



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Participación de la proteína de la familia DUF642 de *Arabidopsis thaliana*,
At2g41800 en la formación y remodelación de la pared celular

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

Alexis Salazar Iribe

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Alicia Gamboa de Buen, Instituto de Ecología, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. Adriana Garay Arroyo, Instituto de Ecología, UNAM
Dr. Luis Felipe Jiménez García, Facultad de Ciencias, UNAM

Ciudad de México. Abril del 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE ECOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Participación de la proteína de la familia DUF642 de *Arabidopsis thaliana*,
At2g41800 en la formación y remodelación de la pared celular

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

Alexis Salazar Iribe

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Alicia Gamboa de Buen, Instituto de Ecología, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. Adriana Garay Arroyo, Instituto de Ecología, UNAM
Dr. Luis Felipe Jiménez García, Facultad de Ciencias, UNAM

Ciudad de México. Abril del 2017



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

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina en su sesión ordinaria del día 14 de noviembre de 2016, aprobó el siguiente jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS**, del Posgrado en Ciencias Biológicas, del alumno **SALAZAR IRIBE ALEXIS** con número de cuenta **509015079**, con la tesis titulada: **"PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA DE LA FAMILIA DUF642 DE *Arabidopsis thaliana* AT2G41800 EN LA FORMACIÓN Y REMODELACIÓN DE LA PARED CELULAR."**, bajo la dirección de la **DRA. ALICIA GAMBOA DE BUEN**:

Presidente:	DRA. SOBEIDA SANCHEZ NIETO
Vocal:	DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL
Secretario:	DRA. ADRIANA GARAY ARROYO
Suplente:	DRA. ROSANA SÁNCHEZ LÓPEZ
Suplente	DRA. ALEJANDRA VÁZQUEZ LOBO YURÉN

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 24 de febrero de 2017

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

A CONACyT por el apoyo recibido con el número de becario 227932

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica Proyectos IN200912-3 y IN207915 y por el proyecto SEP-CONACyT 2010 155074.

Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida

A mi tutora principal, la Dra. Alicia Gamboa de Buen

A mi comité tutorial, la Dra. Adriana Garay Arroyo y al Dr. Luis Felipe Jiménez García quienes contribuyeron con valiosas sugerencias y correcciones

Agradecimientos personales

A mi tutora, la Dra. Alicia Gamboa de Buen por todos estos años de dedicación, constancia, esfuerzo, y a la formación académica fomentada para poder sacar adelante esta etapa tan importante de mi vida.

A los miembros de mi jurado de examen de grado, por sus valiosas correcciones, sugerencias y comentarios:

Dra. Sobeida Sánchez Nieto
Dr. Jorge Luis Folch Mallol
Dra. Adriana Garay Arroyo
Dra. Rosana Sánchez López
Dra. Alejandra Vázquez-Lobo Yurén

A quienes de alguna forma contribuyeron en ésta tesis:

Dra. Karina Jiménez Durán
Dra. Lourdes Teresa Agredano Moreno
Dra. María Berenit Mendoza Garfias
M. en C. Ximena Gómez-Maqueo
Quim. Blanca Estela Hernández Bautista
M en C. Ma. Teresa de Jesús Olivera Flores
M. en C. Laura Márquez Valdelamar

A mis compañeros de laboratorio y amigos con quienes compartí muchas experiencias durante estos años:

Alfredo (Chocks), Humberto, Martín, Elsa, Erik, Ximena, Marimar, Angel, Jorge, Diana, Esther, Luz Elena, Laura, Ale Ro, Alejandra, Juan, Sandra, Rogelio. A mis amigos “frikis” culichis: Bere, Chumel, Emir, Emma, Jair, Joana, Mabel, Marey, Moy, Peke, Cristian y Yamile.

A mi familia por su apoyo incondicional en todo momento:

Hugo, Sirley y Lolita. Ximena, Isabela, Luis Enrique, Marián, Magui y a mi mamá Gloria.

Índice

Índice de figuras.....	3
Resumen	4
Abstract.....	6
Introducción General	8
1.1 La Pared Celular	8
1.2 Polisacáridos de la pared celular	9
1.3 Proteínas de la pared celular	10
1.3.1 Proteínas con actividad enzimática.....	10
1.3.2 Proteínas sin actividad enzimática y señalizadoras	11
1.3.3 Proteínas de función desconocida (DUF).....	12
1.3.4 Proteínas estructurales de pared celular	13
1.4 Dinámica de la pared celular durante la división celular	14
1.4.1 Proteínas de pared celular involucradas en la formación de la placa celular 15	15
1.5 Características particulares de la familia DUF642	16
1.6 Características de At2g41800 (TEEBE)	17
1.8 Desarrollo de las raíces primaria, lateral y adventicia	18
1.9 El hipocótilo como modelo de expansión celular	21
1.10 Crecimiento del hipocótilo en luz y en oscuridad	22
1.11 Interacciones hormonales relacionadas con el control de la elongación del hipocótilo	24
Hipótesis	26
Objetivo general.....	26
1.12 Objetivos Particulares.....	26
Capítulo I. Publicación: The cell wall DUF642 At2g41800 (TEB) protein is involved in hypocotyl cell elongation.....	27-36
1.13 Figuras suplementarias del capítulo I	37-40
Capítulo II. Publicación en preparación: Relación de las proteínas de pared celular DUF642 TEB y BDX con el flujo.....	41-53
Capítulo III. Resultados adicionales	54-60
1.14 TEB se observa intracelularmente durante la mitosis.....	54
1.15 TEB se localiza en células de tricoblastos durante el tratamiento con auxinas y en células dañadas	55
1.16 TEB se expresa y localiza en las células epidérmicas adyacentes a la raíz adventicia durante su protrusión y podría afectar el desarrollo de estas estructuras	58
Discusión general	61-65
Conclusiones.....	66
Bibliografía de la introducción	67-75

Apendice I. Artículo de revisión: Importancia de las pectinas en la dinámica de la pared celular durante el desarrollo vegetal	76-84
Apendice II. Artículo: Cell wall localization in epidermal root cells of the two DUF642 BIIDIX and TEEBE proteins during <i>Meloidogyne incognita</i> early infection.....	85-91
Apendice III. Protocolo para la medición de hipocótilos	93

Índice de figuras

Figura 1. Estructura general de la pared celular primaria	10
Figura 2. Estructura de la raíz de <i>Arabidopsis</i>	20
Figura 3. Etapas tempranas del hipocótilo, durante el desarrollo embrionario	23
Figura 4. Microscopia electrónica de barrido en hipocótilos de plántulas crecidas en condiciones de luz y de oscuridad	24
Figura 5. Localización subcelular de la proteína TEB en células meristemáticas de la raíz sincronizadas con hidroxurea	55
Figura 6. Localización subcelular de TEB durante el desarrollo de pelos radicales y durante el daño celular	57
Figura 7. Expresión, localización subcelular de <i>TEB</i> y fenotipo de raíces adventicias en las plantas mutantes <i>teb-1</i> y de sobreexpresión pTEB::TEB-GFP.....	59

Resumen

Durante el desarrollo de este trabajo se estudió la función del gen de la familia DUF642, *At2g41800* de *Arabidopsis thaliana*, denominado *TEEBE* (“Largo” en lengua mayo-yoreme, a partir de aquí se utilizará *TEB*). Las diferentes proteínas que conforman esta familia han sido descritas en proteomas de pared celular. La composición de la pared celular puede variar entre especies e incluso a lo largo del desarrollo de las plantas, es por eso que el estudio de este compartimento es de gran importancia para lograr entender la dinámica del desarrollo vegetal. En particular, la familia DUF642 tiene características interesantes; es específica de las plantas espermatofitas, está muy conservada y podría estar involucrada en la regulación del grado de esterificación de las pectinas. En el capítulo I se aborda el papel de *TEB* durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* y su relación con las modificaciones en la pared celular, específicamente en el grado de esterificación de las pectinas que es determinante para la elongación del hipocótilo. Para determinar su función durante el desarrollo de la planta, se utilizaron plantas de pérdida (*teb-1* y *teb-2*) y ganancia de función del gen *TEB* (pTEB::*TEB*-GFP). La elongación del hipocótilo crecido en luz y en oscuridad se afectó en estas plantas. Los hipocótilos de las plántulas *teb-1* y *teb-2* son más largos y las células de la epidermis presentan mayor elongación con respecto a la WT. *TEB* se localiza en la pared celular de los hipocótilos. La densidad de pectinas no esterificadas en la pared celular de las células epidérmicas del hipocótilo de *teb-1* y *teb-2* también es menor. Finalmente, demostramos que la proteína *TEB* se localiza en la pared celular de los hipocótilos. Por todo lo expuesto, consideramos que *TEB* está involucrado en la modulación de la elongación del hipocótilo en *Arabidopsis thaliana*, posiblemente mediante la regulación de las PMEs.

En el capítulo II se determinó que *BDX* y *TEB* participan en la elongación del hipocótilo posiblemente a través de la regulación del flujo de auxinas. La participación de las auxinas en la elongación del hipocótilo en respuesta a diferentes estímulos ambientales ha sido ampliamente estudiada. Por otro lado, se ha

demostrado que las auxinas promueven la expresión de *TEB* y de *BIIDXI* (semilla en zapoteco, *BDX*, *At4g32460*), gen de la familia DUF642 involucrado en la producción de semillas. Como en el caso de *TEB*, *BDX* se localiza en la pared celular de los hipocótilos y la mutante *bdx-1* presenta una mayor elongación del hipocótilo en condiciones de luz. Las mutantes *bdx-1*, *teb-1* y *teb-2* son más sensibles a auxinas y al inhibidor de su transporte NPA con respecto a la WT.

Por el contrario, las líneas con mayor expresión de ambos genes son resistentes a auxinas y presentan menor sensibilidad al NPA. Para ver cómo se afecta la concentración de las auxinas debido a la ausencia de *BDX*, hicimos una cruce del marcador de auxinas (*DR5-GUS*) con la mutante de éste gen y encontramos una importante acumulación de auxinas en las células epidérmicas del hipocótilo. Estos resultados sugieren que las modificaciones en la pared celular relacionadas con *BDX* y *TEB* podrían alterar el flujo de las auxinas en las células epidérmicas del hipocótilo.

En el capítulo III se describen resultados adicionales relacionados con la localización subcelular durante el ciclo celular y en los pelos radicales y el fenotipo de raíces adventicias.

Abstract

The aim of this work is the study of the function of the gene *At2g41800* of *Arabidopsis thaliana* from DUF642 family, called TEEBE ("Long" in Mayo-Yoreme language). The different proteins that make up this family have been described in cell wall proteomes. The composition of the cell wall can varied between species and even throughout the plant development, so the study of cell wall is important to understand the dynamics of plant development. In particular, the DUF642 family has interesting features; it is specific to the spermatophytes, is highly conserved and might be involved in regulating the degree of methyl sterification of pectins. In Chapter I the role of *TEB* is addressed during *A. thaliana* development in relation to changes in the cell wall, specifically in the degree of sterification of pectins. To determine *TEB* role during plant development, the mutant (*teb-1* and *teb-2*) and gain of function plants (pTEB::TEB-GFP) were used. Hypocotyl elongation of seedlings grown in light or darkness is affected in these plants. Hypocotyls of *teb-1* and *teb-1* seedlings are longer and their epidermal cells exhibit higher elongation with respect to WT (Wild type). As the degree of methyl sterification of pectins is decisive for hypocotyl elongation, we measured the degree of unesterified pectins in epidermal cells of hypocotyl and foun that it is lower in *teb-1* and *teb-2* mutant plants. Finally, we showed that TEB is located in the cell wall of the hypocotyls. We suggest that *TEB* is involved in modulating hypocotyl elongation in *A. thaliana*, possibly by regulating the methyl sterification of pectins.

In chapter II it was determined that *BDX* and *TEB* participate in hypocotyl elongation possibly through regulating the flow of auxin. The participation of auxin in hypocotyl elongation in response to different environmental stimuli has been widely studied. On the other hand, auxin has been shown to promote expression of *TEB* and *BDX*, a gene from DUF642 family involved in seed production. As in the case of TEB, *BDX* is located in the cell wall of the hypocotyls and *BDX-1* mutant exhibits greater hypocotyl elongation in light conditions. The mutants *bdx-1*, *teb-1* and *teb-2*

are more sensitive to auxin and to auxin transport inhibitor NPA regarding WT. Conversely, lines with higher expression are resistant to auxin and exhibit reduced sensitivity to NPA. In the *bdx-1/DR5-GFP* mutant significant accumulation of auxin in hypocotyl epidermal cells is detected while in WT cells (*DR5-GFP*) no signal is observed as has been previously described by other authors. These results suggest that changes in the cell wall related to TEB and BDX could alter the flow of auxins in the epidermal cells of the hypocotyl.

In Chapter III Additional results related to the subcellular localization during the cell cycle and root hairs and phenotype related to adventitious roots is described.

Introducción General

1.1 La Pared Celular

La pared celular provee de un control morfológico fundamental a las plantas, facilita un amplio rango de funciones biológicas incluyendo la defensa contra diferentes tipos de estrés tanto bióticos y abióticos, permite la comunicación célula-célula y contribuye al transporte de agua y nutrientes (Carpita y McCann, 2000; Sánchez-Rodríguez et al., 2010). En plantas vasculares existen dos tipos de pared celular; una ligera pared primaria y una robusta pared secundaria (Somerville et al., 2004). La pared celular primaria está compuesta de diversos polisacáridos (85-95%) y de proteínas con diferentes funciones (5-15%). La celulosa, hemicelulosa (xiloglucanos) y las pectinas (homogalacturonanos) son los principales tipos de polisacáridos presentes en la pared celular (Figura 1). En cuanto a los polisacáridos, aproximadamente el 25% corresponde a celulosa, otro 25% a hemicelulosa y 35% a pectinas, convirtiendo a este polisacárido en el más abundante de la pared celular primaria. Por otro lado, la pared celular secundaria se caracteriza por ser más gruesa y resistente que la pared primaria y es depositada cuando la elongación celular en los tejido ha finalizado. Presenta un mayor porcentaje de celulosa y su fortaleza y rigidez se debe a la acumulación de lignina (Taiz y Zeigler, 2008).

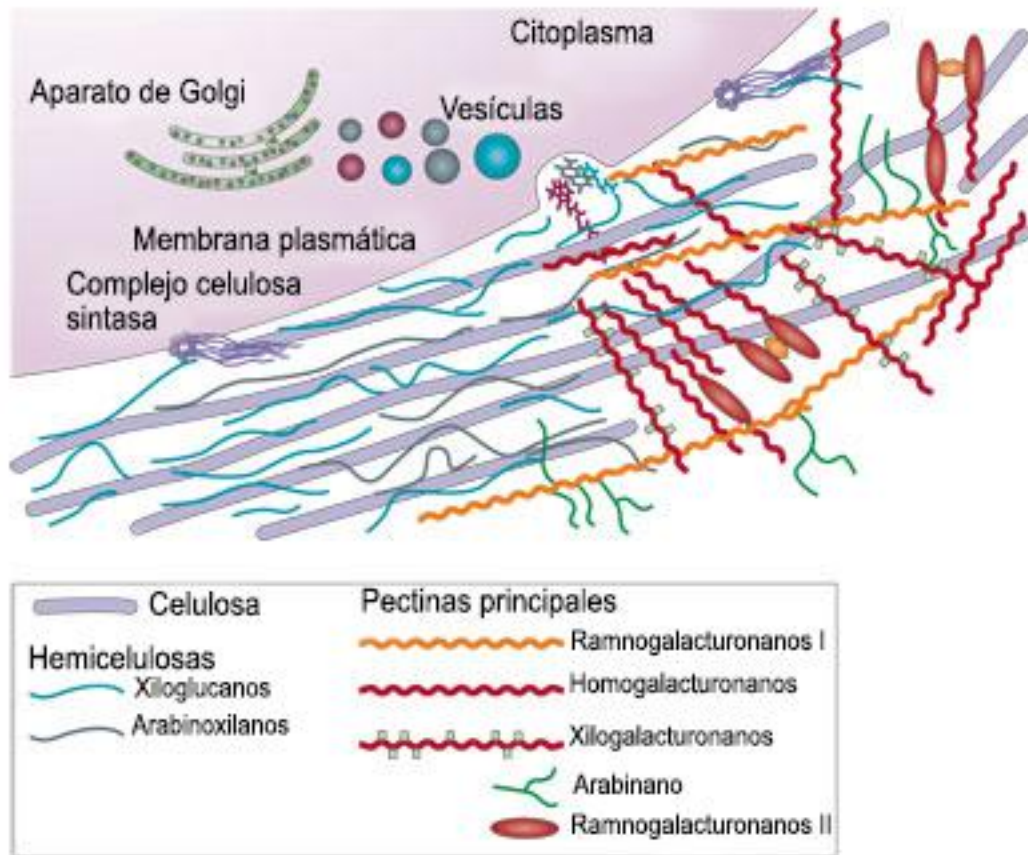


Figura 1. Estructura general de la pared celular primaria. Modificado de Cosgrove 2005.

1.2 Polisacáridos de la pared celular

La celulosa es un polímero de glucosa de cadena lineal que presenta enlaces (1-4) β -D-glucosa y corresponde al polisacárido más abundante y ampliamente distribuido en la pared de plantas, algas y bacterias (Popper y Tuohy, 2010). Las microfibrillas de celulosa, fuertemente empaquetadas, son estructuras rígidas que contribuyen a dar fortaleza y forma a la pared celular. Debido a la disposición paralela de las moléculas de celulosa, las microfibrillas se comportan como cristales, y presentan una gran resistencia a la tensión. Como resultado, las microfibrillas de celulosa

constituyen una estructura muy fuerte y estable para resistir a la degradación (Taiz y Zeiger, 2008). Las hemicelulosas son un grupo heterogéneo de polisacáridos flexibles formados por diferentes hexosas que tienen la característica de unirse a la superficie de la celulosa. Los xiloglucanos constituyen las hemicelulosas más abundantes en las plantas dicotiledóneas. Estas macromoléculas están ampliamente distribuidas en la pared celular de organismos fotosintéticos (Popper y Tuohy, 2010). Estos polímeros pueden formar un lazo que une las microfibrillas de celulosa a una red cohesiva. Algunas hemicelulosas están relacionadas con los procesos de recubrimiento de tejidos dañados (Taiz y Zeiger, 2008). Por otro lado, las pectinas son el mayor componente de la pared celular primaria, representan un gran grupo de polisacáridos complejos que al igual que las hemicelulosas son sintetizados en Golgi y transportados a las pared celular mediante vesículas secretoras (Sterling et al., 2001).

1.3 Proteínas de la pared celular

Alrededor de 400 proteínas de pared celular han sido detectadas en proteomas de pared celular y han sido clasificadas en diferentes categorías con base a la función bioquímica predicha a partir de la identificación de dominios en la secuencia (Jamet et al., 2006). Sin embargo, a las proteínas que presentan dominios singulares a los que no se les ha podido asignar una función, se les ha llamado Proteínas de Función Desconocida (por sus siglas en inglés, “DUF proteins”).

1.3.1 Proteínas con actividad enzimática

En la pared celular también se encuentran proteínas que tienen diferentes actividades enzimáticas como son hidrolasas, que actúan sobre hemicelulosas y pectinas, óxido-reductasas y proteasas

La xiloglucan endotransglicosilasa/hidrolasa (XTH) es una familia de glicosil hidrolasas que transglicosilan al xiloglucano para permitir la elongación de las células. Estas hidrolasas están involucradas en el crecimiento celular, la maduración del fruto y en la movilización de reservas seguido de la germinación en semillas que

acumulan xiloglucanos (Eklöf y Brumer, 2010). En *A. thaliana*, se han descrito 33 genes que codifican para hidrolasas y presentan diferentes patrones de expresión espacio-temporal; esto sugiere que esta familia está involucrada en el cambio de las propiedades de la pared celular relacionados a cada estadio de desarrollo (Becnel et al., 2006; Eklöf y Brumer, 2010).

Por otro lado, la modificación de las pectinas es catalizada por una amplia familia de pectin metil esterasas (PMEs). Las PMEs actúan removiendo grupos metilo situados en los carboxilos del esqueleto de las pectinas; estos carboxilos presentan residuos libres con carga negativa. Los residuos libres pueden promover la unión de iones de calcio (Ca^{++}), que pueden generar una pared celular más rígida (Wolf S y Greiner S, 2002; Hocq et al., 2017). Por otro lado, la liberación de protones por la acción de la PME puede promover la degradación de la pectina por poligalacturonasas (PGs), las cuales son enzimas que también afectan la matriz de pectina. Las PGs promueven la degradación de la pectina y podría ser responsable de diferentes procesos de separación celular. La actividad de las PGs está asociada a la germinación de semillas, a la abscisión de órganos, a la dehiscencia de las anteras, a la maduración del grano de polen, a la maduración del fruto y al crecimiento del tubo polínico (Xiao et al., 2016). En *A. thaliana*, se han identificado 69 genes que codifican para PGs con diferentes patrones espacio temporal. Por ejemplo, *At1g80170* es específico de polen y antera (González-Carranza et al., 2007).

1.3.2 Proteínas sin actividad enzimática y señalizadoras

Las proteínas sin actividad enzimática pueden interactuar con los diferentes polisacáridos o con otras proteínas para modificar las propiedades mecánicas de la pared entre las que se encuentran las expansinas, las proteínas con dominios LRR (PGIPs y AGPs) y los inhibidores de pectin metilesterasa (PMEI). Algunas proteínas presentan, además del dominio de interacción en la pared celular, un dominio con actividad de cinasa. En plantas, existe una subclase de receptores con actividad cinasa que tienen un dominio LRR extracelular y están involucrados en la transducción de señales durante el desarrollo y la defensa (Clark et al., 1997). En los

procesos de señalización también están involucradas las proteínas arabinogalactanas (AGPs), glicoproteínas ricas en hidroxiprolina que están involucradas en adherencia y en defensa.

Las expansinas son proteínas de pared celular que modifican las propiedades mecánicas de las células para permitir la expansión celular mediada por turgencia. Los genes de expansinas están altamente conservados en plantas superiores, y existen cuatro diferentes familias de expansinas en plantas.

Otras proteínas de pared, como la superfamilia LRR incluye proteínas inhibidoras de poligalacturonasas (PGIPs) que están presentes en la pared celular y están involucradas en resistencia a enfermedades (respuesta inmune), así como en crecimiento y desarrollo (Di et al., 2006). Las proteínas con dominios LRR (Leucine Rich Repeat) frecuentemente están implicadas en interacciones proteína-proteína y se localizan en los diferentes compartimentos subcelulares (Kajava, 1998).

Por otro lado, hay proteínas que pertenecen a la familia de inhibidores de invertasas (INHs) y que funcionan como inhibidoras de PMEI. Los PMEIs comparten con los INHs un dominio que se caracteriza por tener residuos de cisteína conservados que pueden formar dos enlaces bisulfuro (Juge, 2006).

1.3.3 *Proteínas de función desconocida (DUF)*

Aproximadamente del 5 al 30% del total de proteínas detectadas en diferentes proteomas de pared celular, especialmente en cultivos de células en suspensión, han sido descritas y clasificadas como hipotéticas, expresadas, putativas, desconocidas o con un dominio de función desconocido (DUF). Ocho familias de proteínas DUF (DUF26, DUF231, DUF246, DUF248, DUF288, DUF642, DUF1005, DUF1680) están representadas por uno o más miembros en los proteomas de pared celular (Mewalal et al., 2014).

La familia de proteínas DUF26 es específica de plantas y está compuesta de 40 miembros en *Arabidopsis*. Algunas de estas proteínas están involucradas en la resistencia a patógenos y son inducidas transcripcionalmente por estrés oxidativo y

ataque por patógenos (Wraczeck et al., 2010).

El DUF231 está presente en las proteínas de la familia TRICHOME BIREFRINGENCE/TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE (TBR/TBL), que cuenta con 46 miembros en *Arabidopsis*. Se ha descrito que esta familia está involucrada en la biosíntesis de celulosa; la mutante *tbr* presenta un decremento en los niveles de celulosa cristalina en los tricomas y en el tallo (Bischoff et al., 2010). La pérdida de *TBR* también produce un incremento en la actividad de PME y un fenotipo de hipocótilos largos (Bischoff et al., 2010).

1.3.4 *Proteínas estructurales de pared celular*

Las proteínas estructurales contribuyen a fortalecer las propiedades físicas de la pared celular. En estas proteínas se incluyen las proteínas ricas en glicina, proteínas ricas en prolina, y las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (Nguema-Ona et al., 2014).

Las extensinas han sido el único grupo de proteínas estructurales detectado en proteomas de pared celular. Las extensinas se caracterizan por presentar repeticiones de secuencias Ser-Hip-Hip-Hip-Hip y pueden presentar hasta 46% de Hip. Generalmente solo presentan residuos de Ser, His, Tir y Lis además de la Hip (Showalter, 1993; Kieliszewski y Lamport, 1994; Liu et al., 2016). Algunos residuos de Tir pueden formar puentes intra o inter moleculares por medio de un enlace difenil-éter. Este enlace es formado por la acción de una peroxidasa (Brady y Fry, 1997; Brady et al., 1998). Estos puentes entre las tiroxinas permiten la formación de una red de extensina que atrapa a las fibras de celulosa regulando el crecimiento al aumentar la rigidez de la pared celular. Las extensinas también pueden estar involucradas en la resistencia a patógenos (Showalter y Basu, 2016). Por otro lado, la interacción entre extensinas y pectinas también ha sido reportada, sin embargo, su función no es clara (Qui et al., 1995).

1.4 Dinámica de la pared celular durante la división celular

La formación de la placa celular, precursora de la nueva pared celular durante la citocinesis es fundamental para la separación de las dos células hijas. La orientación y ensamblaje de la placa celular depende del establecimiento preciso de la banda de la preprofase y el fragmoplasto, dos arreglos de microtúbulos que son específicos de plantas. Durante la formación de la placa celular, el primer componente en depositarse es la calosa que provee el marco para los siguientes materiales de la pared (Samuels et al., 1995). Las pectinas parcialmente esterificadas se depositan posteriormente a través de vesículas derivadas de *Golgi* y por medio de exocitosis hacia la pared celular (Mohnen et al., 2008). El material endocitado de la superficie celular de la célula parental también contribuye a la formación de la placa celular con los ramnogalacturonanos II y con homogalacturonanos, parcialmente esterificados (Dhonukshe et al., 2006). Esta estructura también provee la base para la lámina media, el “pegamento” intercelular que mantiene unidas a las células entre sí.

Durante la maduración de la placa celular, la celulosa es sintetizada por el complejo de la celulosa sintasa (CESA) en la membrana plasmática y grandes proporciones de hemicelulosa, producidas en el aparato de Golgi, son depositadas en la pared celular (Sánchez-Rodríguez et al., 2010). Esta celulosa representa el principal elemento de soporte de carga. Este proceso también promueve el control de las propiedades mecánicas de la pared celular ya que para que se lleve a cabo la elongación celular de la célula parental es necesaria la relajación de la nueva pared celular, y forma una fuerte malla de fibras que moldea la forma de la célula bajo presión de turgencia (Bringmann et al., 2012). El transporte de material de la pared celular como calosa, xiloglucanos y pectinas se realiza por medio de vesículas provenientes de Golgi a través de los microtúbulos. Las vesículas secretadas que acarrearán estos polisacáridos son después acumuladas en la placa celular (Toyooka et al., 2009). Básicamente, la formación de la placa celular depende de manera importante de la internalización de material proveniente de la pared celular parental. su estructura (Baluska et al., 2005). El proceso de endocitosis de las

pectinas también ha sido descrito en otros procesos donde una rápida elongación es esencial, tal es el caso de los pelos radicales y en el crecimiento del tubo polínico (Holdaway-Clarke et al., 2003).

1.4.1 *Proteínas de pared celular involucradas en la formación de la placa celular*

En la banda de la preprofase y en el fragmoplasto se han descrito proteínas que están involucradas tanto en la organización y el establecimiento del plano de división como en la formación de la placa celular (McMichael y Bednarek, 2013). KORRIGAN (KOR) es una endo 1,4- β -D-glucanasa que se localiza principalmente en la membrana plasmática, que podría participar en el acomodo de las microfibrillas de celulosa, en la interfase membrana-pared celular. Las mutantes *kor1* y *kor2* presentan problemas de elongación celular en raíz e hipocótilo, posiblemente debido al depósito inadecuado de la celulosa durante el ensamblaje de la nueva pared celular (Zuo et al., 2000; Lane et al., 2001; Vain et al., 2014). AtEXT3/RSH es una extensina involucrada en el ensamblaje de la pared celular y en la orientación del plano de división, se localiza en la placa celular y en la pared celular parental (Cannon et al., 2012). Las extensinas se acumulan en las intersecciones entre la orilla de la placa celular y la región de la pared celular parental (Drakakaki 2015) y se ha demostrado que una mutante knock out de extensina (*EXTENSIN3, root-shoot-hypocotyl-defective*), es letal y exhibe paredes celulares incompletas (Hall y Cannon, 2002; Cannon et al., 2008).

Los arabinogalactanos son componentes importantes de las proteínas estructurales denominadas proteínas arabinogalactanos que se unen al colorante sintético β -glicosil Yariv (Yariv y Katchalski, 1967). Estas proteínas participan en la división celular y se ha demostrado que se acumulan en la placa celular madura de las células meristemáticas de la raíz de *Arabidopsis* ha sido detectada mediante el anticuerpo monoclonal LM14 específico (Rybak et al., 2014). En zigotos y proembriones de cultivos de tabaco, las células tratadas con este reactivo presentan una división celular aberrante donde la placa celular contiene una menor cantidad de arabinogalactanos (Yu et al., 2012).

1.5 Características particulares de la familia DUF642

Los genes que codifican proteínas DUF han sido descritos en todos los genomas secuenciados. Las proteínas de la familia DUF642 están muy conservadas y son específicas de espermatófitas (Vázquez-Lobo *et al.*, 2012). Miembros de esta familia han sido identificados en dicotiledóneas, monocotiledóneas y en angiospermas basales como *Amborella*, y también en especies de gimnospermas. La gran diversificación de esta familia en plantas espermatófitas y el alto grado de conservación de la secuencia de aminoácidos entre los diferentes miembros sugieren un papel relevante en la evolución de las plantas superiores. La mayoría de las proteínas de esta familia presentan un péptido señal y un dominio DUF642 que está constituido por aproximadamente 330 residuos de aminoácidos. El péptido señal está en la región amino terminal. Las proteínas DUF642 se han detectado principalmente en proteomas de pared celular de diferentes tejidos y de diferentes especies de plantas como *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera* y *Oryza sativa* (Jamet *et al.*, 2006, 2008; Negri *et al.*, 2008). Las proteínas DUF642 que se han detectado en proteomas de membrana presentan, además del péptido señal y del dominio DUF642, una secuencia de 60 aminoácidos en la región carboxilo terminal con un sitio de reconocimiento para GPI (Vázquez-Lobo *et al.*, 2012). En *A. thaliana*, se han identificado diez miembros de esta familia y los siete descritos en proteomas de pared celular derivados de tejidos vegetativos, cultivos de células en suspensión y fluidos apoplásticos corresponden a los genes *BIIDX1* (*BDX*, *At4g32460*), *TEEBE* (*TEB*, *At2g41800*), *At5g11420*, *At5g25460*, *At3g08030*, *At1g08040* y *At2g41810* (Borderies *et al.*, 2003; Boudart *et al.*, 2005; Minic *et al.*, 2007; Bayer *et al.*, 2006; Irshad *et al.*, 2008). A pesar de ser una de las familias más representadas en los diferentes proteomas de pared celular, existen pocos estudios relacionados con su función. Aunque se ha descrito que las proteínas DUF642 *BDX* y *At5g11420* interactúan *in vitro* con una pectin metilesterasa (*AtPME3*, *At3g14310*) (Zúñiga-Sánchez, 2007; Zúñiga-Sánchez y Gamboa-deBuen 2012) y que la proteína *At3g08030* interactúa con celulosa (Vázquez-Lobo *et al.*, 2012) no se ha establecido la función bioquímica del dominio DUF642. Por otro lado, utilizando plantas

transgénicas y mutantes se ha demostrado que *At5g25460* participa en el crecimiento de la raíz (Gao et al., 2012) y *BDX* en el desarrollo de la silicua y la semilla (Zúñiga-Sánchez et al., 2014). Las mutantes *bdx-1* y *bdx-2* presentaron vainas cortas con un número menor de semillas y una disminución en la actividad de PME con respecto a las plantas WT. Por el contrario, la actividad de PME se incrementó en las plantas de sobreexpresión, cuyas semillas tuvieron un mejor desempeño germinativo.

