



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**“Estudio de las extensinas específicas de polen (LRXs)
involucradas en el crecimiento polarizado de tubos
polínicos en *Arabidopsis thaliana*”**

Tesis presentada para optar al título de Doctora

de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Lic. Ana Rocío Sede

Director de tesis: Dr. Jorge P. Muschietti

Co-director de tesis: Dr. José M. Estevez

Consejero de Estudios: Dr. Pablo Cerdán

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular

“Dr. Héctor N. Torres”, INGEBI-CONICET.

Buenos Aires, marzo de 2019

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	6
AGRADECIMIENTOS	8
GLOSARIO	9
PUBLICACIONES	11
INTRODUCCIÓN	12
1. La reproducción sexual en plantas.....	12
2. El desarrollo del grano de polen	13
3. Crecimiento polarizado del tubo polínico.....	17
4. Regulación iónica durante el crecimiento del tubo polínico	19
4.1. El rol del Ca ²⁺ como segundo mensajero	19
4.2. Gradiente de protones.....	22
4.3. La importancia del K ⁺	22
5. Implicancia de las especies reactivas del oxígeno en el crecimiento polarizado.....	22
6. Importancia de la pared celular durante el crecimiento polarizado del tubo polínico	23
7. Rol de las proteínas estructurales en el ensamblado de la pared celular	27
7.1. Características y clasificación de las extensinas (EXTs).....	27
8. Modificaciones post-traduccionales de las EXTs: Hidroxilación y O-glicosilación	28
8.1. Importancia de las Prolil-4-hidroxilasas (P4Hs) en la hidroxilación de las EXTs	28
8.2. Enzimas implicadas en la O-glicosilación de las EXTs.....	31
9. <i>Leucine-rich repeat extensins</i> (LRXs)	33
10. Sensado de la integridad de la pared celular	36
HIPÓTESIS	40
OBJETIVO GENERAL	40
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
MATERIALES Y MÉTODOS	41
1. Expresión <i>in silico</i> de los genes <i>LRXs</i>	41
2. Alineamiento de secuencias aminoacídicas.....	41
3. Material vegetal	41
3.1. Condiciones de crecimiento.....	41

3.2. Líneas mutantes simples de inserción por ADN-T	42
4. Extracción de ADN genómico de tejido vegetal	42
5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	43
6. Extracción de ARN de polen de <i>Arabidopsis</i> y PCR con Transcripción Reversa (RT-PCR)	45
7. Estudio de la segregación de líneas mutantes	46
8. Análisis de la fertilidad	47
9. Germinación <i>in vitro</i> de polen de <i>Arabidopsis thaliana</i>	47
9.1. Ensayos de inhibición de las enzimas P4Hs	48
10. Ensayos de polinización semi- <i>in vivo</i> e <i>in vivo</i>	48
11. Tinción de pectinas, calosa y celulosa y niveles de EROs de tubos polínicos germinados <i>in vitro</i>	49
12. Extracción de proteínas de polen	50
13. SDS-PAGE y <i>Western blot</i>	51
14. Obtención de plantas transgénicas pP4H4:: <i>P4H4-YFP</i>	52
RESULTADOS	53
CAPÍTULO I	53
1. Análisis <i>in silico</i> de la expresión de los genes <i>LRX</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	53
2. Análisis filogenético de la familia de las <i>LRXs</i>	55
3. Estructura modular de las proteínas <i>LRXs</i>	55
4. Obtención y análisis de las mutantes simples de inserción de los genes <i>LRX8-LRX11</i>	58
5. Obtención de mutantes múltiples por cruzamiento	59
6. Evaluación de los parámetros de fertilidad de las mutantes de <i>LRXs</i>	60
6.1. Ensayos de germinación de polen <i>in vitro</i>	60
6.2. Estudio de la distribución de polisacáridos en la pared celular de la mutante triple <i>lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1</i>	66
6.3. Estudio de los niveles de EROs en tubos polínicos de la mutante triple <i>lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1</i>	70
7. Evaluación de los parámetros de fertilidad de las líneas mutantes de <i>LRXs</i>	71
7.1. Ensayos de germinación semi- <i>in vivo</i> e <i>in vivo</i>	71
7.2. Análisis del número de semillas por silicua de la mutante triple <i>lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1</i>	74
7.3. Análisis de la segregación de las líneas mutantes de <i>LRXs</i>	74
8. Ensayo de <i>Western blot</i>	76

CAPÍTULO II	78
1. Análisis de expresión de los genes <i>P4H</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	78
2. Obtención y análisis de las mutantes simples de inserción para los genes <i>P4H4</i> y <i>P4H6</i>	80
3. Análisis filogenético y estructura proteica de <i>P4H4</i> y <i>P4H6</i>	81
4. Determinación de los niveles de transcripto en líneas mutantes.....	82
5. Análisis del fenotipo de tubos polínicos de las mutantes <i>p4hs</i>	82
5.1. Ensayos de germinación <i>in vitro</i>	83
5.2. Ensayos de polinización <i>in vivo</i>	85
5.3. Ensayos de inhibición química de las P4Hs.....	87
6. Análisis de la integridad de la pared celular de tubos polínicos <i>p4h4 p4h6</i>	89
7. Estudio de la localización subcelular de <i>P4H4</i>	89
DISCUSIÓN	91
BIBLIOGRAFÍA	102

RESUMEN

“Estudio de las extensinas específicas de polen (LRXs) involucradas en el crecimiento polarizado de tubos polínicos en *Arabidopsis thaliana*”

El crecimiento celular polarizado de los tubos polínicos es un proceso oscilatorio que implica una compleja regulación de iones Ca^{2+} , especies reactivas de oxígeno (EROs) y alto tráfico vesicular hacia la zona apical. Durante este proceso ocurre la constante remodelación de la pared celular, la cual debe ser rígida para soportar las presiones citoplasmáticas laterales de turgencia pero a la vez flexible en la zona apical para posibilitar el crecimiento. Para esto, es crucial que el ensamblado de la pared celular se encuentre estrictamente regulado mediante la construcción de una red flexible generada por el entrecruzamiento entre glicoproteínas específicas y homogalacturonanos presentes en el espacio apoplástico.

En angiospermas, las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) constituyen una de las familias más abundantes de proteínas estructurales que mayor número de modificaciones post-traduccionales sufre. Miembros de esta familia son las extensinas (EXTs), los arabinogalactanos asociados a proteínas (AGPs) y las proteínas repetitivas en prolina (PRPs). Dentro de las EXTs, se encuentra la subfamilia de las proteínas LRXs (*Leucine-rich repeat extensins*) constituida por 11 miembros, de los cuales 4 (*LRX8*, *LRX9*, *LRX10* y *LRX11*), se expresan específicamente en polen maduro y tubo polínico. Dichas proteínas, presentan una estructura modular formada por un dominio N-terminal rico en repeticiones de leucina (LRR) y un dominio C-terminal de tipo extensina plausible de ser glicosilado. En este trabajo de tesis, caracterizamos y estudiamos la función de las proteínas LRXs de polen (*LRX8*, *LRX9*, *LRX10* y *LRX11*). Mediante ensayos fisiológicos se demostró que la ausencia de las proteínas *LRX8-LRX11*, afecta la germinación de los granos de polen, ocasiona alteraciones en la integridad de los tubos polínicos y provoca desviaciones en la herencia mendeliana. Así mismo, se observó mediante microscopía

confocal, que la mutante triple pérdida de función *lrx9 lrx10 lrx11* presenta fallas en el ensamblado de la pared celular, tales como la deposición alterada de los polisacáridos más abundantes, calosa y pectina. Las evidencias obtenidas sugieren que las proteínas LRX8-LRX11 son necesarias para el mantenimiento de la integridad de la pared celular de los tubos polínicos durante el crecimiento celular polarizado.

El motivo EXT presente en las HRGPs se caracteriza por poseer numerosas repeticiones de la secuencia Ser(Pro)₃₋₅. Previo a ser secretadas a la pared celular, es necesario que ocurran tres modificaciones post-traduccionales (MPTs): la monogalactosilación de los residuos serina (Ser) (*N*-glicosilación), la hidroxilación de los residuos prolina (Pro) a hidroxiprolina (Hyp) y la posterior *O*-glicosilación de la Hyp. Las enzimas responsables de catalizar la hidroxilación de Pro son las prolil-4-hidroxilasas (P4Hs). Es por ello que estudiamos el rol de las proteínas P4H4 y P4H6, de alta expresión en polen, y la importancia de la hidroxilación de las HRGPs. Los resultados obtenidos mostraron que las mutantes simples *p4h4*, *p4h6* y la mutante doble *p4h4 p4h6*, presentan una disminución en la tasa de germinación de los granos de polen. Resultados similares se obtuvieron al bloquear la acción de las enzimas P4Hs empleando los inhibidores químicos EDHB (etil-3,4-dihidroxibenzoato) y DP (α,α -dipiridil). Si bien se observó una reducción en el largo de los tubos polínicos de la mutante doble *p4h4 p4h6*, la disposición y el contenido de pectina en la pared celular de tubos polínicos mutantes fue similar al de plantas *wild type*. Finalmente, se determinó la posible localización subcelular de la enzima P4H4 en el retículo endoplasmático (RE)/aparato de Golgi en tubos polínicos de plantas transgénicas expresando la construcción *pP4H4::P4H4-YFP*. En base a lo observado, proponemos que la hidroxilación de las HRGPs, y posiblemente de las LRXs, sería catalizada por las P4Hs en el RE/aparato de Golgi y sería necesaria principalmente durante los primeros estadios del desarrollo del tubo polínico. Sin embargo, se requerirán nuevos estudios para determinar si, además de P4H4 y P4H6, existe otra enzima de la familia P4H implicada en la hidroxilación de las HRGPs, particularmente las LRX de polen.

ABSTRACT

“Study of pollen specific extensins (LRXs) involved in polarized growth of pollen tubes in *Arabidopsis thaliana*”

In angiosperms, hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs) are cell wall proteins which exhibit a high number of post-translational modifications (PTM). Members of this family are the extensins (EXTs), arabinogalactan-proteins (AGPs) and proline-rich proteins (PRPs). The LRXs (Leucine-rich repeat extensins), belong to the EXTs family; there are 11 members in *Arabidopsis*, 4 of which (*LRX8*, *LRX9*, *LRX10* and *LRX11*) are highly express in mature pollen and pollen tubes. These chimeric proteins contain an N-terminal LRR (Leucine-rich repeat) domain followed by a Cys-rich domain and a C-terminal EXT-like domain. In this study, we demonstrated the involvement of pollen-specific LRXs proteins (*LRX8*, *LRX9*, *LRX10*, and *LRX11*) in cell wall assembly during polarized growth of pollen tubes. We observed by performing physiological assays, that the lack of *LRX8-LRX11* affect the germination rate of pollen grains, the cell wall integrity of pollen tubes and alter mendelian inheritance. By using confocal microscopy, we observed that the triple mutant *lrx9 lrx10 lrx11* exhibit altered deposition of callose and pectin at the cell wall. These results suggested that *LRX8-LRX11* proteins are necessary to maintain pollen tube cell wall integrity during polarized growth.

The EXT motif from HRGPs proteins is characterized by the presence of numerous repetitions of Ser(Pro)₃₋₅ sequence. Before EXTs are secreted to the cell wall, several PTMs occurs over the Ser(Pro)₃₋₅ motif: Ser monogalatosylation (*N*-glycosylation), hydroxylation of Pro to hydroxyproline (Hyp) and *O*-glycosylation of Hyp. The hydroxylation of Pro is exclusive from plants and is catalyzed by proli-4-hydroxylases (P4Hs). According to that, we were focused in the functional study of P4H4 and P4H6 enzymes, highly expressed in pollen, and to explore the relevance of HRGPs hydroxylation. Our results showed a decrease in germination rates of *p4h4* and *p4h6* simple mutants and

p4h4 p4h6 double mutant pollen grains. Similar results were obtained by blocking P4Hs activity applying EDHB (ethyl 3,4-dihydroxybenzoate) and DP (α,α -dipyridyl) inhibitor to the medium. Although a reduction in pollen tube length was observed for *p4h4 p4h6* double mutant, these phenotype could not be explained by changes of the pectin content and deposition, since this polysaccharide remains unaltered at the cell wall. Finally, we observed the subcellular localization of P4H4 in the endoplasmic reticulum/Golgi apparatus of growing pollen tubes. Further analysis is required to explore the implication of other/s P4H enzyme/s, besides P4H4 and P4H6, in HRGP hydroxylation and to study deeply the relevance of this PTM over pollen structural proteins.

AGRADECIMIENTOS

Les quiero agradecer enormemente a las personas que me acompañaron en estos años:

A Jorge y José por guiarme constantemente, por la paciencia y por brindarme todo lo necesario para lograr este objetivo.

A Diego, por estar siempre dispuesto a ayudar y la buena predisposición.

A mis compañeros de laboratorio con los que comparto el día a día por la ayuda, la contención y lograr que todo sea más ameno y divertido (que no es poca cosa), Sofi, Deni, Mari, Lu y Fran.

A Martín y Ceci por la dedicación y por enseñarme a dar los primeros pasos en el mundo del polen, y a mis compañeros del Instituto Leloir.

A Noe, Fede M. y en particular a Fede A. por ayudarme a resolver mis problemas técnicos con la computadora.

A Agus, Mari, Eva y Leo y a mis compañeros del 221/230: Esteban, Lean, Flor, Lau, Cristian, Julián, Carol y las ex integrantes del laboratorio Regi, Vicky y July.

A la “combi del oeste”, Lu y Marin, por hacer de Gral. Paz un lugar mejor.

A mis amigas de la vida: Mari, Sofi, Mica, Marie, Lu, Noe, Euge, Caty J., Caty R. y Maru, por acompañarme en todo momento.

A mis papás, Marcela y David, y a mis hermanos, Pau y Tomy, por el amor, la contención y por alentarme siempre a seguir adelante. A mi hermosa familia por brindarme su apoyo y cariño incondicional aunque sea a la distancia y a mi fiel amigo Ciro. A mis abuelas Lela y Pocha y al abuelo “Papi” por estar siempre pendientes de mis pasos.

Sin ustedes no lo hubiera logrado...

GLOSARIO

AA: Solución de azul de anilina

ADNc: ADN copia

ADN-T: Líneas mutantes insercionales de ADN de transferencia

AGPs: *Arabinogalactan proteins*

ANX: ANXUR; receptor quinasa de expresión diferencial en polen

BUPS: *Buddha's Paper Seal*; receptor quinasa de expresión diferencial en polen

Col-0: Columbia-0; genotipo salvaje de *Arabidopsis thaliana*

Cys: Cisteína

DP: α,α -dipiridil; inhibidor de P4Hs

EDHB: etil-3,4-dihidroxibenzoato; inhibidor de P4Hs

EROs: Especies reactivas del oxígeno

EXT: Extensina

FER: FERONIA; receptor quinasa con dominios de tipo malectina

GFP: Proteína verde fluorescente

H₂DCF-DA: Diclorofluoresceína (DCF)

HG: Homogalacturonano

HRGPs: *Hydroxyproline-rich glycoproteins*

Hyp: Hidroxiprolina

IP: Ioduro de propidio

LePRK: Receptores LRR específicos de polen de tomate

LRR: *Leucine-rich repeat*; dominio rico en repeticiones de leucina

MEC: Matriz extracelular

MPG: Medio de germinación de polen

MPT: Modificación post-traducciona

OG: 2-oxoglutarato; cofactor de las P4Hs

P4Hs: Enzimas Prolyl-4-hidroxilasa

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PME: *Pectin methylesterase*

PMEI: *Pectin methylesterase inhibitor*

Pro: Prolina

RE: Retículo endoplasmático

RGI: Ramnogalacturonano I

RGII: Ramnogalacturonano II

Rho GTPasa: familia de pequeñas de proteínas de la superfamilia Ras involucradas en señalización con actividad GTP-asa

ROPs: *Rho of plants*

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa

S4B: *Pontamine Fast Scarlet*

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

Ser: Serina

Tyr: Tirosina

UDP-D-Glc: Uridina di-fosfato-D-glucosa

UDP-L-Rha: Uridina di-fosfato-L-ramnosa

Esta tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

Sede AR*, Borassi C*, Wengier DL, Mecchia MA, Estevez JM and Muschietti JP. "Arabidopsis pollen extensins LRX are required for cell wall integrity during pollen tube growth". (2018) FEBS Lett. 592(2):233-243. doi: 10.1002/1873-3468.12947.

Borassi C*, **Sede AR***, Mecchia MA, Salgado Salter JD, Marzol E, Muschietti JP and Estevez JM. "An update on cell surface proteins containing extensin-motifs". (2016). J Exp Bot. 67(2):477-87. doi: 10.1093/jxb/erv455.

Marzol E, Borassi C, Bringas M, **Sede AR**, Rodríguez Garcia DR, Capece L and Estevez JM. "Filling the Gaps to Solve the Extensin Puzzle". (2018) Mol Plant. 7;11(5):645-658. doi: 10.1016/j.molp.2018.03.003.

*Estos autores contribuyeron igualmente

INTRODUCCIÓN

1. La reproducción sexual en plantas

A diferencia de los animales, en donde las líneas germinales se establecen durante la embriogénesis y constituyen una población celular diferente, las gametas de las plantas se originan en estadíos tardíos del desarrollo. Las plantas, mantienen una población de células madres indiferenciadas capaces de originar diversos tejidos y órganos reproductivos diploides que sirven como pilares para la formación de micro y megasporas haploides a través de divisiones meióticas (Twell, 2011).

Dentro del reino Plantae, las angiospermas constituyen el grupo más amplio y diverso. La ventaja evolutiva de las angiospermas reside en la capacidad de desarrollar flores, órganos portadores de las gametas y objeto de atracción de los polinizadores. Las flores perfectas poseen tanto órganos reproductivos masculinos como femeninos, tal es el caso de *Arabidopsis thaliana* (**Figura I1**). El órgano reproductor masculino es el estambre, formado por el filamento y la antera dentro de la cual se desarrolla el grano de polen. Por otro lado, el órgano reproductor femenino es el carpelo y está constituido por el estigma, el estilo y el ovario. El estigma presenta una cubierta celular formada por las células papilares, quienes participan en el reconocimiento y adhesión del grano de polen y se conecta con el ovario a través del estilo. El óvulo es el órgano que se forma en el ovario y contiene al saco embrionario que a su vez comprende a la oosfera (o gameta femenina), dos células sinérgidas, una célula polar y tres células antípodas. Una vez producida la doble fertilización (ver siguiente sección), se origina el embrión el cual se desarrollará dentro del fruto, silicua en el caso de *Arabidopsis*.

El grano de polen es el gametofito masculino y, en *Arabidopsis*, en su último estadio de desarrollo, se encuentra formado por tres células: una célula vegetativa encargada de dar origen al tubo polínico y dos células espermáticas (gametas masculinas). Además, en

su exterior presenta una cubierta superficial externa (exina) extremadamente resistente que le confiere tolerancia a diferentes condiciones ambientales prolongando así su viabilidad a lo largo del tiempo y protegiendo en su interior a las células espermáticas (Shi et al., 2015). Durante la reproducción sexual, el tubo polínico es el encargado de transportar, de forma rápida y eficiente, a las gametas masculinas desde el estigma y a través del tracto transmisor del estilo hasta alcanzar el óvulo para producir la doble fertilización y dejar descendencia (Krichevsky et al., 2007) (**Figura I1**). En los últimos años, el estudio de los tubos polínicos ha adquirido gran importancia no solo por su rol en la fertilización, sino también como modelo de estudio del crecimiento polarizado.

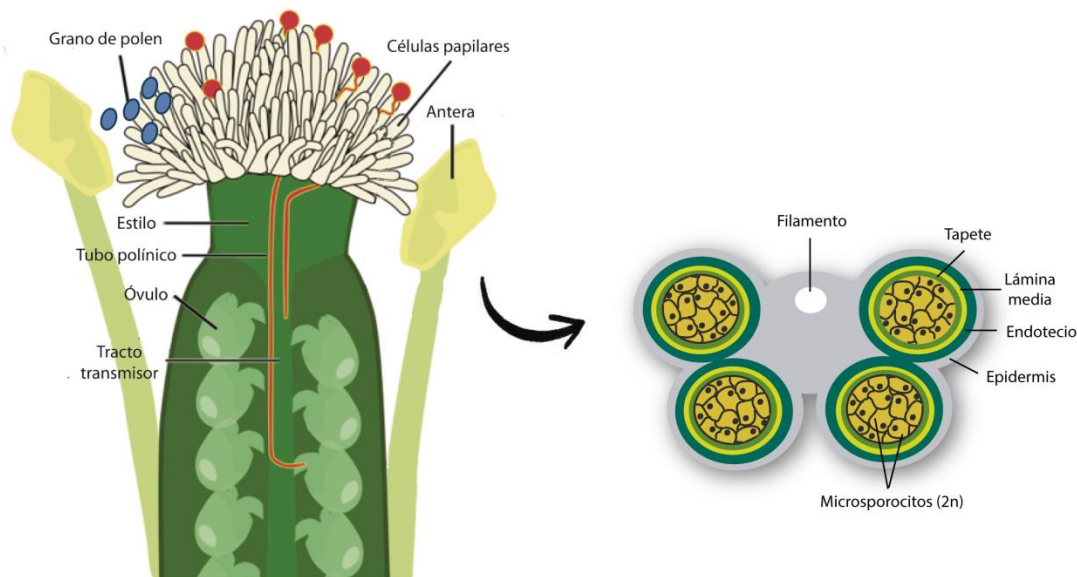


Figura I1. Esquema de la anatomía de la flor de *Arabidopsis thaliana* (izquierda; modificado de Zhen Gao; <http://thenode.biologists.com/all-beauty-must-die/research/>). Los granos de polen deshidratados (amarillo) al posarse sobre el estigma de una flor compatible, se hidratan (rojo), aumenta la presión de turgencia interna y comienza a emerger el tubo polínico; Estructura interna de la antera (derecha).

2. El desarrollo del grano de polen

El desarrollo del grano de polen involucra dos grandes etapas secuenciales denominadas microsporogénesis y microgametogénesis. La **microsporogénesis** comienza

en las anteras (ver **Figura I1**), donde las células madre del polen ($2n$), también llamadas microsporocitos, sufren un proceso de división meiótica (Meiosis I y Meiosis II) originando una tétrada de microesporas haploides rodeadas de una gruesa capa de calosa, un β -1,3 glucano que evita que las paredes de las microesporas se fusionen (**Figura I2**).

Por acción de la enzima calasa, proveniente del tapete (región interna nutritiva de la antera), la calosa es degradada y las microesporas uninucleadas son liberadas. Dichas microesporas tienen la particularidad de presentar una gran vacuola centralizada que desplaza al núcleo hacia un extremo de la célula. Durante la etapa de **microgametogénesis**, cada microespora haploide sufre una división mitótica de tipo asimétrica (Mitosis I), originando una célula generativa pequeña, embebida en el citoplasma de una célula vegetativa de mayor tamaño y ubicada en uno de los polos, próxima a la pared celular (estadío de grano de polen bicelular) (**Figura I2**) (McCormick, 2004). Trabajos previos han demostrado que los microtúbulos contribuyen al establecimiento de la localización polar de la célula generativa y que la división asimétrica es esencial para su correcta diferenciación (McCormick, 2004). Los destinos celulares de estas células hijas y los programas de expresión génica son diferentes entre ellas: la célula vegetativa no se dividirá nuevamente y posteriormente dará origen al tubo polínico, mientras que la célula generativa sufrirá una nueva división mitótica, esta vez simétrica (Mitosis II), dando origen a dos células espermáticas (estadío de grano de polen tricelular) (**Figura I2**) (McCormick, 2004). El momento en que se produce este segundo evento mitótico varía dependiendo de la especie; en Gramíneas y Crucíferas, como *Arabidopsis thaliana*, ocurre dentro de las anteras, mientras que en la mayoría de las especies vegetales tiene lugar posteriormente durante el crecimiento del tubo polínico. Previamente a ser liberado de la antera, el grano de polen sufre un proceso importante de deshidratación alcanzando un contenido hídrico mínimo (Firon *et al.*, 2012), que varía entre el 6% al 60% dependiendo de la especie, y manteniendo un metabolismo quiescente que le confiere tolerancia a diferentes tipos de estreses ambientales (estadío de grano de polen maduro).

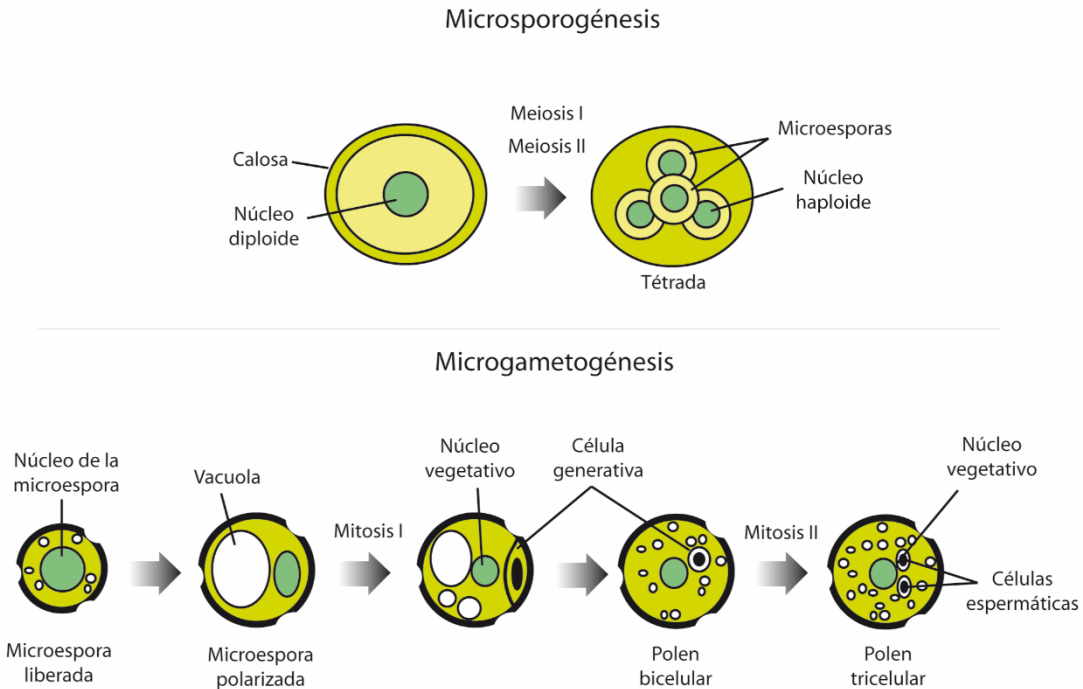


Figura 12. Etapas del desarrollo del grano de polen (esquema adaptado de David Twell; <https://www2.le.ac.uk/departments/genetics/people/twell/lab/pollenis/development>).

En el caso de las plantas con estigma seco, como *Arabidopsis thaliana*, la adhesión inicial entre el grano de polen y las células papilares del estigma es fuerte y altamente selectiva. Dicha interacción se establece entre las moléculas lipofílicas presentes en la exina y la cubierta proteica externa de las células papilares (Zinkl et al., 1999). Una vez establecida la interacción polen-estigma compatible, el grano de polen se rehidrata rápidamente, aumenta la presión de turgencia en el interior celular y comienza a emerger el tubo polínico el cual se elonga y penetra en el tracto transmisor del estilo (ver **Figura 11**). Las células que conforman el tracto transmisor se encuentran cubiertas con una matriz extracelular (MEC) rica en nutrientes. Las proteínas altamente glicosiladas, denominadas AGPs (*Arabinogalactan Proteins*), son los componentes mayoritarios de la MEC y estarían implicadas en el crecimiento y direccionamiento del tubo polínico hacia los óvulos (Cheung, 2000). En las últimas décadas, ha sido de gran interés profundizar en el estudio

de los mecanismos de polinización y fertilización, lo que ha llevado a la identificación de nuevos actores, como proteínas receptoras y moléculas señalizadoras presentes en la pared celular del tubo polínico y del pistilo, que estarían involucradas en la continua comunicación entre ambos componentes (Higashiyama y Takeuchi, 2015; Muschietti y Wengier, 2018).

Una vez que los tubos polínicos atraviesan el tracto transmisor, alcanzan el funículo y son guiados hacia el micrópilo, pequeña apertura ubicada en el extremo del óvulo, alcanzando finalmente al saco embrionario (**Figura 13**). El ingreso del tubo polínico al óvulo se produce a través de una de las dos células sinérgidas, células especializadas ubicadas adyacentes a la célula huevo que tienen un rol fundamental en el proceso de guiado del tubo polínico hacia el saco embrionario. Se ha identificado una familia de péptidos llamados LURE, secretados por las células sinérgidas, como un nuevo grupo de quimioattractantes involucrados en orientar al tubo polínico hacia el óvulo (Okuda et al., 2009; Takeuchi and Higashiyama, 2016). Luego de su entrada, el tubo polínico detiene su crecimiento y explota descargando su contenido citoplasmático, liberando así a las células espermáticas dentro del saco embrionario (Twell, 2006). La célula sinérgida que recibe al tubo polínico se desintegra en el momento de su ingreso (Punwani and Drews, 2008). Lo que ocurre luego es un evento de doble fertilización: el núcleo de una de las células espermáticas se fusiona con el núcleo de la célula huevo, mientras que el núcleo correspondiente a la segunda célula espermática se fusiona con los dos núcleos haploides de la célula central, dando lugar a la formación del embrión ($2n$) y del endosperma ($3n$), respectivamente (**Figura 13**).

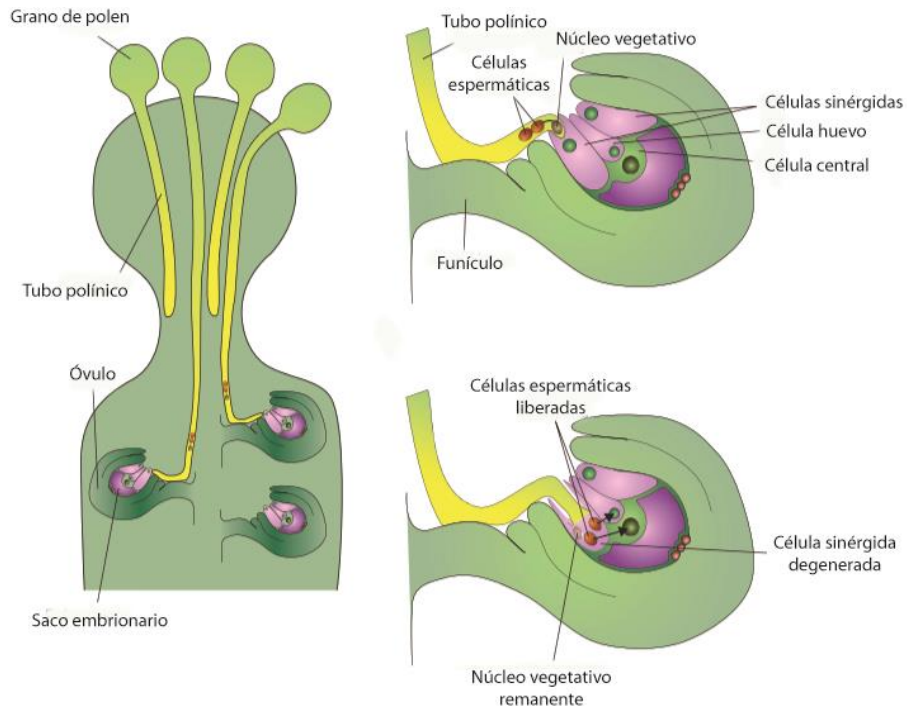


Figura I3. Esquema del proceso de doble fertilización (adaptado de Twell, 2006).

