



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Rol de las PERK como sensores de la integridad de la pared celular durante el crecimiento polarizado en tubos polínicos de *Arabidopsis thaliana*

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Lic. Cecilia Borassi

Directores de tesis: Dr. José M. Estevez y Dr. Jorge P. Muschietti

Consejero de Estudios: Dr. Norberto D. Iusem

Lugares de trabajo: Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires (IIBBA-CONICET), Fundación Instituto Leloir.

Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIByNE-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas, UBA.

Buenos Aires, 2018

Fecha de defensa: 20 de Marzo de 2018

Rol de las PERK como sensores de la integridad de la pared celular durante el crecimiento polarizado en tubos polínicos de *Arabidopsis thaliana*

La plasticidad estructural de los carbohidratos es mayor a la de los aminoácidos, pero nuestro entendimiento de cómo esa plasticidad se relaciona con la funcionalidad biológica es aún muy limitada. Los pelos radicales y los tubos polínicos son células individuales que requieren una gran síntesis de pared celular para poder sostener la expansión apical también denominada crecimiento apical. Las paredes celulares en las células vegetales son estructuras complejas compuestas en su mayoría por polisacáridos, incluyendo una red de microfibrillas de celulosa-xiloglucanos, pectinas y *O*-glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) tales como extensinas (EXTs) y arabinogalactanos asociados a proteínas (AGPs). En esta tesis se propone individualizar la respuesta de señalización que permite el crecimiento polarizado en tubos polínicos en *Arabidopsis thaliana*. Mediante la utilización de redes transcripcionales modulares ya hemos identificado componentes necesarios para el crecimiento polarizado en tubos polínicos. Estas redes establecen un punto de partida para explorar la funcionalidad biológica de los HRGPs, extensinas y receptores quinasa con dominio extracelular de tipo extensina (PERK; *proline-rich extensin-like receptor kinase*) asociados al crecimiento polarizado. En esta tesis estudiamos en tubos polínicos cómo las proteínas PERK afectan al crecimiento polarizado mediante la inhibición bioquímica y por métodos de genética reversa. Los genes candidatos fueron analizados en un contexto más amplio mediante métodos moleculares específicos y microscopía confocal.

Palabras clave: pared celular, tubos polínicos, *Arabidopsis thaliana*, PERKs.

Role of PERKs as cell wall integrity sensors during polar growth in *Arabidopsis thaliana* pollen tubes

The structural plasticity of carbohydrates is greater than that of amino acids but our understanding for how this plasticity relates to biological function is still limited. Root hairs and pollen tubes are single cells that require intensive cell-wall amendments to accommodate apical cell expansion in a process known as tip growth. Plant cell walls are intricate structures comprised largely of polysaccharides, including a network of cellulose microfibrils-xyloglucans, pectins, and of highly glycosylated hydroxyproline-rich *O*-glycoproteins (HRGPs), such as extensins (EXTs) and arabinogalactan proteins (AGPs). We propose to functionally dissect the signaling feedback loop that allows for polarized growth in *Arabidopsis thaliana*. We have employed transcriptional modular networks to identify components necessary for polarized growth of pollen tubes. These predictions provide a framework to explore the biological function of HRGPs and proline-rich extensin-like receptor kinase (PERK) involved in tip growth. We targeted these processes by biochemical inhibition and by different modes of reverse genetics, and assessed blockage of polarized growth. Suitable candidate genes were put into a larger biological context through targeted molecular approaches and through high-definition confocal microscopy.

Key words: cell wall, pollen tubes, *Arabidopsis thaliana*, PERKs.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todos los que me ayudaron a crecer tanto en el aspecto personal como en el ámbito profesional.

A José, por haberme dado la oportunidad de realizar mi doctorado en su laboratorio y brindarme las herramientas necesarias para realizar la tesis.

A Jorge, por el apoyo, los consejos y sobre todo ¡por la paciencia!

A Silvina y Martín por su enorme generosidad, su compañerismo, por compartir su conocimiento y por todo lo que me enseñaron y aconsejaron.

A mis compañeros de la FIL: Silvina, Martín, Juan, Pao, Eliana y Luciana, gracias por ser mucho más que compañeros de laboratorio, gracias por su amistad, por las charlas, las locuras y los mates. Aprendí mucho de todos. A Rodrigo, Ceci, Melina, Martiniano y Javier por la buena onda y colaboración.

A Juliana y Regi del INGEBI por recibirme con la mejor onda cuando empecé el doctorado. A Ana por su ayuda con los experimentos y por esos inolvidables “¡Nice!” cuando las cosas salían bien. Al resto de la gente del INGEBI por estar siempre dispuestos a ayudar y por hacer que mis visitas sean divertidas: Mariana, Sofi, Diego, Denise, Laura, Vicky y Agustina.

A todos los integrantes de la FIL y del IFIBYNE por la buena predisposición y ayuda durante el trabajo de investigación de esta tesis.

A los profes y compañeros de la asignatura Química Orgánica en la UNLu: José, Ana Lía, Betty, Mecha, Jorge, Ele, Diego, Mauri, Juli, Ale, Cholo y Eduardo, por contribuir en mi formación profesional. A Diego y Mauri por hacerme reír cuando me hace falta. A Ele en especial, por tu amistad, tu guía y por las interminables corridas los viernes a la mañana en el labo.

A todos en el laboratorio del Dr. Carlito B. Lebrilla en UC Davis, por recibirme con la mejor predisposición y hacerme sentir una más en el grupo. En especial a la Dra. Mariana Barboza por su generosidad en el trabajo de laboratorio, por aconsejarme profesionalmente, por hacerme sentir como en casa durante mi estadía brindándome su amistad.

A mis amigas y hermanas de la vida Vero y Flor. ¡Las adoro ñoñas! 20 años no son nada...

A Mauri por estar siempre, por tener la palabra justa cuando más lo necesito. Gracias por acompañarme y dejarme acompañarte. Gracias amor por alentarme a crecer y a seguir adelante cuando las cosas se ponen difíciles.

A mi mamá, mi papá y mi hermano por estar siempre, por alentarme, por guiarme y siempre querer lo mejor para mí. Gracias por ayudarme a ser quien soy hoy, los amo.

Esta tesis está dedicada a mi familia por su apoyo incondicional

*If you want to know where your heart is
look where your mind goes when it wanders...*

K.I.S.S

ÍNDICE

HIPÓTESIS	9
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
INTRODUCCIÓN	12
Importancia del polen en la reproducción sexual	12
Desarrollo del grano de polen	12
Crecimiento polarizado en células vegetales.....	15
Crecimiento polarizado del tubo polínico.....	15
Componentes moleculares que regulan la expansión polarizada en tubos polínicos.....	20
Características y dinámica de la pared celular durante el crecimiento polarizado del tubo polínico.....	22
Control de la integridad de la pared celular durante el crecimiento polarizado.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS	37
1. Análisis Filogenético y expresión de las proteínas PERK.....	37
1.1. Búsquedas de homología de secuencias	37
1.2. Búsqueda de ortólogos de los genes <i>PERK</i>	37
1.3. Expresión <i>in silico</i> de los genes PERK.....	37
2. Cepas bacterianas	37
2.1. Conservación de cepas bacterianas.....	37
2.2. <i>Escherichia coli</i>	38
2.2.1. Condiciones de cultivo	38
2.2.2. Preparación de células <i>E. coli</i> DH5α competentes	38
2.2.3. Transformación de células <i>E. coli</i> DH5α competentes	38
2.3.4. Transformación de células competentes de <i>A. tumefaciens</i>	39
2.3.5 Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> mediante <i>A. tumefaciens</i> – <i>Floral dip</i>	39
3. Material vegetal	40

3.1. Condiciones de crecimiento.....	40
3.2. Líneas mutantes simples de inserción de ADN-T.....	40
3.2.1. Extracción de ADN	41
3.3.2. Genotipificación.....	43
4. Plásmidos y construcciones	44
4.1 Amplificación de secuencias por PCR	44
4.2. Clonado por recombinación homóloga	44
4.3.1 Confirmación de clones positivos	45
4.3.2. Construcciones empleadas en la tesis	46
5. Extracción de ARN.....	46
6. Ensayos fisiológicos.....	46
6.1. Análisis de segregación	46
6.1.1. Auto-cruzamientos.....	46
6.1.2. Retro-cruzamientos	46
6.2. Análisis de fertilidad.....	47
6.3. Germinación <i>in vitro</i> de polen de <i>Arabidopsis</i>	47
6.4 Mediciones de longitud de tubo polínico	48
6.5 Tinción de tubos polínicos <i>in vivo</i> con azul de anilina	49
7. Ensayo de tinción GUS (actividad β -glucuronidasa)	49
8. Medición de ROS mediante H ₂ DCFDA.....	50
9. Medición de H ₂ O ₂ mediante el biosensor HyPer	50
10. Ensayos de tinción de la pared celular.....	51
RESULTADOS	53
1. Análisis de la filogenia de las proteínas PERK	53
2. Análisis <i>in silico</i> de la expresión de las PERKs en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	54
3. Análisis de la expresión de los genes <i>PERKs</i>	57
4. Análisis de las mutantes de ADN-T de las PERKs con expresión en polen.....	60

5. Evaluación de los parámetros de fertilidad en las simples mutantes <i>perk5-1</i> , <i>perk5-2</i> , <i>perk12-1</i> y en la doble mutante <i>perk5-1 perk12-1</i>	69
5.1. Análisis de segregación	69
5.2. Análisis del número de semillas	70
6. Localización subcelular de PERK5	71
7. Ensayos de la integridad de la pared celular utilizando Ioduro de Propidio, Rojo de Rutenio, S4B y Azul de Anilina	72
8. Especies Reactivas de Oxígeno	76
9. Las proteínas AGC1.5 y AGC1.7 como posibles componentes de la señalización río abajo de las proteínas PERK	80
DISCUSIÓN	85
ANEXO	90
BIBLIOGRAFÍA	96

HIPÓTESIS

Las proteínas receptor quinasa del tipo PERK estarían involucradas en el crecimiento polarizado de tubos polínicos de *Arabidopsis thaliana* manteniendo la integridad de la pared celular

OBJETIVO GENERAL

Caracterización de los componentes moleculares a nivel de la pared celular que regulan el crecimiento polarizado del tubo polínico en *Arabidopsis thaliana*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo 1. Identificar a los genes *PERKs* asociados con el crecimiento polarizado de los tubos polínicos de *Arabidopsis thaliana*.

Objetivo 2. Estudio del rol de las proteínas receptoras quinasas del tipo PERK en el mantenimiento de la integridad de la pared celular durante el crecimiento de los tubos polínicos.

Objetivo 3. Estudio y caracterización de los eventos río debajo de las proteínas del tipo PERK en tubos polínicos.

Esta tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

Sede, A. R.*, **Borassi, C.***, Wengier, D. L., Mecchia, M. A., Estevez, J. M. and Muschietti, J. P. (2018), *Arabidopsis* pollen extensins LRX are required for cell wall integrity during pollen tube growth. *Letter* 2018 Jan;592(2):233-243. doi:10.1002/1873-3468.12947

*Estos autores contribuyeron igualmente

Borassi C., Sede A.R., Mecchia M.A., Salgado Salter J.D., Marzol E., Muschietti J.P. & Estévez J.M. An update on cell surface proteins containing extensin-motifs. *J. Exp. Bot.* 2016. Jan;67(2):477-87. doi: 10.1093/jxb/erv455.

Velasquez S.M., Marzol E., **Borassi C.**, Pol-Fachin L., Ricardi M.M., Mangano S., Denita Juarez S.P., Salgado Salter J.D., Gloazzo Dorosz J., Marcus S.E., Knox J.P., Dinneny J.R., Iusem N.D., Verli H. & Estevez J.M. Low sugar is not always good: impact of specific O-glycan defects on tip growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 2015. 168:808-813.

Velasquez S.M., Ricardi M.M., Poulsen C.P., Oikawa A., Dilokpimol A. H., Mangano S., Denita Juarez S.P., Marzol E., Salgado Salter J.D., Gloazzo Dorosz J., **Borassi C.**, Rune Möller S., Buono R., Ohsawa Y., Matsuoka K., Otegui M.S., Scheller H.V., Geshi N., Petersen B.L., Iusem N.D., & Estevez J.M. Complex regulation of prolyl-4-hydroxylase 5 impacts root hair expansion. *Molecular Plant*. 2015.8:1-13.

Cecilia Borassi, Juliana Pérez Di Goglio, María Regina Scarpin, Jorge P. Muschietti & J.M. Estevez. Optimized methods for growing *Arabidopsis* pollen tubes. *Methods in Molecular Biology*. 2014. 1242:41-47. ISBN 978-1-4939-1901-7.

Otros trabajos publicados en el período de la tesis:

Marzol E.*, **Borassi, C.***, Denita-Juarez S.P.*, Mangano S., y Estevez J.M. RSL4 Takes Control: Multiple Signals, One Transcription Factor. 2017. *Trends in Plant Science*. [10.1016/j.tplants.2017.04.007](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.04.007).

*Estos autores contribuyeron igualmente.

Mangano S.*, Denita-Juarez S.P.*, Choi S-H*, Marzol E.*, Hwang Y., Ranocha P., Velasquez S.M., **Borassi C.**, Barberini M.L., Aptekmann A.A., Muschietti J.P., Nadra A.D., Dunand C., Cho H-T., y Estevez, J.M. Molecular link between auxin and ROS-mediated polar growth. 2017. *PNAS*. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1701536114>.

Iribarren, MJ; **Borassi, C**; Ferri, MA; González, B; Steciow, M; Guillín, E. 2016. Estructura genética de poblaciones de *Phytophthora capsici* en el noreste de la provincia de Buenos Aires, Argentina. *RIA / Vol. 42 / Nº1*.

Abreviaturas más utilizadas en esta tesis:

35S: Promotor de origen viral extraído del Virus del Mosaico del Coliflor.

AGCs: familia de Ser/Thr quinasas que incluyen a las dependientes de cAMP, cGMP, entre otras.

ANX: quinasas de la familia CrRLK1L

Ca²⁺cit: Ca²⁺ citoplasmático.

cADN: ADN copia.

cpYFP: Proteína fluorescente amarilla circularizada.

CrRLK1L: Ser/Thr quinasas con dominio extracelular tipo lectina

EXT: Extensina/motivo extensina.

GFP: Proteína fluorescente amarilla

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

LRX: Híbridos de extensinas con dominio rico en leucina

MGP: Medio de germinación de polen

MP: Membrana plasmática

Mutante de ADN-T: Mutante generado por la inserción al azar de una secuencia de transposón.

PC: Pared celular

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PERKs: Proteínas receptoras de tipo quinasa Ser/Thr, con un dominio extracelular tipo extensina

RBOHs: *Respiratory Burst Oxidase Homologues*/NADPH oxidasas de plantas.

RE: Retículo endoplásmico.

RLKs: Receptores de tipo quinasa

ROS: Especies reactivas del oxígeno

ROI: (*Region of interest*) Región del tubo polínico seleccionada para realizar las mediciones de fluorescencia

TM: Transmembrana.

WT: Planta de genotipo salvaje.

INTRODUCCIÓN

Importancia del polen en la reproducción sexual

Las plantas con flores presentan un ciclo de vida complejo el cual alterna entre el desarrollo de un organismo esporofítico (diploide) y una forma gametofítica haploide multicelular muy reducida. El gametofito masculino (grano de polen) en el estadio maduro puede ser bi o tricelular una vez que es liberado de las anteras. En las plantas con flor, el grano de polen cumple un papel fundamental en la fertilidad de la planta y, en consecuencia, en la productividad de los cultivos (Borg et. al., 2009). El grano de polen genera y traslada las dos células espermáticas hacia el saco embrionario donde tiene lugar la doble fecundación característica de las plantas con flor. Además de su importancia intrínseca en la reproducción sexual, el linaje celular simple y el desarrollo orquestado del gametofito masculino mediante una red de señalización auto-regulada, también representa un microcosmos de desarrollo celular (Borg et. al., 2009). Esto hace que el polen sea un sistema atractivo y una excelente herramienta para estudiar los procesos fundamentales relacionados con la polaridad celular, tales como la dinámica del citoesqueleto, el tráfico vesicular y reciclado de membrana plasmática, el control del ciclo celular, la comunicación célula-célula, la especificación celular, y de qué forma se integran todos estos procesos.

Desarrollo del grano de polen

En las plantas con flor, la formación del gametofito masculino comienza dentro de las anteras, y consta de dos fases secuenciales: microesporogénesis y microgametogénesis (revisado en McCormick, 2004 y Borg *et al.*, 2009). En la **Figura I1** se muestran de modo esquemático una flor de *Arabidopsis*, especificando donde tiene lugar la microesporogénesis.

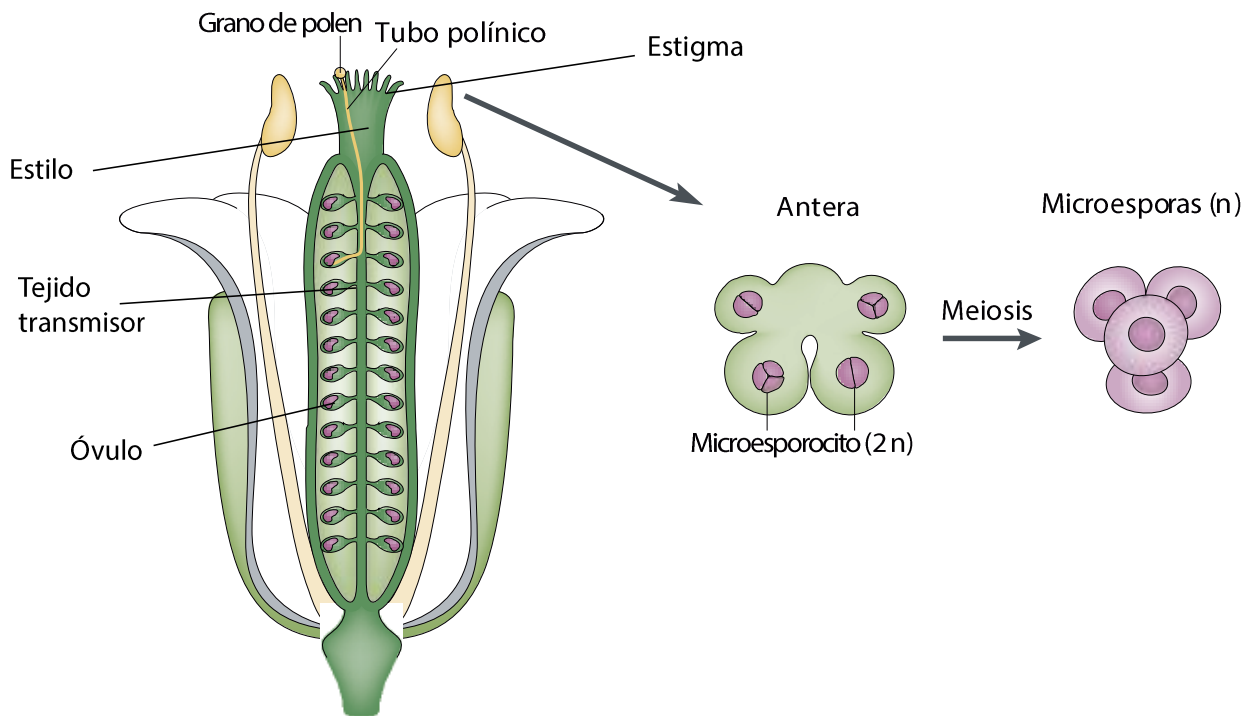


Figura 11. Detalle de una flor de *Arabidopsis* y resumen de los primeros eventos de la microesporogénesis. El desarrollo del grano de polen comienza dentro de las anteras, donde los microesporocitos (2n) o células madre de la microespora sufren meiosis y dan origen a las microesporas (n), que luego de divisiones mitóticas generan los granos de polen maduros. Modificado de Kawashima y Berger, 2014.

Durante la microesporogénesis, las células madres de las microesporas diploides experimentan una división meiótica generando tétradas de microesporas haploides (**Figura 12**). Durante la meiosis cada tétrada queda rodeada de una pared de calosa. Las microesporas recién formadas son liberadas de la tétrada por acción de una enzima llamada calasa, secretada por el tapete (tejido esporofítico correspondiente a la capa interna nutritiva de los estambres) (Lu *et al.*, 2014). El tapete se desintegra en estadios posteriores del desarrollo del polen. Las microesporas liberadas aumentan de tamaño, se genera una única vacuola y el núcleo de cada microespora migra a una posición periférica contra la pared celular. Durante la microesporogénesis, la microespora sufre una división celular mitótica asimétrica conocida como Mitosis del Polen I que da como productos una célula generativa pequeña, que representa la línea germinal masculina, inmersa dentro del citoplasma de una célula vegetativa de mayor tamaño. Las dos células hijas resultantes albergan cada una un citoplasma distinto y poseen perfiles propios de expresión génica que les confieren sus distintas estructuras y sus diferentes destinos celulares. La célula vegetativa no sufre más divisiones y posteriormente originará el tubo polínico. Durante la maduración del polen, la célula vegetativa acumula reservas de carbohidratos y/o lípidos junto con transcritos y proteínas que se requieren para el crecimiento rápido del tubo polínico.

La célula generativa sufre una nueva división mitótica, en este caso simétrica, llamada Mitosis del Polen II, para producir dos células espermáticas genéticamente idénticas que serán las encargadas de realizar la doble fecundación. El momento en el que tiene lugar esta segunda división mitótica difiere en las distintas familias de plantas, en algunos casos tiene lugar previo a la antesis (Gramíneas y Crucíferas), liberando al polen maduro en estado tricelular, como es el caso de *Arabidopsis thaliana*. Aunque la mayoría de las especies liberan el polen en estado bicelular y la Mitosis del Polen II tiene lugar durante la elongación del tubo polínico, como en el caso de *Lilium longiflorum*. Por último, la maduración del polen culmina con la antesis y la dehiscencia de las anteras, finalizando con la liberación de los granos de polen parcialmente deshidratados (McCormick, 2004).

El grano de polen maduro tiene una cubierta de pared celular formada por dos capas, una interna denominada intina y otra externa, la exina. La intina, rodea completamente al grano de polen y está compuesta por celulosa y pequeñas cantidades de pectina y proteínas. La exina recubre a la intina excepto a nivel de las aperturas germinativas por las cuales emergerá el tubo polínico durante la germinación del grano de polen. La exina es una capa gruesa y rígida constituida por un polímero altamente resistente llamado esporopolenina, pero a la vez es dinámica permitiendo grandes cambios de volumen durante la deshidratación del polen maduro y la rehidratación del grano una vez que se adhiere al estigma (Edlund *et al.*, 2004).

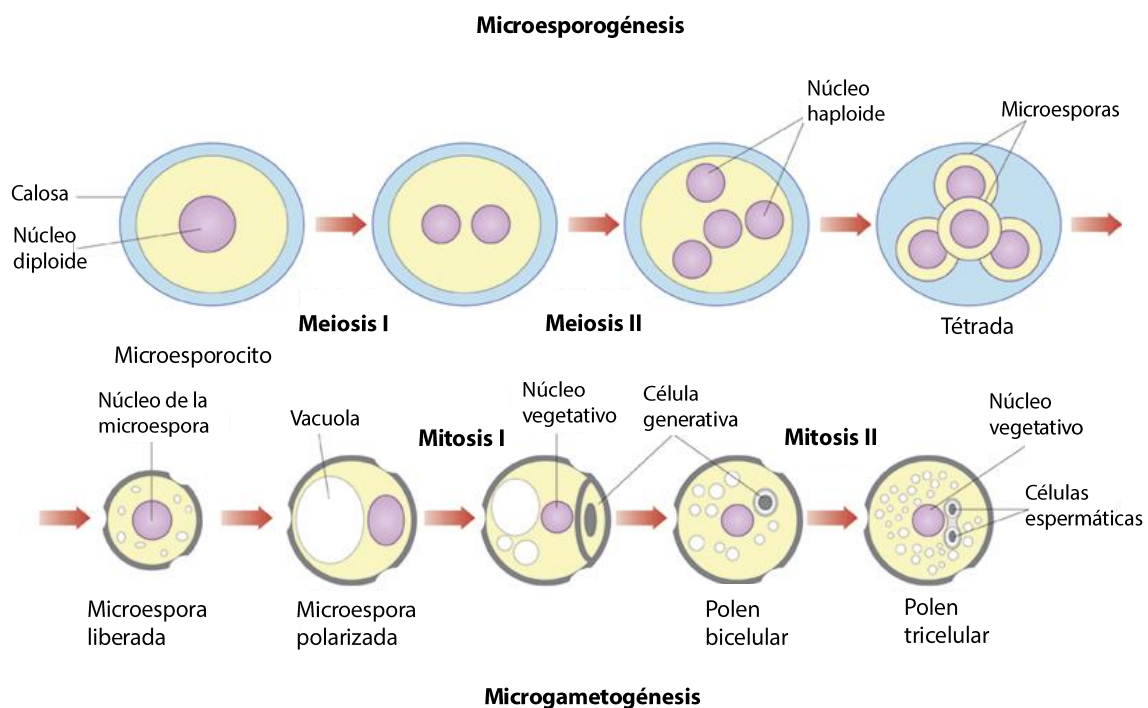


Figura I2. Esquema del desarrollo del grano de polen de *Arabidopsis*.

Crecimiento polarizado en células vegetales

Uno de los desafíos más grandes para los biólogos es entender la biología de las plantas a nivel de una célula individual. Algunas células como los pelos radiculares y los tubos polínicos han sido incorporadas como modelos excelentes para estudiar la expansión celular polarizada y la biosíntesis de pared celular. Este tipo de crecimiento celular polarizado se logra gracias a una rápida secreción de componentes de pared celular y membrana plasmática y a la vez a un aumento en la rigidez de la pared para soportar las fuerzas laterales de turgencia. Desde el punto de vista biológico, el crecimiento del tubo polínico es fundamental para la polinización en angiospermas (plantas con flor) ya que los mismos transportan las gametas masculinas en su interior a través del estigma hacia los óvulos. A pesar de la importancia de este proceso, poco se sabe de los mecanismos celulares y moleculares que controlan el crecimiento espacial y temporal del tubo polínico (Cheung & Wu 2008).

Crecimiento polarizado del tubo polínico

Cuando el grano de polen se adhiere al estigma debe hidratarse y esto ocurre únicamente si la interacción entre ambos es compatible. Luego de la hidratación del grano de polen comienza a germinar por medio de un proceso de expansión celular polarizada que da origen al tubo polínico el cual emerge del grano de polen a través de las aperturas germinativas (**Figura 13 A**). El tubo polínico penetra y crece a través del estilo transportando las células espermáticas hacia el óvulo donde ocurre la doble fecundación en la cual una de las células espermáticas se fusiona con la célula huevo (dando origen al embrión) y la otra a la célula central (generando el endosperma) (**Figura 13 B**).

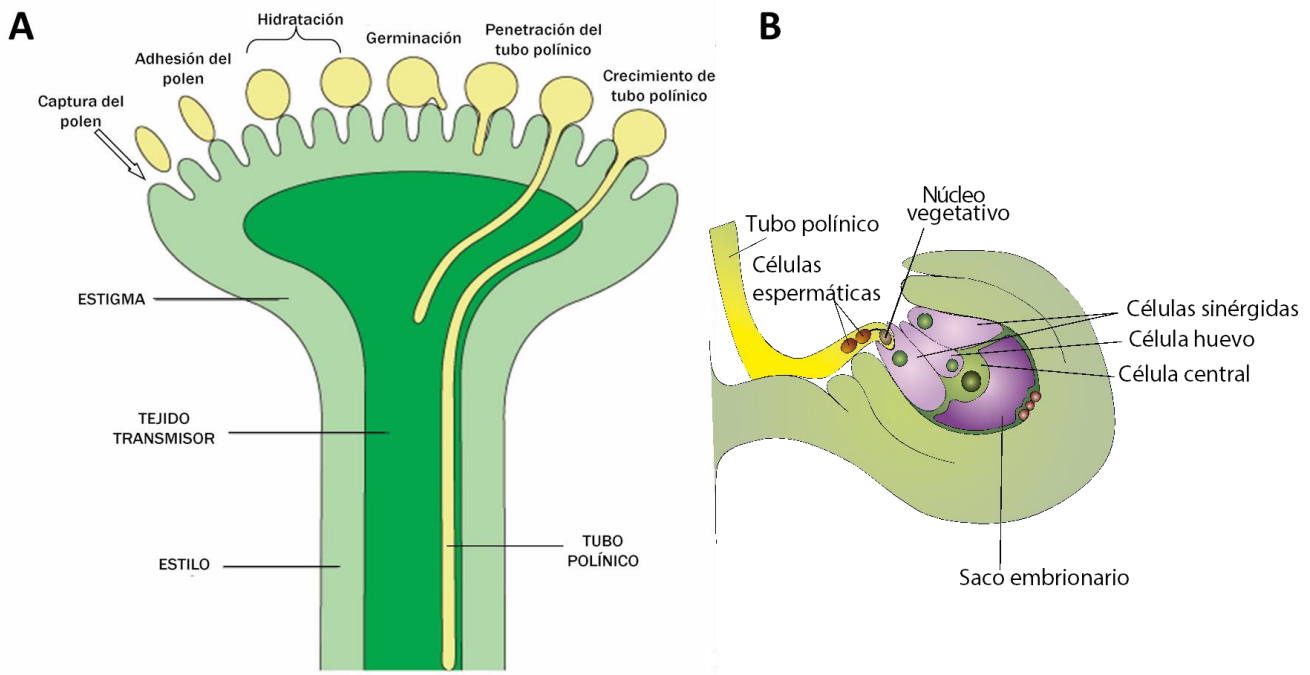


Figura 13. A) Etapas de la recepción del polen en el estigma. Se representa un estigma típico de una flor general y la secuencia de eventos que ocurren luego de la adhesión del grano de polen. Adaptado de Hiscock y Allen, 2008. B) Crecimiento del tubo polínico y doble fecundación. Luego de la germinación del grano de polen comienza el crecimiento del tubo polínico, el cual es guiado hacia el óvulo donde descarga las células espermáticas en una de las sinérgidas. A continuación, tiene lugar la doble fecundación: una de las células espermáticas se fusiona con la célula huevo (dando origen al embrión) y la otra a la célula central (generando el endosperma). Modificado de Twell, 2006.

Durante el crecimiento del tubo polínico el citoplasma está polarizado y pueden distinguirse cuatro zonas estructuralmente distintas (**Figura 14**): la zona apical (también denominada zona clara debido a la ausencia de organelas) donde se observa gran cantidad de vesículas que generarán más membrana y que además transportan material para la síntesis de la pared celular; la zona subapical rica en organelas; la zona nuclear donde se encuentran las células espermáticas y el núcleo vegetativo; y la zona vacuolar que contiene una gran vacuola que aumenta su tamaño a medida que crece el tubo polínico, confinando así al citoplasma hacia la parte apical del tubo. Estas cuatro zonas conforman el área que está en activo crecimiento en el tubo polínico, separada de las partes distales del mismo mediante tapones de calosa que se van formando justo por detrás de la zona vacuolar.

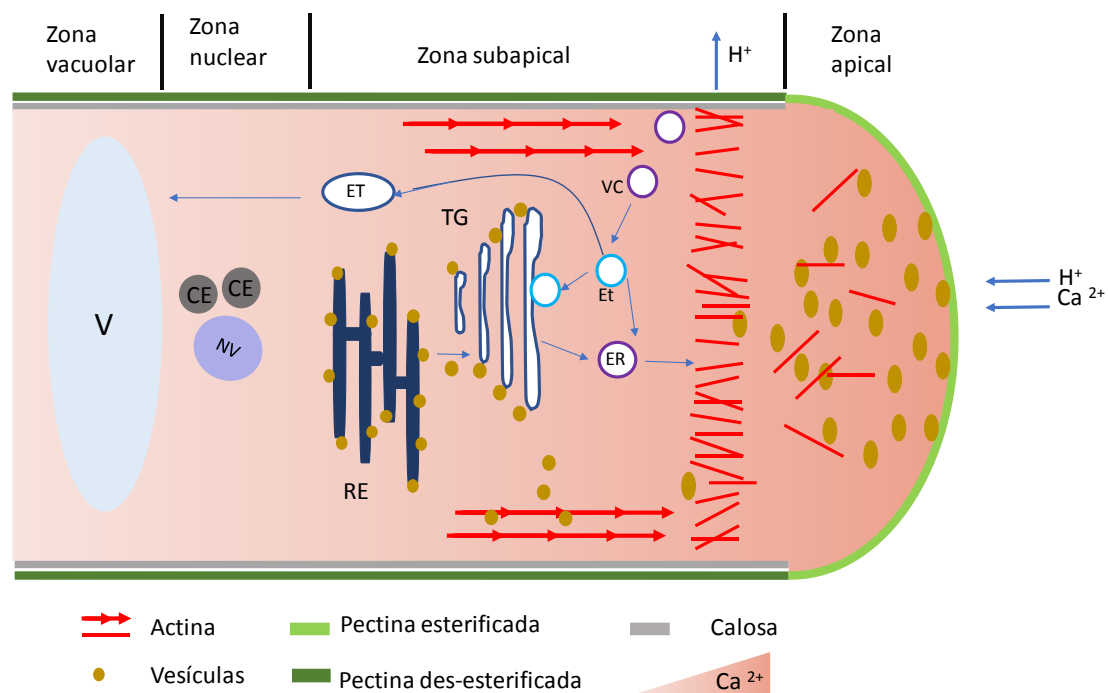


Figura 14. Esquema de tubo polínico en crecimiento. Se indican: CE, células espermáticas; NV, núcleo de la célula vegetativa; RE, retículo endoplasmático; TG, trans-Golgi; Et, endosoma temprano; ER, endosoma de reciclado; ET, endosoma tardío; VC, vesícula recubierta de clatrina. Se muestran filamentos axiales largos de actina (líneas rojas con flechas) excluidos de la zona apical, la franja de microfilamentos gruesos de actina en forma de anillo en la zona subapical, y una población de microfilamentos de actina finos y cortos en la zona apical o zona clara. Las diferentes estructuras celulares no están en escala.

El citoesqueleto de actina es el responsable del mantenimiento de la organización citoplasmática descrita. En dichas zonas la actina está organizada en estructuras diferentes, cada una de ellas fundamentales para el tráfico de vesículas y el crecimiento unidireccional del tubo polínico (Cheung y Wu, 2008, Vidali, *et al.* 2001). La corriente citoplasmática transporta las organelas y vesículas desde la zona subapical hacia la región apical, allí las vesículas son liberadas de los cables de actina y son capturadas por la franja de actina que forma un anillo en el ápice del tubo polínico. La franja de actina junto con los microfilamentos en la zona apical, orientan el tráfico vesicular hacia la membrana plasmática apical. El crecimiento del tubo polínico está sustentado por la exocitosis de las vesículas ya que estas transportan material para la pared celular, así como también las enzimas necesarias para modificar los componentes de la pared, proteínas regulatorias y de señalización (Hepler *et al.*, 2001; Guan *et al.*, 2013). El material exocitado superaría las cantidades requeridas para el crecimiento del tubo polínico (Cheung y Wu, 2008), por lo tanto, la exocitosis está equilibrada por los mecanismos de endocitosis. De esta forma, se internalizaría el exceso de membrana plasmática y de los

componentes de la pared celular asociados para coordinar el crecimiento en el ápice del tubo polínico (Hepler *et al.*, 2001) (**Figura 14**).

Los tubos polínicos crecen extremadamente rápido pudiendo alcanzar velocidades de hasta 2,8 $\mu\text{m}/\text{seg}$ en maíz, 5,3 $\mu\text{m}/\text{min}$ en *Arabidopsis* y 0,2-0,3 $\mu\text{m}/\text{seg}$ en lirio) (Barnabas y Fridvalszky, 1984; Wilhelmi y Preuss, 1996; Chen *et al.* 2002; Hwang *et al.* 2005). El crecimiento del tubo polínico tiene un comportamiento oscilatorio (**Figura 15**) y está directamente regulado por un gradiente citoplasmático apical de iones calcio ($\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$) así como el pH y ROS (Reactive Oxygen Species), los cuales oscilan con el mismo periodo, pero diferente fase que la del crecimiento (Lee y Yang, 2008) (**Figura 15**). Además de esta compleja señalización iónica, el crecimiento también es mantenido gracias a una dinámica estructura de actina-tubulina y eventos de tráfico intracelular intensivos junto con una síntesis y remodelación de componentes de pared celular (Krichevsky *et al.*, 2007; Monhausen y Gilroy, 2009; Swanson y Gilroy, 2010).

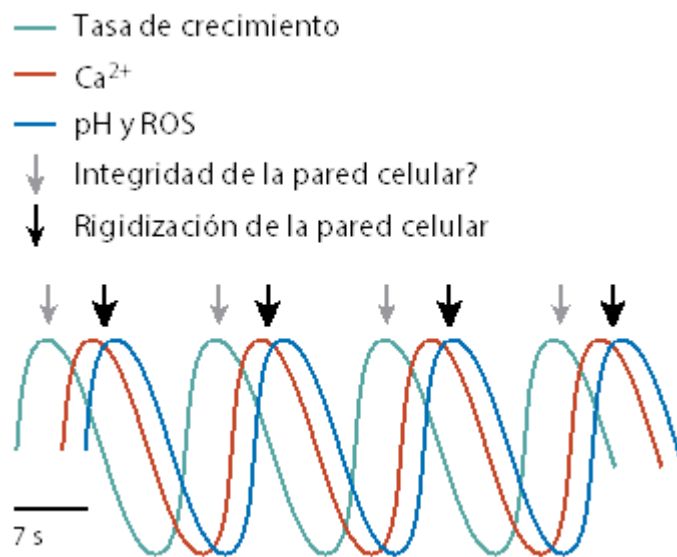


Figura 15. Control del crecimiento polarizado. La tasa de crecimiento de los tubos polínicos oscila con el mismo período que la concentración de calcio en el citoplasma ($\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$), el pH intracelular y apoplástico, y las especies reactivas de oxígeno en el espacio extracelular (ROS_{apo}). El corrimiento en la fase de las oscilaciones es debido a que la expansión de la pared celular causa el estiramiento de la membrana plasmática, lo que podría activar los canales de calcio sensibles a estiramiento (como MCA1) que permitirían la entrada de Ca^{2+} . El aumento en la concentración de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ a su vez disminuye la tasa de crecimiento al regular negativamente a las ATPasas de protones (H^{+} -ATPasas) y activando a los canales transportadores de protones. Como consecuencia el apoplasto presenta un pH alcalino el cual inhibiría la actividad de las enzimas que promueven la flexibilización de la pared (expansinas) y activaría a las enzimas que consolidan la pared celular (como las que esterifican las pectinas, PME). Por otro lado, el aumento de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ incrementa la producción de ROS mediante la activación de las NADPH oxidasas. Todo esto conduciría a la rigidización de la pared celular como resultado, por ejemplo, del *crosslinking* de extensinas. Adaptado de Swanson y Gilroy, 2010.

La entrada de iones Ca^{2+} ocurre en el ápice del tubo polínico (**Figura I4**) y se genera un gradiente intracelular donde la concentración de Ca^{2+} es máxima en el ápice (entre 2 y 10 μM) y va disminuyendo hacia la base del tubo polínico, donde alcanza una concentración de 0,2 μM (Steinhorst y Kudla, 2013). El mantenimiento del gradiente citosólico de Ca^{2+} es fundamental para sostener el crecimiento polarizado del tubo polínico, por lo tanto, deben existir mecanismos que regulen dicho gradiente. Los principales reguladores son los canales de Ca^{2+} que se localizan en la membrana plasmática (Iwano *et al.*, 2009; Michard *et al.*, 2017). En las plantas se han caracterizado canales que permiten el ingreso de Ca^{2+} al citoplasma entre los que se encuentran los canales dependientes de nucleótidos cíclicos (CNGCs), canales semejantes al receptor de glutamato (GLRs) y canales activados por estiramiento (SACs).

De los veinte genes CNGCs caracterizados en plantas, *CNGC7*, *CNGC8*, *CNGC16* y *CNGC18* se expresan en polen (Kaplan *et al.*, 2007). *CNGC18* se localiza en la membrana subapical y su disrupción causa defectos en el crecimiento del tubo polínico (Frietsch *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2016); la mutante *knockout cngc7cngc8* presenta defectos en la fertilidad masculina (Tunc-Ozdemir *et al.*, 2013). En animales, los GLRs son canales iónicos activados por ligando, como el aminoácido D-serina (D-Ser) (Dingledine *et al.*, 1999). Ha sido demostrada la presencia de GLRs en polen (Pina *et al.*, 2005; Bock *et al.*, 2006; Michard *et al.*, 2011) que facilitarían la entrada de Ca^{2+} para mantener su gradiente. Se ha demostrado que tubos polínicos creciendo en pistilos sin D-serina se deforman (fenotipo similar al observado en la mutante *knockout* para el gen *GLR1.2* de *Arabidopsis*), sugiriendo que la D-serina del pistilo ayuda a guiar a los tubos polínicos a su destino final durante la reproducción sexual (Michard *et al.*, 2011). En *Arabidopsis* se han identificado dos genes que codifican SACs, tales como *MCA1* y *MCA2* (Nakagawa *et al.*, 2007), y *MSL8* (Hamilton *et al.*, 2015). Se demostró que la proteína MCA1 promueve el influjo de Ca^{2+} después de la estimulación mecánica y es crítica para el crecimiento de la raíz de la planta. MSL8 se expresa específicamente en polen y es requerido para la integridad celular durante la germinación y el crecimiento del tubo polínico (Hamilton *et al.*, 2015). La proteína MSL8 libera osmolitos en respuesta a los cambios en la tensión de la membrana asociados con la hidratación y germinación del polen. Durante la germinación del polen MSL8 mantiene el potencial osmótico óptimo necesario para impulsar dicho proceso (Hamilton *et al.*, 2015).