1.6 Características de *At2g41800* (TEEBE)

Filogenéticamente el gen *At2g41800*, denominado *TEEBE* (“Largo” en lengua mayoyoreme, a partir de aquí se utilizará *TEB*), este gen es resultado de una duplicación génica en el ancestro de las angiospermas (Vázquez-Lobo et al., 2012). La proteína codificada por el gen *TEB* ha sido descrita únicamente en proteomas de pared celular de células en suspensión incluyendo un proteoma de plasmodesmos derivado de estas células (Fernández- Calvino et al., 2011). En el laboratorio hemos determinado el patrón de expresión espacio-temporal de *TEB* utilizando plantas transgénicas que expresan *GFP-ER* bajo la posible región promotora de *At2g41800* (*pTEB::GFP-ER*), cuyo tamaño es de 890 pares de bases (Salazar-Irribé, 2011). En las raíces primaria y lateral, este gen se expresa principalmente en el cortex y en la epidermis de la zona meristemática. En la zona de diferenciación, *TEB* se expresa en las células epidérmicas que subyacen a la emergencia de la raíz lateral. En la parte aérea, *TEB* se expresa en el hipocótilo y en la papila estigmática del carpelo de las flores en etapa 12. En la raíz primaria de las plantas transgénicas, las auxinas inducen la expresión de *TEB* desde los 10 minutos de exposición a la hormona tal como ha sido descrito en los transcriptomas (Ogawa et al., 2003) Durante la inducción de callo de raíces de plantas transgénicas, la expresión de *TEB* se detectó en las células epidérmicas que subyacen a la estructura emergente tal como se observó durante la protrusión de la raíz lateral sugiriendo que este gen es parte de este programa de desarrollo (Salazar-Irribé, 2011). *TEB* es uno de los genes que presentan un mayor incremento en su expresión desde el inicio de la inducción de callo (Che et al., 2006). Recientemente se ha descrito que la formación del callo es un

proceso de reprogramación a partir de las células de periciclo (*pericycle like cell*) del tejido vascular de todos los tejidos (Che et al., 2006).

1.7 Desarrollo de las raíces primaria, lateral y adventicia

Las raíces son órganos fundamentales en las plantas vasculares, ya que permiten tener un anclaje seguro al suelo para poder absorber agua, minerales y nutrientes. La formación de distintos tipos de raíces organizados en una variable configuración espacial es resultado de la plasticidad de la morfología en las plantas (Verstrartaeten et al., 2014). En general, el sistema de la raíz está compuesto de dos tipos de raíces: la raíz primaria (RP), la cual se forma durante la embriogénesis, y las raíces laterales (RLs) formadas de manera post embrionaria y que se derivan de la RP (Celenza et al., 1995). Las plantas también pueden desarrollar raíces adventicias (RAs), las cuales emergen de un tejido diferente a la raíz, es decir, de los tallos o de hojas (Geiss et al., 2009).

La organogénesis de la raíz ha sido ampliamente estudiada en la planta modelo *A. thaliana* (Malamy y Benfey, 1997; Péret et al., 2009), originalmente en dos dimensiones (Malamy y Benfey, 1997) y recientemente con estudios tridimensionales (Lucas et al., 2013). La raíz de *A. thaliana* tiene una estructura concéntrica simple (Figura 2). El patrón radial de la raíz presenta la cofia lateral y la epidermis como las capas más externas. Las capas internas corresponden al cortex y la endodermis siendo las más internas el periciclo y el tejido vascular. Esta estructura es resultado de un balance entre la división celular y la diferenciación. Las células de CQ presentan una división celular lenta. El CQ, rodeado por células iniciales, constituye el “nicho de células madre” (SCN). En *A. thaliana* existen cuatro grupos de células madre: las iniciales de la epidermis/cofia lateral, las iniciales de la columela, las iniciales de cortex/endodermis y las iniciales del periciclo y del tejido vascular (Scheres et al., 2002).

A lo largo del eje longitudinal, la raíz está compuesta por tres zonas de desarrollo: el meristemo, la zona de elongación y la zona de diferenciación en la cual las células maduran y donde se encuentran los tricoblastos (Figura 2, Lee et al., 2012)

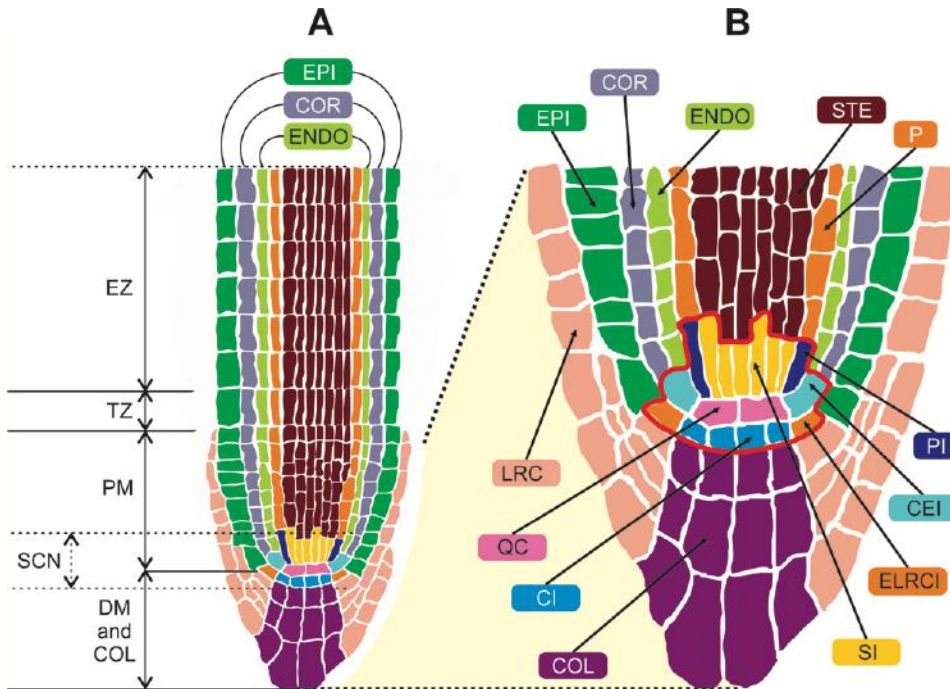


Figura 2. Estructura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. (A) Sección longitudinal esquemática de la raíz de *A. thaliana*. Los tres tipos de zonas de desarrollo: la zona meristemática (MZ), la zona de transición (TZ), y la zona de elongación (EZ) se señalan. La zona meristemática puede dividirse en, meristemo distal (DM) y el meristemo proximal (PM). En la zona meristemática también se encuentra el “nicho de células madre” (SCN), que consiste en el centro quiescente (QC) y las células iniciales (células madre). (B) Sección longitudinal esquemática del ápice de la raíz de *A. thaliana*. El área marcada con línea roja muestra el SCN. Alrededor del QC, hay cuatro células iniciales (células madre de la raíz). QC, centro quiescente (rosa); CEI, iniciales del cortex/endodermis (azul claro); ELRCI, iniciales de la epidermis/cofia lateral (anaranjado); CI, iniciales de la columela (azul cielo); SI, iniciales de la estela (amarillo); LRC, cofia lateral (rosa claro); EPI, epidermis (verde); COR, cortex (gris); ENDO, endodermis (verde claro); STE, estela (café). Modificado de Lee et al., 2012.

La RL de *A. thaliana* se origina exclusivamente a partir de un par de células del periciclo (células fundadoras) opuestas al polo del xilema (De Smet *et al.*, 2007; Lucas *et al.*, 2008). Las células del periciclo, de manera individual o en pares, presentan varias rondas de divisiones celulares de tipo anticlinal, para formar una capa de más de diez células pequeñas de igual tamaño (Malamy y Benfey, 1997). A continuación, las células se dividen periclinamente, formando una capa interna y

otra externa. Las divisiones anticlinales y periclinales forman un primordio con forma de domo (Malamy y Benfey, 1997; Dubrovsky et al., 2001), lo que se traduce en un nuevo órgano similar a la raíz primaria en términos de organización celular (Atkinson et al., 2014).

Los primordios de raíz lateral de *Arabidopsis* deben emerger a través de las capas celulares de endodermis, cortex y epidermis de la raíz parental. Este proceso es promovido por las auxinas derivadas del tejido aéreo (Bhalerao et al., 2002; Swarup et al., 2008) que son conducidas hacia el primordio recién formado, vía los transportadores PIN3 y LAX3, de eflujo e influjo, respectivamente (Swarup et al., 2008; Péret et al., 2013). Este patrón dinámico de la expresión de los transportadores de auxinas funciona para movilizar y acumular auxinas en un subgrupo de células de cortex y epidérmicas que subyacen a la zona de emergencia del primordio de la RL (Atkinson et al., 2014). La auxina induce la expresión de genes que codifican para enzimas remodeladoras de la pared celular, tales como la *AtPME1*, la Alfa Expansina *AtEXP1* y las Pectin Liasas *AtPLA1* y *ATPLA2*, cuando el primordio está a punto de emerger, sugiriendo un papel de la pared celular en la separación del cortex y la epidermis durante la emergencia (Neuteboom et al., 1999; Laskowski et al., 2006; Swarup et al., 2008; Lee et al., 2013; Vilches-Barro y Maizel, 2015). En este proceso las pectinas también pueden ser degradadas por PGs. Las auxinas activan la expresión del gen *PG ABCISSION ZONE ARABIDOPSIS THALIANA (PGAZAT)* detectado en las células corticales y de la epidermis rodeando la emergencia del primordio de raíz lateral (González-Carranza et al., 2007).

En contraste con las RLs, las RAs se desarrollan a partir de diferentes tejidos y consecuentemente de diferentes tipos celulares. Las RAs pueden desarrollarse como consecuencia del programa de desarrollo de la planta (como en monocotiledóneas y dicotiledóneas propagadas vegetativamente de manera natural), o inducidas artificialmente por daño o aplicación de hormonas (Bellini et al., 2014).

Las RA pueden desarrollarse a partir de células del periciclo, del floema o de las células parenquimáticas del xilema, de células jóvenes del floema secundario, o de las células interfasciculares del cambium cercanas a las células del floema (Bellini et

al., 2014). Particularmente, en *Arabidopsis* las RAs se forman en hipocótilo a partir de las células del periciclo adyacentes al polo del xilema, de manera similar a la formación de RLs (Boerjan et al., 1995; Sukumar et al., 2013), de los tejidos vasculares (cambium y tejidos adyacentes) en hipocótilos de plántulas maduras con crecimiento secundario cuya raíz ha sido removida y de los tejidos vasculares o de los tallos cortados.

Los estadios de desarrollo de las RAs de plantas dicotiledóneas propagadas vegetativamente (anuales o perenes) no han sido completamente descritos como en las RLs. El desarrollo de las RAs ha sido dividido en tres fases fisiológicas sucesivas pero independientes: la fase de inducción, la cual precede cualquier evento histológico; la fase de iniciación, donde la división celular conduce a la formación del meristemo interno de la raíz; y la fase de expresión, que corresponde al crecimiento interno del primordio de la RA y protrusión de ésta (De Klerk et al., 1999).

1.8 El hipocótilo como modelo de expansión celular

Los hipocótilos de plántulas dicotiledóneas han sido utilizados ampliamente para el estudio fisiológico de los mecanismos de elongación celular y de la variedad de eventos biológicos que participan en su control (Cosgrove, 1994; Reid y Howell, 1995; Gendreau et al., 1997). Se considera al hipocótilo como un órgano embrionario, se sitúa entre los cotiledones y la raíz primaria (Figura 2); este tejido inicia su diferenciación a partir del estadio embrionario de corazón (Taiz y Zeigler, 2008). El hipocótilo de *Arabidopsis* tiene una anatomía simple, que consiste en varias capas de células concéntricas en sección transversal (Boron y Vissenberg, 2014). La capa celular epidérmica rodea a dos capas de células corticales, las células corticales externa e interna. Debajo de las células del cortex se localiza la endodermis, el periciclo y el tejido vascular (Derbyshire et al., 2007a).

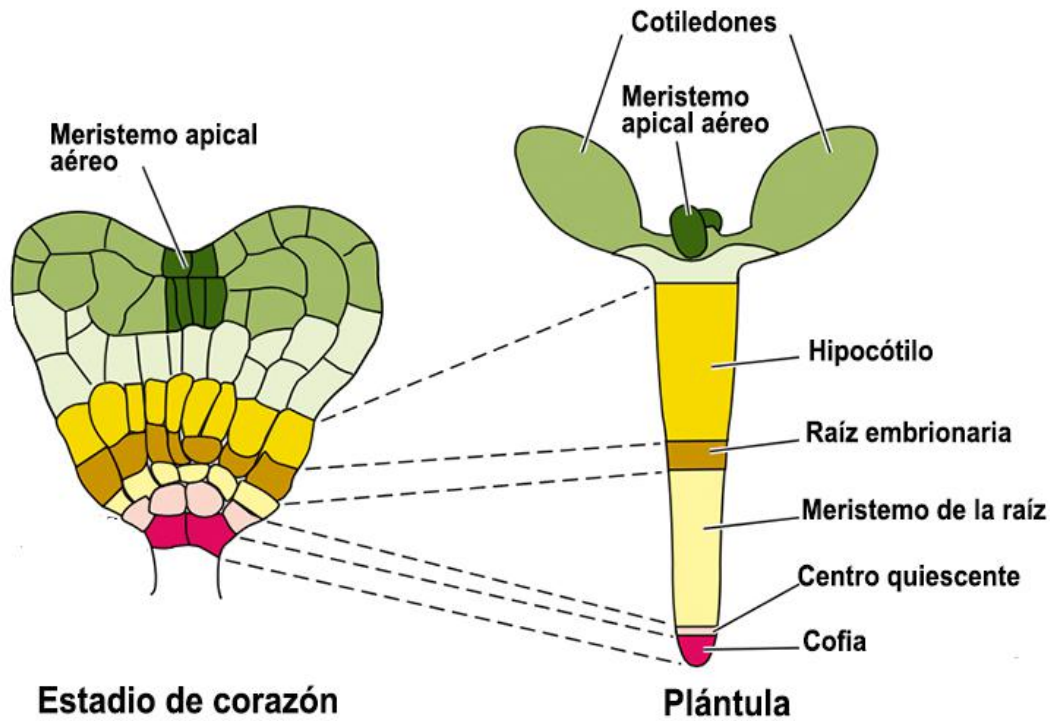


Figura 3. Etapas tempranas del hipocótilo, durante el desarrollo embrionario. Modificado de Taiz y Zeigler, 2008.

1.9 Crecimiento del hipocótilo en luz y en oscuridad

En general, los hipocótilos presentan distinto patrón de crecimiento en la luz y en la oscuridad (fotomorfogénesis y escotomorfogénesis, respectivamente). En luz, el crecimiento del hipocótilo es reducido, y los cotiledones se abren y expanden. En oscuridad, los hipocótilos de plántulas elongan hasta diez veces más que en luz. Además, las plántulas etioladas forman un gancho apical (una curvatura en la parte superior del hipocótilo), cerca de los cotiledones y una reducción del tamaño de la raíz. Estos comportamientos han sido descritos en diferentes plantas como girasol, y chícharo, pero la mayoría de los estudios se han realizado en *A. thaliana* (Cosgrove 1994; Quail et al. 1995).

La luz tiene influencia sobre las características morfológicas de las células epidérmicas del hipocótilo. Las filas de células epidérmicas en hipocótilos crecidos en luz presentan bordes característicos (Figura 4A), los cuales no se observan durante la escotomorfogénesis (Figura 4B). Durante la fotomorfogénesis se observan más de dos rondas de endoreduplicación, mientras que en la escotomorfogénesis ocurre una tercera ronda. Las células epidérmicas no se diferencian en los hipocótilos etiolados (Nemhauser y Chory 2002).

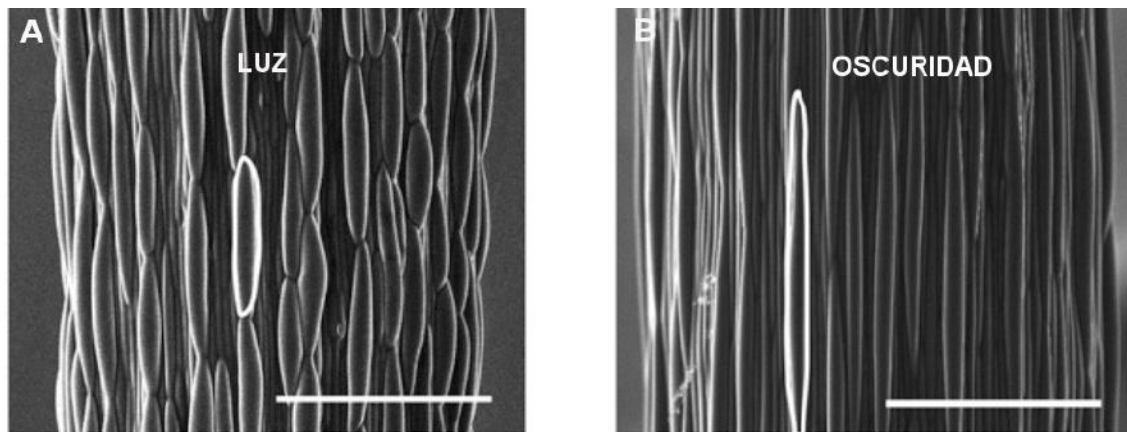


Figura 4. Microscopía electrónica de barrido en hipocótilos de plántulas crecidas en condiciones de luz y de oscuridad. (A) Hipocótilo crecido en condiciones de luz, muestra bordes característicos en sus células. (B) Hipocótilo crecido en condiciones de oscuridad, muestra una superficie sin bordes con células alargadas. Barra= 50 μ m. Modificado de Procko et al., 2014.

La elongación de las células epidérmicas y del cortex a lo largo del hipocótilo crecido en luz tiene un ritmo diferente al observado en la escotomorfogénesis. En la luz, todas las células epidérmicas elongan continuamente durante el periodo de crecimiento completo y el hipocótilo alcanza su máxima velocidad de crecimiento entre los tres y los cinco días después de la germinación, lo cual equivale a 0.3-0.4 mm por día, mientras que en hipocótilos crecidos en oscuridad, la máxima velocidad de crecimiento es 10 veces mayor (Gendreau et al., 1997). En las primeras sesenta horas posteriores a la germinación en condiciones de luz, la pared celular de las células epidérmicas basales del hipocótilo se engrosa como consecuencia de una acumulación de microfibrillas de celulosa posiblemente favorecida por el bajo grado de esterificación de las pectinas. Una disminución en la elongación del hipocótilo

está asociada a un aumento en la actividad de PME; las líneas de sobreexpresión de *AtPME1* y en las mutantes de *TRICHOME BIREFRINGENCE (TBR)*, los hipocótilos son más cortos (Derbyshire et al., 2007b; Bischoff et al., 2010). Posteriormente, un reacomodo de estas microfibrillas determina una disminución en el grosor de la pared durante la elongación celular (Derbyshire et al. 2007a). Alteraciones en la elongación de los hipocótilos crecidos en luz han sido descritas en mutantes de *CESA's*. La expansión celular en los hipocótilos etiolados es bifásica (Refrégier et al., 2004). En la primera fase, todas las células elongan lentamente y de manera sincrónica con un rango de crecimiento de <0.1 mm/h. A las 48 h después de la inducción de la germinación, la aceleración del crecimiento ocurre únicamente en las células más cercanas a la base del hipocótilo (Boron y Vissenberg 2014). Esta aceleración en el crecimiento se propaga a través del hipocótilo, desde la base hacia la zona cercana a los cotiledones. Análisis de microarreglos realizados antes, durante y después del cambio en la velocidad de la elongación indican una disminución en la expresión de genes ribosomales, un incremento en el número de genes regulados por auxinas y en los que codifican para proteínas modificadoras de pared celular durante el cambio de velocidad. Este último grupo consiste en expansinas, xiloglucan endo transglucosilasa/hidrolasas (XTHs), proteínas arabinogalactanos (AGPs) y 14 enzimas modificadoras de pectinas (Pelletier et al., 2010).

1.10 Interacciones hormonales relacionadas con el control de la elongación del hipocótilo

El transporte de auxinas juega un papel importante en la elongación de los hipocótilos en condiciones de luz pero no en la oscuridad (Jensen et al., 1998). La aplicación de la misma concentración de auxina a plántulas crecidas en luz puede inhibir o estimular la elongación del hipocótilo según las condiciones de crecimiento (Jensen et al., 1998; Smalle et al., 1997, Lincoln et al., 1990). Con base en estas observaciones, se ha sugerido que el nivel endógeno de auxina en las plántulas es óptimo para la elongación (Vandenbussche et al., 2003; Collett et al., 2000) y se ha visto que las condiciones limitantes de luz y alta temperatura promueven la

elevación del nivel de IAA libre en las células epidérmicas de los hipocótilos y su elongación (Yamada et al., 2009). El modelo actual para el crecimiento inducido por condiciones limitantes de luz (Sombra) explica que las auxinas sintetizadas *de novo* se producen en los cotiledones, son transportadas hacia el hipocótilo por el tejido vascular y finalmente llegan hasta las células epidérmicas del hipocótilo donde estimulan la elongación de este órgano (Tao et al., 2008; Petrusek y Friml, 2009; Keuskamp et al., 2010; Procko et al., 2016). En la mutante de biosíntesis de auxinas *sav3* (Shade avoidance deficient 3), que no sintetiza rápidamente IAA en respuesta a sombra y/o a altas temperaturas se retarda la elongación del hipocótilo (Tao et al., 2008; Stepanova et al., 2008; Yamada et al., 2009). Por otro lado, la mutante *vas2* (IAA-amido sintetasa *Gretchen Hagen 3 (GH3).17*), presenta hipocótilos largos en condiciones de crecimiento control debido a que presenta un alto nivel de IAA libre y activa en las células epidérmicas de los hipocótilos en comparación a las plántulas silvestres. *vas2* es una mutante de una IAA-amido sintetasa, que es una enzima que participa en la inactivación del IAA libre (Zheng et al., 2016). Recientemente se ha descrito que la acumulación de auxinas en la epidermis coordina la elongación del hipocótilo, tanto en *Arabidopsis* como en *Brassica napa* (Procko et al., 2016).

Por otro lado, las giberelinas pueden estimular la elongación del hipocótilo tanto en luz como en oscuridad (Saibo et al., 2003). En el hipocótilo de *Arabidopsis*, se ha relacionado la elongación celular y el nivel de esterificación de las pectinas con la participación de las giberelinas. La mutante enana deficiente de ácido giberélico (AG), *ga1-3* muestra un bajo grado de esterificación (GE%) en comparación a las plantas silvestres. La aplicación exógena de AG induce el crecimiento de la mutante *ga1-3* (*GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE 1-3*) y se recupera el GE% obtenido en las plantas silvestres, lo cual significa que el GE% óptimo de las pectinas contribuye a la elongación de la pared celular. Cuando el nivel de desmetil esterificación es menor al óptimo, la plasticidad de la pared celular decrece y se inhibe el crecimiento del hipocótilo (Derbyshire et al., 2007b).

Hipótesis

La proteína At2g41800 se localiza en las regiones de la pared celular que presentan una alta proporción de pectinas poco esterificadas y su función está relacionada con la integridad de la pared celular en estas regiones.

Objetivo general

Determinar el papel del gen de la familia DUF642 de *Arabidopsis thaliana* *At2g41800*, durante el desarrollo vegetal en función de la remodelación de la pared celular.

1.11 Objetivos Particulares

1. Determinación de la localización subcelular, por medio de microscopía confocal y microscopía electrónica, de la proteína codificada por *At2g41800* de raíces de las plantas transgénicas sometidas a las diferentes condiciones: tratamiento con hormonas, inducción de callo e infección con *M. incognita*.
2. Determinación de la función de *At2g41800* utilizando plantas transgénicas.
3. Determinación de la participación de los genes *TEB* y *BDX* durante la elongación del hipocótilo a través de la regulación del flujo de auxinas

CAPÍTULO I. ARTÍCULO:
The cell wall DUF642 At2g41800 (TEB) protein is involved in
hypocotyl cell elongation

En este capítulo se describe la participación de *TEB* durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*, específicamente durante la elongación del hipocótilo y su posible relación con las modificaciones de las pectinas de la pared celular de las células epidérmicas. El capítulo engloba al objetivo general de esta tesis y en particular, a los objetivos 1 y 2.



The cell wall DUF642 At2g41800 (TEB) protein is involved in hypocotyl cell elongation



Alexis Salazar-Irribé^a, Lourdes Teresa Agredano-Moreno^b, Esther Zúñiga-Sánchez^a, Luis Felipe Jiménez-García^b, Dr. Alicia Gamboa-deBuen^{a,*}

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

^b Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CP. 04510, México DF, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 May 2016

Received in revised form 10 October 2016

Accepted 12 October 2016

Available online 13 October 2016

Keywords:

Arabidopsis thaliana

Cell wall

DUF642 proteins

Hypocotyls

Pectin

ABSTRACT

In plants, the cell wall is a complex and dynamic structure comprising high molecular weight carbohydrates and proteins. The cell wall plays an important role in several stages of the plant life cycle, including cell division, elongation and differentiation. The DUF642 family of cell wall proteins is highly conserved in spermatophytes and might be involved in pectin structural modifications. Particularly, *At2g41800* is one of the most highly induced genes during the M/G1 phases of the cell cycle, and the protein encoded by this gene has been detected in cell wall proteomes of cell suspension cultures. In the present study, the expression of *At2g41800* (*TEB*) was confirmed in primary and lateral roots, stigmatic papillae and hypocotyls. Subcellular localization studies showed that *TEB* is located in the cell wall. The root length and lateral root density were not affected in either of the two *teb* mutants studied, but the length of the hypocotyls from seedlings grown under light and dark conditions was increased. Immunogold labelling studies using JIM5 antibodies on sections of hypocotyl epidermal cells showed an important reduction of gold particles in *teb* mutants. The results suggested that *TEB* is involved in hypocotyl elongation.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cell growth in plants is highly regulated according to the composition and properties of the cell wall. Cell division and cell expansion processes require changes in the cell wall composition as well as the deposition of new material [1]. The plant cell wall is a dynamic structure comprising high molecular weight carbohydrates and proteins with known and unknown functions. The relevance of these protein interactions and functional studies of putative cell wall proteins of unknown function has recently been highlighted [2].

The DUF642 family is a highly conserved family of cell wall-related proteins specific to spermatophytes. The phylogenetic tree

of this family retrieved 4 clades: clade A, which includes cell wall proteins with a signal peptide and a DUF642 domain, and clades B, C, and D, which include DUF642 proteins localized to the membrane based on the presence of a GPI anchor site. The DUF642 domain has structural similarities to carbohydrate binding domains. The At3g08030 protein, present in cell wall proteomes from different tissues, interacts *in vitro* with cellulose and hemicellulose [3]. Recent studies also suggested that the DUF642 family of proteins could be involved in pectin structural modifications. Proteins encoded by *BIIDXI* (*BDX*, *At4g32460*) and *At5g11420* interact *in vitro* with AtPME3, a pectin methyl esterase (PME) from *Arabidopsis thaliana* involved in different plant developmental processes [4]. *BDX* positively regulates PME activation during *Arabidopsis* seed germination and silique development. Germination parameters are improved in the seeds of plants overexpressing *BDX*, and a positive correlation was observed between the increase in testa rupture velocity and PME activity. A reduction in total PME activity was detected in *bdx* heterozygous mutants, in which siliques were short with few seeds [5]. An increase in PME activity was also detected in the leaves of *Vitis quinquangularis* plants overexpressing VqDUF642, which is involved in berry development and pathogen resistance [6].

Abbreviations: AtPME3, *Arabidopsis thaliana* pectin methyl esterase 3; *BDX*, *BIIDXI* (*At4g32460*); BSA, bovine serum albumin; CIM, callus induction medium; DIC, differential interference contrast; DMSO, dimethyl sulfoxide; DUF, domains of unknown function; DGR, DUF642 L-GalI responsive gene; GFP, green fluorescence protein; HG, homogalacturonan; HU, hydroxyurea; MS, Murashige and Skoog medium; NGS, normal goat serum; PLA, pectate lyase; PME, pectin methyl esterase; PG, polygalacturonase; RT-PCR, reverse transcription-PCR; *TEB*, (*At2g41800*); TBS, tris-buffered saline.

* Corresponding author.

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

<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.10.007>

0168-9452/© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Functional studies with the DUF642 protein DGR2 (DUF642 L-GalI Responsive Gene2, *At5g25460*), present in cell proteomes from suspension cells and hypocotyls, indicate the participation of this gene in seedling development. The *dgr2* mutants showed shorter root and smaller rosettes compared with WT. Based on the results, the authors suggested that DGR2 might play a role in cell wall pectin dynamics [7].

Pectins are the most structurally complex family of polysaccharides in nature, and homogalacturonan (HG), a linear β -1,4-linked GalA homopolymer, is the most abundant pectic polysaccharide. The methyl-esterification status of HG, based on pectin methyl-esterase (PME) activity, alters cell wall mechanical properties and regulates cell growth and shape. The pectin methyl esterification status is subject to significant changes during cell separation, cell division and cell expansion [8]. Low methyl-esterified motifs in HG are accessible to polygalacturonase (PG) or pectate lyase (PLA) enzymes that degrade the pectin matrix between cells, thereby promoting cell separation [9,10].

Pectins with a low degree of methyl esterification (DM) are involved in the generation of a primary cell wall during the formation of a mature cell plate and the elongation of the parent cell to yield distinct new cells during cell cytokinesis. Cell surface material, including Rhamnogalacturonan II and partially esterified HG pectins, also contributes to cell plate formation [11]. Conversely, cell elongation can be limited by a low degree of pectin methyl esterification in hypocotyls. Under continuous light, a reduction in the pectin esterification level is associated with restricted cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyls. In addition, heterologous PME expression reduces the hypocotyl length in *Arabidopsis* [12]. The role of pectins in cell elongation has also been determined in hypocotyls grown in darkness. The hypocotyls of *atpme3-1* mutants are significantly larger than WT hypocotyls [13]. TRI-CHOME BIREFRINGENCE (TBR) encodes a plant-specific DUF231 protein [14]. The short hypocotyl phenotype of the *tbr* mutant has been associated with increased pectin methyl esterase activity. However, the increased ester bonds in the cell wall pectins of seedlings overexpressing PME14 delayed the initial growth acceleration of dark grown hypocotyls [15]. These opposing consequences on hypocotyl growth that resulted from a low DM might be associated with the presence of calcium ions or active polygalacturonases that differentially alter pectins with different patterns of de-methylesterification [16].

At2g41800 encodes a DUF642 cell wall protein that is primarily detected in the cell wall proteomes from suspension cell cultures. The amino acid sequence of *At2g41800* shows 88% identity with *At2g41810* and 62% identity with *At3g08030*. *At2g41800* and *At2g41810* result from a tandem duplication and the three proteins are grouped in clade A2 [3]. In the present study, we demonstrated the involvement of the DUF642 gene *At2g41800* in mediating hypocotyl length associated to cellular elongation. Based on these results, we name *At2g41800* as *TEB* (TEEBE stands for “long” in the Mayo-Yoreme language).

2. Materials and methods

2.1. Growth conditions

Columbia (WT) and transgenic plants were grown in a CONVIRON (Winnipeg, Canada) growth chamber under long-day conditions (16 h light/8 h dark) at 20–22 °C.

The seeds were surface sterilized after treatment with 70% ethanol for 5 min, followed by 1% SDS and a 15% hypochlorite solution for 15 min. The seeds were subsequently rinsed with sterilized water.

For root studies, the seeds were germinated after imbibition at 4 °C for 2–3 days and grown vertically on Petri dishes with 0.5 X Murashige and Skoog (MS) basal medium (Duchefa) containing 0.5% sucrose and 0.6% agar. Seed germination was conducted in a CONVIRON growth chamber under long-day conditions at 20–22 °C.

2.2. Generation of constructs and transgenic lines for *TEB* and *At3g08030* genes

For *TEB* expression studies, an 890-bp fragment upstream of *ATG-TEB* was amplified using the primers: PRO41800F (5' AAGCTTCGTAGATTGCGGAGAAAAGAACC 3') and PRO41800R (5' GGATCCTTAAAGTCTTATTAATTAGTTCGCC 3'). This fragment contains motifs for auxin response factors (ARF) [17] and light response (GATA motifs) [18] and MADS-box transcription factor [19] (Suppl. Fig. 1A). The PCR fragment was subsequently cloned into the pGEM-T Easy vector and sequenced. The resulting plasmid was cut with the HindIII and BamHI enzymes, and the fragment encompassing the putative *At2g41800* promoter was cloned into the *pBIN-m-GFP-ER* vector ([20]; *pTEB:GFP-ER*). For subcellular localization analyses, a 2222-bp fragment including the putative promoter and the coding region was amplified using the primers: PRO41800F and 41800LSR (5' GGATCCACGGCCAGGGTAACAACAACG 3'). The fragment was cloned and sequenced as previously described. The HindIII/BamHI fragment was cloned into the *pBIN-GFP* vector (*pTEB:TEB-GFP*). WT and CFP-TUA plants [21] were transformed with *pTEB:TEB-GFP* construct (Suppl. Fig. 1) using the floral dip method [22]. The transformants were selected on 0.5X MS plates containing 0.8% agar and 50 mg/L of kanamycin. The transformants were screened for Green Fluorescence Protein (GFP) expression using confocal microscopy. For these studies, at least three independent transformants were analysed.

For *At3g08030* expression studies, a 2112-bp fragment upstream of *ATG-At3g08030* was amplified using the primers PRO8030F (5' AAGCTTCACCGATGGTGACATT 3') and PRO8030R (5' GGATCCTGTCTCTGTGTTCTTCCTCG 3'). This fragment contains motifs for auxin response factors (ARF) and light response factors [17,18].

2.3. Genotyping of T-DNA lines

The homozygous lines of two independent T-DNA lines with insertions in the *At2g41800* locus were obtained. SALK_138024 (*teb-1*) and SALK_109142 (*teb-2*) were analysed using the LBA1 primer (5' TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG 3') and F41800 primer (5' GGATCCCATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCACTGGAG 3'). The T-DNA insertion in *teb-1* line is present at the end of the second exon of the *At2g41800* locus, and the *teb-2* line is located at the end of the third exon (Fig. 4A). For complementation analysis, *teb-1* was crossed to *pTEB:TEB-GFP* to obtain a *teb-1/pTEB:TEB-GFP* line. The presence of TDNA and the complementation construct were verified during subsequent generations. The analyses were carried out on the F₄ double homozygous line. Expression of *TEB* was confirmed by RT-PCR analysis.