3. Crecimiento polarizado del tubo polínico

Como se detalló anteriormente, la función del tubo polínico es la de transportar de manera rápida y eficiente las gametas masculinas hacia el saco embrionario para producir la doble fertilización. El crecimiento del tubo polínico ocurre de manera polarizada, es decir, la elongación se produce solamente a través de su extremo o región apical, alcanzando velocidades de hasta 1 cm/h en maíz (Barnabas and Fridvalszy, 1984). Además del tubo polínico, existen diferentes tipos celulares que exhiben crecimiento polarizado tales como los pelos radicales, las hifas de los hongos, las fibras del algodón y los conos axonales de las neuronas.

La principal actividad metabólica del tubo polínico consiste en la síntesis de material necesario para el remodelado de la pared celular y la generación de nueva membrana necesaria para la elongación. La pared celular del tubo polínico debe ser lo suficientemente rígida para soportar la presión citoplasmática de turgencia, pero a la vez

flexible en la región apical para posibilitar su crecimiento polarizado (ver siguiente sección). La disposición compartimentalizada del citoplasma del tubo polínico y la distribución asimétrica de las organelas a lo largo del tubo, son cruciales para mantener el crecimiento polarizado (**Figura I4**). A medida que el tubo polínico se elonga, ocurre la deposición distal de calosa, desplazando el citoplasma hacia la zona apical de elongación (Cheung and Wu, 2008). La zona apical o clara del tubo polínico, constituye una región carente de organelas pero abundante en vesículas destinadas a exocitosis (Hepler and Winship, 2015). De manera de facilitar el transporte y la distribución de recursos, los tubos polínicos mantienen un patrón de flujo citoplasmático de fuente reversa: las organelas junto con las vesículas, se mueven hacia la región apical cercanas a la periferia del tubo polínico y luego las vesículas invierten su sentido en la región subapical para fluir hacia el centro del tubo (Cai and Cresti, 2009). Las vesículas destinadas a exocitosis se agregan formando un cono invertido que se posiciona contra la membrana plasmática en el ápice (*tip*) del tubo polínico (**Figura I4**).

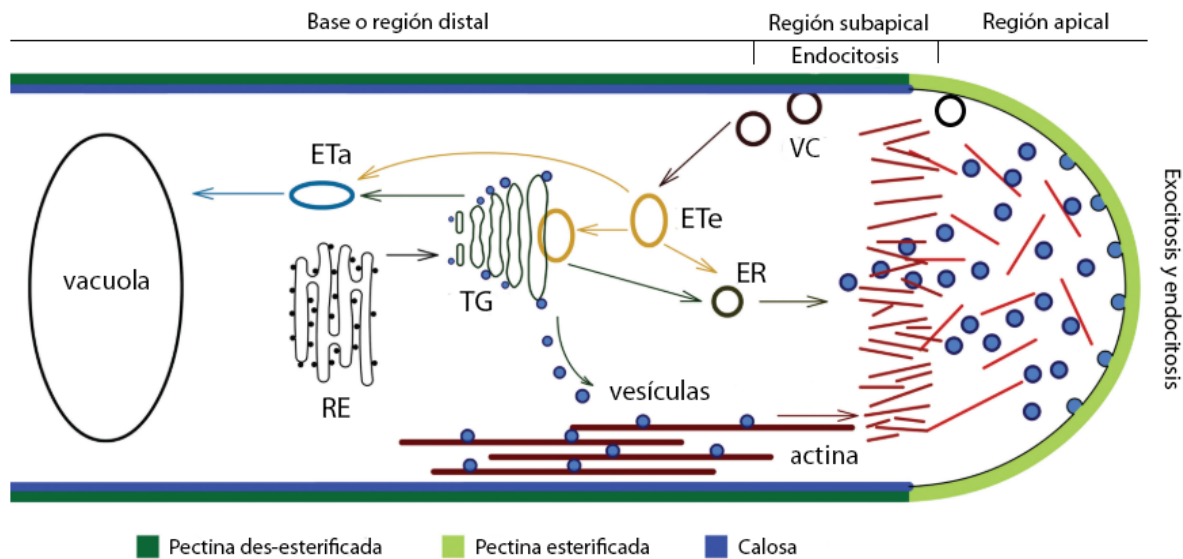


Figura I4. Regulación estructural del crecimiento del tubo polínico. Diagrama resumido de la organización intracelular de un tubo polínico en crecimiento, incluyendo el citoesqueleto de actina, eventos de exocitosis y endocitosis y dinámica de la pared celular (Guan et al., 2013). VC: vesícula de clatrina; ETe: endosoma temprano; ETa: endosoma tardío; ER: endosoma de reciclaje; TG: trans-Golgi; RE: retículo endoplasmático.

4. Regulación iónica durante el crecimiento del tubo polínico

La expansión polarizada del tubo polínico es un proceso de tipo oscilatorio, presentando fases de crecimiento rápido seguidas de fases de crecimiento lento. Este tipo de crecimiento se mantiene gracias a una coordinada regulación del citoesqueleto de actina, el flujo de iones, eventos de endo y exocitosis y cambios en las propiedades de la pared celular que generan variaciones en la presión de turgencia, fuerza impulsora del crecimiento apical. Los iones calcio (Ca^{2+}) y potasio (K^+) y los protones (H^+), tienen un rol fundamental en el crecimiento de los tubos polínicos.

4.1. El rol del Ca^{2+} como segundo mensajero

Los tubos polínicos tienen la particularidad de presentar un gradiente apical de Ca^{2+} que se mantiene principalmente gracias al influjo de Ca^{2+} extracelular en la región apical, a través de canales asociados a la membrana plasmática (**Figura 15**). Las concentraciones citoplasmáticas de Ca^{2+} varían entre 2-10 μM en el ápice y permanecen en el rango de 20-200 nM en la base del tubo (Steinhorst and Kudla, 2013). Este gradiente apical de Ca^{2+} oscila a la misma frecuencia que la tasa de crecimiento, pero se encuentra retrasado respecto a éste último (Messerli et al., 2000). Se ha demostrado que la inhibición del gradiente de Ca^{2+} , modifica los patrones de flujo citoplasmáticos ocasionando la detención del crecimiento polarizado (Pierson et al., 1994), lo que define su importancia. Con el fin de mantener el gradiente oscilatorio, el Ca^{2+} que ingresó a través de la membrana plasmática en la región apical, debe ser inmediatamente llevado a compartimentos de reserva, como el retículo endoplasmático (Iwano et al., 2009), o enviado al medio extracelular. En tal sentido, se han descrito putativos canales de influjo de Ca^{2+} y bombas y *antiporters* de eflujo necesarios para regular dicho gradiente (**Figura 15**). El influjo de Ca^{2+} del medio exterior al citosol involucraría a los canales de Ca^{2+} activados por estiramiento (*Stretch-Activated Channels*, SACs) ubicados en la región apical, a los canales dependientes de nucleótidos (*Cyclic Nucleotide-Gated Channels*, CNGC), a los canales dependientes de voltaje y a los receptores de tipo glutamato (*Glutamate Receptor-like*,

GRL) (Steinhorst y Kudla, 2013). La apertura de los SACs ocurre como consecuencia de la deformación de la membrana plasmática debido al aumento de la presión de turgencia y al ensamblado de nueva pared celular (Holdaway-Clarke and Hepler, 2003). En polen, se identificó a MSL8 (*MscS-like 8*), un canal mecanosensible implicado en la regulación de la presión osmótica generada durante la hidratación y germinación del grano de polen (Hamilton et al., 2015). Además, se identificó a CNGC18 como un canal permeable al Ca^{2+} , esencial para el crecimiento del tubo polínico, ya que la mutante *cngc18* exhibe fenotipo de esterilidad (Frietsch et al., 2007).

En *Arabidopsis thaliana* existen 14 bombas de Ca^{2+} , las cuales se encuentran divididas en dos subfamilias: ATPasas autoinhibidas por Ca^{2+} (ACAs) y Ca^{2+} ATPasas de retículo endoplasmático (ECAs), las cuales estarían involucradas en remover el Ca^{2+} del citoplasma del tubo con el fin de iniciar un nuevo ciclo oscilatorio. La proteína ACA9, específica de polen y localizada en la membrana plasmática, funcionaría como una vía de eflujo de Ca^{2+} citoplasmático, siendo necesaria para la regulación del crecimiento del tubo polínico y la fertilización (Schiott et al., 2004). Por otro lado, las bombas Ca^{2+} ATPasa de retículo endoplasmático, ECA1 y ACA2, serían encargadas de bombear Ca^{2+} en contra de su gradiente de concentración para su almacenamiento en este compartimento (Liang and Sze, 1998; Hwang et al., 2000) (**Figura I5**).

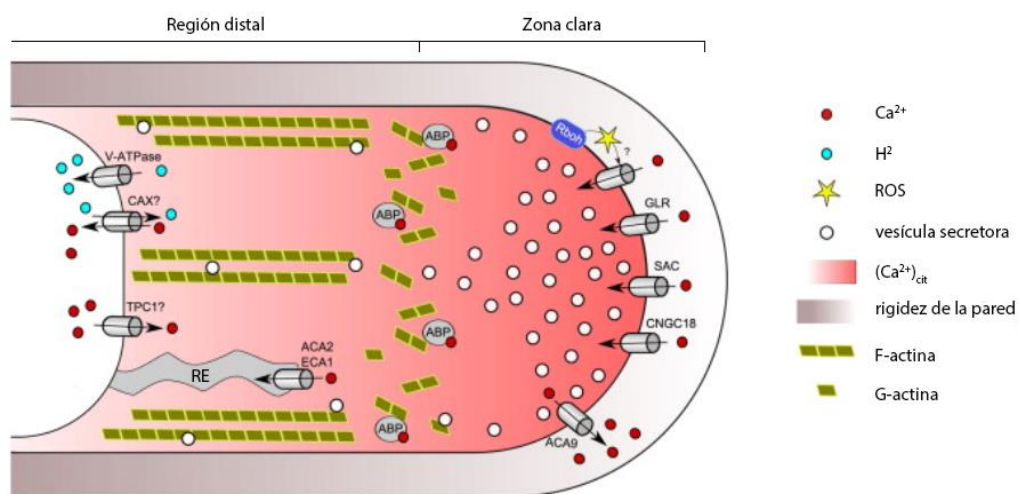


Figura I5. Ilustración del gradiente y los flujos de Ca^{2+} de un tubo polínico en crecimiento. RE: retículo endoplasmático. Modificado de Steinhorst and Kudla, 2013.

El citoesqueleto de los tubos polínicos presenta dos componentes mayoritarios, los microtúbulos y los microfilamentos de actina, los cuales se encuentran altamente organizados e interactúan con varias proteínas asociadas (Vidali and Hepler, 2001). Las vesículas son transportadas a través del citoesqueleto hasta alcanzar la zona apical donde, algunas de ellas, se fusionan con la membrana plasmática y descargan su contenido citoplasmático al apoplasto que será utilizado en tareas de remodelación de la pared celular y de la membrana plasmática. Además, la exocitosis de las vesículas aumenta la superficie de la membrana plasmática necesaria para que el tubo crezca. Los microtúbulos participan en la organización y en el movimiento de las organelas y de las células espermáticas, pero no serían esenciales para el crecimiento del tubo polínico. Por otro lado, los microfilamentos de actina se encuentran involucrados en el transporte de vesículas secretoras y son fundamentales para la formación de la zona clara en la región apical y permitir la elongación celular. Se ha observado que, tanto la acumulación de vesículas en la región de cono invertido como el flujo citoplasmático, se ven interrumpidos al inhibir la formación del citoesqueleto de actina, brindando evidencia de que éste último, constituye la ruta más importante de tráfico intracelular (Cheung and Wu, 2008).

Los microfilamentos de actina sufren ciclos repetitivos de polimerización/despolimerización dependientes de proteínas de unión a actina (*Actin Binding Proteins*, ABPs) como la profilina y la gelsolina/vilina, cuya actividad está regulada por Ca^{2+} . En este contexto, el Ca^{2+} actuaría como un segundo mensajero en la regulación del tráfico vesicular y la dinámica del citoesqueleto de actina. Esta regulación se ajusta al modelo propuesto por Cárdenas y colaboradores, el cual indica que al producirse el influjo de Ca^{2+} , se genera un aumento en sus concentraciones citoplasmáticas, activando a las ABPs y previniendo de esta forma la polimerización de nuevos microfilamentos de actina (Cardenas et al., 2008). Esto genera una disminución en la tasa de crecimiento, que es revertido al disminuir las concentraciones de Ca^{2+} citoplasmático, ya sea a través del secuestro en compartimentos de reserva y/o por el cierre de las bombas de influjo y/o eflujo al exterior del tubo polínico. Como consecuencia, la actividad de las ABPs se reduce, originando un nuevo ciclo de polimerización de la actina, el cual a su vez se encuentra

modulado por la vía de la proteína ROP1, miembro de la familia de las Rho GTPasas (Gu et al., 2005), promoviendo el crecimiento del tubo polínico nuevamente.

4.2. Gradiente de protones

Tal como ocurre con el Ca^{2+} , los tubos polínicos presentan un gradiente de H^+ en la región apical. El pH en esta región se mantiene ligeramente ácido y aumenta gradualmente cercano a la base de la zona clara, formando una región conocida como “banda alcalina” en la zona subapical. El gradiente de pH es mantenido gracias al influjo de H^+ en la región apical y al eflujo de H^+ a lo largo de la región subapical a través de bombas H^+ -ATPasas localizadas en la membrana plasmática (Cortal et al., 2008).

4.3. La importancia del K^+

La presión de turgencia generada en el interior del tubo polínico actúa como una fuerza impulsora del crecimiento y depende de la regulación de iones como el K^+ . Se han identificado canales de influjo de K^+ en protoplastos de polen de lirio (Obermeyer and Kolb, 1993) y de Brassica, estos últimos, sensibles al Ca^{2+} extracelular y al pH (Fan et al., 2001). Por otro lado, se identificó a un canal de influjo de K^+ en polen de Arabidopsis, SPIK (*Shaker Pollen Inward K⁺*), localizado en la región apical del tubo polínico y esencial para el mantenimiento del crecimiento del tubo polínico *in vitro* (Mouline et al., 2002). De igual manera, se caracterizaron dos transportadores de K^+ , llamados CHX21 y CHX23, necesarios para la germinación, la polaridad y el direccionamiento del tubo polínico hacia los óvulos (Lu et al., 2011). Estos resultados, en conjunto, evidencian la importancia del K^+ durante la germinación y el crecimiento polarizado del tubo polínico.

5. Implicancia de las especies reactivas del oxígeno en el crecimiento polarizado

Las especies reactivas del oxígeno (EROs) presentan una amplia diversidad de funciones relacionadas con el crecimiento celular. En tubos polínicos, las EROs se acumulan en la región apical y su generación depende de las enzimas de tipo NADPH

oxidasas (NOX) localizadas en la membrana plasmática. Estas enzimas, catalizan la reducción del oxígeno molecular al anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$). Las NOX de *Arabidopsis* son conocidas como RBOH (*Respiratory Burst Oxidase Homolog*), de las cuales RBOHH y RBOHJ, de expresión en polen, regulan el crecimiento del tubo polínico modulando los niveles de EROs (Kaya et al., 2014). La disminución en la concentración de EROs, ya sea por el agregado de un agente quelante o por ausencia de RBOHH/RBOHJ, afecta el normal desarrollo de los tubos polínicos. Se observó que mutaciones en los motivos *EF-hand* de unión a Ca^{2+} en los dominios de las RBOHH/ RBOHJ ocasiona alteraciones en la producción de EROs (Kaya et al., 2014) y que la homeostasis de Ca^{2+} se encuentra afectada en tubos polínicos de la mutante doble *rboh h rboh j* (Boisson-Dernier et al., 2013), lo cual sugiere la existencia de una regulación de EROs mediada por Ca^{2+} .

6. Importancia de la pared celular durante el crecimiento polarizado del tubo polínico

La pared celular de las células vegetales posee una estructura dinámica y compleja que presenta múltiples funciones, entre ellas, controlar la morfología celular y proteger a la célula contra el daño mecánico y la presión de turgencia. En eudicotiledóneas, la pared celular primaria está compuesta principalmente por celulosa, un polímero lineal formado por cientos de residuos de glucosa unidos covalentemente mediante enlaces $\beta(1-4)$ -glicosídicos. Las moléculas de celulosa se unen entre ellas mediante enlaces intramoleculares de hidrógeno formando largas cadenas conocidas como microfibrillas de celulosa, que se encuentran embebidas en una matriz no celulósica de polisacáridos y que contiene glicoproteínas y proteoglicanos (Alberts B. et al., 2002).

Formando parte de la matriz de polisacáridos se encuentran los glicanos, que constituyen un grupo heterogéneo de polímeros ramificados que presentan una estructura principal linear compuesta por glucosa, manosa o xilosa y pueden unirse a la superficie de las microfibrillas de celulosa. Además, la matriz presenta una red compuesta por pectina, una familia de polisacáridos complejos formados por residuos de ácido galacturónico de carga negativa. La pectina presenta 3 componentes mayoritarios:

homogalacturonano (HG), ramnogalacturonano I (RGI) y ramnogalacturonano II (RGII) (Ridley *et al.*, 2001). El HG es un homopolímero formado por residuos de (1→4)- α -D-ácido galacturónico, con algunos de sus grupos carboxilos metil-esterificados. RGI es un heteropolímero cuya estructura principal está compuesta por repeticiones del di-sacárido (1→2)- α -L-ramnosa-(1→4)- α -D-ácido galacturónico. RGII es un heteropolisacárido complejo con una estructura principal de HG a la cual se le adosan 4 cadenas compuestas por diferentes monosacáridos. La ramnosa (Rha), es el mayor componente del RGI y RGII y es sintetizada por las enzimas RHM (*Rhamnose Biosynthesis*) encargadas de convertir UDP-D-Glc a UDP-L-Rha.

La estructura de la pared celular del grano de polen varía según la especie pero, en general, está formada por 3 capas: la exina (capa superficial; compleja y resistente), la intina (capa interna y laxa; formada por pectinas, celulosa, hemicelulosa y proteínas hidrofóbicas) y la trifina (capa más superficial del grano de polen; altamente hidrofóbica) (Shi *et al.*, 2015). Cuando el grano de polen se hidrata, aumenta la presión de turgencia intracelular y comienza a emerger el tubo polínico por una de las hendiduras presentes en la exina del grano de polen. La pared celular del tubo polínico presenta una distribución heterogénea de sus componentes y tanto la exina como la trifina se encuentran ausentes de manera de posibilitar su crecimiento. El *tip* del tubo polínico está formado únicamente por una pared celular primaria mientras que las regiones distales, donde la expansión se detuvo, presentan una pared secundaria (Geitmann and Steer, 2006).

La principal diferencia entre la composición de la pared celular del tubo polínico con respecto al resto de las células vegetales es la baja abundancia de celulosa y la alta proporción de calosa. Si bien la celulosa se encuentra presente en la totalidad de la pared celular del tubo polínico, existe un cambio espacio-temporal en la distribución de este polisacárido, dependiendo del estadio de desarrollo del tubo polínico (Chebli *et al.*, 2012). Las microfibrillas de celulosa son sintetizadas en la membrana plasmática por complejos multiproteicos de celulosa sintasa (*Cellulose Synthase Complex*, CSC), formados presumiblemente por 36 subunidades catalíticas individuales de celulosa sintasa (CesA) (Guerriero *et al.*, 2010). La enzima CesA se localiza en la totalidad de la membrana

plasmática del tubo polínico, con una alta concentración en la región apical y en citoplasma, probablemente asociada a vesículas derivadas de Golgi (Cai et al., 2011). Por su parte, la calosa se localiza mayormente en la intina de la pared celular, capa de naturaleza pectocelulósica ubicada entre el manto fibrilar de pectinas y la membrana plasmática; en la mayoría de las angiospermas, su deposición comienza a una distancia promedio de 10 μm del ápice del tubo polínico (Parre and Geitmann, 2005). La calosa es sintetizada en la membrana plasmática por la enzima calosa sintasa (CaS) que, a diferencia de CesA, se localiza en la región apical y distal del tubo polínico y en las zonas de formación de tapones de calosa (Cai et al., 2011). Los filamentos de actina estarían involucrados en el transporte de estas enzimas en vesículas derivadas de Golgi y en su distribución en la membrana plasmática, mientras que la localización distal de CaS sería dirigida por los microtúbulos (Cai et al., 2011).

Otro componente abundante en la pared celular de los tubos polínicos es la pectina, la cual es sintetizada y metilesterificada en el aparato de Golgi y posteriormente transportada por las vesículas hacia zona apical del tubo polínico (Driouich et al., 2012). Dada la complejidad estructural de la pectina, resulta razonable pensar en la existencia de un gran número de enzimas requeridas para su biosíntesis, entre ellas glicosiltransferasas, metiltransferasas y acetiltransferasas, pero son pocas las caracterizadas hasta el momento. La pectina se localiza específicamente en la capa externa de la pared celular, la cual presenta estructura fibrilar. La enzima pectina metil esterasa (*Pectin methylesterase*, PME), cataliza la remoción de los grupos metilo de las pectinas, exponiendo de esta forma los grupos carboxílicos y permitiendo su interacción con iones divalentes como el Ca^{2+} , lo que conlleva a la formación de un gel de pectinas que le otorga rigidez a la pared celular (Bosch 2005; Hepler 2015). Se ha determinado que la PME se localiza en la totalidad de la pared celular del tubo polínico mientras que la localización de la proteína inhibidora de la PME (*Pectin Methylesterase Inhibitor*, PMEI) está restringida a la zona apical, donde la pared celular debe ser lo suficientemente flexible para permitir la expansión tubular (Röckel et al., 2008) (**Figura 16**). Estudios llevados a cabo en tubos polínicos de *Nicotiana tabacum*, detectaron la presencia de dos isoformas de la PME en el lado externo de la

membrana plasmática, en el aparato de Golgi y alrededor de vesículas secretoras. Ambas enzimas co-localizan en vesículas secretoras con homogalacturonanos (HG) metil-esterificados, por lo que se presume que la PME es transportada como un precursor inactivo que sería activado al ser excitado en el *tip* (Li et al., 2002). Se ha demostrado que la ausencia del gen *VANGUARD1*, codificante de la enzima PME en polen de Arabidopsis, provoca la explosión temprana de los tubos polínicos *in vitro* y retarda el desarrollo de los mismos en el tracto transmisor (Jiang et al., 2005), lo cual sugiere que la desesterificación de las pectinas es necesaria para mantener la integridad de la pared celular. El grado de esterificación de las pectinas es máximo en la región apical, donde se encuentra activa la PME, otorgándole flexibilidad a la pared celular, y disminuye gradualmente hacia la zona distal del tubo polínico (**Figura I6**) (Chebli et al., 2012). Por otro lado, los xiloglucanos son sintetizados y procesados en el aparato de Golgi y luego son exportados por vesículas secretoras hacia la capa interna de la pared celular donde se asocian con las microfibrillas de celulosa, contribuyendo a la formación de una red resistente (Dardelle et al., 2010).

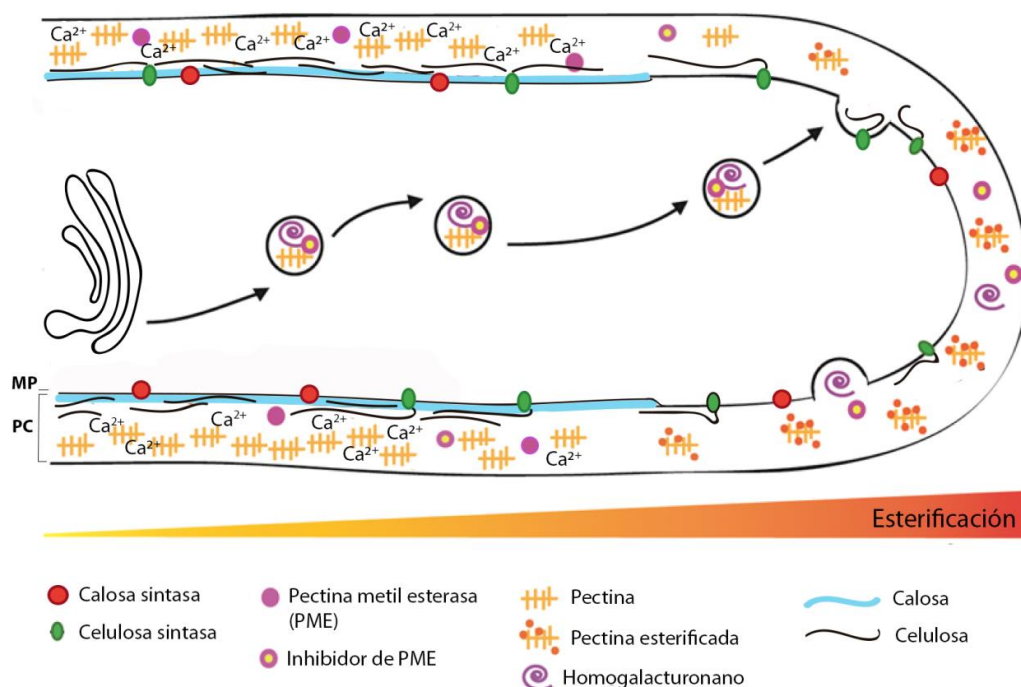


Figura I6. Modelo del ensamblado y estructura de la pared celular del tubo polínico. Las pectinas altamente esterificadas son sintetizadas en el aparato de Golgi y transportadas por vesículas secretoras hacia la pared celular. La desesterificación de la pectina tiene lugar fuera de la zona

apical donde la enzima PME se encuentra activa, permitiendo su interacción con iones Ca^{2+} y otorgando rigidez en la región. Los complejos de celulosa sintasa ubicados en la membrana plasmática sintetizan las microfibrillas de celulosa. La calosa es sintetizada en la membrana plasmática por la calosa sintetasa y se ubica en la intina, encontrándose ausente en la región apical. La disposición espacial y temporal de estos componentes en la pared celular se encuentra estrechamente controlada y es crucial para el mantenimiento del crecimiento polarizado y de la morfología del tubo polínico.

7. Rol de las proteínas estructurales en el ensamblado de la pared celular

Como se mencionó anteriormente, la pared celular brinda soporte estructural, protección y media interacciones entre células vecinas. Embebidas en la matriz de polisacáridos que componen la pared, encontramos a una amplia variedad de proteínas estructurales, entre ellas a las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (*Hydroxyproline-rich Glycoproteins*, HRGPs). La familia de las HRGPs se divide según su grado de glicosilación en tres categorías: extensinas (*Extensins*; EXT) moderadamente glicosiladas, arabinogalactanos (*Arabinogalactan proteins*; AGPs) hiperglicosilados y proteínas ricas en prolina (*Proline-rich proteins*; PRPs) que pueden encontrarse poco o altamente glicosiladas (Showalter et al., 2010). Diversas funciones fueron asignadas para estas familias de proteínas, como la de proveer integridad estructural para mediar interacciones entre célula-célula y la implicancia en procesos de comunicación y defensa.

7.1. Características y clasificación de las extensinas (EXTs)

Las EXTs son proteínas estructurales que forman redes covalentes y se caracterizan por poseer dominios con repeticiones de Ser-Pro₍₃₋₅₎ plausibles de ser glicosilados. Las EXTs clásicas presentan un péptido señal en el extremo N-terminal para ser enviadas al sistema secretor. Algunas de ellas poseen también motivos de Tyr-X-Tyr (donde "X" puede ser cualquier aminoácido) necesarios para el *crosslinking* en la pared celular. Previo a ser secretadas a la pared celular, las EXT sufren una serie de modificaciones post-traduccionales (MPTs) que involucran la adición del péptido señal (en el RE), la

hidroxilación de los residuos prolina (Pro) generando hidroxiprolina (Hyp) y la glicosilación sobre los residuos de Hyp y Ser (en el RE-aparato de Golgi) para finalmente, participar en la formación de una red covalente en la pared celular, en caso de poseer secuencias de *crosslinking* que involucren Tyr. Las modificaciones anteriormente mencionadas son catalizadas por numerosas enzimas que se detallarán más adelante.

En *Arabidopsis thaliana* se han identificado 65 EXTs, separadas en 20 EXTs clásicas, 12 EXTs cortas, 13 receptores quinasa ricos en prolina de tipo EXT (PERKs), 6 EXTs homólogas de formina (FH EXTs), 11 proteínas con repeticiones de leucina de tipo EXTs (LRXs; *Leucine-rich repeat extensins*) y 3 EXTs quimeras (Borassi et al., 2016; Liu et al., 2016).

8. Modificaciones post-traduccionales de las EXTs: Hidroxilación y O-glicosilación

En plantas, las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) sufren tres modificaciones post-traduccionales mayoritarias y consecutivas: la hidroxilación de los residuos de Pro en Hyp, la posterior O-glicosilación de los residuos de Hyp y la monogalactosilación de Ser (Marzol et al., 2018).

8.1. Importancia de las Prolil-4-hidroxilasas (P4Hs) en la hidroxilación de las EXTs

La hidroxilación es un proceso oxidativo que consiste en el reemplazo de un átomo de H del enlace C-H de un compuesto orgánico por un grupo hidroxilo (-OH), formando un enlace C-OH. Al ser el oxígeno un elemento electronegativo, la hidroxilación altera drásticamente las propiedades de los residuos modificados. En las proteínas HRGPs de plantas, la hidroxilación ocurre predominantemente sobre la peptidil-prolina lo que resulta en la formación de Hyp necesaria para definir futuros sitios de glicosilación. Si bien aún resulta difícil predecir el contexto en el que ocurre la hidroxilación de la prolina, se han propuesto algunas secuencias aminoácidas posibles (Kieliszewski, 2001; Canut *et al.*, 2016; Duruflé *et al.*, 2017).

Las enzimas prolil-4-hidroxilasas (*Prolyl-4-Hydroxylases*, P4Hs) pertenecen a la familia de las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (OG) y son las encargadas de catalizar la conversión de Pro en Hyp empleando O₂ molecular, OG como co-sustrato y el catión Fe²⁺ junto con ascorbato como cofactores (**Figura 17**) (Gorres and Raines, 2010).

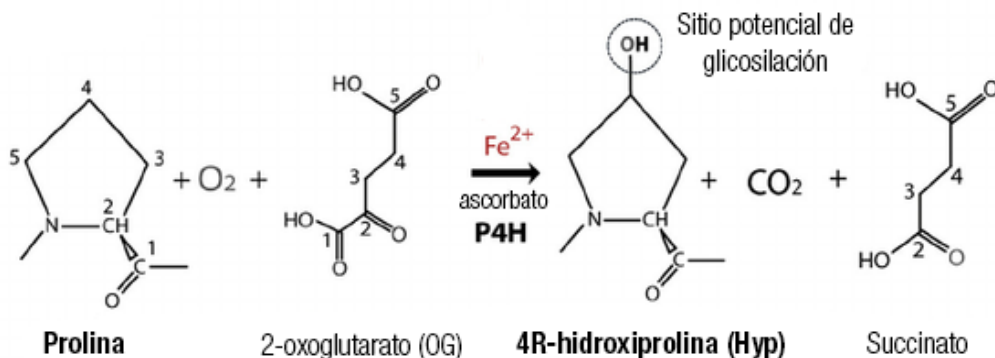


Figura 17. Reacción química de hidroxilación de la prolina catalizada por las P4Hs.