El gradiente de Ca^{2+} en el ápice del tubo no es estático sino oscilatorio, por lo tanto, deben existir mecanismos que permitan la disipación de dicho gradiente. El Ca^{2+} puede ser removido mediante ATPasas auto-inhibidas por Ca^{2+} (ACAs) localizadas en la membrana plasmática del tubo polínico (tales como ACA9) o puede ser secuestrado mediante ATPasas localizadas en el retículo endoplasmático (por ejemplo, ACA2) o la vacuola (ACA4), que desempeñan un papel importante en el movimiento de Ca^{2+} en contra de su gradiente de concentración (Bock *et al.*, 2006; Iwano *et al.*, 2009; Steinhorst y Kudla, 2013).

El crecimiento del tubo polínico está regulado, además, por un gradiente de pH (Feijó *et al.*, 1999; Michard *et al.*, 2008), observándose un pH más ácido en el ápice del tubo (alrededor

de 6,8) y un pH más alcalino en la zona subapical (cercano a 7,5) generando una banda alcalina intracelular. Esto se debe a que el ingreso de H^+ ocurre en el ápice y el eflujo en los laterales del tubo polínico a través de las H^+ -ATPasas (AHA) (Lang *et al.*, 2014).

Componentes moleculares que regulan la expansión polarizada en tubos polínicos

Como se mencionó anteriormente los tubos polínicos utilizan las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el Ca^{2+}_{cit} como moléculas señalizadoras durante el crecimiento y desarrollo. Estudios previos han demostrado que la generación de ROS promueve el influjo de Ca^{2+} al citoplasma y que, a su vez, el aumento de Ca^{2+}_{cit} estimula la producción de ROS (Boisson-Dernier *et al.*, 2013). Recientemente han sido descritas en tubo polínico dos proteínas receptoras de tipo quinasa de la familia CrRLK1L (por *Catharanthus roseus* RLK1-like), ANXUR1 (ANX1) y ANXUR2 (ANX2). Las proteínas de esta familia poseen un dominio extracelular tipo malectina, un dominio transmembrana y un dominio quinasa serina/treonina citoplasmático (Lindner *et al.*, 2012; Wolf y Hofte, 2014). ANX1 y ANX2 regularían la producción de ROS, la homeostasis de Ca^{2+} y la exocitosis, conectando los eventos a nivel de la pared celular con la maquinaria presente en el citoplasma durante el crecimiento polarizado (**Figura I6**) (Boisson-Dernier *et al.*, 2013). En dicho estudio demostraron que la sobreexpresión de ANX1 y ANX2 ocasionaba un marcado aumento en la exocitosis, generando un aumento en la deposición de membrana plasmática y material de la pared celular. Las NADPH oxidasas son proteínas de membrana que producen radicales superóxido ($O_2^{\bullet-}$) en el apoplasto, el cual es dismutado (enzimáticamente o no) a H_2O_2 que puede difundir libremente hacia el citoplasma. Se ha demostrado que las proteínas ANX1/2 actuarían río arriba de las dos NADPH oxidasas específicas de tubo polínico, RBOHH y RBOHJ (por *Respiratory Burst Oxidase Homologue*, NADPH oxidasas de plantas). Mediante el empleo de sensores de ROS y Ca^{2+} , fue demostrado que ambas RBOH producen H_2O_2 en el ápice del tubo polínico, y esto mantiene estable el gradiente de concentración de Ca^{2+} , esencial para el crecimiento del tubo polínico (Boisson-Dernier *et al.*, 2013; Lassig *et al.*, 2014; Kaya *et al.*, 2014).

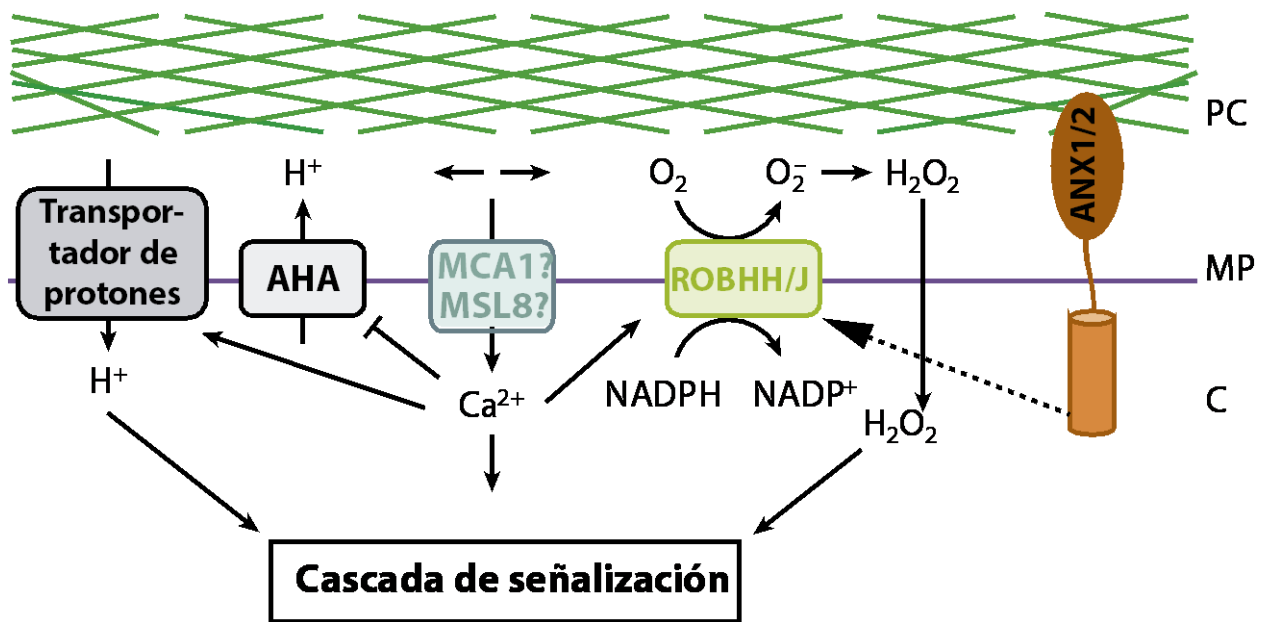


Figura 16. Modelo propuesto para la integración de los componentes moleculares que regulan el crecimiento polarizado. La extensión de la pared provoca el estiramiento de la membrana plasmática y el flujo de Ca^{2+} , posiblemente a través de un canal de Ca^{2+} activado por estiramiento relacionado con MCA1 o MSL8. El aumento de la concentración de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$, a su vez, enlentece el crecimiento al regular negativamente a AHA y aumentar la entrada de H^+ . Además, el aumento de los niveles de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ causa la producción de ROS a través de la activación de las NADPH oxidasas RBOHH y RBOHJ. Las ROS conducen al fortalecimiento de la pared favoreciendo el *crosslinking* de ciertos componentes de la pared celular y a su vez, mantienen el gradiente de Ca^{2+} . Dicho gradiente sustenta la secreción de material hacia el ápice evitando la pérdida de integridad de la pared celular durante la elongación de los tubos polínicos. Las proteínas ANX regularían también a las RBOHH y RBOHJ, para producir ROS. Modificado de Wolf y Hofte, 2012.

Otros reguladores fundamentales del crecimiento polarizado de los tubos polínicos son las proteínas GTPasas ROP (por *Rho of Plants*). Las proteínas ROP alternan entre un estado activo (unión a GTP) y un estado inactivo (unión a GDP), catalizado por las ROPGEFs (ROP *Guanine-nucleotide Exchange Factor*), funcionando como “interruptores moleculares” que interactúan de forma transitoria con otras proteínas desencadenando ciclos de activación/inhibición de las cascadas de señalización (revisado en Feiguelman *et al.*, 2018). Las proteínas ROP están involucradas en la regulación de la dinámica de los filamentos de actina y los microtúbulos (Bashline *et al.*, 2014; Hamada, 2014; Henty-Ridilla *et al.*, 2013), la endocitosis y exocitosis, la activación de las NADPH oxidasas y en la señalización intracelular mediada por quinasas. Debido a la regulación sobre la actina, el tráfico vesicular, la producción de ROS y la fosforilación de proteínas, las ROP son controladores centrales del crecimiento celular (Nagawa *et al.*, 2010; Bloch y Yalovsky, 2013). En *Arabidopsis* sido demostrado el péptido LURE1 (péptido secretado por las células sinérgicas para guiar al tubo polínico hacia el óvulo, (Palanivelu *et al.*, 2006; Higashiyama y Takeuchi, 2015) activa al receptor quinasa específico de polen PRK6

ubicado en el ápice del tubo polínico, que a su vez interactuaría con las proteínas ROPGEFs que activan a las ROP específicas de polen (ROP1/3/5) (Zhang y McCormick, 2007; Takeuchi y Higashima, 2016). La activación de ROP1 está asociada con la regulación del ensamblado y desensamblado de la actina (Gu *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2015). Dicha regulación está mediada por las proteínas RIC (por *ROP-interacting CRIB motif-containing proteins*) que interactúan con ROP: RIC3 actúa cuando los niveles de Ca^{2+} son elevados favoreciendo la despolimerización de actina mientras que RIC4 está implicada de manera positiva en la polimerización de actina. Mediante su función antagónica las proteínas RIC, como efectores de ROP, controlan la dinámica del citoesqueleto de actina y, por ende, participan en la regulación espacial y temporal de la secreción vesicular en el ápice del tubo polínico.

Características y dinámica de la pared celular durante el crecimiento polarizado del tubo polínico

La pared celular de las células vegetales puede soportar grandes presiones de turgencia, lo cual les sirve para focalizar el crecimiento en ciertas direcciones. Para facilitar dicho crecimiento polarizado, la pared celular tiene que asimilar cambios estructurales muy grandes. La estructura de la pared celular debe ser flexible para facilitar la expansión, pero a la vez fuerte para soportar las presiones de turgencia (Hepler *et al.*, 2013).

La pared celular está compuesta por polisacáridos como la celulosa, hemicelulosa y pectinas junto con glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) (**Figura 17**). En este entramado flexible las microfibrillas de celulosa están interconectadas con cadenas de xiloglucanos y posiblemente con pectinas (Dick-Pérez *et al.*, 2011). Las pectinas están entrecruzadas entre sí por Ca^{+2} y ésteres de apiosil-borato.

Las HRGPs forman hasta un 10 % (en peso seco) de la pared celular vegetal. La modificación post-traducciona l más común en las HRGPs es la hidroxilación de los residuos de prolina en 4-hidroxiprolina (4Hyp) por la acción de las prolil 4-hidroxilasas (**P4Hs**). La conversión de Pro en Hyp en la vía secretoria modifica la conformación proteica y provee de grupos hidroxilos reactivos hacia modificaciones posteriores como la O-glicosilación. Las glicoproteínas HRGPs de tipo extensinas (EXTs) forman una red ordenada interconectada por uniones covalentes que involucran a tirosinas (Carpita & Gibeaut 1993; Cosgrove 2004; Somerville *et al.* 2005; Cannon *et al.* 2008). Esta arquitectura de la pared celular se va modificando en respuesta a la presión de turgencia y a cambios en el pH, el cual contribuye a la expansión celular (Cosgrove, 1993; Refrégier *et al.*, 2004). Las EXT O-glicosiladas que son secretadas en la pared celular podrían formar una red covalente ordenada (Brady *et al.*, 1998; Held *et al.*, 2004; Cannon *et al.*, 2008). Se ha propuesto que la red de EXT cargadas positivamente reaccionaría con pectinas ácidas para formar agregados de EXT-pectinas, que funcionarían como moldes

para la síntesis de nueva pared celular (Cannon *et al.*, 2008; Valentin *et al.*, 2010).

En la pared celular de las células vegetales, las estructuras predominantes son las microfibrillas de celulosa, que envolverían a las células y estarían entrecruzadas por polisacáridos de simple cadena, como los xiloglucanos, y posiblemente las pectinas (Dick-Perez *et al.*, 2011). La celulosa se encuentra en forma de fibrillas largas no ramificadas, compuestas por cadenas de β -1,4-glucosa unidas por puentes de hidrógeno. Las hemicelulosas son polisacáridos ramificados con esqueletos de azúcares neutros que pueden formar puentes de hidrógeno con la superficie de las fibrillas de celulosa. Las pectinas que predominan en la pared celular son: el homogalacturonano, el Rhamnogalacturonano I y el Rhamnogalacturonano II. La pectina más simple es el homogalacturonano (HG), un polímero no ramificado de (1 $\rightarrow$ 4) α -D-ácido galacturónico. El rhamnogalacturonano I (RGI) tiene un esqueleto compuesto por repeticiones del disacárido (1 $\rightarrow$ 4) α -D-ácido galacturónico-(1 $\rightarrow$ 2) α -L-rhamnosa con decoraciones de cadenas laterales de arabinanos y galactanos. En cambio el esqueleto del Rhamnogalacturonano II (RGII) está compuesto por hasta 8 unidades de (1 $\rightarrow$ 4) α -D-ácido galacturónico. Las cadenas laterales del RGII contienen una serie de azúcares poco comunes, entre los que se encuentran la d-apiosa (Api), l-ácido acérico (3-C-carboxi-5-desoxi-l-xilosa, AceA), 2-O-metil l-fucosa (2Me-Fuc), 2-O-metil d-xilosa (2Me-Xil), l-galactosa (l-Gal), ácido 2-ceto-3-desoxi-d-lixo-heptulosárico (Dha) y ácido 2-ceto-3-desoxi-d-mano-octulosónico (Kdo) (O'Neill *et al.*, 2004). El RGI actuaría de andamiaje para las otras pectinas, como el rhamnogalacturonano II y HG, que se unirían covalentemente como cadenas laterales (Vincken *et al.*, 2003). Las pectinas están entrecruzadas entre sí por puentes de Ca^{2+} (entre los grupos carboxilo de las cadenas HG) y ésteres de apiosil-borato (en las moléculas RGII). Estos dos tipos de modificaciones refuerzan a la pared celular. Las microfibrillas de celulosa son sintetizadas en la membrana plasmática por las celulosas sintetasas (CESA) (Paredes *et al.*, 2006; Wightman y Turner, 2010). Se ha sugerido que la unión de la hemicelulosa a la superficie de las microfibrillas de celulosa mediante puentes de hidrógeno sería una de las causas para el ensamblado de la estructura de la pared celular (Somerville *et al.*, 2004).

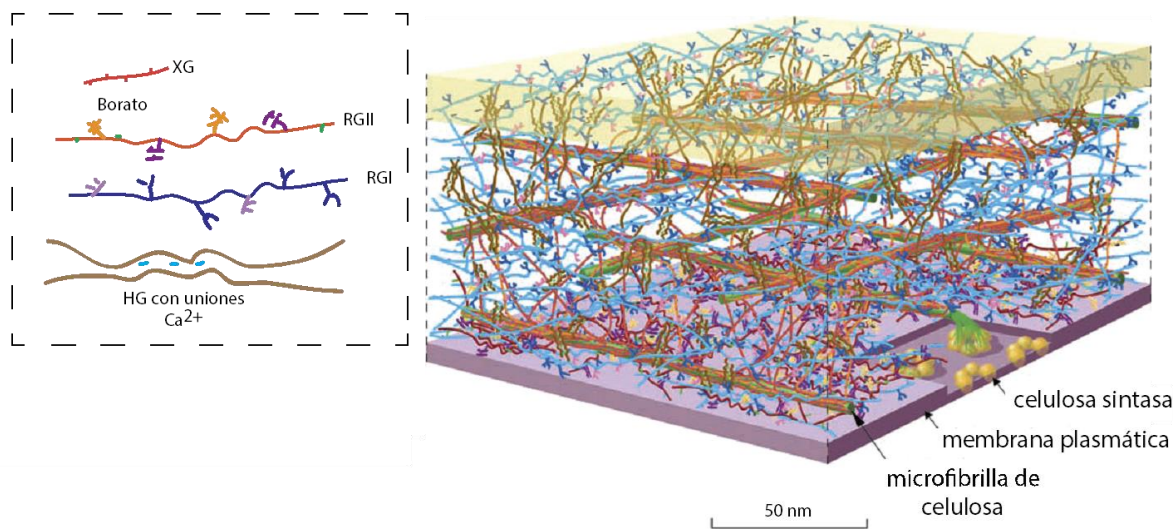


Figura 17. Estructura general de la pared celular en células vegetales. Modelo a escala de los polisacáridos en una célula de hoja de *A. thaliana* (adaptado de Somerville *et al.*, 2004). XG: xiloglucano; RG: Ramnagalacturonano; HG: homogalacturonanos. Hemicelulosa: XG; Pectinas: RGI, RGII y HG.

La pared celular de los tubos polínicos tiene algunas diferencias respecto de las del resto de las células vegetales. Una de ellas es que el principal componente es la calosa, un β -(1 $\rightarrow$ 3) glucano, mientras que la celulosa es menos abundante. La calosa se localiza mayormente en la pared interna y está ausente en el ápice de los tubos polínicos de *A. thaliana*, *Nicotiana tabacum* y *Lilium longiflorum* (Krichevsky *et al.*, 2007; Cai *et al.*, 2011, Dardelle *et al.*, 2010) (**Figura 18**). Además, durante el crecimiento del tubo polínico se van formando tapones de calosa a intervalos regulares manteniendo el contenido citoplasmático hacia la zona apical del tubo, separando la parte en activo crecimiento (viable) de aquella en degeneración. La celulosa está presente a lo largo de toda la pared celular formando una capa muy delgada, inclusive en el ápice. En un estudio realizado en tubos polínicos de *Torenia fournieri* (Wu *et al.*, 2008) se observó que las microfibrillas de celulosa eran más abundantes en la zona del ápice de aquellos tubos que crecían más lentamente, lo que sugiere que existe una relación entre la velocidad de crecimiento y el contenido de celulosa durante la elongación de los tubos polínicos. Las pectinas son sintetizadas en el aparato de Golgi en su forma esterificada por la acción de las pectin metiltransferasas (PMTs) y son transportadas hacia el ápice del tubo polínico, donde son secretadas hacia la pared celular. En el apoplasto las pectin metilesterasas (PME) remueven los grupos metilo, modificando el patrón de metilación de las pectinas. Esto conduce a un cambio en las características funcionales de las pectinas aumentando su afinidad por el calcio y disminuyendo la accesibilidad a las hidrolasas de la pared. Las pectinas desesterificadas entrecruzadas mediante Ca^{2+} dan rigidez a la pared celular especialmente en la parte posterior del tubo, por lo tanto, la pared en el ápice del tubo polínico es más flexible que

en la zona subapical y posterior del tubo polínico (gradiente de esterificación representado en la **Figura I8**).

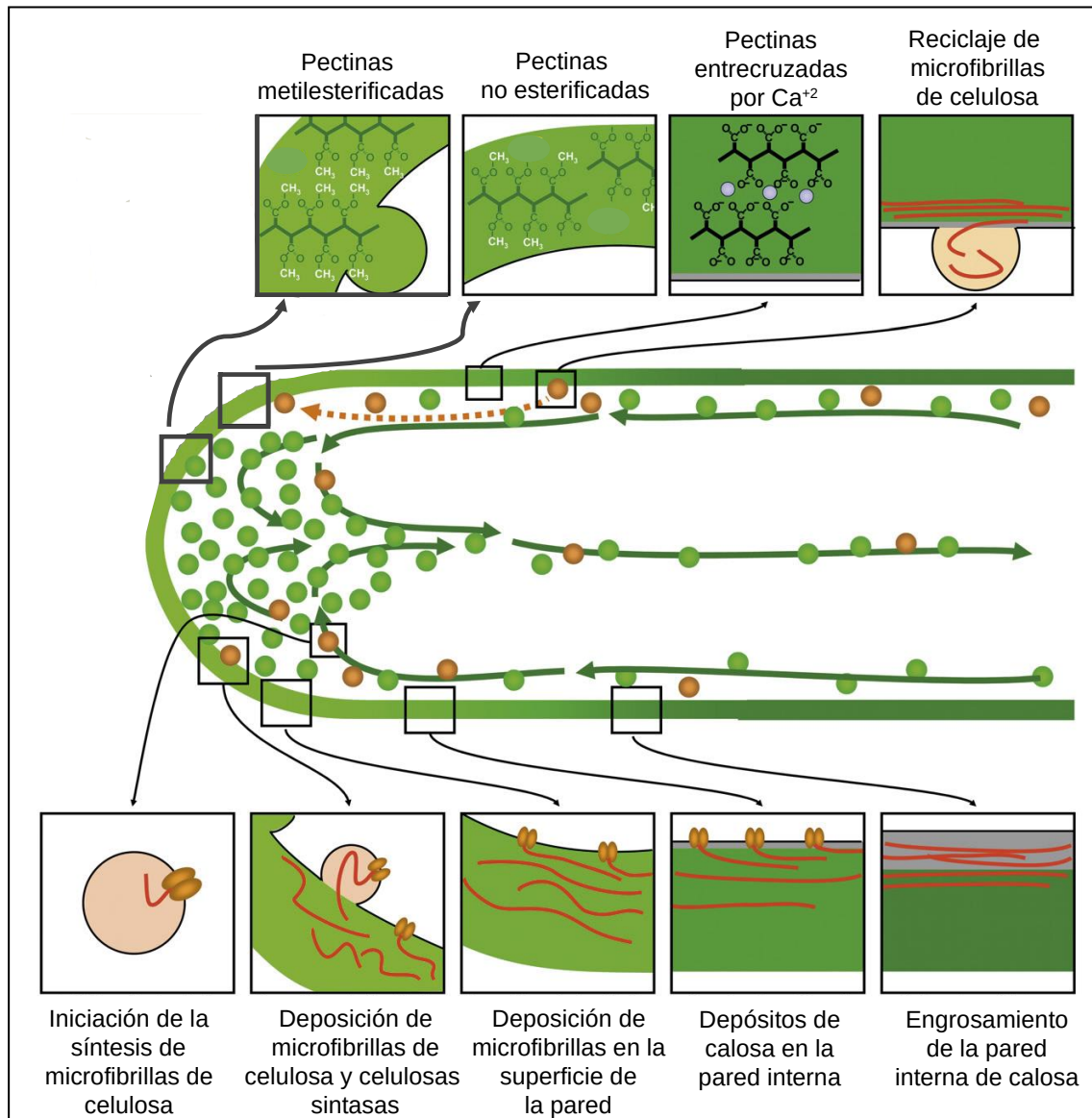


Figura I8. Esquematización del proceso de ensamblado y estructura de la pared celular de un tubo polínico de *Arabidopsis thaliana*. Las pectinas altamente esterificadas son sintetizadas en el aparato de Golgi y transportadas a la pared celular ubicándose en la zona apical. La desesterificación de las pectinas comienza en la curvatura de la zona apical, generando un gradiente en la metilación de las pectinas (verde claro a verde oscuro en el esquema) desde el ápice hacia la parte posterior del tubo. Las microfibrillas de celulosa (líneas rojas) son depositadas en la pared junto con las celulosas sintetas. El contenido de celulosa disminuye hacia la zona distal del tubo polínico, lo que sugiere que puede existir un reciclaje vía endocitosis de las microfibrillas. La calosa (gris) es sintetizada en la membrana plasmática, y está presente sólo a partir de la región distal a partir de donde comienza a aumentar su abundancia. (Adaptado de Chebli *et al.*, 2012)

Ejemplos de expansión celular ocurren en las fibras del algodón, pelos radiculares e hipocotilos crecidos en oscuridad como respuesta al sombreado. Por lo tanto, el conocimiento acerca de las distintas interacciones entre los componentes de la pared celular y de que forma la célula sensa donde y cuando hay que sintetizar y modificar dichos componentes es realmente crucial para entender cómo se produce la expansión celular vegetal.

Control de la integridad de la pared celular durante el crecimiento polarizado

La pared celular de las plantas forma una matriz extracelular compuesta por glicanos y proteínas que brindan estructura a las células. La integridad de la pared celular depende principalmente del correcto auto ensamblado de sus componentes individuales. Los organismos mutantes con defectos en los glicosaminoglicanos, proteoglicanos o colágenos ricos en hidroxiprolina son a menudo letales en animales (Buehler, 2006). Del mismo modo, algunos defectos en la matriz extracelular de las plantas (Cannon *et al*, 2008; Velasquez *et al*, 2011) y las algas verdes emparentadas (Keskiäho *et al* 2007) se relacionan con las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) como las extensinas (EXTs). La visión actual de la pared celular sugiere que es una estructura dinámica, que existe como un continuo con la membrana plasmática. La expansión celular en plantas involucra la flexibilización de la pared, la deposición de material nuevo y la subsecuente rigidización. Este proceso está altamente controlado para permitir el mantenimiento de la integridad de la pared celular y la coordinación durante el desarrollo de la planta.

El sensado complejo de las señales ambientales y de anomalías en la pared celular requiere, para un correcto desarrollo, de componentes de señalización de respuesta rápida entre la pared celular y el interior de la célula (Ringli, 2010b). En este sentido las plantas han desarrollado una diversidad de proteínas complejas con distintos dominios extracelulares que pueden constituirse en potenciales transductores de las señales provenientes de la pared hacia el citoplasma (**Figura I9**). Los receptores de tipo quinasa (RLKs) constan de 600 miembros, la mayoría de ellos con localización en la membrana plasmática y cuya función es mediar la señalización desde el espacio extracelular hacia el citoplasma y el núcleo. Una de las familias de potenciales sensores más estudiadas en *Arabidopsis* corresponde a las *wall-associated kinases* (WAKs), que contienen un dominio quinasa serina/treonina citoplasmático y un dominio N-terminal con repeticiones de tipo EGF (factor de crecimiento epidérmico) asociado a la pared celular (Kohorn & Kohorn, 2012). El dominio extracelular de las WAKs es capaz de unirse fuertemente a pectinas entrecruzadas por Ca^{+2} , por lo que intervendrían en la regulación de la expansión celular a través del sensado de la red de pectinas. Dentro de la superfamilia de receptores tipo quinasa también se encuentran las *Catharanthus roseus* RLK1-like (CrRLK1L). Una de las más estudiados de esta familia es FERONIA (FER) cuya expresión es ubicua en toda la planta (excepto en polen) y participa en diversos procesos dependiendo del tejido u órgano en que se expresa. Por ejemplo, durante la fertilización FER se expresa en células sinérgicas del

gametofito femenino e interviene en la comunicación entre el óvulo y el tubo polínico promoviendo la ruptura y descarga del contenido del tubo polínico en el óvulo. FER reconocería a través de su dominio extracelular a un ligando proveniente del polen y desencadenaría una cascada de señalización hacia las células sinérgidas. Debido a las características del dominio extracelular es probable que dichos ligandos contengan polisacáridos en su estructura, pudiendo ser productos de la degradación de la pared celular o secreción de glicoproteínas desde el tubo polínico. El dominio intracelular de FER interactúa con los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (ROP-GEFs) que estimulan el intercambio GDP/GTP en las RAC/ROPs (Rho GTPasas de plantas) y las activan (**Figura I9**).

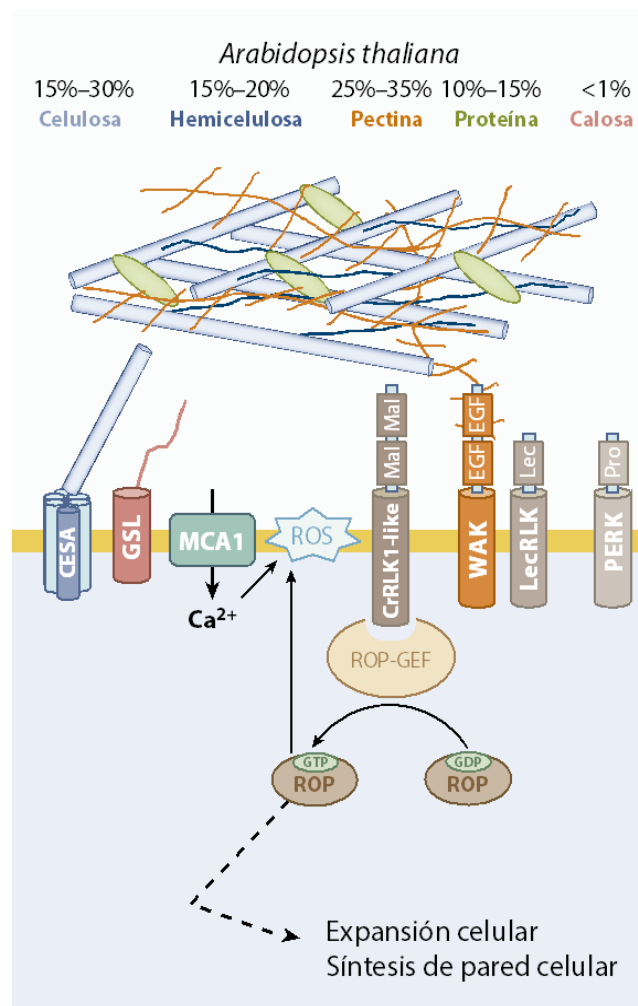


Figura I9. Vías de control de la integridad de la pared celular en *A. thaliana*. La alteración de la estructura de la PC es percibida por varios tipos de sensores localizados en la membrana plasmática: la deformación de la membrana inducida por estrés mecánico puede ser detectada por canales de calcio activados por estiramiento (MCA1) pero también por una variedad de receptores que pueden sentir los diferentes componentes de la PC. En *Arabidopsis* existen varias familias de receptores de tipo quinasa que podrían sentir la integridad de la PC: la familia CrRLK1 (que incluye FER) y las quinasas asociadas a la pared unidas a pectina (WAK), las proteínas quinasa con dominio extracelular tipo lectina (LecRLK) y las proteínas quinasa con dominios extracelulares de tipo extensina (PERK). CESA, celulosa sintasa; GSL, glucano sintasa; PC: pared celular; ROS, especies reactivas de oxígeno. Adaptado de Wolf *et al.*, 2012.

Los receptores quinasa de tipo lectina (Lec-RLKs) poseen un dominio extracelular de tipo lectina, un dominio transmembrana y un dominio quinasa serina/treonina citoplasmático. Las Lec-RLKs constituyen otro grupo de proteínas que podrían actuar integrando las señales extracelulares hacia el interior celular, actuando durante diferentes procesos como tolerancia a estrés biótico y abiótico, señalización mediada por hormonas y en la división celular. La subfamilia de RLKs más extensa es la de las proteínas quinastas con repeticiones ricas en leucina (LRR-RLK), representada por al menos 220 miembros en *Arabidopsis* (Shpak, 2013). Estas quinastas contienen hasta 30 repeticiones del motive LRR en su dominio extracelular (Shiu y Bleecker, 2001), el cual es capaz de sensar diversos ligandos como pequeñas moléculas, péptidos y proteínas (Bojar *et al.*, 2014). Las principales funciones en que participan las LRR-RLK son la defensa frente a patógenos y durante el desarrollo (Liu *et al.*, 2016).

Existe un grupo de proteínas presentes en la superficie celular que podrían intervenir en el sensado de la integridad de la pared, en la señalización y en la reestructuración del citoesqueleto. La característica común que comparten dichas proteínas es la presencia de motivos de tipo extensina (EXT) (Velasquez *et al.*, 2012) (**Figura I10**).

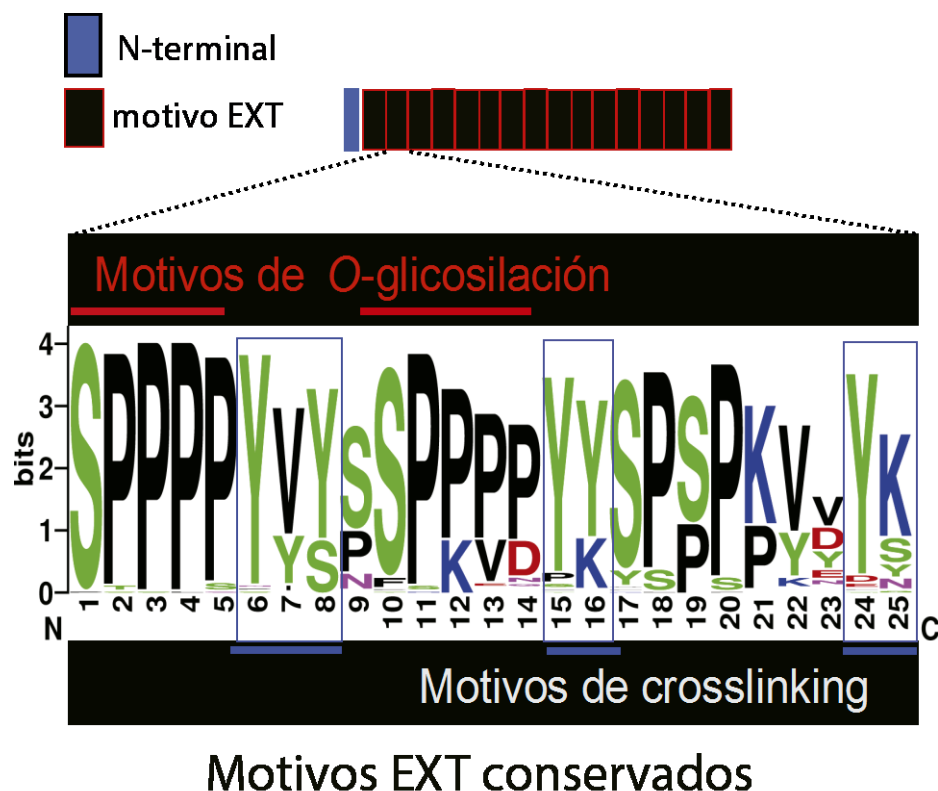


Figura I10. Esquema de una extensina típica. Se observan los motivos EXT clásicos: los motivos Ser-Pro₍₃₋₅₎ pueden ser O-glicosilados luego de la acción de las prolil 4-hidroxilasas; los motivos de *crosslinking* YVY aparecen contiguos a los motivos de O-glicosilación.

El motivo extensina puede definirse como una secuencia corta Ser-Pro₍₃₋₅₎ presente dos o más veces en la secuencia proteica. En el genoma de *Arabidopsis thaliana* hay codificadas 42 proteínas que contienen motivos Ser-Pro₍₃₋₅₎, consideradas extensinas (EXT) ya que la mayoría de ellas contiene el motivo de *crosslinking* YVY contiguo al motivo extensina (Showalter *et al.*, 2010) (**Figura I10**). El *crosslinking* de las EXT es catalizado por peroxidasas apoplásticas (Schnabelrauch *et al.*, 1996; Jackson *et al.*, 2001); las EXT clásicas forman una red glicoprotéica en la pared celular que posiblemente interactúa con la red de pectinas cargadas positivamente (Valentín *et al.*, 2010). La relevancia de la red glicoprotéica basada en EXT ha sido reportada en numerosos procesos biológicos como la expansión polarizada de pelos radicales (EXT6–7,10–13) (Velasquez *et al.*, 2011), en tubos polínicos (EXT18) (Choudhary *et al.*, 2015) y durante el desarrollo de los embriones (EXT3) (Hall y Cannon, 2002; Cannon *et al.*, 2008).

Dentro de las proteínas de la superficie celular con motivos extensina se encuentran las forminas (con dominio de unión a microtúbulos), las PERK (con dominio quinasa citoplasmático), los híbridos de extensinas como LRR-EXT (LRX, con dominio rico en leucina) e híbridos de arabinogalactanos AGP-EXT (HAE) (**Figura I11**). En *Arabidopsis* hay 11 forminas en el Grupo I (AtFH1-11) de un total de 21 forminas codificadas. Las forminas del Grupo I son proteínas multidominio con un péptido señal (excepto AtFH7), un dominio N-terminal variable, un dominio rico en prolina con motivos Ser-Pro (2-5), un dominio de homología-1 de formina (FH1), y un dominio de actividad (FH2) (Borassi *et al.*, 2015). Las forminas no contienen motivos de *crosslinking* de Tyr como los que están presentes en el motivo EXT clásico (**Figura I11**). El dominio FH2 sería suficiente para nuclear actina, mientras que el dominio FH1 interactúa con la profilina y potencia la actividad de FH2. La mayoría de las forminas del grupo I interactúan con los microfilamentos de actina (AtFH1, AtFH3–AtFH6, y AtFH8), mientras que AtFH4 también se une a microtúbulos (Cheung and Wu, 2004; Ingouff *et al.*, 2005; Deeks *et al.*, 2010). Ha sido propuesto que las forminas que presentan un dominio extracelular de tipo extensina podrían mediar la conexión de los componentes del citoesqueleto-membrana plasmática-pared celular, y que intervendrían en procesos como la división celular y el crecimiento polarizado (Cheung and Wu, 2004; Ingouff *et al.*, 2005; Yi *et al.*, 2005; Vidali *et al.*, 2009; Deeks *et al.*, 2010). Las extensinas con dominio rico en leucina (LRX) son proteínas que contienen un dominio LRR (por Leucine Rich Repeat) N-terminal conservado y un dominio tipo extensina C-terminal con motivos repetitivos Ser-Pro (3-5) posiblemente implicados en el *crosslinking* de componentes de la pared celular (Borassi *et al.*, 2015) (**Figura I11**). El dominio LRR está altamente conservado en monocotiledóneas y dicotiledóneas y potencialmente implicado en el reconocimiento y unión de ligandos. Hay 11 miembros de LRX en *Arabidopsis thaliana* separados en dos grandes clados: LRX1-LRX7 pertenecientes al clado vegetativo y LRX8-LRX11 (originalmente conocido como PEX1-PEX4) al clado reproductivo (Ringli, 2010; Baumberger *et al.*, 2003). Recientemente Sede *et al.* (2018) demostraron que la triple mutante *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1* presenta defectos en el ensamblado de la pared celular, con una alta acumulación de calosa y pectina, resultando en la formación de tubos polínicos anormales que desarrollan protuberancias y luego explotan. Estos resultados indican que las LRXs son necesarias para el desarrollo apropiado de la pared

celular (Sede *et al.*, 2018). Con respecto a los híbridos AGP-EXT (HAE), cada proteína contiene motivos tanto AGP como EXT en la misma proteína (**Figura I11**). Los AGP son proteínas apoplásticas fuertemente *O*-glicosiladas con hasta 90-95% de glucanos compuestos principalmente de arabinosa y galactosa (Hijazi *et al.*, 2014). Solo hay cuatro proteínas HAE en *Arabidopsis* (Showalter *et al.*, 2010): HAE1 tiene un dominio inhibidor de pectina metil esterasa (PMEI) y HAE4 tiene un dominio de transferencia de lípidos, mientras que HAE2-HAE3 contienen dominios con funciones desconocidas.