2.4. Quantitative RT-PCR

cDNA samples containing 100 ng of RNA from transgenic and WT seedlings were employed for amplification with SYBR Green Master Mix using an Applied Biosystems StepOne platform (Applied Biosystems). The PCR conditions were 50 °C for 2 min for DNA polymerase activation and 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min; subsequently, the samples were cycled at 95 °C for 15 s, 60 °C for 1 min and 95 °C for 15 s for melting curve analysis. Three independent biological replicates with three technical replicates were performed using specific primers for *TEB*

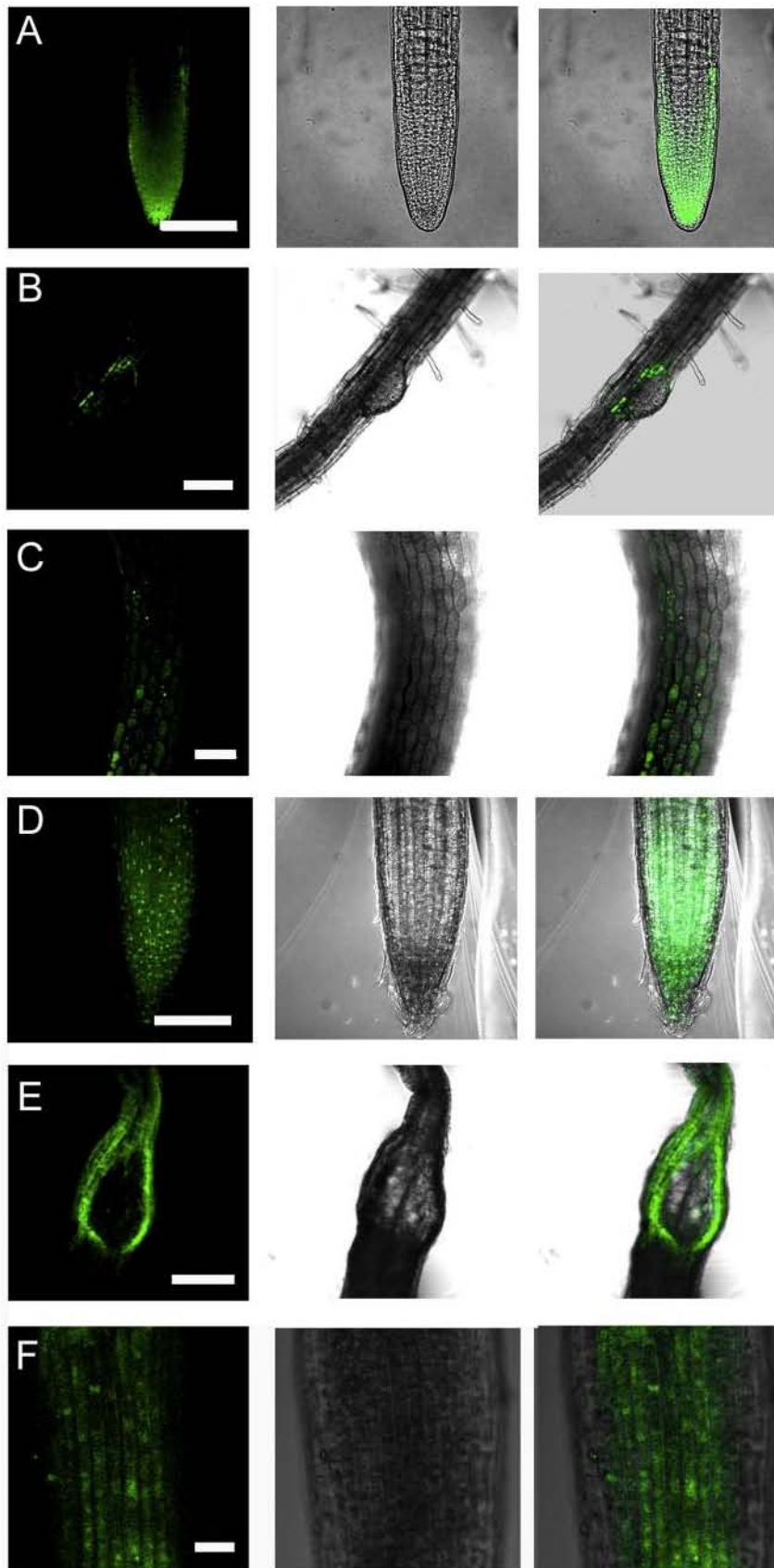


Fig. 1. Expression pattern of *TEB* during *Arabidopsis thaliana* development and callus induction. Three different lines of transgenic plants containing the *TEB* promoter fragment fused to the GFP-ER reporter gene were studied (*pTEB:GFP-ER*). (A) GFP was detected in the primary root in the meristematic zone. (B) GFP was detected in epidermal cells overlying the lateral root primordia. (C) GFP was observed in epidermal cells in the hypocotyls of 2-d seedlings. (D) GFP fluorescence was detected in the meristematic zone of the roots of auxin-treated 7-d seedlings. (E) GFP fluorescence was observed in epidermal cells overlying the callus primordia present in the root elongation zone (F) GFP was detected in epidermal cells of roots treated with hydroxyurea (HU) for 18 h. B and E are projections of confocal Z-stacks, and A, C, D and F are section images. A, D and E scale bars = 100 μm . B, C and F scale bars = 50 μm .

forward (5' GGCTCTTACAGTCTTCAACCA 3') and reverse (5' GGAA-GAGAGTTAGCCCGATT 3') and *ACT7* and tubulin as endogenous controls. The samples were compared with C_T and slope values and analysed using the mathematical model Pfaffl [23] to obtain the relative expression ratio. For Student's *t*-test, the data were subjected to a natural log transformation.

2.5. Callus induction

Root and cotyledon explants from Columbia WT and transgenic plants were excised from seedlings at 7 days after germination. The explants were cultured on callus-inducing medium (CIM) according to Che et al. [24]. The experimental concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4D) and kinetin were 0.5 mg/L and 0.05 mg/L, respectively. The pH was adjusted to 5.7 using 1.0 M KOH.

2.6. Indole acetic acid (IAA) treatment

The plants were stratified at 4 °C for 2 days prior to germination and grown vertically on Petri dishes containing 0.5X MS under standard long-day conditions (16 h light/8 h dark) at 20–22 °C. On the fifth day after germination, one day prior to confocal screening, plants were transferred to 0.5X MS growth medium containing 1 μM IAA.

2.7. Materials

All chemicals were purchased from Sigma, except when otherwise specified, and prepared as stock solutions. Propidium iodide (PI, 10 mM; Invitrogen) was dissolved in water. FM4-64 was dissolved in water (1 μg/μl Thermo-Fisher). IAA (2 mM) was dissolved in 100% ethanol and added to 0.5X MS to obtain different concentrations.

2.8. Histological analysis

To label the cell wall or membrane, the seedlings were incubated in PI solution (1.7 mM) or FM4-64 (1 ng/100 μl), respectively, for 30 s prior to confocal imaging analysis. For plasmolysis, transgenic *pTEB:TEB-GFP* seedlings were incubated in 1 M mannitol for 30 min. Prior to microscopy, seedlings were stained with either PI or FM4-64 in 1 M mannitol.

PI and FM4-64 were imaged at 576–670 nm and GFP was imaged at 485–545 nm using an Olympus FV100 Laser Confocal Scanning Microscope. Images of the WT plant tissues without internal fluorescence were used as controls. The images were assembled using Photoshop version 5.0 (Adobe Systems).

2.9. Cell cycle synchronization

For cell cycle synchronization, the seeds were stratified for 2 days and sown on sterilized 0.5X MS Petri dishes pH-adjusted to 5.7, solidified with 0.6% agar and maintained vertically under standard conditions (16 h light/8 h dark) at 21 °C. After 2 days of germination and 5 days of growth, seedlings were transferred to 0.5X MS medium containing 2 mM hydroxyurea (HU) as described in Cools et al. [25]. The effect of HU treatment on tubulin rearrangements in CFP-TUA plants was used to monitor cell cycle synchronization. The microscopic analysis of the transgenic *pTEB:TEB-GFP* seedlings was conducted at different hours after treatment.

2.10. Lateral root density determination

Seven-day-old seedlings were grown on 0.5X MS supplemented with 0.5% sucrose and fixed in 50% methanol and 10% acid acetic at 4 °C overnight. The roots were cleared using 30% glycerol and 2% dimethyl sulphoxide (DMSO) solution overnight. The samples were mounted in NaI clearing solution containing 4.2 M NaI and 8 mM Na₂S₂O₃ dissolved in 65% glycerol and 2% DMSO [26]. Whole mounting root samples were visualized using an IX81 Olympus microscope employing Nomarski differential interference contrast (DIC). The lateral Root (LR) density was calculated as the number of LR per mm of the parental root region where LR were present [27].

2.10. Hypocotyl growth conditions

The seeds were sown onto medium containing 0.5X MS basal salts supplemented with 3% (w/v) sucrose and solidified with 0.5% (w/v) bacteriological agar (Ambresco, USA) according to Derbyshire et al. [12]. Approximately 20 seeds were evenly sown across each 12-cm Petri plate (Bibby Sterilin Ltd.), and the plates were sealed with Parafilm. For 'light-grown' hypocotyls, the plates were incubated in darkness at 4 °C for 48 h to stimulate and synchronize germination. Following cold treatment, the plates were transferred to a growth room maintained at 22 °C and incubated horizontally under fluorescent lamps (70 μmol m⁻² s⁻¹) under continuous white light. For 'dark-grown' hypocotyls, the plates were wrapped in two layers of aluminium foil prior to cultivation under identical growth conditions.

2.11. Hypocotyl measurements

The hypocotyl length was defined as the distance between the top of the collet root hairs and the 'V' of the cotyledon shoulder [28]. The epidermal cell length was determined using an IX81 Olympus microscope employing Nomarski differential interference contrast (DIC). The hypocotyl length was measured using ImageJ (FIJI 2.0.0) software from images captured using a Canon EOS Rebel T1i (500D) camera with a large format. Three biological replicates of at least 40 hypocotyls were analysed for each line.

2.12. PME activity

PME activity was determined in 2.5- and 4-d seedlings according to Zúñiga-Sánchez et al. [5]. The PME activity in *teb-1* and *teb-2* seedlings was normalized to the WT seedling activity. Significant differences were assessed using the Mann-Whitney *U* test.

2.14. Immunoelectron microscopy of low methyl esterified (DM) pectins using JIM5 antibodies

The samples were processed as previously described [29]. Briefly, small fragments of wild-type, *teb1* or *teb2* hypocotyls from 4-d seedlings were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 60 min at room temperature. Lowicryl K4M embedding was conducted as previously described [30]. Thin sections (40–60 nm) were mounted on Formvar-coated gold grids. The sections were floated in Tris-buffered saline (TBS) containing 20 mM Tris (pH 7.6), 150 mM NaCl, 20 mM sodium azide, 1.0% Tween-20, 10% bovine serum albumin (BSA), and 10% normal goat serum (NGS) for 60 min. The sections were subsequently incubated in JIM5 (antibody against pectins with low degree of methyl esterification [31],) diluted 1:20 overnight at 4 °C in a humidified chamber. As negative controls, some grids were floated in TBS at 4 °C for 16 h. The grids were washed three times with TBS for 5 min each time. The samples were subsequently incubated with a secondary anti-rat antibody coupled to 18-nm colloidal gold particles, diluted 1:20 in

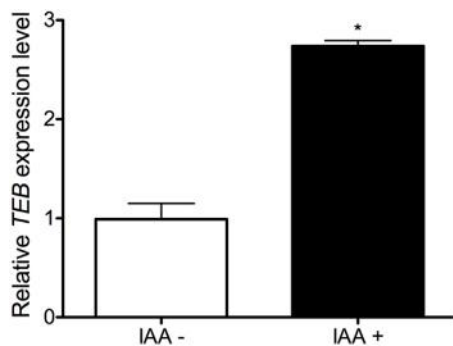


Fig. 2. Auxin induced *TEB* expression in WT seedlings. WT seedlings were grown under continuous light for 5 days in 0.5X MS and transferred to 0.5X MS with 1 μ M IAA for 24-h before confocal studies. *TEB* endogenous gene expression was significantly increased in seedlings subjected to auxin treatment. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA test and Tukey's test for multiple comparisons ($P < 0.05$).

TBS for 1 h at room temperature. After incubation, the grids were rinsed for 15 min in TBS and 10 min with doubly distilled water. The samples were stained with uranyl acetate for 20 min and lead citrate for 10 min. The grids were observed using a GATAN 831 SC600 ORIUS CCD Camera adapted to a 1010 Jeol transmission electron microscope at 80 kV.

Immunogold-labelled particles (black dots) were counted in 40–45 electron micrographs for each line from epidermal cells of WT, *teb-1*, *teb-2* and *teb1/pTEB:TEB-GFP* hypocotyls from three different experiments. The immunogold particles were determined in the same region of the cell wall (120–150 nm from the cell intersection).

3. Results

3.1. *TEB* is expressed in primary root and hypocotyls

TEB is expressed in the roots, stems and stigmatic papilla organs (bar.utoronto.ca). To determine whether the cloned region (Suppl. Fig. 1A) was sufficient to recapitulate the endogenous expression of *TEB*, Green Fluorescent Protein (GFP) was monitored at different developmental stages. Three different lines of transgenic plants containing the promoter fragment fused to the GFP reporter were studied. In transgenic lines, GFP was expressed in the primary and lateral roots, hypocotyls and the stigmatic papilla of the 12-stage flower (Fig. 1 and Suppl. Fig. 2). In primary roots, GFP fluorescence was detected in the meristematic zone (Fig. 1A). GFP was also detected in the epidermal cells overlying the lateral root (LR) and in the emerging lateral root primordia (Fig. 1B). GFP was not detected in new lateral root primordium from stage I until after lateral root emergence (Suppl. Fig. 2). In hypocotyls, GFP was detected in epidermal cells (Fig. 1C). Studies have shown that auxin regulates *At2g41800* expression [32]. Consistently, auxin treatment induced GFP expression in transgenic plants and a two-fold increase in *TEB* expression in WT seedlings (Figs. 1 D and 2). *TEB* protein has been extensively detected in cell wall proteomes from suspension cells, a highly proliferative tissue [33]. In addition, *At2g41800* expression is upregulated during callus induction [24]. During early callus induction, GFP was highly detected in the epidermal cells overlying the callus primordium present in the elongation zone of a primary root (Fig. 1E). Furthermore, *At2g41800* is one of the most highly induced genes in the M/G1 phase of the cell cycle [34]. To determine the expression of *At2g41800* during cell division, transgenic seedlings were treated with hydroxyurea (HU) to synchronize root meristematic cells [25]. As expected, this treatment promoted *TEB* expression in the meristematic zone of the primary root (Fig. 1F).

3.2. *TEB* is localized in the cell wall

DUF642 has been extensively detected in cell wall proteomes from different tissues and plants [33]. To determine the cell wall localization of *TEB* protein in epidermal cells, we generated expression lines with the full-length *TEB* coding sequence fused to GFP under the control of the cognate promoter, *pTEB:TEB-GFP*. qRT-PCR analysis of the two homozygous lines revealed a two-fold increase of *TEB* expression in both lines (Suppl. Fig. 1). These transgenic lines were used for *TEB* subcellular localization by confocal microscopic studies (Fig. 3). No GFP was detected along the primary root (Fig. 3A), although GFP was detected using the cognate promoter (Fig. 1A). This inconsistency could be associated with differences in protein stability between GFP and *TEB*. During the emergence of lateral root primordia, GFP was detected in the peripheries of the epidermal cells overlaying the root primordia (Fig. 3B). GFP was also detected in the peripheries of epidermal cells from hypocotyls (Fig. 3C). *TEB* expression and localization was detected in dividing cells when cell division was induced using auxin, callus induction medium (CIM) or HU (Fig. 3D, E and F). Particularly, auxin treatment also promoted *TEB* expression in the elongation and differentiation zones (Suppl. Fig. 3). To confirm the cell wall localization of *TEB*, 7-d seedlings of *pTEB:TEB-GFP* plants previously treated with IAA for 24 h were subjected to mannitol treatment to promote plasmolysis (Fig. 4). In the differentiation zone of the primary root, cell wall localization was detected in epidermal cells. No colocalization of FM 4–64 with GFP protein was observed (Fig. 4A), whereas PI colocalized with GFP (Fig. 4B). These results indicate that *TEB* protein is localized to the cell wall.

3.3. Root primary growth and lateral root density is not affected by *TEB* expression

To examine the function of *TEB*, two independent T-DNA lines with insertions in the *TEB* locus were obtained: *teb-1* (SALK_138024) and *teb-2* (SALK_109142). The T-DNA insertion in the *teb-1* line is present at the end of the second exon of the *At2g41800* locus, and the *teb-2* line is located at the end of the third exon (Fig. 5A). Homozygous lines were obtained, and qRT-PCR analysis, using ACT7 as an endogenous control, detected a significant decrease in *TEB* expression levels in both T-DNA homozygous lines. A reduction of 75% and 50% in *TEB* expression was detected in the *teb-1* and *teb-2* lines, respectively (Fig. 5B). Similar results were obtained using tubulin as an endogenous control. Although *TEB* protein was consistently detected in cell wall proteomes from highly proliferative tissues, no difference in root primary length and lateral root density was observed between the two mutant lines, the overexpression line and WT (Fig. 5C and D). Potential functional redundancy within the DUF642 family could explain this absence of root growth alterations in the SALK mutants. *TEB* has the highest identity with *At2g41810*, but its transcript is hardly detected during plant development. The expression of this gene is practically only induced under stress conditions [35]. Moreover, the encoded *At2g41810* protein has not been detected in any cell wall proteome. However, *TEB* was derived from a recent duplication of *At3g08030*, a gene highly expressed in the epidermal cells of primary roots (Suppl. Fig. 4) [3].

3.4. Both the overexpression and loss of *TEB* expression altered hypocotyl lengths

The presence of *TEB* protein in the cell wall suggested that *TEB* function might reflect cell wall remodelling. Additionally, consistent with the published data, *TEB* is also expressed in hypocotyls (Fig. 1C). Hypocotyl length has been extensively used to study the role of cell wall components in cell elongation processes. Con-

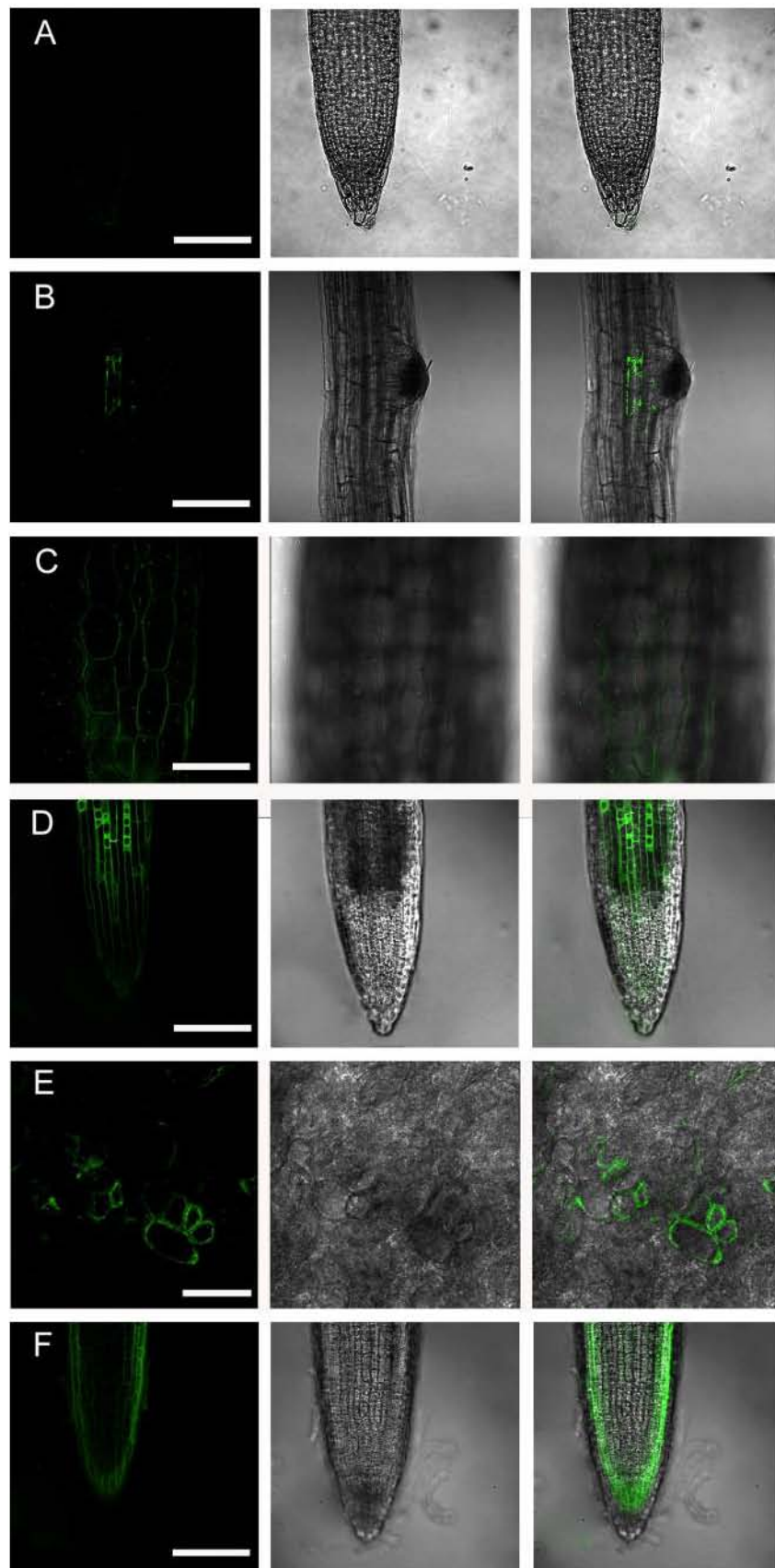


Fig. 3. Subcellular localization of TEB-GFP protein. Transgenic plants containing the same promoter fragment as in Fig. 1 fused to the coding region of *TEB-GFP* (*pTEB:TEB-GFP*) were used to determine the subcellular localization of TEB under control conditions, callus induction, hydroxyurea (HU) and auxin treatment. (A) No GFP was detected in cells in the meristematic region of non-treated, transgenic primary roots. (B) During lateral root emergence, GFP was detected in the cell wall of some epidermal cells overlaying the root primordia. (C) GFP was observed in the cell wall of epidermal cells in the hypocotyls of 4-d seedlings. (D) GFP fluorescence was detected in the cell wall of epidermal cells in the meristematic zone of roots from auxin-treated 7-d seedlings. (E) GFP was detected in the cell walls of cells from callus tissue derived from primary root (30 d). (F)

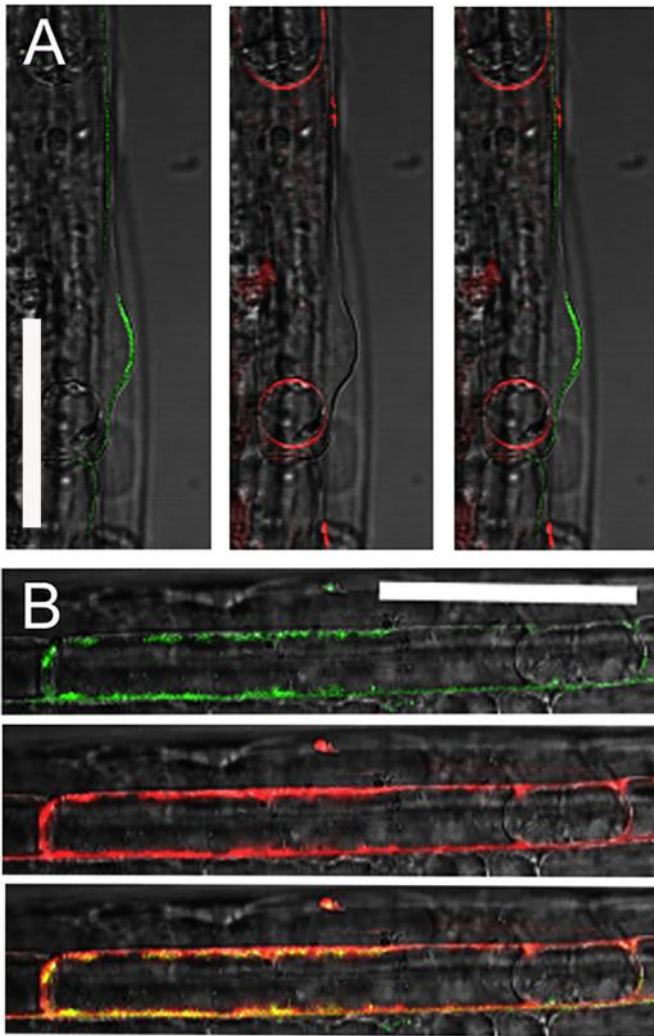


Fig. 4. Cell wall localization of the TEB-GFP protein in epidermal cells from primary root. 7-d seedlings from transgenic plants (*pTEB:ER-GFP*) were treated with mannitol for 30 min. (A) hair cell stained with FM4-64. No colocalization between GFP and FM4-64 was detected. (B) Epidermal cell stained with PI. A colocalization of GFP and PI was detected. Scale bars = 50 μm.

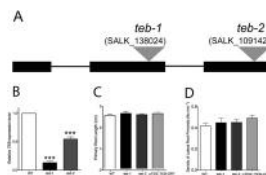


Fig. 5. Genomic and phenotypic characterization of mutants SALK.138024 (*teb-1*) and SALK.109142 (*teb-2*). (A) Schematic representation of T-DNA insertion at the end of the second exon of *TEB* for *teb-1* and at end of third exon for *teb-2*. (B) *TEB* endogenous gene expression was significantly reduced in 4-d seedlings from homozygous *teb-1* and *teb-2*. (C) Root length of 7-d seedlings from WT, *teb-1*, *teb-2* and *pTEB:TEB-GFP*. (D) Lateral root density of 7-d seedlings from WT, *teb-1*, *teb-2* and *pTEB:TEB-GFP*. These data are presented as the means \pm SE for three different biological replicas; $n = 50$ –60 for each line. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA test and Tukey's test for multiple comparisons ($P < 0.01$).

sidering that DUF642 are cell wall proteins, the length of the hypocotyls and epidermal cell length in *teb-1* and *teb-2* mutants and *pTEB:TEB-GFP* seedlings grown under continuous light were determined. As expected, hypocotyls of mutant seedlings were longer than WT hypocotyls with longest epidermal cells in the middle region of hypocotyls (Fig. 6A and B). Conversely, analyses *pTEB:TEB-GFP* transgenic seedlings showed shorter hypocotyls than WT seedlings, with the shortest epidermal cells (Fig. 6A and B). Under conditions of continuous darkness (Fig. 6C), mutants have a longer hypocotyl than wt seedlings, while in *pTEB:TEB-GFP* seedlings, hypocotyl length was slightly but significant reduced in comparison with that of WT seedlings. Complementation line was also analyzed. The length of the *teb-1/pTEB:TEB-GFP* hypocotyls was quite similar to those of WT (Fig. 6A).

To determine the effect of TEB function on the relationship between hypocotyls length and pectin, total PME activity was measured in seedlings from WT, *teb-1*, *teb-2* and *pTEB:TEB-GFP* plants (Fig. 7). A slight but significant decrease in total PME activity was only detected in 4-d *teb-1* seedlings (Fig. 7B). The relationship between TEB function on hypocotyl length and pectin DM in the cell walls from hypocotyls cells was performed by immunogold labelling of low-esterified pectins using JIM5 antibodies on sections of hypocotyls epidermal cells from 4-d seedlings (Fig. 7D, C, and E). A decrease in gold particles was observed in *teb* mutants, indicating that low-esterified pectins are less abundant in the hypocotyls cells of these lines compared with WT seedlings. The gold particle density in the hypocotyls cells of the *teb-1/pTEB:TEB-GFP* seedlings was similar to that of WT, indicating that TEB participates in the regulation of pectin status in hypocotyls cells. These results suggest that TEB is involved in the regulation of cell wall elongation and impacts the degree of pectin methylesterification.

4. Discussion

DUF642 proteins have been described as cell wall-related proteins, and different members of this family have been detected in high levels in cell wall proteomes from different tissues and plants [33]. These results confirm that TEB protein is localized to the cell wall in different plant tissues (Fig. 4). Although the DUF642 genes *BDX*, *DGR1* and *TEB* are expressed in the meristematic region of primary roots, no phenotype was observed in the primary root mutants or overexpression lines [5,7]. These results suggest physiological redundancy between DUF642 genes involved in meristem determination in primary roots. However, *DGR2* is expressed in the elongation zone, and the *dgr2* mutant present short roots [7].

BDX, *DGR2* and *TEB* are expressed in hypocotyls from seedlings grown under light conditions [5,7] (Fig. 1). Although a phenotype associated with hypocotyl elongation has not yet been reported for DUF642 genes, the *BDX*, At5g11420 and At3g08030 proteins are abundant in hypocotyl proteomes [33]. Although TEB has not been described in hypocotyl proteomes, the TEB-GFP protein was detected in the cell wall of epidermal cells from hypocotyls (Fig. 3), hypocotyl elongation was affected in *teb* mutants and overexpression lines and the complementation line and WT hypocotyls showed similar phenotype (Fig. 6). Moreover, the cell length was increased in *teb* mutants and decreased in *pTEB:TEB-GFP*, suggesting a role for *TEB* in cell elongation in this tissue. These results suggested that *TEB* is involved in the regulation of hypocotyl cell elongation. The relevance of pectin status in hypocotyl elongation has been extensively demonstrated. A decrease in PME activity in *pme3-1* mutants increased the hypocotyl length, whereas the short hypocotyl phenotype of *tbr* mutants was associated with

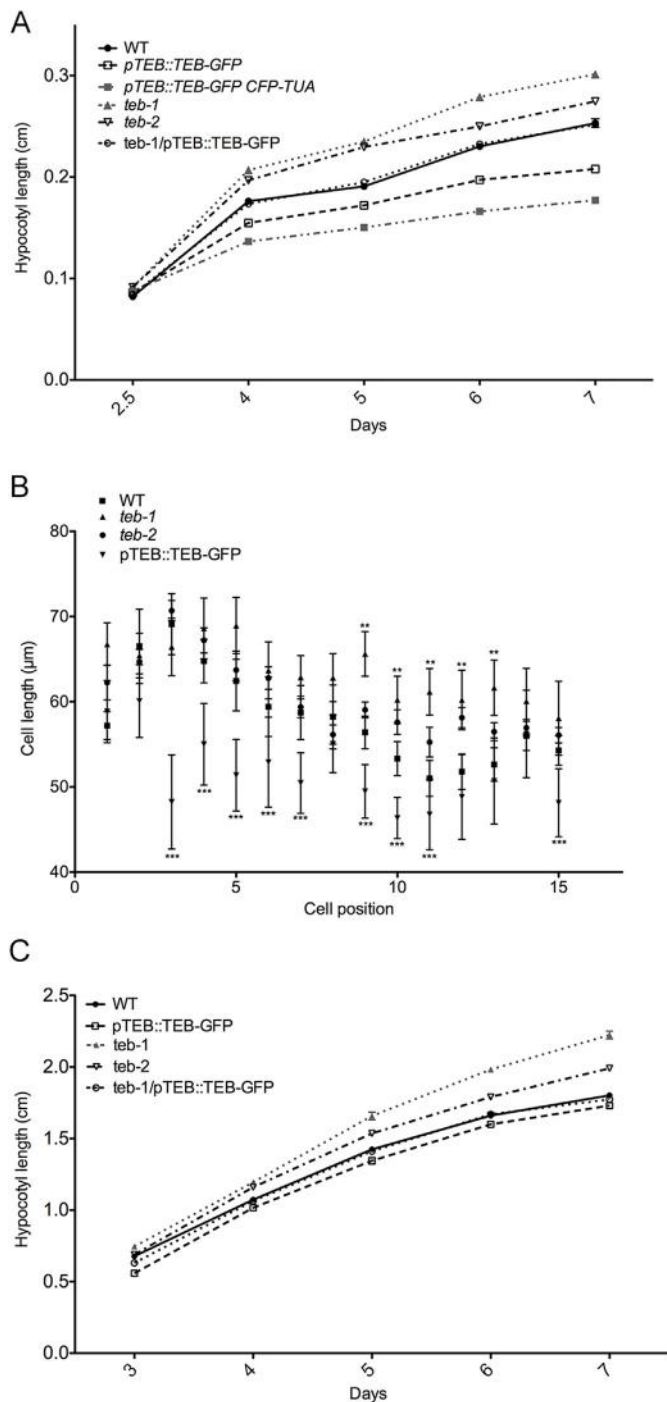


Fig. 6. Growth kinetics of hypocotyl elongation and epidermal cell length in WT, SALK mutants and overexpression *TEB* seedlings grown under continuous light and dark conditions. (A) The seedlings were grown under continuous light for 7 d in the presence of 3% sucrose. The data points are an average of measurements taken from 50 seedlings \pm SE from three different biological replicates. Data comparisons showed significant differences against WT ($P < 0.001$). (B) The cell length determination of epidermal cells from hypocotyls (4 d). The ninth to thirteenth cells from *teb-1* and *teb-2* are significantly longer than WT cells (Student's *t*-test, $P < 0.05$). (C) Seedlings were grown in the dark for 7 d in the presence of 0.5% sucrose.

an increase in PME activity [13,14]. The *teb-1* hypocotyls also showed a reduction in PME activity. Consistently, a reduction of low methylesterified pectins was detected in the cell walls from *teb-1/pTEB::TEB-GFP* hypocotyls suggesting a recovery of the WT DM. These results suggest that *TEB* could be involved in the regulation of the pectin methylesterification status in elongating hypocotyl

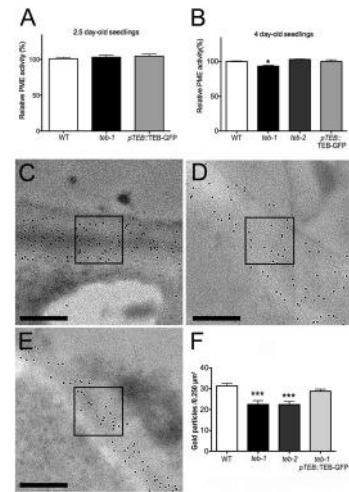


Fig. 7. Total PME activity and quantification of low methyl-esterified pectins in cell wall from epidermal cells of WT, *teb-1*, *teb-2* hypocotyls grown under continuous light. Graphs depict PME activity in WT, *teb-1* mutant and pTEB::TEB-GFP seedlings grown under continuous light for 2.5 d (A) and in WT, *teb-1* and *teb-2* mutants and pTEB::TEB-GFP seedlings grown under continuous light for 4 d (B) from three different biological replicates. The asterisk indicates significant difference. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA test and Tukey's test for multiple comparisons ($P < 0.05$). (C) Electron micrograph of WT epidermal cells. (D) Electron micrograph of *teb-1* epidermal cells. (E) Electron micrograph of *teb-1/pTEB::TEB-GFP* epidermal cells. A 0.250 μm^2 cell wall area was used for quantification analysis. (F) The graph depicts the average of gold particles per 0.250 μm^2 present in the cell wall from epidermal cells of WT, *teb-1*, *teb-2* and *teb-1/pTEB::TEB-GFP* hypocotyls. Scale bar = 500 nm. Asterisks indicate significant differences. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA test and Tukey's test for multiple comparisons ($P < 0.001$).

cells. A relationship between DUF642 protein function and pectin has previously been described [5–7]. The increased germination of *BDX*-overexpressing seeds is correlated with an increase in PME activity, while mutant *bdx* plants showed less activity.