En animales, las P4Hs tienen un rol fundamental en la biosíntesis de colágeno, ya que catalizan la formación de (2S,4R)-4-hidroxi prolina que tiene un rol muy importante en la estabilización de la triple hélice de colágeno; la abundancia de Hyp en los residuos de proteínas animales representa aproximadamente el 4%. En plantas y algas, la Hyp es abundante en proteínas de la familia de las HRGPs, donde el 15-25% de los residuos de Pro se encuentran hidroxilados. Mientras que las P4Hs de mamíferos están formadas por un tetrámero de subunidades $\alpha_2\beta_2$, las P4Hs de plantas y algas son monómeros solubles (Gorres and Raines, 2010). Mediante cristalografía de rayos X, se pudo determinar la estructura tridimensional de la enzima P4H del alga *C. reinhardtii* (CR-P4H-1) (Koski et al., 2007).

El genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica para 13 genes de P4Hs de expresión variable en los tejidos vegetales. La actividad de P4H1 fue ensayada *in vitro* y se observó que hidroxila eficientemente poli(L-prolina) y péptidos sintéticos con repeticiones de Pro como las encontradas en las HRGPs de plantas (Hieta and Myllyharju, 2002). La principal diferencia entre P4H1 y su isoforma P4H2, reside en su especificidad por el sustrato; P4H2

hidroxila poli(L-prolina) presente en EXTs y AGPs pero con valores de K_m mucho más elevados que P4H1 (Myllyharju and Koivunen, 2005). Estudios posteriores demostraron que los genes *P4Hs* presentan una expresión diferencial bajo condiciones de hipoxia, anoxia y daño mecánico. En relación con lo anterior, se observó que la sobre-expresión de P4H1 produce un aumento en la hidroxilación de las HRGPs lo que conlleva a la aparición de fenotipos relacionados con la baja disponibilidad de O_2 , como aumento en el largo del pelo radical, disminución en el tamaño de la semilla y la falta de capacidad de crecimiento en ausencia de azúcares (Asif et al., 2009). Recientemente, se demostró que la acción de P4H2, P4H5 y P4H13 en la hidroxilación de las Pro de las EXTs es necesaria para el correcto ensamblado de la pared celular durante la elongación del pelo radical (Velasquez et al., 2015). Así mismo, se observó que el tratamiento de los pelos radicales con inhibidores de la actividad de las P4Hs, como DP (α,α -dipiridil) y EDHB (etil-3,4-dihidroxibenzoato), bloquea la hidroxilación e inhibe drásticamente la elongación celular de los pelos radicales (Velasquez et al., 2011; Velasquez et al., 2015). En búsqueda de posibles interactores, mediante un *screening* por la técnica de doble híbrido y empleando P4H5 como “anzuelo”, se identificó a la proteína LRX3 (perteneciente a la familia de las EXTs) específica de pelo radical, como posible *target* de esta enzima (Velasquez et al., 2011). En base a estas observaciones, en esta tesis nos abocamos en estudiar la función de las enzimas P4H4 y P4H6, de alta expresión en polen y su relación con las proteínas estructurales de la pared celular durante el crecimiento del tubo polínico (**ver Capítulo II**).

El alineamiento de las secuencias amoniácidas completas, divide a las P4Hs en dos subclados bien definidos (**Figura I8**). Las proteínas P4H5, P4H8, P4H11, P4H3, P4H10, P4H1, P4H9 y P4H13 se encuentran agrupadas en uno de los subclados y presentan un péptido señal de retención en RE-Golgi en el extremo N-terminal, seguido de un dominio transmembrana y un dominio catalítico de tipo 2-oxoglutarato dioxigenasa. Por otro lado, las proteínas P4H2, P4H4, P4H12, P4H6 y P4H7 se agrupan en un segundo subclado y presentan un dominio transmembrana N-terminal seguido del dominio catalítico de tipo 2-oxoglutarato dioxigenasa y una región C-terminal rica en residuos de Cys. Ambos dominios catalíticos contienen motivos conservados de unión a Fe^{2+} y a 2-oxoglutarato

(Figura 18). Estos dominios son típicos de enzimas que catalizan la oxidación de un sustrato orgánico, a través de la unión de Fe^{2+} en el sitio activo y empleando 2-oxoglutarato como co-sustrato, el cual es descarboxilado a succinato y CO_2 (Figura 17).

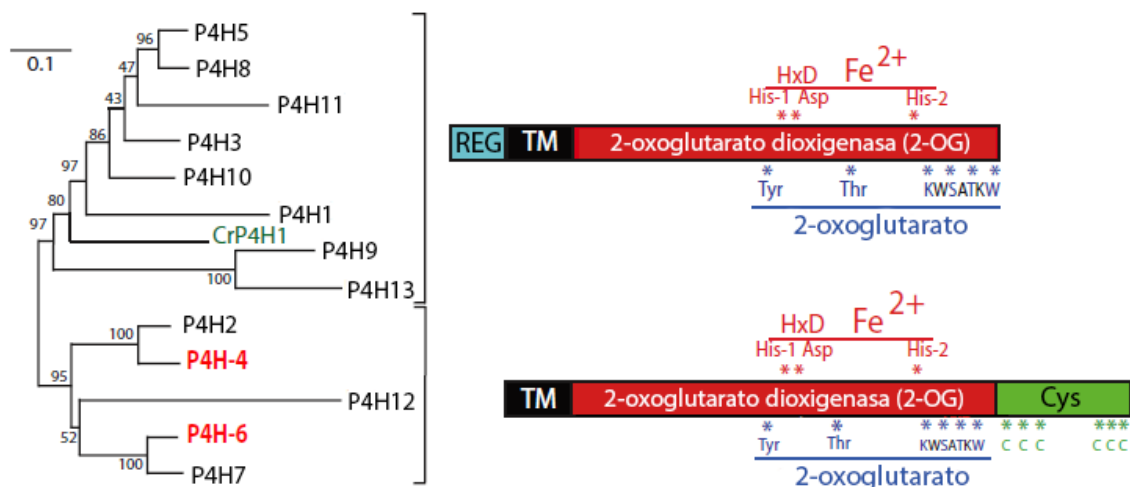


Figura 18. Árbol filogenético de las P4Hs (izquierda) y organización estructural de las proteínas de cada subclado (derecha). REG: péptido señal de retención en RE-Golgi; Cys: dominio rico en cisteínas; TM: dominio transmembrana. Se señalan los sitios de unión a Fe^{2+} (rojo) y a 2-oxoglutarato (azul). Modificado de Velasquez *et al.*, 2011.

8.2. Enzimas implicadas en la O-glicosilación de las EXTs

La glicosilación es una de las mayores modificaciones post-traduccionales (MPTs) que sufren las proteínas estructurales de la pared celular e involucra la transferencia mediada por enzimas de determinados azúcares sobre residuos de aminoácidos específicos. Entre los tipos de glicosilación encontramos a la N-glicosilación, la O-glicosilación y la glicipiación, que involucra la adición de anclas de glicofosfatidilinositol (GPI). La N-glicosilación consiste en la adición de glicanos sobre residuos de Asn en motivos Asn-X-Ser/Thr. La presencia de Pro en la posición "X" previene la N-glicosilación, mientras que los grupos hidroxilos de los residuos de Ser/Thr son necesarios para que ocurra sobre el residuo de Asn. Por otro lado, la O-glicosilación es más compleja y ocurre

sobre hidroxiaminoácidos, principalmente de Ser y Thr y sobre residuos de Hyp, siendo esta última, específica de plantas. La O-glicosilación es característica de las proteínas de membrana o extracelulares, que tiene lugar en el aparato de Golgi, posterior a la N-glicosilación y al plegado de la proteína. La galactosa puede ser transferida a residuos de Ser e Hyp, mientras que la arabinosa puede transferirse a residuos de Hyp únicamente (Canut *et al.*, 2016). El tipo de O-glicosilación dependerá de la localización y el contexto de los residuos de Hyp, como lo explica la hipótesis de contigüidad, la cual predice que residuos de Hyp contiguos (≥ 2) son arabinosilados, mientras que los *clusters* de residuos de Hyp no contiguos son arabinogalactosilados (Shpak *et al.*, 2001).

La O-glicosilación de la secuencia Ser(Hyp)₃₋₅ presente en las EXTs, involucra a enzimas glicosiltransferasas que catalizan la adición de una unidad de galactosa al residuo de Ser y una cadena lineal de 4-5 unidades de arabinosa sobre la Hyp. La enzima seringalactosiltransferasa, SerGT1, sería la responsable de catalizar la adición de galactosa a la Ser del motivo Ser(Hyp)₄ (Saito *et al.*, 2014). Como se observa en la **Figura 19**, la primer unidad de arabinosa sería transferida por las enzimas HPAT1-HPAT3 (*Hydroxyproline O- β -arabinosyltransferase* 1-3) (Ogawa-Ohnishi *et al.*, 2013); la segunda unidad de arabinosa sería transferida por las enzimas RRA1-RRA3 (*Reduced Residual Arabinose* 1-3) (Egelund *et al.*, 2007; Velasquez *et al.*, 2011) y, finalmente, la enzima XEG113 (*Xiloglucanase113*) añadiría el tercer residuo a la cadena (Gille *et al.*, 2009). Recientemente se caracterizó a la enzima ExAD (*Extensin Arabinose Deficient*), encargada de transferir el cuarto residuo de arabinosa mediante uniones α -(1 \rightarrow 3) (Møller *et al.*, 2017). Sin embargo, hasta el momento no han sido identificadas la/las enzimas responsables de adicionar el quinto residuo de arabinosa.

Las mutantes triples por pérdida de función *hpat1 hpat2 hpat3* y *rra1 rra2 rra3* y las mutantes simples *xeg113* y *exad1*, exhiben alteraciones en el normal desarrollo del pelo radical. En lo que respecta a polen, se ha observado que la mutante triple *hpat1 hpat2 hpat3* muestra serios problemas de fertilidad, ya que los tubos polínicos presentan fallas durante la elongación siendo incapaces de alcanzar los óvulos (MacAlister *et al.*, 2016).

Estos resultados reflejan que la *O*-glicosilación de las EXTs es necesaria para que puedan cumplir su función en el mantenimiento de la integridad de la pared celular.

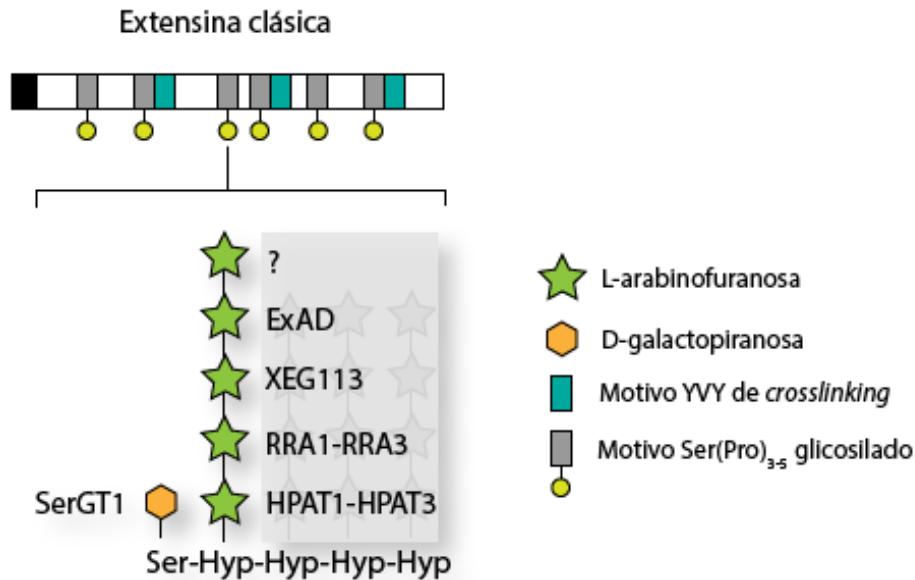


Figura I9. Patrones de *O*-glicosilación de la secuencia Ser(Hyp)₄ de una EXT clásica. Se indican las enzimas glicosiltransferasas que catalizan la transferencia de azúcares específicos en cada paso de glicosilación. Esquema modificado de Marzol *et al.*, 2018.

9. *Leucine-rich repeat extensins* (LRXs)

Las proteínas con repeticiones de leucina de tipo EXTs (LRXs) son proteínas quimeras formadas por un péptido-sígnal, un dominio N-terminal rico en repeticiones de leucina (LRR), seguido de un dominio rico en cisteínas (Cys) y un dominio C-terminal de tipo EXT (**Figura I10**).

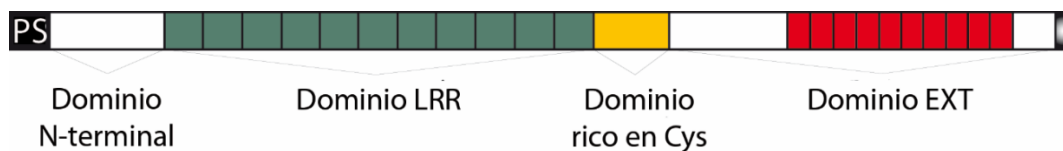


Figura I10. Organización estructural de las proteínas LRXs. Se indica el péptido señal (PS), el dominio rico en leucina (LRR), el dominio rico en cisteínas (Cys) y el dominio extensina (EXT).

El dominio LRR está compuesto por repeticiones secuenciales de un motivo estructural de 20-29 residuos aminoacídicos que contiene leucinas conservadas en su posición dentro de cada motivo (Kobe and Kajava, 2001). La principal función de este dominio sería la de proveer un marco estructural para la formación de interacciones proteína-ligando y proteína-proteína (Matsushima and Miyashita, 2012). Los proteomas de *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa* subespecie *japonica* (arroz) contienen más de 700 y 1400 proteínas con dominios LRR, respectivamente (Matsushima and Miyashita, 2012). En plantas, el motivo LRR se encuentra presente en proteínas receptoras de tipo quinasa (Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinases LRR-RLKs), en proteínas implicadas en la señalización y mecanismos de defensa en receptores (Leucine-Rich Repeat-Containing Receptor-like Proteins LRR-RLPs) y en proteínas de resistencia a patógenos con sitios LRR de unión a nucleótidos (Nucleotide-Binding Site Leucine-Rich Repeat proteins, NBS-LRR), entre otras (Matsushima and Miyashita, 2012). Por otro lado, la alta conservación de las Cys entre las LRXs sugiere que la formación de puentes di-sulfuro sería importante para definir su conformación final y/o para su función.

El primer gen del tipo *LRX* caracterizado fue *Pex1* (Pollen extensin-like-1), obtenido a partir de un *screening* diferencial realizado sobre una librería de ADN copia de polen de maíz (Rubinstein et al., 1995). Mediante ensayos de de-glicosilación pudieron observar que *Pex1* se encontraba glicosilada y que se localizaba en la intina, asociada fuertemente a la pared celular a través de su dominio EXT. Más tarde, se aisló *Pex2*, un segundo gen de maíz (monocotiledónea) y el gen *Pex* de tomate (dicotiledónea), altamente conservados en sus dominios LRR (Stratford et al., 2001).

De acuerdo al análisis filogenético, las LRXs se encuentran conservadas entre mono y dicotiledóneas (Liu et al., 2016). Las LRXs se dividen en dos grandes clados: las pertenecientes al clado vegetativo, de expresión en tejidos esporofíticos y las del clado reproductivo, de expresión diferencial en polen (**Figura I11**). Dentro de *Arabidopsis thaliana* las del clado vegetativo son las proteínas LRX1-LRX7 y del clado reproductivo, LRX8-LRX11.

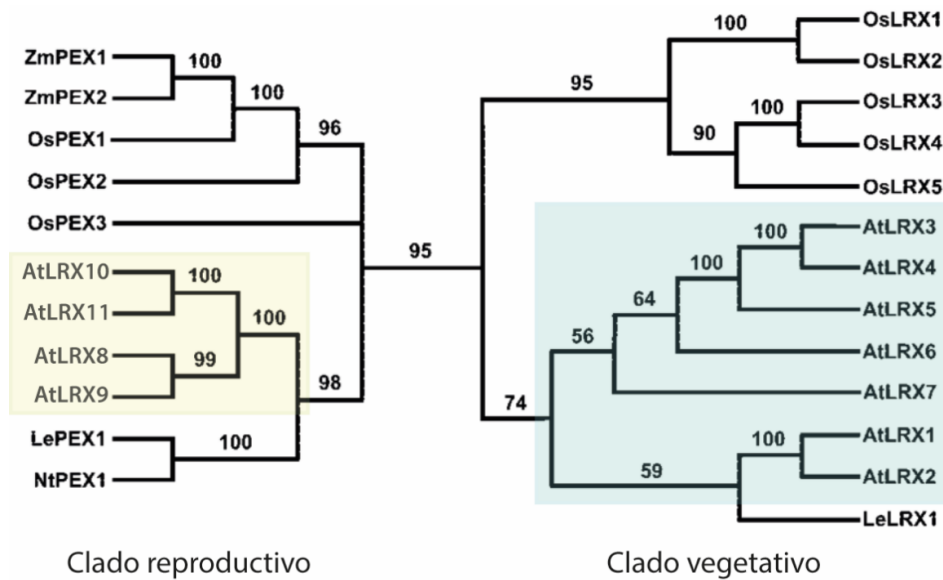


Figura I11 . Análisis filogenético de las LRXs. Los recuadros amarillo y celeste señalan a las LRXs de *Arabidopsis thaliana* pertenecientes al clado reproductivo y vegetativo, respectivamente. Se indica la especie a la que pertenece cada LRX: Zm (*Zea mays*); Os (*Oryza sativa*); At (*Arabidopsis thaliana*); Le (*Lycopersicon esculentum*); Nt (*Nicotiana tabacum*). (Modificado de Baumberger *et al.*, 2003).

Las proteínas LRX1-5 del clado vegetativo han sido ampliamente estudiadas en *Arabidopsis* y se les ha asignado un rol estructural en la pared celular. Por un lado, se comprobó que *LRX1* y su gen parálogo *LRX2*, ambos de expresión en pelo radical, presentan una acción sinérgica y regulan la morfogénesis y la elongación del pelo radical participando en el ensamblado de su pared celular (Baumberger *et al.*, 2001; Baumberger *et al.*, 2003). Los pelos radicales de las mutantes pérdida de función *lrx1 lrx2* presentan anomalías durante su desarrollo, mostrando fenotipos de explosión, ramificación y ensanchamiento apical (Baumberger *et al.*, 2003). Al igual que para *LRX1* y *LRX2*, se observó un efecto sinérgico para los genes *LRX3*, *LRX4* y *LRX5*, todos de alta expresión en órganos aéreos como hojas y tallos (Draeger *et al.*, 2015). Las plantas mutantes triple *lrx3 lrx4 lrx5* exhiben un desarrollo vegetal retardado, reducción en el largo de la raíz y cambios en las fracciones de ligno-celulosa, pectina y xilano de la pared celular (Draeger *et al.*, 2015). Mediante un *screening* en búsqueda de supresores del fenotipo de la mutante

lrx1 se identificó el alelo *rol1* (Repressor Of Irx1). El locus *ROL1* codifica para una enzima implicada en la biosíntesis de la ramnosa, llamada RHM1, que cataliza la formación de UDP-L-Rha. La ramnosa es el mayor componente de los polisacáridos pectínicos como RGI y RGII, por lo que se hipotetiza que LRX1 sería un posible regulador extracelular implicado en la formación de la matriz de pectinas (Diet et al., 2006).

10. Sensado de la integridad de la pared celular

A lo largo de la evolución, las plantas han desarrollado una gran diversidad de proteínas complejas con diferentes dominios extracelulares, encargadas de sensar la integridad y el ensamblado de la pared celular y responder ante cambios ambientales activando vías de señalización y llevando esta información hacia el interior celular. Dentro de este grupo de proteínas encontramos a los receptores de tipo quinasa (Receptor-like Kinases, RLKs). Existen 610 RLKs en Arabidopsis, de las cuales más de 45 se expresan en tubo polínico, sugiriendo la presencia de una gran diversidad de ligandos posibles, capaces de interactuar con estas proteínas (Muschiatti and Wengier, 2018).

Debido a la cercanía entre la membrana plasmática y la pared celular de las células vegetales, es esperable contar con proteínas receptoras transmembrana con dominios extracelulares que contengan motivos de unión a proteínas o polisacáridos presentes en la pared celular y dominios citoplasmáticos de tipo quinasa. Entre estas proteínas de tipo RLK, encontramos a la familia de los receptores quinasa asociados a pared celular (Wall Associated Kinases, WAKs), que tienen la particularidad de unirse, a través de su dominio extracelular, a diferentes tipos de pectina. Las WAKs son inducidas por infección de patógenos y por diferentes tipos de estreses y son necesarias para la expansión celular (Kohorn and Kohorn, 2012). Por otro lado, las proteínas receptoras de la familia PERK (Proline-rich Extensin-like Receptor Kinase), actúan como reguladores del crecimiento vegetal en diferentes tejidos y estadios del desarrollo y presentan un dominio extracelular de tipo EXT. El genoma de Arabidopsis codifica para 15 genes *PERK* y la mayoría de ellos se expresan altamente en células de crecimiento rápido, como el tubo polínico y el pelo

radical, donde el ensamblado de la pared celular ocurre de forma constante y sostenida (Borassi et al., 2016). Si bien hasta el momento no se encontraron ligandos para ninguna de las PERKs, es probable que respondan a cambios en los componentes de la pared celular al igual que las WAKs o que se unan a péptidos señalizadores como lo hacen FERONIA (FER) y ANXUR (ANX), receptores quinasa de los que hablaremos a continuación.

En plantas, de la familia de los receptores quinasa con dominios de tipo malectina, CrRLK1L (*Catharanthus roseus Receptor-like Kinase 1-like*), FERONIA (FER) es el miembro más estudiado. Su expresión es ubicua en los tejidos vegetales pero ausente en polen, aunque sí se expresa en saco embrionario (Huck et al., 2000). FER está implicada en varios procesos relacionados con el crecimiento vegetativo e interacciones gametofíticas. Los tubos polínicos de las mutantes *fer* son incapaces de descargar su contenido citoplasmático al penetrar la célula sinérgida para producir la fertilización (Escobar-Restrepo, 2007). Al igual que las WAKs, recientemente se demostró que el dominio extracelular de FER es capaz de unirse a pectina *in vitro* (Feng et al., 2018; Verger and Hamant, 2018). Además, se han identificado otras dos proteínas de la familia CrRLK1L, ANXUR1 (ANX1) y ANXUR2 (ANX2), que se encuentran preferencialmente expresadas en polen y estarían implicadas en el mantenimiento de la integridad de la pared celular de los tubos polínicos (Boisson-dernier et al., 2009; Miyazaki et al., 2009).

En la búsqueda de posibles ligandos de los receptores CrRLK1Ls, se identificaron a los péptidos de la familia RALF (*Rapid Alkalinization Factor*). Los RALFs, son pequeños péptidos que se secretan al medio extracelular y en su estado de péptido maduro y, como su nombre lo indica, incrementan el pH del apoplasto modulando la expansión y el desarrollo celular. Existen 37 miembros en Arabidopsis de expresión ubicua en los distintos tejidos y se los han relacionado con diferentes procesos (Murphy and Smet, 2014). Se ha reportado que la adición de péptidos RALF sintéticos al medio de cultivo genera la inhibición del crecimiento del pelo radical (Pearce et al., 2010), del hipocotilo (Mingossi et al., 2010) y reduce la germinación de los granos de polen (Morato do Canto et al., 2014). En raíz, RALF1 tendría un rol opuesto al de la hormona brasinoesteroides en

la regulación de la expansión celular (Bergonci et al., 2014). La sobre-expresión de RALF1 genera una disminución en el largo de la raíz, mientras que bajos niveles de RALF1 provoca el efecto contrario, el desarrollo de raíces más largas (Bergonci et al., 2014). Recientemente, se demostró que los péptidos RALF4 y RALF19, de alta expresión en polen y redundantes en función, son necesarios para el normal crecimiento del tubo polínico (Ge et al., 2017; Mecchia et al., 2017). De igual manera se ha visto que unas nuevas proteínas receptoras quinasas de la familia CrRLK1L, llamadas BUPS1 y BUPS2 (*Buddha's Paper Seal*), interaccionan con ANX1/ANX2 y con RALF4/RALF19 a través de sus ectodominios (Ge et al., 2017). También se caracterizó otro péptido RALF, RALF34, pero de expresión específica en células sinérgidas, que compete *in vitro* con RALF4/RALF19 por su unión a ANX1/ANX2 (Ge et al., 2017). La adición de RALF34 exógeno al medio de germinación del polen, provoca la explosión de los tubos polínicos (Ge et al., 2017). Además, se observaron fenotipos similares de explosión temprana de tubos polínicos *in vitro* para las mutantes dobles *anx1 anx2* (Boisson-dernier et al., 2009), *bups1 bups2* (Ge et al., 2017; Zhu et al., 2018) y *ralf4 ralf19* (Mecchia et al., 2017), lo que apoya la hipótesis de que estas proteínas participarían en la misma vía de señalización.

Hace varios años, mediante un *screening* por la técnica de doble híbrido de levadura empleando el dominio LRR de una proteína LRX de tomate como anzuelo, se identificó a un péptido de tomate de la familia RALF como posible interactor (Covey et al., 2010). Dicha interacción física entre las LRX y los péptidos RALF, fue también demostrada entre las proteínas de Arabidopsis LRX8 y LRX9 de polen y el péptido RALF4; se comprobó que esta interacción es necesaria para activar la vía de señalización mediada por ANX1/ANX2 y mantener el normal crecimiento del tubo polínico (Mecchia et al., 2017). El modelo propuesto a partir de estas observaciones, postula que los receptores BUPS1/BUPS2 y ANX1/ANX2 de membrana y las LRXs de pared celular, estarían participando de una vía de señalización mediada por los péptidos RALF. Los péptidos RALF4 y RALF19 actuarían como señalizadores autócrinos manteniendo el normal crecimiento del tubo polínico, mientras que una regulación parácrina proveniente del óvulo y que involucra a RALF34, ocasionaría

la ruptura del tubo polínico liberando así su contenido citoplasmático de manera que se efectúe la doble fertilización.

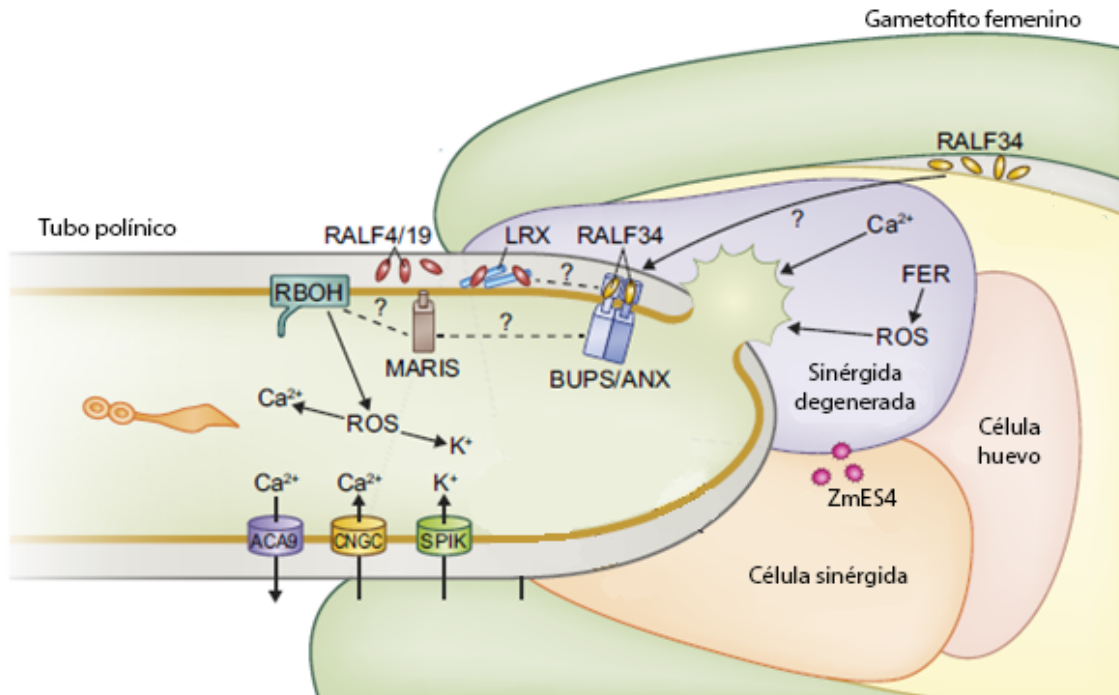


Figura I12. En su trayecto por el tracto transmisor, el tubo polínico secreta dos péptidos, RALF4 y RALF19, que se unen tanto a las proteínas LRXs como al complejo formado por los receptores transmembrana BUPS1-BUPS2/ANX1-ANX2 quienes, en conjunto, modularían la señal para mantener la integridad del tubo polínico y sostener su crecimiento. Al penetrar la sinérgida, RALF34, secretado por el tejido femenino, competiría por su unión a los receptores con RALF4/RALF19, induciendo así la ruptura del tubo polínico y liberando a las células espermáticas para producir la doble fertilización. Se señalan los canales de Ca^{2+} (ACA9 y GNGC) y K^+ (SPIK) importantes durante el crecimiento del tubo polínico; se señala también la proteína quinasa MARIS (Boisson-Dernier *et al.*, 2015; Liao *et al.*, 2016) y el péptido ZmES4 (Aimen *et al.*, 2010). Modificado de Ge *et al.*, 2019.

HIPÓTESIS

Las proteínas LRX8, LRX9, LRX10 y LRX11, específicas de polen, tendrían un rol estructural en la pared celular manteniendo el correcto ensamblado de sus componentes durante el crecimiento de tubos polínicos de *Arabidopsis thaliana*.

Las enzimas P4H4 y P4H6 estarían implicadas en la hidroxilación de las HRGPs de polen, siendo esto necesario para permitir el normal crecimiento de tubos polínicos en *Arabidopsis thaliana*.

OBJETIVO GENERAL

Caracterización y estudio del rol de las proteínas LRXs y P4Hs específicas de polen en la regulación del crecimiento polarizado del tubo polínico en *Arabidopsis thaliana*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo 1. Identificación de los genes *LRXs* específicos de polen asociados al desarrollo del grano de polen y al crecimiento polarizado de tubos polínicos.

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

Objetivo 3. Caracterización e identificación de los genes *P4Hs* con alta expresión en polen y estudio de la importancia biológica de la hidroxilación de las HRGPs.

Los objetivos 1 y 2 fueron desarrollados en el **Capítulo I**, mientras que el objetivo 3 se desarrolló en el **Capítulo II** de esta tesis doctoral.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Expresión *in silico* de los genes *LRXs*

Para determinar el patrón de expresión de los genes *LRXs* y *P4Hs* en los diferentes tejidos de *Arabidopsis thaliana*, se consultó la base de datos de microarreglos disponible en *Genevestigator* (<http://genevestigator.com/gv>) y se generó el *heatmap* correspondiente. Por otro lado, el análisis de expresión de los transcritos *LRXs* y *P4Hs* durante la microgametogénesis del grano de polen, fue realizado empleando la herramienta *eFP Browser (Electronic Fluorescent Pictograph)* [<http://bar.utoronto.ca>] (Winter et al., 2007). Los datos de expresión génica corresponden a datos de microarreglos de plantas *wild type* (WT) obtenidos por Honys y Twell, 2004.