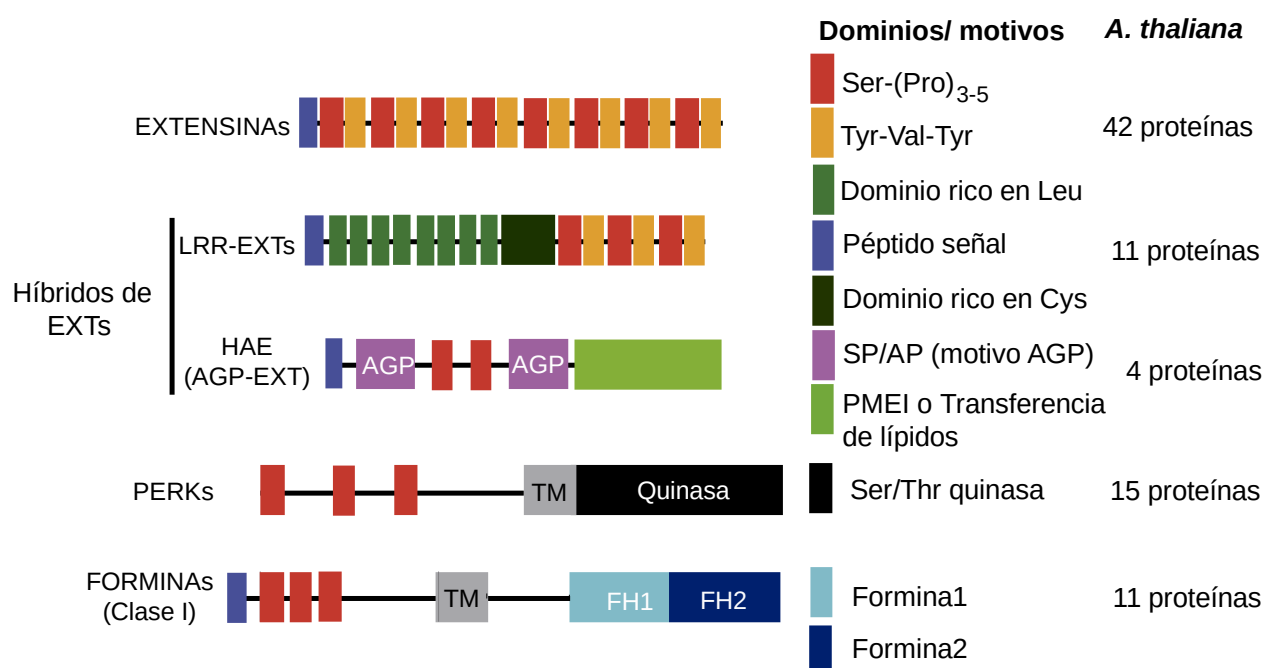


Figura I11. Proteínas de la superficie celular que contienen motivos extensina. El motivo extensina (Ser-Pro₃₋₅) está presente en varias proteínas: las extensinas clásicas (EXT), los híbridos de extensinas, las PERKs y las forminas; pero sólo las EXT y las LRR-EXT poseen la secuencia de crosslinking YVY. Se muestra además la organización de los dominios y motivos, y el número de proteínas codificadas en *Arabidopsis thaliana*. TM= dominio transmembrana. (Borassi *et al.*, 2015)

Como se mencionó anteriormente este grupo de proteínas de superficie celular incluye a la familia PERK (por Proline-rich Extensin-like Receptor Kinases), representada por 15 miembros en el genoma de *Arabidopsis* (PERK1-5) (Silva y Goring, 2002). Las proteínas PERK son receptores de tipo quinasa Ser/Thr, con un dominio transmembrana y un dominio extracelular tipo extensina rico en prolina. Usando una búsqueda InParanoid (Sonnhammer y Östlund, 2015) de los ortólogos de PERKs, se encontraron ortólogos putativos en al menos 12 especies de plantas (**Anexo 1**), incluyendo 4 monocotiledóneas, de los cuales 3 *loci* fueron encontrados en

Oryza sativa y 2 en *Hordeum vulgare*, 8 eudicotas incluyendo 6 loci en *Solanum tuberosum* y 19 en *Brassica rapa*, lo que sugiere que la familia PERK está bien conservada en angiospermas (Florentino *et al.*, 2006). Todas las PERKs muestran una estructura génica similar con alta variabilidad en los primeros 2 exones, lo que explica las diferencias de longitud de los dominios extracelulares, con excepción de PERK2 que es codificada por un solo exón. Considerando el alineamiento de los dominios citoplasmáticos y la localización, Silva y Goring (2002) propusieron que las PERKs provienen de eventos de duplicación. Mientras que la longitud de los dominios extracelulares varía considerablemente, la filogenia del dominio quinasa muestra un alto grado de similitud, como es esperable para proteínas con actividad quinasa (Silva y Goring, 2002; Nakhamchick *et al.*, 2004).

En la **Tabla 1** se resumen los patrones de expresión y las funciones de los miembros de la familia de genes PERK ya caracterizados. El primer miembro caracterizado fue BnPERK1 (ortólogo putativo de PERK1 de *Arabidopsis*) en *Brassica napus*, el cual se expresa en toda la planta y es inducido por daño (Silva y Goring, 2002). El análisis de las fusiones de los promotores de PERK:GUS predijo que *PERK1* es expresado principalmente en tejidos vasculares, cotiledones, hojas en desarrollo y raíces, mientras que *PERK3* se expresa en las venas de las hojas de la roseta, tallos y polen (Haffani *et al.*, 2006). También se ha descrito que *PERK12* se expresa en pelos radicales de plantas jóvenes, mientras que en plantas adultas se expresa altamente en anteras y posiblemente en polen (Hwang *et al.*, 2010). Usando un reportero de promotor fusionado a GFP, se demostró que PERK13 se expresa en pelos radicales (Won *et al.*, 2009). Todos estos resultados coinciden con los datos de microarreglos obtenidos para diferentes tejidos de *Arabidopsis*. Sin embargo, Bai *et al.*, (2009) encontraron que PERK4 estaba presente en raíces, semillas germinadas, cotiledones, tallos y flores, mientras que los microarreglos de polen lo describen como altamente expresado en polen maduro y tubos polínicos (Honys y Twell, 2004; Qin *et al.*, 2009) pero no en los tejidos esporofíticos que fueron analizados (Honys y Twell, 2004).

Tabla 1. Revisión de las PERK enfatizando aquellas presentes en células con expansión polarizada (tubos polínicos y pelos radicales).

Proteína/Código del gen	Función propuesta	Expresión ^a / (Localización subcelular)	Referencias
<i>BnPERK1</i>	Control de la ramificación de raíces y tallos. Percepción y respuesta a dano o estímulo por patógenos. Actividad serina/treonina quinasa in vitro	Tallo, pétalos y pistilo/ (Membrana plasmática)	Silva y Goring, 2002; Haffani <i>et al.</i> , 2006
<i>PERK1 (NsAK)</i>	Relacionada con infecciones virales	Ubicua	Nakhamchik <i>et al.</i> , 2004; Florentino <i>et al.</i> , 2006; Haffani <i>et al.</i> , 2006
<i>PERK3</i>		Vena de hojas de la roseta, tallo y polen	Nakhamchik <i>et al.</i> , 2004; Haffani <i>et al.</i> , 2006
<i>PERK4</i>	Control del crecimiento de la raíz en respuesta a ABA. Actividad serina/treonina quinasa in vitro.	Raíz, primordios, semillas germinadas y cotiledón/(Membrana plasmática)	Nakhamchik <i>et al.</i> , 2004; Bai <i>et al.</i> , 2009a; Bai <i>et al.</i> , 2009b; Honys <i>et al.</i> , 2004; Qin <i>et al.</i> , 2009
<i>PERK8</i>	Control redundante del crecimiento de la raíz primaria	Plántulas, raíces, primordios y yemas florales	Nakhamchik <i>et al.</i> , 2004; Humphrey <i>et al.</i> , 2015
<i>PERK9</i>	Control redundante del crecimiento de la raíz primaria	Raíces, primordios y yemas florales	Nakhamchik <i>et al.</i> , 2004; Humphrey <i>et al.</i> , 2015
<i>PERK10</i>	Control redundante del crecimiento de la raíz primaria	Primordios y yemas florales	Nakhamchik <i>et al.</i> , 2004; Humphrey <i>et al.</i> , 2015
<i>PERK12 (IGI1)</i>	Control de la dominancia apical.	Pelo radical, anteras, polen, tallo y silicuas inmaduras	Nakhamchik <i>et al.</i> , 2004; Hwang <i>et al.</i> , 2010
<i>PERK13 (RHS10)</i>	Control de la elongación de pelos radicales.	Pelo radical	Nakhamchik <i>et al.</i> , 2004; Won <i>et al.</i> , 2009; Humphrey <i>et al.</i> , 2015

^a Información basada en reporteros, RT-PCR, Northern blot o de la información proveniente de microarreglos disponible en Genevestigator (Hruz *et al.*, 2008). At= *Arabidopsis thaliana*; Bn= *Brassica napus*.

Como los receptores quinasa típicos de plantas, se espera que las proteínas PERKs estén localizadas en la membrana plasmática, como de hecho fue reportado para BnPERK1 y PERK4 (Silva y Goring, 2002; Bai *et al.*, 2009). Todos los miembros de la familia PERK y BnPERK1 carecen de péptido señal; sin embargo, una secuencia de aminoácidos cargados positivamente río debajo del dominio transmembrana sería responsable de ubicar el dominio quinasa en el citoplasma y el dominio rico en prolina hacia el exterior celular (Nakhamchick *et al.*, 2004). De este modo, las PERKs pertenecen a la familia de proteínas de membrana de tipo Ib (Silva y Goring, 2002) y se propone que son insertadas en la membrana a través de la maquinaria de translocación usual del retículo endoplásmico (Singer, 1990). La actividad serina/treonina quinasa de BnPERK1 y PERK4 ha sido demostrada *in vitro* (Silva y Goring, 2002; Bai *et al.*, 2009). Además, Mayank *et al.* llevaron a cabo experimentos de fosfoproteómica sobre granos de polen maduro de *Arabidopsis* y encontraron que PERK6 estaba fosforilada en una serina localizada en el dominio C-terminal (Mayank *et al.*, 2012).

Aunque los simples mutantes de ADN-T de la mayoría de las 15 PERK no muestran un fenotipo detectable en la planta adulta o durante procesos como el crecimiento polarizado de pelos radicales o tubos polínicos, aparentemente debido a la redundancia dentro de la familia de genes (Haffani *et al.*, 2006), existen algunos estudios donde se han utilizado aproximaciones de genética directa y reversa para elucidar la función de varias PERKs durante el desarrollo vegetal. Mediante la estrategia de *activation tagging* se caracterizó una nueva mutante de *Arabidopsis* llamada *igi1* (por *inflorescence growth inhibitor 1*) que presentaba menor altura y mayor ramificación. *Activation tagging* es un método para generar mutaciones dominantes mediante la inserción aleatoria de un ADN-T que lleva elementos potenciadores constitutivos, que pueden provocar la activación transcripcional de genes flanqueantes. El método consiste en generar numerosas plantas transformantes y luego realizar una selección del fenotipo deseado. Luego, el gen activado es rescatado de las transformantes seleccionadas para realizar un posterior análisis funcional. En el caso de la mutante *igi1* los fenotipos observados son debidos posiblemente a la sobreexpresión ectópica del gen *IGI1*. En las plantas homocigotas (*igi1/igi1*), la expresión de *IGI1* era 3000 veces mayor respecto del tipo salvaje, produciendo esterilidad a causa de la falta de inflorescencias. Mediante TAIL-PCR (*thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction*). Brevemente, la TAIL-PCR es una técnica que permite amplificar secuencias desconocidas adyacentes a sitios de inserción conocidos, esto se logra empleando primers específicos para el borde izquierdo y el borde derecho del ADN-T, y primers degenerados que “pegan” en todo el genoma. Se determinó que el ADN-T se había insertado en la región promotora del gen *IGI1* que resultó ser *PERK12*. Estos resultados sugieren que, bajo condiciones fisiológicas, un miembro de la familia PERK, que no debería ser *PERK12* ya que este se expresa en polen y no en meristemas, regularía negativamente la dominancia apical en *Arabidopsis* (Hwang *et al.*, 2010).

Un *screening in silico* para promotores de genes que contienen RHE (por *root hair cis element*; los genes cuyos promotores presentan estos elementos regulatorios se expresan

específicamente en pelo radical) combinado con el análisis de los transcriptomas de pelo radical, condujo a la identificación de 19 genes específicos de pelos radicales. Uno de ellos (*RHS10*) es *PERK13*, que se expresa específicamente en pelos radicales. Una línea de ADN-T para *PERK13* mostró pelos radicales más largos que las plantas salvajes, mientras las plantas que sobreexpresan *PERK13* bajo el promotor específico de pelo radical EXPA7 mostraron pelos más cortos, indicando el efecto negativo de *PERK13* en la elongación de los pelos radicales (Won *et al.*, 2009).

Por otro lado, cuando se transformaron plantas de *Arabidopsis* con la versión antisentido del gen *BnPERK1* de *Brassica napus* bajo el control del promotor 35S (promotor de origen viral extraído del Virus del Mosaico del Coliflor), se observaron defectos tales como la pérdida de dominancia apical, incremento en las ramificaciones secundarias, tallos más cortos y pocas semillas por silicua. Estas plantas presentaban una completa inhibición de *PERK1* y *PERK3*, los dos genes de *Arabidopsis* más cercanos a *BnPERK1*. Por otro lado, la expresión ectópica de *BnPERK1* en *Arabidopsis* bajo el control del promotor 35S produjo un aumento del crecimiento con un incremento en la producción de raíces laterales, número de óvulos por pistilo y cantidad de semillas (Haffani *et al.*, 2006). Sin embargo, también fue descrito que las plantas de *Arabidopsis* transgénicas para *BnPERK1* antisentido presentaban hipocotilos más largos que el tipo salvaje, mientras que en las líneas sobreexpresantes eran más cortos (Haffani *et al.*, 2006), sugiriendo una compleja regulación aun sin descifrar.

También ha sido demostrado que las mutantes de ADN-T de *PERK4* eran menos sensibles al ácido abscísico (ABA) durante la germinación de la semilla y el crecimiento de la raíz primaria y la plántula (Bai *et al.*, 2009a). La menor sensibilidad al ABA de las mutantes *perk4* durante el crecimiento polarizado de la raíz reveló un aumento en la elongación celular en lugar de un aumento en la división celular. El aumento del calcio citoplasmático y la activación de los canales de calcio producido por el ABA era menor en plantas *perk4* que en las de tipo salvaje. La proteína *PERK4* recombinante expresada en levaduras se autofosforilaba cuando era estimulada por el agregado de 1μM de ABA o calcio. Todos estos resultados sugieren que la inhibición del crecimiento de la raíz causada por el ABA es al menos parcialmente mediada por *PERK4* (Bai *et al.*, 2006a).

Por último, Humpfrey *et al.*, realizaron un estudio mediante genética reversa para analizar la función de *PERK8*, *PERK9* y *PERK10* (Humpfrey *et al.*, 2015). Obtuvieron simples y múltiples mutantes para dichos genes *PERKs* y analizaron el crecimiento de la raíz en distintas concentraciones de glucosa. Mientras que las plantas salvajes y las simples mutantes crecidas en MS 0,5X (sales Murashige & Skoog) con 4,5% de sacarosa mostraron raíces primarias más cortas comparadas con aquellas crecidas en un medio sin sacarosa, la triple mutante *perk8-1 perk9-1 perk10-1* mostró un aumento en la longitud de la raíz. Por el contrario, la sobreexpresión de *PERK10* condujo a un rápido arresto en el crecimiento de la raíz primaria acompañado de deposición ectópica de lignina y calosa (Humpfrey *et al.*, 2015).

En conjunto estos estudios sugieren que las proteínas PERKs son reguladores del crecimiento y el desarrollo en plantas. El crecimiento de la raíz, la sensibilidad al ABA y la dominancia apical son rasgos donde las PERKs muestran un efecto negativo.

Utilizando el ensayo de dos híbridos en levaduras se demostró que los dominios quinasa de PERK8, PERK9 y PERK10 interactúan con dos proteínas de la familia de quinasas AGCIII llamadas KIPK (por *kinesin-like calmodulin-binding protein (KCBP)-interacting protein kinase*). El análisis de mutantes sugiere que las proteínas PERKs (8,9,10) y las proteínas KIPKs (1,2) son parte de la misma vía que regula negativamente el crecimiento de la raíz (Humpfrey *et al.*, 2015).

Las quinasas AGC pertenecen a una de las 6 superfamilias de quinasas serina/treonina de plantas (Dardick *et al.*, 2007). Se las denomina con el nombre AGC para poder incluir a las quinasas dependientes de cAMP (PKA, del inglés cAMP-dependent protein kinases), las quinasas dependientes de cGMP (PKG, del inglés cGMP-dependent protein kinases), varias proteínas quinasa C (PKC), proteína quinasa B (PKB), la proteína quinasa-1 dependiente de 3-fosfoinositol (PKD1, del inglés 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1) y la proteína quinasa ribosomal S6 (Sobko *et al.*, 2006). Si bien se desconoce la función de la mayoría de las quinasas AGC, algunos estudios han mostrado que tendrían un papel importante en ciertos procesos celulares y del desarrollo tales como, el crecimiento de los tubos polínicos y pelos radicales, el transporte de auxinas y durante la respuesta a estrés biótico y abiótico (Zhang *et al.* 2009b). Las quinasas de la familia AGC se agrupan en diferentes subfamilias (AGCI, AGCVII, AGCVIII, homólogos de PDK1, etc), siendo la subfamilia AGCVIII la que contiene más miembros y que a su vez se divide en cuatro grupos (AGC1-AGC4) (**Figura I12**) (Bögre *et al.*, 2003). Fue demostrado que las proteínas AGC1.5 y AGC1.7 (pertenecientes al grupo AGC1 dentro de la subfamilia AGCVIII) son fundamentales en el correcto funcionamiento del citoesqueleto de actina y en el mantenimiento de la polaridad durante el crecimiento del tubo polínico (Zhang *et al.*, 2009a).

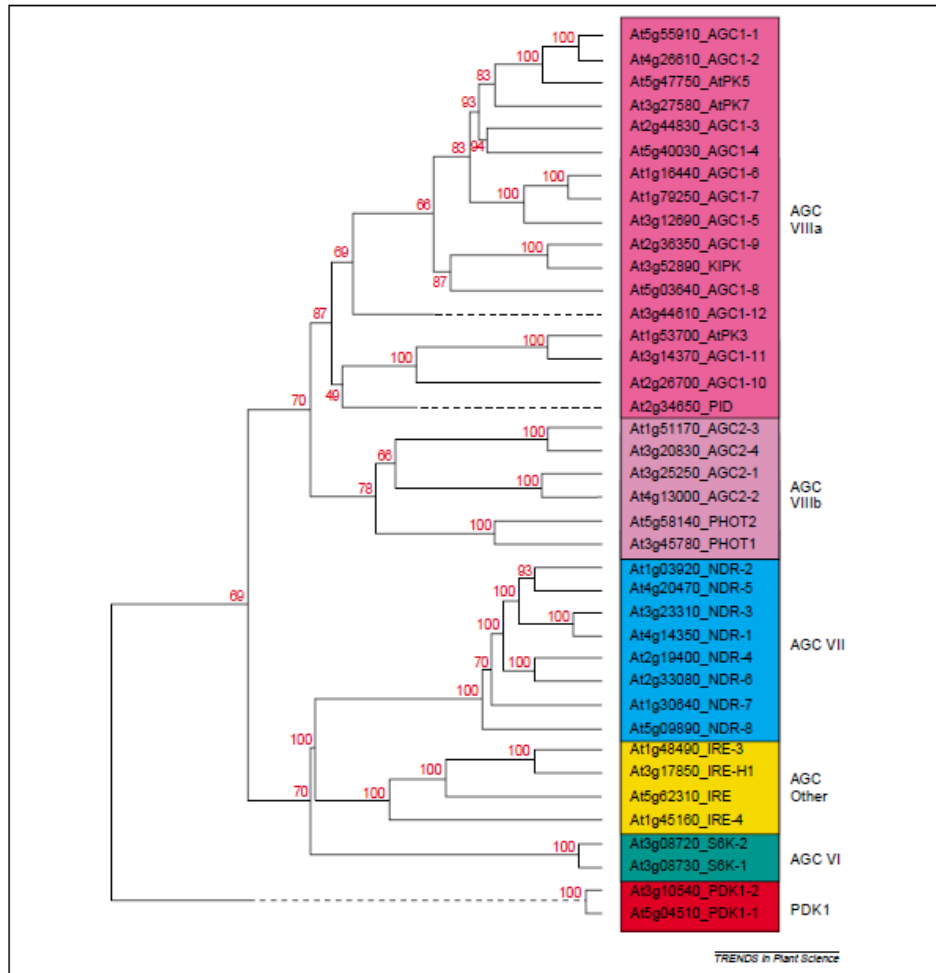


Figura I12. Árbol filogenético de la familia de quinasas AGC. Como se puede observar el grupo que comprende a las AGC se divide en 6 subfamilias. Las AGCVI y PDK1 tienen ortólogos en animales y levaduras. Dentro de la familia AGCVIIIa-b se encuentran quinasas que han sido caracterizadas en plantas (PID, IRE y PHOT). Tomado de Bögre *et al.*, 2003.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Análisis Filogenético y expresión de las proteínas PERK

1.1. Búsquedas de homología de secuencias

Se buscaron las secuencias aminoacídicas de las PERKs de *A. thaliana* en el sitio *TAIR* (*The Arabidopsis Information Resource*; <http://www.arabidopsis.org>). Estas secuencias fueron utilizadas para hacer alineamientos globales del tipo ClustalW con los que se construyó un árbol filogenético con el programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2007).

1.2. Búsqueda de ortólogos de los genes *PERK*

Realizamos una búsqueda de los ortólogos de *PERKs* mediante un análisis *InParanoid* (Sonnhammer y Östlund, 2015). Este método realiza una comparación exhaustiva mediante BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) de todas las proteínas de dos especies y luego aplica reglas de *clustering* para construir los grupos de ortólogos.

1.3. Expresión *in silico* de los genes *PERK*

Para determinar cuáles de los genes *PERK* se expresan preferencialmente en polen empleamos los datos provenientes de microarreglos (<http://genevestigator.com/gv/>). En este trabajo de tesis se incluyen los genes *PERK* con máximos niveles de expresión en los distintos estadios del desarrollo del polen y durante el crecimiento del tubo polínico.

2. Cepas bacterianas

2.1. Conservación de cepas bacterianas

Para conservar los clones bacterianos, se mezcló en un tubo *Eppendorf* un volumen de cultivo crecido durante toda una noche con una solución de glicerol estéril, hasta alcanzar una concentración final de 10-20% de glicerol. Los *stocks* bacterianos se guardaron a -80°C.

2.2. Escherichia coli

2.2.1. Condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa DH5 α de *E. coli* para el clonado y amplificación de plásmidos. Los cultivos líquidos se desarrollaron a 37°C en medio LB (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, y NaCl 5 g/l) con agitación a 250 r.p.m. (revoluciones por minuto). Los cultivos sólidos se realizaron en placas de Petri a 37°C, en medio LB con 1,5% de agar. De acuerdo con la resistencia conferida por cada vector, el medio de cultivo se suplementó con ampicilina (100 mg/l), kanamicina (50 mg/l), estreptomycin (100 mg/l), espectinomicina (100 mg/l) o gentamicina (50 mg/l).

2.2.2. Preparación de células *E. coli* DH5 α competentes

Se inoculó 1l de medio SOB (triptona 20 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 0,5 g, 10 ml de KCl 250 mM, ajustado a pH 7 con NaOH 1M) con un cultivo crecido durante toda la noche a partir de una colonia de *E. coli*. El cultivo se incubó con agitación a 250 r.p.m. a 37°C hasta alcanzar una D.O. a 600 nm de 0,5-0,6. Posteriormente, se colocó el cultivo en hielo durante 10 min y se centrifugaron las células a 2500g por 10 min a 4°C. Luego, se removió el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 80 ml de buffer *Inoue* (MnCl₂ 55mM, CaCl₂ 15mM, KCl 250 mM, PIPES 10 mM pH 6,7) pre-enfriado y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. El *pellet* fue resuspendido en 20 ml de buffer *Inoue*, al cual se le agregó 1,5 ml de DMSO y la suspensión fue incubada en hielo 10 minutos más. Las células se fraccionaron en alícuotas de 50 μ l, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C.

2.2.3. Transformación de células *E. coli* DH5 α competentes

Se descongeló un tubo *Eppendorf* con 50 μ l de bacterias competentes y se agregó entre 100-250 ng del ADN de interés. Se incubó la mezcla en hielo por 30 minutos, luego 90 segundos a 42°C e inmediatamente se coloca en hielo por 5 minutos. Se adicionan 950 μ l de LB sin agente selectivo y se incuba 1 hora a 37 °C. Las bacterias se centrifugan a 3000g por 2 minutos. Las células transformadas se seleccionaron sembrando 50-100 μ l de suspensión bacteriana en medio LB sólido suplementado con los agentes selectivos correspondientes luego de una incubación de 24 h a 37°C.

2.3.4. Transformación de células competentes de *A. tumefaciens*

Los distintos vectores binarios obtenidos fueron clonados en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90) mediante la técnica de electroporación. Se dejó descongelar un tubo *Eppendorf* con 50 µl de bacterias electrocompetentes y se agregó entre 100-250 ng del ADN de interés. Una vez agregado el ADN, la mezcla se mantuvo en hielo por 10 min. Se traspasó la mezcla a una cubeta de electroporación de 0,1 cm previamente enfriada. Se colocó la cubeta en un electroporador (Micro pulser, Bio-Rad) y se dio un pulso a 1,8 kV. Inmediatamente se agregó 250 µl de LB sin agente selectivo y las bacterias se resuspendieron rápidamente y se incubaron durante 2 horas a 28°C con agitación a 250 r.p.m. Las células transformadas se seleccionaron sembrando 50 µl de suspensión bacteriana en medio LB sólido suplementado con gentamicina (50 mg/ml) y rifampicina (50 mg/ml) y el agente selectivo correspondiente al plásmido luego de una incubación de 48 h a 28°C.

2.3.5 Transformación de *Arabidopsis thaliana* mediante *A. tumefaciens* – Floral dip

Se utilizó el protocolo descrito por Zhang *et al.* (2006). Brevemente, a partir de una colonia de GV3101 transformada previamente con la construcción de interés y confirmada su transformación por PCR, se preparó un pre-cultivo de 3 ml que se incubó 48 h a 28°C en agitación a 200 r.p.m. Con el pre-cultivo se inocularon 250 ml de LB suplementado con rifampicina (100 mg/l) y los agentes selectivos correspondientes con la resistencia otorgada por la construcción de interés. Se incubó durante 16 horas en las mismas condiciones. Pasado este tiempo, se obtuvo una D.O. a 600 nm de 0,5-0,8, se centrifugó por 10 min a 4000 g. Luego, las bacterias se resuspendieron en 250 ml de medio de inoculación (5% sacarosa y 0,02% *Silwet L-77* (Lehle Seeds, Texas, EEUU). Las flores de *Arabidopsis* se sumergieron en el medio de inoculación durante 20 segundos y se dejó escurrir el medio de inoculación excedente. Para aumentar la frecuencia de transformaciones, este procedimiento se repitió 2 veces, separadas por un intervalo de 7 días (Weigel and Glazebrook, 2002). Las plantas transformadas se dispusieron en posición horizontal envueltas en papel transparente para conservar la humedad y reparadas de la luz durante 1 día. Luego, se continuó con el crecimiento normal de las plantas hasta cosechar las semillas. La selección de plantas transgénicas se hizo en medio MS 0,5X, agar 1% más el agregado del agente selectivo correspondiente. Para los vectores binarios pMDC84 y pMDC163 se utilizó higromicina 25 mg/ml. La selección se realizó por 4 días en oscuridad. Las plantas transformantes positivas presentaban un hipocótilo largo con respecto a las plantas no transformadas.

3. Material vegetal

3.1. Condiciones de crecimiento

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* fueron esterilizadas usando una solución de lavandina 30% por 15 minutos. Luego se procedió a lavarlas 2 veces con agua grado *Mili-Q* estéril. Las semillas estériles se suspendieron en agua *Milli-Q* y se vernalizaron por 24-48hs a 4°C en oscuridad. Al cabo de este tiempo, fueron puestas en placas cuadradas de 120x120 mm con medio agar 0.8% (Duchefa) con sales Murashige & Skoog (MS) pH 5,8. Las placas se sellaron con cinta microporosa (que permite el intercambio gaseoso), y se colocaron verticalmente en una cámara de cría (*Biocontrol*; con alternancia de dos temperaturas entre un rango de 10 a 45°C, refrigeración por unidad condensadora, iluminación 80-120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{seg}$, con control de fotoperiodo mediante *timer* programable, superficie interna de 1650 x 630 x 520 cm) a 22°C con un ciclo de 16 hs luz/8 hs oscuridad (intensidad de la luz: 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{seg}$). Las plántulas fueron luego transferidas a una mezcla de 3 partes tierra, 1 parte vermiculita, 1 parte perlita y 1 parte turba, más el agregado del fertilizante NITROFOSKA (N: 10%, F: 4%, P: 7%) y puestas a crecer nuevamente bajo un ciclo de 16 hs luz/8 hs oscuridad.

3.2. Líneas mutantes simples de inserción de ADN-T

La mutagénesis con ADN-T se basa en la inserción de un fragmento de ADN por medio de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* que infecta a la planta causando tumores conocidos como "agallas" o "tumores del cuello", que crecen en la zona donde se unen la raíz y el tallo. Esta bacteria es capaz de insertar en el genoma de la planta genes que se encuentran en la región de su genoma denominada ADN-T el cual es un transposón. Mediante técnicas de Ingeniería genética, actualmente se puede modificar este ADN-T de manera de insertar en la planta secuencias de ADN conocidas y de interés. Este tipo de técnicas permitió obtener mutantes insercionales de ADN-T de casi todos los genes de *Arabidopsis thaliana* y permite generar plantas transgénicas con construcciones de interés de estudio.

En diferentes organismos, las mutantes han sido cruciales para descubrir y estudiar funciones génicas. *Agrobacterium* inserta al ADN-T de manera casi aleatoria en el genoma de la planta y al insertarse dentro de las regiones codificantes o regulatorias de un gen, ocasiona su interrupción o alteraciones en su regulación transcripcional. Por ejemplo, si el ADN-T cae en un exón es muy probable que se transcriba el gen, pero trunco dando lugar a un transcripto no funcional que posteriormente va a ser degradado (mutante insercional de ADN-T nula); si cae en alguna zona regulatoria del gen puede desencadenar la inhibición de la transcripción del mismo (mutante insercional de ADN-T nula), pero también la exacerbación de la transcripción. Esto último es debido que hay secuencias en las zonas regulatorias del gen que promueven la represión de la transcripción del gen, si el ADN-T irrumpe estas secuencias, la transcripción del

mismo ya no se encontraría inhibida. Este tipo de estrategia es conocida como mutagénesis no dirigida y existen colecciones de semillas mutantes insercionales para casi todos los genes de *Arabidopsis thaliana* y se puede acceder a estas líneas y estudiarlas mediante genética reversa. Una de estas bases es ABRC *Arabidopsis Resource Center* (ABRC; www.abrc.osu.edu) de la cual se adquirieron la mayoría de las líneas mutantes en esta tesis. Se usó a *Arabidopsis thaliana* Columbia-0 (Col-0) como el genotipo salvaje (WT, *Wild Type*).

Las mutantes simples de inserción de ADN-T *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia-0) empleadas en este trabajo fueron para *PERK5*, SAIL_1148_H05 y WiscDsLox30F06 (*perk5-1* y *perk5-2* respectivamente); para *PERK3*, SAIL_1055_F12 (*perk3-1*); para *PERK4*, SALK_034666C (*perk4-1*); para *PERK6*, SALK_056076C (*perk6-1*); para *PERK7*, SALK_000753 (*perk7-1*); para *PERK11*, SALK_043970 (*perk11-1*) y para *PERK12*, SAIL_324_F02 (*perk12-1*). Para *AGC1.5* se utilizó SALK_076780 (*agc1.5-1*) y para *AGC1.7*, SALK_140378 (*agc1.7-1*). En la **Tabla M1** se muestran los genes analizados en este estudio y las construcciones asociadas a los mismos.

3.2.1. Extracción de ADN

Se realizó la extracción de tejido vegetal de hojas de roseta de plantas crecidas en tierra de aproximadamente de 2 semanas de edad. Se tomaron 2 hojas y se congelaron en nitrógeno líquido en tubos de 1,5 ml. Luego se procedió a moler el tejido dentro del tubo con émbolos de plástico. Una vez que el tejido fue reducido a un fino polvo, se agregó 500 µl de *buffer* de extracción 2X CTAB (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 8.0; 20 mM EDTA) y se incubó el tubo en un baño térmico a 65°C durante 30 minutos. Se centrifugó por 10 minutos a 18000g y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml. Posteriormente se agregó 1 volumen de isopropanol frío y se centrifugó nuevamente por 10 min a 18000g. Una vez centrifugado, se descartó el sobrenadante conservando el pellet. El pellet fue lavado con 500 µl de etanol 70% y centrifugado 5 min a 18000g. Se descartó el sobrenadante obtenido. Se dejó secar el pellet en estufa a 37°C por 5 min y luego fue resuspendido en 30 µl de agua *Mili-Q* (modificado de Weigel and Glazebrook, 2002).

Tabla M1. Descripción de los genes, líneas de ADN-T y construcciones utilizadas en este trabajo.

Gen	Código AGI	Código de polimorfismo ADN-T	Construcciones asociadas (vector)
<i>PERK3</i>	At3g24540	SAIL_1055_F12	pPERK3:GUS (pMDC162)
<i>PERK4</i>	At2g18470	SALK_034666	pPERK4:GUS (pMDC162)
<i>PERK5</i>	At4g34440	SAIL_H05_1148	pPERK5::GUS (pMDC163)
			35S::PERK5-GFP (pMDC84)
			pLAT52::HyPer
	At4g34440	WiscDsLox302F06	
<i>PERK6</i>	At3g18810	SALK_056076	pPERK6:GUS (pMDC162)
<i>PERK7</i>	At1g49270	SALK_000753	pPERK7:GUS (pMDC162)
<i>PERK11</i>	At1g10620	SALK_043970	pPERK11:GUS (pMDC162)
<i>PERK12</i>	At1g23540	SAIL_324_F02	pPERK12::GUS (pMDC163)
			pLAT52::HyPer
<i>perk5-1 perk12-1</i>		doble mutante generada por cruzamiento	
			pLAT52::HyPer
<i>AGC1.5</i>	At3g12690	SALK_076780	
<i>AGC1.7</i>	At1g79250	SALK_140378	
<i>agc1.5-1 agc1.7-1</i>		doble mutante generada por cruzamiento	

3.3.2. Genotipificación

Para la genotipificación de cada línea mutante se diseñaron dos *primers* (Forward y Reverse, F y R respectivamente) específicos para la secuencia flanqueante a la inserción. Los *primers* se diseñaron a partir de las líneas utilizando el software “*iSect primer design tool*” disponible en (SIGnAL; signal.salk.edu, Alonso *et al.*, 2003). Los *primers* LbA1 y Lb1 (*primers* de la inserción) son específicos del borde izquierdo del ADN-T de las líneas SALK y SAIL, respectivamente. Para cada planta se efectuaron dos reacciones de PCR. La primera, con los *primers* F+R pone de manifiesto el alelo salvaje y por lo tanto sólo estará presente en plantas salvajes y heterocigotas. La segunda, con los *primers* F+LbA1 o Lb1, evidencia el alelo que sufrió la inserción, estando presente tanto en plantas homocigotas como heterocigotas para la inserción (**Figura M1 A-B**). La lista de *primers* empleados para el genotipado se encuentran en la **Anexo Tabla1** (ver anexo).

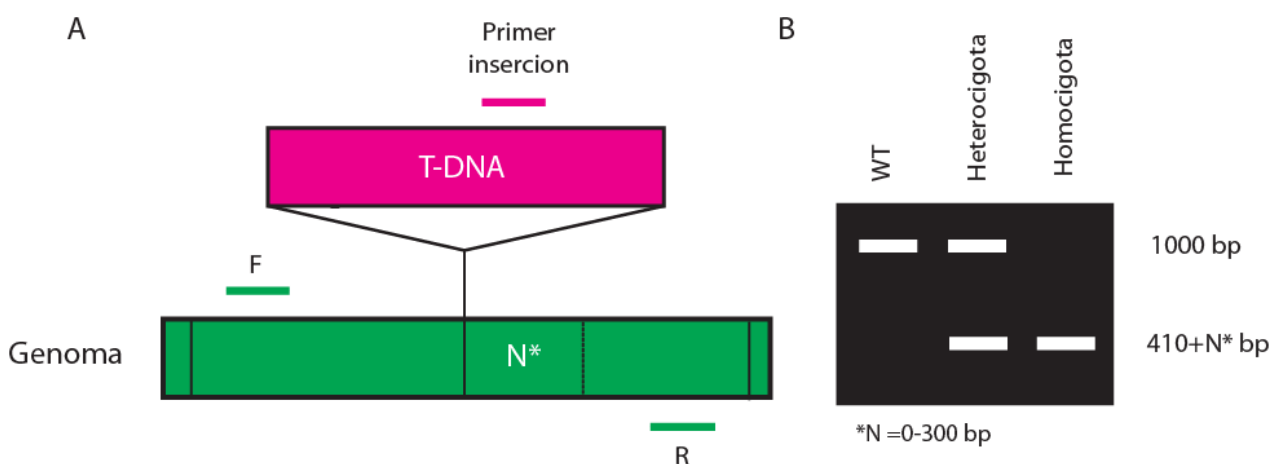


Figura M1. Esquema de los *primers* utilizados en la PCR para determinar las líneas ADN-T homocigotas mutantes. A) Los 3 *primers* utilizados: el F (forward), y el R (reverse) que se anillan en la secuencia del gen, y el primer específico para la inserción que se anilla en la secuencia del transposón. B) Bandas esperadas dependiendo si la planta analizada resulta ser WT, heterocigota u homocigota para la inserción del transposón, en una corrida electroforética en gel de agarosa. N*: Diferencia entre el sitio de inserción y la posición de la secuencia flanqueante.

4. Plásmidos y construcciones

Los clonados realizados en esta tesis fueron realizados siguiendo el esquema detallado a continuación. Las diferencias en las enzimas de restricción, vectores, insertos y agentes de selección se especifican en cada caso.

4.1 Amplificación de secuencias por PCR

Las secuencias se amplificaron con la enzima polimerasa Pfx Platinum (Invitrogen, California, EEUU), de acuerdo al protocolo sugerido y con los *buffers* suministrados. En cada reacción se utilizaron 30-100 ng de ADN como molde, *buffer* de reacción 2X, MgSO₄ 1 mM, dNTPs 300 µM y 0,3 µM de cada *primer forward* y *reverse*, y 1 unidad de ADN polimerasa Pfx Platinum, en 50 µl de volumen de reacción. El ciclado se realizó de la siguiente manera:

Desnaturalización inicial	94°C	5 min
Ciclado 35 ciclos	94°C	30 seg
	Ta	30 seg
	68°C	1min/Kb
Extensión final	68°C	10 min

Esquema de ciclado para reacciones de amplificación por PCR con la enzima polimerasa Pfx Platinum. Ta: temperatura de *annealing*.

Los *primers* se diseñaron con la secuencia específica del inserto más el agregado de los sitios de recombinación AttB para poder emplear el fragmento amplificado en el sistema de clonado Gateway® (sección 4.2). Para el cálculo de la temperatura de *annealing* (Ta), en todos los casos se calculó la temperatura de *melting* (Tm) de cada primer (a través del sitio web www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer) y se utilizó una temperatura de *annealing* 5°C menor que la del primer con menor Tm. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 0,8- 2% p/v dependiendo del tamaño de producto esperado en *buffer* TAE 1x, conteniendo 1 µg/ml de bromuro de etidio para su visualización por exposición a la luz UV en un transiluminador.

4.2. Clonado por recombinación homóloga

Se generaron vectores binarios por recombinación homóloga utilizando vectores del sistema Gateway® y la enzima LR recombinasa (Invitrogen, California, USA), siguiendo el protocolo propuesto por los fabricantes. Esta tecnología consiste como primer paso en la creación de un vector de entrada que contiene el inserto de interés. Este vector de entrada se

puede crear levantando el fragmento mediante PCR. El ligado del inserto con el vector donante (pDONR) es llevado a cabo por un mix de enzimas llamado Clonasa **BP**[®] (por los sitios Att**B** que posee el inserto y los sitios Att**P** que posee el vector que se va a utilizar) que contiene la integrasa del fago λ y el factor de integración en el huésped (Integration Host Factor; *IHF*) de *E.coli*. Una vez generado el vector de entrada se procede a hacer una segunda reacción de recombinación y ligación pero con el vector de destino (PGWB, pMDC, pCAMBIA, etc.). La reacción es catalizada por otro mix de enzimas llamado Clonasa **LR**[®] (por los sitios de recombinación Att**L** del vector de entrada y los sitios Att**R** del vector de destino) que contiene nuevamente la integrasa y la Excisionasa del fago λ , y el *IHF* de *E.coli*. Los vectores de entrada y de destino poseen el gen letal *ccdB*, el cual favorece el muestreo de clones positivos. Una descripción de los vectores binarios de destino está disponible en (Curtis and Grossniklaus, 2003; Nelson *et al.*, 2007). Todos los ADNc amplificados por PCR fueron confirmados por digestión con enzimas de restricción y posteriormente mediante secuenciación (Macrogen; <http://www.macrogen.com>).

En todos los vectores generados se comprobó la presencia del inserto mediante digestión con enzimas de restricción. Se seleccionaron enzimas que con su acción liberasen el inserto.

4.3 Transformación bacteriana

Se transformaron 50 μ l de bacterias *Escherichia coli* DH5 α competentes con 1 ó 2 μ l de la reacción BP o LR. Siguiendo el protocolo de la sección 2.2.3.

4.3.1 Confirmación de clones positivos

Se analizaron al menos 10 colonias de las placas de transformación mediante *PCR colony* con la enzima Taq Polimerasa Recombinante (Invitrogen, Brasil) y los mismos *primers* específicos indicados para amplificar el inserto. Las colonias confirmadas fueron amplificadas mediante cultivo en 3 ml de medio LB líquido con el agente selectivo correspondiente. A partir de los cultivos se realizaron las purificaciones plasmídicas con el Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Wisconsin, EEUU) de acuerdo al protocolo del fabricante. A partir de los plásmidos confirmados purificados, se corroboró la presencia de los insertos de interés mediante digestión con enzimas de restricción (Promega, Wisconsin, EEUU) y electroforesis en gel de agarosa 1%. A partir de los plásmidos confirmados por *PCR colony* y restricción, se corroboró la secuencia de los insertos de interés mediante secuenciación en Macrogen Inc., Corea del Sur (<http://www.macrogen.com>). Los análisis de secuencias obtenidas se realizaron utilizando el sitio web BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

4.3.2. Construcciones empleadas en la tesis

En la **Tabla M1** se muestran las construcciones empleadas en esta tesis. En todos los casos se empleó como agente de selección kanamicina 25 mg/ml.