It has been suggested that DUF families represent biological functions specific to a group of organisms; however, identifying the functions of DUFs could be extremely important [36]. In spermatophytes, cell wall proteomes showed that the study of the function of DUF protein families could contribute to the understanding of the relevance of the cell wall during plant development [2]. The functions of only a limited number of proteins involved in the regulation of the cell wall composition and properties are known. Particularly, DUF642 proteins constitute a highly conserved family of cell wall-related proteins specific to spermatophytes, and the results obtained in the present study contribute to the elucidation of the function of this DUF family in plant development.

Acknowledgements

This paper constitutes a partial fulfillment of the Posgrado de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). A. Salazar-Irbe was supported by the scholarship provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) no. 227932 and the financial support from Dirección General Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México.

This work was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica [PAPIIT UNAM] IN200912, IN207915 to AGB] and the Secretaría de Educación Pública-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [155074 to AGB].

We thank Karina Jiménez Durán, Laura Márquez, Ximena Gómez-Maqueo, Elsa Quezada, Ma. Teresa de Jesús Olivera Flores, Rigoberto Vicencio Pérez Ruíz, María Berenit Mendoza Garfias and Blanca Hernández for technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.10.007>.

References

- [1] L. Braidwood, C. Breuer, K. Sugimoto, My body is a cage: mechanisms and modulation of plant cell growth, *New Phytol.* 201 (2014) 388–402.
- [2] R. Mewalal, E. Mizrahi, S.D. Mansfield, A.A. Myburg, Cell wall-related proteins of unknown function: missing links in plant cell wall development, *Plant Cell Physiol.* 55 (2014) 1031–1043.
- [3] A. Vazquez-Lobo, D. Roujol, E. Zuniga-Sanchez, C. Albenne, D. Pinero, A. Gamboa de Buen, E. Jamet, The highly conserved spermatophyte cell wall DUF642 protein family: phylogeny and first evidence of interaction with cell wall polysaccharides in vitro, *Mol. Phylogenet. Evol.* 63 (2012) 510–520.
- [4] E. Zúñiga-Sánchez, A. Gamboa-deBuen, The two DUF642 At5g11420 and At4g32400 encoded proteins interact in vitro with the ATPME3 catalytic domain, in: J. Cai (Ed.), *Protein Interaction*, Book InTech Editorial, 2012, pp. 119–142.
- [5] E. Zúñiga-Sánchez, D. Soriano, E. Martínez-Barajas, A. Orozco-Segovia, A. Gamboa-deBuen, *BHDX1*, the *At4g32460* DUF642 gene, is involved in pectin methyl esterase regulation during *Arabidopsis thaliana* seed germination and plant development, *BMC Plant Biol.* 14 (2014) 338.
- [6] X. Xie, Y. Wang, VqDUF642, a gene isolated from the Chinese grape *Vitis quinquangularis*, is involved in berry development and pathogen resistance, *Planta* 222 (2016) 1075–1094.
- [7] Y. Gao, A.A. Badejo, Y. Sawa, T. Ishikawa, Analysis of two L-galactono-1,4-lactone-responsive genes with complementary expression during the development of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol.* 53 (2012) 592–601.
- [8] S. Wolf, G. Mouille, J. Pelloux, Homogalacturonan methyl-esterification and plant development, *Mol. Plant* 2 (2009) 851–860.
- [9] C.P. Darley, A.M. Forrester, S.J. McQueen-Mason, The molecular basis of plant cell wall extension, *Plant Mol. Biol.* 47 (2001) 179–195.
- [10] F. Senechal, C. Wattier, C. Rusterucci, J. Pelloux, Homogalacturonan-modifying enzymes: structure, expression, and roles in plants, *J. Exp. Bot.* 65 (2014) 5125–5160.
- [11] K. Toyooka, Y. Goto, S. Asatsuma, M. Koizumi, T. Mitsui, K. Matsuoka, A mobile secretory vesicle cluster involved in mass transport from the Golgi to the plant cell exterior, *Plant Cell* 21 (2009) 1212–1229.
- [12] P. Derbyshire, M.C. McCann, K. Roberts, Restricted cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level, *BMC Plant Biol.* 7 (2007) 31.
- [13] S. Guenin, A. Mareck, C. Rayon, R. Lamour, Y. Assoumou Ndong, J.M. Domon, F. Senechal, F. Fournet, E. Jamet, H. Canut, G. Percoco, G. Mouille, A. Rolland, C. Rusterucci, F. Guerinneau, O. Van Wuytswinkel, F. Gillet, A. Driouich, P. Lerouge, L. Gutierrez, J. Pelloux, Identification of pectin methylesterase 3 as a basic pectin methylesterase isoform involved in adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana*, *New Phytol.* 192 (2011) 114–126.
- [14] V. Bischoff, S. Nita, L. Neumetzler, D. Schindelasch, A. Urbain, R. Eshed, S. Persson, D. Delmer, W.R. Scheible, Trichome birefringence and its homolog At5g01360 encode plant-specific DUF231 proteins required for cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 153 (2010) 590–602.
- [15] S. Pelletier, J. Van Orden, S. Wolf, K. Vissenberg, J. Delacourt, Y.A. Ndong, J. Pelloux, V. Bischoff, A. Urbain, G. Mouille, G. Lemonnier, J.P. Renou, H. Hofte, A role for pectin de-methylesterification in a developmentally regulated growth acceleration in dark-grown *Arabidopsis* hypocotyls, *New Phytol.* 188 (2010) 726–739.
- [16] G. Levesque-Tremblay, J. Pelloux, S.A. Braybrook, K. Muller, Tuning of pectin methylesterification: consequences for cell wall biomechanics and development, *Planta* 242 (2015) 791–811.
- [17] V.V. Mironova, N.A. Omelyanchuk, D.S. Wiebe, V.G. Levitsky, Computational analysis of auxin responsive elements in the *Arabidopsis thaliana* L. genome, *BMC Genomics* 15 (2014).
- [18] G.R. Teakle, I.W. Manfield, J.F. Graham, P.M. Gilmartin, *Arabidopsis thaliana* GATA factors: organisation, expression and DNA-binding characteristics, *Plant Mol. Biol.* 50 (2002) 43–57.
- [19] S.R. Hepworth, F. Valverde, D. Ravenscroft, A. Mouradov, G. Coupland, Antagonistic regulation of flowering-time gene *SOC1* by *CONSTANS* and *FLC* via separate promoter motifs, *EMBO J.* 21 (2002) 4327–4337.
- [20] J. Haseloff, K.R. Siemering, D.C. Prasher, S. Hodge, Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 2122–2127.
- [21] V. Kirik, U. Herrmann, C. Parupalli, J.C. Sedbrook, D.W. Ehrhardt, M. Hulskamp, CLASP localizes in two discrete patterns on cortical microtubules and is required for cell morphogenesis and cell division in *Arabidopsis*, *J. Cell Sci.* 120 (2007) 4416–4425.
- [22] S.J. Clough, A.F. Bent, Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* 16 (1998) 735–743.
- [23] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) e45.
- [24] P. Che, S. Lall, D. Nettleton, S.H. Howell, Gene expression programs during shoot, root, and callus development in *Arabidopsis* tissue culture, *Plant Physiol.* 141 (2006) 620–637.
- [25] T. Cools, A. Iantcheva, S. Maes, H. Van den Daele, L. De Veylder, A replication stress-induced synchronization method for *Arabidopsis thaliana* root meristems, *Plant J.* 64 (2010) 705–714.
- [26] J.G. Dubrovsky, A. Soukup, S. Napsucially-Mendivil, Z. Jeknic, M.G. Ivanchenko, The lateral root initiation index: an integrative measure of primordium formation, *Ann. Bot. Lond.* 103 (2009) 807–817.
- [27] J.G. Dubrovsky, G.A. Gambetta, A. Hernández-Barrera, S. Shishkova, I. González, Lateral root initiation in *Arabidopsis*: developmental window, spatial patterning, density and predictability, *Ann. Bot. Lond.* 97 (2006) 903–915.
- [28] B. Scheres, H. Wolkenfelt, V. Willemsen, M. Terlou, E. Lawson, C. Dean, P. Weisbeek, Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials, *Development* 120 (1994) 2475–2487.
- [29] L.T. Agredano-Moreno, L.F. Jiménez-García, New evidence that *Lacandonia* granules are ultrastructurally related to perichromatin and Balbiani ring granules, *Biol. Cell* 92 (2000) 71–78.
- [30] J. Roth, Post-embedding cytochemistry with gold-labelled reagents: a review, *J. Microsc.* 143 (1986) 125–137.
- [31] J.P. Knox, P.J. Linstead, J. King, C. Cooper, K. Roberts, Pectin esterification is spatially regulated both within cell-walls and between developing-tissues of root apices, *Planta* 181 (1990) 512–521.
- [32] H. Goda, S. Sawa, T. Asami, S. Fujioka, Y. Shimada, S. Yoshida, Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 134 (2004) 1555–1573.
- [33] E. Jamet, H. Canut, G. Boudart, R.F. Pont-Lezica, Cell wall proteins: a new insight through proteomics, *Trends Plant Sci.* 11 (2006) 33–39.
- [34] M. Menges, L. Hennig, W. Gruijsem, J.A. Murray, Cell cycle-regulated gene expression in *Arabidopsis*, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 41987–42002.
- [35] J.A. Kreps, Y.J. Wu, H.S. Chang, T. Zhu, X. Wang, J.F. Harper, Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress, *Plant Physiol.* 130 (2002) 2129–2141.
- [36] A. Bateman, P. Coggill, R.D. Finn, DUFs: families in search of function, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 66 (2010) 1148–1152.

1.12 Figuras suplementarias del capítulo I

Authors: Alexis Salazar-Irbe¹, Lourdes Agredano-Moreno², Esther Zúñiga-Sánchez¹, Luis Felipe Jiménez-García² and Alicia Gamboa-deBuen¹

Title: The Cell Wall DUF642 At2g41800 (TEB) Protein is involved in Hypocotyl Cell Elongation.

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

Corresponding author: Dr. A. Gamboa-deBuen

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

Tel: 52 55 56229008

Fax: 52 55 56161976

Email: agamboa@ecologia.unam.mx

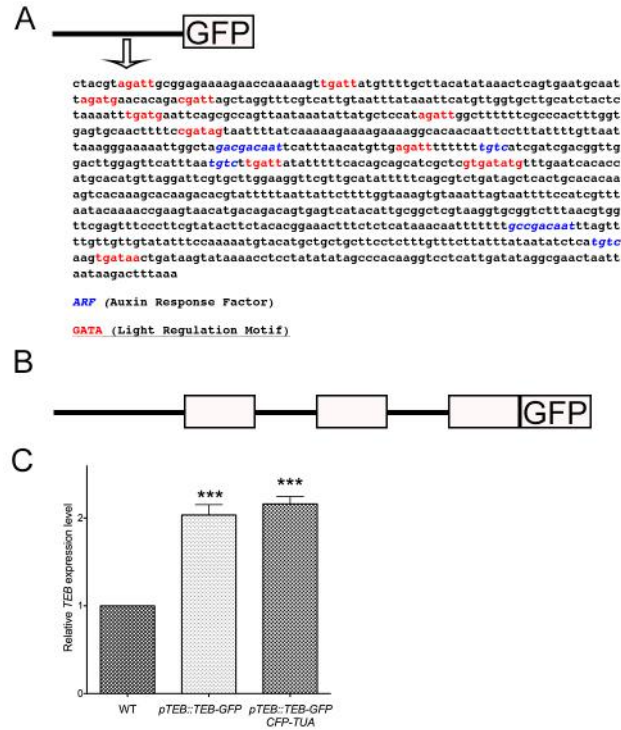


Figure 1. Schematic presentation of the constructed transgenes.

(A) For *pTEB::GFP-ER* construction, a 890-bp fragment of the *At2g41800* intergenic region was cloned into *pBIN- m-GFP-ER*. The nucleotide sequence of this fragment showing auxin response factor motifs (ARF) and light response motifs (GATA). For *At3g08030::GFP-ER* construction, a 2112-bp fragment of the *AT3g08030* intergenic region was cloned into *pBIN- m-GFP-ER*. B) Amplified *At2g41800* 2222-bp DNA fragment that included the promoter and coding regions was cloned into pBIN to generate *pTEB::TEB-GFP*. Black bars represent the *At2g41800* promoter, gray bars represent *At2g41800* coding region, and white bar represent GFP. WT plants and 35S::CFP-TUA plants were transformed using *pTEB::TEB-GFP*. C) qRT-PCR analyses of the two homozygous lines detected two fold increase of *TEB* expression in both lines. Data are mean \pm SE for three different biological replicas (4-d seedlings) $n = 50-60$ for each line. Statistical analysis was performed using a One-way ANOVA test and Tukey's test for multiple comparisons ($P < 0.01$).

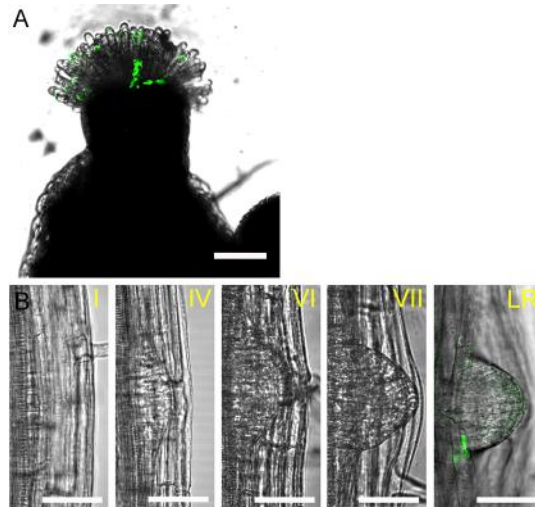


Figure 2. Expression of *TEB* in carpel and during lateral root development. Three different lines of *pTEB::ER-GFP* transgenic plants were studied. (A) GFP fluorescence in the stigmatic papilla (flower stage 12). B) *TEB* is expressed in epidermal cells overlaying root primordia during lateral root emergence and in the lateral root cap cells. GFP was not detected in new lateral root primordium from stage I until after lateral root emergence (LR). (A) Projection of confocal Z-stacks, scale bar = 100 μm . (B) Section images of lateral root primordium, scale bar = 20 μm .

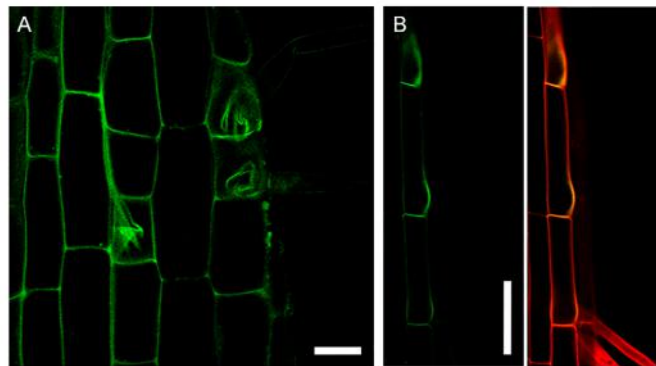


Figure 3. Effect of auxin in *TEB* expression in primary roots. *pTEB::TEB-GFP* transgenic seedlings (7-d) were subjected to 1mM IAA for 24h prior to confocal microscopy. Cell wall localization of GFP was

detected in cells from the differentiation zone of primary root (A) hair cells (B). A scale bar = 20 μm and B scale bar = 50 μm . A and B are section images of epidermal cells.

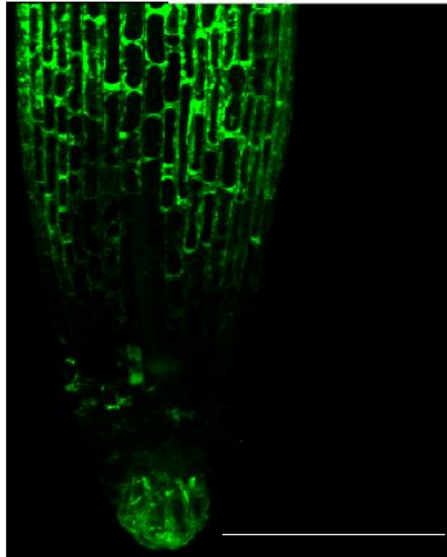


Figure 4. Expression of *At3g08030* in primary root. Three different lines of *pAt3g08030::ER-GFP* transgenic plants were studied. GFP fluorescence in the epidermis and cortical cells in the meristematic cells of primary root (7 d seedling). Scale bars = 100 μm . This image is a section image of epidermal cells.

Capítulo II

En este capítulo se aborda la importancia de los genes *TEB* y *BDX* y su posible relación con el flujo de auxinas durante la elongación del hipocótilo. El capítulo está más enfocado a los objetivos particulares 2 y 3.

Relación de las proteínas de pared celular DUF642 TEB y BDX con el flujo de auxinas durante la elongación del hipocótilo.

Salazar-Irbe A, Cruz-Valderrama E, Gómez-Maqueo X, Jiménez-Durán K, Gamboa-deBuen A

(En preparación)

Introducción

El hipocótilo ha sido utilizado ampliamente para el estudio de los diferentes procesos involucrados en la elongación celular dado que la contribución de la proliferación celular en la elongación del hipocótilo es muy baja. Por lo general, el hipocótilo de *A. thaliana* presenta 20 células epidérmicas de origen embrionario (Gendreau et al., 1997).

Este proceso de elongación es muy dinámico y está influenciado por factores ambientales tales como la calidad de la luz, la temperatura y es regulado por las diferentes hormonas (Collett et al., 2000). La elongación de los hipocótilos es mayor cuando las plántulas crecen en condiciones limitantes de luz, oscuridad y baja relación Rojo/Rojo Lejano (R:RL, sombra). El incremento en la elongación de los hipocótilos también es una respuesta a altas temperaturas.

Por estas características, el hipocótilo ha sido utilizado como modelo para el estudio de la participación de la pared celular en los procesos de elongación celular. En las primeras sesenta horas posteriores a la germinación en condiciones de luz, la pared celular de las células epidérmicas basales del hipocótilo se engrosa como consecuencia de una acumulación de microfibrillas de celulosa posiblemente favorecida por el bajo grado de esterificación de las pectinas. Posteriormente, un reacomodo de estas microfibrillas determina una disminución en el grosor de la pared durante la elongación celular (Derbyshire et al 2007). Alteraciones en la

elongación de los hipocótilos han sido descritas en mutantes de CESA's y de PME's. Una disminución en la elongación del hipocótilo está asociada a un aumento en la actividad de PME; las líneas de sobreexpresión de *AtPME1* y de *TEB* (*At2g41800*) presentan hipocótilos más cortos y en las mutantes de *TRICHOME BIREFRINGENCE* (*TBR*), los hipocótilos son más cortos (Derbyshire et al., 2007; Bischoff et al., 2010; Salazar-Irbe et al., 2016). *TEB* es una proteína de pared celular que pertenece a la familia DUF642, específica de espermatofitas. *TEB* y *BDX*, otra proteína de la familia DUF642, participan en la regulación del grado de esterificación de las pectinas en la pared celular y su expresión es regulada por auxinas (Vázquez-Lobo et al., 2012; Zúñiga-Sánchez et al., 2014; Salazar-Irbe et al., 2016)

Las auxinas participan activamente en la elongación del hipocótilo y en su respuesta a diferentes factores ambientales. Aunque la adición de auxina exógena induce la elongación celular en segmentos de tallos aislados y coleóptilos (Kutschera y Nicklas, 2007) se ha descrito que las plántulas crecidas en condiciones control de luz y temperatura en un medio que contiene auxinas, presentan una inhibición de la elongación del hipocótilo (Collett et al., 2000). Esta respuesta sugiere que los niveles de auxinas en las plántulas son óptimos para la elongación celular y que la adición de más auxinas puede provocar una saturación en el sistema (Collett et al., 2000). Las condiciones limitantes de luz y alta temperatura promueven la elevación del nivel de IAA libre en las células epidérmicas de los hipocótilos (Yamada et al., 2009). El modelo actual para el crecimiento inducido por condiciones de sombra explica que las auxinas sintetizadas *de novo* se producen en los cotiledones, son transportadas hacia el hipocótilo por el tejido vascular y finalmente llegan hasta las células epidérmicas del hipocótilo donde estimulan la elongación de este órgano (Tao et al., 2008; Petrusek y Friml, 2009; Keuskamp et al., 2010; Procko et al., 2016). En la mutante de biosíntesis de auxinas *sav3* (*SHADE AVOIDANCE DEFICIENT 3*), que no sintetiza rápidamente IAA en respuesta a condiciones de sombra y/o a altas temperaturas se retarda la elongación del hipocótilo (Tao et al., 2008; Stepanova et al., 2008; Yamada et al., 2009). Por otro lado, la mutante *vas2* (*IAA-amido synthetase Gretchen Hagen 3 (GH3).17*, *vas* es lo contrario a *sav*), que presenta un

alto nivel de IAA activa en las células epidérmicas de los hipocótilos en comparación a las plántulas silvestres presenta hipocótilos largos en condiciones de crecimiento control. *vas2* presenta una mutación en la IAA-amido sintetasa, enzima que participa en la inactivación del IAA libre (Zheng et al., 2016). Recientemente se ha descrito que la acumulación de auxinas en la epidermis coordina la elongación del hipocótilo, tanto en *Arabidopsis* como en *Brassica napa* (Procko et al., 2016).

El ácido 1-N-naftilftalámico (NPA, por sus siglas en inglés), inhibidor del transporte polar de auxinas (PAT, por sus siglas en inglés), interrumpe el flujo de IAA libre de los cotiledones hacia el hipocótilo, inhibiendo por completo su elongación (Tao et al., 2008; Keuskamp et al., 2010). Uno de los transportadores involucrados en este flujo es PIN3 (*PIN-FORMED 3*); los hipocótilos de las mutantes *pin3* no elongan en respuesta a condiciones de sombra (Keuskamp et al., 2010).

Por otro lado, las respuestas fototrópica y gravitrópica requieren de una elongación diferencial de las células epidérmicas del hipocótilo en la zona cercana a la intersección con los cotiledones. La acumulación de las auxinas en estas células epidérmicas también interviene en estas respuestas y recientemente, se ha demostrado que la regulación del flujo de salida de las auxinas participa activamente en este proceso. Se ha determinado que en la mutante de síntesis de calosa *gsl8* se altera la acumulación de auxinas en las células epidérmicas al mantenerse los plasmodesmos abiertos e impidiendo la formación del dominio simplástico durante la elongación diferencial (Han et al., 2014). Estos estudios demuestran que la remodelación de la pared puede determinar el flujo de las auxinas durante las respuestas fototrópica y gravitrópica.

En este estudio se determinó que TEB y BDX participan en la elongación del hipocótilo posiblemente a través de la regulación del flujo de auxinas. Las mutantes *bdx* presentan un hipocótilo de mayor tamaño y una importante acumulación de auxinas en las células epidérmicas.

Materiales y métodos.

Material biológico

En este estudio se utilizaron las siguientes líneas: WT (col) y WT *DR5-GFP*, *teb-1*, *teb-2*, *pTEB::TEB-GFP* para el gen *At2g41800* y *bdx-1*, *OEBDX*, *pBDX::BDX-GFP* *bdx-1/DR5-GFP* para el gen *At4g32460* (Salazar-Irbe et al., 2016; Zúñiga-Sánchez et al., 2014). Las plantas se crecieron en una cámara de crecimiento CONVIRON (Winnipeg, Canadá) en condiciones de fotoperiodo largo (16 h luz/ 8 horas oscuridad). Para el cultivo en placa, las semillas se esterilizaron con etanol al 70% durante 5 min y posteriormente con una solución de 1% SDS y 15% de hipoclorito de sodio por 10 min. Antes de sembrar, las semillas se enjuagaron con agua estéril cinco veces.

Para determinar el crecimiento del hipocótilo, las semillas se sembraron en un medio conteniendo 0.5X MS adicionando 3% (w/v) sacarosa según lo descrito en Derbyshire et al 2007. Las condiciones de crecimiento corresponden a las reportadas en Salazar-Irbe et al., 2016. La medición del largo de los hipocótilos se realizó según lo reportado previamente (Salazar-Irbe et al., 2016)

Generación de los vectores y líneas transgénicas para la localización subcelular.

Para los estudios de localización de BDX, se amplificó un fragmento 1098-bp río debajo de *ATG-BDX* a partir de cDNA sintetizado a partir de mRNA de inflorescencia utilizando los oligonucleótidos BDXLSF (5'ATGAAAGAGATGGGAGTGATAG 3') y BDXLSR (5'CCTCCGAGCACTGAGAAGCTTAAC 3'). El fragmento de PCR fue clonado en el vector pGEM-T Easy vector y posteriormente secuenciado. El plásmido con el inserto se cortó con la enzima de restricción BamHI y se clonó en el plásmido *pBIN:pBDX::GFP* (Zúñiga-Sánchez et al., 2014). Las plantas WT se transformaron con este vector y las plantas transgénicas se seleccionaron tal como se ha descrito previamente (Zúñiga-Sánchez et al., 2014).

Tratamientos con ácido indol acético (IAA) y con ácido 1-N-naftilftalámico (NPA)

Las semillas esterilizadas de las diferentes líneas fueron estratificadas a 4°C durante 2 días y posteriormente sembradas en cajas de Petri con 0.5X MS con 1%

sacarosa y adicionando 1 μM IAA o 2 μM de NPA. Para las plántulas control, se añadió al medio la cantidad equivalente de disolvente según el tratamiento. Las plántulas control y transgénicas se crecieron verticalmente en condiciones de luz continua a 20-22°C

RT-PCR Cuantitativo

Se utilizaron muestras de cDNA conteniendo 100 ng de RNA de plántulas WT, para la amplificación con SYBR Green Master Mix utilizando el Applied Biosystems StepOne Platform (Applied Biosystems). Se analizaron tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas, usando primers específicos para *BDX*.

Materiales

La solución de Ioduro de Propidio (IP, Invitrogen) se preparó a 10 mM utilizando agua como disolvente. El IAA se preparó a 2 mM en 100% etanol y el NPA se preparó en DMSO a 2 mM.

Análisis Histológicos.

Para marcar la pared celular, las plántulas se incubaron en una solución de IP (1.7 mM) durante 30 segundos antes del análisis en el microscopio confocal. El IP se visualizó a 576-670 nm y la GFP a 485-545 nm utilizando un microscopio confocal Olympus FV100 Laser. Las imágenes de las plantas WT sin fluorescencia fueron usados como controles. Para la plasmólisis, las plántulas transgénicas de *pBDX:BDX-GFP* fueron expuestas a manitol al 1M, durante 15 min. Antes de ser observado en el microscopio, la raíz primaria fue expuesta a ioduro de pripio (IP) en manitol al 1M .

Resultados y Discusión

La familia DUF642 está conformada por 10 genes en *A. thaliana* y las auxinas regulan la expresión de dos de los genes de esta familia *TEB* y *BDX* (Capítulo I y Figura 1D). Previamente se describió que *TEB* se localiza en la pared celular de las células epidérmicas del hipocótilo y participa en la elongación del hipocótilo. (Salazar-Irube et al., 2016) y en la figura 1 se muestra que *BDX* también se localiza en la pared celular de las células epidérmicas del hipocótilo y en células

plasmolizadas de la raíz primaria. Estos resultados sugieren que *BDX* también podría estar involucrada en los procesos relacionados con la elongación del hipocótilo.

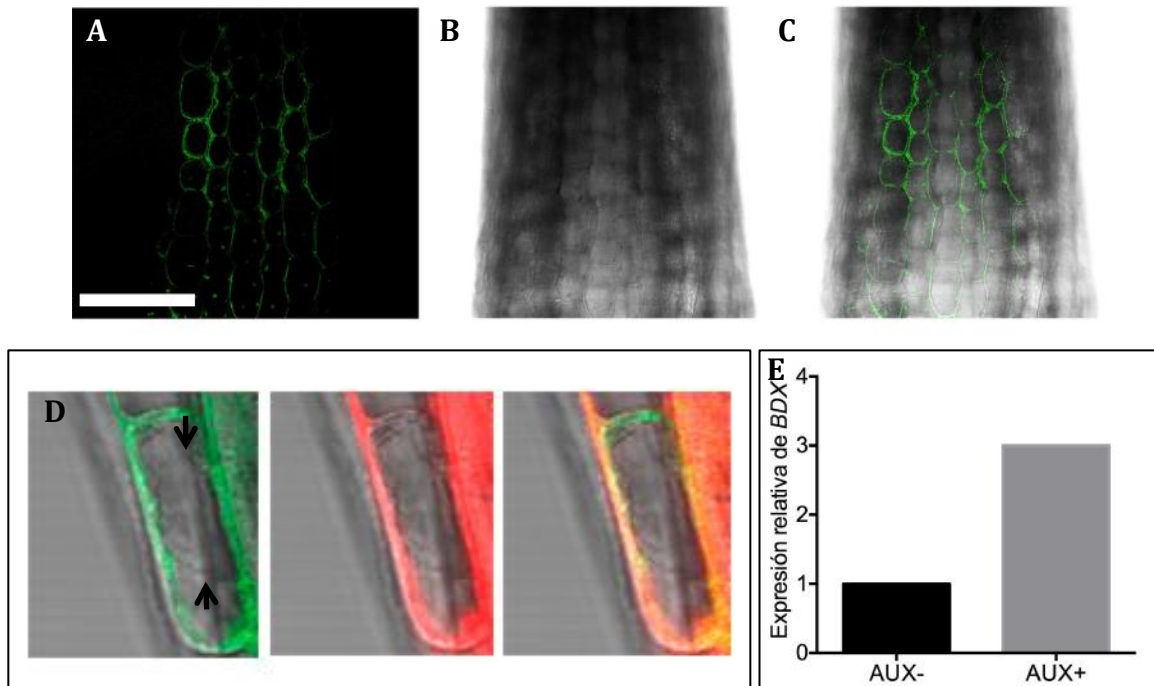


Figura 1. Localización de *BDX* en la pared celular de las células epidérmicas del hipocótilo. Plántulas transgénicas (*pBDX::BDX-GFP*) de 6 días fueron tratadas con 1mM IAA durante 24 horas para incrementar la expresión de *BDX*. A) La señal de GFP fue detectada en la periferia de las células B) Imagen DIC C) Imágenes superpuestas. D) Localización de *BDX* en la pared celular de células epidérmicas plasmolizadas de la raíz. De izquierda a derecha se muestran los cuadros que muestran la proteína GFP, el yoduro de propidio y las imágenes superpuestas, respectivamente. Las flechas señalan la membrana plasmática plasmolizada. E) Expresión relativa de *BDX* en plántulas WT de 7 d tratadas con IAA a 1 μ M durante un día. Barra= 100 μ m.