2. Alineamiento de secuencias aminoacídicas

Las secuencias proteicas de las *LRXs* y *P4Hs* de *Arabidopsis thaliana* fueron obtenidas del sitio *TAIR (The Arabidopsis Information Resource)*, (<https://www.arabidopsis.org/>). Para llevar a cabo la identificación de los dominios y el estudio del grado de conservación aminoacídica tanto de las *LRXs* como de las *P4Hs*, se realizó el alineamiento de las secuencias completas de estas proteínas empleando el *software CLUSTALW* (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). Por otro lado, el árbol filogenético de las *LRXs* de polen fue generado con el *software* Seaview 4.6.1. utilizando el método de *neighbor-joining*.

3. Material vegetal

3.1. Condiciones de crecimiento

Las semillas de los genotipos utilizados en este trabajo, fueron estratificadas a 4°C durante 48 hs y en oscuridad, de manera de favorecer y sincronizar la germinación. Posteriormente, fueron sembradas en tierra e incubadas a 22°C bajo luz constante y en

condiciones de humedad controladas en un invernadero. El ecotipo Columbia-0 (Col-0) de *Arabidopsis thaliana* fue empleado como WT.

3.2. Líneas mutantes simples de inserción por ADN-T

Las líneas mutantes por ADN-T fueron obtenidas del ABRC (*Arabidopsis Biological Resource Center*): para el gen *LRX8* (At3g19020), las líneas salk_002743 (*lrx8-1*) y salk_031536 (*lrx8-2*). Para el gen *LRX9* (At1g49490), las líneas salk_137163 (*lrx9-1*) y salk_136163 (*lrx9-2*). Para el gen *LRX10* (At2g15880), la línea salk_087083 (*lrx10-1*) y para el gen *LRX11* (At4g33970), la línea salk_076356 (*lrx11-1*). Para el gen *P4H4* (At5g18900), la línea salk_102582 (*p4h4-1*) y para el gen *P4H6* (At3g28490), la línea salk_067682 (*p4h6-1*).

4. Extracción de ADN genómico de tejido vegetal

El ADN genómico fue extraído de hojas de roseta de plantas de aproximadamente dos semanas de edad. Las muestras de tejido vegetal fueron colocadas en un tubo de microcentrífuga junto con 400 µl de *buffer* de extracción de ADN (200 mM Tris-HCl pH=7,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0,5% SDS). Se provocó la ruptura del tejido realizando presión con un émbolo de plástico estéril y se incubó la muestra a temperatura ambiente (TA) durante 30 min. Luego se realizó una centrifugación a TA de 5 min a 13.000 rpm y se transfirieron 300 µl del sobrenadante a un nuevo tubo. Posteriormente, se agregaron 300 µl de isopropanol para producir la precipitación del ADN y luego de incubarlo por 5 min a TA, se realizó una centrifugación por 5 min a 13.000 rpm. Se descartó cuidadosamente el sobrenadante, se lavó el precipitado con 500 µl de etanol 70%, y se realizó otro paso de centrifugación por 5 min a 13.000 rpm. Por último, se descartó el sobrenadante, se secó el precipitado en una estufa a 37°C por 10 min y se lo resuspendió en 50 µl de agua de calidad *Milli-Q*. Las muestras de ADN genómico fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de su uso.

5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las líneas mutantes por inserción de ADN-T fueron genotipificadas empleando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, se diseñaron oligonucleótidos empleando el software “*iSect primer design tool*” disponible en el sitio <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>. Para amplificar el alelo salvaje, presente en plantas WT y heterocigotas, se emplearon oligonucleótidos específicos, RP (*Right Primer*) y LP (*Left Primer*), flanqueantes a la región de inserción de la secuencia de ADN-T. Para identificar el alelo mutante de las líneas SALK, portado por plantas homocigotas y heterocigotas, se emplearon los oligonucleótidos RP y LBb1.3 ó Lba1. La región de hibridación de los oligonucleótidos Lba1.3 y Lba1 es sobre el borde izquierdo del ADN-T. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados se encuentran detalladas en la **Tabla M1**.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Propósito
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	Genotipificación de líneas SALK
Lba1	TGGTTCACGTAAGTGGGCCATCG	Genotipificación de línea SALK <i>lrx11-1</i>
LRX8-1 RP	ACTTCGTAAGTATGTCGTCG	Genotipificación de línea SALK <i>lrx8-1</i>
LRX8-1 LP	TACCAAAAACCAAGCTCCATG	Genotipificación de línea SALK <i>lrx8-1</i>
LRX8-2 RP	AGAACACACGTCTGGACCAAC	Genotipificación de línea SALK <i>lrx8-2</i>
LRX8-2 LP	TACCAAAAACCAAGCTCCATG	Genotipificación de línea SALK <i>lrx8-2</i>
LRX8-2 #2 RP	GAGGTGTTGACATATTGAACAG	Genotipificación de línea SALK <i>lrx8-2</i>
LRX8-2 #2 LP	GGACCAACGAAACGGTTATTGC	Genotipificación de línea SALK <i>lrx8-2</i>
LRX9-1 RP	TGGAGTTGACCTTAACCATGC	Genotipificación de línea SALK <i>lrx9-1</i>
LRX9-1 LP	TTCAGGTTTAGACGGTTGTGG	Genotipificación de línea SALK <i>lrx9-1</i>
LRX9-2 RP	AACAATCGATTCGTTGGTCAG	Genotipificación de línea SALK <i>lrx9-2</i>
LRX9-2 LP	GGTGGTGGTACACGTGTATCC	Genotipificación de línea SALK <i>lrx9-2</i>
LRX10-1 RP	GGTGGTGAGGTAGGAGGAGAC	Genotipificación de línea SALK <i>lrx10-1</i>
LRX10-1 LP	TTAACACCACAGGAAACTGGC	Genotipificación de línea SALK <i>lrx10-1</i>
LRX10-1 #2 RP	CGCCGAAACTTCACTGGAGAC	Genotipificación de línea SALK <i>lrx10-1</i>
LRX10-1 #2 LP	GGTGACATTTGCAAACCATAGG	Genotipificación de línea SALK <i>lrx10-1</i>
LRX11-1 RP	TTCTGTCATTGCGTGATGTTT	Genotipificación de línea SALK <i>lrx11-1</i>
LRX11-1 LP	GAACGAGTTCTTGCTTGCATC	Genotipificación de línea SALK <i>lrx11-1</i>
P4H4 RP	AGCGAGAAAACCTCCAAACTCC	Genotipificación de línea SALK <i>p4h4</i>
P4H4 LP	ATACACAAACGCCCTGAACAC	Genotipificación de línea SALK <i>p4h4</i>
P4H6 RP	TGCCACACAATATTTTTCTGAAG	Genotipificación de línea SALK <i>p4h6</i>
P4H6 LP	TACCCTCAGGAAGAAAGGTCC	Genotipificación de línea SALK <i>p4h6</i>

Tabla M1. Oligonucleótidos empleados para la genotipificación de líneas mutantes por ADN-T de los genes *LRXs* y *P4Hs*.

La amplificación de las secuencias a partir de ADN genómico se realizó por la técnica de PCR. Para ello, se empleó la enzima recombinante *Taq* ADN polimerasa (*Invitrogen*, Cat n° 10342020) junto con los *buffers* suministrados por el fabricante. En cada reacción se colocaron 30-100 ng de ADN genómico como molde, 1X PCR *Buffer*, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP (*Promega*, Cat n° U1330), 0,5 μM de cada oligonucleótido y 1U de la enzima *Taq* ADN polimerasa. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (*Biorad*; *T100™ Thermal Cycler*) bajo las siguientes condiciones:

Desnaturalización inicial	94°C	5 min
	94°C	30 seg
Ciclado 33 ciclos	Temperatura de <i>annealing</i>	30 seg
	72°C	1 min/Kb
Extensión final	72°C	10min

6. Extracción de ARN de polen de Arabidopsis y PCR con Transcripción Reversa (RT-PCR)

En primer lugar se colectaron flores de cada genotipo y se colocaron en un tubo de microcentrífuga, libre de RNAsa, junto con 1 mL de medio de germinación de polen líquido (ver sección 6.2). Se realizó una agitación vigorosa durante 4 min, para desprender el polen maduro de las anteras, se removieron las flores y se incubó el polen durante 5 hs. Transcurrido este tiempo, se realizó una centrifugación por 5 min a 6.000 rpm a TA y se removió cuidadosamente el sobrenadante, conservando el precipitado compuesto mayormente por tubos polínicos. Luego se disgregó el precipitado empleando un émbolo de plástico estéril y se procedió con la extracción de ARN utilizando el kit *RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)* de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de ARN total extraído fueron cuantificadas en el equipo *NanoDrop 1000 (Thermo Scientific)*.

Para la síntesis del ADN copia (ADNc), se equipararon las concentraciones de ARN obtenido previamente para cada muestra y se realizó una reacción de transcripción reversa (RT) empleando la enzima transcriptasa reversa MM-LV (*Promega*). Para cada reacción, se colocaron 100 mM de dNTPs, 5X de *buffer* MM-LV, 10 µM de cada oligonucleótido específico (dTA, dTC y dTG) y el ARN; se realizaron dos incubaciones sucesivas (10 min a 65°C y 5 min a 37°C) y luego se adicionó 1 µl de la enzima MM-LV. Finalmente, se incubó la reacción por 1 h a 37°C y 15 min a 72°C. El ADNc obtenido fue utilizado como molde para la reacción de PCR final, respetando las siguientes condiciones de ciclado:

Desnaturalización inicial	94°C	5 min
	94°C	30 seg
Ciclado 30 ciclos	Temperatura de <i>annealing</i>	30 seg
	72°C	1 min/Kb
Extensión final	72°C	10 min

Los oligonucleótidos utilizados en la RT-PCR, presentan zonas de hibridación cercanas al extremo C-terminal de cada gen. El gen de actina fue utilizado como control interno (**Tabla M2**).

Nombre	Secuencia 5'-3'	Propósito
RT-LRX8 FW	GATTCAAATCATTACCCAGTGTTC	RT-PCR del gen <i>LRX8</i>
RT-LRX8 RV	TGGTGGCGATGCATATTGGTGTCC	RT-PCR del gen <i>LRX8</i>
RT-LRX9 FW	ACTCCATCATCAGAATCAAACCAGT	RT-PCR del gen <i>LRX9</i>
RT-LRX9 RV	TGGCGATGCATATTGGAATCCAAT	RT-PCR del gen <i>LRX9</i>
RT-LRX10 FW	CGGTCCATTACCCACTCCACCAG	RT-PCR del gen <i>LRX10</i>
RT-LRX10 RV	GGTGGTGAAGCATATTGGTGGCCGA	RT-PCR del gen <i>LRX10</i>
RT-LRX11 FW	ACTCACCGCCTCCACCGTTTCATTC	RT-PCR del gen <i>LRX11</i>
RT-LRX11 RV	GGCGGTGGTGGTGTGCGTATTGGT	RT-PCR del gen <i>LRX11</i>
RT-P4H4 FW	ACATTGTCCGTGGTGGACAT	RT-PCR del gen <i>P4H4</i>
RT-P4H4 RV	TTTCCGCTTGGTGTACGAT	RT-PCR del gen <i>P4H4</i>
RT-P4H6 FW	GTCACAAAGGGTGGAGAAACAGT	RT-PCR del gen <i>P4H6</i>
RT-P4H6 RV	AAGCTATTTGGGTCCGTTGTTCC	RT-PCR del gen <i>P4H6</i>
RT-ACTINA8 FW	ATGAAGATTAAGTTCGTGGCA	RT-PCR del gen <i>ACTINA8</i>
RT-ACTINA8 RV	GTTTTTATCCGAGTTTGAAGAGGC	RT-PCR del gen <i>ACTINA8</i>

Tabla M2. Secuencia de los oligonucleótidos empleados en la técnica de RT-PCR.

7. Estudio de la segregación de líneas mutantes

Para estudiar la segregación de las líneas mutantes, se realizaron auto-cruzamientos de plantas heterocigotas *lrx9-2^{+/-} lrx11-1^{+/-}*, *lrx8-2^{+/-} lrx10-1^{+/-}*, *lrx8-2^{+/-} lrx11-1^{+/-}*, *lrx9-2^{+/-} lrx10-1^{+/-}*, *lrx10-1^{+/-} lrx11-1^{+/-}*, *lrx8-2^{+/-} lrx9-2^{+/-} lrx10-1^{+/-}*, *lrx9-2^{+/-} lrx10-1^{+/-} lrx11-1^{+/-}* y se

analizó la descendencia de las mismas empleando la técnica de PCR (ver sección 5). Los oligonucleótidos utilizados se encuentran detallados en la **Tabla M1**. Las desviaciones de la segregación mendeliana se determinaron aplicando el *test* estadístico Chi-cuadrado (χ^2).

8. Análisis de la fertilidad

Se seleccionaron 10 silicuas del tallo principal de 11 plantas independientes, WT y mutante triple *lrx-9-2 lrx10-1 lrx11-1*, y se cuantificó el número de semillas por silicua. No fueron incluidas en el análisis las primeras 4 silicuas de cada tallo, debido a la baja viabilidad del polen de las primeras flores. Para facilitar el recuento, las silicuas fueron decolorizadas colocándolas en etanol 96% durante 3 horas y luego en agua destilada por 15 min. Se tomaron imágenes de cada vaina empleando una cámara acoplada a una lupa estereoscópica LEICA S9 E (*Leica Microsystems*).

9. Germinación *in vitro* de polen de *Arabidopsis thaliana*

Se empleó el protocolo de germinación de polen descrito por Boavida y McCormick (2007) con leves modificaciones. Para realizar los experimentos, se colectaron flores abiertas de cada genotipo y se las colocó sobre un papel humedecido por 30 min. Para los ensayos en medio de germinación de polen (MGP) semi-sólido (0,01% H_3BO_3 , 5 mM CaCl_2 , 5 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 10% sacarosa y 0.1% de agarosa de bajo punto de fusión, pH 7,5), se colocó 1 mL de MGP sobre un portaobjetos y, una vez solidificado, se pincelaron suavemente las flores para desprender el polen de las anteras. Se lo cubrió con un cubreobjetos y se incubaron las muestras en una cámara húmeda a 22°C por 3 horas.

El MGP semi-líquido (0,01% H_3BO_3 , 5 mM CaCl_2 , 5 mM KCl, 1 mM MgSO_4 y 10% sacarosa, pH 7,5) se llevó a volumen final empleando agarosa 0,15% previamente fundida en lugar de agua *Mili-Q*. Se seleccionaron flores abiertas de cada genotipo y se pincelaron sobre 30 μl de MGP para desprender el polen. Las muestras fueron incubadas en una cámara húmeda a 22°C durante 2 hs.

Para los ensayos de germinación de polen y medición de largo de tubo polínico, se analizaron entre 60 y 80 granos de polen por flor. Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio *Olympus BX41* con un objetivo 20X y las cuantificaciones se realizaron empleando el *software ImageJ* (Abreamoff *et al.*, 2004). Se consideraron como germinados los granos de polen cuyos tubos polínicos hayan alcanzado una longitud de al menos 2 veces el diámetro del grano. Solo fueron incluidos en el análisis aquellos ensayos donde el porcentaje de germinación fuera mayor al 40%. Para el ensayo de cinética de crecimiento, se preparó la muestra como se indicó anteriormente y se tomaron imágenes cada 10 min durante 3 horas. Se realizaron mediciones del largo de 7 tubos polínicos de 2 líneas independientes (n=2).

9.1. Ensayos de inhibición de las enzimas P4Hs

Para bloquear la actividad de las enzimas P4Hs, se emplearon los inhibidores EDHB (*ethyl 3,4-dihydroxybenzoate*) y DP (*α,α -dipyridyl*). Para el preparado de las soluciones *stock* 100 mM de los inhibidores, se pesó la cantidad adecuada de cada droga y se llevó a volumen con etanol absoluto. Los inhibidores fueron agregados al MGP semi-sólido según las concentraciones seleccionadas y, una vez pincelado el polen, se incubaron las muestras en cámara húmeda a 22°C por 3 hs. Las imágenes fueron adquiridas empleando un microscopio *Olympus BX41* con un objetivo de 20X y las cuantificaciones se realizaron con la herramienta “*cell counter*” del *software Image J*.

10. Ensayos de polinización semi-*in vivo* e *in vivo*

Para el ensayo semi-*in vivo*, se seleccionaron flores en estadios previos a la antesis y se emascularon pistilos (es decir, se despojaron de pétalos, sépalos y anteras) por 24 hs. Posteriormente los pistilos fueron polinizados manualmente con polen WT o mutante y luego de 30 min, se realizó un corte en la región superior y se posicionó el estigma más la porción superior del estilo suavemente sobre MGP semi-sólido dispuesto sobre un portaobjetos (Palanivelu and Preuss, 2006). Por último, se incubó el preparado en una

cámara húmeda a 22°C durante 3 horas. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio *Olympus BX41* empleando un objetivo de 10X.

Para el ensayo *in vivo*, se realizaron polinizaciones controladas (con cantidades de polen equivalentes) sobre pistilos previamente emasculados por 24 horas, empleando polen WT o mutante. Luego de 4 hs u 8 hs post-polinización, los pistilos fueron escindidos y fijados con ácido acético:etanol (1:3), rehidratados con series de etanol (70%, 50%, 30% y agua destilada), decolorados con NaOH 8M por 24 horas y teñidos con azul de anilina (azul de anilina 0.1% p/v en K₃PO₄ 108 mM, pH 11 y glicerol 2%) (Mori *et al.*, 2006), y se lo dejó reposar a TA y en oscuridad durante 1 h. Transcurrido este tiempo, los pistilos fueron colocados sobre un portaobjetos, se los cubrió con un cubreobjetos y se realizó una leve presión para compactar el tejido. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio fluorescente *Olympus BX41* y aumento 20X empleando luz UV.

11. Tinción de pectinas, calosa y celulosa y niveles de EROs de tubos polínicos germinados *in vitro*

Se seleccionaron flores en anthesis y se las incubó por 30 min sobre un papel humedecido. Luego las flores fueron pinceladas sobre 30 µl de MGP líquido, se colocó un cubreobjetos y se incubaron las muestras en cámara húmeda a 22°C durante 2 hs. Las pectinas fueron teñidas empleando Ioduro de propidio (IP) a una concentración final de 3 µM y, luego de 5 min de incubación, se adquirieron las imágenes. Para la tinción de la calosa, se adicionaron 5 µl de la solución de azul de anilina (AA) al MGP y para la tinción de celulosa se empleó 0,01% del reactivo S4B (*Pontamine Fast Sacarlet 4B*). El pico de excitación del IP es de 488 nm, el de AA de 395nm y el de S4B de 535nm. En todos los casos, se cuantificó la fluorescencia de la pared celular de la región apical y parte de la región subapical del tubo polínico empleando la función de “línea segmentada” del *software ImageJ* 1.5k (con un ancho de línea de 15 píxeles). La fluorescencia integrada fue normalizada al perímetro de la región medida.

Para estudiar los niveles de EROs, se adicionó 25 μM de diclorofluoresceína (H_2DCFDA) (pico de excitación a 495 nm) (Sigma, St. Louis, MO, USA) al MGP y se incubó la muestra por 5 min. . La medición de la fluorescencia se realizó trazando un ROI (región de interés) circular en la región citoplasmática de la zona apical. Las mediciones de IP y S4B fueron realizadas sobre secciones confocales adquiridas con un microscopio confocal *Leica SPE* y *Zeiss Meta 510 LSM*. Las imágenes de los tratamientos con AA y H_2DCFDA fueron tomadas con el microscopio de epifluorescencia *Olympus BX41* bajo luz UV.

12. Extracción de proteínas de polen

Las semillas de las plantas transgénicas utilizadas en este ensayo, fueron gentilmente proporcionadas por el grupo de investigación liderado por el Dr. Yi Guo perteneciente a la *Hebei Normal University*, Shijiazhuang, China. Las construcciones se encuentran publicadas en Wang *et al.*, 2018 y se detallan en la **Tabla M3**:

Transgen	Background
pLRX8::LRX8-GFP	<i>lrx8 lrx9 lrx10</i>
pLRX10::LRX10-GFP	<i>lrx8 lrx9 lrx10</i>
pLRX11::LRX11-GFP	<i>lrx8 lrx9 lrx11</i>

Tabla M3. Se especifica el transgen y el *background* genético en donde fue introducida la construcción.

La extracción de proteínas a partir de polen se realizó de acuerdo al protocolo de (Chang and Huang, 2017). En general, este método permite obtener alrededor de 100 μg de proteína total partiendo de 100 flores.

En primer lugar, se recolectaron en tubos de microcentrífuga aproximadamente 100 flores abiertas de cada planta transgénica (**Tabla M3**) y de plantas Col-0. Las muestras fueron colocadas inmediatamente en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C hasta el

momento de la extracción. El día del ensayo, se colocó 1 ml de *Buffer K-HEPES* con inhibidor de proteasas libre de EDTA (*Roche*) para cada muestra y se agitaron las flores durante 4 min para desprender la mayor cantidad de granos de polen posible. Luego, se realizó una centrifugación a 350 *g* durante 1 min a 4°C; a esta velocidad, el polen decantará y las flores quedarán en la región superior del tubo para ser removidas con mayor facilidad empleando una pinza. Una vez realizado este paso, se descartó el sobrenadante, se colocó el tubo en hielo y con un émbolo de plástico para tubos de 1,5 ml, se disgregó el polen durante 3 min. Luego se adicionaron 50 µl de *buffer K-HEPES* y se incubó la muestra en hielo durante 1 h. Finalmente se centrifugó a 18.000 *g* por 20 min a 4°C, y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo; este paso se repitió dos veces y las muestras de extracto proteico total fueron almacenadas a -80°C.

La concentración de proteína total se calculó mediante el ensayo de *Bradford*. Para ello se construyó una curva de BSA (*Bovine serum albumin; Sigma*) empleando concentraciones de 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 µg/µl; el blanco de reacción se preparó colocando 1 µl de *buffer K-HEPES* y 9 µl de agua *MilliQ*. Seguidamente, se realizaron diluciones 1/10 de las muestras obtenidas con agua *MilliQ*, y, en cada pocillo de una placa de 96 *wells*, se colocó 1 µl de cada dilución, 9 µl de agua *MilliQ* y 200 µl del reactivo de *Bradford*. Por último, se registró la absorbancia empleando un espectrofotómetro y se calculó la concentración de cada una de ellas al extrapolarlas con la curva de BSA.

13. SDS-PAGE y Western blot

El extracto proteico fue separado por electroforesis en un gel de poliacrilamida 10% bajo condiciones desnaturalizantes a voltaje constante (40 mA), según la técnica de SDS-PAGE. Se sembraron en el gel 100 µg de proteína total para cada muestra. Una vez finalizada la corrida electroforética, se realizó una transferencia húmeda de las proteínas separadas en el gel a una membrana de nitrocelulosa, a voltaje constante (100 V) durante 1,5 h. Luego, para revelar la presencia de las proteínas, se incubó la membrana durante 2 min con Rojo Ponceau y, a continuación, se realizaron lavados con agua destilada para

eliminar el colorante. Para el bloqueo de la membrana se empleó *buffer* de bloqueo conteniendo BSA y se incubó durante 30 min con agitación constante. Luego, se realizó una nueva incubación de la membrana, esta vez, con el anticuerpo “3H9 α -GFP” (*Chromotek*; Cat. No. #029762) durante toda la noche a 4°C y con agitación. Finalmente, se realizaron 3 lavados consecutivos de la membrana, se la incubó con el anticuerpo Anti-Rat IgG-Peroxidasa (*Sigma*; Cat. No. A9037-1ML) durante 30 min en agitación y se lavó nuevamente.

Para el revelado, se colocaron 300 μ l del reactivo luminiscente Luminata™ Crescendo (*Millipore*) y luego de 5 min, se registró la luminiscencia emitida empleando el equipo *GeneGenome XRQ* (*Syngene*). El extracto proteico de flores Col-0 fue empleado como control negativo, mientras que el control positivo corresponde a p35S::YFP.

14. Obtención de plantas transgénicas pP4H4::P4H4-YFP

Para los clonados, se ordenó la síntesis del promotor de *P4H4*, incluyendo a la región 5'UTR, y el ADNc del gen *P4H4*. El fragmento de 2,4 Kb fue sub-clonado en un vector pENTR-D-TOPO y recombinado en el vector destino pHGY. La construcción pP4H4::P4H4-YFP fue introducida en la cepa *Agrobacterium tumefaciens* GB3.101 por electroporación. Plantas Col-0 fueron transformadas por *floral-dip* de acuerdo al protocolo de Zhang *et al.*, 2006. Las semillas de las plantas transformadas (T0), fueron esterilizadas y sembradas en selección en medio MS (*Murashige & Skoog*) suplementado con Kanamicina. Luego de dos rondas de selección, se obtuvieron plantas transgénicas (T3) homocigotas y se seleccionaron aquellas que presentaran altos niveles de expresión en polen de la proteína P4H4-YFP para su posterior análisis.

RESULTADOS

Capítulo I

1. Análisis *in silico* de la expresión de los genes *LRX* de *Arabidopsis thaliana*

Mediante el análisis de los transcriptomas disponibles de *Arabidopsis thaliana* en Genevestigator (<http://genevestigator.com/gv>), se identificaron aquellos genes *LRX* con alta expresión en polen. Estos fueron: *LRX8*, *LRX9*, *LRX10* y *LRX11* (**Figura R1**). Como se puede observar, la expresión de los transcritos de *LRX8-LRX11* es específica en el gametofito masculino con respecto al resto de los tejidos de la planta. De acuerdo a los datos reportados de microarreglos generados durante el desarrollo del grano de polen de *Arabidopsis* (Hony and Twell, 2004) y empleando la herramienta *eFP* (*electronic Fluorescent Pictograph*) Browser [<http://bar.utoronto.ca>] (Winter et al., 2007), se pudo determinar que los niveles de expresión de los genes *LRX8-LRX11* son mayores en los estadios tardíos del desarrollo del grano de polen: grano de polen tricelular y grano de polen maduro (**Figura R2**). Por otro lado, el análisis de los datos de microarreglos de granos de polen germinados *in vitro* y *semi-in vivo* (Qin et al., 2009), revela que la expresión de los transcritos permanece elevada durante el desarrollo del tubo polínico (**Figura R2**). Todos estos datos sugieren que dichas proteínas no actuarían durante el desarrollo del grano de polen, sino que lo harían en etapas posteriores como la germinación y durante el crecimiento del tubo polínico.

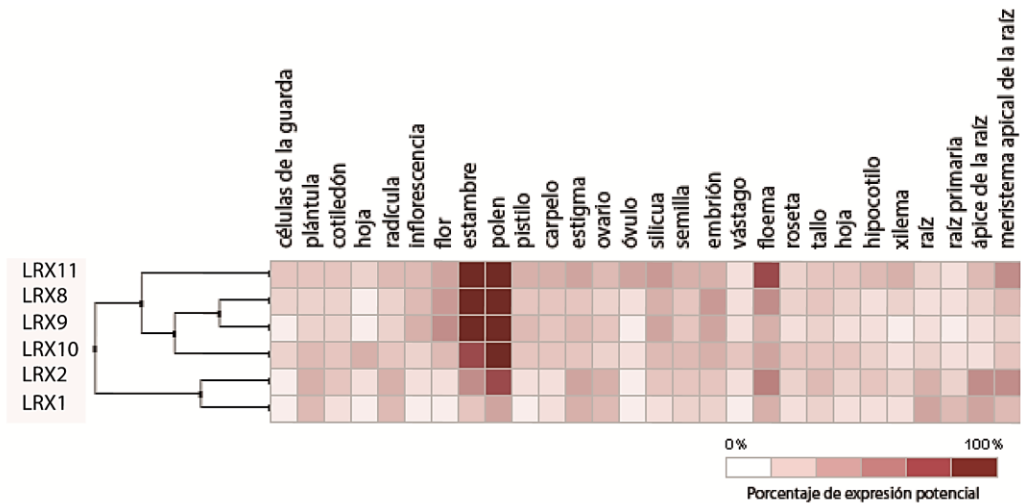


Figura R1. Patrón de expresión de los genes *LRX* en diferentes tejidos de *Arabidopsis thaliana* generado por el software *Genevestigator* (<http://genevestigator.com/gv>). Se incluyeron en el análisis a las proteínas LRX1 y LRX2 pertenecientes al clado vegetativo.

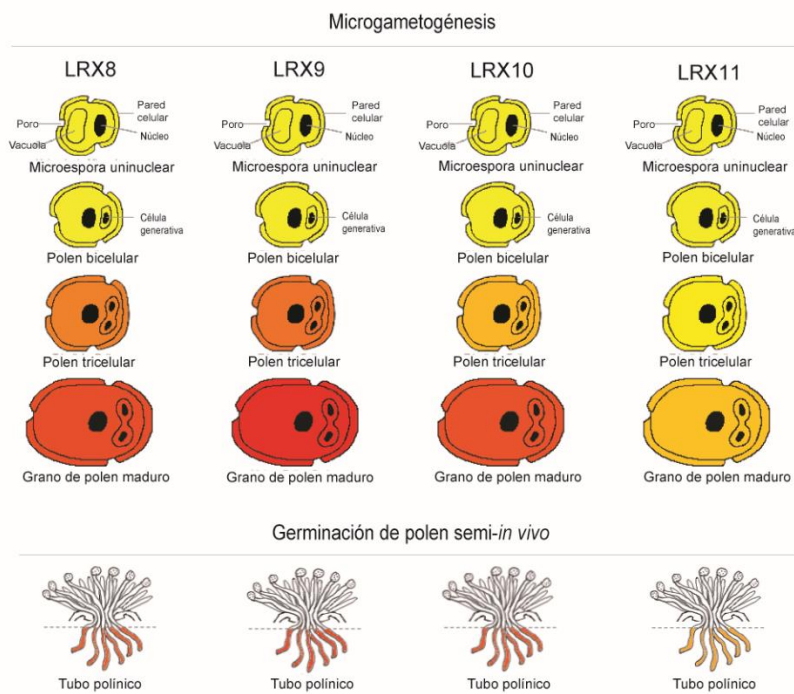


Figura R2. Representaciones pictográficas de datos obtenidos de microarreglos de *Arabidopsis thaliana*. Se observa la expresión de los transcritos de *LRXs* durante los diferentes estadios de desarrollo del grano de polen (microgametogénesis) y en ensayos de germinación de polen semi-*in vivo*, empleando la herramienta *eFP Browser* (<http://bar.utoronto.ca>) (Winter et al., 2007).

2. Análisis filogenético de la familia de las LRXs

Estudios previos de alineamiento de las secuencias aminoacídicas de proteínas LRXs presentes tanto en eudicotiledóneas (*Arabidopsis* y tomate) como en monocotiledóneas (arroz y maíz), permitió separar a las proteínas LRXs en dos grandes clados: las pertenecientes al clado vegetativo (LRX1-7) y las pertenecientes al clado reproductivo (LRX8-LRX11) (Baumberger *et al.*, 2003) (**Figura I11**).