5. Extracción de ARN

Para el análisis por RT-PCR, granos de polen maduro extraídos de flores de *Arabidopsis* fueron germinados por 5 h y el ARN total fue extraído con el kit RNazol RT (Molecular Research Center, Ohio, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la síntesis de ADNc se utilizó la enzima M-MLV reverse transcriptase (Promega, Wisconsin, EEUU). El gen de la fosfatasa *PP2A* (AT1G69960) fue utilizado como estándar interno. La especificidad de dichos *primers* fue comprobada mediante el *software on-line primer blast* (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). El ciclado para la reacción de PCR fue el siguiente:

Desnaturalización inicial	94°C	4 min
Ciclado 30 ciclos	94°C	20 seg
	57/60 °C	30 seg
	72°C	20 seg
Extensión final	72°C	5 min

La lista de *primers* utilizados se encuentra en la **Tabla A2** (ver anexo).

6. Ensayos fisiológicos

6.1. Análisis de segregación

6.1.1. Auto-cruzamientos

Se realizaron autocruzamientos de plantas heterocigotas *perk5-1*, *perk5-2* y *perk12* y la doble mutante *perk5-1 perk12-1*. Luego se analizó la segregación de la descendencia de dichas plantas mediante reacciones de genotipificación por PCR. El número de plantas analizadas se indican en la **Tabla R1**.

6.1.2. Retro-cruzamientos

Se realizaron cruzamientos entre plantas wild type femeninas (emasculadas 24 horas antes de la polinización manual) y polen heterocigota correspondiente a las simples mutantes y

la doble mutante *perk5-1 perk12-1*. En ambos casos se analizó la segregación de la descendencia F1 por reacciones de genotipificación por PCR. El número de plantas analizadas se indican en la **Tabla R1**.

6.2. Análisis de fertilidad

Se cuantificó el número de semillas por vaina y el largo de las primeras 20 vainas del tallo principal de plantas wild type, simple mutantes *perk5-1*, *perk5-2*, *perk12-1* y la doble mutante *perk5-1perk12-1*. Se analizaron al menos 11 plantas por línea (réplicas). Luego, se colectaron las vainas de cada planta por separado. Se colocaron sobre un portaobjetos con una cinta doble faz, respetando su posición en el tallo de la planta (de izquierda a derecha), y se midió la longitud de cada vaina. A continuación, se decoloraron las vainas con ácido acético:etanol (1:9), se contó el número de semillas de cada vaina, y se tomaron imágenes a fin de poder observar el patrón de distribución de las semillas, utilizando una cámara acoplada a una lupa estereoscópica OLYMPUS SZX7 (Olympus America Inc, Nueva York, EEUU).

6.3. Germinación *in vitro* de polen de *Arabidopsis*

Se empleó el protocolo de germinación de polen de *Arabidopsis* descripto por Boavida y McCormick, (2007). En los experimentos de germinación de polen en medio líquido, se sumergieron 20-25 flores en 150 µl de medio de germinación de polen (MGP) (0,01% H₃BO₃, 5 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄ y 10% sacarosa, pH 7,5) dispuesto en tubos de 1,5 ml. Se agitaron los tubos con las flores por 1 minuto para desprender el polen de las anteras y se incubaron por 3 horas en cámara de cultivo en condiciones controladas de luz y temperatura (iluminación 80-120 µmol/m².seg y temperatura de 22°C). En los experimentos de germinación en medio sólido, se agregó al MGP estándar 1-1,5 % agarosa de bajo punto de fusión. Por cada repetición, se colocaron 30 µl de MGP sobre un portaobjetos, se dejó solidificar, se pinceló con polen de una flor y se incubó por 3 horas en una cámara húmeda en condiciones controladas de temperatura (22°C).

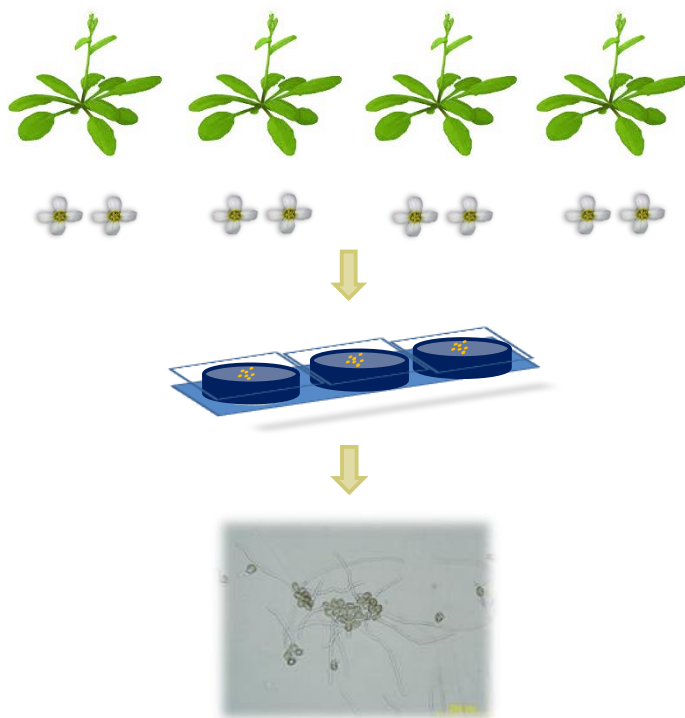


Figura M2. Esquema de la metodología empleada para germinar polen *in vitro*.

Para ambos ensayos de germinación de polen *in vitro* en MGP líquido o semi-sólido, se realizaron al menos 3 réplicas con 4 repeticiones por genotipo. Se tomaron imágenes con un microscopio Olympus DX41 (Olympus America Inc, Nueva York, EEUU) con objetivo 10X. Para cada repetición (polen de 20-25 flores en 150 μ l de MGP líquido o polen de 1 flor dispersado sobre 30 μ l de MGP sólido), se analizó el porcentaje de germinación de al menos 200 granos de polen, utilizando la herramienta Cell counter del *software* ImageJ (Abramoff *et al.*, 2004). Los tubos polínicos con una longitud de 2 veces el diámetro del grano de polen fueron considerados como germinados.

6.4 Mediciones de longitud de tubo polínico

Para los ensayos de germinación de polen *in vitro* en MGP sólido, se realizaron al menos 3 repeticiones por genotipo con al menos 3 réplicas. Para detener el crecimiento de los tubos polínicos y poder medirlos, los portaobjetos se colocaron 5 min a -20°C y se mantuvieron en heladera a 4°C o sobre hielo hasta el momento de analizarlos. Se tomaron imágenes con un microscopio MVX10 *Research Macro Zoom Microscope* (Olympus America Inc, Nueva York, EEUU). Se seleccionaron al azar 80-100 tubos polínicos para cada repetición. Luego, con el *software* ImageJ se midió el largo de los tubos sin considerar el grano de polen. El valor de longitud de tubo polínico para cada repetición se obtuvo del promedio de las 100 mediciones.

Sólo fueron consideradas las repeticiones para las cuales se pudieron medir al menos 100 tubos polínicos.

6.5 Tinción de tubos polínicos *in vivo* con azul de anilina

Se tiñeron los tubos polínicos con azul de anilina (AA) que permite visualizar la calosa presente en la pared celular, de acuerdo al protocolo descrito por Mori *et al.* (2006). Brevemente, se colocaron pistilos (emasculados 24 horas antes de la polinización manual) de las primeras 10 flores del tallo principal luego de 3 y 12 de polinización en un tubo de 1,5 ml con 500 µl de solución de fijación (ácido acético:etanol, 1:3) durante 2 horas a temperatura ambiente. Los pistilos se rehidrataron con series de etanol 70%, 50%, 30% y finalmente con agua destilada durante 10 min cada uno. Luego, se procedió al tratamiento alcalino con 1ml de NaOH 8M durante toda la noche. Al día siguiente se realizó un lavado con agua destilada durante 10 min a temperatura ambiente y se tiñeron los pistilos con 1 ml de solución de azul de anilina (azul de anilina 0.1% m/v en K₃PO₄ 108 mM, pH 11 y glicerol 2%) durante 2 horas en oscuridad. Para su observación, se colocó cada pistilo en un portaobjetos con una gota de solución de azul de anilina y se colocó un cubreobjetos. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de epifluorescencia Olympus DX41 con el filtro UV y los objetivos 10X y 20X.

7. Ensayo de tinción GUS (actividad β-glucuronidasa)

Se realizaron ensayos cualitativos de tinción GUS de pistilos polinizados manualmente, flores auto-polinizadas y plántulas (crecidas 7 días post-germinación en placas de MS 0,5 X agar 0,8%) wild type y transgénicas pPERK3::GUS, pPERK4::GUS, pPERK5::GUS, pPERK6::GUS, pPERK7::GUS, pPERK11::GUS, pPERK12::GUS. Para los ensayos de tinción de pistilos se utilizó el protocolo detallado por Donnelly *et al.* (1999). Brevemente, se polinizaron pistilos wild type, previamente emasculados, con polen de plantas transgénicas pPERK5::GUS, pPERK12::GUS y wild type (control negativo) y se permitió la elongación de los tubos polínicos 16:8 (L:O) a 22°C. Los pistilos fueron escindidos y fijados (90% acetona, 20 min, 4°C) y teñidos con X-Gluc (0,5 mg/mL ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-glucurónico en dimetil sulfoxido, 3 mM ferrocianuro de potasio, 3 mM ferricianuro de potasio y 50 mM NaH₂PO₄ pH 7.0) por 24h a 37°C en oscuridad. Los pistilos teñidos fueron tratados con hidrato cloral hasta alcanzar la decoloración total y finalmente fueron montados en glicerol tomándose imágenes con una cámara acoplada a una lupa OLYMPUS SZX7.

8. Medición de ROS mediante H₂DCFDA.

Para la medición de especies reactivas de oxígeno (ROS) totales citoplasmáticas se utilizó la molécula 2',7'-Diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA, Sigma, Missouri, EEUU). Esta molécula es permeable a la pared celular y membrana plasmática. Se trata de una forma de fluoresceína reducida químicamente que se utiliza como indicador de ROS en las células. Una vez que entra en la célula se disocian los grupos acetato por parte de las esterasas intracelulares imposibilitando su salida de la célula y al entrar en contacto con ROS la sonda se oxida y en consecuencia la molécula H₂DCFDA no fluorescente se convierte en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), que es altamente fluorescente, siendo excitada a 488nm y emitiendo en el rango de 517–527. Esta sonda no es reversible, no es radiométrica y es oxidada inespecíficamente por todas las diferentes especies reactivas de oxígeno.

Se germinaron tubos polínicos de *Arabidopsis thaliana* (WT Col-0 y mutantes) en medio semi-sólido sobre un portaobjetos, en una cámara húmeda a 19-23°C con luz continua durante 3 h. En oscuridad, se adicionaron 20 µl de H₂DCFDA 50µM y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las imágenes fueron obtenidas mediante el uso de un microscopio de epifluorescencia Zeiss *Imager A2* (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania). El objetivo utilizado fue 10X, 0.3 de apertura numérica y el tiempo de exposición fue 80-500ms. Las imágenes se analizaron utilizando el programa *ImageJ*. Para medir los niveles de ROS, se seleccionó una región circular de interés (ROI) dentro del citoplasma del ápice del tubo polínico y se calculó la media de las intensidades de los píxeles incluidos en el ROI. Los valores reportados son la media ± SEM.

9. Medición de H₂O₂ mediante el biosensor HyPer

Alternativamente para la medición de ROS, se empleó el biosensor radiométrico denominado HyPer. Este biosensor fluorescente codificado genéticamente detecta peróxido de hidrógeno (H₂O₂) una de las principales ROS producidas por las células. HyPer fue generado en base a la proteína fluorescente YFP permutada circularmente (YFPcp) e insertada en el dominio OxyR de *E. coli* que sensa H₂O₂. La actividad de este dominio depende de los residuos Cys199 y Cys208 que al estar expuestos a H₂O₂ forman un puente disulfuro, lo que causa un cambio intramolecular. Este cambio modifica el pico de excitación de la YFPcp de 420 a 500 nm, mientras que el pico de emisión no es alterado (516 nm). Estas modificaciones son reversibles, por lo que HyPer es empleado para detectar tanto los aumentos como las disminuciones de los niveles de H₂O₂ en células vivas. Para determinar los niveles de H₂O₂ en tubos polínicos en crecimiento se emplearon líneas WT y mutantes que expresaban HyPer bajo el control del promotor de polen LAT52 (Muschietti *et al.*, 1994). Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal Zeiss Meta 510 LSM (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania). La fluorescencia fue adquirida en modo secuencial con excitación a 488 nm y la emisión entre 500-540 nm (F488) y excitación a 405 nm con emisión entre 500-540 nm (F405). Para la cuantificación se

seleccionó una ROI a 5 μm del ápice de cada tubo polínico para cada “*time point*”. Las mediciones radiométricas (F488/F405) se realizaron con el plugin RatioPlus Manager disponible en el software ImageJ 1.47d luego de sustraer el *background*. Para la obtención del *kymograph* se utilizó la extensión específica de *ImageJ: Multiple kymograph*. Para esto se trazó una línea por el centro del pelo radical desde el ápice hacia la base del mismo. Esta extensión compila la señal del biosensor en la línea trazada a través del tiempo y la gráfica una sobre la otra, generando una imagen en donde la primera línea representa la adquisición de la señal en el tiempo 1 y la última en el tiempo final del experimento. Por lo que, el *kymograph* representa de manera colorimétrica (escala de colores utilizada: *FIRE*) los niveles de H_2O_2 en la zona seleccionada (ápice celular) a través del tiempo, ya que este se encuentra representado en el eje Y.

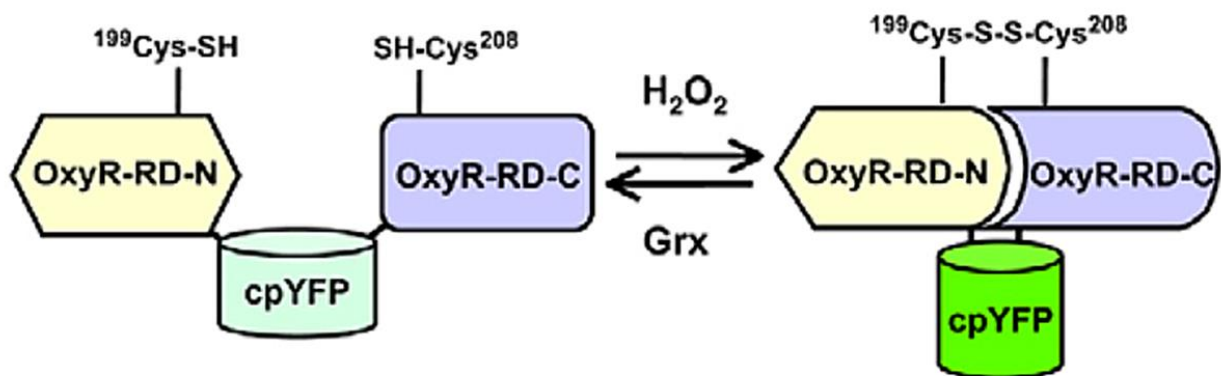


Figura M3: Sensor HyPer. Se observan los dos posibles estados de oxidación del dominio OxyR -RD del biosensor. A la izquierda se observa el estado reducido del mismo con una longitud de onda de excitación de 405nm, a la derecha se observa el estado oxidado y la excitación es a 488nm. Esquema extraído de Belousov *et al.*, 2006.

10. Ensayos de tinción de la pared celular

Para evaluar la composición de polisacáridos en la pared celular de los tubos polínicos realizamos diferentes tinciones. Los granos de polen de plantas WT y mutantes por inserción de ADN-T fueron germinados *in vitro* por 2-3 horas en MGP líquido. Luego fueron incubados con rojo de rutenio (RR) 0.01% (w/v), yoduro de propidio (IP) 30 μM , 5 μl de solución de azul de anilina (AA) o 0.01% Pontamine Fast Scarlet 4B (S4B), 5 minutos antes de tomar las imágenes.

El RR tiñe específicamente pectinas de-esterificadas (no metoxiladas), uniéndose a los ácidos carboxílicos de los homogalacturonanos. El IP tiñe las paredes celulares al competir con el calcio, uniéndose a los grupos carboxilo de los homogalacturonanos. El AA reacciona con los

glicanos que presentan enlaces β -1,3 como la calosa presente en la pared de los tubos polínicos. S4B es un colorante selectivo para polisacáridos con uniones β -1,4 (Anderson *et al.*, 2010). La estructura de este colorante se asemeja a la superficie de los módulos de unión a carbohidratos (CBM) (Boraston *et al.*, 2004) que interactuarían con sus sustratos a través de las cadenas laterales de aminoácidos aromáticos (**Figura M4**).

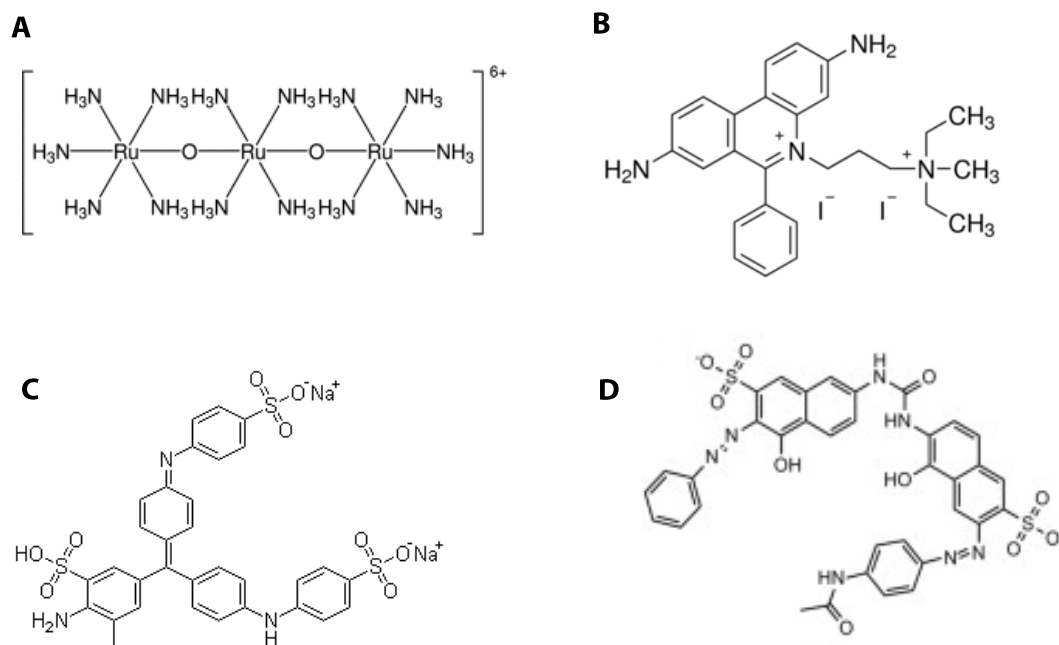


Figura M4. Estructura de los colorantes empleados para teñir la pared celular de los tubos polínicos. A) Rojo de Rutenio (RR); B) Ioduro de Propidio (IP); C) Azul de Anilina (AA) y D) Pontamine Fast Scarlet 4B (S4B).

La adquisición de imágenes de las tinciones con RR fue realizada con un microscopio de epifluorescencia MVX10 Research Macro Zoom Microscope (Olympus), 40X empleando luz blanca. Las imágenes correspondientes al ensayo con IP, S4B y AA fueron tomadas con un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta, objetivo con inmersión de aceite 63X N/A=1,4. Las mediciones fueron realizadas con el software ImageJ 1.47d. La fluorescencia a lo largo de la pared celular que abarca la punta del tubo polínico y la región subapical se determinó usando la función de línea segmentada en ImageJ (con un ancho de línea de 15 píxeles). La fluorescencia integrada se normalizó al perímetro de la región medida. Esta estrategia permite la comparación directa entre tubos polínicos de diferente ancho.

RESULTADOS

1. Análisis de la filogenia de las proteínas PERK

En *Arabidopsis thaliana*, se han identificado 15 *loci* que codificarían para genes *PERKs*. Mediante el análisis de la expresión relativa de los genes *PERK* disponible en la base de datos de Genevestigator (<https://www.genevestigator.com>) pudimos identificar 7 genes *PERK* con alta expresión enriquecida en polen: *PERK3*, *PERK4*, *PERK5*, *PERK6*, *PERK7*, *PERK11* y *PERK12*. Para establecer las relaciones entre las proteínas PERK de *Arabidopsis thaliana* se construyó un árbol filogenético utilizando sus secuencias aminoacídicas completas en el cual las proteínas PERKs presentes en polen maduro y tubo polínico estudiadas en detalle en este trabajo fueron resaltadas en color rojo en la **Figura R1**. Se definieron dos grupos en función de su similitud de proteínas: el primer grupo está compuesto por PERK3, 4, 5, 6 y 7, mientras que un segundo grupo está compuesto por PERK11 y 12. Todas las PERK dentro de estos dos grupos tienen una gran similitud en sus secuencias, aunque el dominio extracelular es su parte más divergente. Los dominios extracelulares de las proteínas PERK contienen motivos similares a extensina (EXT) con regiones ricas en prolina del tipo Ser-Pro₍₃₋₅₎. Se mapearon los motivos Ser-Pro de los dominios extracelulares de las proteínas PERK resultando los motivos Ser-Pro₍₂₋₃₎ los predominantes (**Figura R1**). Las unidades de prolina pueden potencialmente hidroxilarse y O-glicosilarse en cada prolina hidroxilada.

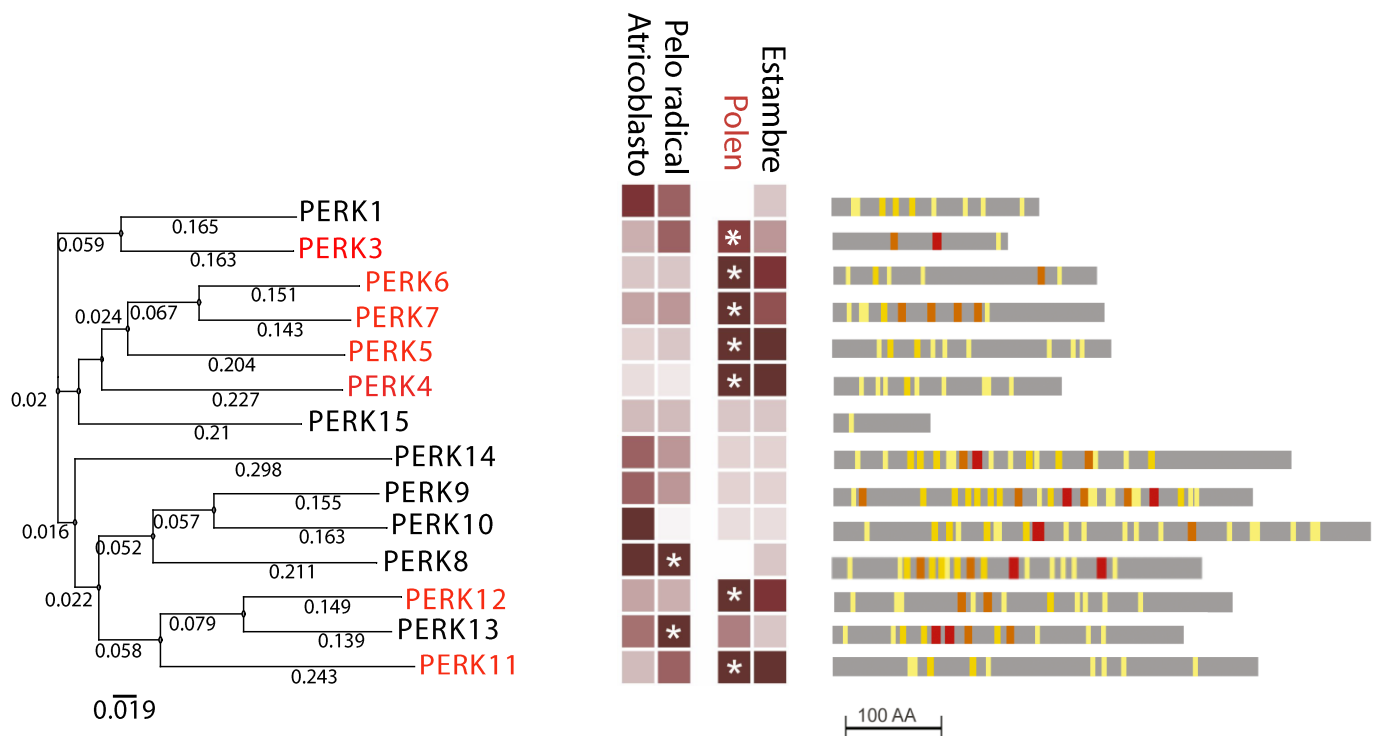


Figura R1. Árbol filogenético de las proteínas PERK1-15 (izquierda) combinado con la expresión relativa (centro) y mapa de los motivos Ser-Pro_n de los dominios extracelulares (derecha). El análisis filogenético fue realizado con MEGA6 (Tamura *et al.*, 2007) mediante el método de Máxima Similitud (*Maximum Likelihood*) (Saitou y Nei, 1987). Los números en los nodos indican los valores de *bootstrap* obtenidos para 1000 iteraciones/réplicas. La escala de distancia representa la distancia evolutiva, expresada como número de sustituciones por aminoácido. Se muestra la expresión relativa de los genes de la familia de las PERKs en *Arabidopsis* en distintos tejidos. Los asteriscos señalan los genes *PERK* con máxima expresión en pelo radical y en polen, ambos tipos celulares que exhiben crecimiento polarizado, de acuerdo a la base de datos del microarreglos de Genevestigator utilizando la herramienta *Meta-Profile Analysis, Anatomy ProfileK*. Los niveles de expresión (en color bordo) son relativos a la expresión máxima de cada gen. Los motivos Ser-Pro_n están representados con diferentes colores: SP₂=amarillo claro; SP₃=amarillo oscuro; SP₄=naranja; SP₅=rojo. Borassi *et al.*, 2015.

2. Análisis *in silico* de la expresión de las PERKs en plantas de *Arabidopsis thaliana*

Utilizando el software de <http://bar.utoronto.ca/eplant> (Winter *et al.*, 2007), se compararon los niveles de expresión *in silico* de estos genes en los distintos tejidos de *Arabidopsis*. De este modo, se generaron pictogramas en los que se pudo visualizar de forma simple los resultados experimentales obtenidos para las muestras empleadas en los microarreglos. De los 15 genes *PERK*, siete se expresan en polen maduro y/o tubo polínico (*PERK3*, *PERK4*, *PERK5*, *PERK6*, *PERK7*, *PERK11* y *PERK12*). En la **Figura R2** se muestran los resultados de la búsqueda para el gen *PERK5* a modo de ejemplo.

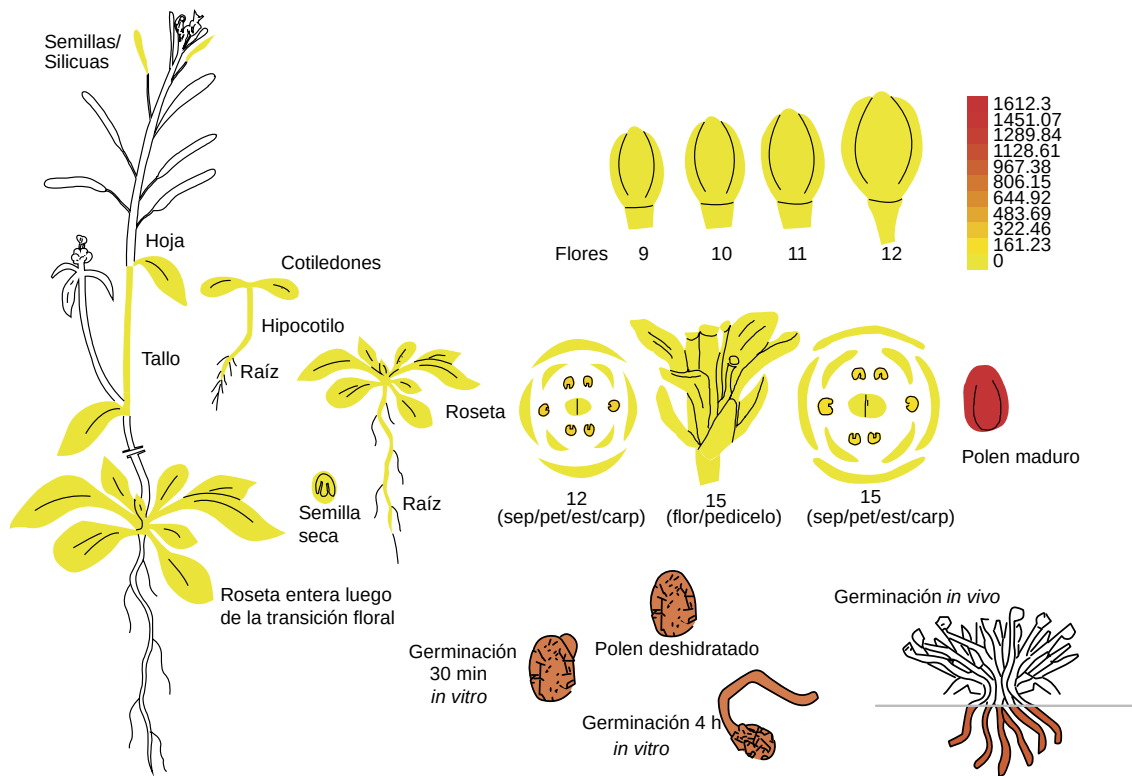


Figura R2. Patrón de expresión del gen *PERK5*. <http://bar.utoronto.ca/eplant> (Winter *et al.*, 2007. PLOS One 2: e718)

Luego, se analizaron en detalle los niveles de expresión de dichos genes *PERK* en microarreglos específicos de polen maduro y tubo polínico (Honys & Twell, 2004; Qin *et al.*, 2009). En la **Figura R3** están representados los datos de expresión colectados de dichos microarreglos empleando la herramienta eFP (*electronic Fluorescent Pictograph*) disponible en <http://www.bar.utoronto.ca/>. Se observó que *PERK4*, *PERK7*, *PERK11* y *PERK12* se expresan en las últimas etapas del desarrollo del grano de polen, mientras que *PERK5* y *PERK6* están presentes durante todo el proceso, con niveles bajos de expresión en las primeras etapas (polen unicelular y bicelular) (Honys y Twell, 2004). Luego se analizó la expresión en las etapas relacionadas con la polinización: polen deshidratado, polen germinado *in vitro* y polen germinado semi *in vivo* (Qin *et al.*, 2009). Se observó que con excepción de *PERK3* cuya expresión se detecta solo en tubos polínicos crecidos semi *in vivo*, todos los genes *PERKs* tienen altos niveles de expresión durante las tres etapas. Estos datos sugieren que las proteínas PERK tendrían un rol importante durante la germinación del grano de polen y/o el crecimiento del tubo polínico.

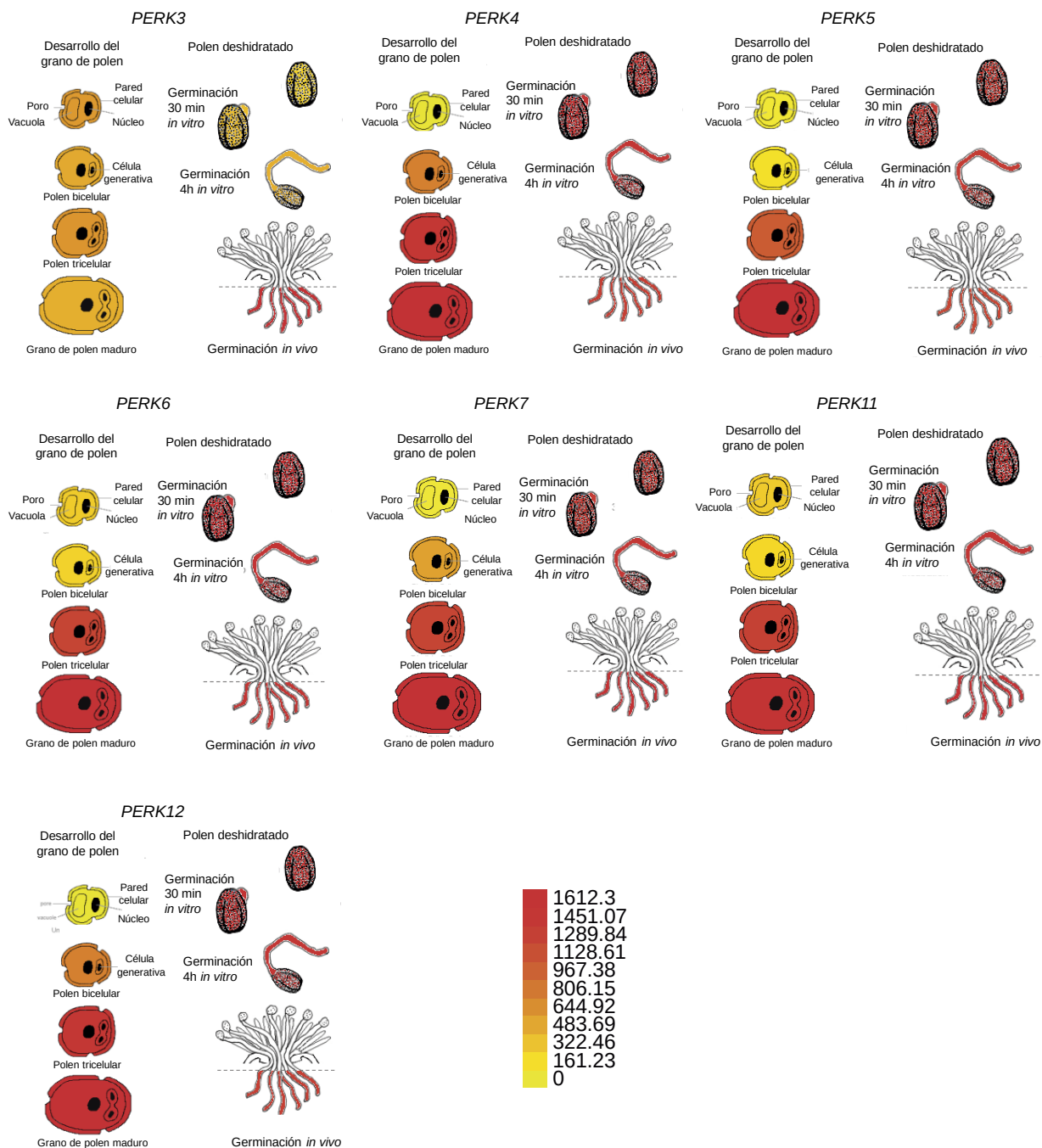


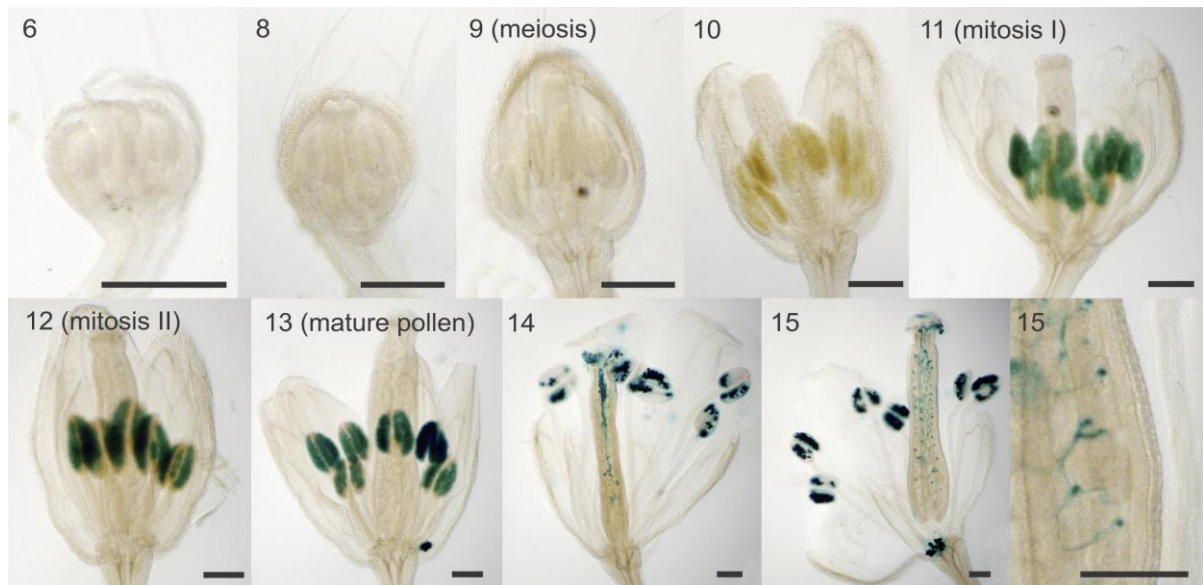
Figura R3. Representaciones pictográficas de los patrones de expresión de los genes *PERK* en diferentes etapas de desarrollo del polen y en los procesos involucrados en la polinización; las mismas fueron generadas a partir de los datos de los microarreglos de Honys y Twell, 2004 y Qin *et al.*, 2009. Se observa la máxima expresión de dichos genes en polen maduro y en tubo polínico.

De estos siete genes *PERK*, tres han sido estudiados previamente: el gen *PERK3* se expresa en polen y en tallo (Nakhamchik *et al.*, 2004; Haffani *et al.*, 2006), *PERK4* se expresa en polen, raíz, inflorescencias, semillas germinadas y cotiledones, y su proteína se localiza en la membrana plasmática (Nakhamchik *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2009a; Bai *et al.*, 2009b), mientras que *PERK12* se expresa en pelos radicales, anteras, polen, tallo y silicuas inmaduras (Nakhamchik *et al.*, 2004; Hwang *et al.*, 2010).

3. Análisis de la expresión de los genes *PERKs*

Con el fin de confirmar los resultados *in silico* obtenidos acerca del patrón de expresión de los genes *PERK*, se llevaron a cabo ensayos de actividad glucuronidasa (GUS) dirigidos por los promotores de los siete genes (**Figura R4A; Figura R5A; Figura R6**). Las putativas regiones promotoras (2kb río arriba del codón de inicio) de los genes *PERK* fueron fusionadas río arriba al gen reportero GUS. Se introdujeron dichas construcciones en plantas WT mediante transformación con *Agrobacterium tumefaciens*. Se obtuvieron líneas independientes para cada uno de los promotores *PERK* (pPERK3::GUS líneas 2 y 3; pPERK4::GUS líneas 1, 2 y 4, pPERK5::GUS líneas 5 y 6; pPERK6::GUS líneas 3 y 4; pPERK7::GUS líneas 1 y 2; pPERK11::GUS líneas 2, 5 y 7; pPERK12::GUS líneas 2 y 6). En la generación T2, en flores transgénicas se observó actividad GUS en los granos de polen en desarrollo en anteras de flores de estadio 11-15 (Cecchetti *et al.*, 2008). También fue observada actividad GUS en granos de polen adheridos a las células del estigma y en tubos polínicos (**Figura R4A; Figura R5A; Figura R6**). No se detectó actividad GUS en estadios tempranos del desarrollo del polen previos a la etapa gametofítica post-meiótica. Asimismo, no se detectó actividad GUS en plántulas de 5 y 10 días crecidas en agar 0,8%, MS 0,5 X y suplementado con su agente selectivo (**Figura R4B; Figura R5B; Figura R6**). Estos resultados concuerdan con los datos de expresión obtenidos de los microarreglos que muestran que estos siete genes *PERKs* se expresan en polen maduro y en tubo polínico.

A

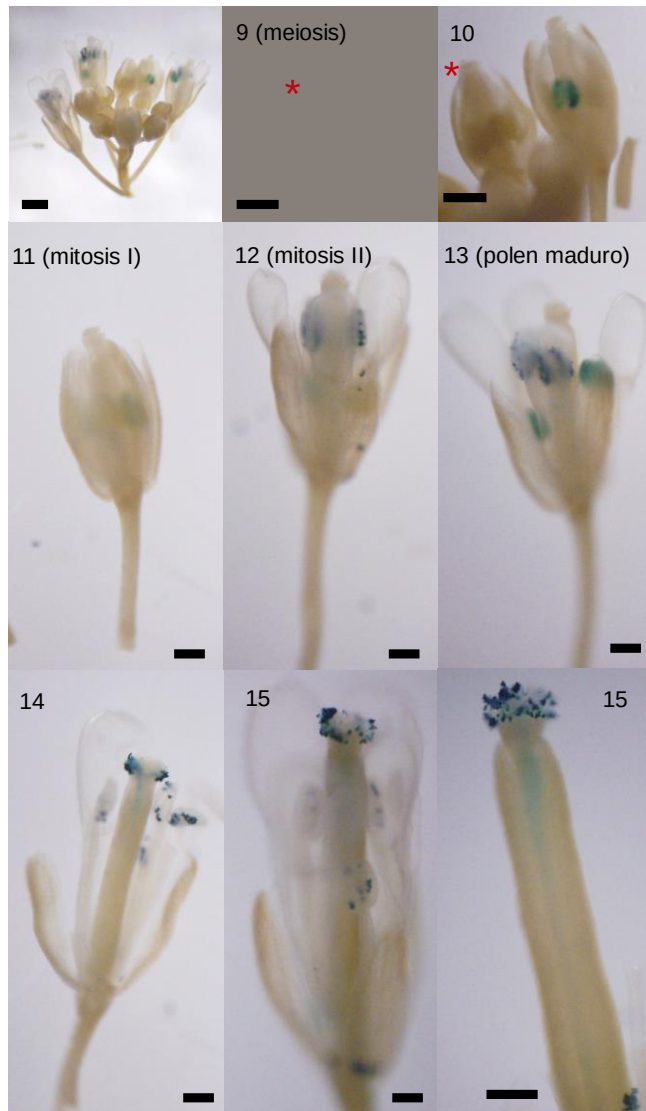


B



Figura R4. Actividad GUS en polen de plantas transgénicas homocigotas para la construcción *pPERK5::GUS*. A) La actividad GUS en plantas transgénicas *pPERK5::GUS* fue examinada antes (estadios 6-12) y después (estadios 13-15) de la antesis. La actividad GUS fue visualizada a partir del estadio 11 (mitosis I) hasta el estadio 15. El inset en el estadio 15 muestra un tubo polínico que alcanzó el óvulo y descargó el contenido. Escala= 100 μ m. B) Cuando se analizaron plántulas transgénicas *pPERK5::GUS* no se detectó actividad GUS.