Las auxinas participan activamente en el proceso de elongación celular de las células del hipocótilo por lo que se determinó el efecto de IAA y del inhibidor de transporte de auxinas NPA sobre la elongación del hipocótilo en las plantas transgénicas mutantes o sobreexpresoras de *TEB* y *BDX* (Figuras 2 y 3). El

tratamiento con IAA disminuyó la elongación de los hipocótilos de las plántulas WT según lo reportado (Collett et al 2000). En la figura 2 se muestra que las plántulas que sobreexpresan *TEB* presentaron resistencia a IAA ya que no se detectó una inhibición de la elongación del hipocótilo. Por otro lado, el efecto inhibitorio de IAA fue más notorio en las líneas mutantes *teb-1* y *teb-2* que en la WT (>50% de inhibición). EL NPA inhibió la elongación de los hipocótilos de todas las líneas pero el efecto fue menor en las plántulas que sobreexpresan *TEB*.

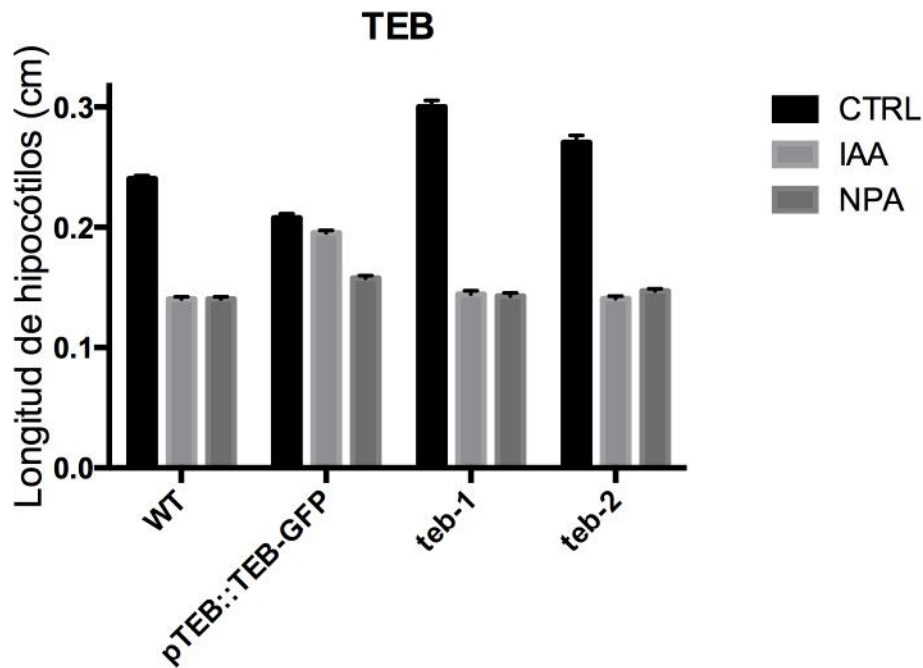


Figura 2. Elongación del hipocótilo de plántulas WT, *teb-1* y *teb-2* y que sobreexpresan *TEB* crecidas en condiciones de luz continua. Las plántulas de las diferentes líneas fueron crecidas en condiciones de luz continua en medio 0.5 X MS con 1% de sacarosa. Para el tratamiento con IAA o NPA, las semillas se sembraron en 0.5 X MS con 1% de sacarosa al que se le añadió 1 μ M IAA o 2 μ M NPA. En ambos tratamientos las plántas se crecieron desde el inicio en el medio que contiene el compuesto. Los datos corresponden al promedio de las mediciones de 40-50 plántulas \pm SE de tres réplicas biológicas diferentes.

En la figura 3 se muestra el efecto del IAA y de NPA sobre la elongación del hipocótilo de plantas mutantes o sobreexpresoras de *BDX*. Las plántulas de las líneas sobreexpresoras de *BDX* fueron resistentes al IAA y la mutante *bdx-1* fue más sensible. Esta resistencia a auxinas ha sido descrita para mutantes de proteínas involucradas en el proceso de señalización de auxinas como *AXR1* (*AUXIN*

RESISTANCE 1) (Collett et al, 2000). El NPA inhibió la elongación del hipocótilo de manera diferencial en la mutante y en las líneas sobreexpresoras de *BDX*. Tal como se describió para *TEB* (Figura 2), las líneas sobreexpresoras son menos sensibles a este inhibidor del transporte de auxinas (Figura 3).

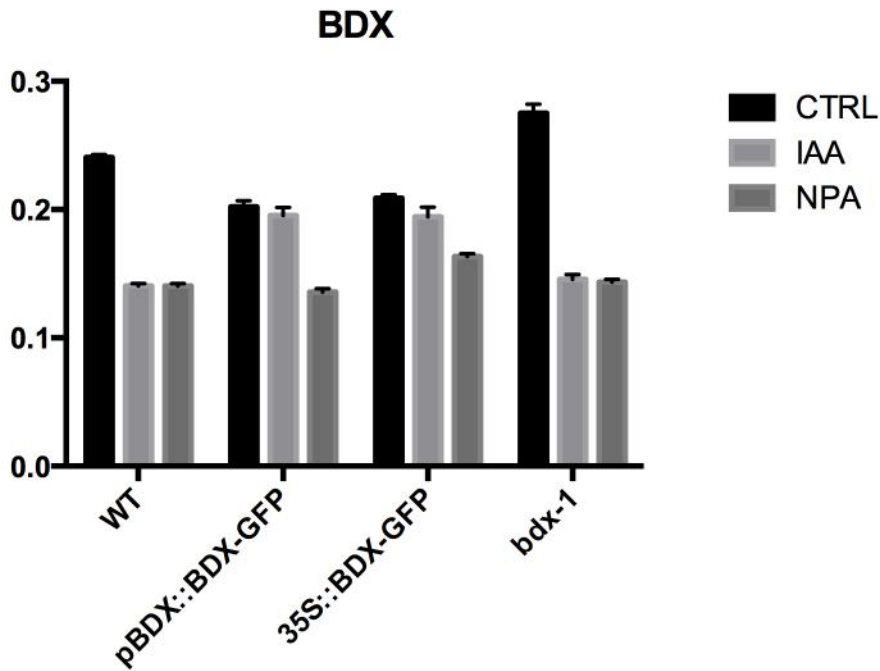


Figura 3. Elongación del hipocótilo de plántulas WT, *bdx-1* y que sobreexpresan *BDX* crecidas en condiciones de luz continua. Las plántulas de las diferentes líneas fueron crecidas en condiciones de luz continua en medio 0.5 X MS con 1% de sacarosa. Para el tratamiento con IAA o NPA, las semillas se sembraron en 0.5 X MS con 1% de sacarosa al que se le añadió 1 μ M IAA o 2 μ M NPA. Los datos corresponden al promedio de las mediciones de 40-50 plántulas \pm SE de tres réplicas biológicas diferentes.

El efecto inhibitorio de las auxinas sobre la elongación celular de las células epidérmicas del hipocótilo puede ser resultado de una mayor acumulación de esta hormona. La acumulación excesiva de auxinas en las células epidérmicas inhibe la elongación del hipocótilo en la mutante *vas2-1*. La enzima VAS está involucrada en el proceso de inactivación de las auxinas (Zheng et al., 2016) Para determinar si la función de *BDX* en el hipocótilo está relacionada con el flujo de auxinas, se determinó su acumulación en *bdx-1* (*bdx-1/DR5-GFP*, Figura 4). La línea transgénica

DR5::GFP se utilizó como control. El hipocótilo de las plántulas *DR5::GFP* presento exclusivamente señal en el tejido vascular, como ha sido descrito previamente (Fig 4A y D) (Zheng et al., 2016). Por otro lado, las células epidérmicas del hipocotilo de las plántulas *bdx-1/DR5-GFP* presentaron una señal importante y no se detectó ninguna señal en el tejido vascular (Figura 4A y D). En presencia de auxinas exógenas, se detectó señal en las células epidérmicas del hipocótilo de las plántulas *DR5::GFP* y de *bdx-1/DR5-GFP* (Figura 4B y E). El tratamiento con NPA no alteró la acumulación de auxinas descrita para las condiciones control en ninguna de las dos líneas (WT y *bdx-1*, Figura 4C y F). Esta acumulación de auxinas en las células epidérmicas que se relaciona con una mayor elongación del hipocótilo ha sido descrita cuando las plántulas se someten a altas temperaturas (29 °C, Zheng et al., 2016)

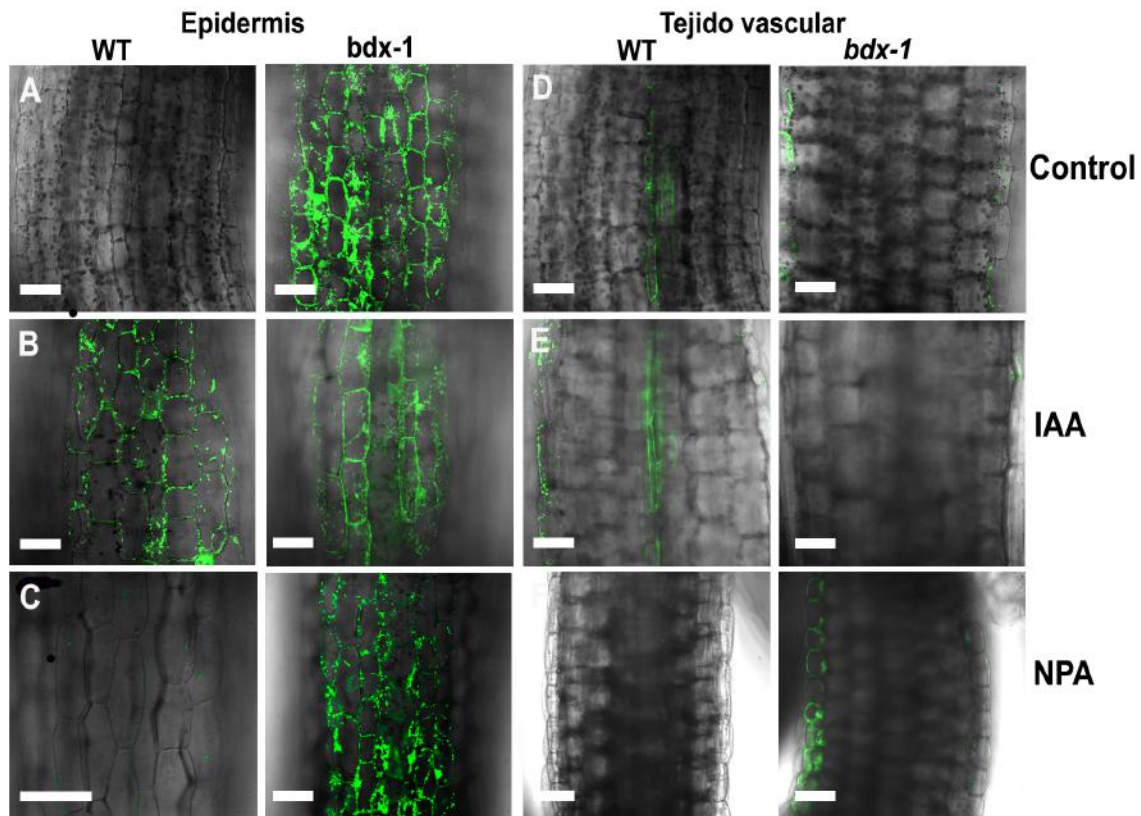


Figure 4. Efecto de IAA y NPA en la distribución de la señal de GFP en la epidermis y en el tejido vascular de hipocótilos. Las plántulas de las líneas *DR5::GFP* (WT) y *bdx-1/DR5::GFP* fueron crecidas en condiciones de luz continua durante 5 días con

1 mM IAA o 0.2 mM NPA. A) Células epidérmicas de la región basal del hipocótilo de plántulas WT y *bdx-1* B) Células epidérmicas de la región basal del hipocótilo de plántulas WT y *bdx-1* tratadas con 1 μ M IAA. C) Células epidérmicas de la región apical del hipocótilo de plántulas WT y *bdx-1* tratadas con 2 μ M NPA. D) Tejido vascular de la región basal del hipocótilo de plántulas WT y *bdx-1* E) Tejido vascular de la región basal del hipocótilo de plántulas WT y *bdx-1* tratadas con 1 μ M IAA. F) Tejido vascular de la región apical del hipocótilo de plántulas WT y *bdx-1* tratadas con 2 μ M NPA. Barra = 50 μ m.

La acumulación de auxinas en las células epidérmicas del hipocótilo también puede ser resultado de una alteración en el flujo de las auxinas. El transporte de auxinas entre el cotiledón y el hipocótilo está determinado principalmente por PIN3 (Figura 5). En condiciones control PIN3 se localiza en las membranas transversales de la endodermis del hipocótilo (Figura 5A) (Keuskamp et al., 2010). Durante el desarrollo del gancho apical (apical hook, en inglés, 1dag), PIN3 regula la distribución de auxinas hacia la parte aérea y hacia la raíz. En las células epidérmicas cercanas a la raíz, PIN3 se localiza en la membrana transversal basal, mientras que en las células cercanas a los cotiledones se localiza en la membrana transversal apical de las células epidérmicas (Zadnikova et al., 2010). El transportador PIN3 también participa activamente en el flujo de auxinas en el hipocótilo en respuesta a la calidad de luz (R:RL) y a la gravedad y se ha demostrado que la elongación de los hipocótilos de las mutantes *pin3-1* es menor que la elongación de los hipocótilos WT en condiciones de baja relación R:RL. En condiciones control de luz, PIN3 se localiza en las membranas transversales de las células de la endodermis y la disminución en la relación R:RL promueve la reubicación de PIN3 a las membranas laterales para dirigir el flujo de auxinas hacia las células epidérmicas (Figura 5B) (Keuskamp et al., 2010, Rakusová et al., 2016). Por otro lado, también se ha reportado que el flujo de auxinas depende de un transporte pasivo a través de plasmodesmos. La sobreexpresión del gen *GSL8* (*Glucan Synthase-Like 8*), relacionado con la síntesis de calosa, promueve la acumulación de auxinas en las células epidérmicas impidiendo su flujo simplástico al reducirse la permeabilidad de los plasmodesmos (Figura 5C) (Han et al., 2014).

El grado de esterificación de las pectinas altera la localización subcelular de PIN1 en el meristemo apical (Peaucelle et al., 2014). Asimismo, se ha sugerido que el grado de esterificación de las pectinas participa en la regulación de la apertura de los plasmodesmos (Lionetti et al., 2014). BDX y TEB se localizan en la pared celular de las células epidérmicas del hipocótilo por lo que la acumulación de auxinas en las células epidérmicas observadas en *bdx1* podría estar relacionada con una alteración en el flujo de auxinas como consecuencia de la alteración de la localización en la pared celular de PIN3 y/o en la regulación de la apertura de plasmodesmos (Figura 5 D y E).

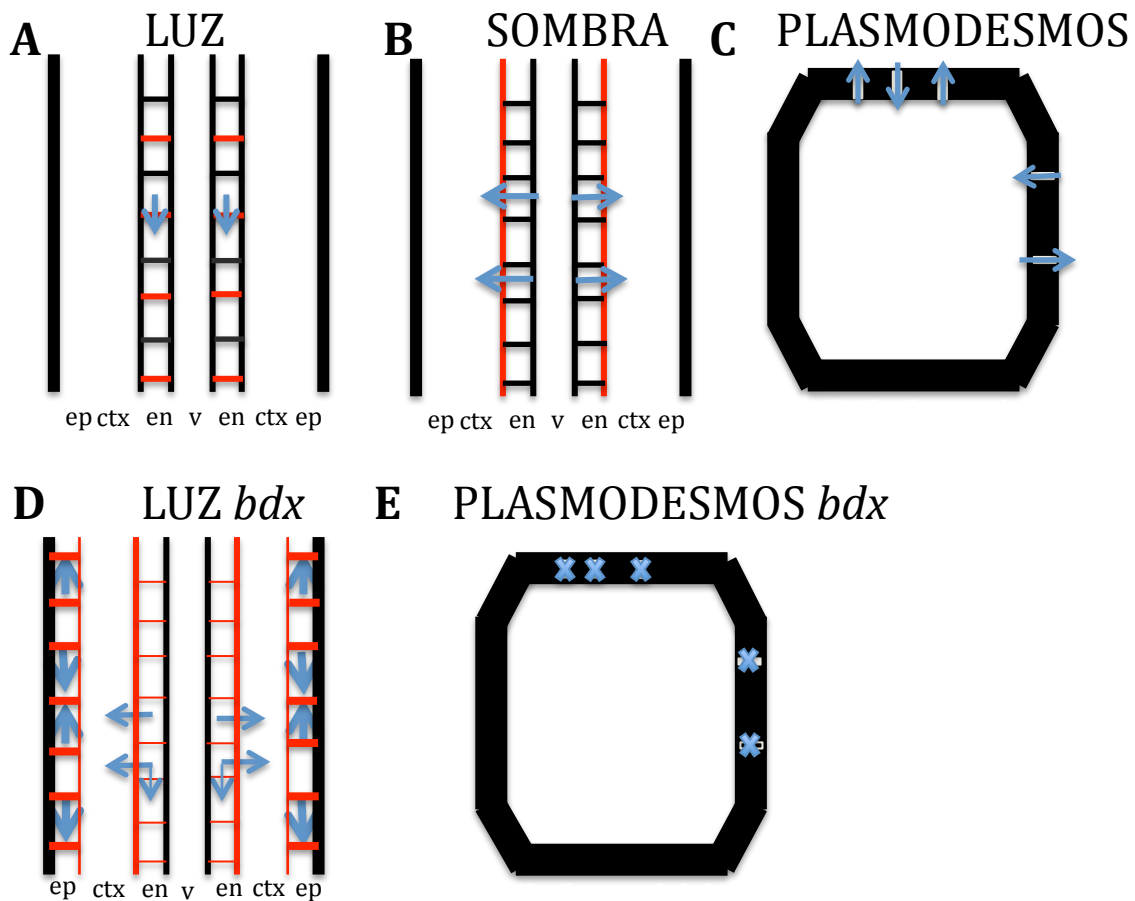


Figura 5. Modelos del flujo de auxinas en condiciones control y en plántulas de *bdx*. A) En condiciones de crecimiento en luz blanca, el transporte de auxinas conducido por el transportador de eflujo PIN3, es de manera basipetal en el tejido vascular y en la endodermis, donde la proteína se encuentra en las membranas transversales. B) En condiciones de una baja relación R:RL, la orientación de PIN3 en la endodermis cambia hacia la membrana lateral que está del lado de los tejidos

externos, dirigiendo el flujo hacia el cortex y epidermis. C) Flujo de auxinas a través de los plasmodesmos. La permeabilidad en estas estructuras permite a moléculas pequeñas como las auxinas poder moverse desde el apoplasto hacia el interior de la célula y viceversa, cuando las condiciones de apertura del plasmodesmo son óptimas. D) Flujo de auxinas en *bdx*. El flujo de auxinas podría verse alterado por el grado de esterificación de las pectinas, promoviendo el reacomodo de los transportadores de auxinas PIN3 hacia las membranas laterales de las células, permitiendo que un mayor flujo de auxinas llegue hasta la epidermis, donde el transporte de auxinas también se podría ver alterado. E) Flujo de auxinas en plasmodesmos de células epidérmicas de *bdx*.

Es necesario llevar a cabo estudios de localización subcelular de PIN3 y de permeabilidad de los plasmodesmos en la *bdx-1* para poder determinar el proceso en el cual participan las proteínas de la familia DUF642 TEB y BDX durante el flujo de auxinas en el hipocótilo.

Bibliografía

Bischoff V, Selbig, J, Scheible WR. (2010). Involvement of TBL/DUF231 proteins into cell wall biology. *Plant Sign Behav*, 5:1057-1059.

Collett CE, Harberd NP, Leyser O. (2000) Hormonal interactions in the control of *Arabidopsis* hypocotyl elongation. *Plant Physiol*, 124:553–561

Derbyshire P, Findlay K, McCann MC, Roberts K. (2007) Cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyls involves dynamic changes in cell wall thickness. *J Exp Bot*, 58:2079–2089

Gendreau E, Traas J, Demos T, Crandjean O, Caboche M, Hofte H. (1997) Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 114: 295-305

Han X, Hyun T.K, Zhang M, Kumar R, Koh EJ, Kang BH, Lucas WJ, Kim JY. (2014) Auxin-callose-mediated plasmodesmal gating is essential for tropic auxin gradient formation and signaling. *Dev Cell*, 28:132–146.

Lionetti V, Raiola A, Cervone F, Bellincampi D. (2014). How do pectin methylesterases and their inhibitors affect the spreading of tobamovirus?. *Plant Sign Behav*. 9:e972863.

Keuskamp DH, Pollmann S, Voeselek LA, Peeters AJ, Pierik R. (2010) Auxin transport through PIN-FORMED 3 (PIN3) controls shade avoidance and fitness during competition. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 107:22740–22744.

Kutschera U, Niklas KJ. (2007) The epidermal-growth-control theory of stem elongation: an

old and a new perspective. *J Plant Physiol*, 164: 1395–1409.

Petrasek, J. & Friml, J. Auxin transport routes in plant development. *Development* 136, 2675–2688 (2009).

Procko C, Burko Y, Jaillais Y, Ljung K, Long JA, Chory J. (2016) The epidermis coordinates auxin-induced stem growth in response to shade. *Genes Dev* 30:1529–1541.

Rakusová H , Abbas M, Han H, Song S, Robert HS, Friml J (2016) Termination of shoot gravitropic responses by auxin feedback on PIN3 polarity. *Current Biology* 26, 1–7.

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

Tao Y, Ferrer JL, Ljung K, Pojer F, Hong F, Long JA, Li L, Moreno JE, Bowman ME, Ivans LJ, Cheng Y (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell*, 133:164–176.

Vázquez-Lobo A, Roujol D, Zúñiga-Sánchez E, Pinero D, Albenne C, Gamboa-de Buen A, Jamet E. (2012) The highly conserved spermatophyte cell wall DUF642 protein family: phylogeny and first evidence of interaction with cell wall polysaccharides in vitro. *Mol Phyl Evol*, 63: 510-520

Yamada M, Greenham K, Prigge MJ, Jensen PJ, Estelle M. (2009) The *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE2* gene is required for auxin synthesis and diverse aspects of plant development. *Plant Physiol*, 151:168–179.

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

Zúñiga-Sánchez E, Soriano D, Martínez-Barajas E, Orozco-Segovia A, Gamboa-deBuen A. (2014) *BIIDX1*, the *At4g32460* DUF642 gene, is involved in pectin methyl esterase regulation during *Arabidopsis thaliana* seed germination and plant development. *BMC Plant Biology* 14:33

Capítulo III. Resultados Adicionales

En este capítulo se muestran resultados adicionales relacionados con la localización p de TEB durante la fase final del ciclo celular (citocinesis), la participación de TEB durante la fase temprana del crecimiento de los pelos radicales y durante la exposición de la planta a un daño mecánico. Por último se estudia un posible papel de TEB en la formación de las raíces adventicias.

1.13 TEB se observa intracelularmente durante la mitosis

Para determinar el patrón espacial de TEB durante la división celular, se sincronizaron células meristemáticas de la raíz de *A. thaliana*, utilizando el tratamiento de hidroxiaurea (HU, Cools et al., 2010). Cabe destacar que no se detectó la proteína en la línea pTEB::TEB-GFP en las plantas transgénicas a las que no se les aplicó el tratamiento con HU (Salazar-Irbe et al., 2016; Figura 1A). Sin embargo, este tratamiento promovió la expresión de TEB en todas las células sincronizadas (Figura 1). Se detectó un patrón difuso de la proteína en células del cortex de la zona meristemática en plántulas tratadas por 16 horas (Figura 1B). A las 17 h, la proteína fluorescente se observó en células del cortex y de la endodermis de manera compacta en forma de anillo, posiblemente alrededor del núcleo (Figura 1B y C). Por lo general, la proteína TEB se observa en cortex y epidermis, sin embargo con este tratamiento también se logra detectar en la endodermis (Figura 1D). Para establecer una posible relación entre la proteína TEB y el fragmoplasto, se utilizaron plántulas que expresan pTEB::TEB-GFP y 35S::CFP-TUA como marcador de microtúbulos (tubulina) y se observaron durante el tratamiento de HU. A las 18 h, se detectaron tanto la GFP como la CFP en células del cortex de la zona meristemática en raíz. Durante la formación del fragmoplasto (Fig 1D, E y F), la proteína TEB mostró un patrón espacial similar al de la tubulina, sugiriendo que la proteína se deposita en la placa celular a través de vesículas asociadas al fragmoplasto como se ha descrito para otras proteínas involucradas en la formación de la pared celular (Toyooka et al., 2009; Miart et al., 2014).

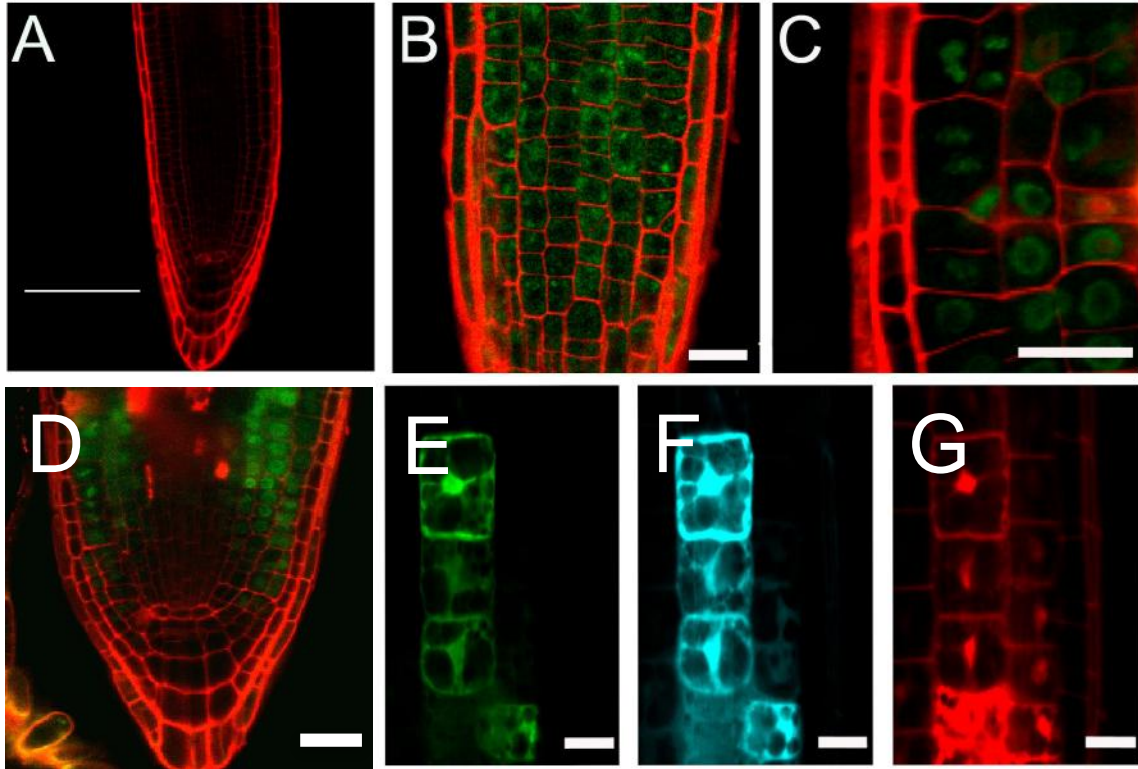


Figura 1. Localización subcelular de la proteína TEB en células meristemáticas de la raíz sincronizadas con hidroxIUrea. (A) Plántulas no expuestas al tratamiento de HU. (B) Plántulas tratadas durante 16 h, las raíces tratadas mostraron un patrón difuso de la GFP en células meristemáticas del cortex. La pared celular fue teñida con yoduro de propidio (rojo). (C) Después de 17 h la GFP fue detectada en forma de anillo rodeando al núcleo en células del cortex. (D) En este corte longitudinal de plántulas de 18 h, la GFP se observa en diferentes tipos celulares incluyendo, cortex y endodermis. En la epidermis, la GFP se detectó en la pared celular. (E) Se muestra a TEB localizado en el fragmoplasto durante el depósito de la placa celular en células del cortex. (F) La línea 35S::CFP-TUA se utilizó como control para observar el movimiento de los microtúbulos, mediante la tubulina. (G) Ioduro de propidio. La barra en (A) es 100 μ M, (B-G) es de 20 μ M.

1.14 TEB se localiza en células de tricoblastos durante el tratamiento con auxinas y en células dañadas

Los pelos radicales son estructuras unicelulares que se desarrollan por el crecimiento de la punta de células epidérmicas y están especializados en la absorción de nutrientes. Sus paredes celulares están compuestas principalmente, de polisacáridos y glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (Velásquez et al., 2011). El desarrollo de los pelos radicales es un proceso altamente dinámico, donde

participan de manera conjunta procesos endógenos y ambientales y las auxinas son un componente clave en su compleja regulación. Con base en esta última idea, decidimos observar pelos radicales de plántulas de 7 d que expresan pTEB::TEB-GFP y 35S::CFP-TUA expuestas a un tratamiento con auxinas (IAA), dado que el gen *TEB* se expresa en pelos radicales (Salazar-Irribé, 2011). Se observó la localización de la proteína TEB en células de tricoblastos, principalmente en la pared transversal de estas células y en la punta del pelo en temprana formación (Fig. 2A-C). La tubulina mostró un patrón similar al de TEB (Fig. 2D-F), sugiriendo un papel importante en la formación de estas estructuras.

Bajo condiciones control, no se observó fluorescencia de la GFP en la zona de elongación, excepto como resultado de un daño ocasionado en la raíz por la manipulación de las plántulas (daño mecánico). En estas células dañadas, la proteína TEB se observó principalmente en las paredes transversales y también se presentó en las células adyacentes al daño en la pared e intracelularmente (Fig. 2G-I).

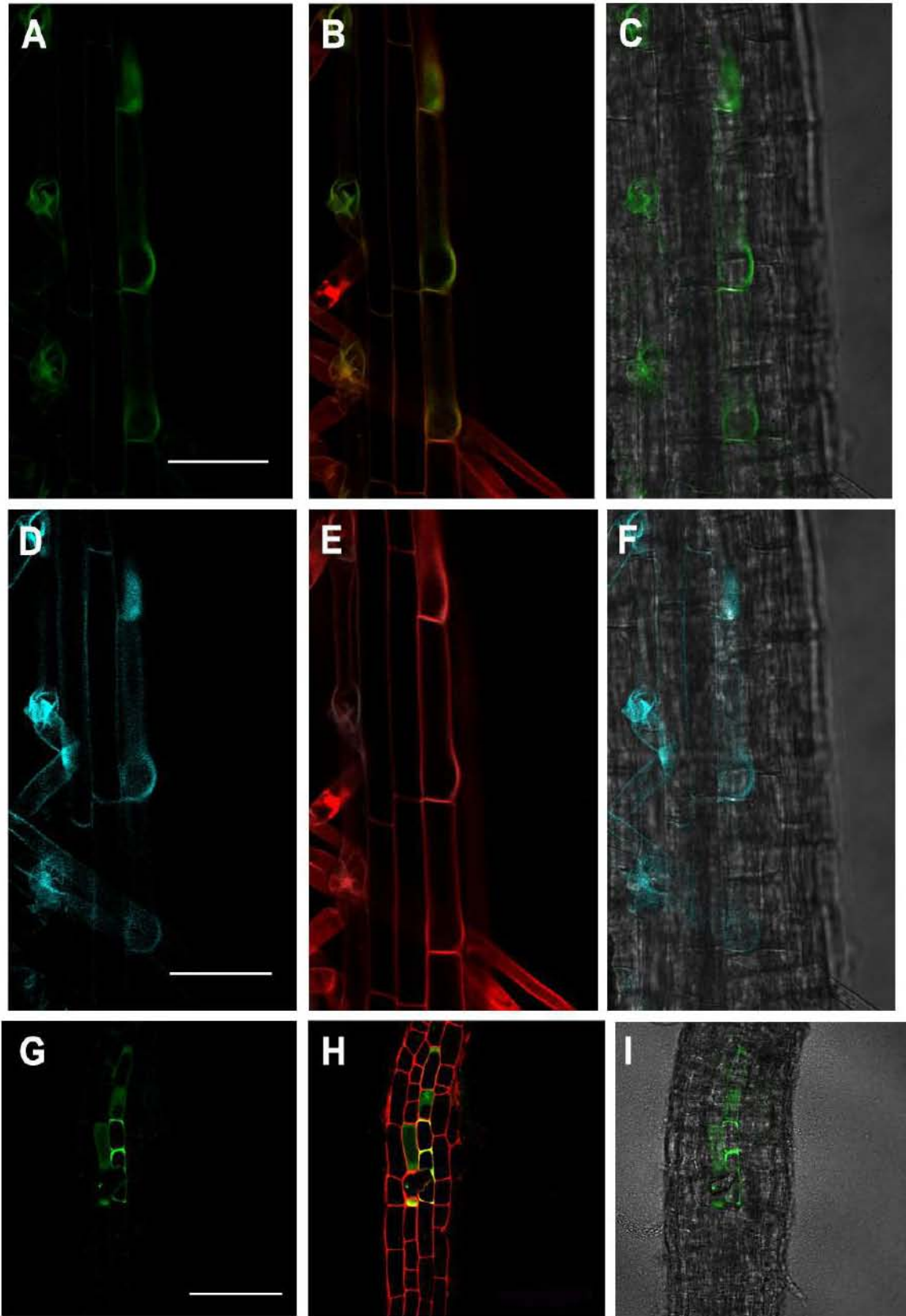


Figura 2. Localización subcelular de TEB durante el desarrollo de pelos radicales y durante el daño celular. (A-C) Localización de TEB en tricoblastos. (D-F) Localización de 35S::CFP-TUA en tricoblastos. Se utilizaron plántulas de 6 días crecidas verticalmente en luz continua en medio MS 0.5 %. Al sexto día las plantas fueron trasplantadas a un medio MS adicionado con 1 μ M de IAA y se mantuvieron aproximadamente 24 horas antes de observarse en el microscopio confocal. (G-I) Localización de TEB durante el daño celular en células epidérmicas de raíz de plántulas de 7 días. Barras de A-F = 50 μ m; Barra G-I = 100 μ m.