Para llevar a cabo el análisis filogenético de las LRXs de polen, se realizó un nuevo alineamiento de las secuencias aminoacídicas completas de las proteínas LRX8-LRX11, empleando el método de *neighbor-joining* del software *Seaview* 4.6.1. La secuencia proteica de LRX1, perteneciente al clado vegetativo, fue empleada como *out-group*. El árbol filogenético de *bootstrap* resultante, representa al árbol consenso generado a partir de 1000 réplicas, cada una inferida por distancias paramétricas (**Figura R3**). De acuerdo al grado de homología de secuencia, se pudo asociar a las proteínas LRX8 y LRX9 en un subgrupo y a las proteínas LRX10 y LRX11 en otro, presentando una similitud aminoacídica del 68.12% y 76.43% respectivamente.

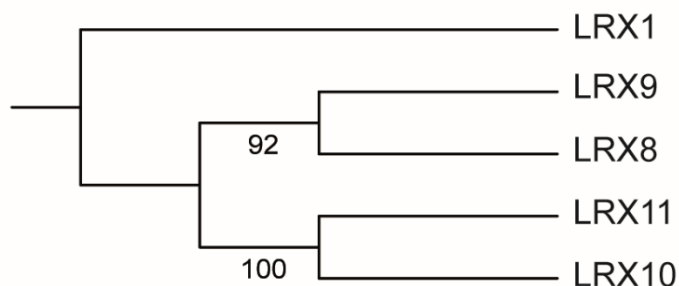


Figura R3. Árbol filogenético de las LRXs generado con el software *Seaview* 4.6.1 empleando el método de *neighbor-joining*. La secuencia proteica de LRX1 fue empleada como *out-group*.

3. Estructura modular de las proteínas LRXs

Las proteínas LRXs son proteínas modulares de tipo quimera ya que presentan en su estructura un dominio N-terminal globular de tipo LRR, rico en repeticiones de leucina,

seguido de una corta región enriquecida en cisteínas y un dominio C-terminal hipervariable de tipo extensina. Para la identificación de estos dominios, se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas completas de las proteínas LRXs de polen, junto a la proteína LRX1 de alta expresión en raíz, empleando el *software* CLUSTALW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) (Figura R4).

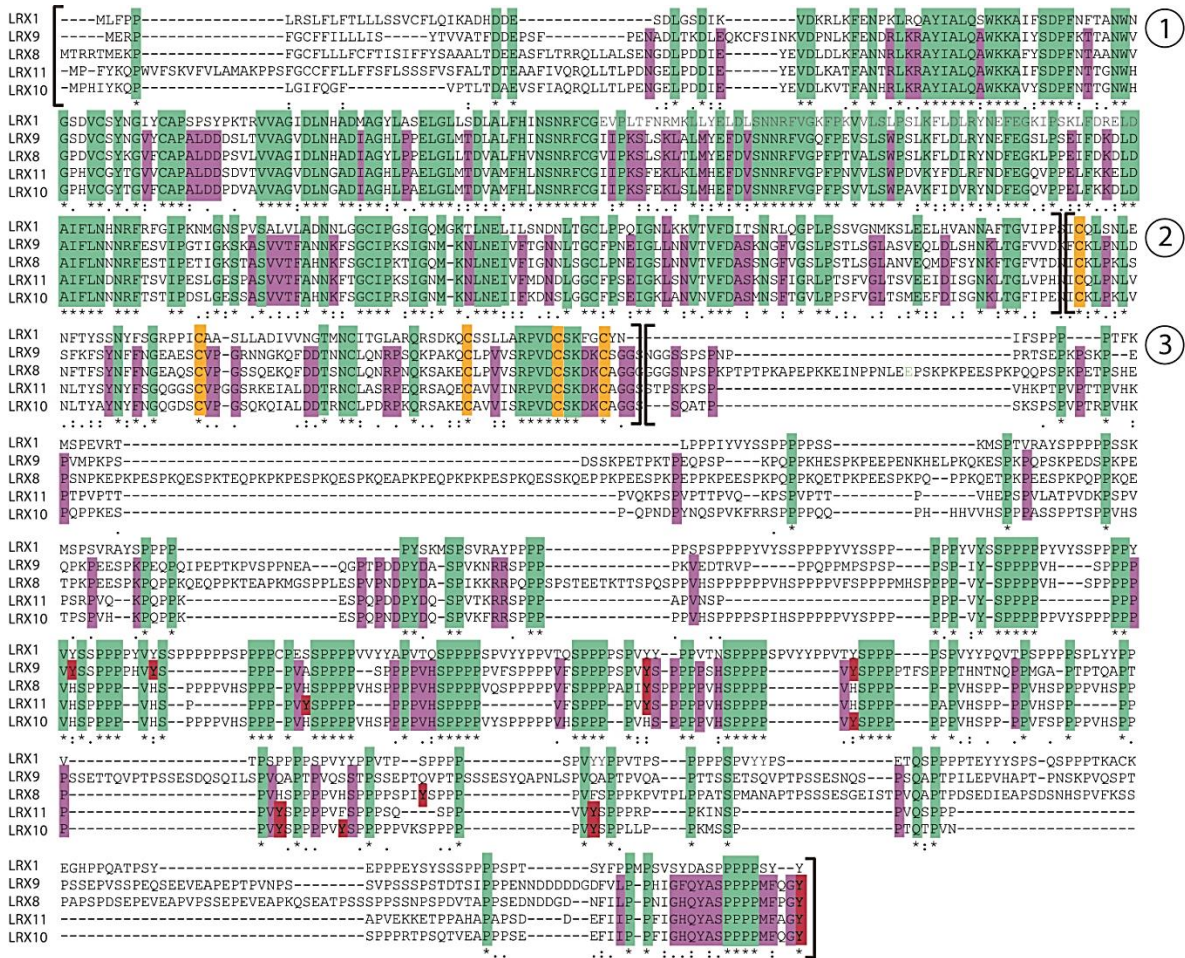


Figura R4. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de las proteínas LRX1 y LRX8-LRX11 generado por CLUSTALW. Se indican los motivos LRR (1), rico en cisteína (2) y EXT (3). Se señalan aquellos aminoácidos que se encuentran conservados entre las cinco LRXs (celeste), los aminoácidos conservados solo en las LRX de polen (verde), las cinco cisteínas conservadas (naranja) y los residuos de Tyr de las LRX8-LRX11 (rojo). La secuencia de la proteína LRX1, perteneciente al clado vegetativo, fue empleada como molde.

El alineamiento permitió determinar que el segmento LRR se encuentra altamente conservado entre las LRXs analizadas y que consiste en 11 repeticiones de la secuencia consenso LxxLxxLxLxxNxLxGxIPxxLGx, donde la posición “x” puede ser ocupada por cualquier aminoácido y la posición “L” puede corresponder a Leu o un aminoácido alifático como Val, Ile o Phe (Baumberger *et al.*, 2003) (**Figura R4**). A continuación del dominio LRR, las LRXs presentan una corta región con cinco residuos de Cys en posiciones conservadas y regularmente espaciadas. La conservación en estas posiciones permite suponer que los puentes disulfuro, resultantes de la interacción entre las Cys, serían importantes para alcanzar el correcto plegamiento de la proteína. Finalmente, el dominio de tipo EXT de las LRX8-LRX11, presenta un número de repeticiones de Ser-Pro₍₃₋₅₎ variable, encontrándose 25 repeticiones para LRX8, 14 para LRX9, 24 para LRX10 y 17 para LRX11 (**Figura R4, R5**). Por otro lado, se pudo observar que las proteínas LRXs de polen no presentan el típico motivo de *crosslinking* Tyr-x-Tyr (donde la posición “x” puede ser ocupada por cualquier aminoácido) en el dominio EXT, que sí está presente en las LRX1-7 del clado vegetativo. Sin embargo, contienen Tyr en el extremo C-terminal que podrían ser necesarias para su anclaje en la pared celular.

Mediante el empleo del *software TargetP 1.1 Server* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>), se identificó la presencia de un péptido señal en las LRX8-LRX11, de una longitud aproximada de 24 aminoácidos, necesario para ser enviadas al retículo endoplasmático (RE)/Golgi donde sufrirían las modificaciones post-traduccionales (MPTs) adecuadas y posteriormente ser introducidas en el sistema secretor. Por otro lado, el estudio de la estructura nucleotídica reveló que los genes *LRX8-LRX11* están constituidos por un solo exón, a excepción del gen *LRX10*, que contiene un pequeño intrón luego del péptido señal (**Figura R5**).

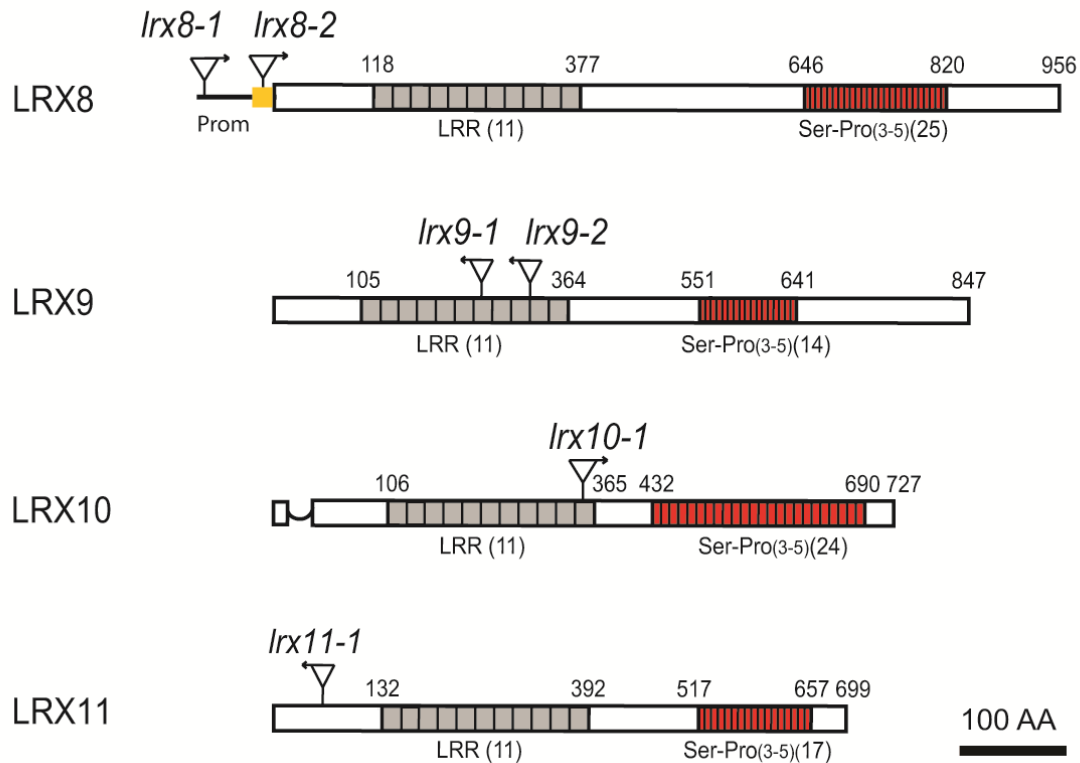


Figura R5. Representación esquemática de la estructura proteica de las LRXs. Se muestran los dominios LRR (gris) y EXT (rojo), exones (rectángulos) e intrón (línea curva), sitios de inserción de ADN-T, región promotora (Prom) y 5'UTR (amarillo). Escala: 100 aminoácidos.

4. Obtención y análisis de las mutantes simples de inserción de los genes *LRX8-LRX11*

Para llevar a cabo el estudio funcional de las proteínas LRXs en la germinación del grano de polen y durante el desarrollo y crecimiento del tubo polínico, se ordenaron al banco de germoplasma de Arabidopsis (ABRC, por sus siglas en inglés), semillas de mutantes insercionales de ADN de transferencia (ADN-T) para cada locus *LRX8-LRX11* de polen. Para el gen *LRX8* (At3g19020), las líneas salk_002743 (*lrx8-1*) y salk_031536 (*lrx8-2*). Para el gen *LRX9* (At1g49490), las líneas salk_137163 (*lrx9-1*) y salk_136163 (*lrx9-2*). Para el gen *LRX10* (At2g15880), la línea salk_087083 (*lrx10-1*) y para el gen *LRX11* (At4g33970), la línea salk_076356 (*lrx11-1*) (ver **Figura R5**).

Para todas ellas, se identificaron las líneas mutantes homocigotas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando oligonucleótidos que flanquean a la región de inserción del ADN-T. La obtención de líneas homocigotas sugiere que la ausencia individual de cada una de las proteínas LRX8-LRX11, no afecta la capacidad del polen en fertilizar.

Para corroborar que los niveles de transcripto fueran nulos en las líneas mutantes homocigotas, se obtuvo el ADN copia (ADNc) mediante la técnica de RT-PCR a partir del extracto total de ARN de polen germinado *in vitro* (**Figura R6**). Luego, se realizó una PCR empleando como molde el ADNc y oligonucleótidos que hibridaran en la región C-terminal de cada gen *LRX* (**Tabla M2**). Efectivamente, todas las líneas mutantes mostraron niveles nulos del transcripto, a excepción la línea *lrx8-1*, motivo por el cual fue descartada para posteriores análisis.

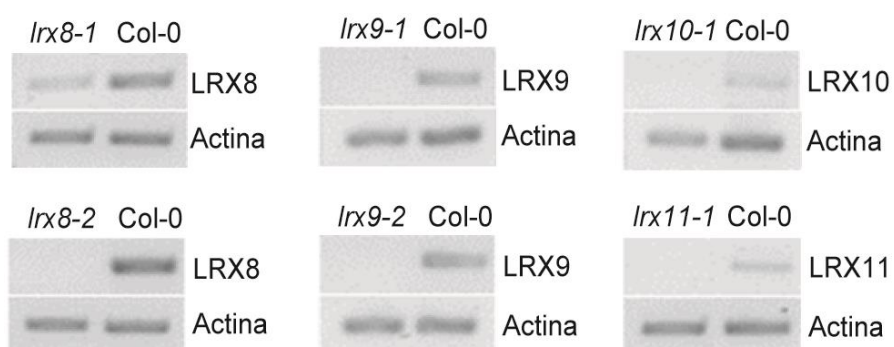


Figura R6. Medición de los niveles de transcripto de los genes *LRX8-LRX11* empleando la técnica de RT-PCR sobre el extracto total de ARN extraído de granos de polen germinados *in vitro*. Actina fue empleada como control interno.

5. Obtención de mutantes múltiples por cruzamiento

Debido a la alta identidad entre las secuencias aminoacídicas de las LRXs (**Figura R4**) y a la falta de un fenotipo claro resultante del análisis de las líneas mutantes simples

homocigotas, se planteó la existencia de una posible redundancia funcional entre ellas, tal como se observó anteriormente para las proteínas LRX1 y LRX2 de raíz (Baumberger *et al.*, 2003). Para corroborar esta hipótesis, se obtuvieron mutantes múltiples por cruzamientos manuales:

Genotipo	Denominación
Mutante doble	<i>lrx8-2 lrx10-1</i>
Mutante doble	<i>lrx8-2 lrx11-1</i>
Mutante doble	<i>lrx9-2 lrx10-1</i>
Mutante doble	<i>lrx9-2 lrx11-1</i>
Mutante doble	<i>lrx10-1 lrx11-1</i>
Mutante triple	<i>lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1</i>

Debido a la severidad creciente del fenotipo aberrante del polen a medida que aumentan la multiplicidad de las mutaciones *lrx* (tal como se verá más adelante), no fue posible la obtención de la cuádruple mutante *lrx8 lrx9 lrx10 lrx11*.

6. Evaluación de los parámetros de fertilidad de las mutantes de LRXs

6.1. Ensayos de germinación de polen *in vitro*

Para comenzar a estudiar el rol durante la polinización de las proteínas LRX8-LRX11, se llevó a cabo el análisis funcional de las diferentes líneas mutantes obtenidas mediante ensayos de germinación de polen realizados *in vitro*, *semi-in vivo* e *in vivo*.

En primer lugar, se analizó si la germinación de los granos de polen se veía afectada en ausencia de las proteínas LRX8-LRX11. Para ello, se realizaron ensayos de germinación *in vitro* de polen de *Arabidopsis* y se procedió al recuento de los granos de polen germinados luego de 3 hs de incubación. Se consideraron como germinados a aquellos granos de polen cuyo tubo polínico fuera por lo menos el doble de largo del diámetro del

grano. Se observó una reducción estadísticamente significativa del porcentaje de germinación en relación a Col-0 (WT) (fijado como el 100% de germinación) para todas las líneas analizadas (*lrx9-2*: 60.8%, *lrx10-1*: 73.2%, *lrx11-1*: 71.9%, *lrx8-2 lrx10-1*: 69.1%, *lrx9-2 lrx11-1*: 52.8%, *lrx9-2 lrx10-1*: 43.7% y *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1*: 39.3%), a excepción de la mutante simple *lrx8-2* (97.3%) (**Figura R7**). Como puede apreciarse, la disminución en la germinación fue mayor en las mutantes dobles respecto de las mutantes simples y alcanzó los valores más bajos (39.3%) en la mutante triple *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1*.

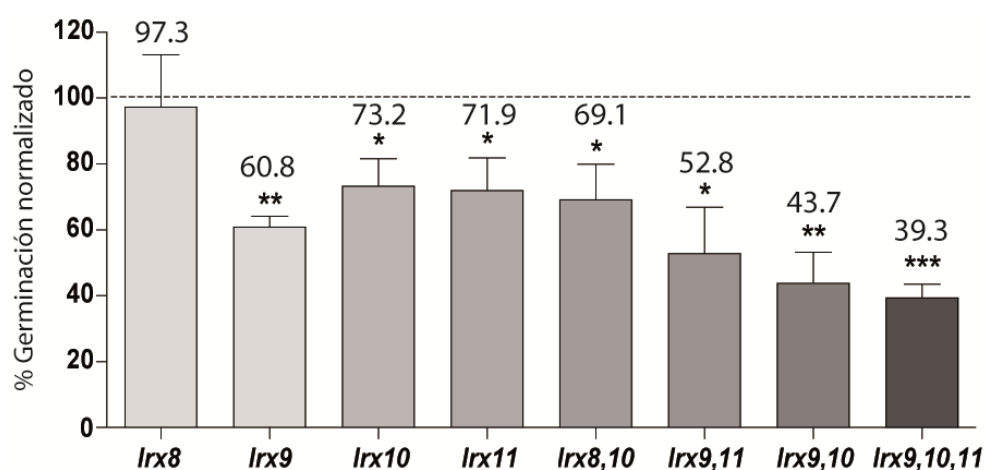


Figura R7. Tasa de germinación de granos de polen de las mutantes *lrx* simples, dobles y triple normalizados con respecto a Col-0, fijado como el 100% de germinación. Se grafican los valores promedios \pm SEM para *lrx8-2* (n=3), para *lrx9-2* (n=3), para *lrx10-1* (n=8), para *lrx11-1* (n=7), para *lrx8-2 lrx10-1* (n=11), para *lrx9-2 lrx11-1* (n=6), para *lrx9-2 lrx10-1* (n=3) y para *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1* (n=15), donde “n” corresponde al número de plantas independientes con más de 80 granos de polen analizados por genotipo y experimento. Los asteriscos representan diferencias significativas de acuerdo al test Student’ t: (*) $P \leq 0.05$, (**) $P \leq 0.01$ y (***) $P \leq 0.001$.

A continuación, se realizaron mediciones del largo de los tubos polínicos de las plantas mutantes y Col-0. En esta ocasión, solo fueron incluidos en el análisis aquellos tubos polínicos sanos que no presentaban anomalías. No se observaron diferencias significativas en las líneas analizadas, a excepción de la mutante doble *lrx8-2 lrx10-1* que mostró tubos polínicos más largos con respecto a Col-0 (**Figura R8**).

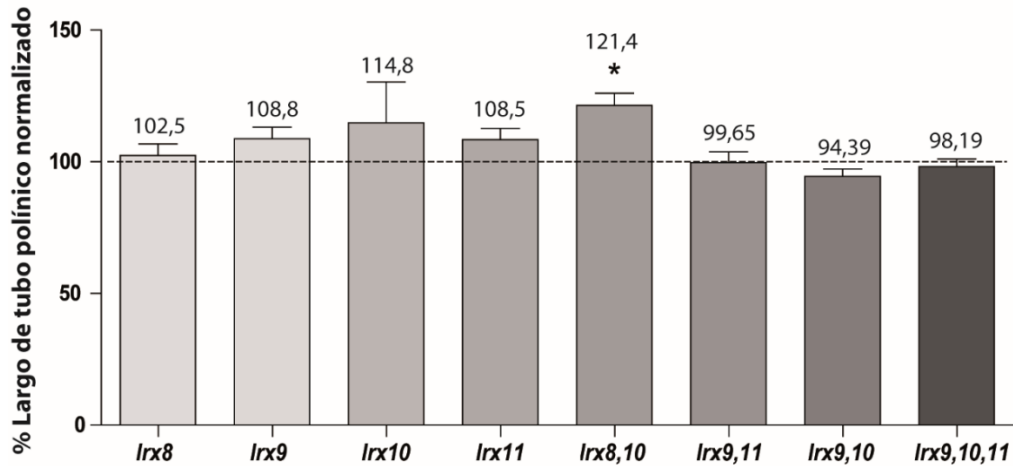


Figura R8. Medición del largo de tubos polínicos de las mutantes *lrx* simples, dobles y triple, de granos de polen germinados *in vitro* durante 3 hs. Se grafican los valores promedios \pm SEM, para *lrx8-2* (n=6), para *lrx9-2* (n=5), para *lrx10-1* (n=3), para *lrx11-1* (n=11), para *lrx8-2 lrx10-1* (n=11), para *lrx9-2 lrx11-1* (n=6), para *lrx9-2 lrx10-1* (n=10) y para *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1* (n=13), donde “n” corresponde al número de plantas independientes con más de 80 tubos polínicos analizados por genotipo y experimento. Los valores promedios fueron normalizados respecto a Col-0, fijado como el 100% del largo. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto a Col-0 de acuerdo al test ANOVA de un factor: (*) $P \leq 0,05$.

Durante el análisis del polen de plantas mutantes, resultó frecuente la aparición de tubos polínicos con morfología anormal. Dentro de las anomalías encontradas, se observó la formación de protuberancias desarrolladas tanto en la zona apical como en la base del tubo polínico, crecimiento sinuoso, ápices ensanchados y explosión de los tubos con la consecuente descarga del contenido citoplasmático a tiempos tempranos del desarrollo (**Figura R9A**). El porcentaje de tubos polínicos anormales fue mayor en las mutantes dobles *lrx8-2 lrx10-1* y *lrx9-2 lrx11-1* y en la mutante triple *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1* con respecto a las mutantes simples y a Col-0 (**Figura R9B**).

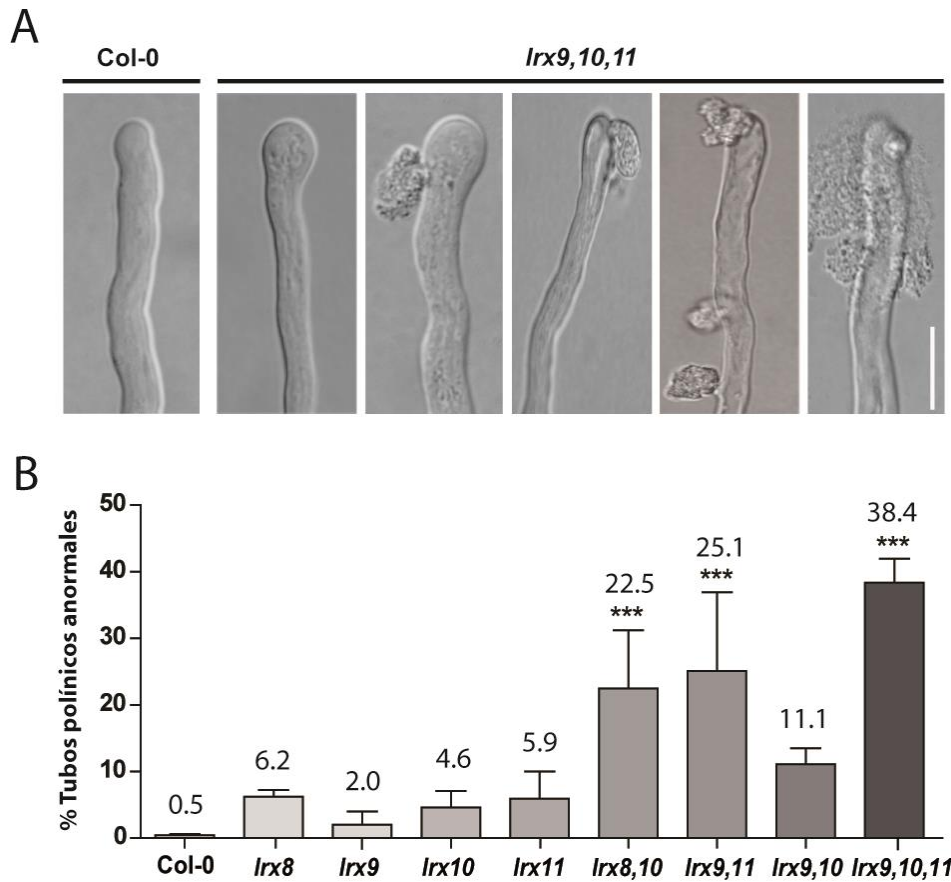


Figura R9. A) Imágenes microscópicas representativas de los fenotipos de tubos polínicos de Col-0 y *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1*. Escala: 10 μ m. **B)** Porcentaje de tubos polínicos anormales sobre el total de granos de polen germinados *in vitro* durante 3 hs. Se grafican los valores promedios \pm SEM, para Col-0 (n=33), para *lrx8-2* (n=3), para *lrx9-2* (n=4), para *lrx10-1* (n=8), para *lrx11-1* (n=7), para *lrx8-2 lrx10-1* (n=7), para *lrx9-2 lrx11-1* (n=6), para *lrx9-2 lrx10-1* (n=3) y para *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1* (n=15), donde “n” corresponde al número de plantas independientes con más de 80 tubos polínicos analizados por genotipo y experimento. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a Col-0 de acuerdo al test ANOVA de un factor: (***) $P \leq 0,001$.

La **Figura R9B** muestra resultados luego de 3 hs de germinación *in vitro*. Si el ensayo se prolonga hasta las 8 hs post germinación, casi la totalidad de los tubos polínicos de la mutante triple *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1* (94.31%) desarrollan este tipo de anomalías (**Figura R10**), confirmando la implicancia de las proteínas LRX8-LRX11 durante el crecimiento polarizado de los tubos polínicos.

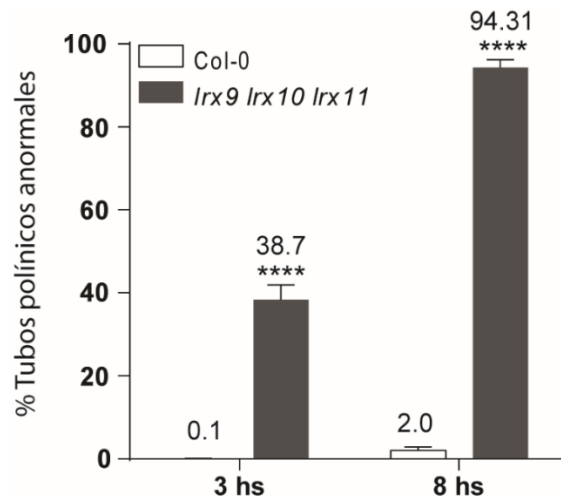


Figura R10. Gráfico del porcentaje de tubos polínicos anormales de Col-0 y la mutante triple *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1* sobre el total de granos de polen germinados, luego de 3 y 8 hs de crecimiento *in vitro*. Se grafican los valores promedios \pm SEM, para Col-0 (n=9) y *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1* (n=6) a las 3 horas y para Col-0 (n=15) y *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1* (n=7) a las 8 horas, donde “n” corresponde al número de plantas independientes con más de 80 tubos polínicos analizados por genotipo y experimento. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a Col-0 de acuerdo al test Student’t: (****) $P \leq 0,0001$.

Luego se realizaron estudios de cinética del crecimiento de tubos polínicos de plantas Col-0 y de la mutante triple *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1*. Para esto, se efectuaron mediciones del largo de los tubos polínicos crecidos *in vitro* cada 10 minutos, durante 3 hs. En la **Figura R11A** se puede observar que, luego de 60 minutos de crecimiento a una velocidad similar a Col-0, la pendiente de la curva correspondiente a los tubos polínicos de la mutante triple, disminuye. Esto sugiere que existe una reducción en la velocidad de crecimiento de los tubos polínicos mutantes ($181.5 \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$) en comparación con los tubos polínicos Col-0 ($214.0 \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$). La **Figura R11B** muestra, a modo representativo, el crecimiento de un tubo polínico mutante triple *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1* a lo largo de 3 hs. Como puede apreciarse, la expansión se detiene a los 60 minutos y a partir de los 80 minutos se observa el ensanchamiento del ápice y el desarrollo de una protuberancia en dicha región.

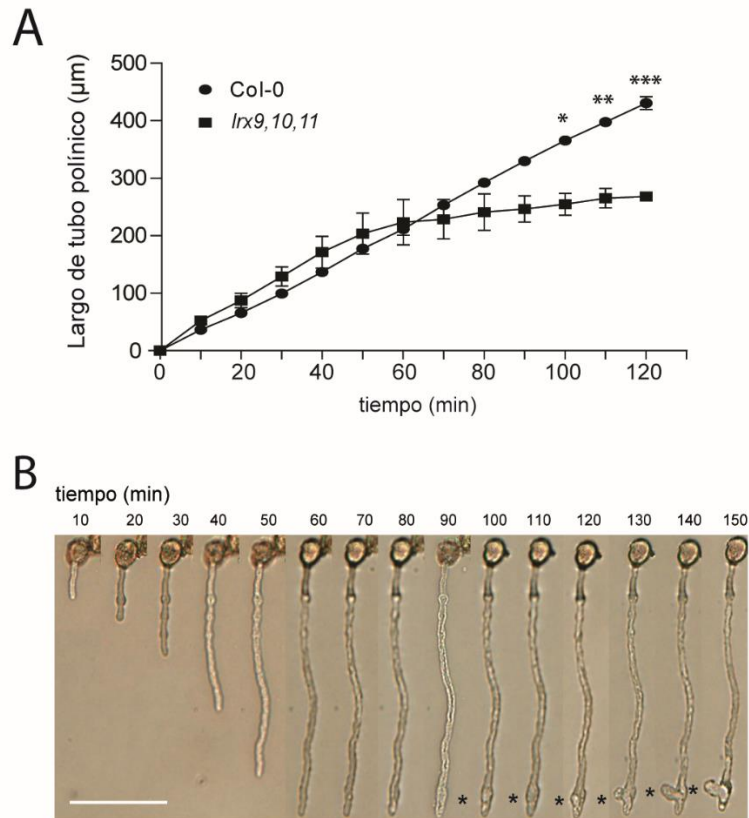


Figura R11. A) Análisis de la cinética de crecimiento de tubos polínicos Col-0 y *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1* germinados *in vitro* durante 3 hs. Se grafican los promedios \pm SEM de dos experimentos independientes y siete tubos polínicos analizados por experimento. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a Col-0 de acuerdo al test Student't: (*) $P \leq 0,05$, (**) $P \leq 0,01$, y (***) $P \leq 0,001$. **B)** Imágenes representativas del crecimiento de un tubo polínico mutante triple *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1*. Los asteriscos indican el desarrollo de una protuberancia cercano a la región apical. Escala: 100 μm .