A



B



Figura R5. Actividad GUS en polen de plantas transgénicas homocigotas para la construcción pPERK12::GUS. A) La actividad GUS en plantas transgénicas pPERK12::GUS fue examinada antes (estadios 9-12) y después (estadios 13-15) de la antesis. La actividad GUS fue visualizada a partir del estadio 11 (mitosis I) hasta el estadio 15. Los asteriscos rojos señalan la flor que corresponde al estadio indicado en la foto. Escala= 100 μ m. B) Cuando se analizaron plántulas transgénicas pPERK12::GUS no se detectó actividad GUS.

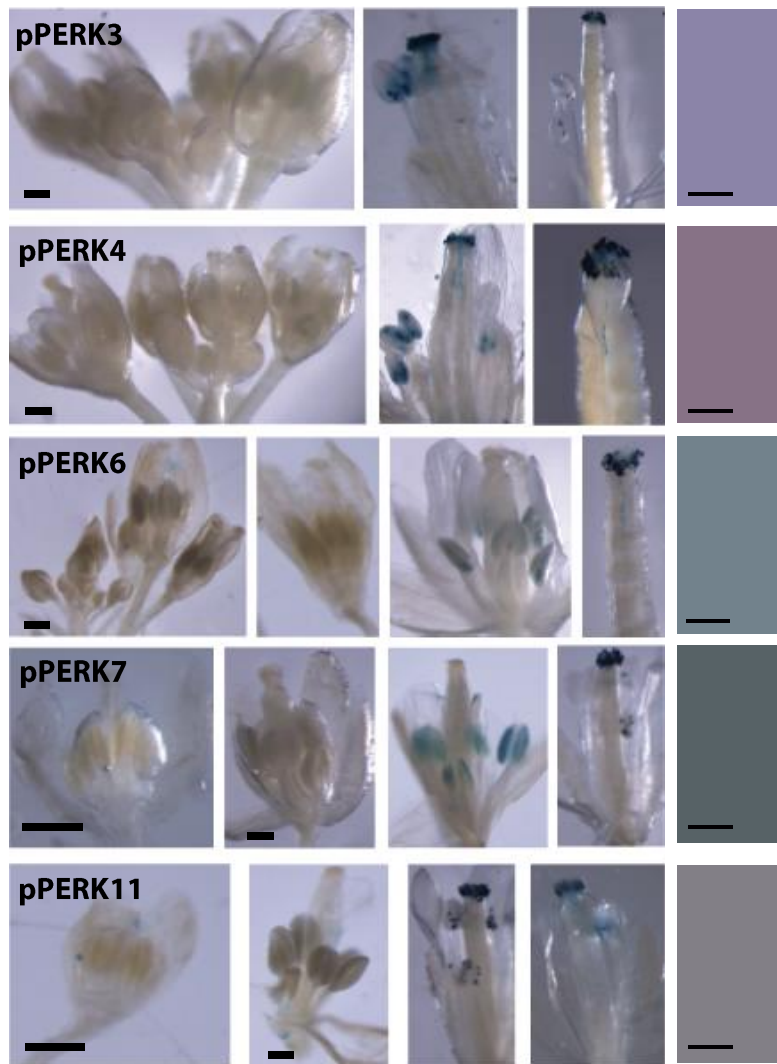


Figura R6. Actividad GUS en polen de plantas transgénicas homocigotas para la construcciones pPERK3::GUS, pPERK4::GUS, pPERK6::GUS, pPERK7::GUS y pPERK11::GUS. La actividad GUS fue visualizada en granos de polen maduro y en tubos polínicos creciendo a través del estilo. A la derecha de la figura se pueden observar las fotos correspondientes a las plántulas de cada línea transgénica en las cuales no fue detectada actividad GUS. Escala= 100 μ m.

4. Análisis de las mutantes de ADN-T de las PERKs con expresión en polen

Para determinar si las siete PERKs que se expresan en polen están involucradas en los eventos de polinización, se obtuvieron mutantes insercionales de *Arabidopsis thaliana* correspondientes a cada uno de ellas y luego aislamos mutantes homocigotas por autocruzamiento (**Figura R7**). Luego de confirmar la presencia de la inserción en cada una de las líneas mutantes, se procedió a verificar si dicha inserción afectaba los niveles de transcripto de cada uno de estos genes. Mediante RT-PCR fue confirmado que en todos los casos los niveles de transcripto disminuyen significativamente con respecto al WT (**Figura R7**).

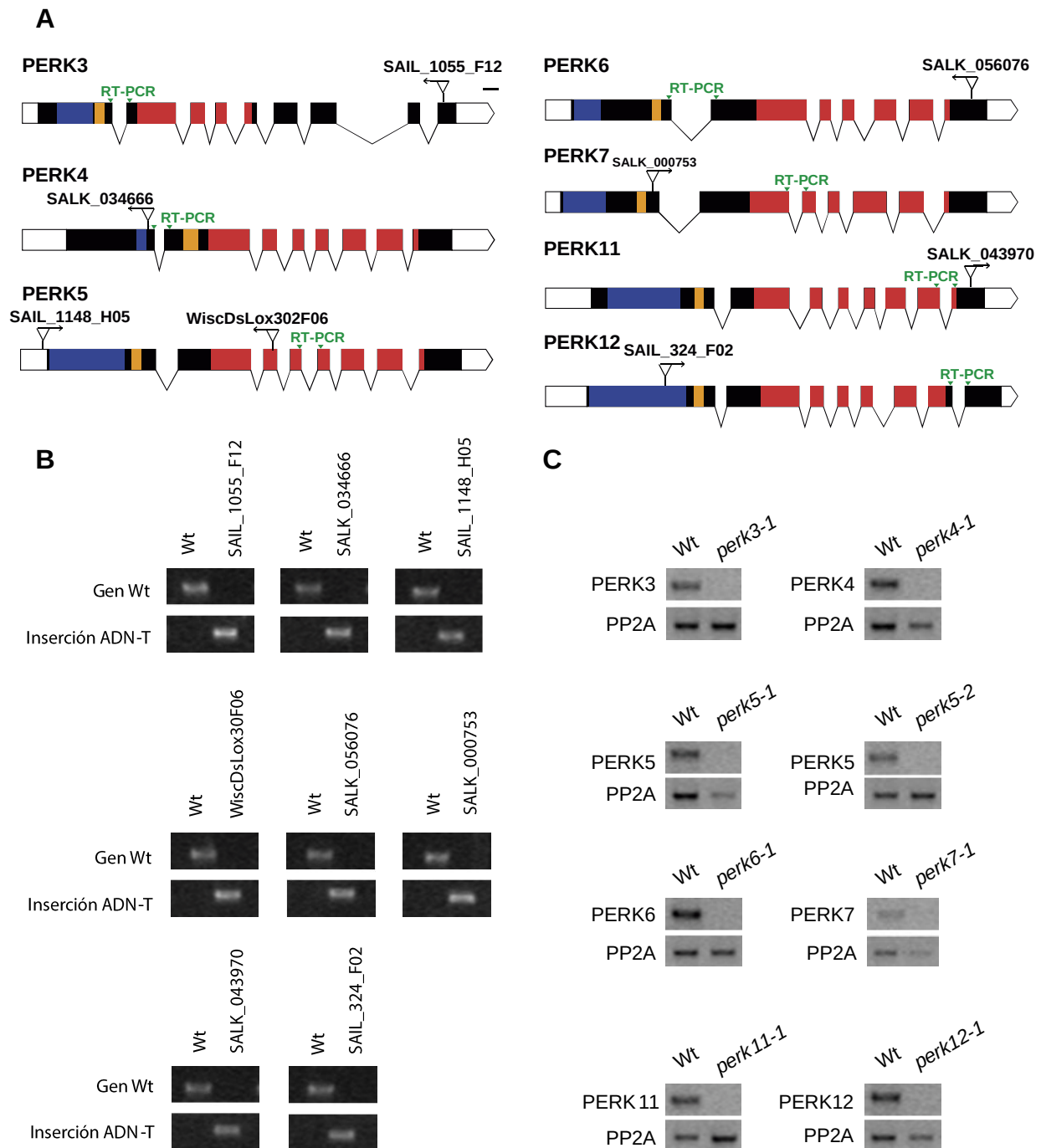


Figura R7. A) Esquema de los genes *PERK3-7* y *PERK11-12* mostrando los dominios extracelulares Ser-Pro (azul), transmembrana (amarillo) y quinasa (rojo). También se indican los intrones (líneas delgadas), los exones (rectángulos) y las posiciones de las inserciones de ADN-T. Barras= 100 pb. B) Confirmación mediante PCR de la presencia de inserciones en las líneas mutantes *perk3-1* (SAIL_1055_F12), *perk4-1* (SALK_034666C), *perk5-1* (SAIL_1148_H05), *perk5-2* (WiscDsLox302F06), *perk6-1* (SALK_056076C), *perk7-1* (SALK_000753), *perk11-1* (SALK_043970), *perk12-1* (SAIL_324_F02). Panel superior: fila 1, con 2 primers específicos para el gen de interés (genes interrumpidos por la secuencia del ADN-T quedan muy largos para ser amplificados por la Taq-polimerasa); fila 2, con un primer específico para la secuencia del ADN-T (LBb1 para líneas SALK y LB3 para líneas SAIL), y otro específico para la secuencia del gen. C) RT-PCR de WT, *PERK3-7* y *PERK11-12*. El ARN fue extraído de tubos polínicos germinados in vitro. PP2A fue utilizado como control interno. Las flechas verdes en (A) representan la región amplificada por los primers utilizados en la RT-PCR. Todos los primers utilizados se encuentran listados en la **Tabla A1**.

Luego, se analizó si las mutantes simples por inserción de ADN-T presentaban algún fenotipo relacionado con defectos en la germinación del grano de polen y/o crecimiento del tubo polínico. En caso de no observar un fenotipo claro y debido a que existen siete PERKS expresadas en polen se planteó obtener múltiples mutantes por cruzamiento. Todas las mutantes simples analizadas presentaron un porcentaje de germinación menor que el WT (WT: 70%, *perk3-1*: 61% *perk4-1*: 54%, *perk5-1*: 55%, *perk5-2*: 60%, *perk6-1*: 58%, *perk7-1*: 64%, *perk11-1*: 57% y *perk12-1*: 62%), pero sólo *perk5-1*, *perk5-2* y *perk12-1* mostraron un fenotipo de tubo polínico más corto (**Figura R8**). Tomando en cuenta que *perk5* y *perk12* fueron las únicas mutantes simples que mostraron diferencias significativas en el largo del tubo polínico, se realizaron cruza para obtener la doble mutante *perk5-1perk12-1*. Esta mostró, al igual que las mutantes simples *perk5* y *perk12*, tubos polínicos más cortos que los del WT y un porcentaje de germinación menor (WT: 69% y *perk5-1 perk12-1*: 59%) (**Figura R9**). Los resultados obtenidos indican que PERK5 y PERK12 son necesarias para el normal crecimiento *in vitro* del tubo polínico aunque su efecto no es aditivo. También obtuvimos las mutantes dobles: *perk4-1 perk7-1*, *perk6-1 perk7-1*, *perk6-1 perk11-1* y *perk7-1 perk11-1*. Las combinaciones elegidas para generar las dobles mutantes se realizaron en base a la cercanía en la filogenia y a los niveles de expresión en polen maduro. En las nuevas mutantes dobles analizadas no se detectaron diferencias significativas en el crecimiento del tubo polínico, si bien en todos los casos el porcentaje de germinación sí se vio afectado, aunque no significativamente para la doble mutante *perk7-1 perk11-1* (WT: 75%, *perk4-1 perk7-1*: 60%, *perk6-1 perk7-1*: 58%, *perk6-1 perk11-1*: 63% y *perk7-1 perk11-1*: 71%) (**Figura R10**). Luego de este ensayo se decidió continuar el trabajo analizando las mutantes simples *perk5-1*, *perk5-2*, *perk12-1* y la doble mutante *perk5-1 perk12-1*.

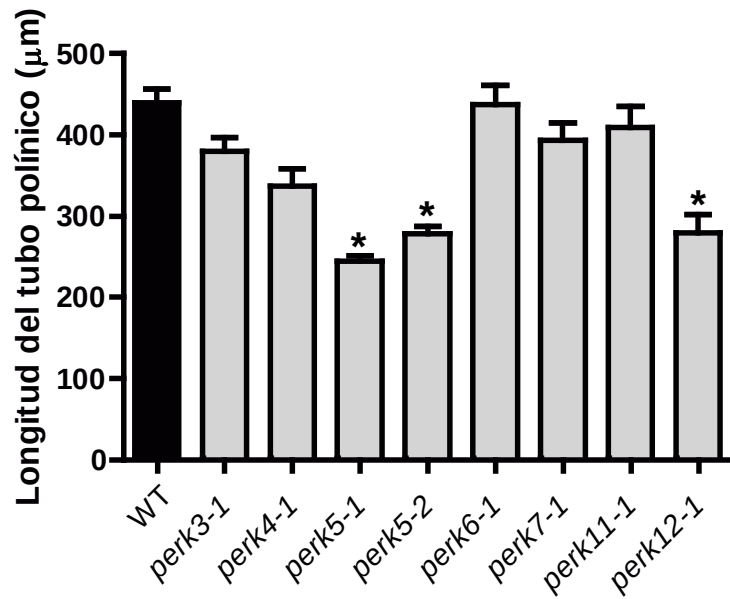


Figura R8. Cuantificación de la longitud de los tubos polínicos WT y de las mutantes simples *perk* luego de 3 h de germinación in vitro. Los datos se muestran como la media $\pm$ SEM, (n=10). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del WT de acuerdo al test de ANOVA con $p < 0.05$.

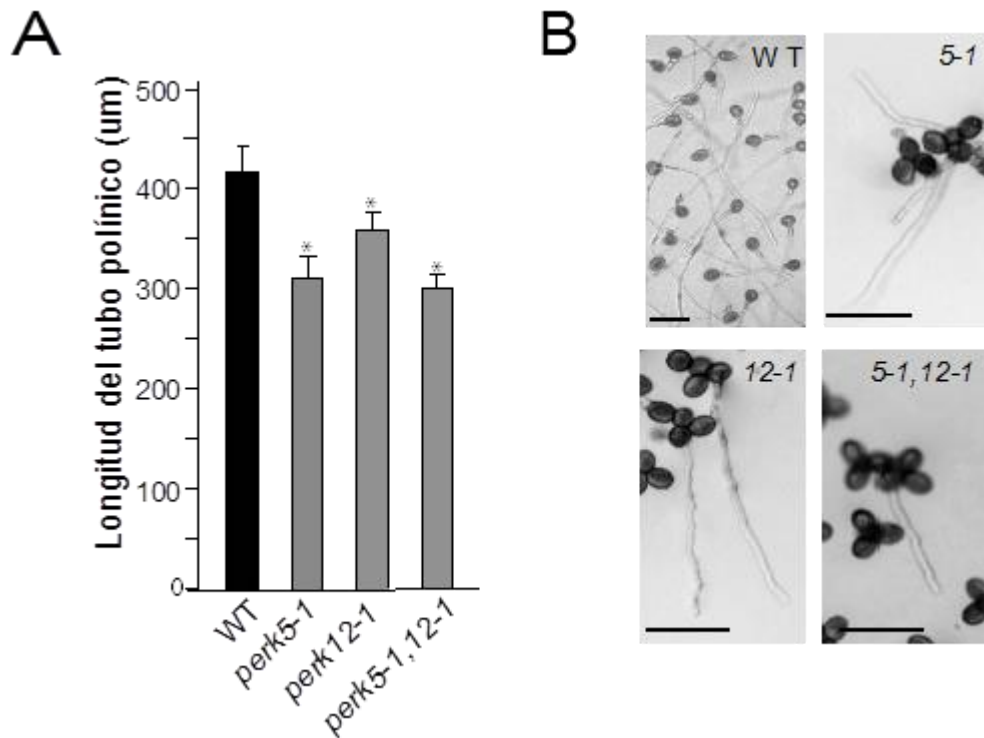


Figura R9. A) Cuantificación de la longitud de los tubos polínicos WT, de las mutantes simples *perk5-1*, *perk12-1* y de la doble mutante *perk5-1perk12-1* luego de 3 h de germinación in vitro. Los datos se muestran como la media $\pm$ SEM, (n=11). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del WT de acuerdo al test de ANOVA con $p < 0.05$. B) Imágenes representativas de las cuantificaciones realizadas en A. Escala= 100 μm.

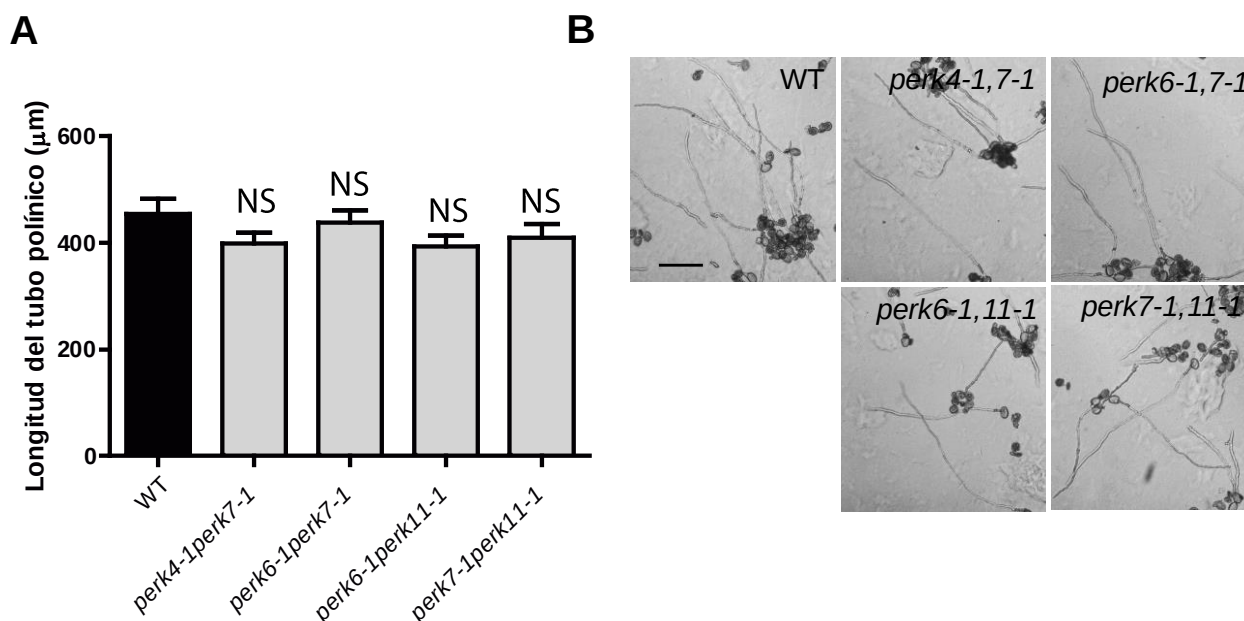


Figura R10. A) Cuantificación de la longitud de los tubos polínicos WT y de las dobles mutantes obtenidas por cruzamiento luego de 3 h de germinación *in vitro*. Los datos se muestran como la media $\pm$ SEM, (n=8). B) Imágenes representativas de las cuantificaciones realizadas en A. Escala=100 μm .

En una segunda instancia, se realizaron ensayos para establecer la cinética de crecimiento de los tubos polínicos *in vitro*. para determinar la velocidad de crecimiento de los tubos polínicos se graficó su longitud en función del tiempo (**Figura R11A**). El análisis de la cinética del crecimiento de los tubos polínicos indica que las mutantes simples *perk5-1*, *perk12-1* y la doble mutante *perk5-1 perk12-1* (*perk5-1*_{vel} = 180,2 $\mu\text{m/h}$; *perk5-2*_{vel} = 217,9 $\mu\text{m/h}$; *perk12-1*_{vel} = 173,4 $\mu\text{m/h}$ y *perk5-1 perk12-1*_{vel} = 143,1 $\mu\text{m/h}$) crecen a menor velocidad que el WT (WT_{vel} = 325,7 $\mu\text{m/h}$). Esto explicaría el hecho de que luego de 3h los tubos polínicos de las mutantes alcancen una longitud final menor que los tubos polínicos WT. Para simplificar, en la **Figura R11B** se muestra la cinética correspondiente a tubos polínicos WT, *perk5-1* y de la doble mutante *perk5-1perk12-1*; mientras que en las imágenes se muestran tubos polínicos representativos de los genotipos WT y *perk5-1*.

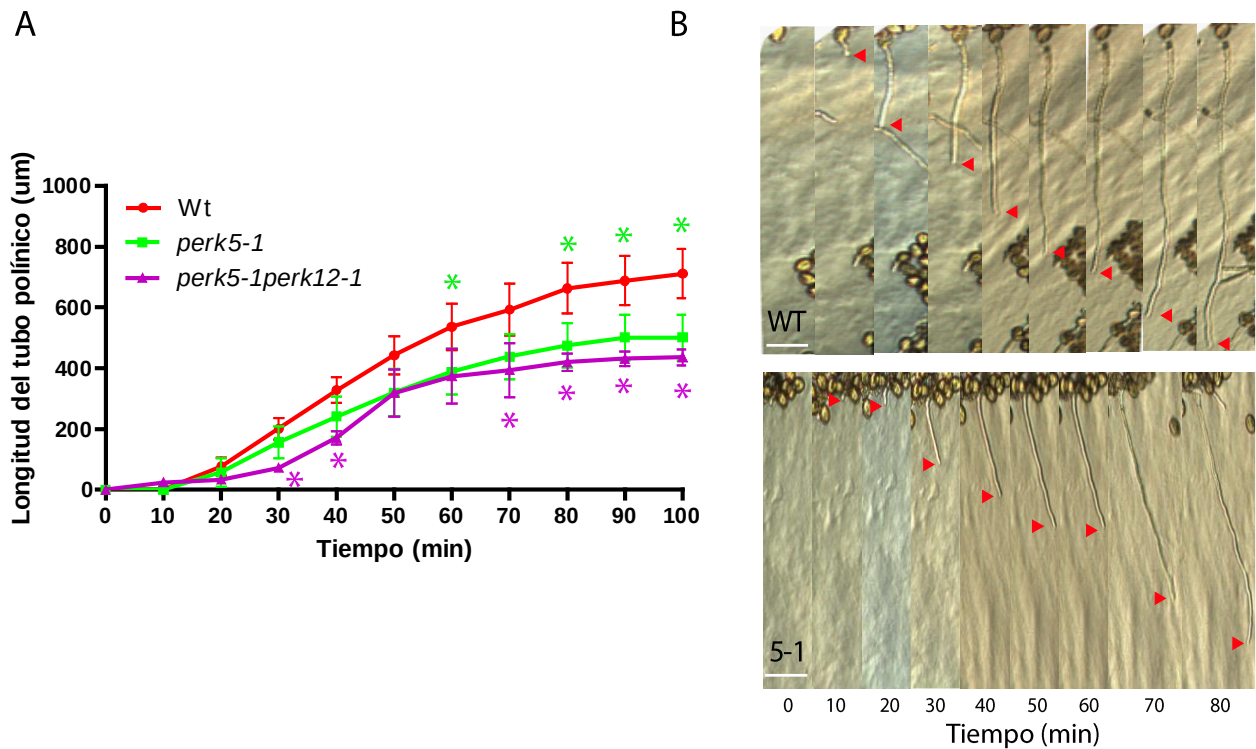


Figura R11. A) Las longitudes se informan para cada tiempo como el promedio de 20 tubos polínicos. Los valores se reportan como la media $\pm$ SEM y los asteriscos representan diferencias significativas respecto del WT de acuerdo a un test ANOVA de 1 factor, $p < 0,05$. B) Imágenes representativas del análisis de la cinética de crecimiento del tubo polínico in vitro, para el WT y la mutante *perk5-1*. Escala = 100 μ m.

En otra aproximación para estudiar el rol de *PERK5* y *PERK12* en la polinización, realizamos ensayos de germinación semi *in vivo*. En dichos ensayos los pistilos son polinizados manualmente con polen WT o polen mutante y luego estigma y estilo son escindidos de la planta y colocados en medio de germinación de polen semi-sólido. Como puede observarse las diferencias en la longitud de los tubos polínicos sólo son significativas en los casos en los que se utilizó polen proveniente de plantas mutantes (**Figura R12**). Esto concuerda con los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*.

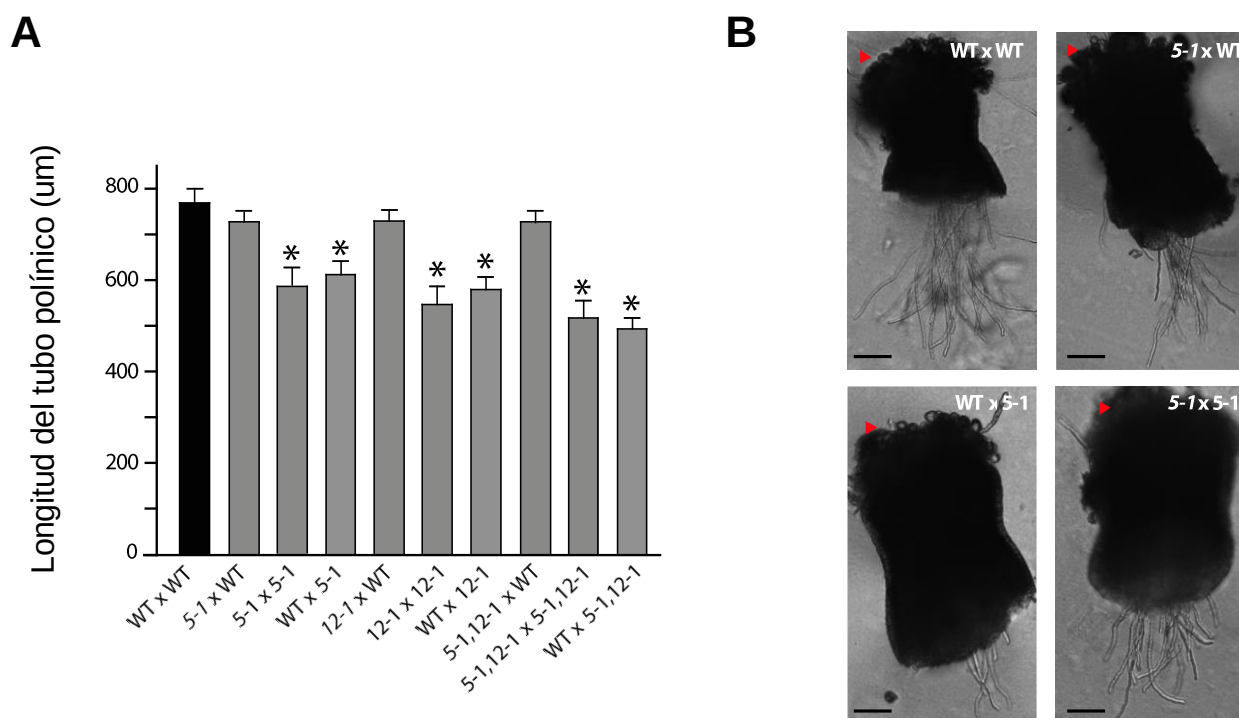


Figura R12. A). Cuantificación de la longitud de los tubos polínicos que emergen de los pistilos. Los valores se reportan como la media $\pm$ SEM y los asteriscos representan diferencias significativas de acuerdo a un test ANOVA de 1 factor, $p < 0,05$. (Las cruces se presentan como pistilo x polen). B) Imágenes representativas del ensayo de germinación semi in vivo. Escala = 100 μ m.

Por último, se realizó el ensayo de polinización *in vivo* para evaluar el crecimiento de los tubos polínicos en los pistilos. En este ensayo se emplea azul de anilina para visualizar la calosa presente en la pared celular de los tubos polínicos. Se analizó luego de 3 h el crecimiento de tubos polínicos en pistilos WT polinizados manualmente con polen mutante y viceversa. También se realizó este mismo ensayo con pistilos autopolinizados estudiando el crecimiento de los tubos polínicos luego de 12h. Transcurridas las 3 h el frente de crecimiento de los tubos polínicos WT se sitúa dentro del 60% del pistilo, mientras que cuando se emplea polen de las mutantes simples y de la doble mutante *perk5-1perk12-1* se observa un recorrido significativamente menor (*perk5-1*: 37%, *perk5-2*: 36%, *perk12-1*: 39% y *perk5-1 perk12-1*: 37%) (**Figura R13**). Por otro lado, luego de 12 h los tubos polínicos WT en su mayoría han alcanzado la base del pistilo y fecundado la mayoría de los óvulos (**Figura R14**), mientras que los tubos polínicos mutantes han recorrido una menor distancia. Estos resultados en un contexto *in vivo* concuerdan con los obtenidos *in vitro* y semi *in vivo*, indicando que existe un retraso en el crecimiento de los tubos polínicos de las mutantes simples *perk5* y *perk12-1* simples y de la doble mutante *perk5-1perk12-1* con respecto a los tubos WT.

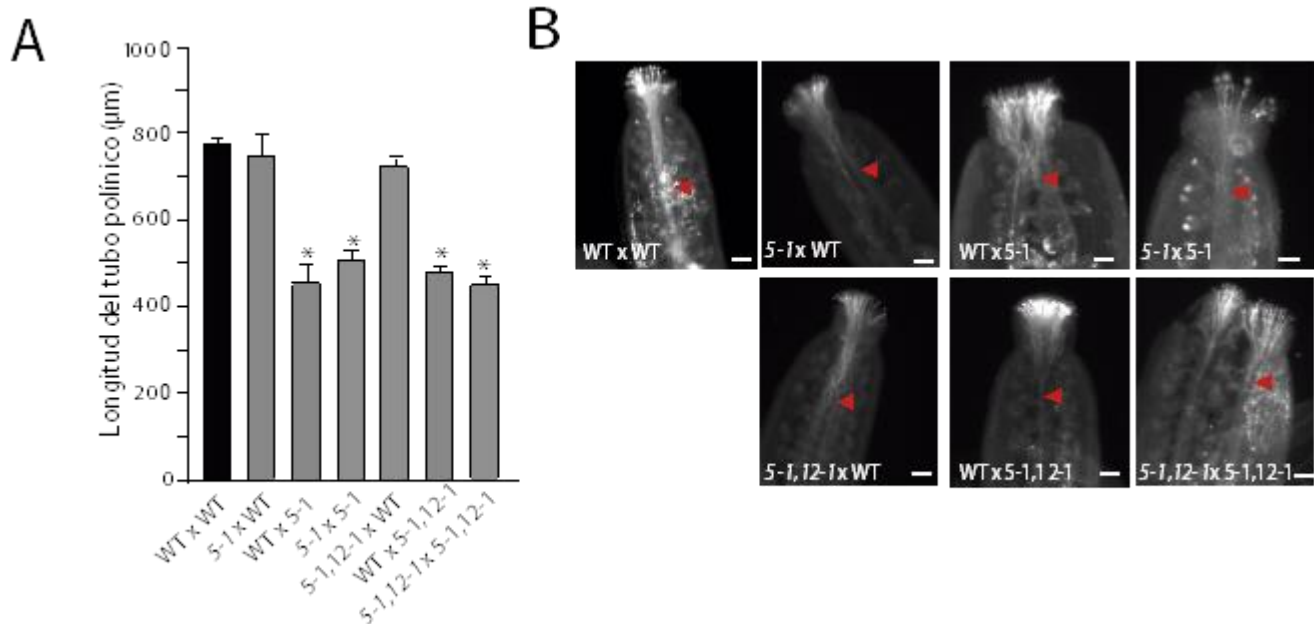


Figura R13. A). Cuantificación de la longitud máxima de los tubos polínicos dentro de los pistilos. Los valores se reportan como la media $\pm$ SEM y los asteriscos representan diferencias significativas de acuerdo a un test ANOVA de 1 factor, $p < 0.05$. (Las cruces se presentan como pistilo x polen). B) Imágenes representativas del ensayo de germinación in vivo. Las flechas rojas señalan el frente de crecimiento de los tubos polínicos luego de 3 h, teñidos con azul de anilina. Escala = 100 μ m.

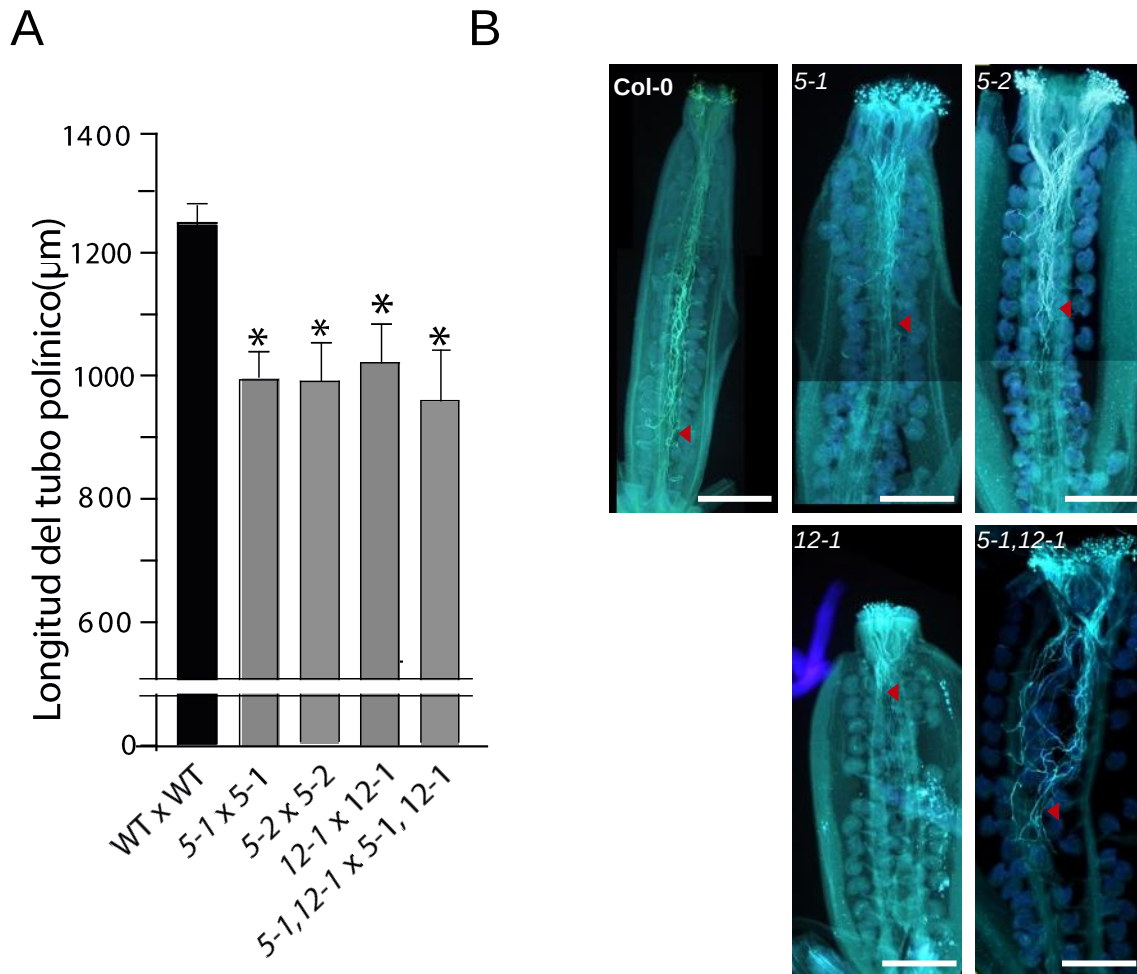


Figura R14. A). Cuantificación de la longitud máxima de los tubos polínicos dentro de los pistilos luego de 12 h de crecimiento. Los valores se reportan como la media $\pm$ SEM y los asteriscos representan diferencias significativas de acuerdo a un test ANOVA de 1 factor, $p < 0,05$. (Las cruces se presentan como pistilo x polen). B) Imágenes representativas del ensayo de germinación *in vivo*. Las flechas rojas señalan el frente de crecimiento de los tubos polínicos que fueron teñidos con azul de anilina. Escala = 500 μ m.

Los resultados obtenidos en los ensayos de germinación (*in vitro* e *in vivo*) y de cinética indican que los defectos observados en el crecimiento del tubo polínico de plantas mutantes *perk5* y *perk12*, pueden deberse a problemas en el desarrollo del polen, a deficiencias en la germinación o a una alteración en el crecimiento de los tubos polínicos a través del estigma y hacia los óvulos.

5. Evaluación de los parámetros de fertilidad en las simples mutantes *perk5-1*, *perk5-2*, *perk12-1* y en la doble mutante *perk5-1 perk12-1*

5.1. Análisis de segregación

Con el objetivo de determinar los parámetros de fertilidad en las distintas mutantes simples y en la doble mutante *perk5-1perk12-1* se hicieron análisis de segregación. En primer lugar, se analizó la segregación en los autocruzamientos de plantas mutantes simples heterocigotas *perk5-1*, *perk5-2* y *perk12-1* (**Tabla R1**). Los resultados muestran que para todos los casos el número de plantas homocigotas mutantes obtenido es significativamente menor al esperado.

Luego, se realizaron retrocruzas de pistilos WT polinizados con polen heterocigota mutante y viceversa, analizándose la segregación de la descendencia (**Tabla R1**). En los casos en los que se empleó polen heterocigota mutante *perk5-1*, *perk5-2* y *perk12-1*, se observó una desviación significativa de la relación de segregación mendeliana esperada (1:1). Mientras que cuando se utilizó polen WT para polinizar los pistilos heterocigotas mutantes, no se observaron desviaciones significativas. Estos resultados señalan que la segregación anormal observada es debida a defectos en el gametofito masculino y no en el femenino.

Se prosiguió con el análisis de segregación de retrocruzamientos de plantas doble mutante heterocigota para *PERK5* y homocigota para *PERK12* (*perk5-1 +/- perk12-1 -/-*). Se siguió la segregación de los alelos de *PERK5* y se observó una desviación significativa de la relación 1:1 esperada sólo cuando se usó el polen de la doble mutante (**Tabla R1**). Del mismo modo que en las simples mutantes, el defecto en la segregación en la doble mutante está asociado a deficiencias en la transmisión del polen.

Tabla R1. Segregación de auto y retrocruzamientos de las simples mutantes *perk5-1*, *perk5-2* y *perk12-1*, y retrocruzamientos de la doble mutante *perk5-1 perk12-1*. Las diferencias fueron evaluadas con la prueba de Chi-cuadrado (χ^2) * $p < 0,05$. ♀: pistilo; ♂: polen; ns: diferencias no significativas; WT: *wild type*; +/+ : homocigota salvaje; +/-: heterocigota; -/- homocigota mutante.

	♀ X ♂	Genotipo F1	Segregación esperada	Segregación observada	χ^2 p value
Auto-cruzamientos	<i>perk5-1^{+/-}</i> X <i>perk5-1^{+/-}</i>	<i>PERK5^{+/+/-}</i>	1:2:1	82:109:65	*
	<i>perk5-2^{+/-}</i> X <i>perk5-2^{+/-}</i>	<i>PERK5^{+/+/-}</i>	1:2:1	75:99:60	*
	<i>perk12-1^{+/-}</i> X <i>perk12-1^{+/-}</i>	<i>PERK12^{+/+/-}</i>	1:2:1	81:102:70	*
Retro-cruzamientos	<i>perk5-1^{+/-}</i> X WT	<i>PERK5^{+/+/-}</i>	1:1	111:90	ns
	WT X <i>perk5-1^{+/-}</i>	<i>PERK5^{+/+/-}</i>	1:1	108:75	*
	<i>perk12-1^{+/-}</i> X WT	<i>PERK12^{+/+/-}</i>	1:1	88:79	ns
	WT X <i>perk12-1^{+/-}</i>	<i>PERK12^{+/+/-}</i>	1:1	101:82	*
	<i>perk5-2^{+/-}</i> X WT	<i>PERK5^{+/+/-}</i>	1:1	100:86	ns
	WT X <i>perk5-2^{+/-}</i>	<i>PERK5^{+/+/-}</i>	1:1	113:81	*
	<i>perk5-1^{+/-} perk12-1^{+/-}</i> X WT	<i>PERK5^{+/+/-}</i>	1:1	125:103	ns
	WT X <i>perk5-1^{+/-} perk12-1^{+/-}</i>	<i>PERK5^{+/+/-}</i>	1:1	133:91	*

5.2. Análisis del número de semillas

Para continuar con el estudio de la disminución en la fertilidad se analizó el número de semillas por silicua en las mutantes simples *perk5-1*, *perk5-2* y *perk12-1*, y la doble mutante *perk5-1 perk12-1*. Se contó el número de semillas en al menos 200 vainas de 15 plantas por línea mutante, crecidas durante 5 semanas. Para las plantas WT, el número promedio de semillas por vaina fue de $48 \pm 1,02$, mientras que para las plantas mutantes fue de $45 \pm 1,24$ (*perk5-1*), $46 \pm 0,78$ (*perk5-2*), $44 \pm 1,45$ (*perk12-1*) y $43 \pm 1,57$ (*perk5-1 perk12-1*) (**Figura R15**). A pesar de que las diferencias en el número de semillas fueron significativas, no se correlacionan con lo hallado respecto a los parámetros fisiológicos del crecimiento del tubo polínico. Esto podría deberse a que, a pesar de tener un crecimiento más lento, los tubos polínicos de las líneas mutantes llegan de igual manera a fecundar el óvulo, aunque más tarde que las líneas WT.