1.15 TEB se expresa y localiza en las células epidérmicas adyacentes a la raíz adventicia durante su protrusión y podría afectar el desarrollo de estas estructuras

Anteriormente se ha determinado la expresión y la localización de TEB durante el desarrollo de la raíz lateral. Se ha descrito que el programa de desarrollo de raíz lateral y adventicia es muy similar (Boerjan et al., 1995; Sukumar et al., 2013), por lo cual se decidió hacer un análisis en las raíces adventicias. Se utilizaron plántulas etioladas durante 3 d para luego ser expuestas a luz continua durante 7 días para una mayor producción de raíces adventicias.

En plántulas de pTEB-GFP se observó una expresión en las células epidérmicas adyacentes a la raíz adventicia en protrusión (Fig. 3A y B). Sin embargo, no se encontró señal en raíces adventicias maduras (Fig. 3C). Por otro lado, la localización subcelular de TEB se encontró en la pared celular de células de la epidermis rodeando a la raíz adventicia en plena protrusión (Fig. 3D).

De manera similar a las raíces laterales, se contó el número de raíces adventicias promedio en las plantas de pTEB::TEB-GFP y la mutante *teb-1* y se comparó con las plantas silvestres. En la Fig. 3E, se muestra que tanto en las plantas de sobreexpresión, como en la línea mutante, el número de raíces adventicias es mayor con respecto a las plantas silvestres.

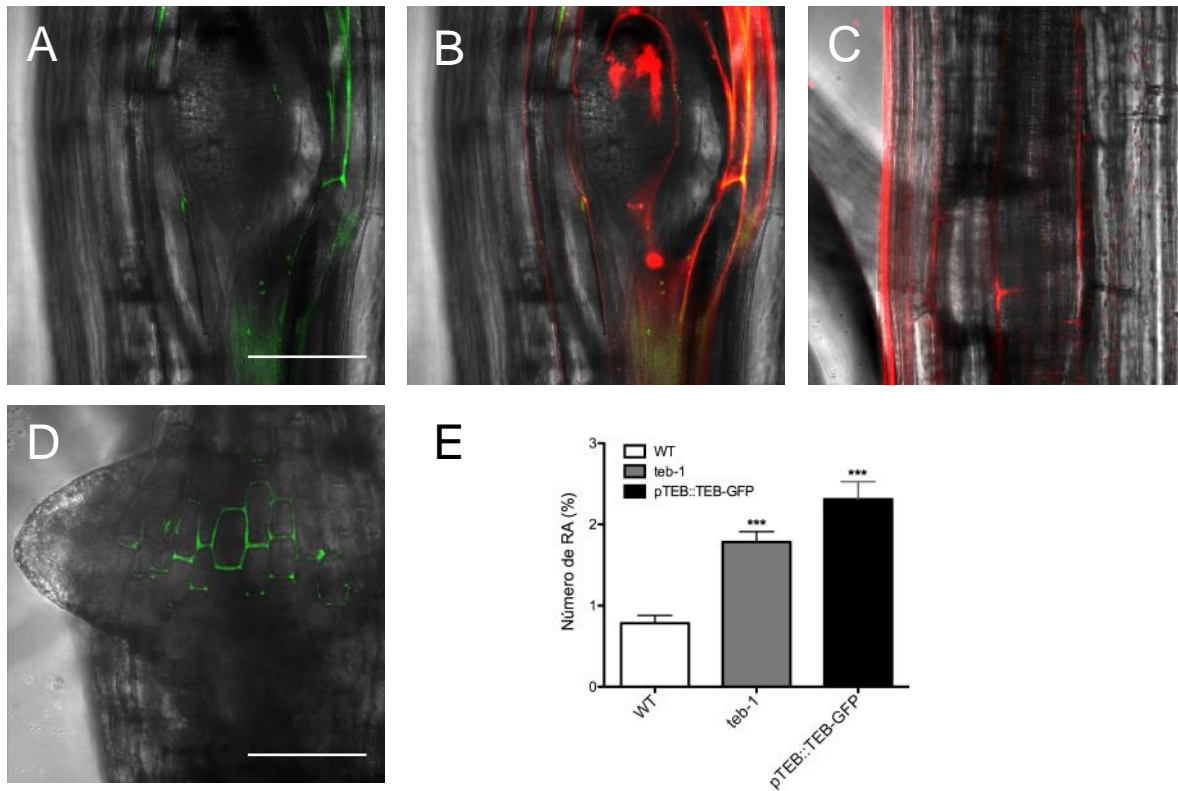


Figura 3. Expresión, localización subcelular de *TEB* y fenotipo de las plantas mutantes *teb-1* y de sobreexpresión pTEB::TEB-GFP. (A-B) Expresión de *TEB* en las células epidérmicas adyacentes a la protrusión de una raíz adventicia joven en hipocótilo en plántulas de 10 días, de los cuales 3 inicialmente fueron en oscuridad y 7 en luz continua, para un mejor desarrollo de las raíces, según Guénin 2011. (C) Raíz adventicia madura en plántula de 10 días. (D) Localización subcelular de *TEB* en las células epidérmicas de la base del hipocótilo que rodean a la protrusión de una raíz adventicia. Se utilizó el mismo método para las plántulas de expresión. (E) Porcentaje de raíces adventicias en plántulas de 10 días. La pared celular fue teñida con ioduro de propidio (rojo). Las barras representan 100 μM.

Bibliografía

Akkerman M, Franssen-Verheijen MA, Immerzeel P, Hollander LN, Schel JH, Emons AM (2012) Texture of cellulose microfibrils of root hair cell walls of *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula*, and *Vicia sativa*. *J Microsc*, 247:60-7.

Boerjan W, Cervera MT, Delarue M, Beeckman T, Dewitte W, Bellini C, Caboche M, Van Onckelen H, Van Montagu M, Inzé D (1995) Superroot, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *Plant Cell* 7: 1405–1419.

Cools T, Iantcheva A, Maes S, Van den Daele H, De Veylder L. (2010) A replication stress-induced synchronization method for *Arabidopsis thaliana* root meristems, *Plant J.* 64 705–

714.

Emons AMC, Woltersarts AMC (1983) Cortical microtubules and microfibril deposition in the cell-wall of root hairs of *Equisetum-hyemale*. *Protoplasma*, 117:68-81.

Emons AMC, Kieft H (1994) Winding threads around plant cells - applications of the geometrical model for microfibril deposition. *Protoplasma*, 180:59-69.

Galway ME, Heckman JW, Schiefelbein JW (1997) Growth and ultra-structure of *Arabidopsis* root hairs: the *rhd3* mutation alters vacuole enlargement and tip growth. *Planta*, 201: 209-18.

Guenin S, Mareck A, Rayon C, Lamour R, Assoumou Ndong Y, Domon JM, Senechal, F, Fournet F, Jamet E, Canut H, Percoco G, Mouille G, Rolland A, Rusterucci C, Guerineau F, Van Wuytswinkel O, Gillet F, Driouch A, Lerouge P, Gutierrez L, Pelloux J (2011) Identification of pectin methylesterase 3 as a basic pectin methylesterase isoform involved in adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana*, *New Phytol.* 192 114–126.

Miart F, Desprez T, Biot E, Morin H, Belcram K, Höfte H, Gonneau M, Vernhettes S (2013) Spatiotemporal analysis of cellulose synthesis during cell plate formation in *Arabidopsis*.

Newcomb EH, Bonnett HT: Cytoplasmic microtubule and wall microfibril orientation in root hairs of radish. *J Cell Biol* 1965, 27:575-89.

Park S, Szumlanski AL, Gu F, Guo F, Nielsen E: A role for CSLD3 during cell-wall synthesis in apical plasma membranes of tip- growing root-hair cells. *Nat Cell Bio* 2011, 13:973-80

Salazar-Iribe (2011) Expresión y localización subcelular de *At2g41800* durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*, un miembro de la familia DUF642 específico de espermatófitas. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México.

Sukumar P, Maloney GS, Muday GK. 2013. Localized induction of the ATP-binding cassette B19 auxin transporter enhances adventitious root formation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 162:1392–405

Toyooka K, Goto Y, Asattsuma S, Koizumi M, Mitsui T, Matsuoka K (2009). A mobile secretory vesicle cluster involved in mass transport from the Golgi to the plant cell exterior. *Plant Cell* 21 (4): 1212-1229

Velasquez SM, Ricardi MM, Dorosz JG, Fernández PV, Nadra AD, Pol-Fachin L, Egelund J, Gille S, Harholt J, Ciancia M, Verli H, Pauly M, Bacic A, Olsen CE, Ulvskov P, Petersen BL, Somerville C, Iusem ND, Estevez JM (2011) O-glycosylated cell wall proteins are essential in root hair growth. *Science* 332: 1401-1403

Yoo CM, Quan L, Blancaflor EB (2012) Divergence and redundancy in CSLD2 and CSLD3 function during *Arabidopsis thaliana* root hair and female gametophyte development. *Front Plant Sci*, 3.

Discusión general

La pared celular ha sido un órgano fundamental en la diversificación de las plantas en todos los ecosistemas. La pared celular provee a las plantas de soporte, estructura y protección ante factores bióticos y abióticos. El estudio de los genes que dan lugar a proteínas que cumplen alguna función en la pared es de gran importancia para entender su dinámica. En los últimos años, el estudio de la pared celular ha alcanzado un gran auge debido a intereses biotecnológicos, al utilizar sus componentes para producir biocombustibles. Aproximadamente 400 proteínas de pared celular han sido detectadas en proteomas y han sido clasificadas con base en la función bioquímica predicha (Jamet et al., 2006). En esta clasificación se encuentran proteínas que actúan sobre polisacáridos (PME's, PG's), óxido reductadas, proteasas, proteínas de andamiaje, de señalización, relacionadas con metabolismo de lípidos y proteínas de función desconocida (Zúñiga-Sánchez y Gamboa-deBuen, 2011). Sin embargo, el número de proteínas a las que se les ha podido asignar una función es bajo.

Las proteínas con función desconocida representan entre un 5 a un 30% del total de proteínas en un proteoma de pared celular. La proteína TEB, codificada por el gen *At2g41800*, tiene la particularidad de encontrarse únicamente en proteomas de pared celular generados a partir de células en suspensión (Chivasa et al, 2002; Borderies et al, 2003; Slabas et al, 2004; Bayer et al, 2006), incluyendo un proteoma de plasmodesmo (Fernández-Calvino et al., 2011). *TEB* se expresa preferencialmente en el meristemo apical de la raíz, así como en tejido joven de hoja y tallo, en condiciones control. Sin embargo, en estas condiciones no fue posible determinar la localización subcelular (Salazar-Iribe, 2011). Para poder determinar la localización subcelular de TEB y, considerando que *TEB* ha sido reportado como uno de los 71 genes que más se expresa durante la división celular, específicamente entre la fase M y la G1 (Menges et al., 2002), se promovió la división celular utilizando auxinas exógenas (Ogawa et al., 2004), medio de inducción de callo y un

tratamiento con hidroxiaurea (Figura 3, capítulo I) (Cools et al., 2010). El tratamiento con auxinas promovió la acumulación de TEB en citoplasma y en pared celular de células epidérmicas en la zona del meristemo y en tricoblastos desde etapas tempranas de su desarrollo (Figura suplementaria 3, capítulo I). Al trasplantar las plántulas a un medio de inducción de callo, se observó un incremento en la expresión y la localización de la proteína en la pared celular de las células que conforman el callo, a partir del cuarto día en tejido de raíz (Figura 1 y 3, capítulo I). El medio de inducción de callo también contiene una concentración importante de auxinas. Estos resultados indican que *TEB* es un gen ampliamente regulado por auxinas.

La hidroxiaurea (HU) sincroniza el ciclo celular de las células meristemáticas; la línea transgénica de localización de tubulina (35S::CFP-TUA) se utilizó como control del tratamiento, ya que la tubulina forma parte del rearrreglo de los microtúbulos a lo largo de la división celular (Rasmussen et al., 2010). Las plantas 35S::CFP-TUA fueron transformadas con el vector *pTEB::TEB-GFP*. A pesar de ser de que TEB ha sido descrita como una proteína de pared celular, a las 16 horas de tratamiento con HU, cuando las células están sincronizadas al final de la fase G2 y a punto de entrar a la fase M, su localización es intracelular presentando un patrón difuso. A las 18 horas de tratamiento, TEB colocaliza con la tubulina en el fragmoplasto. Posteriormente, a las 20 horas de tratamiento que corresponde al término de la citocinesis y formación de las dos células hijas, TEB se localiza en la pared celular (Figura 3F, Capítulo I). Estos resultados indican que el gen podría tener alguna función importante en tejidos con una alta proliferación celular. Durante la división celular TEB podría estar colaborando en la remodelación de la pared parental y en la formación de la nueva pared celular entre las dos células hijas. Sin embargo, es necesario llevar a cabo experimentos más finos para poder determinar el papel de *TEB* durante el proceso de división celular.

A pesar de que *TEB* se expresa en la raíz primaria y en la raíz lateral, no se observó fenotipo en las plantas de pérdida y ganancia de función. Estos resultados sugieren

una posible redundancia funcional con el gen de la familia DUF642 *At3g08030* dado que su expresión se presenta en los mismos tipos celulares de la raíz primaria y lateral que *TEB* (Figura suplementaria 4, Capítulo I).

En raíces adventicias de las plantas transgénicas, *TEB* se expresa y localiza en las células epidérmicas que rodean al primordio de la raíz adventicia, con un patrón similar al de las raíces laterales.. El número de raíces adventicias es mayor tanto en las plantas mutantes como las de sobreexpresión (Figura 3; Capítulo III). Un mismo fenotipo para plantas con disminución o aumento en la expresión del mismo gen ha sido reportado para proteínas involucradas en la remodelación de la pared celular. Para el gen POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION1 (*PGX1*), las plantas mutantes y de sobreexpresión presentan altas proporciones de flores con pétalos extras, sugiriendo que el cambio en la regulación de la degradación de las pectinas juega un papel en la determinación del patrón floral (Xiao et al., 2014).

BDX y otras proteínas de la familia DUF642 han sido detectadas en proteomas de pared celular de hipocótilos mientras que la presencia de *TEB* en este tejido no ha sido descrita previamente (Jamet et al., 2010). Tanto *BDX* como *TEB* se localizan en la pared celular de las células epidérmicas de los hipocótilos (Figura 3, capítulo I; Figura 1, capítulo II) y, en condiciones de luz y de oscuridad las plántulas mutantes de ambos genes (*bdx-1*, *teb-1* y *teb-2*) presentan un fenotipo de hipocótilos largos. Por otro lado, en las líneas de sobreexpresión de ambos genes los hipocótilos son más cortos con respecto al control (Figura 6, Capítulo I) Para *TEB*, las células epidérmicas de las mutantes son más grandes y las de la línea de sobreexpresión son más cortas (Figura 6; capítulo I), por lo que se puede decir que *TEB* participa en el proceso de elongación celular.

Por otro lado, en plántulas de 7 días de la línea mutante *teb-1* se detectó una menor actividad de PME. En las plantas mutantes de *teb-1* y *teb-2* se realizaron inmunolocalizaciones para determinar el grado de metil esterificación en células epidérmicas de hipocótilos de 4 días, utilizando el anticuerpo JIM5 el cual es específico para pectinas desmetil esterificadas. En ambas mutantes hubo un decremento de la densidad de pectinas desmetil esterificadas, lo cual sugiere que

TEB podría estar asociado con el correcto funcionamiento de las enzimas con actividad de PME. La participación de las PME en la elongación del hipocótilo ha sido previamente descrita. El hipocótilo es más largo en las mutantes de PME y más corto en las líneas sobreexpresoras (Derbyshire et al., 2007; Pelletier et al., 2010; Guenin et al., 2013). Asimismo se ha descrito que el mayor grado de esterificación de las pectinas puede promover la elongación celular de las células epidérmicas del hipocótilo (Peacelle et al., 2015; Voxeur y Hofte, 2016) por lo que la mayor elongación de las células observada en las mutantes de los genes *TEB* y *BDX* podría estar relacionada con este mecanismo.

Por otro lado, el grado de esterificación de las pectinas también puede regular la localización de los transportadores de eflujo de auxinas (PIN) y la permeabilidad de los plasmodesmos por lo tanto la acumulación de auxinas. La inhibición del proceso de desmetil esterificación de las pectinas, utilizando líneas de sobreexpresión de inhibidores de PME, bloquea la formación de órganos en el meristemo apical mediado por auxinas. En estas líneas se altera el patrón del transportador de auxinas PIN1 en las células de la epidermis del meristemo aéreo (Braybrook y Peaucelle, 2013). La elongación de las células epidérmicas del hipocótilo es el factor determinante en la modulación de la elongación del hipocótilo (Kuschera y Nicklas 2007). Recientemente se ha demostrado que para que el hipocótilo elongue adecuadamente, es necesario que haya una acumulación de auxinas en la epidermis (Procko et al., 2016). Esta acumulación puede ser mediada por PIN3 (Rakusova et al., 2016) o por un cambio la permeabilidad de los plasmodesmos (Han et al., 2014). La acumulación de auxinas en las células epidérmicas de la línea *bdx-1/DR5-GFP* podría estar relacionada con la mayor elongación del hipocótilo de esta mutante (Figura 3 y Figura 4, capítulo II) tal como ha sido descrito en la mutantes *vas2* y cuando las plántulas WT crecen en condiciones de alta temperatura (Zheng et al., 2016) vía cambios en el grado de esterificación de las pectinas. El efecto negativo del NPA sobre la acumulación en la mutante *bdx-1* sugiere que en el flujo de auxinas vía transportadores esta alterado.

Sin embargo, también se ha descrito que niveles supraóptimos de auxinas pueden repercutir negativamente en el tamaño del hipocótilo de las plantas pero algunas

mutantes relacionadas con la vía de señalización de las auxinas son resistentes, como es el caso de *axr1* (Collet et al., 2000; Procko et al., 2016). Las plántulas de sobreexpresión de *TEB* y *BDX* son resistentes ya que la auxina exógena no inhibió la elongación del hipocótilo, y las mutantes *teb-1*, *teb-1* y *bdx1* presentaron una mayor sensibilidad al tratamiento con respecto al control. (Figura 2 y 3, Capítulo II). Estos resultados sugieren que las líneas de sobreexpresión tienen bajos niveles de auxinas y que *TEB* y *BDX* podrían participar activamente en la regulación del flujo de auxinas.

La familia de proteínas DUF642 tiene la característica de estar conformada por un péptido señal y dos subdominios; un subdominio que no tiene similitud con nada antes descrito y el segundo que es similar a un dominio de unión a carbohidrato. En relación con este último, se ha descrito que al menos la proteína At3g08030 es capaz de interactuar *in vitro* con la celulosa (Vázquez-Lobo et al., 2012). Asimismo, se ha reportado que la proteína BDX interacciona *in vitro* con la pectin metilesterasa 3 (PME3) (Zúñiga-Sánchez y Gamboa-deBuen, 2011). Además, las líneas mutantes SALK y antisentido de *BDX* muestran una menor actividad *in vitro* de PME, mientras que las plántulas de sobreexpresión presentan mayor actividad (Sánchez-Zúñiga et al., 2014). Asimismo, las hojas de la línea de *A. thaliana* sobreexpresora del gen de la familia DUF642 de *Vitis quinquangularis*, VqDUF642, presentan una mayor actividad de PME (Xie et al., 2016). En este trabajo se determinó que la función de *TEB* podría estar también relacionada con la regulación local de la actividad de las PMEs. Las PMEs presentan, al igual que la familia DUF642, una amplia diversificación durante la evolución de las plantas espermatofitas.

Conclusiones

TEB y BDX son las primeras proteínas DUF642 que se comprueba *in vivo*, ser proteínas de pared celular.

TEB está involucrada en la remodelación de la pared celular de las células epidérmicas del hipocótilo, modulando su elongación posiblemente mediante la regulación de la actividad de la PME.

TEB y *BDX* son genes ampliamente regulados por auxinas, las mutantes de los genes son más sensibles a concentración altas de auxinas, mientras las líneas de mayor expresión son resistentes.

Los genes DUF642 podrían estar involucrados en el correcto flujo de auxinas en las células epidérmicas del hipocotilo durante el desarrollo de la plántula.

La infección por nematodos que producen agallas incrementa los niveles de expresión y localiza a dos miembros de la familia DUF642, *TEB* y *BDX* en la zona periférica de las células durante etapas tempranas de infección, por lo que se proponen como posibles reguladores de la interacción planta-patógeno y su estudio podría ser de gran ayuda para entender mejor estos procesos.

Bibliografía de la introducción

Atkinson JA, Rasmussen A, Traini R, Voß U, Sturrock C, Mooney SJ, Wells DM, and Bennett MJ (2014) Branching Out in Roots: Uncovering Form, Function, and Regulation. *Plant Physiol* 166: 538–550

Baluska F, Liners F, Hlavacka A, Schlicht M, Van Cutsem P, McCurdy DW, Menzel D (2005) Cell wall pectins and xyloglucans are internalized into dividing root cells and accumulate within cell plates during cytokinesis. *Protoplasma* 225: 141–155

Baumberger N, Doesseger B, Guyot R, Diet A, Parsons RL, Clark MA, Simmons MP, Bedinger P, Goff SA, Ringli C, & Keller B (2003) Whole-genome comparison of leucine-rich repeat extensins in *Arabidopsis* and rice. A conserved family of cell wall proteins from vegetative and a reproductive clade. *Plant Physiology*, Vol. 131, No. 3, pp. 1313-1326

Bayer EM, Bottrill AR, Walshaw J, Vigouroux M, Naldrett MJ, Thomas CL, Maule A (2006) *Arabidopsis* cell wall proteome defined using multidimensional protein identification technology. *Proteomics* 6: 301-311.

Becnel J, Natarajan M, Kipp A & Braam J (2006) Developmental expression patterns of *Arabidopsis* XTH reported by transgenes and Genevestigator. *Plant Mol Biol* 61: 451-467

Bellini C, Pacurar DI, Perrone I. (2014) Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Annu Rev Plant Biol* 65: 639–666

Bhalerao RP, Eklöf J, Ljung K, Marchant A, Bennett M, Sandberg G (2002) Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* 29: 325–332

Bischoff, V., Nita, S., Neumetzler, L., Schindelasch, D., Unrbain ,A., Eshed, R., Persson, S., Delmer, D., & Scheible, WR (2010a) TRICHOME BIREFRINGENCE and its homolog At5g01360 encode plant-specific DUF231 proteins required for cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, Vol. 153, No. 2, pp. 590-602

Boerjan W, Cervera MT, Delarue M, Beeckman T, Dewitte W, *et al.* (1995) *superroot*, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *Plant Cell* 7:1405–19

Borderies G, Jamet E, Lafitte C, Rossignol M, Jauneau A, Boudart G, Monsarrat B, Esquerré-Tugayé MT, Boudet A, Pont-Lexica R (2003) Proteomics of loosely bound cell wall proteins of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures: a critical analysis. *Electrophoresis* 24: 3421-3432

Boron AK, Vissenberg K (2014) The *Arabidopsis thaliana* hypocotyl, a model to identify and study control mechanisms of cellular expansion. *Plant Cell Rep* 33:697–

Boudart G, Jamet E, Rossignol M, Lafitte C, Borderies G, Jauneau A, Esquerré-Tugayé MT, Pont-Lezica R (2005) Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: identification by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics* 5:212-221.

Bringmann M, Landrein B, Schudoma C, Hamant O, Hauser M-T, Persson S (2012) Cracking the elusive alignment hypothesis: the microtubule–cellulose synthase nexus unraveled. *Trends Plant Sci* 17:11.

Cannon MC, Terneus K, Hall Q, Tan L, Wang Y, Wegenhart BL, Chen L, Lamport DT, Chen Y, Kieliszewski MJ (2008) Self-assembly of the plant cell wall requires an extensin scaffold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:2226–2231.

Carpita N, McCann M (2000) The plant cell wall. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B. et al., eds), pp. 52–109, American Society of Plant Biologists

Celenza JL, Grisafi PL, Fink GR (1995) A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 9:2131–2142.

Che P, Lall S, Nettleton D, Howell SH (2006) Gene expression programs during shoot, root, and callus development in *Arabidopsis* tissue culture. *Plant Physiol* 141:620–637

Clark SE, Williams RW and Meyerowitz EM (1997) The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and meristem size in *Arabidopsis*. *Cell*, Vol. 89, No. 4 pp. 575-585, ISSN 0092-8674.

Collett CE, Harberd NP, Leyser O (2000) Hormonal interactions in the control of *Arabidopsis* hypocotyl elongation. *Plant Physiol* 124:553–561

Cosgrove DJ (1994) Photomodulation of growth. In: Kendrick RE, Kronenberg GHM (eds) *Photomorphogenesis in plants*. Kluwer, Dordrecht, pp 631–658

Cosgrove DJ (2005) Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology* 6:850–861.

De Klerk GJ, Van der Krieken W, De Jong JC (1999) The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 35:189–99

Derbyshire P, Findlay K, McCann MC, Roberts K (2007a) Cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyls involves dynamic changes in cell wall thickness. *J Exp Bot.* 58:2079–2089

Derbyshire P, McCann MC, Roberts, K (2007b) Restricted cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level. *BMC Plant Biol* 7, 1.

Dhonukshe P, Baluska F, Schlicht M, Hlavacka A, Samaj J (2006) Endocytosis of cell surface material mediates cell plate formation during plant cytokinesis. *Dev Cell* 10:137–150.

Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B (1993) Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119:71–84.

Drakakaki G (2015) Polysaccharide deposition during cytokinesis: Challenges and future perspectives. *Plant Sci* 236:177–184

Dubrovsky JG, Rost TL, Colón-Carmona A, Doerner P (2001) Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 214, 30–36.

Eklöf JM, Brumer H (2010) The XTH gene family: an update on enzyme structure, function, and phylogeny in xyloglucan remodeling. *Plant Physiology* 153: 456– 466.

Fernandez-Calvino L, Faulkner C, Walshaw J, Saalbach G, Bayer E, Benitez-Alfonso Y, Maule A (2011) *Arabidopsis* Plasmodesmal Proteome. *PLoS ONE* 6(4).

Gao Y, Badejo A.A, Sawa Y, Ishikawa T (2012) Analysis of two L-galactono-1,4-lactone-responsive genes with complementary expression during the development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 53:592–601.

Gendreau E, Traas J, Demos T, Crandjean O, Caboche M, Hofte H (1997) Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 114:295-305

González-Carranza ZH, Elliott KA, Roberts JA (2007) Expression of polygalacturonases and evidence to support their role during cell separation processes in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot* 58:3719–3730

Grunewald Wim, Karimi Mansour, Wiczorek Krzysztof, Van de Cappelle Elke, Wischnitzki Elisabeth, Grundler Florian, Inze Dirk, Beeckman Tom, and Gheysen Godelieve (2008) A Role for AtWRKY23 in Feeding Site Establishment of Plant-Parasitic Nematodes. *Plant Physiol* 148:358–368

Hall Q. Cannon MC (2002) The cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein RSH is essential for normal embryo development in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 14:1161–1172.

Holdaway-Clarke TL, Weddle NM, Kim S, Robi A, Parris C, Kunkel JG, Hepler PK (2003) Effect of extracellular calcium, pH and borate on growth oscillations in *Lilium formosanum* pollen tubes. *J Exp Bot* 54:65-72

Irshad M, Canut H, Borderies G, Pont-Lezica R, Jamet E (2008) A new picture of cell wall protein dynamics in elongating cells of *Arabidopsis thaliana*: confirmed actors and newcomers. *BMC Plant Biol* 8:1.

Jamet E, Canut H, Boudart G, Pont-Lezica RF (2006) Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends Plant Sci* 11:33-39.

Jensen PJ, Hangarter RP, Estelle M (1998) Auxin transport is required for hypocotyl elongation in light-grown but not dark-grown *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 116:455-462

Juge, N (2006) Plant proteins inhibitors of cell wall degrading enzymes. *Trends in Plant Sci* Vol. 11, No. 7, pp. 359-367. ISSN 1360-1385.

Kajava, A.V (1998) Structural diversity of Leucine-rich repeat proteins. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 277, No. 3, (April), pp. 519-527, ISSN 0022-2836.

Keuskamp, D. H., Pollmann, S., Voeselek, L. A., Peeters, A. J. & Pierik, R (2010) Auxin transport through PIN-FORMED 3 (PIN3) controls shade avoidance and fitness during competition. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107:22740-22744

Lane DR, Wiedemeier A, Peng L, Höfte H, Vernhettes S, Desprez T, Hocart CH, Birch RJ, Baskin TI, Burn JE et al (2001) Temperature-sensitive alleles of *rsw2* link the *korrigan* endo-1,4- β -glucanase to cellulose synthesis and cytokinesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 126: 278-288

Laskowski M, Biller S, Stanley K, Kajstura T, Prusty R: Expression profiling of auxin-treated *Arabidopsis* roots: toward a molecular analysis of lateral root emergence. *Plant Cell Physiol* 2006, 47:788-792.

Laskowski M, Grieneisen VA, Hofhuis H, Hove CA, Hogeweg P, Marée AF, Scheres B (2008) Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport. *PLoS Biol* 6:e307.

Lee SJ, Rose KK (2011) Characterization of the plant cell wall proteome using high-throughput screens. *Methods Mol Biol* 715:255-72.

Lee Y, Lee WS and Kim SH (2012) Hormonal regulation of stem cell methylation and chromatin patterning. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 63, No. 2, pp. 695-709, 2012

Lucas, M., Godin, C., Jay-Allemand, C. and Laplaze, L (2008) Auxin fluxes in the root apex co-regulate gravitropism and lateral root initiation. *J Exp Bot* 59: 55-66.

Lucas M, Kenobi K, von Wangenheim D, Voß U, Swarup K, De Smet I, Van Damme D, Lawrence T, Peret B, Moscardi E, et al (2013) Lateral root morphogenesis is dependent on the mechanical properties of the overlaying tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 5229-5234

Malamy JE, Benfey PN (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124:33–44

McMichael CM, Bednarek S. Y. (2013) Cytoskeletal and membrane dynamics during higher plant cytokinesis. *New Phytologist* 197: 1039–1057.

Menges M, Hennig L, Gruissem W and Murray, JAH (2002) Cell cycle-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem* 277:41987–42002.

Mewalal R, Mizrahi E, Mansfield SD, Myburg AA (2014) Cell wall-related proteins of unknown function: missing links in plant cell wall development. *Plant Cell Physiol.* 55:1031–1043.

Minic Z, Jamet E, Négroni L, der Garabedian A, Zivy M, Jouanin L (2007) A sub-proteome of *Arabidopsis thaliana* mature stems trapped on Concanavalin A is enriched in cell wall glycoside hydrolases. *J Exp Bot* 58:2503-2512.

Mohnen D (2008) Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 11:266–277

Nemhauser J, Chory J (2002) Photomorphogenesis. In: Meyerowitz E, Somerville C (eds) *The Arabidopsis book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, pp 1–12

Negri AS, Prinsi B, Scienza A, Morgutti S, Coccuci M, Espen L (2008) Analysis of grape berry cell wall proteome: A comparative evaluation of extraction methods. *J Plant Physiol* 165:1379-1389.

Neuteboom LW, Veth-Tello LM, Clijdesdale OR, Hooykaas PJ, van der Zaal BJ (1999) A novel subtilisin-like protease gene from *Arabidopsis thaliana* is expressed at sites of lateral root emergence. *DNA Res* 6:13–19.

Nguema-Ona E, Vitré-Gibouin M, Gotté M, Plancot B, Lerouge P, Bardor M and Driouich A (2014) Cell wall O-glycoproteins and N-glycoproteins: aspects of biosynthesis and function. *Frontiers in plant science* 5:499

Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S (2003) Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell* 15(7):1591-604.

Pelletier S, Van Orden J, Vissenberg K, Delacourt J, Urbain A, Mouille G, Lemonnier G, Renou J-P, Höfte H (2010) Transcript profiling reveals a role for pectin demethylesterification in the growth acceleration in dark-grown *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant J* 188:726–739

Péret B, de Rybel B, Casimiro I, Bénéková I, Swarup R, Laplaze L, Beeckman T, Bennett MJ (2009) *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci* 14: 399–408.

Péret, B., Li, G., Zhao, J., Band, L. R., Voss, U., Postaire, O., Luu, D.-T., Da Ines, O., Casimiro, I. and Lucas, M. I (2012) Auxin regulates aquaporin function to facilitate lateral root emergence. *Nature cell biology* 14:991-998.

Péret, B., Middleton, A. M., French, A. P., Larrieu, A., Bishopp, A., Njo, M., Wells, D. M., Porco, S., Mellor, N., Band, L. R., et al. (2013). Sequential induction of auxin efflux and influx carriers regulates lateral root emergence. *Mol Syst Biol* 9: 699.

Petrasek, J. & Friml, J (2009) Auxin transport routes in plant development. *Development* 136: 2675–2688

Popper ZA, Tuohy MG (2010) Beyond the green: Understanding the evolutionary puzzle of plant and algal cell walls. *Plant Physiol* 153: 373-383.