En conjunto, todos estos resultados demuestran que la tasa de germinación y el crecimiento de los tubos polínicos se encuentran afectados en las mutantes *lrx*, siendo este fenotipo más drástico en la mutante triple *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1* con respecto a las mutantes simples y dobles analizadas, lo que permite suponer la existencia de una posible redundancia funcional entre estas proteínas.

6.2. Estudio de la distribución de polisacáridos en la pared celular de la mutante triple *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1*

Basándonos en la hipótesis de que las proteínas de tipo LRX tendrían un rol estructural en la pared celular y en las evidencias obtenidas de los análisis realizados anteriormente, se propuso estudiar la distribución de polisacáridos mayoritarios en la pared celular de los tubos polínicos (calosa, celulosa y pectina) en las mutantes *lrx* de polen.

Como se mencionó anteriormente, la composición y distribución de polisacáridos en la pared celular de tubos polínicos de *Arabidopsis thaliana* ha sido ampliamente estudiada (Derksen et al., 2002; Dardelle et al., 2010; Chebli et al., 2012). A diferencia de las células vegetales, las paredes celulares de los granos de polen están compuestas mayoritariamente por calosa y pectina, mientras que la celulosa se encuentra en menor proporción. En tubos polínicos de *Arabidopsis thaliana*, la pectina con alto grado de esterificación se encuentra principalmente en el ápice del tubo, mientras que en la región subapical y distal prevalece en su forma desesterificada. Se ha visto que durante la germinación de los granos de polen, los eventos de exocitosis que distribuyen la pectina en la pared celular ocurre únicamente en los primeros 5 μm de la región apical (Chebli et al., 2012). Por otro lado, la calosa es sintetizada en la membrana plasmática y se deposita en la lámina interna de la pared celular en la zona distal de tubo polínico (a partir de los 10 μm desde el ápice). Por último, la celulosa se acumulada en gran medida en la región apical y disminuye al alejarse de la zona. En los tubos polínicos de angiospermas, el contenido de celulosa es relativamente bajo, representando solo un 10% del total de polisacáridos en los tubos polínicos de *Nicotiana glauca* (Chebli et al., 2012). Microfotografías de transmisión electrónica, muestran que la celulosa cristalina marcada con CBM3a, se deposita en la lámina interna de la pared celular (Chebli et al., 2012).

Para analizar si la ausencia de las proteínas LRXs en los tubos polínicos triples mutantes *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1* provoca una alteración en la deposición de los polisacáridos mayoritarios de la pared celular, se procedió a la cuantificación de los niveles

de calosa, celulosa y pectina durante el crecimiento de tubos polínicos *in vitro*, empleando diferentes reactivos que, al unirse a dichos componentes, fluorescen. Para el análisis cuantitativo, fueron excluidos aquellos tubos polínicos que presentaron una protuberancia en la región donde se efectuó la medición.

En primer lugar, se cuantificó el contenido de pectina en la pared celular de los tubos polínicos, utilizando ioduro de propidio (IP) el cual compite con el Ca^{2+} por su unión a los residuos carboxílicos de los homogalacturonanos no metoxilados (Rounds et al., 2011). Las mediciones se efectuaron en el perímetro de los tubos polínicos incluyendo la zona apical y subapical y normalizando la señal de fluorescencia respecto al perímetro del tubo polínico de la región medida. El análisis reveló una deposición significativamente mayor de pectina en tubos polínicos de la mutante triple *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1* con respecto a Col-0 (**Figura R12A**). Al trazar una línea transversal en la región subapical de los tubos polínicos teñidos con IP, se pudo observar que la intensidad de fluorescencia en los márgenes (que corresponden a la pared celular) fue mayor y más variable en los tubos polínicos de la mutante triple *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1* con respecto a Col-0 (**Figura R12B**).

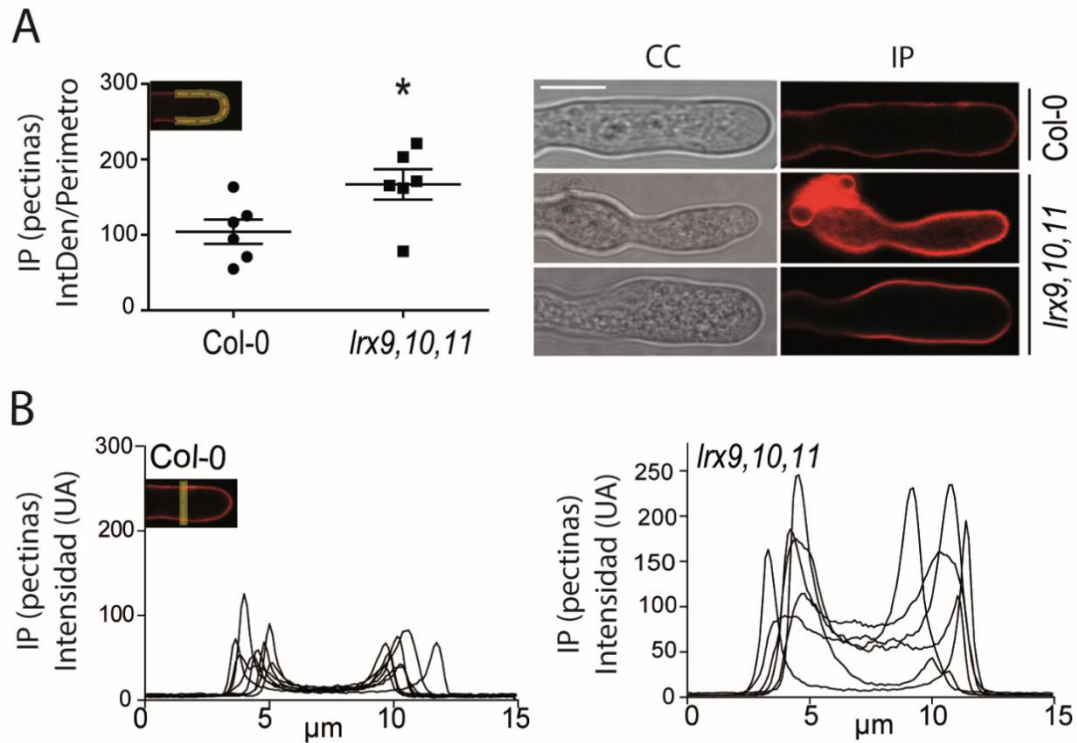


Figura R12. A) Cuantificación del contenido de pectinas en la pared celular de tubos polínicos de Col-0 y la mutante triple *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1*, teñidos con Ioduro de propidio. La señal de fluorescencia (línea amarilla) fue normalizada respecto al perímetro del tubo polínico de la región medida. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a Col-0 de acuerdo al test Student't: (*) $P \leq 0.05$. A la derecha, imágenes representativas de los tubos polínicos con diferentes morfologías. CC: campo claro. IP: Ioduro de propidio. IntDen: Densidad Integrada. Escala: 5 μm . **B)** Mediciones de fluorescencia de IP efectuadas mediante el trazado de una línea transversal (línea amarilla) a 5 μm de la zona apical del tubo polínico. UA: unidades arbitrarias.

A continuación, se cuantificó el contenido de calosa y celulosa en la pared celular de tubos polínicos, utilizando para las tinciones, azul de anilina (AA) y *Pontamine Fast Scarlet* (S4B), respectivamente. El AA ha sido ampliamente utilizado para detectar calosa en la pared de células vegetales (Mori et al., 2006; Schenk and Schikora, 2015). Por otro lado, la ventaja del uso del reactivo S4B, reside en que la intensidad de fluorescencia aumenta en presencia de celulosa, siendo inocuo a las concentraciones de trabajo y presentando mayor especificidad por los glicanos en comparación con el reactivo *Calcofluor White* (Wallace and Anderson, 2012). Nuevamente, las mediciones se efectuaron en el perímetro

de los tubos polínicos incluyendo la zona apical y subapical y normalizando la señal de fluorescencia respecto al perímetro del tubo polínico de la región medida. Como se puede observar en la **Figura R13A**, los tubos polínicos de la mutante triple *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1* presentan mayor contenido de calosa con respecto a Col-0 y localización ectópica de este polisacárido en la región apical. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en el contenido de celulosa en la pared celular de los tubos polínicos de la mutante triple y Col-0 (**Figura R13B**).

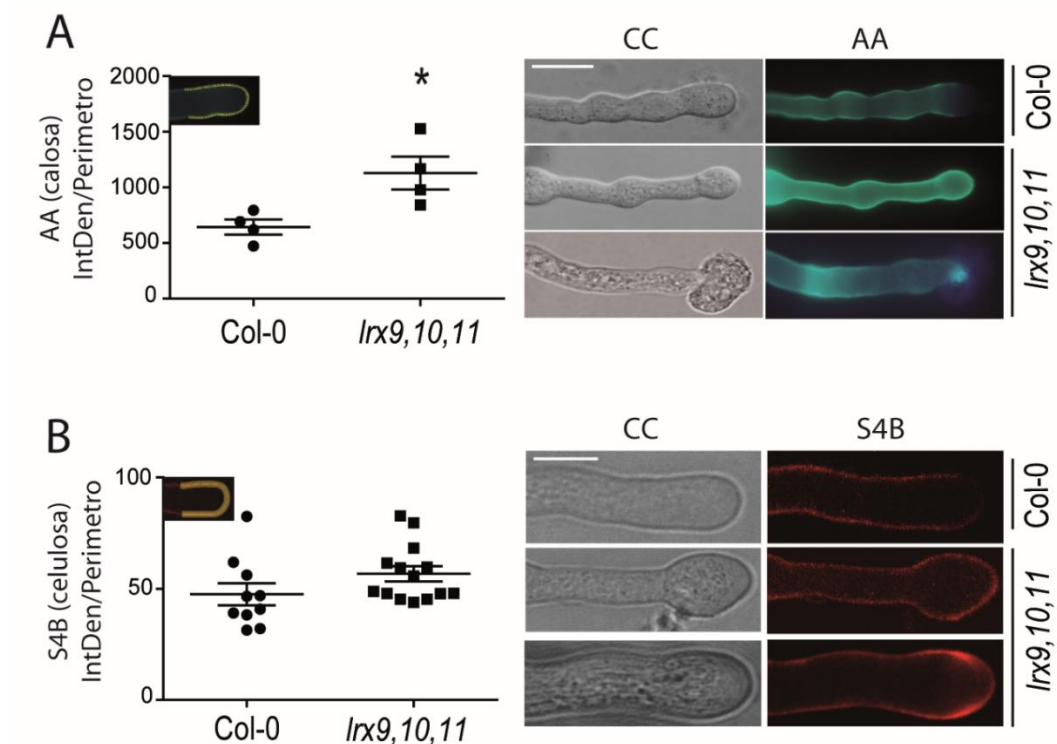


Figura R13. Cuantificación del contenido de calosa **(A)** y celulosa **(B)** en la pared celular de tubos polínicos de Col-0 y la mutante triple *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1*, teñidos con azul de anilina (AA) y *Pontamine Fast Scarlet* (S4B). La señal de fluorescencia (línea amarilla) fue normalizada respecto al perímetro del tubo polínico de la región medida. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a Col-0 de acuerdo al test Student't: (*) $P \leq 0,05$. IntDen: Densidad Integrada. A la derecha, imágenes representativas de los tubos polínicos con diferentes morfologías. CC: campo claro. Escala: 10 μ m. Fueron excluidos del análisis aquellos tubos polínicos que presentaran protuberancias en la región apical.

Al observar la distribución de los diferentes polisacáridos en la pared celular de tubos polínicos de la mutante triple *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1* con anomalías en su morfología, se pudo apreciar que existe acumulación de calosa en la zona de iniciación de las protuberancias, mientras que la pectina se encuentra presente en el interior de las mismas (**Figura R12A, R13A**). Estas observaciones sugieren que la disminución en la velocidad de crecimiento de los tubos polínicos anteriormente observada, se debería a un aumento en la rigidez de la pared celular dado por la acumulación heterogénea de pectinas y la deposición aberrante de calosa en la región apical del tubo polínico.

En conjunto, estos resultados permiten concluir que la ausencia de las proteínas LRXs en la pared celular de los tubos polínicos, ocasiona la deposición alterada de pectinas y calosa, comprometiendo la integridad estructural de la pared celular tanto en la zona apical como subapical y alterando gravemente el crecimiento polarizado.

6.3 Estudio de los niveles de EROs en tubos polínicos de la mutante triple *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1*

Estudios previos han revelado la importancia de las especies reactivas de oxígeno (EROs) como moléculas señalizadoras durante el crecimiento celular polarizado (Potock *et al.*, 2006; Mangano *et al.*, 2016). Se ha visto que las EROs se acumulan en la región apical de los tubos polínicos. Las enzimas NADPH oxidasas, RBOHH y RBOHJ localizadas en la membrana plasmática, producen EROs de forma Ca^{2+} dependiente, y éste se acumula en la pared celular de los granos de polen, permitiendo la elongación del tubo polínico (Kaya *et al.*, 2014; Kaya *et al.*, 2015). Asimismo, se sugiere que las EROs estimulan los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática induciendo el influjo de Ca^{2+} hacia el citoplasma, donde actúa como modulador de la dinámica de actina y otros procesos requeridos para el crecimiento polarizado (Mangano *et al.*, 2016). Además, se ha demostrado que las EROs estarían involucradas en el proceso de ruptura y descarga del contenido citoplasmático de los tubos polínicos para producir la fertilización de manera Ca^{2+} dependiente, proceso

regulado por un mecanismo de señalización mediado por las Rho GTPasas (Duan et al., 2014).

Para estudiar los niveles de EROs citoplasmáticos de tubos polínicos Col-0 y de la mutante triple *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1* crecidos *in vitro*, se empleó el colorante 2,7-dichlorofluoresceína ($H_2DCF-DA$). Como se observa en la **Figura R14**, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de EROs de tubos polínicos de la mutante triple *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1* con respecto a Col-0. Sin embargo, el reactivo $H_2DCF-DA$ es sensible a varias especies generadoras de EROs y se oxida rápidamente dificultando la medición. Es por esto que, para realizar un estudio más preciso, sería necesario el empleo de biosensores como por ejemplo, el sensor fluorescente *Hyper* para la determinación de H_2O_2 (Belousov et al., 2006) y así poder explorar de forma radiométrica si la homeostasis de EROs se encuentra alterada.

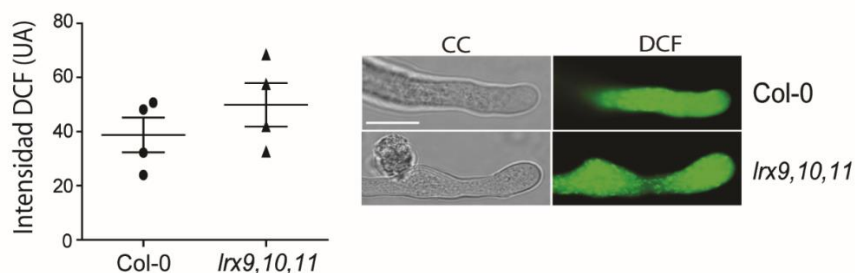


Figura R14. Cuantificación de los niveles de EROs en tubos polínicos Col-0 y mutante triple *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1*, teñidos con $H_2DCF-DA$ (DCF). UA: unidades arbitrarias. A la derecha, imágenes representativas de tubos polínicos incluidos en el análisis. CC: campo claro. Escala: 10 μm .

7. Evaluación de los parámetros de fertilidad de las líneas mutantes de LRXs

7.1. Ensayos de germinación semi-*in vivo* e *in vivo*

Para estudiar la función biológica de las proteínas LRXs durante el desarrollo del tubo polínico se realizaron ensayos de polinización semi-*in vivo* e *in vivo*.

Para realizar los ensayos semi-*in vivo*, los pistilos fueron previamente emasculados (despojados de sépalos, pétalos y anteras) y luego polinizados de forma manual y

controlada (ver sección 10 de Materiales y Métodos). Una vez depositado el polen, se realizó un corte en la región superior del pistilo, preservando el estigma y parte del estilo, y se lo colocó sobre medio de germinación semi-sólido de tal manera que los tubos que emerjan del pistilo continuarán creciendo en el medio de germinación y podrán ser analizados (**Figura R15A**). Luego de 3 hs de incubación, se pudo observar que, al emplear el polen de la mutante triple *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1* para polinizar estigmas de plantas Col-0, un 26,96% de los tubos polínicos emergentes mostraron alteraciones en la morfología como ápices ensanchados y el desarrollo de protuberancias (**Figura R15B y R15C**), al igual que lo observado en los ensayos realizados *in vitro*. Sin embargo, al emplear polen Col-0 sobre pistilos de la mutante triple, no se observaron anomalías en la morfología de los tubos polínicos emergentes (**Figura R15B y R15C**).

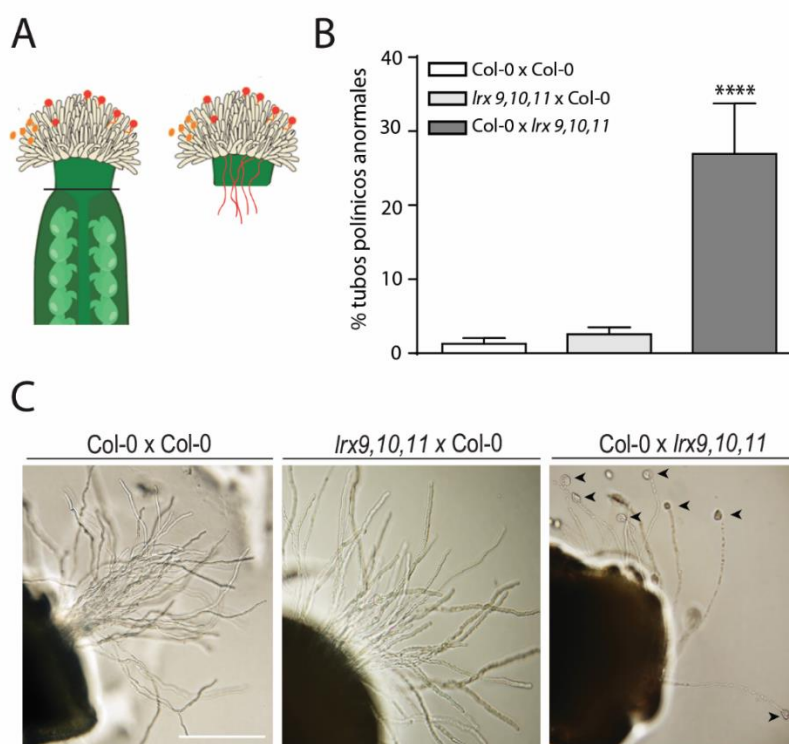


Figura R15. **A)** Esquema representativo de la técnica de germinación de polen semi-*in vivo*. A la izquierda se muestra un pistilo emasculado y polinizado (la línea negra transversal indica el sitio de corte); a la derecha se muestran los tubos polínicos que emergen del estilo cortado. **B)** Cuantificación del porcentaje de tubos polínicos anormales en las cruces Col-0 x Col-0, *lrx9,10,11* x Col-0 y Col-0 x *lrx9,10,11*. Se grafican los promedios \pm SEM de $n=13$ para Col-0 x Col-0 y $n=8$ para *lrx9,10,11* x Col-0 y Col-0 x *lrx9,10,11*, donde “n” corresponde al número de pistilos analizados. Los

asteriscos indican diferencias significativas respecto a Col-0, de acuerdo al test ANOVA de un factor: (****) $P \leq 0,0001$ **C**) Imágenes representativas de ensayos semi-*in vivo* de las cruza Col-0 x Col-0 (panel izquierdo), *lrx9,10,11* x Col-0 (panel medio) y Col-0 x *lrx9,10,11* (panel derecho). Escala: 200 μm . Las cabezas de flecha indican tubos polínicos anormales.

Para los ensayos de polinización *in vivo*, se polinizaron pistilos Col-0 con polen *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1* y Col-0 previamente emasculados y luego de 4 hs, fueron escindidos de la planta, fijados y teñidos con azul de anilina para visualizar calosa. La **Figura R16** muestra que la mayoría de los tubos polínicos mutante triple *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1* presentaron ensanchamiento de la región apical. Además, se puede observar que el trayecto recorrido a lo largo del pistilo fue menor en comparación a los tubos polínicos Col-0.

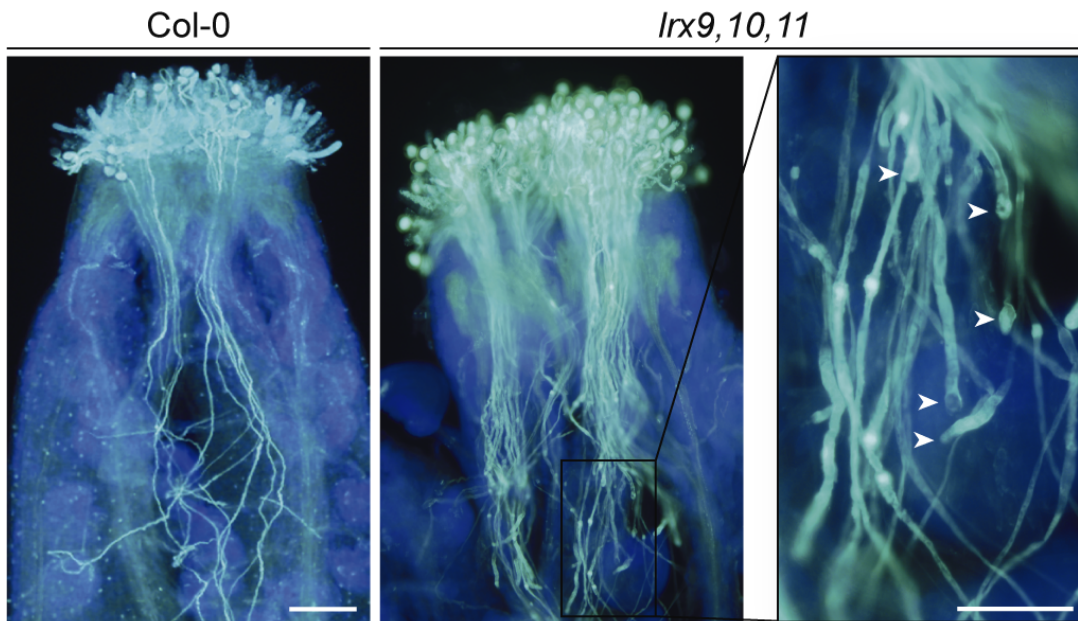


Figura R16. Imágenes representativas de pistilos teñidos con azul de anilina en ensayos de polinización *in vivo*. Se polinizaron manualmente pistilos Col-0 empleando polen Col-0 (panel izquierdo) y polen mutante triple *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1* (panel medio). En el panel derecho se muestra una magnificación de la región señalada en el panel medio; las flechas indican tubos polínicos anormales. Escala: panel izquierdo y medio: 100 μm , panel derecho: 50 μm .

7.2. Análisis del número de semillas por silicua de la mutante triple *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1*

Para analizar cuán afectada se encontraba la descendencia en plantas mutante triples *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1*, se procedió al recuento de semillas por silicua. Se observó una importante disminución (a un 67% comparado con el WT) en el número de semillas por silicua de plantas mutantes, lo que equivale a una reducción de 20 semillas con respecto a plantas WT (**Figura R17**). Teniendo en cuenta estos resultados, se sugiere que los defectos en la fertilización se ocasionan por fallas en el desarrollo del gametofito masculino, provocadas por la pérdida de la integridad de la pared celular ante la ausencia de las LRXs en los tubos polínicos mutantes.

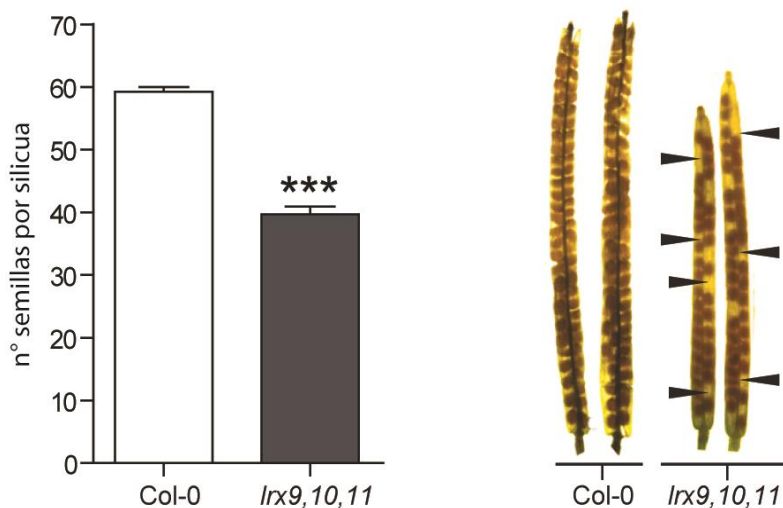


Figura R17. Número de semillas por silicua en plantas Col-0 y mutante triple *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1*. Se muestran los promedios \pm SEM, de 11 plantas independientes y de 10 silicuas analizadas por individuo. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a Col-0 de acuerdo al test Student't: (***) $P \leq 0,001$. Las flechas negras indican aquellos óvulos no fertilizados o abortados.

7.3. Análisis de la segregación de las líneas mutantes de LRXs

Para determinar si el crecimiento anormal de los tubos polínicos de plantas mutantes *lrxs* provoca un impacto directo en la transmisión de la descendencia y la competitividad *in vivo*, se analizó la segregación de la progenie proveniente de autocruzamientos de plantas heterocigotas mutantes dobles y triples.

Se observó una desviación de la segregación mendeliana en la progenie de algunas de las mutantes analizadas (**Tabla R1**). La mayor distorsión en la proporción ocurrió para las mutantes dobles *lrx8-2 lrx10-1* (1:300) y *lrx8-2 lrx11-1* (1:115). Además, no fue posible la obtención de la mutante triple homocigota *lrx8-2 lrx9-2 lrx10-1* luego de analizar la descendencia de 115 plantas *lrx8^{+/-} lrx9^{+/-} lrx10^{-/-}*. Esto sugiere que, a pesar de que las proteínas LRX8 y LRX10 o LRX11 pertenezcan a diferentes subclados dentro de las LRXs de polen (**Figura R3**), es necesario que estén presentes en simultáneo. Estas alteraciones en la transmisión de la descendencia también explican el hecho de no haber podido obtener la mutante cuádruple homocigota *lrx8 lrx9 lrx10 lrx11*.

Autocruza	Genotipo F2	Segregación esperada	Segregación observada	χ^2 p value
<i>lrx9-2^{+/-} lrx11-1^{+/-}</i>	Doble homocigota	1:16	3:92	ns
<i>lrx8-2^{+/-} lrx10-1^{+/-}</i>	Doble homocigota	1:16	3:301	$p < 0.05$
<i>lrx8-2^{+/-} lrx11-1^{+/-}</i>	Doble homocigota	1:16	1:115	$p < 0.05$
<i>lrx9-2^{+/-} lrx10-1^{+/-}</i>	Doble homocigota	1:16	3:133	ns
<i>lrx10-1^{+/-} lrx11-1^{+/-}</i>	Doble homocigota	1:16	1:100	$p < 0.05$
<i>lrx8-2^{+/-} lrx9-2^{+/-} lrx10-1^{-/-}</i>	Triple homocigota	1:16	0:115	ND
<i>lrx9-2^{-/-} lrx10-1^{+/-} lrx11-1^{+/-}</i>	Triple homocigota	1:16	7:174	ns

Tabla R1. Tabla de segregación de la progenie proveniente de autocruzas de plantas heterocigotas mutantes dobles y triples. ns= no significativo. ND: no determinado. (χ^2): Test estadístico Chi cuadrado. Para todos los casos, las líneas mutantes fueron genotipeadas por PCR empleando los oligonucleótidos detallados en la **Tabla M1**.

En conjunto, estos resultados permiten concluir que la ausencia de las LRXs provoca el arresto del crecimiento de los tubos polínicos mutantes a lo largo del tracto transmisor del pistilo impidiendo que alcancen los óvulos para producir la doble fertilización.

8. Ensayo de *Western blot*

Las semillas de las plantas transgénicas T3 empleadas en el siguiente ensayo, fueron gentilmente proporcionadas por el grupo de investigación liderado por el Dr. Yi Guo, tal como se menciona en Materiales y Métodos (ver sección 14 de Materiales y Métodos).

Para revelar la presencia de las proteínas LRXs en granos de polen de plantas transgénicas independientes transformadas con las construcciones pLRX8::*LRX8-GFP*, pLRX10::*LRX10-GFP* y pLRX11::*LRX11-GFP*, se empleó la técnica de *Western blot*. Para ello, el extracto de proteínas totales de polen fue separado electroforéticamente por SDS-PAGE y luego se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa, la cual fue bloqueada con BSA e incubada con un anticuerpo anti-GFP. Como se observa en la **Figura R18**, se revelaron bandas específicas para las proteínas LRX8-GFP, LRX10-GFP y LRX11-GFP. Sin embargo, en todos los casos se obtuvieron bandas de mayor peso molecular al esperado. Esto posiblemente se deba a la presencia de modificaciones post-traduccionales sobre el dominio EXT de las LRXs o a la formación de dímeros entre estas proteínas, tal como se reportó previamente para las proteínas PEX de maíz en extractos de polen maduro (Rubinstein *et al.*, 1995).