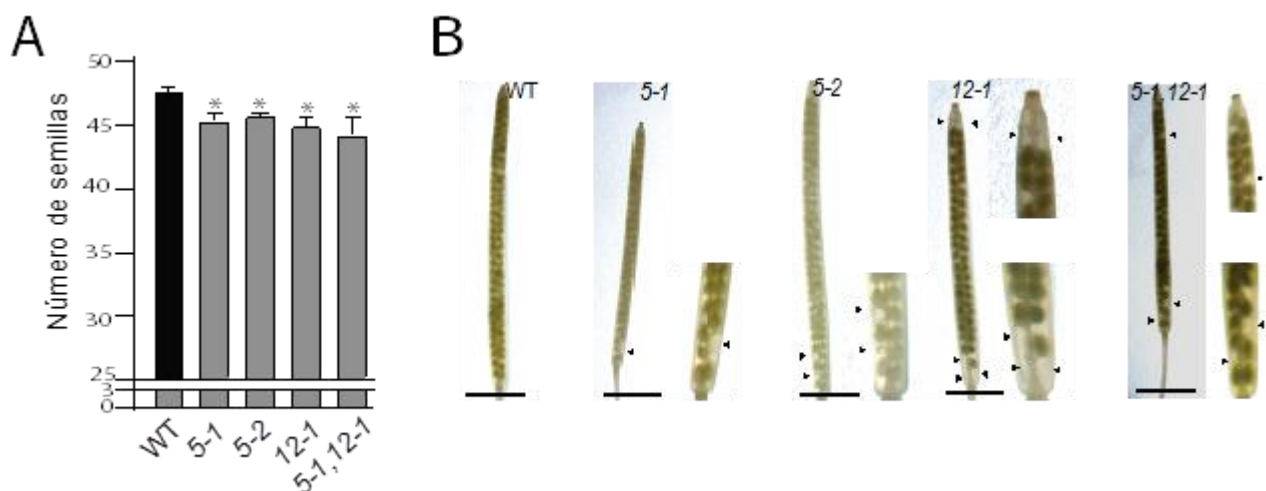


Figura R15. A) Número de semillas por vaina de plantas WT y simples mutantes (n = 15 plantas por genotipo). Se grafican los valores medios $\pm$ SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del WT de acuerdo al test de ANOVA de 1 factor con $p < 0.05$. Escala= 500 μ m. B) Imágenes representativas de las silicuas WT, de las simples mutantes *perk5-1*, *perk5-2*, *perk12-1* y la doble mutante *perk5-1perk12-1*. Las flechas negras señalan la ausencia de semillas a lo largo de la silicua.

6. Localización subcelular de PERK5

Para comprender el rol de las proteínas PERK durante el crecimiento del tubo polínico es importante también conocer su localización subcelular. Estudios previos indican que las proteínas PERKS estarían localizadas en la membrana plasmática (Nakhamchik *et al.*, 2004), pero esto se desconoce experimentalmente para casi todas ellas. Sólo se ha descrito previamente que las proteínas PERK4 (Bai *et al.*, 2009a; Bai *et al.*, 2009b) y PERK13 (Hwang *et al.* 2016) se localizan en la membrana plasmática. Para determinar la localización de PERK5, plantas de *Arabidopsis thaliana* fueron transformadas con la construcción 35S::PERK5-GFP. Se analizaron las células epidérmicas de raíz correspondientes a plantas transgénicas homocigotas para dicha construcción mediante microscopía confocal (**Figura R16**). Los resultados muestran que PERK5 se localiza en los márgenes celulares y co-localiza parcialmente con el marcador de pared celular Ioduro de Propidio.

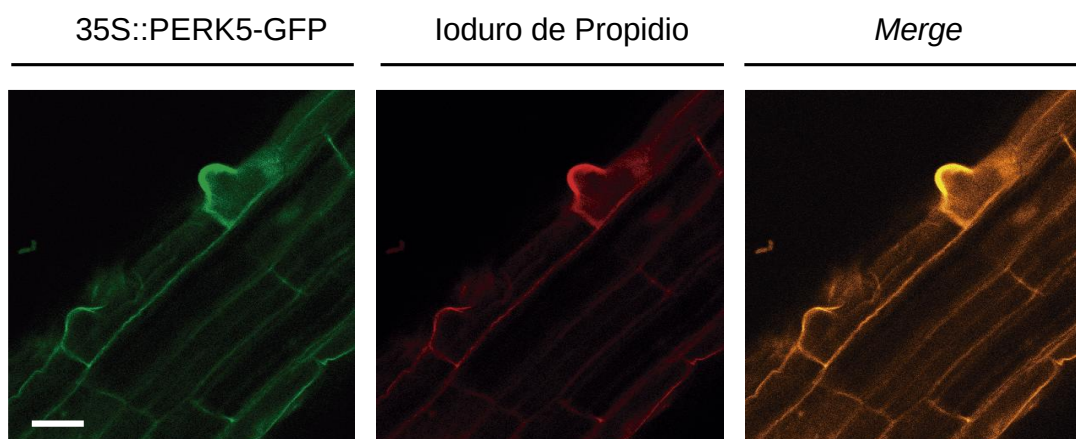


Figura R16. Localización subcelular de PERK5. Imágenes representativas de células epidérmicas de raíz de *Arabidopsis thaliana* expresando PERK5-GFP. El panel de la izquierda muestra la expresión de PERK5-GFP, el panel central muestra la fluorescencia correspondiente al Ioduro de Propidio, y el panel de la derecha muestra la superposición de las imágenes (*merge*), donde la fluorescencia amarilla indica co-localización. Escala: 5 μ m.

7. Ensayos de la integridad de la pared celular utilizando Ioduro de Propidio, Rojo de Rutenio, S4B y Azul de Anilina

Tal como se mencionó en la introducción, el posible rol de las proteínas PERKs como sensores de la integridad y estado de la pared celular podría explicar el fenotipo observado en las mutantes simples y doble. La ausencia de PERK5 y/o PERK12 podría generar un incorrecto ensamblado de la pared celular de los tubos polínicos provocando que estos crezcan más lento que los del genotipo salvaje (WT). Por ello, fueron analizados distintos componentes de la pared celular de tubos polínicos germinados *in vitro* mediante el uso de diferentes tinciones.

En primer lugar, se utilizó la tinción de azul de anilina (AA) que permite visualizar calosa, uno de los principales componentes de la pared celular de los tubos polínicos. El AA se une a polisacáridos que presentan enlaces β -(1,3) y permite visualizar los depósitos de calosa en la pared celular empleando luz UV. Se analizaron tubos polínicos simples mutantes *perk5-1*, *perk12-1* y la doble mutante *perk5-1perk12-1* y no se encontraron diferencias significativas respecto del genotipo WT (**Figura R17**).

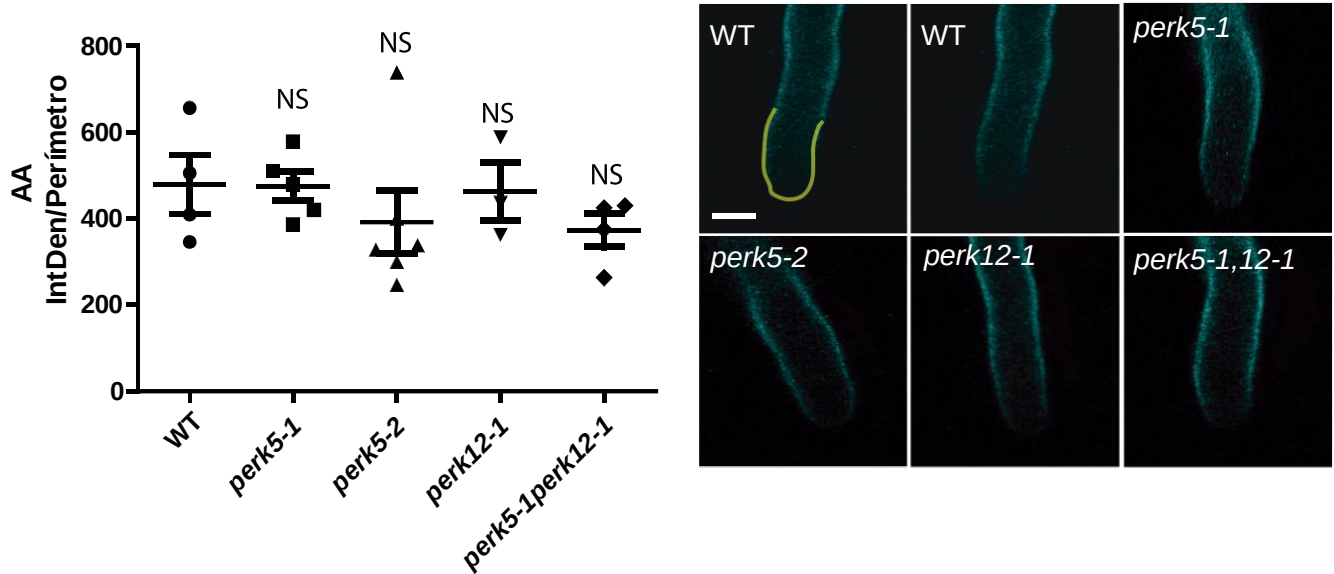


Figura R17. Determinación de calosa mediante AA en la pared celular de tubos polínicos germinados *in vitro*. A) Cuantificación de la calosa presente en las simples y dobles mutantes. B) Imágenes representativas de las cuantificaciones realizadas en A. La línea amarilla indica la zona seleccionada para realizar las mediciones. Escala=10 μ m. NS: diferencias no significativas respecto del WT de acuerdo al test de ANOVA de 1 factor con $p < 0,05$.

El Ioduro de Propidio (IP) se une a los grupos carboxílicos del ácido galacturónico presente en las pectinas de la pared (Rounds *et al.*, 2011). En la **Figura R18** se observa que tanto en las simples como en la doble mutante hay un mayor contenido de homogalacturonanos no metoxilados que en tubos controles. De igual manera, utilizando Rojo de Rutenio (RR) que tiñe pectinas no esterificadas se observó una mayor acumulación de pectinas en el ápice del tubo polínico (**Figura R19**).

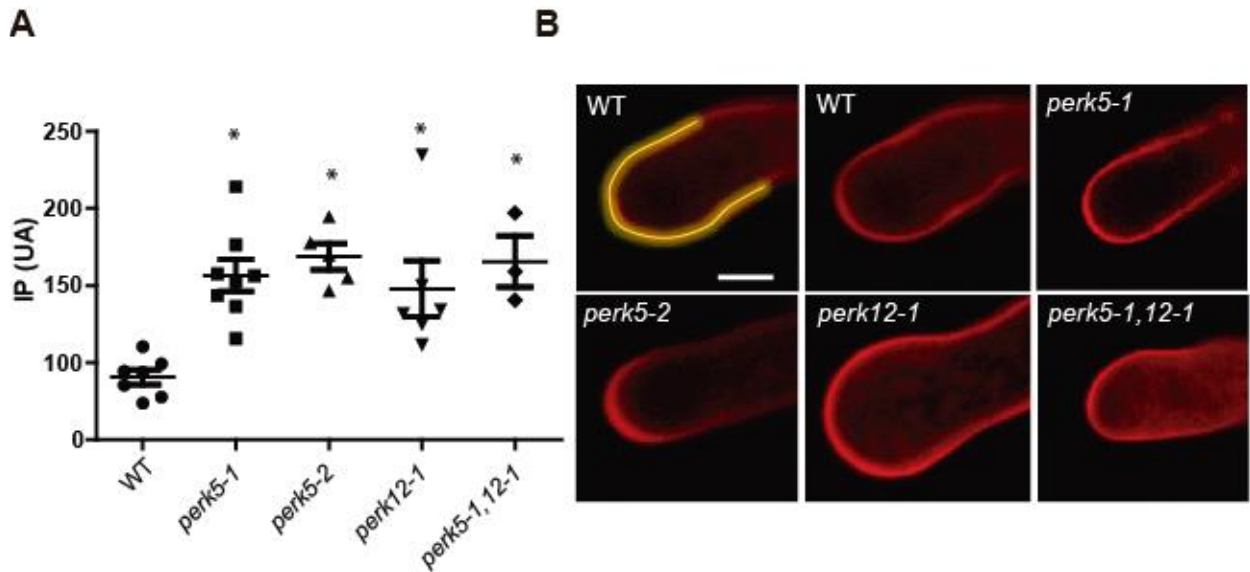


Figura R18. Determinación de pectinas mediante IP en la pared celular de tubos polínicos germinados in vitro. A) Cuantificación de las pectinas presentes en las simples y dobles mutantes. La región delimitada en amarillo ejemplifica el perímetro en el que se midió la fluorescencia para cada tubo polínico. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del WT de acuerdo al test de ANOVA de 1 factor con $p < 0,05$. B) Imágenes representativas de tubos polínicos de *Arabidopsis thaliana* teñidos con Ioduro de Propidio. Escala=6 μ m.



Figura R19. Determinación de pectinas mediante Rojo de Rutenio (RR) en la pared celular de tubos polínicos germinados in vitro. Imágenes representativas de tubos polínicos de *Arabidopsis thaliana* teñidos con RR. Escala=50 μ m.

Estos resultados sugieren que la ausencia de PERK5 y/o PERK12 produciría una acumulación de pectinas en la zona apical y subapical del tubo polínico (Figuras R17 y R18), en

particular pectinas no metiladas. Este bajo nivel de esterificación permitiría que las pectinas se entrecrucen mediante Ca^{2+} , otorgándole rigidez a la pared celular lo que explicaría el fenotipo de tubo polínico corto observado en las simples y doble mutante estudiadas.

La celulosa puede ser visualizada con un colorante específico llamado *Pontamine Fast Scarlet 4B* (S4B) (Anderson *et al.*, 2010). En la **Figura R20** se observa un aumento en el contenido de celulosa en las simples mutantes *perk5-1*, *perk5-2*, *perk12-1* y en la doble mutante *perk5-1 perk12-1* con respecto a plantas WT. Este aumento en la abundancia de celulosa en la pared celular podría explicar en parte el fenotipo presente en las mutantes estudiadas, ya que un mayor contenido de celulosa está asociado con una disminución en la velocidad de crecimiento de los tubos polínicos (Mollet *et al.*, 2013).

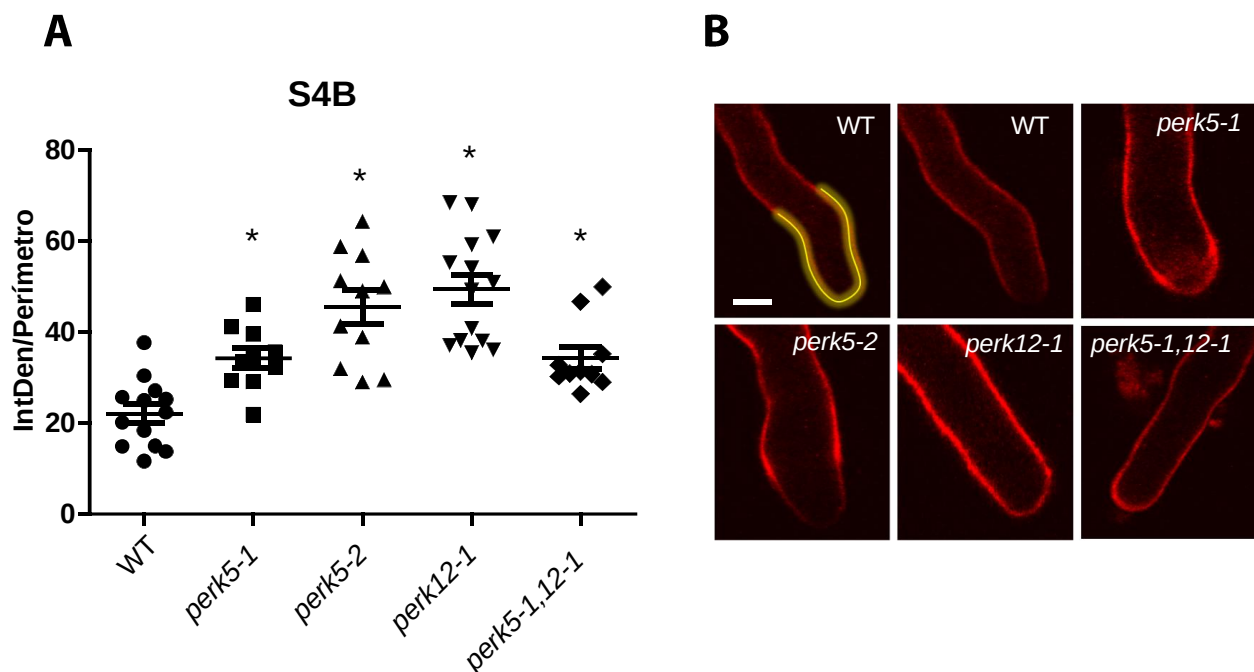


Figura R20. Determinación de celulosa mediante S4B en la pared celular de tubos polínicos germinados in vitro. A) Cuantificación de celulosa presente en las simples y dobles mutantes. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del WT de acuerdo al test de ANOVA de 1 factor con $p < 0,05$. B) Imágenes representativas de tubos polínicos de *Arabidopsis thaliana* teñidos con S4B. La región delimitada en amarillo ejemplifica el perímetro en el que se midió la fluorescencia para cada tubo polínico. Escala= 10 μm .

Todos estos resultados sugieren que en ausencia de las proteínas PERK5 y PERK12 se produce una acumulación de pectinas y celulosa en las paredes celulares de los tubos polínicos. Esto coincide con los resultados obtenidos en los ensayos fisiológicos, ya que un aumento en la rigidez de la pared celular puede ocasionar una disminución en la tasa de crecimiento de los tubos polínicos.

8. Especies Reactivas de Oxígeno

Ha sido descrito previamente que las especies reactivas de oxígeno (ROS) tienen un rol importante en varios procesos durante el crecimiento del tubo polínico: durante la germinación (Speranza *et al.*, 2012), el crecimiento polarizado (Potocký *et al.*, 2007) y la ruptura del tubo polínico en la fertilización (Duan *et al.*, 2014).

Para determinar si PERK5 y/o PERK12 regulan de alguna manera la concentración de ROS en tubos polínicos, empleamos la sonda 2,7-diclorofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA). Esta sonda fluoresce en presencia de ROS y especies reactivas de nitrógeno, tales como óxido nítrico (NO) (Maxwell *et al.*, 1999). Los tubos polínicos de la mutante simple *perk5-1* y de la doble mutante *perk5-1 perk12-1* mostraron niveles de ROS significativamente mayores que los observados en tubos WT (**Figura R21**).

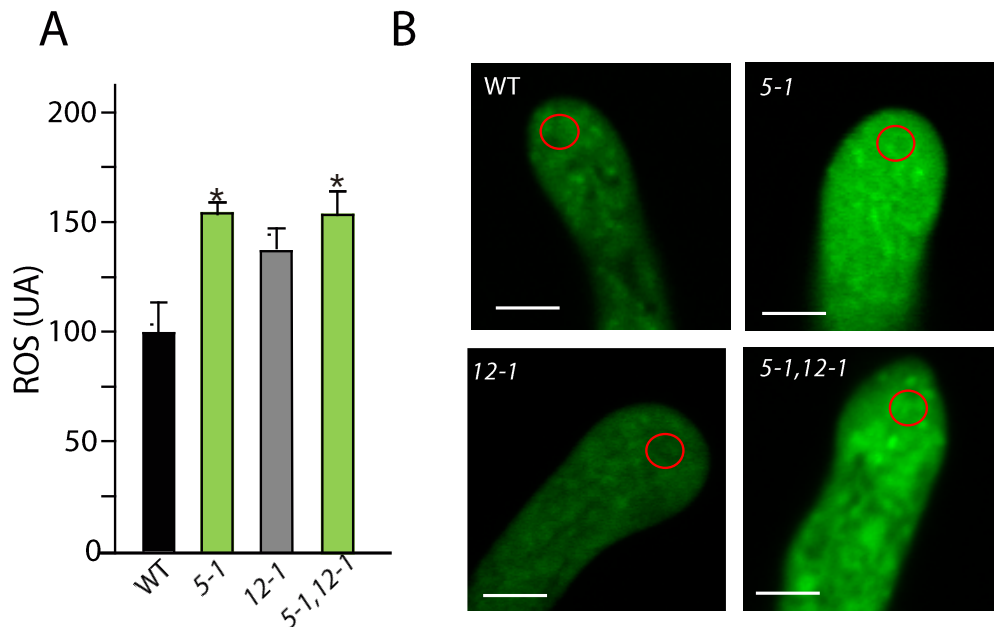


Figura R21. A) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de los tubos polínicos teñidos con H2DCF-DA (n=15). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del WT de acuerdo a un test ANOVA de 1 factor con $p < 0,05$. (B) Imágenes representativas de los tubos polínicos teñidos con H2DCF-DA por 5 minutos. Los círculos rojos señalan el área donde se midió la fluorescencia. Escala 6 μ m. UA: Unidades arbitrarias.

Sin embargo, debido a que la oxidación de la H₂DCF-DA es irreversible y sensible a distintas ROS y a la luz, no es conveniente utilizarla para evaluar la producción de ROS en el tiempo. Para ello utilizamos HyPer que sensa la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en bacterias, animales y células vegetales (Mishina *et al.*, 2013; Hernández-Barrera *et al.* 2015). HyPer consiste en una molécula de YFP circularmente permutada (cpYFP) acoplada al dominio regulatorio OxyR de *Escherichia coli* que sensa H₂O₂ (Costa *et al.*, 2010; Hernández-Barrera *et al.*, 2015). Generamos líneas estables de *Arabidopsis* que expresan HyPer en el fondo genético WT, mutantes simples *perk5-1*, *perk12-1* y la doble mutante *perk5-1 perk12-1* y se midieron los niveles de H₂O₂ en el citoplasma del ápice de los tubos polínicos (**Figura R22**). Se observó que los niveles promedio en las oscilaciones de H₂O₂ en los tubos polínicos en crecimiento de las simples mutantes *perk5-1* y *perk12-1* y en la doble mutante *perk5-1 perk12-1* eran mayores respecto del WT (**Figura R22A y C**). Los *kymographs* de la **Figura R22B** representan de manera colorimétrica los niveles de H₂O₂_{cit} en la zona seleccionada (ápice celular del tubo polínico) a través del tiempo.

Luego, se analizaron si los altos niveles de ROS de los tubos polínicos de las mutantes las hacían más vulnerables al agregado exógeno de ROS, adicionando directamente H₂O₂ al medio de germinación *in vitro*. Se observó que luego de la adición exógena de ROS, los tubos polínicos de la doble mutante *perk5-1 perk12-1* mostraron niveles mayores de H₂O₂ en el citoplasma que el WT. También observamos que mientras los tubos polínicos WT responden al agregado exógeno de ROS disminuyendo los niveles citoplasmáticos de H₂O₂, la doble mutante *perk5-1 perk12-1* no fue capaz de hacerlo, mostrando elevados niveles de H₂O₂ constantemente, lo que ocasionó la explosión y descarga del contenido citoplasmático de los mismos (**Figura R23**). Estos resultados sugieren que PERK5 y PERK12 regularían negativamente los niveles de ROS durante el crecimiento del tubo polínico.

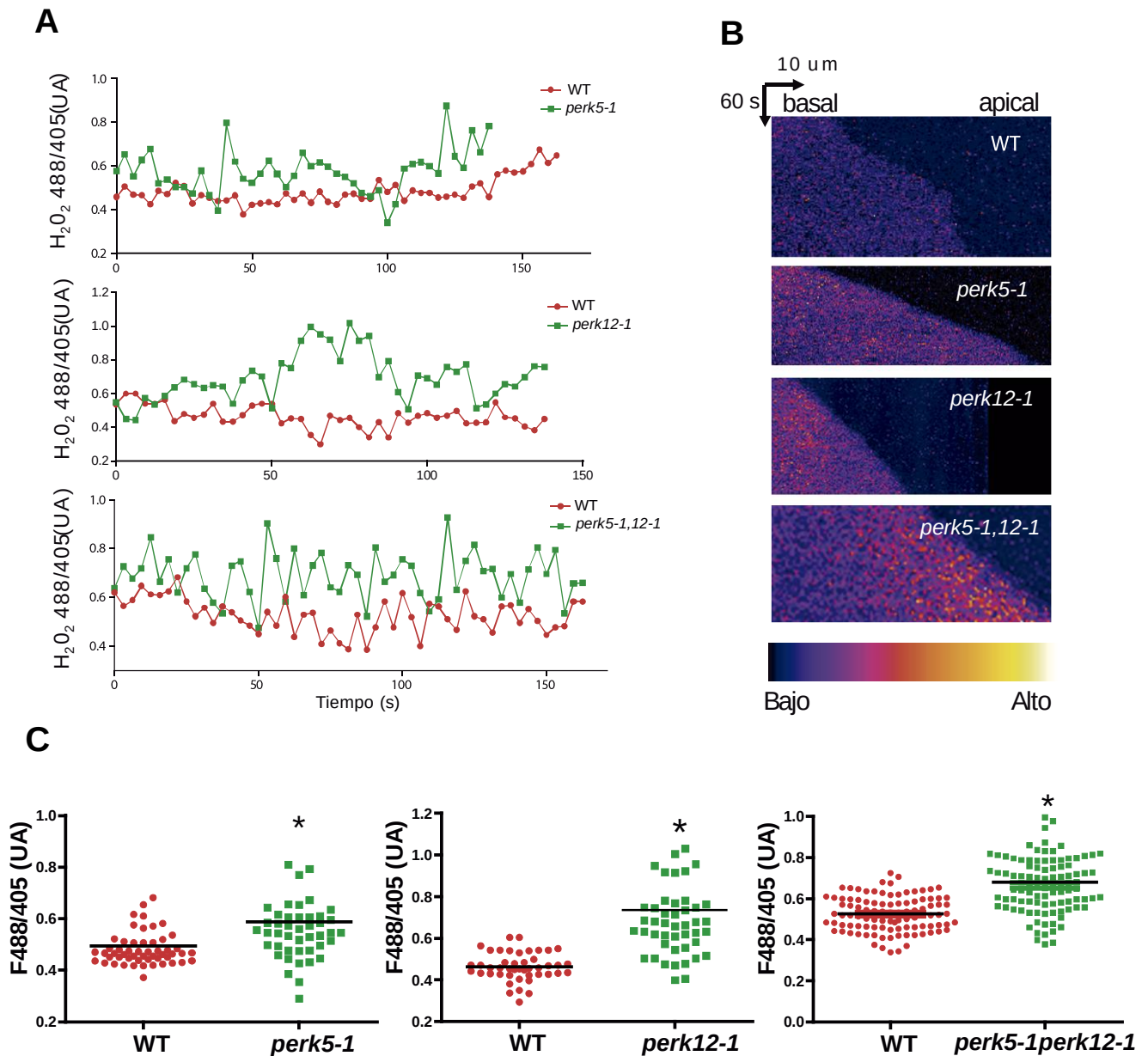


Figura R22. A) Cuantificación de la relación F488/F405 para el biosensor HyPer en el ápice de los tubos polínicos ($n=9$), *perk5-1* ($n=9$) y *perk12-1* ($n=11$). Los valores se muestran como la media de las relaciones a lo largo de 150 segundos. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del WT de acuerdo a un test ANOVA de 1 factor con $p<0,05$. B) *Kymographs* que representan la cuantificación realizada en C. C) Gráfico BoxPlot de las mediciones realizadas en A, se puede observar que en promedio los niveles de H_2O_2 son mayores en el ápice de los tubos polínicos de las plantas mutantes. UA: Unidades arbitrarias.

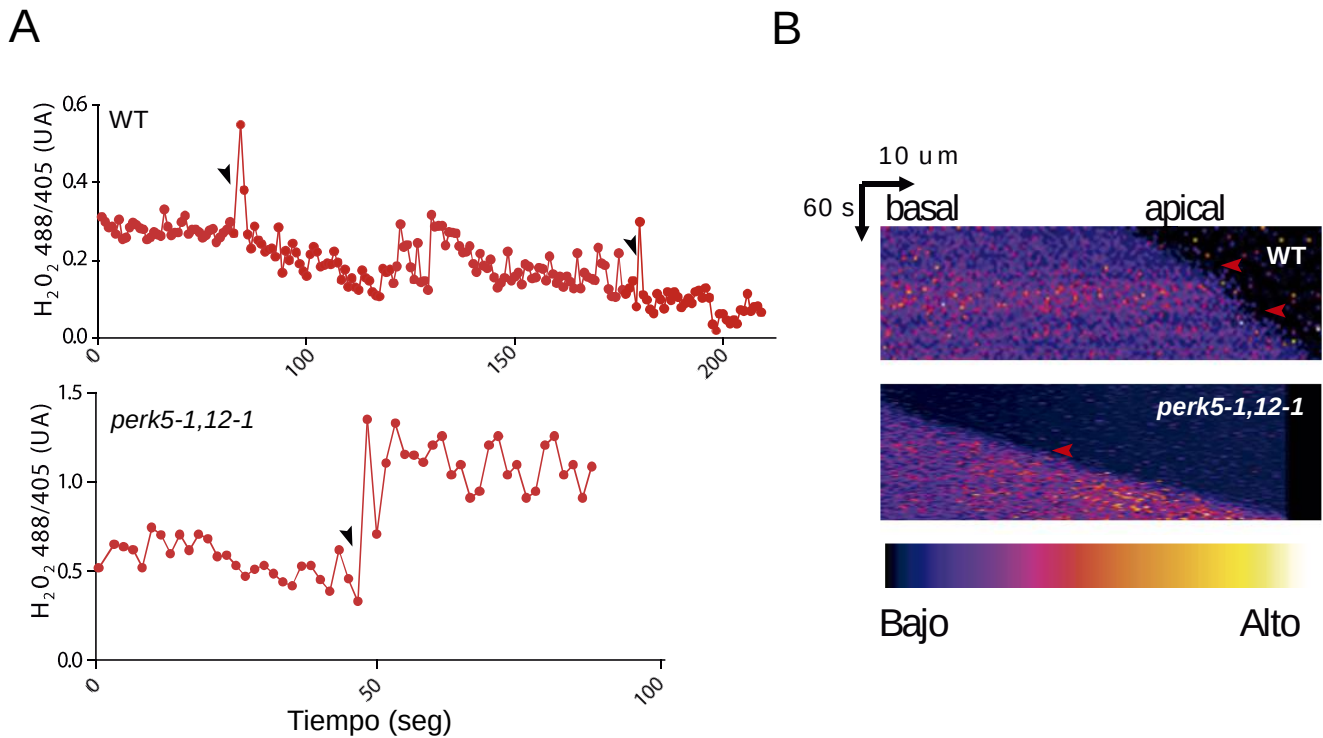


Figura R23. A) Cuantificación de la relación F488/405 para el biosensor HyPer antes y después de adicionar H_2O_2 . Las flechas negras señalan el momento de adición exógena de H_2O_2 . B) Kymographs que representan las mediciones realizadas en A.

Con el fin de determinar el comportamiento de las mutantes al agregado de un inhibidor químico de la producción de ROS llamado VAS2870 (3-benzyl-7-(2-benzoxazolyl) thio-1,2,3-triazolo (**Figura R24**). Se observó que luego del agregado de VAS, se produce una disminución en los niveles de ROS en el citoplasma de los tubos polínicos WT y mutantes. Además, se registró una disminución en la tasa de crecimiento de los tubos polínicos luego del agregado de VAS, probablemente debido a un aumento de la flexibilización de la pared ocasionada por la disminución de los niveles de ROS. Los resultados corroboran que la regulación de la homeostasis de las ROS es fundamental para el correcto crecimiento de los tubos polínicos.

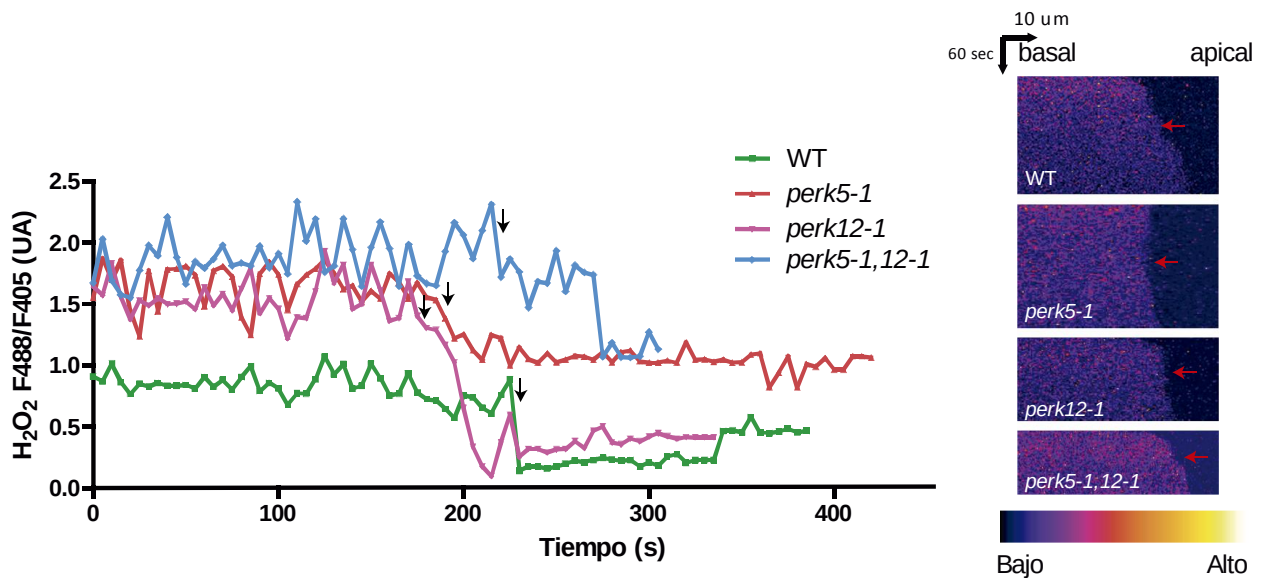


Figura R24. A) Cuantificación de la relación F488/405 para el biosensor HyPer antes y después de adicionar VAS. Las flechas negras señalan el momento de adición exógena de VAS. B) *Kymographs* que representan las mediciones realizadas en A.

9. Las proteínas AGC1.5 y AGC1.7 como posibles componentes de la señalización río abajo de las proteínas PERK

En estudios previos fue reportado que KIPK1 (a *kinesin-like calmodulin-binding protein* (KCBP)-*interacting protein kinase*) y KIPK2 (miembro de la familia de quinasas AGCVIII, AGC1-9) interactúan con el dominio citoplasmático de PERK8, PERK9, PERK10 y PERK13 (Humphrey *et al.*, 2015). Además, la doble mutante *agc1.5-1 agc1.7-1* presenta defectos en el crecimiento del tubo polínico debido a la presencia de filamentos de actina ectópicos (Zhang *et al.* 2009). Con el objetivo de identificar a los miembros de la familia AGC con altos niveles de expresión en tubo polínico, empleamos Genevestigator (**Figura R25**). Se puede observar que tanto AGC1.5 como AGC1.7 tienen máxima expresión en polen.

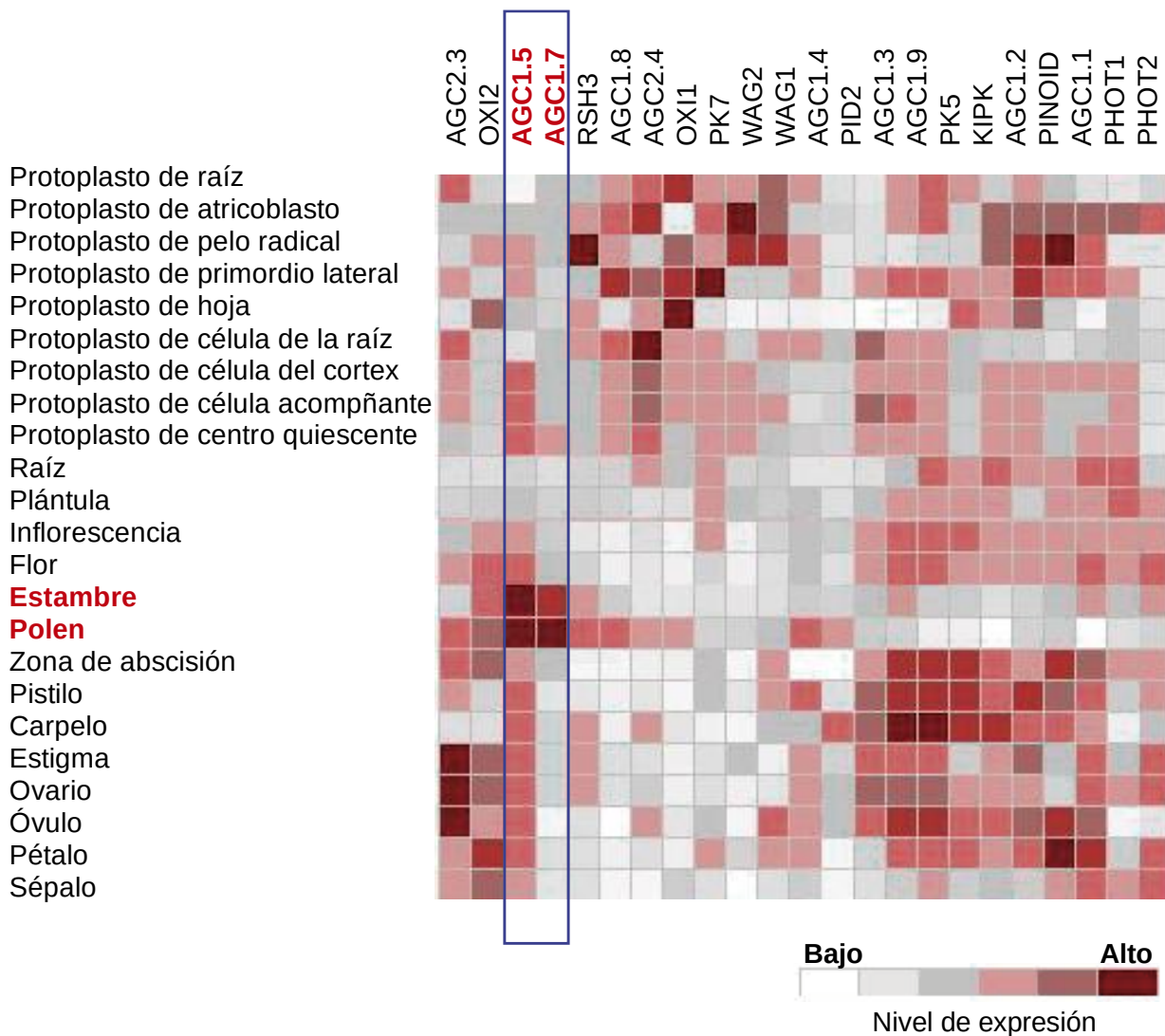


Figura R25. Expresión relativa de los genes de la familia de las AGCs en *Arabidopsis* en diferentes tejidos de acuerdo a la base de datos de microarreglos de Genevestigator utilizando la herramienta *Meta-Profile Analysis*, *Anatomy ProfileK*. Los niveles de expresión (en color rojo) son relativos a la expresión máxima de cada gen.

Basándonos en lo arriba expuesto, examinamos si las quinasas de la familia AGCVIII están involucradas en el crecimiento del tubo polínico mediado por ROS, como fue determinado previamente para PERK5 y PERK12. En la **Figura R26** se muestra las estructuras de los genes AGC1.5 y AGC1.7, la organización en dominios y los sitios de inserción de ADN-T. Se obtuvieron líneas mutantes por inserción de ADN-T corroborando por RT-PCR que los niveles de transcritos en dichas mutantes eran nulos (**Figura R26**).