Procko C, Crenshaw CM, Ljung K, Noel JP, and Chory J (2014) Cotyledon-Generated Auxin Is Required for Shade-Induced Hypocotyl Growth in *Brassica rapa*. *Plant Physiol* 165:1285–1301

Procko C, Burko Y, Jaillais Y, Ljung K, Long JA and Chory J (2016) The epidermis coordinates auxin-induced stem growth in response to shade. *Genes and Development* 30:1529–1541

Quail PH, Boylan MT, Parks BM, Short TW, Xu Y, Wagner D (1995) Phytochromes: photo-sensory perception and signal transduction. *Science* 268:675–680

Refrégier G, Pelletier S, Jaillard D, Höfte H (2004) Interaction between wall deposition and cell elongation in dark-grown hypocotyl cells in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 135:959–968

Reid BR, Howell SH (1995) The functioning of hormones in plant growth and development. In PJ Davies, ed, *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 448-485

Rybak K, Steiner A, Synek L, Klaeger S, Kulich I, Facher E, Wanner G, Kuster B, Zarsky V, Persson S, Assaad FF (2014) Plant cytokinesis is orchestrated by the sequential action of the TRAPP II and exocyst tethering complexes. *Dev Cell* 29: 607–620

Sabatini S, Heidstra R, Wildwater M, Scheres B (2003) SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes and Development* 17: 354–358.

Saibo NJM, Vriezen WH, Beemster GTS, Van Der Straeten D (2003) Growth and stomata development of *Arabidopsis* hypocotyls are controlled by gibberellins and modulated by ethylene and auxins. *Plant J* 33:989–1000

Salazar-Irbe A (2011) Expresión y localización subcelular de *At2g41800* durante el

desarrollo de *Arabidopsis thaliana*, un miembro de la familia DUF642 específico de espermatófitas. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México.

Samuels, A.L., Giddings, T.H. Jr and Staehelin, L.A (1995) Cytokinesis in tobacco BY-2 and root tip cells: a new model of cell plate formation in higher plants. *J. Cell Biol.* 130: 1345–1357.

Sánchez-Rodríguez, C. et al (2010) Phytohormones and the cell wall in *Arabidopsis* during seedling growth. *Trends Plant Sci* 15: 291–301.

Scheres B, Benfey P, Dolan L (2002) Root Development. *The Arabidopsis Book* doi: 10.1199/tab.0101.

Smalle J, Haegman M, Kurepa J, Van Montagu M, Van Der Straeten D (1997) Ethylene can stimulate *Arabidopsis* hypocotyl elongation in the light. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2756–2761

Somerville C, Bauer S, Brininstool G, Facette M, Hamann T, Milne J, Osborne E, Paredez A, Persson S, Raab T, Vorwerk S, Youngs H (2004) Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* 306: 2206–2211

Stepanova, A. N. et al. (2008) TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* 133: 177–191

Sterling, J.D., Quigley, H.F., Orellana, A., & Mohnen, D (2001) The catalytic site of the pectin biosynthetic enzyme alpha-1,4-galacturonosyltransferases is located in the lumen of the Golgi. *Plant Physiol* 127: 360-371, ISSN 0032-0889.

Sukumar P, Maloney GS, Muday GK (2013) Localized induction of the ATP-binding cassette B19 auxin transporter enhances adventitious root formation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 162:1392–405

Swarup K, Benková E, Swarup R, Casimiro I, Péret B, Yang Y, Parry G, Nielsen E, De Smet I, Vanneste S, et al (2008) The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat Cell Biol* 10: 946–954

Taiz L, Zeiger E (2008) *Plant Physiology*, Tercera Edición Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland Massachusetts. 311-328 p.

Tao, Y. et al. (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* 133: 164–176

Toyooka K, Goto Y, Asatsuma S, Koizumi M, Mitsui T and Matsuoka K (2009) A Mobile Secretory Vesicle Cluster Involved in Mass Transport from the Golgi to the Plant Cell Exterior. *Plant Cell* 21: 1212–1229

Vain T, Crowell EF, Timpano H, Biot E, Desprez T, Mansoori N, Trindade LM, Pagant S, Robert S, Höfte H, Gonneau M, Vernhettes S (2014) The cellulase KORRIGAN is part of the cellulose synthase complex. *Plant Physiol*, 165:1521-1532.

Vandenbussche F, Vriezen WH, Smalle J, Laarhoven LJ, Harren FJ, Van Der Straeten D (2003) Ethylene and auxin control the Arabidopsis response to decreased light intensity. *Plant Physiol* 133:517–527

Van den Berg C, Willemsen V, Hage W, Weisbeek P, Scheres B (1997) Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* 390: 287–289.

Vázquez-Lobo A, Roujol D, Zúñiga-Sánchez E, Pinero D, Albenne C, Gamboa-de Buen A, Jamet E (2012) The highly conserved spermatophyte cell wall DUF642 protein family: phylogeny and first evidence of interaction with cell wall polysaccharides in vitro. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63: 510-520.

Verstrartaeten I, Schotte S and Geelen D (2014) Hypocotyl adventitious root organogenesis differs from lateral root development. *Front. Plant Sci* 4: 495

Vilches-Barro A and Maizel A. (2015) Talking through walls: mechanisms of lateral root emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology* 23:31–38

Voxeur A and Höfte H (2016) Cell wall integrity signaling in plants: “To grow or not to grow that’s the question” *Glycobiology* 1–11

Wraczeck, M., Brosché, M., Salojärvi, J., Kangasjärvi, S., Idänheimo, N., Mersmann, S., Robatzek, S., Karpinski, S., Karspinska, B., & Kangasjärvi, J (2010) Transcriptional regulation of CRK/DUF26 group of receptor-like protein kinases by ozone and plant hormones in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol* 10: 95- 101

Xiao C, Barnes WJ, Zamil MS, Yi H, Puri VM, Anderson CT (2016) Activation tagging of *Arabidopsis* *POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION2* promotes hypocotyl elongation, leaf expansion, stem lignification, mechanical stiffening, and lodging. *The Plant J* doi: 10.1111/tpj.13453.

Yamada, M., Greenham, K., Prigge, M. J., Jensen, P. J. & Estelle, M (2009) The TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE2 gene is required for auxin synthesis and diverse aspects of plant development. *Plant Physiol* 151: 168–179

Yu M, Zhao J (2012) The cytological changes of tobacco zygote and proembryo cells induced by beta-glucosyl Yariv reagent suggest the involvement of arabinogalactan proteins in cell division and cell plate formation. *BMC Plant Biology* 12:126.

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

Zúñiga Sánchez Esther (2007) Análisis de expresión de una familia de proteínas de función desconocida, DUF642, en *Arabidopsis thaliana* y su posible papel en las vías de transducción de señales durante el desarrollo. Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

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

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

Zuo J, Niu QW, Nishizawa N, Wu Y, Kost B, Chua NH (2000) KORRIGAN, an *Arabidopsis* endo-1,4- β -glucanase, localizes to the cell plate by polarized targeting and is essential for cytokinesis. Plant Cell 12: 1137–1152

IMPORTANCIA DE LAS PECTINAS EN LA DINÁMICA DE LA PARED CELULAR DURANTE EL DESARROLLO VEGETAL*

Alexis Salazar Iribe y Alicia Gamboa de Buen

Departamento de Ecología Funcional, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, Distrito Federal, México. Correo E: agamboa@ecologia.unam.mx

RESUMEN

La importancia de las pectinas en diversos procesos del desarrollo vegetal ha sido ampliamente estudiada recientemente. Las características de la pared celular, tal como rigidez o relajación, dependen en gran medida del grado de metil esterificación de las pectinas. En particular, los constantes cambios estructurales de uno de los componentes de la pectinas, los homogalacturonanos, a consecuencia de la actividad de pectin metil esterases y poligalacturonasas y de las proteínas que inhiben estas enzimas, generan cambios locales en las características mecánicas de la pared celular que son fundamentales para el desarrollo vegetal. Estos procesos han sido ampliamente descritos durante el crecimiento del polen y en la formación de primordios en el meristemo apical de *Arabidopsis thaliana*.

ABSTRACT

Recently, the important role of pectins in plant development has been widely studied. Cell wall characteristics, such as stiffness or loosening, depend on dimethyl esterification grade of pectins. In particular, the constant structural changes of one of the components of pectin, the homogalacturonans, by the activity of of pectin methyl esterases and polygalacturonases and their respective inhibitors, promote local changes in mechanical properties of the cell wall that are fundamental for plant development. These processes have been widely described during pollen growth and primordial formation in the apical meristem of *Arabidopsis thaliana*.

INTRODUCCIÓN

La pared celular es una estructura semirrígida y dinámica que rodea a la célula vegetal y define la morfología distintiva de la planta. Esta estructura está involucrada en el mantenimiento del tamaño, de la forma, el crecimiento y el desarrollo de la planta y confiere protección a los eventos adversos del ambiente incluyendo la invasión de patógenos y predadores, la deshidratación y los daños mecánicos (1). El material de la pared celular es también de gran importancia para la nutrición humana y representa el reservorio más importante de carbono en la naturaleza, además de formar parte de los procesos de flujo de carbono en todos los ecosistemas.

La pared celular en crecimiento está compuesta por un esqueleto de microfibrillas de celulosa

embebidas en una matriz gelatinosa formada por pectina, hemicelulosa, enzimas y proteínas estructurales (Fig. 1). La celulosa está formada por una serie de cadenas de glucosa de enlace β -1-4 que interactúan a través de puentes de hidrógeno formando una microfibrilla cristalina. En la pared celular primaria, los xiloglucanos son los elementos principales de la hemicelulosa. Los xiloglucanos no sólo se unen fuertemente a la superficie de la celulosa sino que también pueden ser retenidos dentro de la red de microfibrillas a través de un enlace covalente o por una reacción de transglicosilación. Por otro lado, las pectinas se caracterizan por ser un grupo heterogéneo de polisacáridos ricos en ácido galacturónico que conforman hasta un 35% de la pared celular primaria de las dicotiledóneas y de las monocotiledóneas, con excepción de la familia Poaceae, cuyas paredes solo presentan entre un 2

PALABRAS

CLAVE:

Arabidopsis thaliana, pared celular, pectinas.

KEY WORDS:

Arabidopsis thaliana, cell wall, pectins.

*Recibido: 20 de febrero de 2013 Aceptado: 4 de junio de 2013

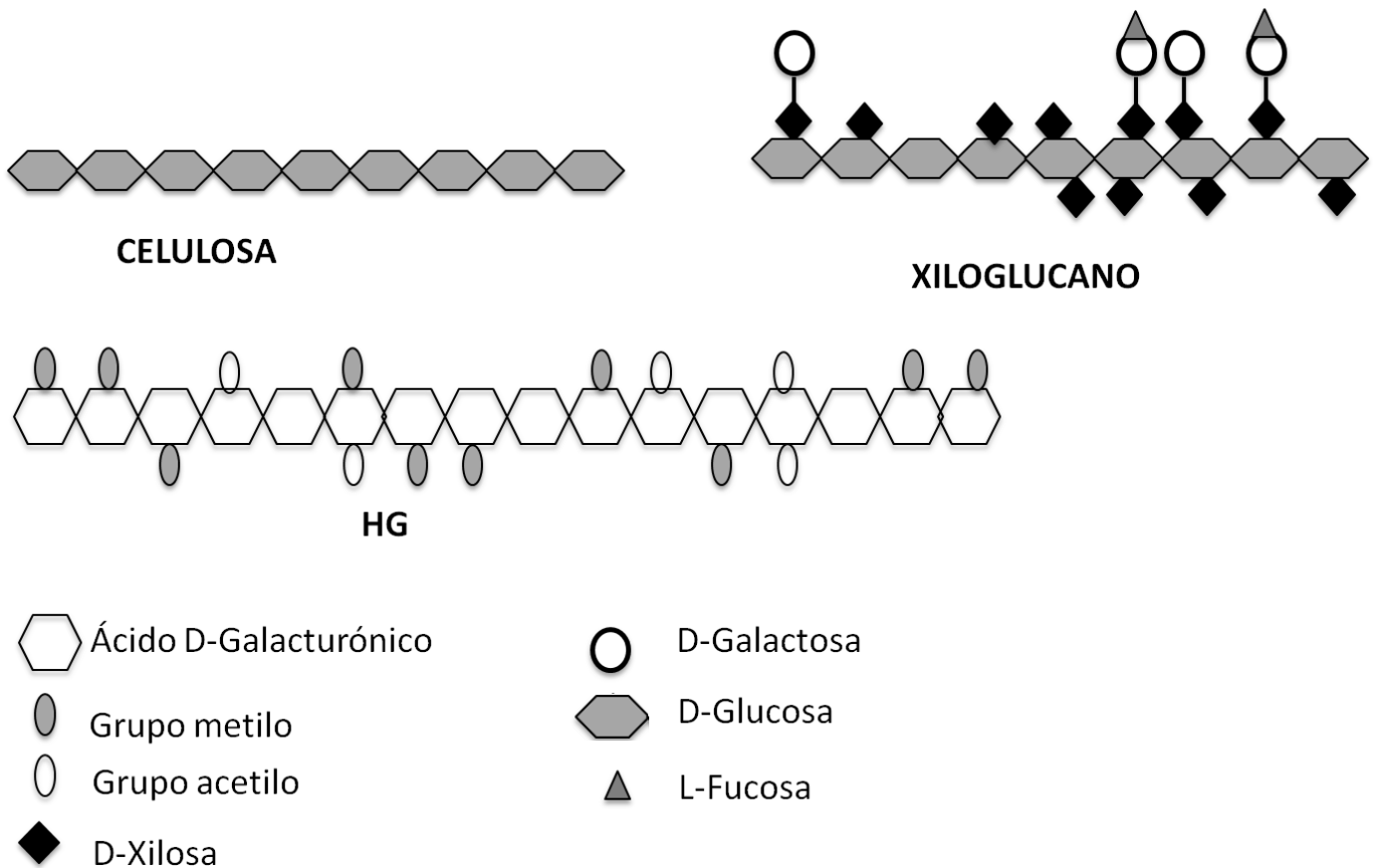


Figura 1. Estructura de los polisacáridos principales de la pared celular de plantas. La celulosa está constituida por una cadena de glucosas unidas a través de un enlace β -1-4. Las hemicelulosas constituyen un grupo de polisacáridos formados por una cadena principal de glucosas unidas con enlace β -1-4 con ramificaciones. La galactosa, fucosa y xilosa son los residuos que se presentan en el caso de los Xiloglucanos. Las pectinas son un grupo heterogéneo de polisacáridos ricos en ácido galacturónico que pueden estructuras muy complejas. Los más sencillos y abundantes son los homogalacturonanos, que son cadenas de ácido galacturónico y presenta modificaciones como metilaciones y acetilaciones.

y un 10% de pectinas. En particular, las pectinas pueden presentar modificaciones importantes que les permiten tener un papel crítico en las propiedades biomecánicas de la pared celular influyendo sobre su porosidad, permeabilidad y elasticidad, entre otras (1, 2).

Características de las Pectinas

Las pectinas son un extenso grupo de polisacáridos complejos que son sintetizados en el aparato de Golgi y son transportados a la pared celular por vesículas secretoras. Las pectinas se clasifican en: homogalacturonanos (HG), ramnogalacturonanos I (RGIs) y ramnogalacturonanos II (RGIIs) y en algunas especies particulares también se pueden encontrar xilogalacturonanos y apiogalacturonanos. Las pectinas son sintetizadas en el cis-Golgi, posteriormente son metilesterificadas en su carboxilo C-6 en

el Golgi medio por las pectin metiltransferasas (PMT) y modificadas por la adición de cadenas laterales al esqueleto en el trans Golgi, dando lugar a RGI, RGII y xilogalacturonanos. Estas cadenas laterales pueden estar formadas por residuos de galactosa, arabinosa, ramnosa, fucosa, ácido glucurónico, apiosa y/o xilosa. Los residuos de apiosa presentes en RGII son fundamentales para la interacción con boro y consecuente formación de dímeros (2). La complejidad de la estructura de las cadenas laterales de RGI y RGII determina que sean necesarias al menos 53 diferentes actividades enzimáticas. Las enzimas biosintéticas requeridas incluyen glicosiltransferasas y otras enzimas como son las metiltransferasas, acetiltransferasas y feruloiltransferasas. Las glicosiltransferasas (GTs) constituyen la mayor parte de las enzimas biosintéticas de pectinas y están especializadas en la transferencia de un residuo glicosil desde un nucleótido azúcar donador hacia

el extremo no reductor de un aceptor oligo o polisacárido (4-3). Estos polisacáridos están presentes en las paredes de todos los tipos celulares pero su abundancia relativa y los detalles en su estructura difieren. Los estudios más detallados con respecto a las diferencias en la estructura de la pared celular se han realizado en los diferentes tipos celulares de la semilla, en las células meristemáticas y en el proceso de crecimiento del tubo polínico. Por otro lado, la lámina media entre las paredes celulares de las células adyacentes es rica en HGs que participan en su adhesión (1,2).

Los HGs son las pectinas más abundantes y los principales componentes con carga de la pared celular. La carga parcialmente negativa de las cadenas de ácido poligalacturónico interactúa con moléculas de carga positiva como poliaminas, cationes y proteínas. Estas interacciones participan activamente en los cambios de las propiedades de la pared celular durante su ensamblaje y remodelación en los diferentes tipos celulares a través del desarrollo vegetal (3-4).

Proteínas que Interaccionan y/o Modifican a los Homogalacturonanos

La estructura fina de la matriz de pectina es modificada extensamente *in muro* durante el desarrollo y en respuesta a requerimientos funcionales locales por la acción de enzimas modificadoras incluyendo pectin metil esterasas (PMEs), que remueven el grupo metilo del ácido galacturónico, y las poligalacturonasas (PGs) que degradan a las pectinas demetil esterificadas al hidrolizar el enlace α -1,4 del ácido galacturónico (3) (Fig. 2).

Cuando las pectinas son demetil esterificadas pueden ocurrir diversos procesos que incluyen la relajación o el aumento en la rigidez de la pared, la alteración en la adhesión celular y la generación de fragmentos de oligogalacturonidos (OGAs) (Fig. 3). Los residuos con carga negativa del ácido galacturónico pueden interactuar con diferentes moléculas. Por un lado, se favorece la hidratación de la pared y, en consecuencia, se incrementa su relajación y por otro lado la interacción de un mínimo de nueve re-

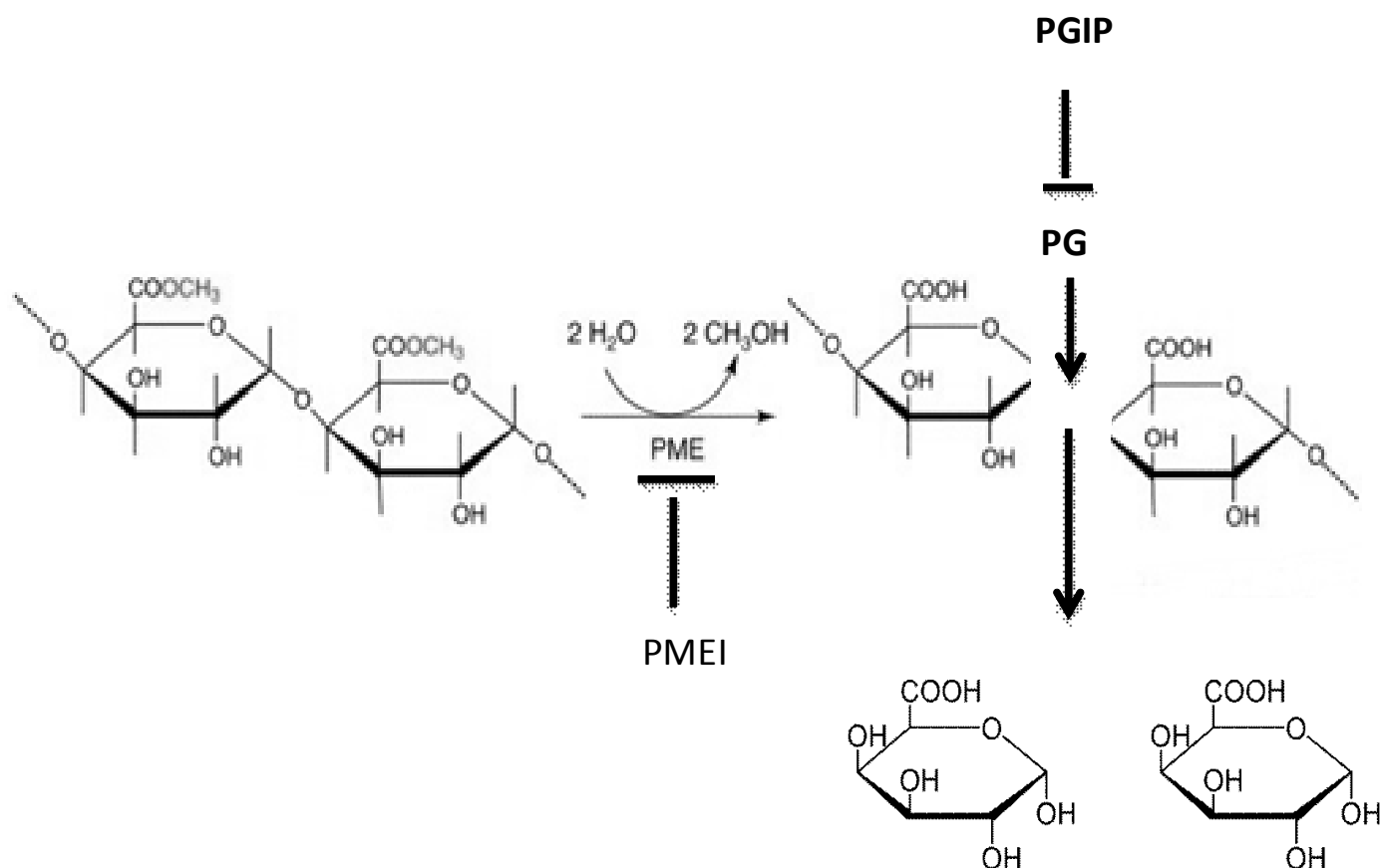


Figura 2. Modificación de los Homogalacturonanos. Las enzimas Pectin metil esterasas (PMEs) remueven el grupo metilo del ácido galacturónico. La actividad de estas enzimas es inhibida por la interacción con las proteínas específicas denominadas proteínas inhibidoras de PME (PMEI). La pectina demetil esterificada es el sustrato de las Poligalacturonasas (PGs), que hidrolizan el enlace α -1,4 del ácido y promueven su degradación. La actividad de las PG es inhibida por la proteínas específicas denominadas inhibidores de PG (PGIP).

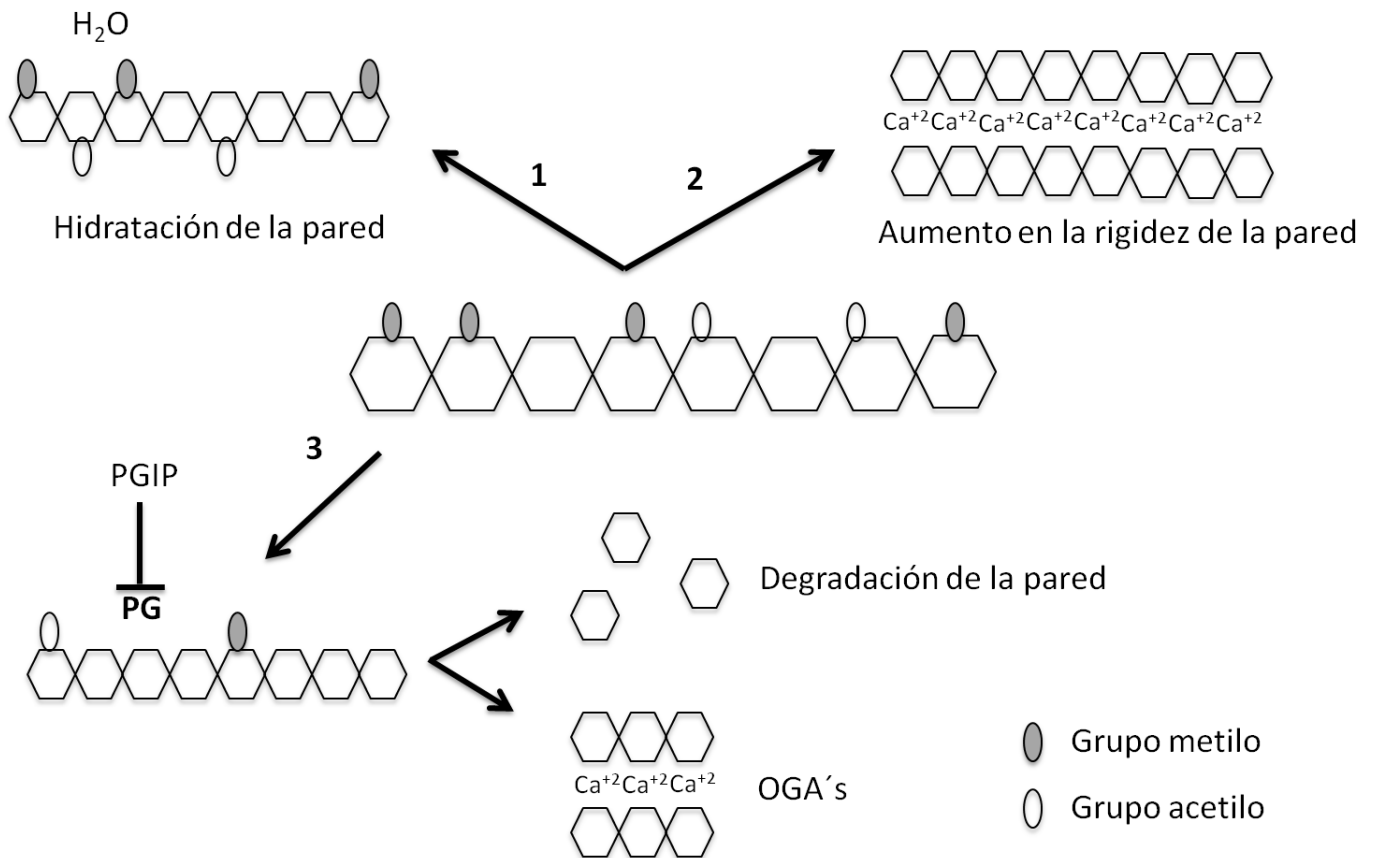


Figura 3. Función de los Homogalacturonanos con un Bajo Grado de Esterificación. La demetil esterificación de los Homogalacturonanos (HGs) promueve 1) la relajación de la pared celular como consecuencia de la hidratación, 2) un aumento en la rigidez de la pared celular como consecuencia de la interacción de dos moléculas de HGs a través de iones calcio, 3) la degradación de la pared celular por las poligalacturonas (PGs) y/o la formación de oligogalacturonanos (OGAs) involucrados en señalización.

siduos de ácido galacturónico con calcio (Ca^{+2}) promueve la formación de las estructuras denominadas "egg-box" que causan un aumento en la rigidez de la pared al establecerse una interacción entre dos moléculas de HG adyacentes. La formación de OGAs activos, con posibles funciones en señalización, es dependiente de los distintos patrones de esterificación del HG y de la actividad de las PGs (4,5).

Función de las Pectin metil esterasas y sus inhibidores

En *Arabidopsis thaliana* han sido reportados 66 genes que podrían codificar para enzimas con actividad de pectin metil esterasas (PME's) algunos de los cuales se expresan específicamente en ciertos órganos y tejidos y otros de manera generalizada. Las PMEs de plantas presentan un dominio catalítico muy conservado y en *Arabidopsis*, el 70% de los miembros de la familia presentan un dominio inhibitorio. Se ha sugerido que la función inhibitoria de

este dominio se lleva a cabo durante el transporte hacia la pared celular (6).

La importancia de las PMEs en el desarrollo vegetal y su posible función como reguladoras del crecimiento y la reproducción han sido ampliamente documentadas en diferentes especies de plantas. Dado que, como consecuencia de su actividad, la pared celular puede incrementar su rigidez o relajarse (Fig. 3), el cambio en la actividad de las PMEs puede causar efectos diferentes durante el desarrollo vegetal que pueden ser difíciles de interpretar. En *Arabidopsis* se ha demostrado que la *PME35* está involucrada en el mantenimiento de la fortaleza mecánica para el soporte de la planta. En algunas especies de eucalipto se ha sugerido que el mantenimiento de las propiedades de la madera involucra la participación de los genes *PME6* y *PME7*. El proceso de deshidratación de la madera está fuertemente influido por el grado de hidratación de la pared celular resultado de la actividad de las PMEs sobre las pectinas. Por otro lado, la mutación de *PME*

QUARTET1 (*QRT1*) causa la esterilidad masculina de *Arabidopsis*. Para que se lleve a cabo la liberación del polen es necesaria la actividad coordinada de *QUARTET 1* y de *QUARTET 3*, la poligalacturonasa que lleva a cabo la degradación del material de la pared celular que conecta la microspora en una tétrada de polen. Asimismo, en Chile se ha descrito una PME que se expresa específicamente en las anteras, posiblemente esté involucrada en el desarrollo del polen. Sin embargo, mutantes de otras PMEs no presentan fenotipos claros. Por ejemplo, se ha descrito que la mutante nula de *AtPME3* puede presentar raíces cortas o una mayor cantidad de raíces adventicias según el grupo que la describa (3).

La interacción de la PME con proteínas que inhiben su actividad, conocidas como inhibidores de pectin metil esterases (PMEI's), contribuye a la modulación del grado de metil esterificación de la pectina en la pared celular durante diferentes procesos del desarrollo (Fig. 2). Los genes que codifican para PMEIs también se expresan diferencialmente durante el desarrollo vegetal. El gen *AtPMEI2* que codifica para el inhibidor de la actividad de *AtPPME1*, se expresa específicamente en el polen de *Arabidopsis*. En tabaco, la acumulación del ortólogo de *AtPMEI2* en el ápice del tubo polínico regula la estabilidad de la pared celular, inhibiendo la actividad local de *AtPPME1* (7). Por otro lado, recientemente se ha reportado que el inhibidor *AtPMEI5* está involucrado en la germinación de la semilla de *Arabidopsis*. Las semillas que sobreexpresan esta proteína muestran un alto grado de metil esterificación de los HG's de la pared de sus células y presentan una mayor capacidad germinativa y menor sensibilidad al ácido abscísico (ABA) posiblemente en función de la alteración de las células del endospermo micropilar (8).

El estricto control del grado de metil esterificación del HG localmente a lo largo de la pared celular, mediado por las PME's y sus reguladores, es fundamental en diferentes aspectos del desarrollo vegetal. Durante la germinación del polen, el tubo polínico crece y se sintetiza nueva pared celular. Las pectinas con alto grado de metil esterificación se ubican en la región del ápice, donde la concentración de las PMEIs es más alta, y las pectinas poco metil esterificadas están presentes a lo largo del tubo, zonas en las que se lleva a cabo un mayor depósito de celulosa (9). Este depósito de las microfibrillas de celulosa debe ser en paralelo a los microtúbulos en regiones de la pared con un bajo grado de esterificación de las pectinas. Por otro lado, la relajación local de la pared celular del tracto de transmisión del estilo del carpelo, resultado de la baja metil esterificación de las pectinas, facilita el crecimiento de los tubos polínicos en la matriz celular del tejido femenino (9, 10).

Las zonas meristemáticas están compuestas por dos regiones; la región central donde hay poca proliferación celular, y la región periférica donde las células se dividen rápidamente y se forman los nuevos órganos (primordios). El incremento local de la actividad de PME en alguna región de la zona meristemática promueve la formación de primordios de nuevos órganos y la actividad local de inhibidores de PMEs impide su formación. Esta regulación estricta del grado de esterificación de HGs determina las propiedades mecánicas de la pared celular sugiriendo una señal mecánica en el proceso de diferenciación de las células meristemáticas (3). Recientemente se ha demostrado la relación entre las auxinas, el bajo grado de esterificación de las pectinas y la rigidez de la pared celular en la formación de nuevos órganos en el meristemo apical de *Arabidopsis*. La reducción de la rigidez de la pared de las células de la región periférica causada por las auxinas requiere de una disminución en la esterificación de las HGs. La presencia de dominios en la pared celular con un bajo grado de esterificación de pectinas es suficiente para inducir el primordio pero no para el desarrollo completo del órgano, proceso estrictamente dependiente de auxinas (11).

Función de las poligalacturonasas y sus inhibidores

Las poligalacturonasas (PGs) están directamente involucradas en los procesos de separación celular que incluyen desde la placa de abscisión de las hojas y frutos hasta la separación de las microsporas durante el desarrollo del polen y la emergencia de la raíz lateral a través de diferentes tipos celulares de la raíz. En *Arabidopsis*, se han reportado 69 genes que podrían codificar para PGs que presentan diferentes patrones de expresión espacio-temporal. En general, las diferentes PGs se expresan en zonas de los tejidos en los que es necesario que tenga lugar una correcta separación celular. Estos eventos de separación que dan lugar a la abscisión de los órganos o a la dehiscencia son fundamentales para el desarrollo vegetal, especialmente durante los procesos reproductivos. Algunos ejemplos son los procesos relacionados con polinización, maduración del fruto y dispersión de las semillas (12).