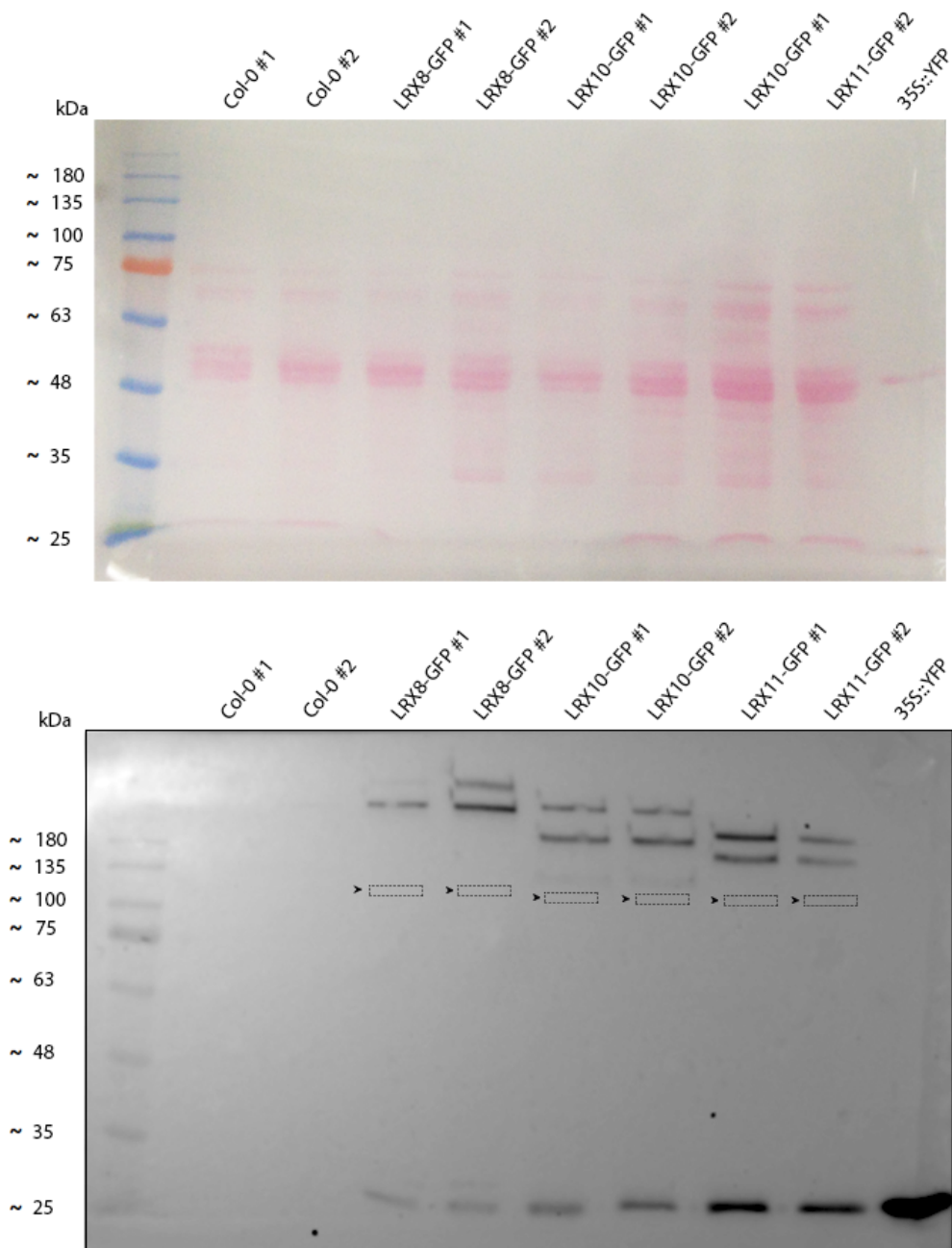


Figura R18. SDS-PAGE y *Western blot* de proteínas de polen. Extracto de proteína total de cada muestra separado por SDS-PAGE y teñidas con rojo Ponceau (panel superior). Revelado de bandas específicas por la técnica de *Western blot* utilizando un anticuerpo anti-GFP (panel inferior). Las puntas de flecha indican los pesos esperados para las proteínas LRXs; (#): réplica biológica.

RESULTADOS

Capítulo II

Basándonos en la hipótesis de que las enzimas prolil-4-hidroxilasas (P4Hs) serían las encargadas de catalizar la hidroxilación de las prolinas (Pro) del dominio extensina (EXT) de las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs), en este capítulo, nos propusimos caracterizar a las enzimas P4Hs con alta expresión en polen y a estudiar la importancia de esta modificación post-traducciona l en los eventos asociados a la polinización en *Arabidopsis*.

1. Análisis de expresión de los genes *P4H* de *Arabidopsis thaliana*

El genoma de *Arabidopsis thaliana* contiene 13 *loci* codificantes para los genes de *P4H*. A partir de la base de datos de microarreglos disponibles en el sitio *Genevestigator* (<https://genevestigator.com/gv/>), se realizó un análisis *in silico* para comparar los niveles de expresión de los transcritos de *P4H1-13* en los diferentes tejidos de *Arabidopsis*. Como se puede observar en la **Figura R19**, el transcrito de *P4H4* presenta alta expresión en polen y en el suspensor del embrión, mientras que los niveles del transcrito de *P4H6* son mayores en el gametofito masculino respecto al resto de los tejidos vegetales. La abundancia de los transcritos de *P4H4* y *P4H6* se condice con los resultados obtenidos del *RNAseq* de polen maduro de *Arabidopsis* (Loraine et al., 2013); sin embargo, la expresión de *P4H11*, elevada en polen según los datos microarreglos, es prácticamente nula de acuerdo al *RNAseq*. Un análisis más detallado de la expresión de *P4H4* y *P4H6*, empleando la herramienta *eFP Browser*, permitió determinar que la expresión de estos dos genes es mayor en los estadios de grano de polen tritelular y grano de polen maduro, pero menor en tubo polínico en ensayos de germinación semi-*in vivo* (**Figura R20**).

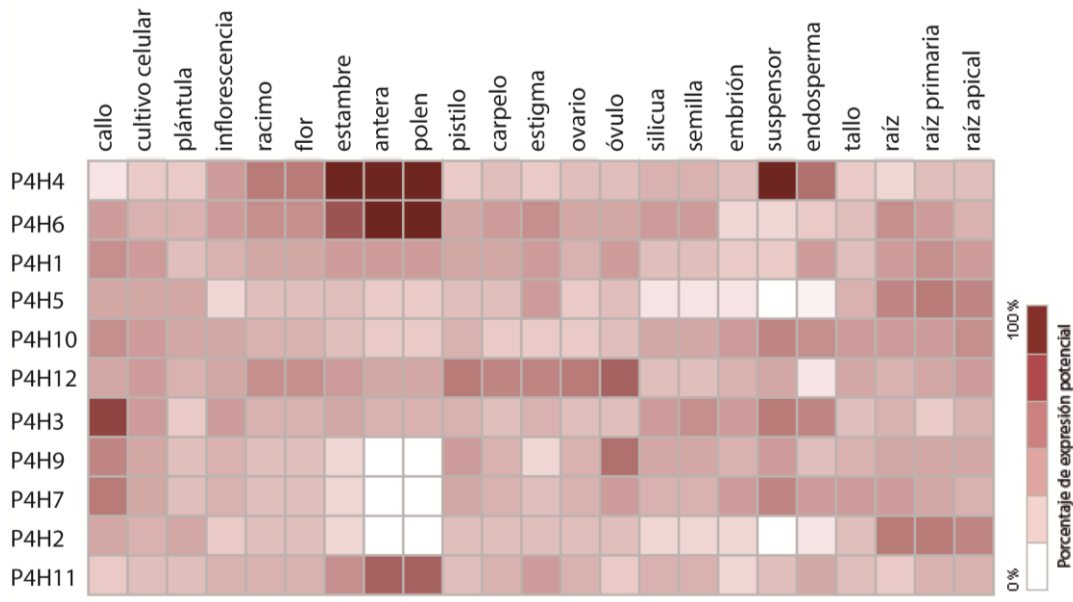


Figura R19. Análisis de expresión de los transcritos de P4Hs en los tejidos de *Arabidopsis thaliana* de acuerdo a la base de datos de microarreglos disponibles en *Genevestigator* (<https://genevestigator.com/gv/>).

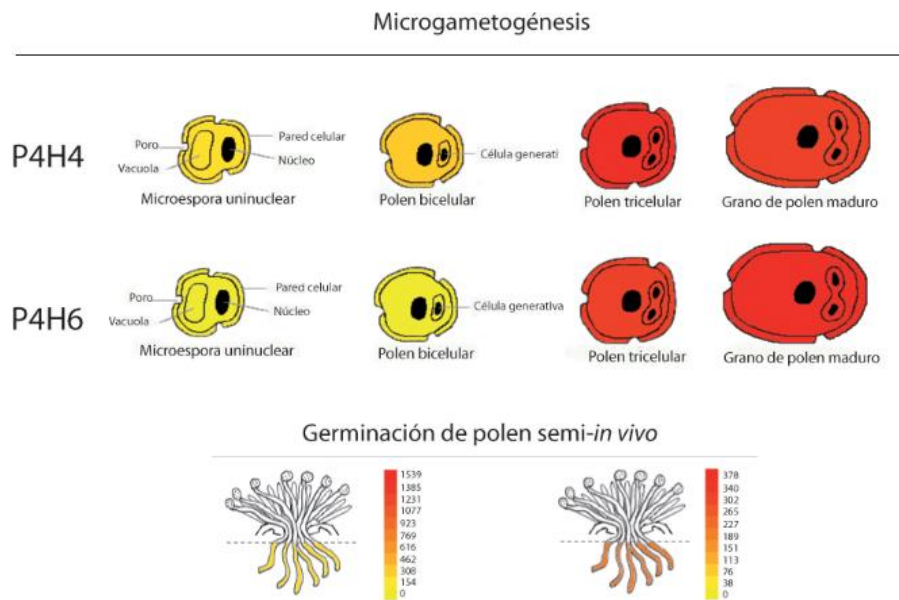


Figura R20. Niveles de expresión de los transcritos de *P4H4* y *P4H6* en los distintos estadios de desarrollo del grano de polen (microgametogénesis) y en tubo polínico. Fuente: *eFP Browser* (<http://bar.utoronto.ca>).

En base a estos resultados se decidió llevar a cabo el estudio funcional de los genes *P4H4* y *P4H6* durante el desarrollo del grano de polen y el crecimiento del tubo polínico.

2. Obtención y análisis de las mutantes simples de inserción para los genes *P4H4* y *P4H6*

Al igual que para los genes *LRX* (ver Capítulo I), se ordenaron al banco de germoplasma de Arabidopsis (ABRC) semillas de mutantes simples de inserción por ADN-T para los genes *P4H4* y *P4H6*. Para el gen *P4H4* (At5g18900), se seleccionó la línea *salk_102582* (*p4h4-1*) y para el gen *P4H6* (At3g28490) la línea *salk_067682* (*p4h6-1*). En la **Figura R21** se encuentra esquematizada la estructura de los genes de *P4H4* y *P4H6* y se señala la posición de la inserción del ADN-T para cada línea. Como se puede observar, ambos genes están formados por 7 exones, 6 intrones, siendo la organización estructural muy similar entre ellos dos (**Figura R21**).

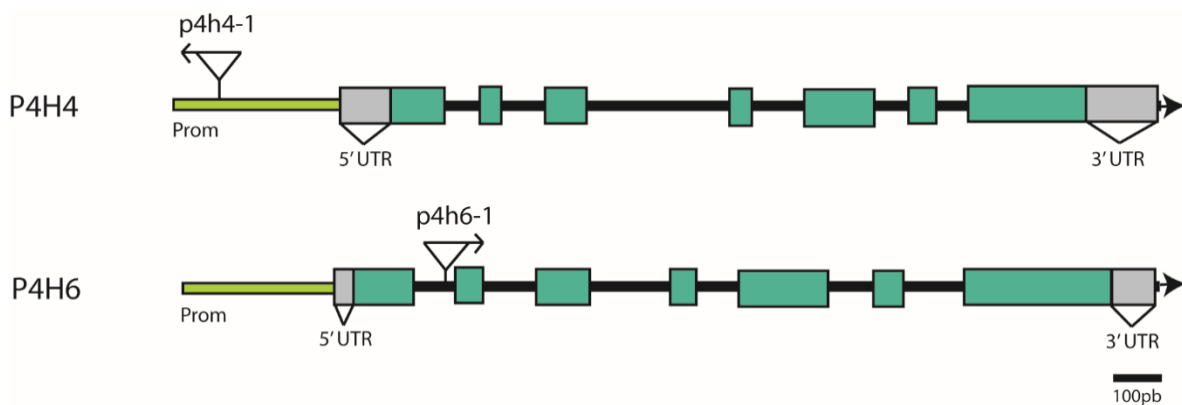


Figura R21. Estructura de los genes *P4H4* y *P4H6*. Se señalan los promotores, 5' y 3' UTR, los exones (rectángulos verdes), los intrones (barras negras) y los sitios de inserción del ADN-T para cada línea. Prom: promotor. Escala: 100 pb.

3. Análisis filogenético y estructura proteica de P4H4 y P4H6

Para efectuar el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las proteínas P4H4 y P4H6, se empleó el *software Clustal Omega* (Sievers et al., 2011). Como se mencionó anteriormente, el análisis filogenético agrupa a las proteínas P4H4 y P4H6 en uno de los subclados, presentando un porcentaje de similitud de secuencia del 59.23% entre ellas. En la **Figura R22** se encuentran señalados los dominios transmembrana, Fe²⁺/2-oxoglutarato dioxigenasa y los ricos en Cys de tipo ShKT del extremo C-terminal. El motivo ShKT se encuentra presente en proteínas del tipo metaloproteasas, tirosinasas, peroxidasas y oxidoreductasas, entre otras, y le otorgaría a estas enzimas una potencial actividad moduladora de canales iónicos (Rangaraju et al., 2010).

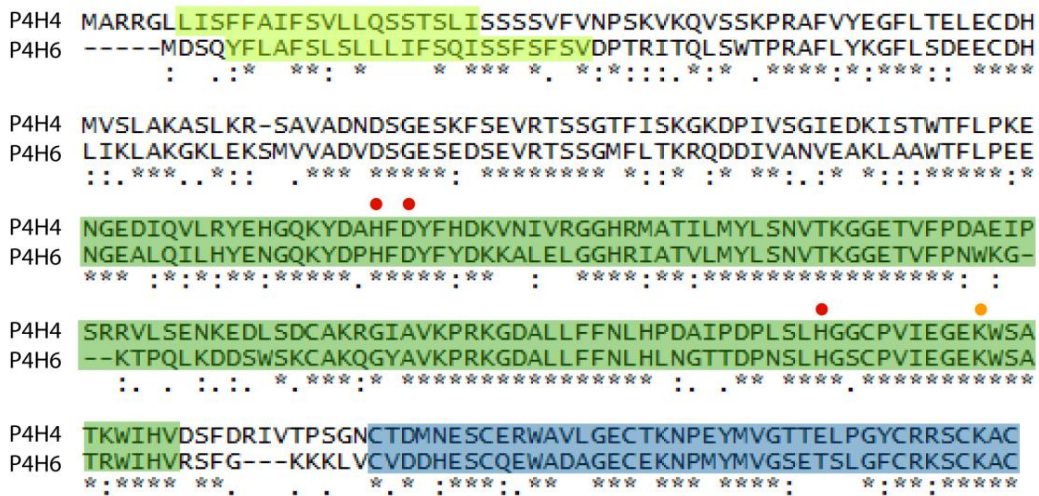


Figura R22. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las proteínas P4H4 y P4H6. Se señalan los dominios transmembrana (verde claro), Fe²⁺/2-oxoglutarato dioxigenasa (verde oscuro) y los dominios ricos en Cys de tipo ShKT (celeste). En rojo se indican los sitios de unión a Fe²⁺ y en naranja se señalan los sitios de unión a 2-oxoglutarato. Los asteriscos (*) indican los aminoácidos conservados entre ambas proteínas.

4. Determinación de los niveles de transcritos en líneas mutantes

Para corroborar que los niveles del transcritos estuvieran disminuidos en la línea mutante *p4h4* debido a la presencia del ADN-T, se empleó la técnica de RT-PCR. Para ello se llevó a cabo una RT-PCR sobre ARN de polen maduro, empleando oligonucleótidos que hibridan en la región C-terminal del gen (**Tabla M2**). El gen actina fue empleado como control interno. En la **Figura R23**, no se observa una disminución en la expresión del transcritos de *P4H4* en la línea mutante con respecto al control (ADNc de Col-0). Esto podría deberse a que el sitio de inserción de ADN-T de la línea *p4h4*, se encuentra sobre el promotor y no sobre algún exón (**Figura R21**). Sin embargo, como se verá más adelante, dicha inserción estaría ocasionando algún impedimento para el normal funcionamiento del gen *P4H4*, ya que la mutante simple *p4h4* presenta fenotipo. La reacción de RT-PCR para la mutante *p4h6* se está llevando a cabo.

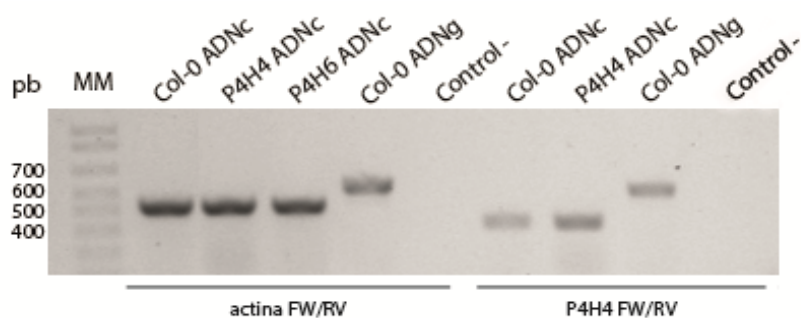


Figura R23. Medición de los niveles de transcritos del gen *P4H4* empleando la técnica de RT-PCR sobre el extracto total de ARN extraído de granos de polen germinados *in vitro*. Actina fue empleada como control interno. ADNc: ADN copia; ADNg: ADN genómico.

5. Análisis del fenotipo de tubos polínicos de las mutantes *p4hs*

Para realizar el estudio funcional de las proteínas P4H4 y P4H6, se obtuvieron plantas mutantes simples homocigotas *p4h4* y *p4h6* y también la mutante doble *p4h4 p4h6*. Para ello, se realizaron cruzamientos manuales entre plantas mutantes simples

p4h4 y *p4h6* y se seleccionaron por genotipificación aquellas plantas mutantes dobles homocigotas *p4h4 p4h6* en la F2 (Filial 2) de la cruce. Los oligonucleótidos empleados se encuentran detallados en la **Tabla M1** (ver sección 5 de Materiales y Métodos).

5.1. Ensayos de germinación *in vitro*

Luego, para estudiar si la ausencia de las P4Hs de polen altera el normal desarrollo y crecimiento del tubo polínico, se realizaron ensayos de germinación de polen *in vitro*. En primer lugar, se analizó si la tasa de germinación de los granos de polen se encontraba afectada en las mutantes *p4hs*. Para ello, se cuantificó el porcentaje de granos de polen germinados en ensayos *in vitro* luego de 3 hs de incubación. Como se observa en la **Figura R24**, la tasa de germinación de los granos de polen de las mutantes simples *p4h4* y *p4h6* y de la mutante doble *p4h4 p4h6*, se encuentra disminuida con respecto a Col-0. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de tubos polínicos con anomalías, a diferencia de lo observado para las mutantes *lrx* (Resultados no mostrados).

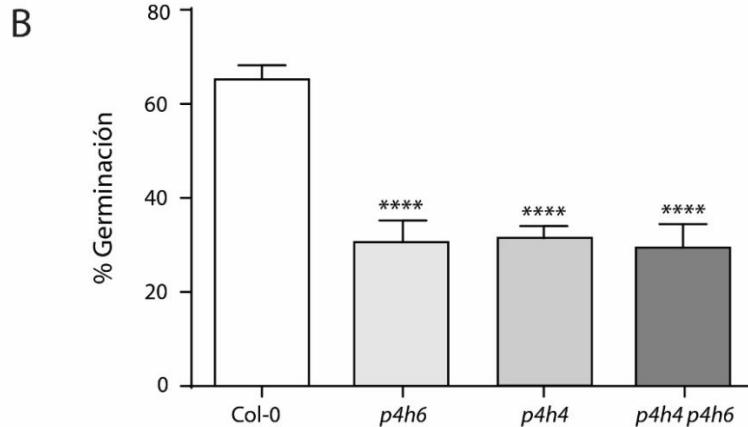
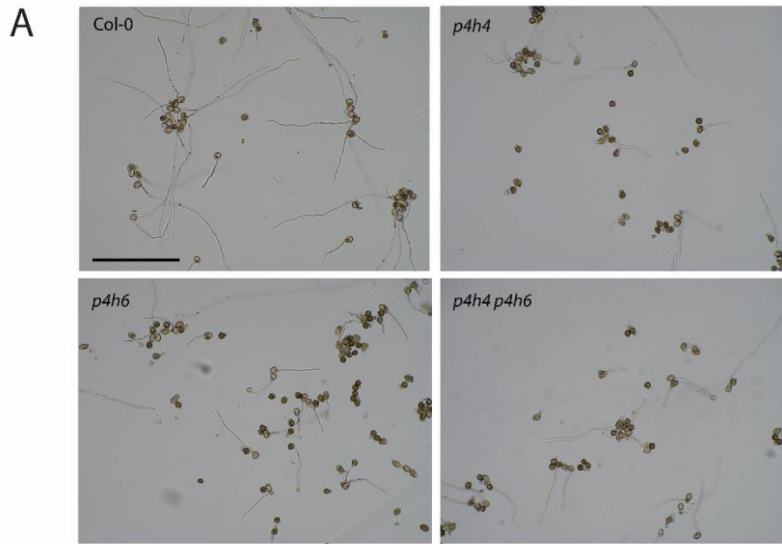


Figura R24. A) Imágenes representativas de ensayos de germinación de polen *in vitro* para Col-0 y las mutantes *p4h*. Escala 300 μ m. **B)** Tasa de germinación de granos de polen Col-0 y de mutantes *p4h*. Se grafican los valores promedios \pm SEM para cada genotipo evaluado (n=6), donde “n” corresponde al número de plantas independientes con más de 80 granos de polen analizados por genotipo y experimento. Los asteriscos representan diferencias significativas de acuerdo al test ANOVA de un factor: (****) $P \leq 0,0001$.

Posteriormente, se efectuaron mediciones del largo del tubo polínico de las mutantes simples *p4h4*, *p4h6* y la mutante doble *p4h4 p4h6*. Como se indica en la **Figura R25**, no se observó una gran variación en el largo de los tubos polínicos de las mutantes con respecto a Col-0, aunque sí hubo diferencias significativas entre las mutantes *p4h4* y *p4h4 p4h6* con respecto a Col-0.

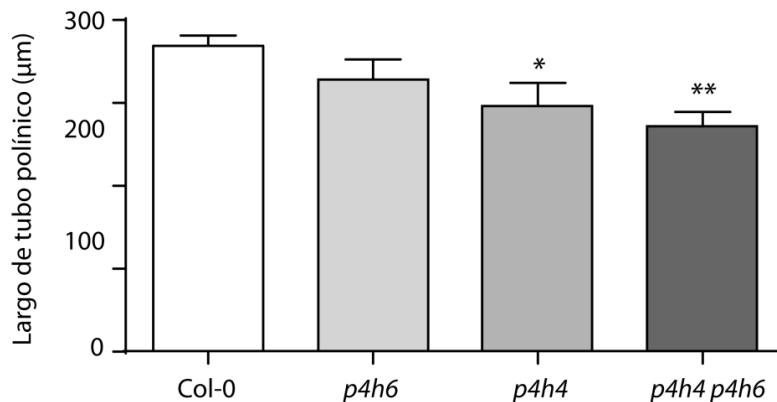


Figura R25. Medición del largo de tubos polínicos de las mutantes *p4h* y Col-0, de granos de polen germinados *in vitro* durante 3 hs. Se grafican los valores promedios \pm SEM, para *p4h4* y *p4h6* (n=4) y para *p4h4 p4h6* y Col-0 (n=5), donde “n” corresponde al número de plantas independientes con más de 60 tubos polínicos analizados por genotipo y experimento. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto a Col-0 de acuerdo al test ANOVA de un factor: (*) $P \leq 0,05$; (**) $P \leq 0,01$.

5.2. Ensayos de polinización *in vivo*

Para los ensayos de polinización *in vivo*, pistilos Col-0 fueron emasculados y, luego de 48hs, polinizados manualmente y de forma controlada empleando polen Col-0 o de la mutante doble *p4h4 p4h6*. Luego de 4hs de crecimiento, los pistilos fueron fijados y teñidos con azul de anilina. Finalmente, se observaron al microscopio y se cuantificó el largo que alcanzaron los tubos polínicos dentro de cada pistilo polinizado. Como se observa en la **Figura R26**, el largo de los tubos polínicos de la mutante doble *p4h4 p4h6* no presenta diferencias con respecto a Col-0. Es importante aclarar que el análisis *in vivo* del largo de los tubos polínicos, presenta algunas limitaciones, ya que solo permite evidenciar grandes diferencias entre genotipos, resultando ser una técnica más cualitativa que cuantitativa. Esto podría explicar el hecho de que no hayamos detectado *in vivo* diferencias en el largo de los tubos polínicos de la mutante doble *p4h4 p4h6*, como sí se demostró en los ensayos realizados *in vitro*.

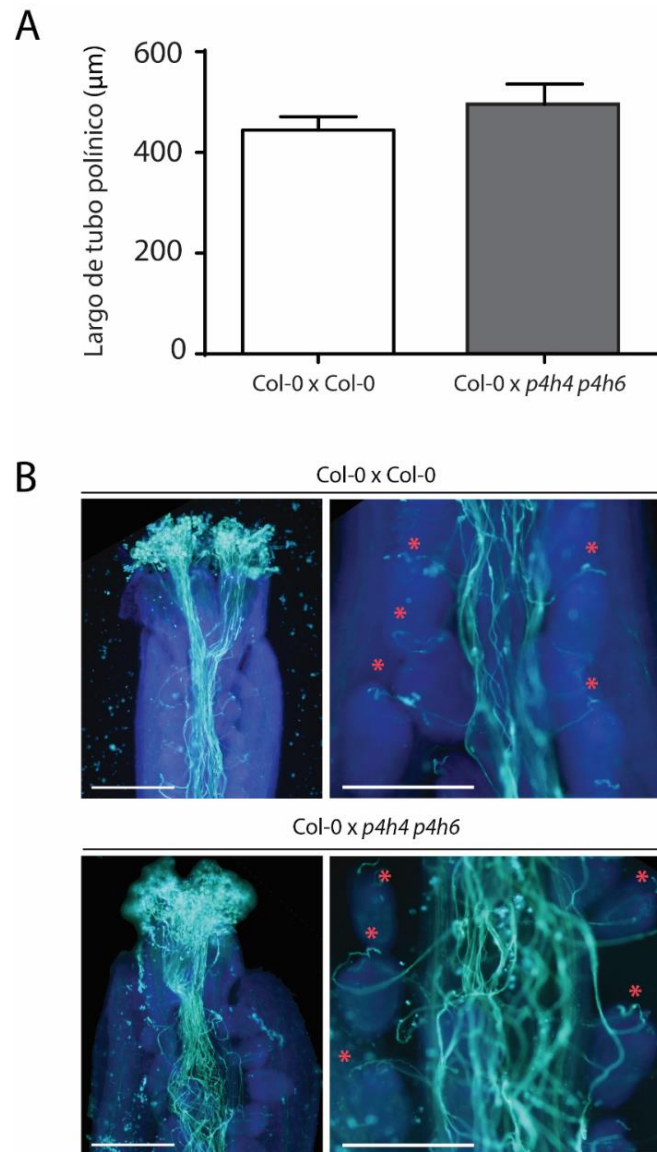


Figura R26. A) Cuantificación del largo de los tubos polínicos alcanzado en ensayos *in vivo* luego de 4 hs post-polinización. Pistilos Col-0 fueron polinizados empleando polen Col-0 (Col-0 x Col-0) o polen mutante *p4h4 p4h6* (Col-0 x *p4h4 p4h6*). **B)** Imágenes representativas de pistilos Col-0 fijados y teñidos con azul de anilina luego de 8 hs post-polinización. Se empleó polen Col-0 (Col-0 x Col-0) o *p4h4 p4h6* (Col-0 x *p4h4 p4h6*). Los asteriscos rojos denotan ovulo fertilizados. Escala 250 µm (izquierda); 250 µm (derecha).

5.3. Ensayos de inhibición química de las P4Hs

Con el fin de estudiar la importancia de la hidroxilación sobre las HRGPs de polen, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* empleando inhibidores químicos de las P4Hs. Para ello, se utilizaron dos inhibidores químicos: EDHB (etil-3,4-dihidroxibenzoato), sustrato análogo al 2-oxoglutarato que compite por la unión al sitio activo y DP (α,α -dipiridil), compuesto quelante del cofactor Fe^{2+} necesario para su función. En primer lugar, se adicionaron los inhibidores al medio de germinación utilizando tres concentraciones finales (10, 50 y 75 μM) y se incubaron los granos de polen Col-0 durante 3 hs. Como se observa en la **Figura R27A**, la tasa de germinación de los granos de polen disminuyó conforme al aumento de la dosis del inhibidor. Por último, se determinó que la IC_{50} para DP (concentración a la cual el 50% de la germinación de los granos de polen se vio afectada), es aproximadamente de 20 μM (**Figura R27B**).

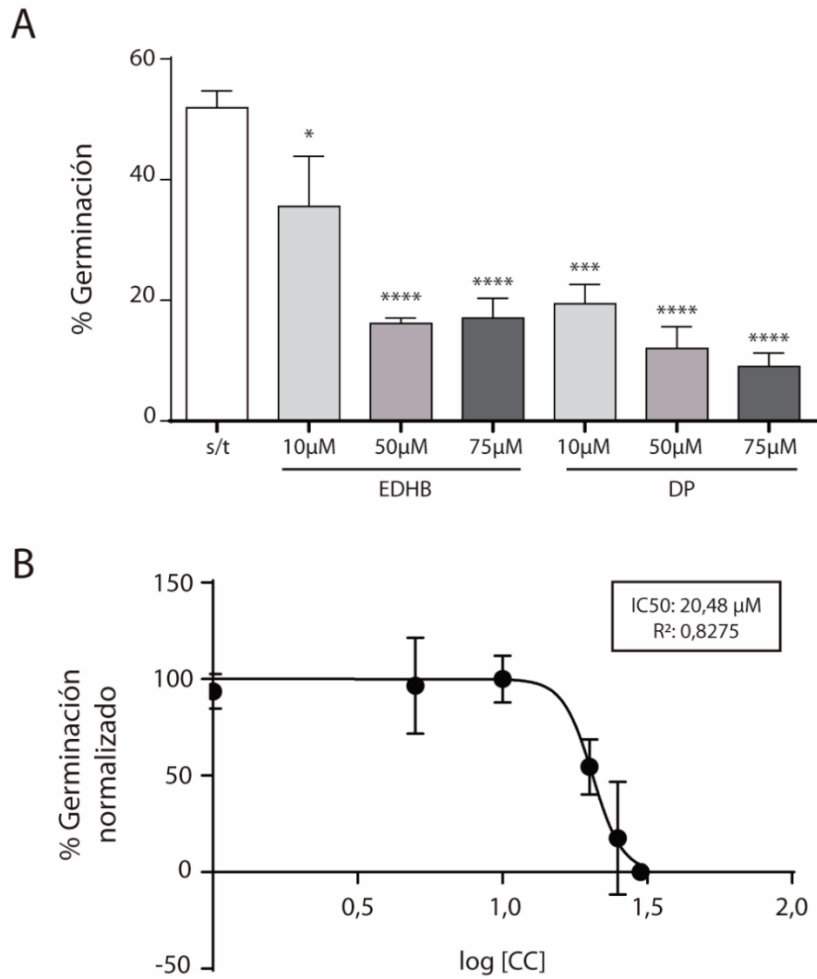


Figura R27. A) Ensayo de inhibición de la actividad de las enzimas P4Hs en polen Col-0 empleando diferentes concentraciones de EDHB (etil-3,4-dihidroxibenzoato) y DP (α,α -dipiridil). Se grafican los valores promedios \pm SEM para cada tratamiento ($n=3$), donde “n” corresponde al número de plantas independientes con más de 80 granos de polen analizados por experimento; s/t: sin tratamiento ($n=4$). Los asteriscos representan diferencias significativas de acuerdo al test ANOVA de un factor: (*) $P \leq 0,05$, (***) $P \leq 0,001$ y (****) $P \leq 0,0001$. **B)** Curva de inhibición empleando el reactivo DP de granos de polen Col-0 ($n=2$) para cada tratamiento. Se calcula la IC50, a la cual se logró la inhibición del 50% de la germinación de los granos de polen.