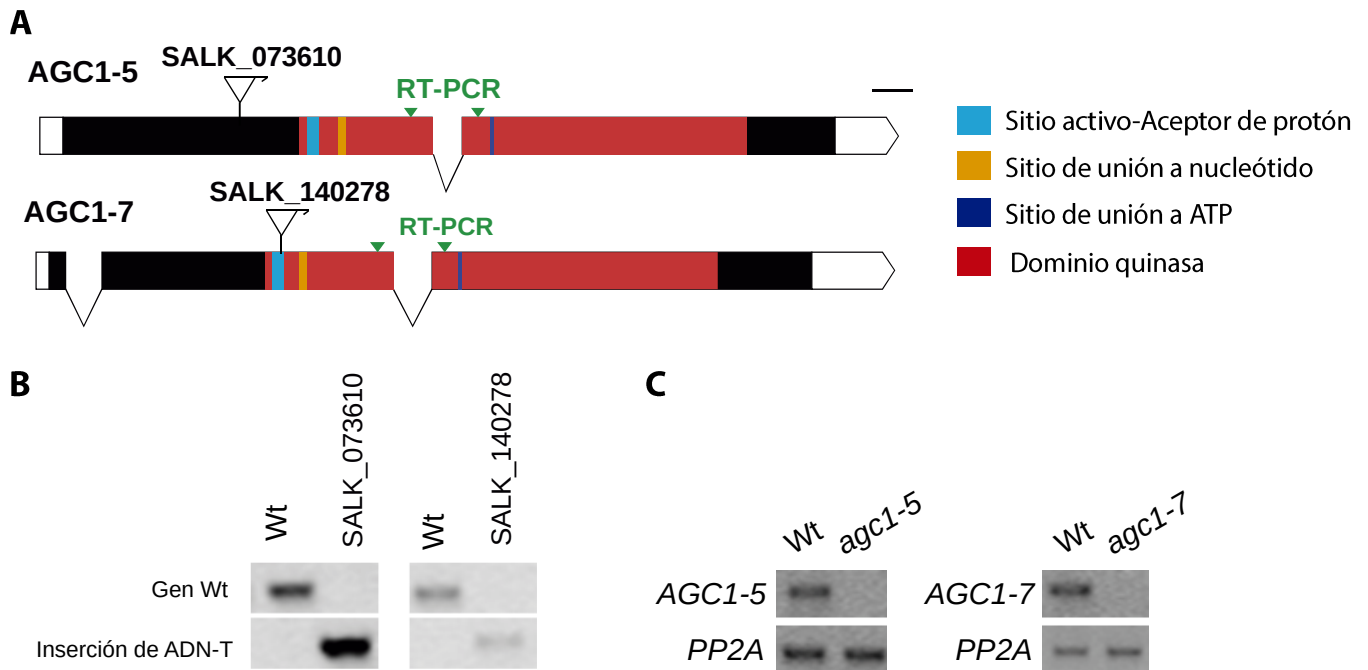


Figura R26. Esquema de los genes y dominios de las quinasas AGC. A) Los rectángulos negros representan los exones, las líneas representan los intrones y los rectángulos blancos representan las regiones 5' y 3' UTR. En rojo se representa el dominio quinasa, en amarillo el sitio de unión a nucleótido, en azul el sitio de unión a ATP y en celeste el sitio activo (aceptor de H⁺). Se pueden observar los sitios de las inserciones de ADN-T y en verde los sitios de pegado de los *primers* empleados para la RT-PCR. B) Confirmación mediante PCR de la presencia de inserciones en las líneas mutantes *agc1.5-1* (SALK_073610) y *agc1.7-1* (SALK_140278). Panel superior: fila 1, con 2 *primers* específicos para el gen de interés fila 2, con un primer específico para la secuencia del ADN-T (LBb1 para líneas SALK), y otro específico para la secuencia del gen. C) RT-PCR de polen de plantas WT y mutantes *agc1.5* y *agc1.7*. El ARN fue extraído de tubos polínicos germinados *in vitro*. El gen *PP2A* fue utilizado como control interno.

Seguidamente, se analizó si existían defectos en el crecimiento del tubo polínico y se observó que las simples mutantes *agc1.5-1* y *agc1.7-1*, y la doble mutante *agc1.5-1 agc1.7-1* generada por cruzamiento presentaron *in vitro* e *in vivo* tubos polínicos más cortos que el WT (**Figura R27**), a diferencia de lo reportado previamente por Zhang *et al.* (2009). Cuando se empleó polen WT para polinizar pistilos de las mutantes *agc1*, no se encontraron diferencias respecto del WT. En cambio, cuando la polinización fue realizada con polen proveniente de las mutantes simples *agc1.5-1* y *agc1.7-1*, y de la doble mutante *agc1.5-1 agc1.7-1* la longitud de los tubos polínicos era significativamente más corta respecto del WT (**Figura R28**).

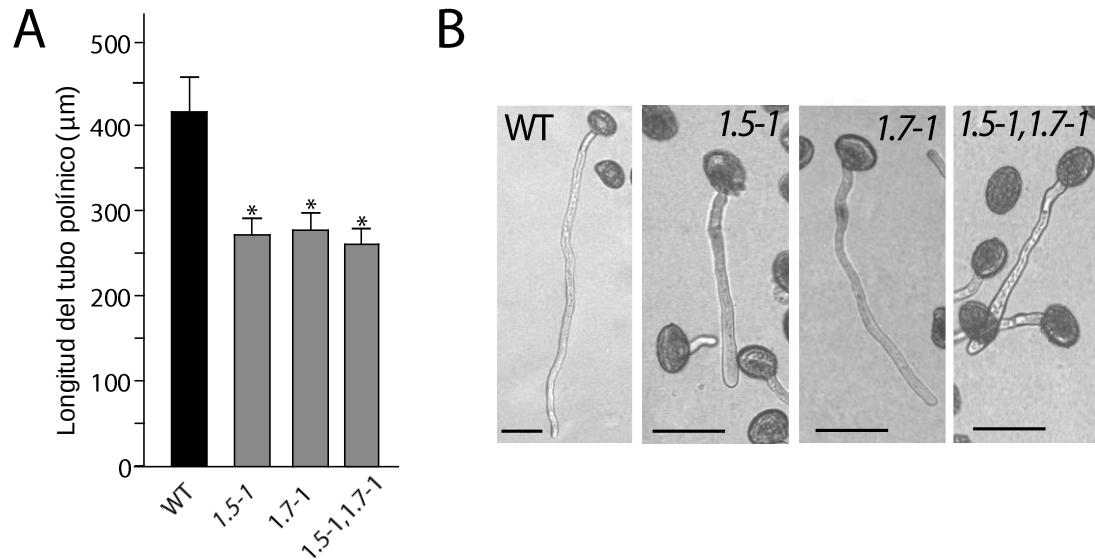


Figura R27. A) Cuantificación de la longitud de los tubos polínicos WT y de las mutantes simples por inserción de ADN-T *agc1.5-1*, *agc1.7-1* y la doble mutante *agc1.5-1 agc1.7-1* luego de 3 h de germinación in vitro. Los datos se muestran como la media $\pm$ SEM, (n=8). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del WT de acuerdo al test de ANOVA con $p < 0,05$. B) Imágenes representativas de la cuantificación realizada en A. Escala= 100 µm.

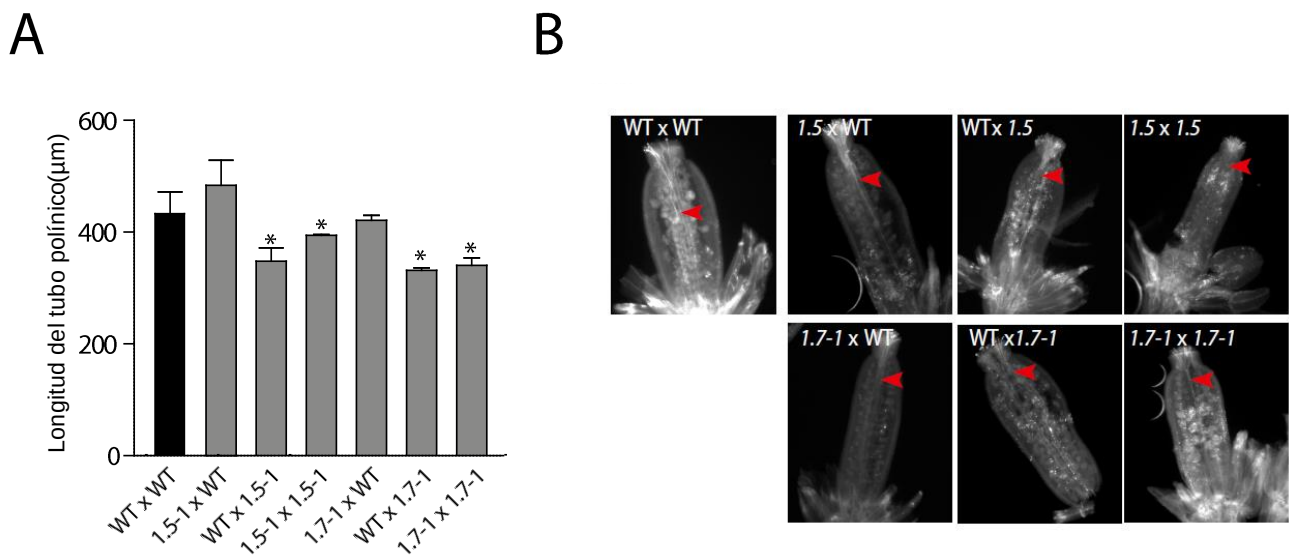


Figura R28. A). Cuantificación de la longitud máxima de los tubos polínicos dentro de los pistilos. Los valores se reportan como la media $\pm$ SEM y los asteriscos representan diferencias significativas de acuerdo a un test ANOVA de 1 factor, $p < 0.05$. B) Imágenes representativas del ensayo de germinación in vivo. Las flechas rojas señalan el frente de crecimiento de los tubos polínicos luego de 3 h, teñidos con azul de anilina. Escala = 500 µm.

Para verificar si el fenotipo observado se relaciona con una producción anormal de ROS, como fue observado para las mutantes *perk5* y *perk12*, se midió la producción de ROS total con H₂DCF-DA en el ápice de los tubos polínicos de las mutantes *agc*. Se detectaron niveles anormales de ROS en la línea mutante simple *agc1.5-1*, así como en la doble mutante *agc1.5-1 agc1.7-1*, pero no en la mutante simple *agc1.7-1* (**Figura R29**).

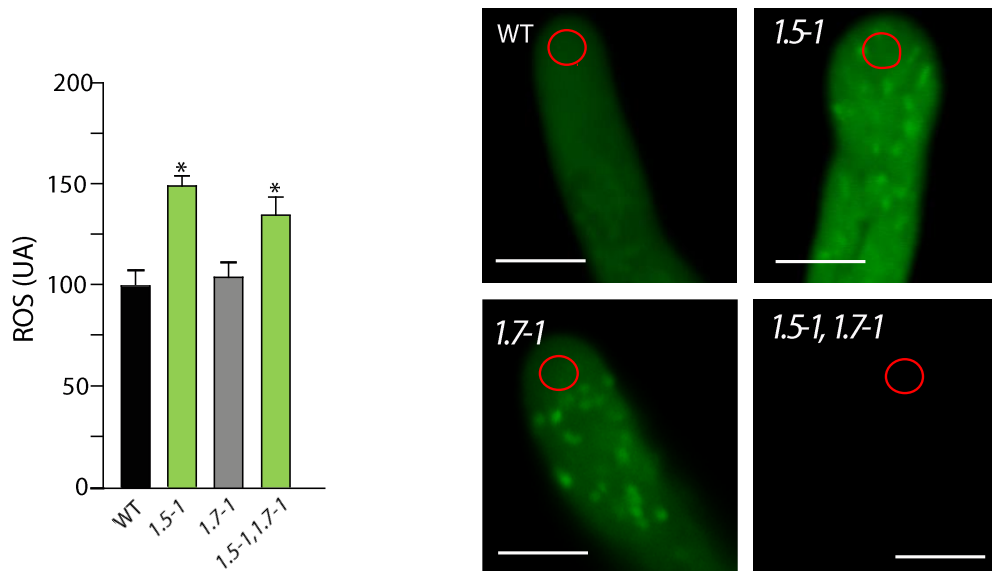


Figura R29. A) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de los tubos polínicos teñidos con H₂DCF-DA (n=15). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del WT de acuerdo a un test ANOVA de 1 factor con $p < 0.05$. (B) Imágenes representativas de los tubos polínicos teñidos con H₂DCF-DA por 5 minutos. Los círculos rojos señalan el área donde se midió la fluorescencia. Escala 6 μm. UA: Unidades arbitrarias.

Los resultados obtenidos sugieren que las quinasas AGC1.5 y AGC1.7, podrían estar actuando en conjunto con las PERK en la regulación de las ROS para permitir el correcto crecimiento de los tubos polínicos. Sin embargo, estudios genéticos y de interacción deberán ser realizados para corroborar nuestra hipótesis.

DISCUSIÓN

Durante su transporte hacia el óvulo, los tubos polínicos deben sintetizar los materiales necesarios para generar nueva pared celular y transportarlos hacia el ápice del tubo para que sean liberados al medio extracelular por medio de la exocitosis. Monitorear la estructura de la pared celular en formación y transducir esta señal hacia el citoplasma del tubo es un requisito necesario para asegurar una correcta coordinación a lo largo del crecimiento del tubo polínico. Las proteínas receptoras de tipo quinasa con dominio extracelular de tipo extensina (PERKs) son excelentes candidatos para evaluar y reportar hacia el citoplasma cualquier modificación que ocurra en la pared celular del ápice del tubo (**Figura D1**).

En esta tesis, demostramos que los genes *PERK3*, *PERK4*, *PERK5*, *PERK6*, *PERK7*, *PERK11* y *PERK12* se expresan específicamente en polen maduro y en tubo polínico de *Arabidopsis thaliana*. En particular, determinamos que *PERK5* y *PERK12* son necesarios para la germinación eficiente del polen y el crecimiento del tubo polínico. Hallamos que las mutantes nulas *perk5-1*, *perk12-1*, y *perk5-1 perk12-1* presentan tubos polínicos más cortos y tienen valores de fertilidad masculina reducidos. Estos resultados podrían explicarse por el hecho de que los tubos polínicos de estas mutantes muestran altos niveles de ROS al ser germinados *in vitro*, sugiriendo que *PERK5* y *PERK12* regularían negativamente los niveles de ROS durante el crecimiento del tubo. Los altos niveles de H₂O₂ en ausencia de *PERK5* y/o *PERK12* disminuirían la velocidad de crecimiento, posiblemente debido a la rigidización de la pared celular.

En ausencia de *PERK5* y *PERK12*, el ensamblado de la pared celular de los tubos polínicos se ve seriamente afectado con una mayor acumulación de pectina y celulosa. El aumento de estos polisacáridos en el ápice otorga mayor rigidez a la pared en dicha zona inhibiendo su normal crecimiento y teniendo como resultado tubos más cortos. Recientemente ha sido demostrado que la ausencia de las proteínas híbridas de extensinas con dominio rico en leucina (LRX) específicas de polen, *LRX8*, *LRX9*, *LRX10* y *LRX11* genera defectos durante el crecimiento de los tubos polínicos debido a la acumulación de calosa y pectinas en el ápice (Sede *et al.*, 2018). Por otro lado, ha sido demostrado que *LRX1* tiene un papel estructural esencial como glicoproteína físicamente unida a la pared celular, necesaria para mantener el crecimiento polarizado en los pelos radicales y que el dominio EXT es clave en su función (Baumberger *et al.*, 2003). Las mutantes *lrx1* presentan pelos radicales ensanchados que eventualmente explotan. Dicho fenotipo podía ser rescatado por *ROL1* (represor de *lrx1*) gen alélico a *RHM1* (por *RHaMnose biosynthesis 1*), que está involucrado en la formación de UDP-LRha, un componente básico del ramnogalacturonano I (RG-I) y ramnogalacturonano II (RG-II). Como era de esperar, las mutantes *rol1-1* y *rol1-2* modifican el polisacárido péctico RG-I y RG-II sugiriendo que existe una relación estrecha entre las proteínas de tipo extensina y la red de pectinas en la pared celular.

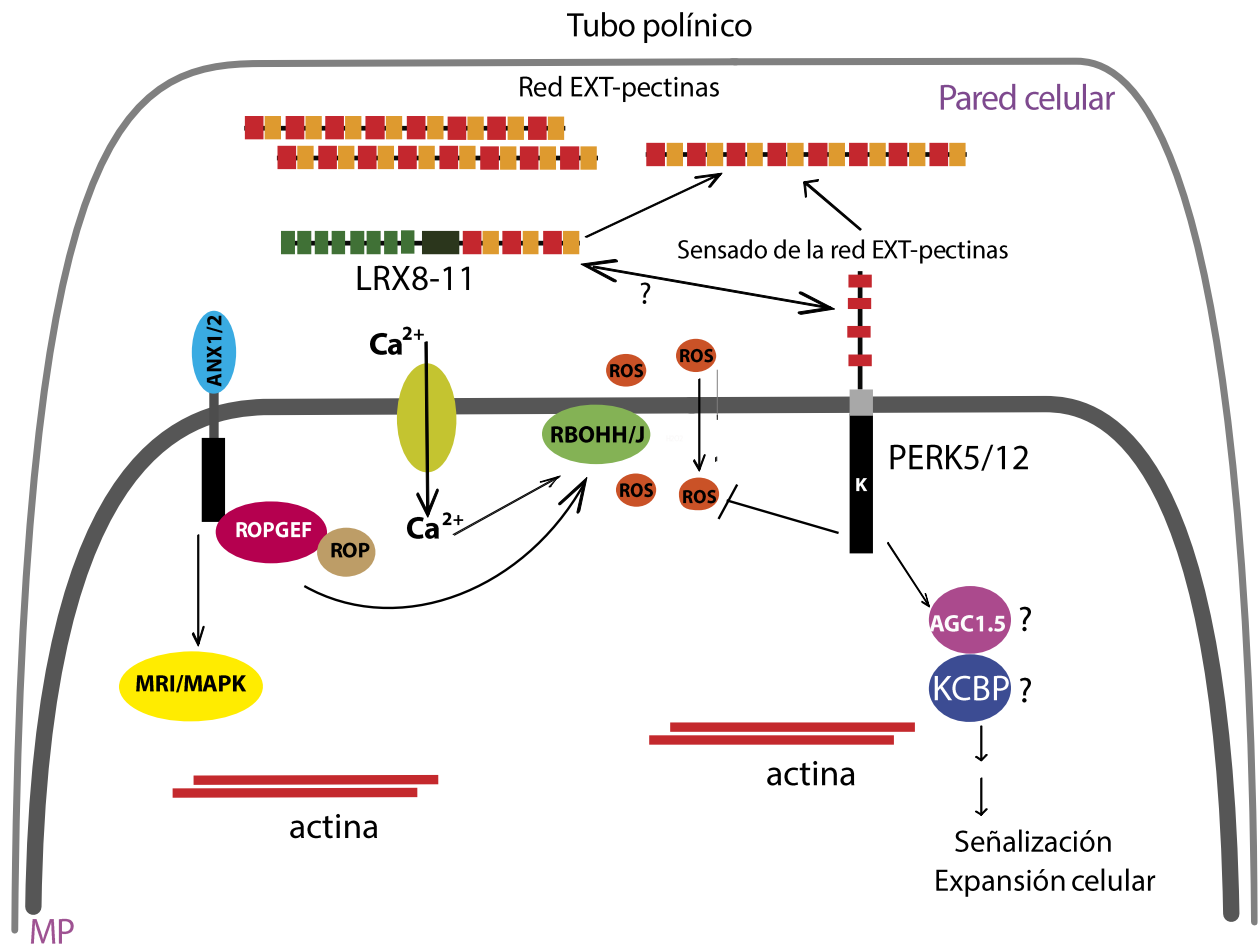


Figura D1. PERK5 y PERK12, ancladas a la pared celular, sensarían su integridad y permitirían la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana, lo que provocaría una serie de eventos de transducción de señales que producirían la modulación del crecimiento del tubo polínico. El hecho de que la red EXT tenga la capacidad de formar matrices complejas con pectinas (Cannon *et al.*, 2008) sugiere que las PERK (mediante su dominio extracelular) son candidatos ideales para la detección de la integridad de la pared celular a través de la red EXT-pectinas. No está claro qué ligando o componente de la pared celular es sentido por PERK5/12 y, además, cuáles son las interacciones entre LRX, PERK5/12 y el resto de los componentes presentes en el ápice del tubo polínico durante la expansión. Es importante resaltar que la *O*-glicosilación como modificación postraduccional, es crucial para la función correcta de varias glicoproteínas (p. Ej. EXT3, EXT10, AGP21, etc.) en muchos procesos biológicos como el desarrollo embrionario, la expansión de pelos radicales, etc. Es esperable que también la posible *O*-glicosilación en las LRX y en las proteínas PERK5/12 también sea crucial para su función durante el crecimiento polarizado del tubo polínico. Se propone que PERK5/12 actuaría en paralelo y de forma similar a los receptores de la familia CrRL1L, ANX1 y ANX2, regulando los niveles de ROS durante el crecimiento polarizado del tubo polínico. PERK5 y PERK12 actuarían río arriba de las NADPH oxidasas RBOHH y RBOHJ, regulando la producción de ROS. Río debajo de dichas PERK, actuaría AGC1.5 posiblemente regulando también los niveles de ROS en el citoplasma y la dinámica del citoesqueleto de actina, aspectos esenciales para mantener el correcto crecimiento polarizado de los tubos polínicos. MP: Membrana plasmática, K: dominio quinasa

Muchas de las PERKs descritas parecen actuar como inhibidoras de los procesos celulares en plantas (Borassi *et al.*, 2016). Considerando que las mutantes nulas de *perk5-1*, *perk12-1* y *perk5-1 perk12-1* mostraron una reducción en la transmisión durante la segregación proveniente de las gametas masculinas, se propone que PERK5 y PERK12 deben ser consideradas como reguladores positivos del crecimiento del tubo polínico. La redundancia génica entre las PERK podría explicar la falta de un fenotipo claro de tubo polínico en las simples mutantes *perk3*, *perk4*, *perk6*, *perk7*, y *perk11* y en las dobles mutantes *perk4 perk7*, *perk6 perk7*, *perk6 perk11* y *perk7 perk11*. Por otro lado, se puede especular que este diverso repertorio de PERKs en polen es el encargado de monitorear las fluctuaciones que ocurren en la pared celular durante el crecimiento polarizado del tubo polínico. Analizando su localización subcelular en tubo polínico y generando nuevas mutantes con mayor multiplicidad sería la mejor aproximación para lograr entender el rol de las PERKs durante los eventos de la polinización.

Otros RLK involucrados en la polinización son *ANXUR1* (*ANX1*) y *ANXUR2* (*ANX2*), receptores de la familia CrRLK1L parálogos de FERONIA (FER), presentes en la membrana del tubo polínico, regulan positivamente a RBOHH y RBOHJ, posiblemente a través de la señalización mediada por ROP para producir la oscilación de ROS (Wudick and Feijó, 2014) (**Figura D1**). Subsecuentemente, ROS activa los canales de Ca^{2+} para permitir la regulación fina del gradiente de Ca^{2+} en el ápice, que a su vez regula la exocitosis permitiendo la elongación estable de los tubos polínicos sin pérdida de la integridad de la pared celular. Las ROS incluyen una variedad de moléculas pequeñas, entre ellas el H_2O_2 es la más estable y su producción y transporte requiere una regulación precisa (Mangano *et al.* 2016). Aunque las RBOHs producen especies radicales superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), estas son dismutadas rápidamente a H_2O_2 en el espacio apoplástico. Cuando ANX1 y ANX2 están ausentes o desreguladas por sobreexpresión, tienen un impacto directo sobre la producción de ROS sugiriendo que existe una relación entre estas RLKs y la actividad de las RBOHs durante el crecimiento polarizado (Boisson-Dernier *et al.* 2009, 2013). Los niveles anormales de ROS, ya sean bajos o altos respecto de las condiciones fisiológicas, inhiben o exacerban el crecimiento polar del tubo polínico lo que influye en la estructura de la pared celular y genera la ruptura de la célula. Existe una única e importante función de las ROS en la ruptura del tubo polínico para liberar las células espermáticas durante la fertilización (Duan *et al.* 2014) y dicho proceso requiere una fuerte regulación en tiempo y espacio. Recientemente se han identificado a los péptidos RALF4 y RALF19 (por *Rapid Alkalinization Factor*) de polen como ligandos involucrados en los procesos de polinización (Ge *et al.*, 2017; Mecchia *et al.*, 2017). Las mutantes por pérdida de función de *RALF4* y *RALF19* producen defectos en la fertilización debido a la explosión prematura de los tubos polínicos, fenotipo semejante al observado en las mutantes *anx1anx2* (Boisson-Dernier *et al.*, 2009). Mediante estudios genéticos fue demostrado que RALF4 y RALF19 se unen al dominio extracelular de ANX1 y ANX2 con alta afinidad (Ge *et al.*, 2017). Por lo tanto, RALF4 y RALF19 están involucrados en un mecanismo de regulación autócrina junto con ANX1 y ANX2 para controlar la integridad del tubo polínico evitando la ruptura prematura. Por otro lado, estudios

previos mostraron que la sobreexpresión de ANX1 aumenta la acumulación de materiales de pared celular generando una disminución del crecimiento del tubo polínico (Boisson-Dernier *et al.*, 2013). En este sentido, Mecchia *et al.* (2017) propusieron un posible vínculo entre el control de la integridad de la pared celular y ligandos RALF. Observaron que RALF4 interacciona con LRX8, LRX9 y LRX10 y que triples mutantes de *LRX8-11* anulan la represión del crecimiento del tubo polínico causada por el agregado exógeno de RALF4, sugiriendo que estas LRX son necesarias para la señalización mediada por RALF4 (Mecchia *et al.*, 2017). Aún queda por demostrar si dichas LRX interactúan con las ANX formando complejos heteroméricos durante el sensado de los péptidos RALF o si median la unión de los péptidos con ANX1 y 2.

KIPK1 y *KIPK2* pertenecen al subgrupo AGC1 de la familia AGCVIII que contiene 13 miembros (Zegzouti *et al.* 2006; Rademacher y Offringa, 2012). Fueron previamente identificadas como interactores mediante su dominio N-terminal con el dominio quinasa de PERK8, PERK9 y PERK10 (Humphrey *et al.*, 2015). Debido a que las AGCVIII vegetales son las más cercanas a las PKA y PKC de animales, las cuales están involucradas en la regulación del crecimiento polar, no es inesperado que la doble mutante para *AGC1.5* y *AGC1.7* tenga defectos en el crecimiento del tubo polínico, presentando microfilamentos de actina ectópicos (Zhang *et al.* 2009a). En esta tesis, las simples mutantes *agc1.5* y así como la doble mutante *agc1.5 agc1.7* mostraron niveles de ROS más altos que los tubos WT. No es claro si la dinámica anormal de la actina o la producción elevada de ROS en estas mutantes es una consecuencia directa o indirecta de las mutaciones en estas proteínas AGC1. El hecho que la interacción física entre las quinasas AGC1 y las PERKs se mantenga como una unidad funcional en diferentes tipos de células vegetales, nos permite especular que estos dos genes candidatos AGC1 podrían interactuar con *PERK5* y *PERK12* identificadas en esta tesis. Además, estos resultados sugieren que *AGC1.5* actuaría en la misma vía de señalización que *PERK5* y *PERK12* que involucra a las ROS durante el crecimiento polarizado del tubo polínico.

Previamente, se demostró que dos quinasas AGCVIII llamadas OXIDATIVE STRESS INDUCIBLE1 (*OXI1* también nombrada AGC2-1) y INCOMPLETE ROOT HAIR ELONGATION (*IRE*; Oyama *et al.*, 2002) eran necesarias para el crecimiento polar durante la elongación de los pelos radicales. *IRE* pertenece a un grupo diferente de quinasas AGC y promueve la nodulación en *Medicago* (Pislario y Dickstein 2007), mientras que *OXI1* parece conectar las señales de estrés oxidativo con las respuestas río debajo (Anthony *et al.*, 2004; Rentel *et al.*, 2004). Recientemente se propuso que *MARIS* (*MRI*), una proteína receptora tipo quinasa citoplasmática (Boisson-Dernier *et al.*, 2015), activaría a *OXI1* posiblemente mediante fosforilación (Liao *et al.* 2016). *MRI* se expresa en pelos radicales y tubos polínicos en crecimiento, y se postula que actúa río debajo de CrRLK1L FERONIA (*FER*) y *ANX1-ANX2*, respectivamente. *OXI1*, que transmite señales de ROS, fosforila a MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES (por ejemplo, MAPK3, MAPK4, y MAPK6) que activan a los genes involucrados en la respuesta a ROS (Moon *et al.*, 2003). Recientemente, fue descrita una

RNasa (*RNS2*) que interactúa directamente con *PERK13* (Hwang *et al.* 2016). *RNS2* pertenece a la clase II RNasa T2, que se expresa altamente en toda la planta y se propuso que tiene un rol *housekeeping* mediante el reciclado de RNA (MacIntosh *et al.*, 2010; Hillwig *et al.*, 2011). Aunque la fosforilación de *RNS2* por el dominio quinasa de *PERK13* no fue observada in vitro, *RNS2* actúa negativamente en el crecimiento del pelo radical y se sugiere que actúa río debajo de *PERK13* (Hwang *et al.* 2016).

En este complejo escenario hemos identificado dos receptores quinasa, *PERK5* y *PERK12*, así como dos quinasas AGCVIII citoplasmáticas, *AGC1.5* y *AGC1.7*, que contribuyen al normal crecimiento polarizado de los tubos polínicos posiblemente regulando los niveles de ROS (**Figura D1**). Por otro lado, la mutante de *PERK13* (*rsh10*), también presenta niveles elevados de ROS en las raíces (Hwang *et al.* 2016) indicando posiblemente que *PERK13* reprime la actividad de RBOHC en los pelos radicales (Foreman *et al.* 2003). Una relación más general podría existir entre las PERKs y las RBOHs aunque su asociación debe ser aún establecida.

Por el momento, las proteínas PERKs deberían ser consideradas como receptores huérfanos ya que aún no se conocen sus ligandos. Es probable que el dominio extracelular de las PERK se encuentre embebido en la pared celular de forma similar a las WAKs, sugiriendo que podrían actuar sensando cambios en la pared (Silva y Goring, 2002). Teniendo en cuenta que el dominio extracelular de las WAKs une pectina, la cual activa su dominio quinasa (Kohorn y Kohorn, 2012), es posible especular que las PERKs también retengan la habilidad de ser activadas por componentes de la pared celular y transducir señales río abajo. Las proteínas PERKs podrían unir también pequeños péptidos, como otros receptores quinasas, por lo que sería interesante también estudiar a dichos péptidos como posibles activadores de las vías de señalización de las proteínas PERKs.

Los resultados de esta tesis sugieren que la vía de *PERK5*, *PERK12* Y *AGC1.5* actuaría río arriba de RBOHH/J. Varias proteínas PERK como *PERK6*, *PERK7*, *PER11* y *PERK12* co-expresan entre sí, lo que sugiere que podrían actuar juntas en el mismo proceso biológico. Además, el hecho de que *ANX1,2* a través de la interacción con RALF-LRX regulen RBOH sugiere que las proteínas PERK actuarían en paralelo a *ANX* para regular los niveles de ROS y la integridad de la pared celular, aunque más experimentos son necesarios para establecer la forma en que estos componentes están conectados a nivel molecular para coordinar el crecimiento polarizado de los tubos polínicos.

ANEXO

Anexo 1. Ejemplos de secuencias de proteínas PERK halladas en otras especies de dicotiledóneas, así como en monocotiledóneas. Entre paréntesis se indica el número de PERKs encontradas en cada especie.

Motivo EXT

Dominio transmembrana

Residuos clave en el dominio quinas

>Arabidopsis_AT3G24400 (PERK3) (15) Eudicot

MSSAPPPGGTSPPPPQPLPIPPPPQPLPVTTPPPPTALPPALPPPPPPPTTVPPIPPSTSPPPP
LTPSPLPPSPTTSPPLTPSPTTSPPLTPSPPPAITPSPLTPSPLPPSPTTSPPPSPSPISPLTPSPPPSSP
LRPSPPPPSPATPSTPPRPPPPSTTTPPPRVGSLPPPPASPSGGRSPSTTTPGSSPPAQSSKELSKGAMVGI
AIGGGFVLLVALALIFFLCKKKRRRDNEAPPAPIDGVYGGQQQNASRRSDHVVMSVPPPKSPSSAPRPPPHFMSS
GSSGDYDSNYSDQSVLPPPSPLALGLGIYQGTfNYEELSRATNGFSEANLLGQGGFGYVFKGMLRNGKEVAVKQLK
EGSSQGEREFQAEVGIISRVRHRLVALVGYCIADAQRLLVYEFVPNNLTLEFHLHGKGRPTMEWSSRLKIAVGSAGK
LSYLHENCNPKIIHRDIKASNILIDFKFEAKVADFGLAKIASDTNTHVSTRVMGTFGYLAPEYASSGKLTEKSDVFS
FGVLLLELITGRRPIDVNNVHADNSLVDWARPLLNQVSELGNFEVVVDKKNNEYDKEEMARMVACAAACVRSTAPR
RPRMDQVARVLEGNISPSDLNQGITPGHSNVYGSSGGSTDYDSSQDNEGMNKFVKVLETQDLYSNPISEYDLYPSW
SSTDGQTTQGKATGNIKRPGQGYG

>Vitis_vinifera_VIT_11s0016g03880 (5) Eudicot

MSSPSPGQSPGPTSPSTNTTSPPPSTNTTAPPPATPAAPPPSSPPPPPTAPTGSPTAPAGSPPPPPDSFGSP
PSGQTGSPPPPSRAPPPPSPSSNKSPPPPPSDSKSPPPPPSSPSNTVSTGLVVGIAIGGVVILVLSLLFTCC
KKKKRRDHRQDYVPPPPGPKNDPYGGPPQWQHNVPPPADHAVTVFVKPSPPPGTASRPPHSPVQVPTPPPPQPP
FVSSSGSGSNYSGSDNPLPPPSIALGFSKSTFTYEELVMATDGFSSANLLGQGGFGYVHRGVLNPGKEVAVKQL
KAGSGQGEREFQAEVEIISRVRHKLVLTLAGYCITGSHRLLVYEFVPNNLTLEFHLHGKGRPTMDWSTRLKIALGSAK
GLAYLHEDCHKPIIHRDIKASNILIDFKFEAKVADFGLAKFSSDANTHVSTRVMGTFGYLAPEYAAAGKLSKSDVFS
SFGVMLLELLTGRRPVDANQTFMEDSLVDWARPLLTRALEDGNFDTLVDPRLQKDYNHHEMARMVACAAACVRHSAR
RRPRMSQIVRALEGDASLSDNNEGMRPGQSSIYSSHGSSDYDTNQYNEDMIKFRKMALASRDYGSSEYSGPTSEYGL
YPSGSSSEGQRTTREMENGKMKKDSRGYSGGSEK

>Glycine_max_I1L4I8_SOYBN (12) Eudicot

MSTAPAPSSPPANNGTAPPSTPATPSAPPPATPSAPPPSTPSPPPPATPSPPPPATPSPPPPATPSPPPPATPS
PPSTPSASPPPPSTPTTSTSPSPSTSPSPSSGGSTSPSPSRSSSPSPSGSSPTTSPSPSSSSSISTGVVVGIA
VGAVAVLLVLSILCIICRKKKKRRRDEEYHAPPPQQQPPRGPKDGAYGGPPQWQHNVPPPDHVVSMMPKPSPPP
APPAYAGQPPPPPPFISSSGSGSNNSGGEFLPPPSPGISLGFSKSTFTYEELARATDGFSDANLLGQGGFGYVHR
GILPNGKEVAVKQLKAGSGQGEREFQAEVEIISRVRHKLVLVLVGYCITGSQRLLVYEFVPNNLTLEFHLHGKGRPTM
DWPTLRRLIALGSAKGLAYLHEDCHKPIIHRDIKASNILIDFKFEAKVADFGLAKFSSDVNTHVSTRVMGTFGYLAPE
YASSGKLTDKSDVFSYGIMLLELITGRRPVDKNQTYMEDSLVDWARPLLTRALEEDDFDSIIDPRLQNDYDPHEMAR
MVASAAACIRHSKRRPRMSQVVRALEGDVSLADLNEGIRPGHSTMYSSHESDYDTAQYKEDMKKFRKMALGTQEY
GASSEYSAATSEYGLNPSGSSSEASRQTTREMERMKMKNNQGFSGSS

>Solanum_lycopersicum_Solyc05g010140.2 (4) Eudicot

MSVVVSPPPSLAPIVPPIVLSPPPQLSPPPASQPNATAPPVSSLPPTLPPQSPPPALPTLPQSPTPSNVTSPPP
SNVTSPPPMASPPTESAPPTVSPPIPPASPPPVSPPPSSPPPPQSPPPASAPPPTSSPPVSSPPPEVEPPPV
SPPPQPTVPTSPPPPPKDDPPASPPPPQPTTTPSSSPPPPKVDSPPFSPPPPAQNPDPPTAPPQSPEPPKGSPPVNS
PPSPASVPPRGSPPTPASDPPANTPPSPAFTPPQGSPTPSLEPPKNTPPSPSVPSGGTTTDRPSDNAAGSANSSSS
SGIGTGGTVAIGVIVAVLLLGIVGLVGWCLWKRKKKAFRPSGGNVMPTPSGSTPNSDSVLLKIQESTPDTRNGTGK
FLNSPGSGGGFNPKIWFTEELVKATGDFSAENLLGAGGFGSVYKGCPLDGRDVAVKQLDIGGRQGDREFRAEVEI
ISRVRHRLVSLVGYCISENRLLVYEFVPNNLTLYFHLHAEGRPVMDWTTTRVKIAVGAARGIAYLHEDCNPRIHRD

IKSSNILLDINFEARVSDFGLAKLAQDAKTHVTTRVVGTFGYMAPEYASTGKLTEKSDIYSFGVVLELITGRKPVD
TSQPLGDESLVEWARPLLSHALEKVEFDQLVDPRLERNYVIPMFQLEIAAAACVRHSAAKRPGMGQIMRAFDNMSA
SDLTNGMKVGESTIYNSADQSAEIRLFRRMAFGSPDFSSDFFSQGTQHSGESAEDRV

>Solanum_tuberosum_PGSC0003DMG400010093 (6) Eudicot

MASPDSPPSFFFPFTPTATPSNSTSDSPAPPPDSSSPPPPPPDSSAPPPSPAPDSSPPSESKSPPPPAE SPPPPPP
PTAAAPPPSAPPPKPSV SPPPPSPKAPPPAN SPPPPAS SPPPPPSKD SPPPPAPPP SPPPPPPAVSP SPPPPPVKNQPPPP
D SPPPPAPVANPPQN SPPPPALAPPPASLPSAPPPNLLT SPPPPSISPPAPPNNTSPAGAPPPLPVTRLPTTEKPTAIPK
PAITADSSARNGGGKNTGS VAAIGVVAGFLALSLVIVAVWFTRRRKKRESAFNLNLYLGSPSFASSPNSDTSFLRSRS
QHSTYLAPTGSQSNFMYS PDHGGIGNSRSWFTYEELSEATNGFSPDSVL GEGGFG CVYKGVLDNGREVAV KQLKSGS
GQGEREFRAEVEI I SRVHHRHLVSLVGYCISEQQRLLVYDVPNDTLDYHLHGKGMQ TMDWATRVKVAAGAARGLAY
LHEDCHPRI IHRDIKTSNILLDINFEAQVADFGLARLAGDASSTHTVTRVMGTFGYLAPEYASSGKLTEKSDVYSYG
VVLELITGRKPVDQSQPLGDESLVEWARPLLAQALETENFENVDPRLGNFVAGEMFRMIEAAAACVRHSGSKRP
RMSQVVRALDSMDELSDLNGVKPGQSGIFESREQSAQIRMFQKMAFGSQEYSSDFFNYSQGSYKS

>Populus_trichocarpa_POPTR_0008s19400g (5) Eudicot

MSNSVGNPPPGSSSNESFPLQVDNTSLSLGSPSATDGEESAALVDDTATPPPNSTNVDSPTPEPS SPPPTSKSP
PPPPPP SPPPPPPPKSNH SPPPPSPPLVSNSTKSNSSPPLKI SPPPN SPPPN SPNPPPTPAKKESSSSSV SPPPPAAS
PPPAGKFVPPPLSRDVQ SPPPPAEFKPSLSPISNVSPKTLDSNSNPSNSGRVPTDSRFHSPVPVGASPDHPSST
STDATNHNVPRTTPPAPGNESNEAGGKT IIAA VAAVGA AVTGLFLLLT LIAAIFLV VKSRKKRVANASGHYMPKSF LTKT
DGYHYGQQQQSVRLTGPGSPSYHLQSAPSESHGSQGRNMYNGGGPDSDVIGTGKTFFSYHELMEITSGFARQNI IGE
GGFG CVYKGC MADGKVAV KQLKAGSGQDREFKAEVEI I SRVHHRHLVSLVGYCISDNQRLLIYEFVFNKTLNHL
HAGKELPVLDPKRLKIAIGSAKGLAYLHEDCHPKI IHRDIKSANILLDDAFEQAASRLSMLDLSQNVADFGARL
NDTTQTHVSTRVMGTFGYLAPEYASSGKLTDSDVFSFGVVLELITGRKPVDASQPLGDESLVEWARPLLIHALET
GELGELVDTRLEKHVESELFMRVETAAACVRHLAPKRPRMMQVVRALDSGGELSDLNGVKFGQSTAYDSGQYNQE
ISNFRMALVSNGSSSEFDTFSGDYSARDTSREQPTSGDYTSSESETRAMNRTGSYAGRRFR