La regulación de la actividad de las PGs esta mediada por unas proteínas de la familia de proteínas con regiones repetidas ricas en leucina (LRR, Leucine Rich Repeat) que inhiben *in vitro* su actividad (PGIPs, Fig. 2). Aunque no se conoce el mecanismo de inhibición, los estudios de interacción *in vitro* sugieren que las PGIP's pueden unirse a la pectina y competir con las PGs. El estudio de estos inhibidores se ha dirigido principalmente hacia su

participación en defensa ya que inhiben la actividad de las PGs producidas por diferentes organismos patógenos. Sin embargo, la participación de estas proteínas también ha sido demostrada en diferentes aspectos importantes del desarrollo vegetal incluyendo la floración. La PGIP FOR1 de *Oryza sativa* es un elemento importante en el mantenimiento del primordio floral y la PGIP FLOR1 de *Arabidopsis* está involucrada en la transición de meristemo vegetativo a floral (13).

Localización subcelular de las proteínas moduladoras de pectina

En general, los mecanismos que controlan la secreción y la posterior acumulación de las proteínas en la pared celular no han sido clarificados. Para proteínas relacionadas con la modulación de la pectina se han descrito diferentes mecanismos de secreción y acumulación en la pared. PMEs, PMEIs, PGs y PGIPs han sido descritas en diferentes proteomas de pared celular de células de diferentes tejidos en diferentes especies de plantas. Únicamente el dominio catalítico de las PMEs ha sido detectado en estos proteomas, pero se ha determinado que el dominio inhibitorio es indispensable para su secreción y posterior localización en la pared celular. En el caso de las PMEIs, se ha reportado que la PMEI1 es una proteína que se ancla a la cara externa de la membrana mediante un Glicosil fosfato inositol (GPI) que juega un papel fundamental en su localización y permanencia en la pared celular. La localización intracelular de diferentes PGIP's, posiblemente localizadas en vesículas, ha sido ampliamente reportada pero recientemente se ha demostrado que, en ausencia de PGs, PGIP2 se internaliza vía endosomas sugiriendo su localización transitoria en la pared celular (14).

Detección de los cambios en el patrón de metil esterificación de las pectinas durante el desarrollo vegetal

Durante el desarrollo de la planta, los diferentes tipos celulares pueden presentar cambios en los patrones de metil esterificación de las pectinas en dominios discretos de la pared celular. Estos patrones dependen de factores de regulación de la actividad de las PMEs tales como el pH, disponibilidad de iones, grado de metil esterificación del sustrato, concentración de celulosa y diferencias potencialmente intrínsecas en modo de acción de las isoformas respectivas (1,10). Estos dominios pueden ser determinados por anticuerpos específicos; JIM5 para las pectinas demetil esterificadas como se muestra en la Figura 4 y JIM7 con un alto

grado de metil esterificación. Con esta herramienta se ha podido determinar una localización heterogénea tanto a nivel celular como de tejido. Aunque el marcaje con estos anticuerpos muestra únicamente una instantánea de la dinámica del grado de esterificación de las pectinas durante un proceso, esta información generada dentro del contexto fisiológico permite un mayor conocimiento del proceso. Con estas herramientas, los cambios en la actividad de las diferentes enzimas y proteínas que regulan el grado de metil esterificación de la pectina obtenidos en las plantas transgénicas pueden ser estudiadas localmente para facilitar la interpretación de los diferentes fenotipos.

Participación de las pectinas durante la división celular

A lo largo del ciclo de vida, las plantas presentan zonas específicas de alta proliferación celular principalmente en las regiones apicales del tallo (Stem Apical Meristem, SAM) y de la raíz (Root Apical Meristem, RAM), involucradas en la formación de nuevas células y el inicio de la formación de órganos. El proceso de división celular en plantas implica la formación de nueva pared celular (placa celular), que en *Arabidopsis* se lleva a cabo en aproximadamente 50 minutos, en el sitio de división cortical. Este sitio de división se establece a partir de un rearrreglo drástico de los microtúbulos que forman la banda de la preprofase (PPB), el huso mitótico y el fragmoplasto. Al inicio de la mitosis, los microtúbulos se despolimerizan y se rearreglan formando la PPB alrededor del núcleo. La placa celular se forma mediante la fusión de vesículas dirigidas desde la red del trans golgi (Trans Golgi Network, TGN) hacia el fragmoplasto y se ensambla durante la telofase (15). El fragmoplasto está compuesto de dos discos opuestos de microtúbulos cortos y filamentos de actina y con la placa celular se expande centrífugamente hacia la periferia de la célula a medida que avanza la citocinesis. Finalmente, la placa celular se une a la pared celular de la célula madre para completar la citocinesis (16). Desde etapas tempranas de su formación, la placa celular presenta un alto contenido de pectinas y, a diferencia de las paredes celulares primarias, contiene calosa y carece de celulosa.

Dentro de los genes que se requieren para el proceso de citocinesis en células vegetales se encuentran los necesarios para la síntesis de los polisacáridos de la placa celular que constituirá la nueva pared celular. Aunque durante muchos años se asumió que las vesículas secretoras con polisacáridos recién sintetizados eran la única fuente, recientemente se ha sugerido la contribución de

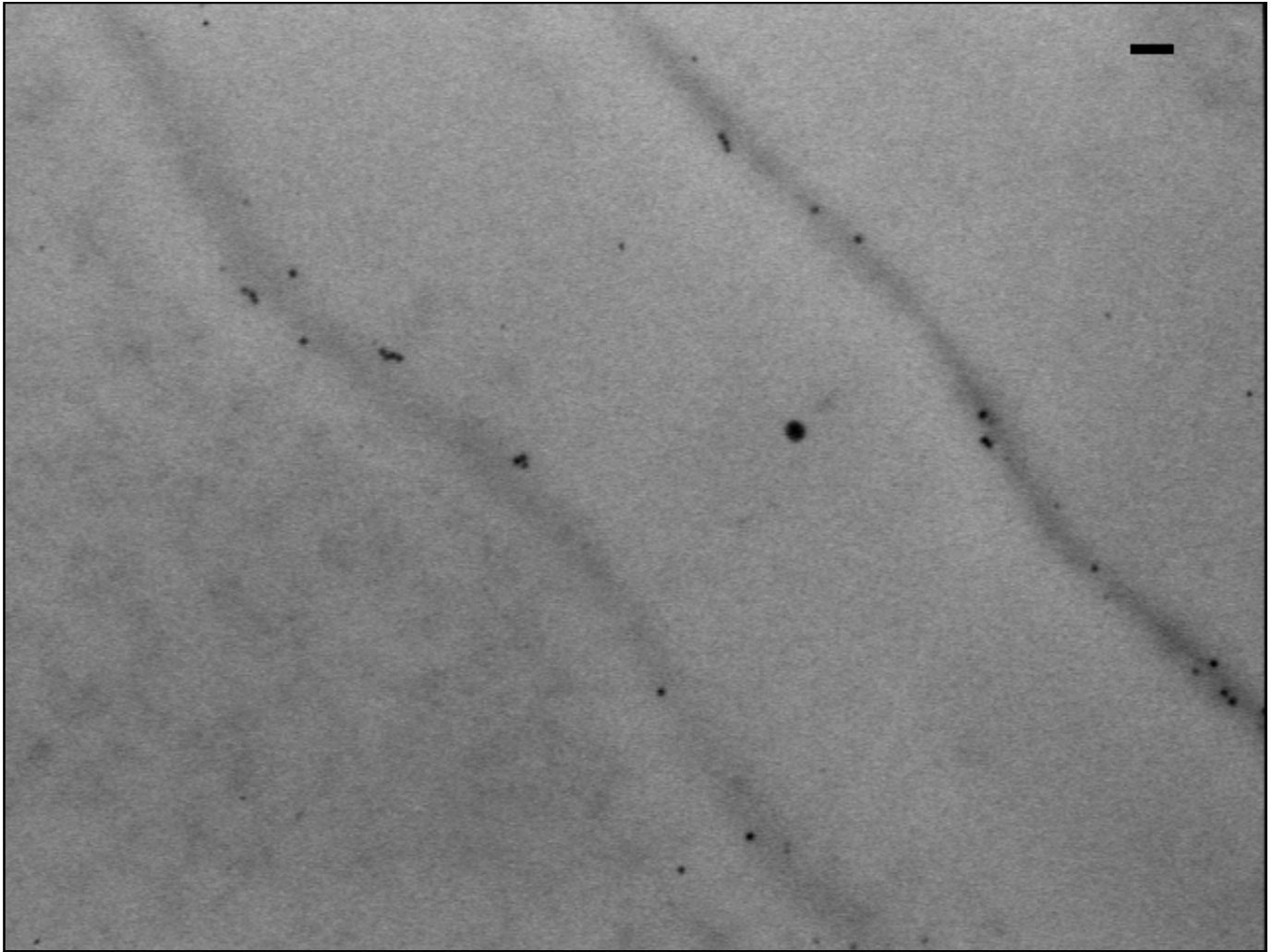


Figura 4. Inmunolocalización de pectinas desmetil esterificadas en células meristemáticas de raíces de *Arabidopsis thaliana*. La micrografía electrónica presenta la inmunolocalización de JIM5 en la pared celular de células meristemáticas. C, citoplasma; PC, pared celular; LM, lámina media; EI, espacio intracelular. Los puntos son artefactos de la cámara fotográfica. La barra corresponde a 100nm.

la vía endocítica a la formación de la placa celular. Material de la superficie celular incluyendo proteínas de membrana plasmática, componentes de la pared celular y marcadores de endocitosis aplicados de manera exógena, son rápidamente endocitados y liberados en la placa celular en formación (17). La utilización de anticuerpos contra pectinas con diferente grado de esterificación y de mutantes con defectos en el proceso de endocitosis ha permitido determinar que éstas pueden ser internalizadas activamente en células del ápice de la raíz. ARF-GEF-GNOM (ADP ribosylation factor-GTP exchange factor) es una GTPasa de la familia ARF involucrada en el proceso de endocitosis. Se ha descrito que esta proteína se localiza en endosomas que reciclan pectinas. Por otro lado, las células del mutante *gnom/emb30*, presentan paredes celulares abe-

rrantes debido a que las pectinas están localizadas de manera anormal (18).

En particular, las pectinas demetil esterificadas están en mayor cantidad durante la formación de la placa celular (17). Sin embargo, es necesario generar más información para entender la participación de este tipo de pectinas en los procesos que se llevan a cabo en formación de la placa celular y la reestructuración de la pared de la célula madre durante la división celular.

Un evento fundamental durante la deposición de la placa celular es la formación de plasmodesmos primarios (PD's). Los PD's son estructuras intercelulares que forman un continuo citoplásmico entre las células vecinas. Estas estructuras complejas regulan el paso de moléculas entre las células, dependiendo del tejido, estado de desarrollo y na-

turalidad de las moléculas. Estas moléculas, además de iones y carbohidratos, pueden ser proteínas como factores de transcripción y diferentes tipos de ARNs. Los PD's primarios se forman durante la división celular cuando nueva membrana plasmática y pared celular depositada es adherida a componentes del retículo endoplásmico que ha sido atrapado en el fragmoplasto. Los PD's están ubicados en regiones de la pared celular enriquecida con pectina y presenta de manera particular glucanos solubles (β -1,3-glucano ó calosa) depositados en la región del cuello del PD. Estas regiones de la pared celular, con las características particulares que le confieren una gran capacidad de respuesta, son fundamentales para la función de los PDs (19).

Señalización y Mantenimiento de la Integridad de la Pared celular

Las células vegetales necesitan mantener la integridad funcional de la pared celular durante el proceso de morfogénesis. Durante el desarrollo vegetal, la pared celular presenta cambios en su estructura que pueden debilitarla y generar señales que indiquen a la célula la posibilidad de un daño. Por otro lado, estos cambios en la estructura también podrían hacer más susceptibles a las células y presentar un mayor daño durante la interacción con los patógenos y en condiciones ambientales adversas. Estas señales pueden ser físicas, tal como se ha descrito para las levaduras, o químicas como los OGAs derivados de pectinas, y pueden inducir cambios en la expresión de diferentes genes involucrados en el mantenimiento de la integridad de la pared celular. Recientemente, se ha sugerido

que los receptores de los OGAs son las proteínas cinasas asociadas a pared (Wall-Associated Kinases, WAK) que están involucradas tanto en la regulación de la elongación de la pared como en respuestas de defensa a patógenos. Se considera que las WAKs son receptores potenciales involucrados en la señalización para el mantenimiento de la integridad de la pared celular. Por otro lado, la interacción del dominio extracelular de las WAKs con regiones de HG que interaccionan con calcio sugiere que este tipo de proteínas puede estar involucrado en sensar cambios en la estructura de la pectina antes de su degradación y generación de los OGAs (3).

Perspectivas

En los últimos años se han generado una gran cantidad de datos que demuestran la importancia de la regulación del grado de metil esterificación de las HG. En general, se ha establecido que la actividad de PME's y su regulación por las proteínas inhibidoras (PMEIs) son fundamentales para controlar el grado de esterificación en diferentes regiones de la pared celular, proceso que es determinante en diferentes etapas del desarrollo de la planta. Sin embargo, no se ha generado suficiente información para establecer la función de la gran cantidad de isoformas y la especificidad de su regulación por PMEIs. Asimismo, un aspecto fundamental para comprender la importancia de las modificaciones en la estructura de las pectinas durante el desarrollo vegetal está relacionado con la participación de otras familias de proteínas que podrían estar involucradas en este proceso.



REFERENCIAS

1. Willats WGT, Knox JP, Mikkelsen JD (2006) Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends Food Sci Tech* 17:97-104.
2. Carpita N, Gibeaut DM (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants -consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* 3:1-30.
3. Wolf S, Hématy K, Höfte H (2012) Growth control and cell wall signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 63:7.1-7.27.
4. Ridley B, O'Neil MA, Mohnen D (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligosaccharide-related signalling. *Phytochem* 57:929-967
5. Mohnen D (2008) Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 11:266-277.
6. Pelloux J, Rustérucci C, Mellerowicz EJ (2007) New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci* 12:267-277.
7. Röckel N, Wolf S, Kost B, Rausch T, Greiner S (2008) Elaborate spatial patterning of cell-wall PME and PME1 at the pollen tube tip involves PME1 endocytosis, and reflects the distribution of esterified and de-esterified pectins. *Plant J* 53:133-143.
8. Müller K, Levesque-Tremblay G, Bartels S, Weitbrecht K, Wormit A, Usadel B, Haughn G, Kermodé A R. (2013). Demethylesterification of cell wall pectins in *Arabidopsis thaliana* plays a role in seed germination. *Plant Physiol* 161:305-316.
9. Chebli Y, Kaneda M, Zerzour R, Geitmann A (2012) The cell wall of the *Arabidopsis* pollen tube -spatial distribution, recycling, and network formation of polysaccharides. *Plant Physiol* 160: 1940-1955.
10. Yoneda A, Ito T, Higaki T, Kutsuna N, Saito T, Ishimizu T, Osada H, Hasezawa S, Matsui M, Demura T. (2010) Cobtorin target analysis reveals that pectin functions in the deposition of cellulose microfibrils in parallel with cortical microtubules. *Plant J* 64:657-667.
11. Braybrook SA, Peaucelle A (2013) Mechanochemical aspects of organ formation in *Arabidopsis thaliana*: The relationship between auxin and pectin. *PLOS One* 8(3): e57813.
12. Ogawa M, Kay P, Wilson S, Swain SM (2009) *Arabidopsis* dehiscence zone polygalacturonase 1 (ADPG1), ADPG2, and QUARTET 2 are polygalacturonases required for cell separation during reproductive development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21:213-233.
13. Tortii S, Formara F, Vincent C, Andres F, Nordström K, Göbel U, Knoll D, Schoof H, Coupland G (2012) Analysis of the *Arabidopsis* shoot meristem transcriptome during floral transition identifies distinct regulatory patterns and a leucine-rich repeat protein that promotes flowering. *Plant Cell* 24:444-462.
14. De Caroli M, Lenucci MS, Di Sansebastiano GP, Dalessandro G, De Lorenzo G, Piro G (2011) Protein trafficking to the cell wall occurs through mechanisms distinguishable from default sorting in tobacco. *Plant J* 65: 295-308.
15. Jurgens G (2005) Cytokinesis in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 56:281-29.
16. Rasmussen CG, Humphries JA, Smith LG (2011) Determination of symmetric and asymmetric division planes in plant cells. *Annu Rev Plant Biol* 62:387-409.
17. Dhonukshe P, Baluska F, Schlicht M, Hlavacka A, Samaj J (2006) Endocytosis of cell surface material mediates cell plate formation during plant cytokinesis. *Dev Cell* 10:137-150.
18. Geldner N, Anders N, Wolters H, Keicher J, Kornberger W, Muller P, Delbarre A, Ueda T, Nakano A, Jürgens G (2003) The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* 112:219-230.
19. Burch-Smith TM, Zambryski PC (2012) Plasmodesmata paradigm shift: regulation from without versus within. *Annu Rev Plant Biol* 63- 22.

Apendice II

(Enviado como “Short Communication” a la revista “ European Journal of Plant Pathology”)

Cell wall localization in epidermal root cells of the two DUF642 BIIDXI and TEEBE proteins during *Meloidogyne incognita* early infection.

Alexis Salazar Iribe¹, Esther Zúñiga-Sánchez^{2*}, Emma Zavaleta Mejía³, Alicia Gamboa-deBuen¹.

¹Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, México Distrito Federal C.P. 04510.

²Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, México Distrito Federal C.P. 04510. Edificio E Laboratorio L-102.

³Colegio de Postgraduados (CP), Instituto de Fitosanidad, km 35.5 Carr. México- Texcoco, Montecillo, Edo. de México CP 56230.

Introduction

The root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infects a variety of plants including *Arabidopsis thaliana*. The elongation region of the root close to the meristematic region is the penetration zone for second stage juveniles (J2) that migrated intercellularly to the root tip before they can enter the stele. Shortly after nematode infection, there is an important auxin accumulation (Grunewald *et al.*, 2009a). During the infection process, nematodes manipulate host auxin distribution network (Grunewald *et al.*, 2009b). In the stele, root-knot juveniles stimulate the division of cells in the vascular parenchyma to form giant cells and, finally, the feeding structure (Williamson and Hussey, 1996).

During migration, root-knot nematodes secrete different proteins to modify cell wall including pectolytic enzymes. These polygalacturonases and pectate lyases facilitate cell separation (Danchin *et al.*, 2010). Different polygalacturonase like proteins are expressed in the glands in second-stage *Meloidogyne* juveniles (Wieczorek *et al.*, 2014). However, the contribution of host cell wall proteins has been described only until the formation of the giant cells (Davis *et al.*, 2004; Wieczorek *et al.*, 2014). DUF642 is a highly conserved domain present in the DUF642 cell wall related family of proteins that has been exclusively described in spermatophytes (Vázquez-Lobo *et al.*, 2012). Transcriptomic analyses of *M. incognita* early infection (3 dpi) revealed an important induction of *At1g29980* expression, a DUF642 gene (Barcalá *et al.*, 2010). Ten genes of this family are present in the *Arabidopsis thaliana* genome and the expression of *BIIDX1* (*BDX*, *At4g32460*) and *TEEBE* (*TEB*, *At2g41800*) are highly induced by auxin in the different root regions (Zúñiga-Sánchez *et al.*, 2014; Salazar-Iribe *et al.*, 2016). In this study, we determined the effect of the migration of *M. incognita* juveniles on the expression and subcellular localization of *BDX* and *TEB* in roots from 5-d seedlings of *A. thaliana*. The effect of the juveniles' migration of a non-compatible with *A. thaliana* knot root nematode *Nacobus aberrans* was also determined.

Materials and Methods

The transgenic plants pBDX::GFP, pBDX::BDX-GFP, pTEB::GFP and pTEB::TEB-GFP were used for expression analyses and for subcellular localization (Zúñiga-Sánchez *et al.*, 2014; Salazar-Iribe *et al.*, 2016). The seeds from these transgenic plants and WT plants (col) were germinated after imbibition at 5 °C for 2-3 days and grown vertically on Petri dishes with 0.5 X Murashige and Skoog (MS) basal medium containing 0.5% sucrose and 0.6% agar. Seed germination was carried out in a CONVIRON growth chamber under long-day conditions at 20-22 °C.

Second stage juveniles (J2s) of the root-knot nematodes *Meloidogyne incognita* and *Nacobus aberrans* were obtained from egg masses extracted from *Capsicum annum* and *Lycopersicon esculentum* roots, respectively. 7-d seedlings grown as described before were inoculated with 250 J2s of *M. incognita* or *N. aberrans* per plant.

DR5::GFP transgenic plants were used for control of infection. As a negative control, the nematode solution preservation was used for plant infection. This solution was obtained by centrifugation at low speed. Both transgenic and WT were inoculated in the same conditions.

GFP was imaged at 485-545 nm with an Olympus FV100 Laser Confocal Scanning Microscope. Images of plant tissues without internal fluorescence were used as controls. Images were assembled using Photoshop version 5.0 (Adobe Systems).

Results and Discussion

Control infection experiments were done by visualization of the auxin responsive reporter DR5::GFP two days after infection with J2s of *M. incognita* (Fig 1A, B). Auxin was present in all cellular types of the *M. incognita* infected roots but no change in auxin pattern was detected upon *N. aberrans* infection. In three independent infection experiments, there was an important increase in both *BDX* and *TEB* expressions (Fig 1D, E, G and H). Changes in cell type expression pattern were also promoted by infection. For *BDX*, a strong GFP fluorescence was observed only in the vascular tissue of the control roots (Fig. 1D) meanwhile was highly detected in the epidermic cells of the infected roots (Fig. 1E). Negative controls were done by exposing the roots of the transgenic plants to *N. aberrans*, a nematode unable to infect *A. thaliana*. At 2 days after treatment a slightly induction of auxin (Fig. 1C) or *BDX* (Fig. 1F) and *TEB* (Fig. 1I) expression was observed.

BDX and *TEB* proteins have been detected in cell wall proteomes from different plant tissues including cell suspension cultures (Jamet *et al.*, 2006). Cell wall localization of these two proteins in epidermal cells from primary roots treated with auxin has also been described (Salazar-Irube *et al.*, 2016). In non-treated roots, *BDX* was intracellular located in cortex and endodermic cells (Fig. 2A). *M. incognita* infection promoted *BDX* localization to cell wall in epidermal cells (Fig. 2B). For *TEB*, no fluorescence was detected in control roots but was localized to cell wall in the epidermal cells of infected roots (Fig. 2C and D).

The promotion of the expression and cell wall localization of *BDX* and *TEB* by *M. incognita* J2 infection suggest that the plant-pathogen early interaction also involved

the induction of plant proteins involved in cell wall remodeling. The observed upregulation of *BDX* and *TEB* promoters in epidermal cells of primary roots during *M. incognita* juvenile migration suggested a potential transcriptional regulation of the expression of these genes upon nematode compatible infection possibly through auxin signaling. The results suggest that host plant proteins can be involved, in response to auxin, in cellular separation for the intercellular migration of J2s. Plant cells are firmly adhered each other by the middle lamella, a pectin layer that fills the space between the adjacent cells, and cell separation processes during plant development involve induction of different plant genes that codify for cell wall proteins including pectin-modifying enzymes. The participation of these enzymes, secreted by the nematode, has also been described during J2 migration. The cell wall localization of BDX and TEB DUF642 proteins during *M. incognita* early infection suggest that these two proteins could be involved in the regulation of the degree of pectin methylation during cell separation as it was previously described during testa rupture and hypocotyl elongation respectively (Zúñiga-Sánchez *et al.*, 2014; Salazar-Iribe *et al.*, 2016).

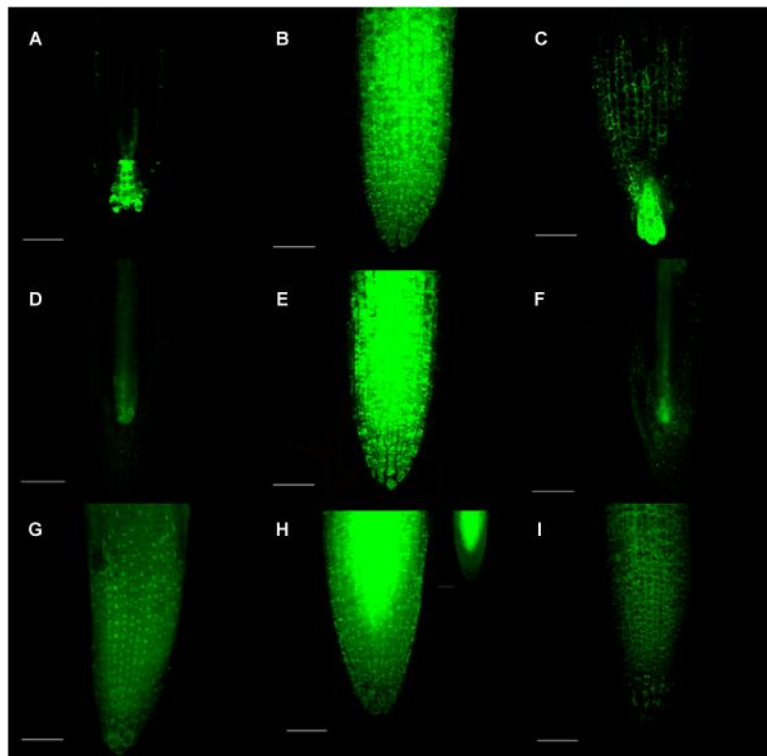


Figure 1. *BIIDX1* and *TEEBE* expression is highly induced by *M. incognita* early infection. 5 d seedlings of DR5::GFP (A-C), pBDX::GFP (D-F) and pTEB::GFP (G-I) transgenic plants were used as control and infected with J2 *M. Incognita* and *N. Aberrans*. D) For *BDX* expression, GFP was detected in the pro-vascular tissue of the meristematic zone in primary roots. E) GFP detection in all cell types of the meristematic and transition zone in primary roots in seedlings infected with *M. incognita* (2 dpi). F) pBDX::GFP in the pro-vascular tissue of the meristematic zone in primary roots of seedlings infected with *N. aberrans* (2 dpi). G) pTEB::GFP in the epidermic cells of the meristematic zone in primary roots. H) pTEB::GFP in all cell types of the meristematic and transition zone in primary roots of seedlings infected with *M. incognita* (2 dpi). I) pTEB::GFP in the epidermic cells of the meristematic zone in primary roots of seedlings infected with *N. aberrans* (2 dpi). Scale bars = 100 μm . All the images are projections of confocal Z-stacks.

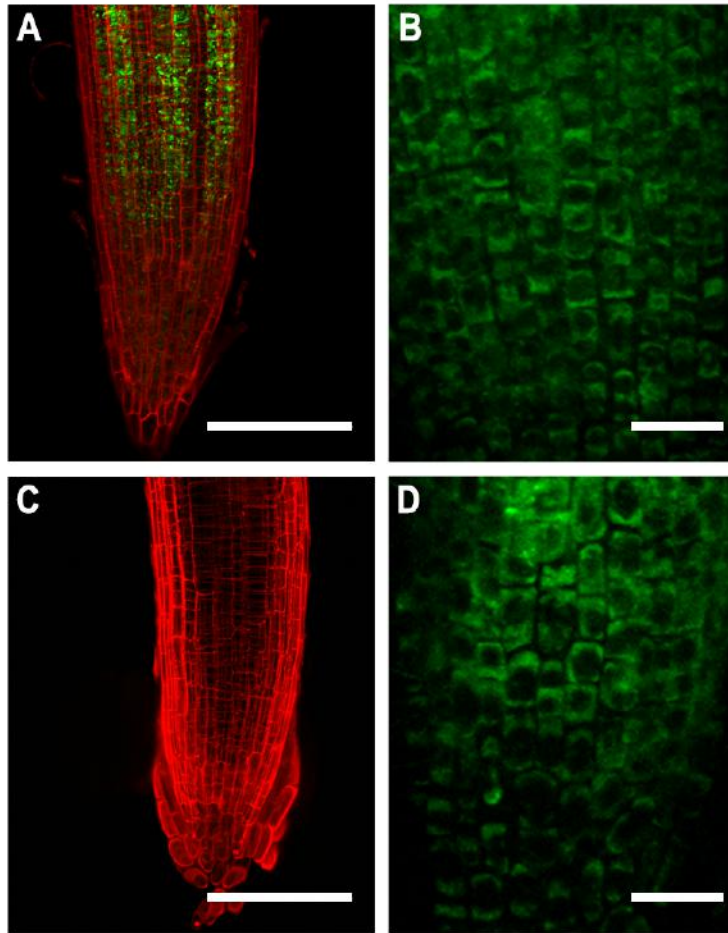


Figure 2: Cell wall localization of BDX and was detected during early infection by *M. incognita*. 5 d seedlings of pBDX::BDX-GFP (A-B), and pTEB::TEB-GFP (C-D) transgenic plants were used and infected with J2 *M. incognita* A) Meristematic zone of primary root from control pBDX::BDX-GFP seedlings. GFP was detected intracellularly. B) Meristematic zone of primary root from infected pBDX::BDX-GFP seedlings. GFP was detected in the cell wall of the epidermal cells. C) Meristematic zone of primary root from control pTEB::TEB-GFP seedlings. GFP was not detected. D) Meristematic zone of primary root from pTEB::TEB-GFP seedlings. GFP was detected in the cell wall of epidermal cells. In A and C scale barr = 100 μ m; B and D scale barr = 20 μ m. A and C are Z-stacks images; B and D are section images.

References

- Barcalá, M., García, A., Cabrera, J., Casson, S., Lindsey, K., Favery, B., Escobar, C. (2010). Early transcriptomic events in microdissected *Arabidopsis* nematode-induced giant cells. *The Plant Journal*, 61(4), 698-712.
- Davis, E.L., Hussey, R.S., Baum, T.J. (2004). Getting to the roots of parasitism by nematodes. *Trends in Parasitology*, 20(3), 134-141.
- Danchin, E.G., Rosso, M.N., Vieira, P., de Almeida-Engler, J., Coutinho, P.M., Henrissat, B., Abad, P. (2010). Multiple lateral gene transfers and duplications have promoted plant parasitism ability in nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(41), 17651-17656.
- Grunewald, W., Van Noorden, G., Van Isterdael, G., Beeckman, T., Gheysen, G., Mathesius, U. (2009a). Manipulation of auxin transport in plant roots during *Rhizobium* symbiosis and nematode parasitism. *The Plant Cell Online*, 21(9), 2553-2562.
- Grunewald, W., Cannoot, B., Friml, J., Gheysen, G. (2009b). Parasitic nematodes modulate PIN-mediated auxin transport to facilitate infection. *PLoS Pathogens*, 5(1), e1000266.
- Jamet, E., Canut, H., Boudart, G., Pont-Lezica, R.F. (2006). Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends in Plant Science*, 11(1), 33-39.
- Salazar-Irribé A., Agredano-Moreno L.T., Zúñiga-Sánchez E., Jiménez-García L.F., Gamboa-deBuen A. (2016) The cell wall DUF642 At2g41800 (TEB) protein is involved in hypocotyl cell elongation. *Plant Science*.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.10.007>
- Vázquez-Lobo A, Roujol D, Zúñiga-Sánchez E, Pinero D, Albenne C, Gamboa-de Buen A, Jamet E. (2012). The highly conserved spermatophyte cell wall DUF642 protein family: phylogeny and first evidence of interaction with cell wall polysaccharides in vitro. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 63: 510-520
- Wieczorek K, El ashry AEN, Quentin M, Grundler FM, Favery B, Seifert GJ, Bohlmann H. (2014) A distinct role of pectate lyases in the formation of feeding structures

induced by cyst and root-knot nematodes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(9), 901-912

Williamson, V.M., Hussey, R.S. (1996). Nematode pathogenesis and resistance in plants. *The Plant Cell*, 8(10), 1735.

Zúñiga-Sánchez, E., Soriano, D., Martínez-Barajas, E., Orozco-Segovia, A., Gamboa-deBuen, A. (2014). *BIIDX1*, the *At4g32460* DUF642 gene, is involved in pectin methyl esterase regulation during *Arabidopsis thaliana* seed germination and plant development. *BMC Plant Biology*, 14(1), 338.

Acknowledgments

We thank Dra. Karina Jiménez for Confocal studies. This work was supported by PAPIIT grant IN207915 (Universidad Nacional Autónoma de México) and CONACyT grant 155074. ASI is PhD student (Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM) and received a CONACyT fellowship.

Apéndice III. Protocolo para la medición de hipocótilos

Preparación de plántulas para la medición de hipocótilos

- Las semillas de *Arabidopsis* se colocan en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se les agrega 1 ml de dH_2O , se agitan y se almacenan a 4° C durante 2 o 3 días para vernalizarlas. Se recomienda utilizar una pipeta de 1 ml.
- Se retira el agua y se agrega 1 ml de alcohol al 70%. El tubo se mantiene en agitación durante 5 minutos.
- Se retira el alcohol y se agrega 1 ml de la solución de lavado (cloro 20%/SDS 1%). El tubo se mantiene en agitación durante 10 minutos.
- Se retira la solución de lavado y se dan 5 lavados con agua destilada estéril. Entre cada lavado se debe agitar el tubo al menos durante 5 segundos.
- Una vez terminado el proceso de lavado, las semillas se siembran en cajas Petri cuadradas de 9 x 9 cm y entre cada semilla se recomienda dejar un espacio de al menos 3 mm.
- Cuando las placas han sido sembradas, se colocan en la cámara de crecimiento en posición vertical. En caso de que sean varias cajas y vayan a ser comparadas entre ellas se debe procurar colocar las cajas de manera que reciban la misma cantidad de luz.
- A partir del tercer día se toman fotografías a la misma hora del día con una cámara a la mayor definición posible.
- Las imágenes se manejan con el programa FIJI (Imagej). Con la herramienta de regla se miden los hipocótilos desde la base del hipocótilo hasta la “V” que forman los cotiledones.