>Brassica_rapa_Bra028192 (19) Eudicot

MSLVPLPILTPPPSSNSSTTS SPPPPSSSPPTTPLVPPPVTPPPSPVPSS SPPPPPVIS SPPPPSS SPPPPPVVS SPPPP
AAAS SPPPPPPVVA SPPPPSTPPAPPPQDS SPPPPPESSPPAPTTS SPPPPPSNTPSPPKPSPPSPSDTR SPPPPPS
SDKP SPPPPPGSTSTPPPA SHPTDPAALAPPTPLPLVPREKPTPPASPNANGNNTSSSSPSGVGTG GIVAIGVIVGL
LLLSLFLVAL WLTRKRKRKDPGAFVGYTMPSSGYSSPQGSDAVL FNTNSSAPNNKMRSHSGNDYMYASSDSGMVSNQ
RSWFSYDELAQVTNGFSQKNLL GEGGFG CVYKGV LSGREIAVK QLKIGGSQGEREFKAEVEI I SRVHHRHLVTLVG
YCISEQHRLLVYDVPNNTLHYHLHAPGRPVMTWETRVKVAAGAARGIAYLHEDCHPRI IHRDIKSSNILLDNSFEA
LVADFG LAKIAQELDLNTHVSTRVMGTFGYMAPEYATSGKLSEKADVSYGVILLELITGRKPVDTSQPLGDESLVE
WAKPLLSQAIENEEFGELVDPR LGVNFIAAEMFRMVEAAAACVRHSAARRPKMSQVVRALDTLEEASDITNGMRPGQ
SQVYDSRQQSAQIRMFQRMAGFSQDYSSDFFDRSQSHSSWGSRDTRDQSKFVP

>Ricinus_communis_RCOM_1464250 (6) Eudicot

MDMKMILNFAHYI I SRVKLKL RPPKEKSKSEEVQE QSKPVQKDFS FLLLRIKEVVIESPPLQS SPPPPPDPLTTSPI P
QPNVTTPSTPSPSQTSAVVV SPPPPANASAPTQPPVAS SPPPTT SPPPPSPNADPPTS N SPPPPQSPVQLPPPPVS
STPPATPSDPPT SPPPPPSNTPTT SPPPPSSARPPAN SPPPPASLSPQESPP SPPPPSSKPPENPP SPPPPPATPSEPP
TNSPP SPPPPPATPSEPTNS SPPPPVSVP PRRSPGPAATPPTT SPPPPASTPPAS SPPPPPASAPPEN SPPPPPASI
APTSPNAPPPPGRTPFPPSQPTPSPSNSTPNASTSPPLITL SPPPPPSLSSAPPSDNTSAPENSKSPGDGGIGTGGI
VAIGVVVGIIIMLSIVGLAV LCMRKRKEAHGLNGGYVMPSPLGSSPRTDLNLSKAQTTIPLMGSGSSTDYVYSPSGS
GGLGNSRSWFMYEELLKSTNGFSSQNL GEGGFG SVYKGCLPDGREVAV KQLKVGGSQGEREFKAEVEI I SRIHHRH
LVSLVGYCISDNRRLLVYDVPNNTLHFHLHGEGRPVLNWAARVKIAAGAARGIAYLHEDCHPRVIHRDIKSSNILL
DNNFEAKVSDFGLAKLAIDADTHVTTRVMGTFGYMAPEYASSGKLTDKSDVFSYGVVLELITGRKPVDASQPLGDE
SLVQWARPLLGHALANEEFDGLVDPRLEKNYVESEMFTMIEAAAACVRHSAAKRPRMGQVVRAFDGLAAADLSNGMR
VGESEIFNSAQSAEIRLFRRMAFGSQNYSTDFFSQGSLDS

>Brachypodium_distachyon_BRADI2G44830 (2) Monocot

MPRVRLLESAERLASAPAGGPPPPPKSSST SPPPPPPSS SPPPPPIP SPPPPSPSPGQNSSSATFEQFLVKDPKTS GSP
PPGKSPTP SPPPPPV SPPPPSPPQTSRSPSPS SPPPPSPPQRSS SPPPPASPTPEASTSA SPPPPSQPEIPATPTPPSP
SGAASAPGTRFSLPATRGTTPAPGTPSPSTSQLPSGVTVIMPASGPPAGTWQSPHKTPTAA SPPPPPLAPP
SGGSAITVPNG VLVGVAVGGFLMALASLFMVA CVTNRENNDKRPPMPMRKRTVVVPARGVASPEYVSSGPAAPSPS
ETGSYDFSGKSWFTYDELAGITGGFSAENVI GEGGFG KVYMGALGDGRVAV KQLKVGGSQGEKEFRAEVEI I SRI

HHRHLVTLVGVCVTENHRLLVYEFVCNNTLEHHLHGKGRPVMDWPKRMKIAIGSARGLTYLHQDCHPRIIHRDIKSA
NILMDDAFEAKVADFLAKLTNDSTMTHVSTRVMGTFGYMAPEYASSGKLTDRSDVFSFGVVLELITGRKPVDSQP
LGEESLVEWARPVLVDALTDDELFRELADPALECRYSKTEMRRMVESAAACIRHSGTKRPMQVVRSLDVSSTDL
TNGVKLGHSTAYESGQYSEDIELFRMAFGNDLNTAEYGFSEDEQQRTAAGR

>Oryza_sativa_OJ1568_D07.15 (3) Monocot

MSESDQAPSPSSPSSSSSSSSSGNGSNKAPPEESDNSSSSNGSSSSSPTPPSSQSSSDSDSGGGSSSPSQGSSSP **SPP**
PPSGSSSESHS **SPPP**APPQSSSSSSSSSSSSSGGSKSSPEAPSPPESSGNGGGGGGGGRS **SPPP**NW **SPPP**QQQQQH
SGGSTP **SPPP**SPSSNQPPSSGSSASSSEPSPPRS **SPPP**SPPQSSGNGNQPPKPSGGQQQAPPQSPPSAANQSVVF
IPVPVASNPPGMLPPPQVIDATPSGAISSTNFPGRNSTAGSSNTLSQQQHTTVSSTAQASSSGHI **AAAIAGAAV**
TGLLCAIVAIYLIVSSRRKKKMDGLVYHYDGNNYFVPSSQFGSSRNHPPPSAIMLNSGGASADGGGYNSGTFSG
GEGTGPAGSKSRFSYEELTGITSNFSRDNVI **GEGGFG**CVYKGWLSDGKCVAV **K**QLKAGSGQGEREFQAEVEIIISRVH
HRHLVSLVGYCIAAHRMLIYEFVPNGTLEHHLHGRGMPVMDWPTRLRIAIGAAKGLAYLHEDCHPRIIHRDIKTAN
ILLDYSWEAQVADFLAKLANDTHVSTRIMGTFGYLAPEYASSGKLTDRSDVFSFGVVLELITGRKPVDTQPL
GEESLVEWARPVLADAVETGDLSELVDPRLGAYNRNEMMTMVEAAAACVRHSAPKRPRMVQVMRVLDEGSMTDLN
GIKVGQSQVFTGGSDAADIQQLRRIAFASEEFTGEFEQRTTNSNSES RPMNRIPE

>Hordeum_vulgare (2) Monocot

MPSRLAPSPSSSEDSSDGQSNRSKSKAPPPRRSSRSSGSSSDENGDDSSSPSRSSQDDDDGGRSSSSSSSDSQDSSP
SDSQDSSPSDSKGSQSSRR **SPPP**SKSSPSPSSSPSRPSSSRKGGNSDSS **SPPP**SDSSGDGEDNDSSSPTWSSPPE
ESEDSESPSPSSSR **SPPPRSSP** **SPPP**GWSNDNDQAGSRPEGSQSPSP **SPPP**PPAPANHSVVFIPVNSHPGAPP
ALVSIAPPGTVGLMSTHLPGAQGAAGAGGMQAAAAGSSASTSSTNGAGGSAASSSAQQHLSSQAINGQV **AAAIAGAS**
VAGLLFIIVAIFFIIVTRKRKMMEGMVYHSDGSRSYMHSGQLVGSNHPSSGVFYGPPPPGSSGGFSYGPLATPGPP
GSTDSFRGTGYPPSGSMEQPPGNKSSFSYEELTSITSNFSRDNVI **GEGGFG**CVYKGWLADGKCVAV **K**QLKAGSGQGE
REFQAEVEIIISRVHHRHLVSLVGYCVAQHHRMLIYEFVPNGTLEHHLHGRGVPMDWSTRLRIAIGAAKGLAYLHED
CHPRIIHRDIKSANILLDYSFEAQVADFLAKLSNDTHTPVSTRIMGTFGYLAPEYASSGKLTDRSDVFSFGVVLE
LITGRKPVDDRLGEESLVEWARPVLADAIETGNHGEADPRLEGGRYNKAEMVRMVEAAAACVRHSAPRRPRMVQV
MRALDVEDVDEGSMSDLSNGVKVGQSQVFNNSSQEEAALQLRRTAFATEELTGEFELSGEYSAAVNTMNQPRAAG

>Setaria_italica_Si008752m.g (3) Monocot

MSDIAPSPSSSSSSSEENGSAADDNNNNNDNNNDSSKAPPPRGSISSSSSSGSGNSKGWS **SPPP**SPSSGGGSRSTPPSDSQ
DSSSS **SPPP**PSHLSPPKSSESP **SPPP**SPSSWSGGNSKSS **SPPP**TPPSESSRNSSGGNSNS **SPPP**GRSSSSSPQORSE
GSSA **SPPP**PPSPSSNQAPPNPSSGGSPSKESPETHSSPSPQESNDDQASSQPSSASPSPTNQSIIVFPVPVSSKNSP
PGAPSPGLVSIAPGAAGVTLTSSNNLSSSQETNASTAGNSSHSSVSGSGVGTSHV **AAAIAGASITGLMFAMLAFFI**
ARRRKKKTDGLVYHNDGNNNLPSGQFGGSNPSGAVYPGTLPGFSYGPSPSGPDSGGGGYYESGSMEPLGSKSSFSY
EELTSITSNFSRDNVI **GEGGFG**CVYKGWLDGKCVAV **K**QLKAGSGQGEREFQAEVEIIISRVHHRHLVSLVGYCIAAH
HRMLIYEFVPNGTLEQHLHGRGMRVMDWPTRLKIAIGAAKGLAYLHEDCHPRIIHRDIKSANILLDYSFEAQVADFG
LAKLSNDTHVSTRIMGTFGYLAPEYASSGKLTDRSDVFSFGVVLELITGRKPVDTQTRPPGQESLVEWARPVLVD
AVETGDLDAVDPRLDGAYNMGEMIVMVEAAAACVRHSAPKRPRMVQVMRALDDEGSMSDLSNGVKVGQSRNYND SG
QQAAAIQQLRLTAFASEEYTGFEQSGEYRGAYSETQPINRR

Anexo Tabla1. Lista de primers empleados en esta tesis.

Gen	Secuencia <i>primer forward</i> 5'-3'	Secuencia <i>primer reverse</i> 5'-3'
	ADN-T F	ADN-T R
At3g24540 <i>perk3-1</i>		
SAIL_1055_F12	ACTGACATGACCGAAAAGTGG	GAGAAAACGCATCGAGAATTG
At2g18470 <i>perk4-1</i>		
SALK_034666	CTCCCTGTCCCAAAGGTTAG	TTCCAACGTTAACACCATTTTG
At4g34440 <i>perk5-1</i>		
SAIL_H05_1148	ACAGAATCGCTGCAAATTTTG	AAACGGTGGAGAAACCTTCTC
At4g34440 <i>perk5-2</i>		
WiscDsLox302F06	ACACACATCGACACAGATTGG	AGGGCTTTTGCTTCTACTTGC
At3g18810 <i>perk6-1</i>		
SALK_056076	CCATATGCTTAAACGCAGCTC	TTCCGTATCAAGAACCACCTG
At1g49270 <i>perk7-1</i>		
SALK_000753	TCCGTAGTACGGCATCTGATC	TGTGATCAGTTAATGCGAACG
At1g10620 <i>perk11-1</i>		

SALK_043970	GGGATTGCATGTGGAATATTG	GCAATGCAGGTATCTAGCACC
At1g23540 perk12-1		
SAIL_324_F02	ATTGGGATGTGGCAAGTACTG	TTTTTCCTGGGAAAAGGAAAG
At3g12690 agc1.5-1		
SALK_076780	AGAAGACGAGGAGAGACCAGG	GCTTGAAAGGTTGAGCTGATG
At1g79250 agc1.7-1		
SALK_140378	CCATCAATTCTCGCAGAAAAC	CTGTAGGTCTCATCGACGAGG
Primers específicos para la inserción de ADN-T		
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	líneas SALK
LB3	TAGCATCTGAATTTATAACCAATCTCGATACAC	líneas SAIL
p745	AACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC	líneas WiscDsLox

	RT-PCR F	RT-PCR R
PERK3	TATCAACGGGAGCTGTGGTC	ATACAAGCCCTATGGGAGCC
PERK4	ACAGAAAGAGAGAGAAGAGGCA	AGGAAGAGATTAAGGGGAGAGAGT
PERK5	GCCAACACCACCTTCTTCACC	GCGATGAGGACGGAGATGTAGG
PERK6	GTTCTGCGTCTGTTGCTGTC	TTGATCACCTTTGCCGGTGG
PERK7	TACCCCGCAGGAAAACTGG	GGAGGTGGAGGCAGATTCAC
PERK11	CGTCAAGCGGAAAGCTAACG	CTTGGACGTGCCCATTCGAC
PERK12	GGACCTGTGGTGTCTCCATC	AAACCGGCTACAGCCATACC
AGC1.5	GTTTCTCTGACGCATTACAATCCCTC	GCTGCAGAACTCCATGACCA
ACG1.7	GCTGGGTTCACCAATCACCA	CGTTGACGAAGAGTCCGAAA

PP2A	GTCGACCAAGCGGTTGTGGAGA	ACGCCCAACGAACAAATCACAGA
	<i>Primer AttB1</i>	<i>Primer AttB2</i>
PERK5	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGGACTCACCGGTGGAT</u>	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAAGCTGAGGATTGCGTTTCATT</u>
Promotor PERK3	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGTCAAGCTGAGGATTGCGTT</u>	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGTTCTGTCGACCATACTCGACT</u>
Promotor PERK4	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATAGCGACAATATATGCC</u>	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGAGTCTTTTCTTCTC</u>
Promotor PERK5	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGACGCCTCTCAGTCAA</u>	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGAAAGGGAGAGAG</u>
Promotor PERK6	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGTAGTTGCTTATTGTGG</u>	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGGTCATCTCTCTTTCGGTG</u>
Promotor PERK7	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCTTCCAAGAACAAATG</u>	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTATCTCTCTCTCCGGTGG</u>
Promotor PERK11	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCTTGTTGTTGATAGCAAT</u>	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGTCTTCACCTTGTTT</u>
Promotor PERK12	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCCTAAACTGACGATAT</u>	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCTAAGGCAAAACTAGGG</u>

BIBLIOGRAFÍA

- Abramoff, M.D., Magalhaes, P.J., Ram, S.J.** 2004."Image Processing with ImageJ". Biophotonics International, volume 11, issue 7, pp. 36-42.
- Anderson C. T, Carroll A., Akhmetova L., and Somerville C.** (2010) Real-Time Imaging of Cellulose Reorientation during Cell Wall Expansion in *Arabidopsis* Roots. *Plant Physiol.* 152: 787–796.
- Bai, L., Zhang, G., Zhou, Y., Zhang, Z., Wang, W., Du, Y., Wu, Z. and Song, C. P.** (2009a). Plasma membrane-associated proline-rich extensin-like receptor kinase 4, a novel regulator of Ca signalling, is required for abscisic acid responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **60**, 314-27.
- Bai, L., Zhou, Y. and Song, C. P.** (2009b). *Arabidopsis* proline-rich extensin-like receptor kinase 4 modulates the early event toward abscisic acid response in root tip growth. *Plant Signal Behav* **4**, 1075-7.
- Barnabas B, Fridvaiszky L.** Adhesion and germination of differently treated maize pollen grains on the stigma. *Acta Bot Hungar* 1984; 30:329-32
- Bashline L, Li S, Gu Y** (2014) The trafficking of the cellulose synthase complex in higher plants. *Ann Bot* 114: 1059–1067
- Baumberger, N., Ringli, C. and Keller, B.** (2001). The chimeric leucine-rich repeat/extensin cell wall protein LRX1 is required for root hair morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* **15**, 1128-39.
- Baumberger, N., Steiner, M., Ryser, U., Keller, B. and Ringli, C.** (2003). Synergistic interaction of the two paralogous *Arabidopsis* genes LRX1 and LRX2 in cell wall formation during root hair development. *Plant J* **35**, 71-81.
- Belousov, V.V., et al.,** 2006. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nature methods*, 3(4): p. 281-286.
- Bloch D, Yalovsky S** (2013) Cell polarity signaling. *Curr Opin Plant Biol*16: 734–742
- Boavida L.C., McCormick S** (2007) Temperature as a determinant factor for increased and reproducible *in vitro* pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **52**, 570–582. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03248.x
- Bock KW, Honys D, Ward JM, Padmanaban S, Nawrocki EP, Hirschi KD, Twell D, Sze H** (2006) Integrating membrane transport with male gametophyte development and function through transcriptomics. *Plant Physiol* 140: 1151–1168
- Boisson-Dernier A, Franck CM, Lituiev DS, Grossniklaus U** (2015) Receptor-like cytoplasmic kinase MARIS functions downstream of CrRLK1L-dependent signaling during tip growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 12211-12216

- Boisson-Dernier A, Lituiev DS, Nestorova A, Franck CM, Thirugnanarajah S, Grossniklaus U** (2013) ANXUR receptor-like kinases coordinate cell wall integrity with growth at the pollen tube tip via NADPH oxidases. *PLoS Biol* **11**, e1001719
- Bögre L, Ökrész L, Henriques R y Anthony R G.** 2003. Growth signalling pathways in *Arabidopsis* and the AGC protein Kinases *TRENDS in Plant Science* Vol.8 No.9
- Bojar, D., Martinez, J., Santiago, J., Rybin, V., Bayliss, R., and Hothorn, M.** (2014). Crystal structures of the phosphorylated BRI1 kinase domain and implications for brassinosteroid signal initiation. *Plant J.* 78, 31–43. doi: 10.1111/tpj.12445
- Borassi C, Sede AS, Mecchia M, Muschietti JP and Estevez JM** (2016) An update on cell surface proteins containing extensin-motifs. *J Exp Bot* 76, 477–487.
- Borg M, Brownfield L y Twell D.** (2009) Male gametophyte development: a molecular perspective. *J Exp Bot.* **60**(5):1465-78
- Buehler, M. J.** (2006). Nature designs tough collagen: explaining the nanostructure of collagen fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12285-90.
- 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
- Cecchetti, V., Altamura, M.M., Falasca, G., Costadino, P., Cardarelli, M.** 2008. Auxin Regulates *Arabidopsis* Anther Dehiscence, Pollen Maturation, and Filament Elongation. *The Plant Cell*, Vol. 20: 1760–1774.
- Cheung, A. Y. and Wu, H. M.** (2004). Overexpression of an *Arabidopsis* formin stimulates supernumerary actin cable formation from pollen tube cell membrane. *Plant Cell* **16**, 257-69.
- Cheung, A. Y., Niroomand, S., Zou, Y. and Wu, H. M.** (2010). A transmembrane formin nucleates subapical actin assembly and controls tip-focused growth in pollen tubes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 16390-5.
- Dardelle F, Lehner A, Ramdani Y, Bardor M, Lerouge P, Driouich A, Mollet JC** (2010) Biochemical and immunocytological characterizations of *Arabidopsis* pollen tube cell wall. *Plant Physiol* **153**, 1563–1576
- Dardick, C. et al.** (2007) The rice kinase database. A phylogenomic database for the rice kinome. *Plant Physiol.* 143, 579–586
- Deeks, M. J., Cvrckova, F., Machesky, L. M., Mikitova, V., Ketelaar, T., Zarsky, V., Davies, B. and Hussey, P. J.** (2005). *Arabidopsis* group Ie formins localize to specific cell membrane domains, interact with actin-binding proteins and cause defects in cell expansion upon aberrant expression. *New Phytol* **168**, 529-40.
- Deeks, M. J., Fendrych, M., Smertenko, A., Bell, K. S., Oparka, K., Cvrckova, F., Zarsky, V. and Hussey, P. J.** (2010). The plant formin AtFH4 interacts with both actin and microtubules, and contains a newly identified microtubule-binding domain. *J Cell Sci* **123**, 1209-15.

- Diet, A., Link, B., Seifert, G. J., Schellenberg, B., Wagner, U., Pauly, M., Reiter, W. D. and Ringli, C.** (2006). The *Arabidopsis* root hair cell wall formation mutant *lrx1* is suppressed by mutations in the *RHM1* gene encoding a UDP-L-rhamnose synthase. *Plant Cell* **18**, 1630-41.
- Donnelly, P. M., Bonetta, D., Tsukaya, H., Dengler, R. E. and Dengler, N. G.** (1999) Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of *Arabidopsis*. *Dev. Biol.* **215**, 407-419
- Duan Q, Kita D, Johnson EA, Aggarwal M, Gates L, Wu H-M, Cheung AY** (2014) Reactive oxygen species mediate pollen tube rupture to release sperm for fertilization in *Arabidopsis*. *Nature Comm* **5**, 3129 doi: 10.1038/ncomms4129
- Edlund A.F, Swanson R, Preuss D.** 2004. Pollen and Stigma Structure and Function: The Role of Diversity in Pollination. *The Plant Cell* **16** (suppl 1) S84-S97; DOI: 10.1105/tpc.015800
- Egelund, J., Obel, N., Ulvskov, P., Geshi, N., Pauly, M., Bacic, A. and Petersen, B. L.** (2007). Molecular characterization of two *Arabidopsis thaliana* glycosyltransferase mutants, *rra1* and *rra2*, which have a reduced residual arabinose content in a polymer tightly associated with the cellulosic wall residue. *Plant Mol Biol* **64**, 439-51.
- Estevez, J. M., Kieliszewski, M. J., Khitrov, N. and Somerville, C.** (2006). Characterization of synthetic hydroxyproline-rich proteoglycans with arabinogalactan protein and extensin motifs in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **142**, 458-70.
- Feiguelman G., Fu Y., Yalovskya S.** ROP GTPases Structure-Function and Signaling Pathways. 2018. *Plant Phys.* Vol. 176, pp. 57–79.
- Florentino, L. H., Santos, A. A., Fontenelle, M. R., Pinheiro, G. L., Zerbini, F. M., Baracat-Pereira, M. C. and Fontes, E. P.** (2006). A PERK-like receptor kinase interacts with the geminivirus nuclear shuttle protein and potentiates viral infection. *J Virol* **80**, 6648-56.
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, et al.** (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**, 442–446.
- Fowler, T. J., Bernhardt, C. and Tierney, M. L.** (1999). Characterization and expression of four proline-rich cell wall protein genes in *Arabidopsis* encoding two distinct subsets of multiple domain proteins. *Plant Physiol* **121**, 1081-92.
- Frietsch S, Wang YF, Sladek C, Poulsen LR, Romanowsky SM, Schroeder JI, Harper JF** (2007) A cyclic nucleotide-gated channel is essential for polarized tip growth of pollen. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 14531–14536
- Gao QF, Gu LL, Wang HQ, Fei CF, Fang X, Hussain J, Sun SJ, Dong JY, Liu H, Wang YF** (2016) Cyclic nucleotide-gated channel 18 is an essential Ca²⁺ channel in pollen tube tips for pollen tube guidance to ovules in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**: 3096–310
- Ge Z, Bergonci T, Zhao Y, Zou Y, Du S, Liu MC, Luo X, Ruan H, García-Valencia LE, Zhong S, Hou S, Huang Q, Lai L, Moura DS, Gu H, Dong J, Wu HM, Dresselhaus T, Xiao J, Cheung AY, Qu LJ.** 2017. *Arabidopsis* pollen tube integrity and sperm release are regulated by RALF-mediated signaling. *Science*. **22**;358(6370):1596-1600.doi:10.1126/science.aao3642.

- Gu F, Nielsen E** (2013) Targeting and regulation of cell wall synthesis during tip growth in plants. *J Integr Plant Biol* **55**, 835–846
- Gu Y, Fu Y, Dowd P, Li S, Vernoud V, Gilroy S, Yang Z** (2005) A Rho family GTPase controls actin dynamics and tip growth via two counteracting downstream pathways in pollen tubes. *J Cell Biol* **169**: 127–138
- Haffani, Y. Z., Silva-Gagliardi, N. F., Sewter, S. K., Grace Aldea, M., Zhao, Z., Nakhamchik, A., Cameron, R. K. and Goring, D. R.** (2006). Altered Expression of PERK Receptor Kinases in *Arabidopsis* Leads to Changes in Growth and Floral Organ Formation. *Plant Signal Behav* **1**, 251-60.
- Hall, Q. and Cannon, M. C.** (2002). The cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein RSH is essential for normal embryo development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* **14**, 1161-1172.
- Hamada T** (2014) Microtubule organization and microtubule-associated proteins in plant cells. *Int Rev Cell Mol Biol* **312**: 1–52
- Hamilton ES, Jensen GS, Maksaev G, Katims A, Sherp AM, Haswell ES** (2015) Mechanosensitive channel MSL8 regulates osmotic forces during pollen hydration and germination. *Science* **350**, 438–441
- Held, M. A., Tan, L., Kamyab, A., Hare, M., Shpak, E. and Kieliszewski, M. J.** (2004). Di-isodityrosine is the intermolecular cross-link of isodityrosine-rich extensin analogs cross-linked in vitro. *J Biol Chem* **279**, 55474-82.
- Henty-Ridilla JL, Li J, Blanchoin L, Staiger CJ** (2013) Actin dynamics in the cortical array of plant cells. *Curr Opin Plant Biol* **16**: 678–687
- Hepler PK, Rounds CM and Winship LJ** (2013) Control of cell wall extensibility during pollen tube growth. *Mol Plant* **6**, 998–1017.
- Hepler PK, Vidali L, Cheung AY.** Polarized cell growth in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2001**; **17**:159-87; PMID:11687487; doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.159
- Hepler, P.K.,** Lovy-Wheeler, A., McKenna, S.T., Kunkel, J.G. Ions and pollen tube growth. In *The Pollen Tube: A Cellular and Molecular Perspective*. R. Malho, ed (Berlin, Heidelberg: Springer- Verlag), 2006. pp. 47–69.
- Hernández-Barrera A, Velarde-Buendía A, Zepeda I, Sanchez F, Quinto C, Sánchez-Lopez R, Cheung AY, Wu HM, Cardenas L** (2015) Hyper, a hydrogen peroxide sensor, indicates the sensitivity of the *Arabidopsis* root elongation zone to aluminum treatment. *Sensors (Basel)* **15**, 855–867
- Higashiyama T, Takeuchi H** (2015) The mechanism and key molecules involved in pollen tube guidance. *Annu Rev Plant Biol* **66**: 393–413

- Hijazi, M., Velasquez, S. M., Jamet, E., Estevez, J. M. and Albenne, C.** (2014). An update on post-translational modifications of hydroxyproline-rich glycoproteins: toward a model highlighting their contribution to plant cell wall architecture. *Front Plant Sci* **5**, 395.
- Hiscock S.J, Allen A.M.** 2008. Diverse cell signalling pathways regulate pollen-stigma interactions: the search for consensus. *New Phytol.* 179(2):286-317. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02457.x.
- Hofte, H.** (2014). The Yin and Yang of Cell Wall Integrity Control: Brassinosteroid and FERONIA Signaling. *Plant Cell Physiol.*
- Honys, D. and Twell, D.** (2004). Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Genome Biol* **5**, R85.
- Humphrey, T. V., Haasen, K. E., Aldea-Brydges, M. G., Sun, H., Zayed, Y., Indriolo, E. and Goring, D. R.** (2015). PERK-KIPK-KCBP signalling negatively regulates root growth in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **66**, 71-83.
- Hwang I, Kim SY, Kim CS, Park Y, Tripathi GR, Kim SK, Cheong H.** (2010) Over-expression of the IGI1 leading to altered shoot-branching development related to MAX pathway in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology* **73**, 629–641
- Hwang Y, Lee H, Lee Y-S, Cho H-T.** (2016) Cell wall-associated ROOT HAIR SPECIFIC 10, a proline-rich receptor-like kinase, is a negative modulator of *Arabidopsis* root hair growth. *J. Exp. Bot.* doi: 10.1093/jxb/erw031
- Ingouff, M., Fitz Gerald, J. N., Guerin, C., Robert, H., Sorensen, M. B., Van Damme, D., Geelen, D., Blanchoin, L. and Berger, F.** (2005). Plant formin AtFH5 is an evolutionarily conserved actin nucleator involved in cytokinesis. *Nat Cell Biol* **7**, 374-80.
- Iwano M, Entani T, Shiba H, Kakita M, Nagai T, Mizuno H, Miyawaki A, Shoji T, Kubo K, Isogai A, et al.** (2009) Fine-tuning of the cytoplasmic Ca²⁺ concentration is essential for pollen tube growth. *Plant Physiol* **150**: 1322–1334
- Kaplan B, Sherman T, Fromm H** (2007) Cyclic nucleotide-gated channels in plants. *FEBS Lett* **581**: 2237–2246
- Kaya H, Nakajima R, Iwano M, Kanaoka MM, Kimura S, Takeda S, Kawarazaki T, Senzaki E, Hamamura Y, Higashiyama T.** (2014) Ca²⁺-activated reactive oxygen species production by *Arabidopsis* RbohH and RbohJ is essential for proper pollen tube tip growth. *Plant Cell* **26**, 1069–1080
- Keskiaho, K., Hieta, R., Sormunen, R. and Myllyharju, J.** (2007). Chlamydomonas reinhardtii has multiple prolyl 4-hydroxylases, one of which is essential for proper cell wall assembly. *Plant Cell* **19**, 256-69.
- Kohorn, B. D. and Kohorn, S. L.** (2012). The cell wall-associated kinases, WAKs, as pectin receptors. *Front Plant Sci* **3**, 88.
- Lamport, D. T., Kieliszewski, M. J., Chen, Y. and Cannon, M. C.** (2011). Role of the extensin superfamily in primary cell wall architecture. *Plant Physiol* **156**, 11-9.

- Lang V, Pertl-Obermeyer H, Safiarian MJ, Obermeyer G** (2014) Pump up the volume: a central role for the plasma membrane H⁺ pump in pollen germination and tube growth. *Protoplasma* 251: 477–488
- Lassig R, Gutermuth T, Bey TD, Konrad KR, Romeis T** (2014) Pollen tube NAD(P)H oxidases act as a speed control to dampen growth rate oscillations during polarized cell growth. *Plant J* 78, 94–106
- Leiber, R. M., John, F., Verhertbruggen, Y., Diet, A., Knox, J. P. and Ringli, C.** (2010). The TOR pathway modulates the structure of cell walls in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22, 1898–908.
- Liu P.L, Xie L.L, Li P.W, Mao J.F, Liu H, Gao S.M, Shi P.H, Gong J.Q.** (2016). Duplication and Divergence of Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Protein Kinase (LRR-RLK) Genes in Basal Angiosperm *Amborella trichopoda*. *Front. Plant Sci.* 7, 1952. doi: 10.3389/fpls.2016.01952
- Mayank, P., Grossman, J., Wuest, S., Boisson-Dernier, A., Roschitzki, B., Nanni, P., Nuhse, T. and Grossniklaus, U.** (2012). Characterization of the phosphoproteome of mature *Arabidopsis* pollen. *Plant J* 72, 89–101.
- Mecchia MA, Santos-Fernandez G, Duss NN, Somoza SC, Boisson-Dernier A, Gagliardini V, Martínez-Bernardini A, Fabrice TN, Ringli C, Muschietti JP, Grossniklaus U.** 2017. RALF4/19 peptides interact with LRX proteins to control pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Science*. 22;358(6370):1600–1603. doi: 10.1126/science.aao5467
- Michard E, Lima PT, Borges F, Silva AC, Portes MT, Carvalho JE, Gilliam M, Liu LH, Obermeyer G, Feijó JA** (2011) Glutamate receptor-like genes form Ca²⁺ channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine. *Science* 332, 434–437
- Michard E., Simon A., Tavares B., Wudick M., Feijó J.A.** 2017. Signaling with Ions: The Keystone for Apical Cell Growth and Morphogenesis in Pollen Tubes. *Plant Phys.* 173 (1) 91–111; DOI: 10.1104/pp.16.0156.
- Mishina NM, Markvicheva KN, Bilan DS, Matlashov ME, Shirmanova MV, Liebl D, Schultz C, Lukyanov S, Belousov VV** (2013) Visualization of intracellular hydrogen peroxide with HyPer, a genetically encoded fluorescent probe. *Methods Enzymol* 526, 45–59
- Monshausen GB, Gilroy S.** 2009. Feeling green: mechanosensing in plants. *Trends Cell Biol.* 19:228–35
- Murashige M, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15, 473–497
- Muschietti J., Dircks L., Vancanneyt G., y McCormick S.** LAT52 protein is essential for tomato pollen development: pollen expressing antisense LAT52 RNA hydrates and germinates abnormally and cannot achieve fertilization. *The Plant Journal*, 1994. 6(3): p. 321–38.
- Nagawa S, Xu T, Yang Z** (2010) RHO GTPase in plants: conservation and invention of regulators and effectors. *Small GTPases* 1: 78–88

- Nakagawa Y., Katagiri T., Shinozaki K., Qi Z., Tatsumi H., Furuichi T., Kishigami A., Sokabe M., Kojima I., Sato S., Kato T., Tabata S., Iida K., Terashima A., Nakano M., Ikeda M., Yamanaka T., Iida H.** (2007). Arabidopsis plasma membrane protein crucial for Ca²⁺ influx and touch sensing in roots Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 104, pp. 3639-3644
- Nakhamchik, A., Zhao, Z., Provart, N. J., Shiu, S. H., Keatley, S. K., Cameron, R. K. and Goring, D. R.** (2004). A comprehensive expression analysis of the *Arabidopsis* proline-rich extensin-like receptor kinase gene family using bioinformatic and experimental approaches. *Plant Cell Physiol* **45**, 1875-81.
- Oyama T, Shimura Y, Okada K** (2002) The IRE gene encodes a protein kinase homologue and modulates root hair growth in *Arabidopsis*. *Plant J* **30**, 289–299
- Palanivelu R, Preuss D** (2006) Distinct short-range ovule signals attract or repel *Arabidopsis thaliana* pollen tubes in vitro. *BMC Plant Biol* **6**, 7. doi:10.1186/1471-2229-6-7
- Paredes, A. R., Somerville, C. R. and Ehrhardt, D. W.** (2006). Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science* **312**, 1491-5.
- Pina C, Pinto F, Feijo JA, Becker JD** (2005) Gene family analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome reveals biological implications for cell growth, division control, and gene expression regulation. *Plant Physiol* **138**: 744–756
- Qin, Y., Leydon, A. R., Manziello, A., Pandey, R., Mount, D., Denic, S., Vasic, B., Johnson, M. A. and Palanivelu, R.** (2009). Penetration of the stigma and style elicits a novel transcriptome in pollen tubes, pointing to genes critical for growth in a pistil. *PLoS Genet* **5**, e1000621.
- Ringli C** (2010) Monitoring the outside: cell wall-sensing mechanisms. *Plant Physiol* **153**, 1445-1452
- Ringli, C.** (2010a). The hydroxyproline-rich glycoprotein domain of the *Arabidopsis* LRX1 requires Tyr for function but not for insolubilization in the cell wall. *Plant J* **63**, 662-9.
- Ringli, C.** (2010b). Monitoring the outside: cell wall-sensing mechanisms. *Plant Physiol* **153**, 1445-52.
- Saitou, N. and Nei, M.** (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-25.
- Schnabelrauch, L. S., Kieliszewski, M., Upham, B. L., Alizadeh, H. and Lamport, D. T.** (1996). Isolation of pl 4.6 extensin peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val-Tyr-Lys as putative intermolecular cross-link site. *Plant J* **9**, 477-89.
- Sede AR, Borassi C; Wengier DL, Mecchia MA, Estevez JM, Muschietti JP.** 2018. FEBS Lett. 592(2):233-243. doi: 10.1002/1873-3468.12947
- Shiu, S. H., and Bleeker, A. B.** (2003). Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **132**, 530–543. doi: 10.1104/pp.103.021964
- Shiu, S.H., Karlowski WM, Pan R, Tzeng Y, Mayer KFX, Li W.** (2004) Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Cell* **16**, 1220–1234

- Showalter, A. M., Keppler, B., Lichtenberg, J., Gu, D. and Welch, L. R.** (2010). A bioinformatics approach to the identification, classification, and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins. *Plant Physiol* **153**, 485-513.
- Shpak, E. D.** (2013). Diverse roles of ERECTA family genes in plant development. *J Integr Plant Biol* **55**, 1238-50.
- Silva NF, Goring DR.** (2002) The proline-rich, extensin-like receptor kinase-1 (PERK1) gene is rapidly induced by wounding. *Plant Mol Biol* **50**, 667-685
- Sobko, A.** (2006) Systems Biology of AGC Kinases in Fungi. Sci. STKE. Vol, 2006 pg re9
- Swanson S, Gilroy S.** 2010. ROS in plant development. *Physiol. Plant.* 138:384–92
- Takeuchi H, Higashiyama T** (2016) Tip-localized receptors control pollen tube growth and LURE sensing in Arabidopsis. *Nature* 531: 245–248
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S.** (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596-9.
- Vaid, N., Macovei, A. and Tuteja, N.** (2013). Knights in action: lectin receptor-like kinases in plant development and stress responses. *Mol Plant* **6**, 1405-18.
- Velasquez, S. M., Ricardi, M. M., Dorosz, J. G., Fernandez, P. V., Nadra, A. D., Pol-Fachin, L., Egelund, J., Gille, S., Harholt, J., Ciancia, M.** (2011). O-Glycosylated Cell Wall Proteins Are Essential in Root Hair Growth. *Science* **332**, 1401-1403.
- Velasquez, S. M., Salgado Salter, J., Petersen, B. L. and Estevez, J. M.** (2012). Recent advances on the post-translational modifications of EXTs and their roles in plant cell walls. *Front Plant Sci* **3**.
- Vidali L, McKenna ST, Hepler PK.** (2001). Actin polymerization is essential for pollen tube growth. *Mol. Biol. Cell* 12:2534–45
- Vidali, L., van Gisbergen, P. A., Guerin, C., Franco, P., Li, M., Burkart, G. M., Augustine, R. C., Blanchoin, L. and Bezanilla, M.** (2009). Rapid formin-mediated actin-filament elongation is essential for polarized plant cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 13341-6.
- Wilhelmi LK, Preuss D.** 1996. Self-sterility in *Arabidopsis* due to defective pollen tube guidance. *Science* 274, 1535–1537.
- Wolf S, Höfte H.** (2014) Growth control: a saga of cell walls, ROS, and peptide receptors. *The Plant Cell Online* **26**, 1848-1856
- Wolf, S. Hematy K, Höfte H.** 2012 (2012) Growth control and cell wall signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **63**, 381–407
- Won, S. K., Lee, Y. J., Lee, H. Y., Heo, Y. K., Cho, M. and Cho, H. T.** (2009). Cis-element- and transcriptome-based screening of root hair-specific genes and their functional characterization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **150**, 1459-73.

- Wu, J.Z.; Lin, Y.; Zhang, X.L.; Pang, D.W.; Zhao, J.** IAA stimulates pollen tube growth and mediates the modification of its wall composition and structure in *Torenia fournieri*. *J. Exp. Bot.* 2008, 59, 2529–2543.
- Wudick, M.M., and Feijó, J.A.** (2014) At the intersection: Merging Ca²⁺ and ROS signaling pathways in pollen. *Molecular Plant* **7**, 1595-1597
- Zhang Y, McCormick S.** 2009. AGCVIII kinases: at the crossroads of cellular signaling. *Trends Plant Sci* 14:689-95
- Zhang, Y. He, J., McCormick S.** 2009. Two Arabidopsis AGC kinases are critical for the polarized growth of pollen tubes. *Plant J.* 58(3):474-84. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03792.x
Trends in Plant Science Vol.14 No.12 694
- Ye, J., Zheng, Y., Yan, A., Chen, N., Wang, Z., Huang, S. and Yang, Z.** (2009). *Arabidopsis* formin3 directs the formation of actin cables and polarized growth in pollen tubes. *Plant Cell* **21**, 3868-84.
- Yi, K., Guo, C., Chen, D., Zhao, B., Yang, B. and Ren, H.** (2005). Cloning and functional characterization of a formin-like protein (AtFH8) from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **138**, 1071-82.
- Zegzouti H, Li W, Lorenz TC, Xie M, Payne CT, Smith K, Glenny S, Payne GS, Christensen SK.** (2006) Structural and functional insights into the regulation of *Arabidopsis* AGC VIIIa kinases. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 35520–35530
- Zhang Y, McCormick S** (2007) A distinct mechanism regulating a pollenspecific guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rop in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 18830–18835
- Zhou Z, Shi H, Chen B, Zhang R, Huang S, Fu Y** (2015) *Arabidopsis* RIC1 severs actin filaments at the apex to regulate pollen tube growth. *Plant Cell* 27: 1140–1161