Los resultados obtenidos de este ensayo demuestran que el tratamiento químico con los inhibidores de P4Hs, provoca la reducción de la tasa de germinación de los granos de polen, al igual que lo observado para la mutante doble *p4h4 p4h6*.

6. Análisis de la integridad de la pared celular de tubos polínicos *p4h4 p4h6*

Para analizar si la integridad de la pared celular de los tubos polínicos mutantes doble *p4h4 p4h6* se encontraba afectada, se cuantificó el contenido de pectina. Luego de 3 hs de incubación *in vitro*, los tubos polínicos fueron teñidos con yoduro de propidio (IP) y observados al microscopio confocal. Los resultados obtenidos muestran que la acumulación de pectina en la pared celular de tubos polínicos *p4h4 p4h6*, no se encuentra afectada con relación al WT (**Figura R28**).

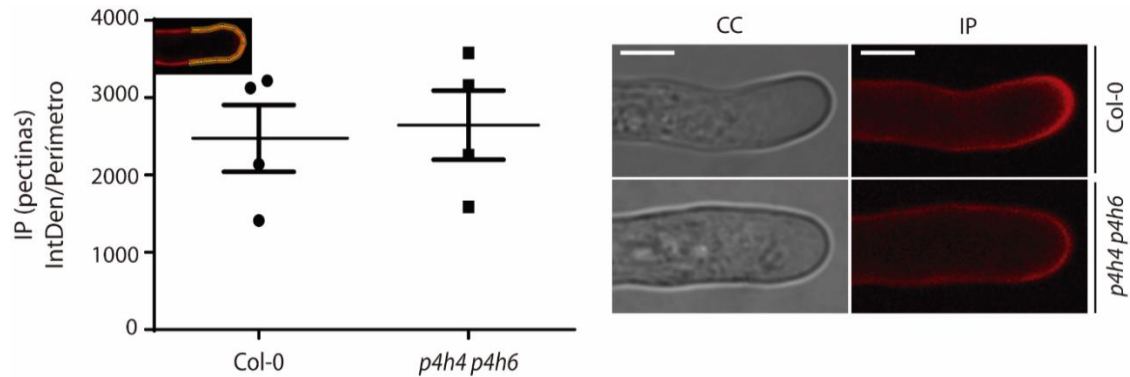


Figura R28. Cuantificación del contenido de pectinas en la pared celular de tubos polínicos de Col-0 y la mutante doble *p4h4 p4h6*, teñidos con Ioduro de propidio (IP). La señal de fluorescencia (línea amarilla) fue normalizada respecto al perímetro del tubo polínico de la región medida. IntDen: Densidad Integrada (panel izquierdo). Imágenes representativas de los tubos polínicos Col-0 y *p4h4 p4h6* teñidos con IP (panel derecho). CC: campo claro. IP: Ioduro de propidio. Escala: 5 μ m.

7. Estudio de la localización subcelular de P4H4

Con el propósito de estudiar la localización de la proteína P4H4, se obtuvieron plantas transgénicas en *background* Col-0, expresando la construcción pP4H4::*P4H4*-YFP (ver sección 14 de Materiales y Métodos).

Mediante microscopía confocal se pudo observar que la proteína P4H4 se encuentra localizada en la base del tubo pero ausente en la zona clara, dentro de pequeños compartimentos de movimiento dinámico, que corresponderían a retículo endoplasmático y/o aparato de Golgi de los tubos polínicos en crecimiento (**Figura R29**). Para corroborar esta hipótesis, es necesario llevar a cabo ensayos de co-localización con marcadores de RE y aparato de Golgi.

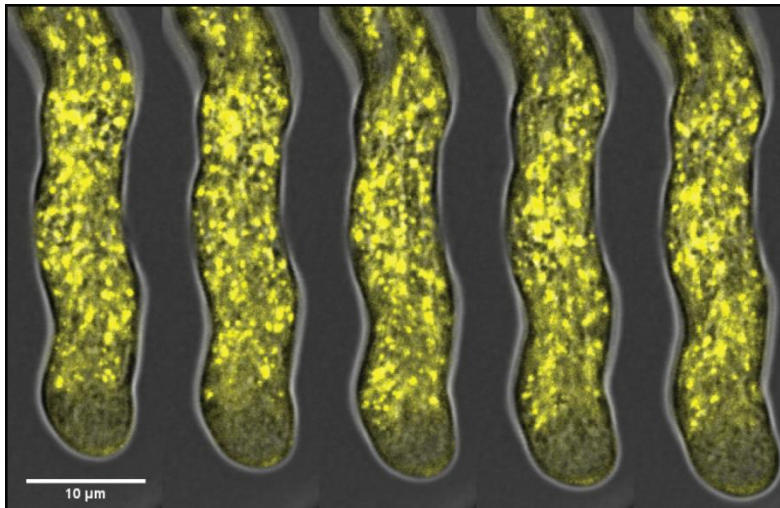


Figura R29. Localización subcelular de la enzima P4H4. Imagen representativa del crecimiento de un tubo polínico Col-0 expresando la construcción pP4H4::*P4H4-YFP*. Escala: 10 μ m.

DISCUSIÓN

Las LRXs específicas de polen tienen un rol estructural en la pared celular de los tubos polínicos.

En el presente trabajo se identificaron a los genes de la familia LRX de *Arabidopsis thaliana* con alta expresión en polen: *LRX8*, *LRX9*, *LRX10* y *LRX11*. Las LRXs son proteínas quimeras formadas por un dominio N-terminal rico en leucina (LRR) y altamente conservado, seguido de un dominio rico en Cys y un dominio C-terminal EXT hipervariable. La principal diferencia estructural entre las LRXs del clado vegetativo (LRX1-7) y las LRXs del clado reproductivo (LRX8-LRX11), reside en que las últimas carecen del motivo de *crosslinking* intramolecular de tipo Tyr-X-Tyr en el extremo EXT; sin embargo, presentan Tyr aisladas en el extremo C-terminal, las cuales posiblemente sean responsables de su anclaje a la pared. Los estudios funcionales de proteínas conteniendo dominios EXT sugieren que los residuos de Tyr se encuentran intra/inter *crosslinkados* para construir una red multidimensional que interacciona con la red de pectinas (Cannon et al., 2008). El motivo Tyr-X-Tyr da lugar a la formación de di-isotirosina (Di-Idt) intramolecular que puede auto-enlazarse para producir uniones intermoleculares de Di-Idt o pulcherosina. Esto fue demostrado para la proteína EXT18, la cual sería capaz de formar uniones covalentes mediante enlaces de Di-Iso creando una red de EXTs y contribuyendo al normal desarrollo del grano de polen y la rápida elongación del tubo polínico (Choudhary et al., 2015). En el caso de LRX1, se ha demostrado que los residuos de Tyr son necesarios para su función pero no para la insolubilización en la pared celular (Ringli, 2010). LRX1 se encuentra físicamente unida a la pared celular y tiene un rol estructural importante como glicoproteína ya que es requerida para mantener el normal crecimiento polarizado del pelo radical (Baumberger et al., 2001; Baumberger et al., 2003). Recientemente, se determinó la localización subcelular de las LRXs en la pared celular de tubos polínicos de *Arabidopsis* (Ndinyanka et al., 2017; Wang et al., 2018) como se observó anteriormente

para la LRX de maíz, mediante técnicas de inmunohistoquímica (Rubinstein et al., 1995). Ndinyanka y colaboradores demostraron que cuando llevaron a cabo la expresión transitoria de la construcción p35S::*LRR11-Citrina* (construcción que contiene el dominio LRR pero no el dominio EXT de la LRX11) en *Nicotiana tabacum*, la proteína LRR11-Citrina se encontraba asociada a la membrana plasmática a través del dominio N-terminal (Ndinyanka et al., 2017).

Los genes *LRX8-LRX11* presentan redundancia funcional

De acuerdo a estudios filogenéticos, las LRXs se encuentran conservadas entre mono y dicotiledóneas (Liu et al., 2016) y tanto *LRX8-LRX9* como *LRX10-LRX11* serían genes parálogos (Baumberger et al., 2003), al igual que los genes *LRX1* y *LRX2* de alta expresión en raíz de Arabidopsis. En el gametofito masculino es común la presencia de genes con redundancia funcional y esto probablemente esté relacionado a la fuerte selección que sufre. En este contexto, es lógico suponer que los tubos polínicos desarrollan mecanismos más robustos para controlar así la integridad celular mediante el incremento de eventos de duplicaciones de genes; por ejemplo, RBOHJ/RBOHH, dos NADPH oxidasas para la producción de EROs, (Kaya et al., 2015b), ANX1/ANX2, dos receptores quinasa específicos de polen como sensores extracelulares (Boisson-Dernier et al., 2013), múltiples canales GLR para la señalización por Ca²⁺ (Michard et al., 2011), etc. El incremento en la severidad de los fenotipos al aumentar el número de las mutaciones de los genes *LRXs*, permite inferir una posible redundancia funcional entre ellos.

Los ensayos fisiológicos demuestran que la ausencia de las LRXs en la pared celular de los tubos polínicos ocasiona severas fallas en la integridad de los tubos polínicos, afecta la germinación de los granos de polen y genera desviaciones de la herencia mendeliana. Estos fenotipos, como era de esperar, son más severos en las mutantes triples (en nuestro caso, *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1*), las cuales presentan una reducción considerable del número de semillas por silicua (Ndinyanka et al., 2017; Sede et al., 2018; Wang et al., 2018). Como se mencionó anteriormente, no fue posible la obtención de la mutante cuádruple *lrx8-2*

lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1 por cruzamientos manuales; sin embargo, Wang y colaboradores pudieron lograrlo empleando diferentes líneas mutantes de ADN-T para los genes *LRX* (Wang et al., 2018). En este caso, la mutante cuádruple exhibe fenotipos más severos que los observados para la mutante triple *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1*. La fertilidad de la mutante cuádruple se encuentra severamente afectada y este efecto se debe exclusivamente a defectos en el gametofito masculino (Ndinyanka et al., 2017; Wang et al., 2018). Además, la tasa de germinación de los granos de polen mutantes cuádruple es prácticamente nula y se observa un aumento en el porcentaje de explosión de los mismos (Ndinyanka Fabrice et al., 2017; Wang et al., 2018). Esto apoya la hipótesis de que las *LRXs* son necesarias durante la germinación y el desarrollo del tubo polínico y que existe una redundancia entre ellas.

Las proteínas *LRX8-LRX11* son necesarias para el mantenimiento de la integridad de la pared celular

Estudios previos demostraron que *LRX1* y *LRX2* presentan una acción sinérgica y estarían implicados en la morfogénesis celular del pelo radical (Baumberger et al., 2003). La línea mutante doble *lrx1 lrx2* desarrolla pelos radicales aberrantes que exhiben ensanchamiento apical, ramificaciones y explosión (Baumberger et al., 2003), fenotipos similares a los observados en los tubos polínicos de la mutante triple *lrx9 lrx10 lrx11*. Mediante microscopía de transmisión de electrones, se detectaron en los pelos radicales de mutantes *lrx1 lrx2*, agregados osmofílicos y regiones de desintegración en la pared celular, evidenciando el rol de estas proteínas en el ensamblado de la pared celular (Baumberger et al., 2003). Funciones similares fueron asignadas para los genes *LRX3*, *LRX4* y *LRX5* durante el desarrollo de la pared celular de órganos aéreos, hojas y tallos (Draeger et al., 2015). Las mutantes *lrx3 lrx4* y *lrx3 lrx4 lrx5* presentan variaciones en el contenido de monosacáridos dependiendo del tejido estudiado; esto puede explicarse debido a que los cambios estructurales dispararían modificaciones secundarias para compensar las alteraciones en la matriz y el grado de esta respuesta dependerá de la severidad de los

mismos. Si bien no se observaron variaciones en el contenido de celulosa de las mutantes *lrx3 lrx4* y *lrx3 lrx4 lrx5*, sí se detectaron diferencias en los niveles de Rha y Gal lo que impactaría en la abundancia de las pectinas (Draeger *et al.*, 2015), tal como observamos en la pared celular del tubo polínico de la mutante triple *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1*.

Nuestros resultados demuestran que la ausencia de las LRXs en los tubos polínicos provoca un aumento en el contenido de los polisacáridos más abundantes de la pared celular, pectina y calosa, lo que ocasiona fallas drásticas en la morfología como la formación de protuberancias y fenotipos de explosión temprana. La mutante triple *lrx9-2 lrx10-1 lrx11-1* presenta deposición aberrante de calosa en la zona del *tip* del tubo, lo que otorgaría rigidez a esta región y podría explicar la reducción en la velocidad de crecimiento de los tubos polínicos. Si bien la acumulación y la distribución de celulosa no se encuentran alterados, este polisacárido por sí solo no sería capaz de mantener la integridad estructural de la pared celular. Ndinyanka y colaboradores, analizaron la ultra estructura de secciones transversales de tubos polínicos mutantes triples *lrx8 lrx9 lrx11* y observaron que la capa externa de la pared celular es más fibrosa y laxa, mientras que la capa interna se encuentra engrosada, debido a la mayor acumulación de calosa (Ndinyanka *et al.*, 2017). Sin embargo, estudios de inmunolocalización empleando los anticuerpos monoclonales contra EXTs (JIM20), arabinogalactanos (LM2), el dominio arabinano del ramnogalacturonano I (RGI) (LM6), homogalacturonano (HG) desesterificado (LM19), HG metil-esterificado (LM20) y xiloglucanos (LM15), revelaron una reducción en la abundancia de los componentes sintetizados en el RE/Golgi y membrana plasmática (Ndinyanka *et al.*, 2017). Los autores sugieren que la reducción de estos componentes se debería a un aumento en la tasa de endocitosis en la mutante *lrx8 lrx9 lrx11*. En conjunto, todos estos resultados permiten concluir que las proteínas LRX8-LRX11 tendrían un rol estructural en el ensamblado de la pared celular siendo necesarias para el mantenimiento de la integridad de la pared celular durante el crecimiento polarizado de los tubos polínicos

En la búsqueda de genes supresores del fenotipo mutante *lrx1*, se identificó a *ROL1* (*Repressor of lrx1*), gen capaz de rescatar el fenotipo de los pelos radicales de la mutante

lrx1. *ROL1* es un gen alélico a *RHM1* (*RHaMnose biosynthesis 1*), que está involucrado en la formación de UDP-L-Rha, una unidad formadora del esqueleto de pectinas de RG-I y RG-II (Diet et al., 2006). Como era de esperar, las mutantes nulas *rol1-1* y *rol1-2*, presentan una reducción en el contenido de los polisacáridos de pectina, RGI y RGII, sugiriendo nuevamente una relación cercana entre las proteínas de tipo EXT y el entramado de pectinas. Sería interesante analizar si la supresión de *ROL1* ó de algún otro gen involucrado en la biosíntesis de pectina, puede rescatar también el fenotipo de la mutante triple *lrx9-1 lrx10-1 lrx11-1* en polen. A pesar de que, tanto tubos polínicos como pelos radicales, presentan crecimiento celular polarizado, las diferencias en el ensamblado de la pared celular de la región apical, podría explicar por qué los tubos polínicos se elongan a velocidades mayores ($> 1 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) que las células de pelos radicales ($> 1 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$) (Chebli et al., 2012; Grierson et al., 2014). Basándonos en esto, los tubos polínicos responden más rápido ante la deposición deficiente de los componentes de la pared celular con respecto a los pelos radicales.

Las LRXs como sensores de la integridad de la pared celular

La ausencia de las proteínas LRX8-LRX11 causa un fenotipo parecido a los reportados previamente para otras proteínas requeridas para la normal elongación del tubo polínico. Por ejemplo, el polen sobre-expresante de la GTPasa RAC/ROPs (por *RAC-like/RHOs of plants*) presenta un fenotipo de tubo polínico globoso y arresto del crecimiento (Zou et al., 2011). Por otro lado, la regulación negativa de RAC/ROP afecta la velocidad de crecimiento y ocasiona el ensanchamiento apical de tubos polínicos con el consecuente arresto del crecimiento. Este fenotipo de depolarización del crecimiento del tubo polínico es observado cuando la vía del factor de depolimerización de la actina se encuentra afectada (Zou et al., 2011). Similarmente, la sobre-expresión de los receptores LRR específicos de polen de tomate, LePRK1 y LePRK2, ocasiona la formación permanente de ampollas (*blebs*) en el ápice (Gui et al., 2014) y ensanchamiento apical (Salem et al., 2011), respectivamente, probablemente debido a la pérdida de la polaridad. Los dominios

citoplasmáticos de LePRK1 y LePRK2 interaccionan con KPP (*Kinase Partner Protein*) (Kaothien et al., 2005), una proteína ROP-GEF que activa a ROP *in vitro* (Löcke et al., 2010). Los tubos polínicos que sobre-expresan KPP desarrollan ápices globosos, irregularidades en la deposición de actina y en el flujo citoplasmático como se observó al sobre-estimular la vía de señalización RAC/ROP (Gui et al., 2014). Fenotipos similares de explosión de tubos polínicos *in vitro*, han sido reportados en Arabidopsis para la mutante doble *anxur1/anxur2* (*anx1/anx2*) (Boisson-Dernier et al., 2009) y *rbohH/rbohJ* NADPH oxidasas (Kaya et al., 2015b) y para la mutante simple *vanguard* (*vgd1*) (Jiang et al., 2005). ANX1 y ANX2 activan ROP y luego RBOHH y RBOHJ, modulando la producción de EROs y la síntesis de nuevos precursores de pared celular (Kaya et al., 2015b). VANGUARD (VGD1) es una proteína pectina metil esterasa (PME) de polen que podría controlar la desmetilesterificación del homopolímero lineal, ácido (1,4)-*linked-α*-D-galacturonic homogalacturonano (HGA), un polisacárido constituyente de la pared celular (Jiang et al., 2005). Cuando se adiciona PME exógeno al medio de germinación de polen, se observa un incremento en el ancho de la pared celular de la región apical lo que ocasiona la inhibición del crecimiento (Bosch et al., 2005). Esto sugiere que incrementar la cantidad de pectina desmetoxilada, sería suficiente para afectar el crecimiento del tubo polínico.

A lo largo de su trayecto por el tracto transmisor, el tubo polínico recibe múltiples señales provenientes de los tejidos femeninos para ser guiado hacia los óvulos. Estas señales deben ser percibidas por proteínas de la pared celular/membrana plasmática y transducidas al interior celular. El hecho de que el dominio de LRR se encuentre altamente conservado entre las LRXs puede ser explicado por la afinidad a un determinado tipo de ligando. Previamente, se reportó la interacción entre el dominio LRR de una LRX específica de tomate y el péptido SIPRALF (Covey et al., 2010). La localización extracelular de SIPRALF, confirmada por la identificación del péptido procesado SIPRALF en el medio de germinación de polen, sugiere que la interacción con LRX ocurre en el espacio apoplástico comprendido entre la membrana plasmática y la pared celular.

La interacción entre las proteínas LRXs y los péptidos RALF de polen de Arabidopsis, fue demostrada *in vitro* empleando los dominios LRR de LRX8 y LRX9 y los péptidos RALF4

y RALF19 (Mecchia *et al.*, 2017). La interacción LRX8/LRX9 con RALF4 sería necesaria para activar la vía de señalización mediada por ANX1/ANX2, la secreción de vesículas hacia el ápice del tubo y el mantenimiento de la integridad de la pared celular durante el crecimiento del tubo polínico (Mecchia *et al.*, 2017). Se propuso la existencia de un módulo formado por los receptores de membrana BUPS1/BUPS2 y ANX1/ANX2, las LRXs y los péptidos RALF4 y RALF19, requerido para el sensado y el mantenimiento de la integridad del tubo polínico durante su crecimiento (Mecchia *et al.*, 2017; Ge *te al.*, 2017) (ver **Figura D1**). Posiblemente, la señal citoplasmática active río abajo componentes de la región apical, como ROP-actina, para direccionar la deposición de nuevo material en la pared celular. Un mecanismo de regulación similar ha sido propuesto entre las proteínas LRX3-LRX5, el receptor análogo a ANX, FERONIA (FER) y los péptidos RALF22/RALF23, quienes en conjunto participarían en el sensado y la transducción de señales en respuesta al estrés salino en *Arabidopsis* (Zhao *et al.*, 2018). La mutante triple *lrx3 lrx4 lrx5* es hipersensible a la salinidad, al igual que *fer*, y dicha respuesta está mediada por los péptidos RALF (Zhao *et al.*, 2018). Se comprobó también, que el dominio LRR de LRX3 y LRX4 es suficiente para la interacción con RALF, al igual que lo observado para LRX8/LRX9 y RALF4 en polen (Mecchia *et al.*, 2017). La expansión celular se relaciona con la acidificación del apoplasto y el desensamblado de la pared celular con el consecuente aumento del tamaño vacuolar. Según lo observado, FER regula negativamente el tamaño vacuolar, ya que la mutante *fer* presentan vacuolas de mayor tamaño, al igual que las de plantas *lrx3 lrx4 lrx5* (Dunser *et al.*, 2017). Mediante ensayos de co-inmunoprecipitación se comprobó la interacción entre FER y LRR4. En este contexto, las LRXs y FER, estarán implicadas en el sensado del estado de la pared celular y en la transducción de la señal al interior celular, lo que impactaría en el aumento del tamaño vacuolar (Dunser *et al.*, 2017).

Caracterización de las P4Hs de polen e importancia de la hidroxilación durante el desarrollo del tubo polínico

En esta tesis, se identificaron a los genes *P4Hs* de *Arabidopsis thaliana* con alta expresión en polen: *P4H4* y *P4H6*. Estructuralmente, las proteínas *P4H4* y *P4H6* están

formadas por un dominio transmembrana, seguido de un dominio de tipo 2-oxoglutarato dioxigenasa y un dominio C-terminal rico en Cys. Hasta el momento, solo se ha estudiado el rol biológico de las enzimas P4H2, P4H5 y P4H13 de *Arabidopsis* (Velasquez *et al.*, 2011; Velasquez *et al.*, 2015). Las mismas tienen un rol importante durante el crecimiento del pelo radical ya que, las mutantes *p4h2*, *p4h5* y *p4h13* exhiben una reducción en el largo de los pelos radicales y alteraciones en la arquitectura de la pared celular en la zona del *tip*, debido a la falta de hidroxilación de las proteínas estructurales (Velasquez *et al.*, 2011; Velasquez *et al.*, 2015). En lo que respecta a las proteínas P4Hs de polen, observamos que las mutantes simples *p4h4* y *p4h6* y la mutante doble *p4h4 p4h6*, presentan una importante reducción en la tasa de germinación de los granos de polen. Fenotipos similares se obtuvieron al bloquear la acción de las P4Hs empleando los inhibidores químicos EDHB y DP, como fue demostrado previamente para las P4Hs de pelo radical (Velasquez *et al.*, 2015). Además, se observó una disminución en la longitud de los tubos polínicos de mutantes *p4h4* y *p4h4 p4h6*. El contenido y la distribución de pectina en la pared celular de tubos polínicos *p4h4 p4h6*, no mostró alteraciones. Sin embargo, se requerirá de un análisis más exhaustivo para determinar si la falta de hidroxilación provoca variaciones en los niveles de algún otro constituyente de la pared celular. Además, sugerimos que la falta de un fenotipo fuerte en los tubos polínicos de la mutante doble *p4h4 p4h6*, podría deberse a la existencia de otra/s P4H de polen, como por ejemplo P4H11, que presente redundancia funcional.

La enzima P4H4 se localiza en el retículo endoplasmático/Golgi de tubos polínicos en crecimiento

Pudimos determinar la localización subcelular de P4H4, en retículo endoplasmático (RE)/aparato de Golgi en tubos polínicos en crecimiento. Esta ubicación era esperable en base a lo observado en estudios previos de expresión transitoria en *Nicotiana bentamiana*, donde se determinó que P4H5 y P4H13 se localizan el aparato de Golgi,

mientras que P4H2 se localiza específicamente en el RE y cambia su localización al co-expresarse con P4H5, suponiendo una interacción entre ellas (Velasquez et al., 2011).

Las LRXs serían blanco de las enzimas P4Hs

Se ha visto que las P4Hs de Arabidopsis, presentan patrones de expresión diferencial en condiciones de hipoxia (reducción de los niveles de O₂), anoxia (falta total de O₂) y daño mecánico (Vlad *et al.*, 2007). Tal es el caso del transcrito de *P4H4*, el cual aumenta su expresión en raíz bajo condiciones de hipoxia y luego de efectuado el daño mecánico en hojas (Vlad *et al.*, 2007). Se identificaron 22 genes que codifican para HRGPs expresados diferencialmente bajo condiciones de hipoxia, de los cuales 5 pertenecen a la familia de las EXTs, siendo uno de ellos *LRX10* (Vlad *et al.*, 2007). Posteriormente, mediante la técnica de doble híbrido, y empleando a P4H5 como anzuelo, se identificó a la proteína LRX3 como posible interactor (Velasquez *et al.*, 2011). Se demostró que las P4Hs actuarían de manera secuencial al hidroxilar los residuos de prolina. La enzima P4H5 hidroxilaría en primer lugar y a continuación lo harían P4H2 y/o P4H13; por su parte, P4H5 hidroxila preferencialmente sustratos de tipo EXT *in vitro* (Velasquez *te al.*, 2015). En base a estos resultados, es altamente factible que las LRXs sean blancos de hidroxilación de las P4Hs, la cual sería necesaria para su función (ver **Figura D1**).

Con respecto al WB de las proteínas LRX8-GFP, LRX10-GFP y LRX11-GFP de granos de polen de plantas transgénicas, se revelaron bandas con pesos moleculares de las LRXs mayores a los esperados. Este aumento, podría explicarse debido a la ocurrencia de modificaciones post-traduccionales en sus dominios EXT. La presencia de eventos de glicosilación sobre una proteína LRX de polen, fue demostrada previamente para la PEX de maíz (Rubinstein et al., 1995). Mediante ensayos de de-glicosilación empleando ácido trifluorometasulfónico (TFMS), el cual actúa clivando los enlaces *N*-glicosídicos y *O*-glicosídicos sin afectar la integridad de la cadena polipeptídica, Rubinstein y colaboradores demostraron que la presencia de ciertas bandas de alto peso molecular correspondían a la

glicosilación de PEX (Rubinstein et al., 1995). Debido a la alta toxicidad del reactivo TFMS, no fue posible la realización de este ensayo en el laboratorio.

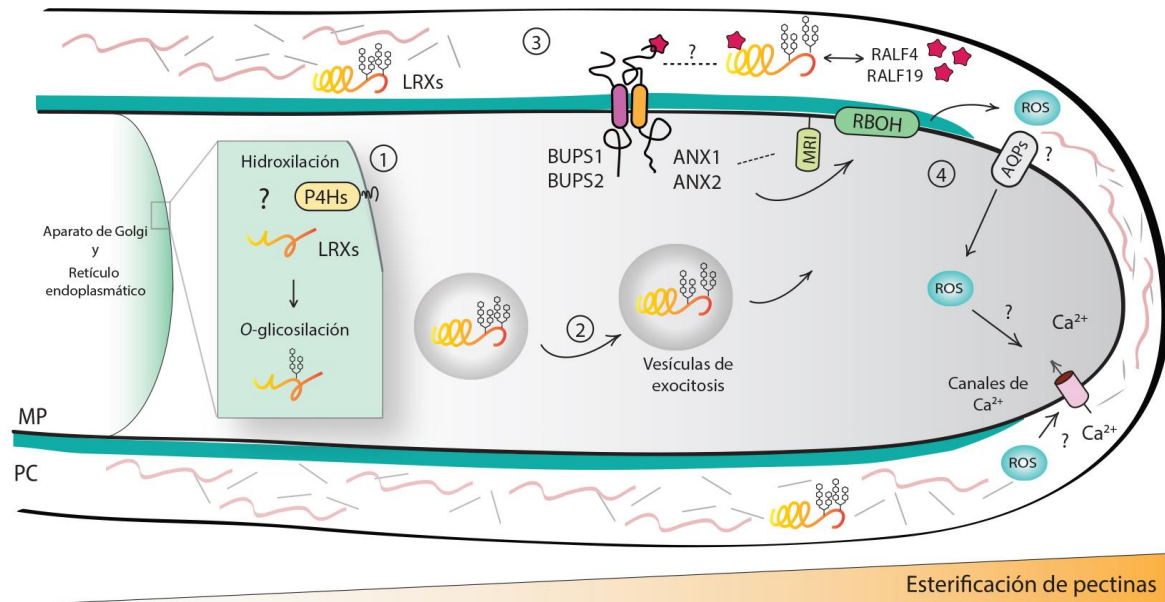


Figura D1. Modelo propuesto. **1)** La hidroxilación de las LRXs sería catalizada por las P4Hs que se encuentran ancladas a la membrana del retículo endoplasmático/aparato de Golgi definiendo sitios de O-glicosilación. **2)** La glicosilación sería necesaria para el correcto plegado de las LRXs, que posteriormente serían transportadas en vesículas y exocitadas al exterior del tubo. **3)** Una vez en la pared celular, a través de su dominio EXT, las LRXs participarían en el *crosslinking* junto a otros polisacáridos (como pectina, calosa y celulosa), contribuyendo a la formación de una red tridimensional. Mediante su dominio N-terminal sensorían los cambios estructurales de la pared celular a través de la interacción con los péptidos RALF4/RALF19. Esta señal sería transducida al citoplasma a través de la vía de señalización de ANX1-ANX2/BUPS1-BUPS2, activando río abajo a la quinasa MARIS (MRI) y a las NADPH oxidasas (RBOH). **4)** Esta activación provocaría la inducción de ROS en el exterior del tubo que ingresaría al citoplasma posiblemente a través de acuaporinas (AQPs). El aumento de ROS citoplasmático ó del exterior del tubo, induciría el influjo de Ca^{2+} necesario para el mantenimiento del gradiente de Ca^{2+} en la región apical.

Perspectivas

A futuro, proponemos estudiar la presencia de otra/s P4H/s de polen que actúe/n de forma redundante con P4H4 y P4H6 llevando a cabo diferentes ensayos fisiológicos de

las nuevas mutantes. Partiendo de la hipótesis de que la hidroxilación de las prolinas del dominio EXT de las LRXs sería catalizada por las P4Hs, proponemos analizar el patrón de glicosilación de las LRXs-GFP de polen expresadas en el *background* de la mutante doble *p4h4 p4h6* comparando con plantas WT; nuestra hipótesis es que la hidroxilación de las prolinas de las LRXs-GFP no tendría lugar y, en consecuencia, no se definirían los sitios de O-glicosilación. Finalmente, estudiaremos si esta posible falta de glicosilación de las LRXs en el *background* mutante *p4h4 p4h6*, afecta de alguna manera la localización de las diferentes LRXs en la pared celular del tubo polínico, debido a la imposibilidad de interactuar con la matriz de polisacáridos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Peter Walter** (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. New York: Garland Science. ISBN-10: 0-8153-3218-1 ISBN-10: 0-8153-4072-9
- Asif MH, Trivedi PK, Misra P, Nath P** (2009) Prolyl-4-hydroxylase (AtP4H1) mediates and mimics low oxygen response in *Arabidopsis thaliana*. *Funct Integr Genomics* **9**: 525–535
- Baumberger N, Doesseger B, Guyot R, Diet A, Parsons RL, Clark M a, Simmons MP, Bedinger P, Goff S a, Ringli C,** (2003a) Whole-genome comparison of leucine-rich repeat extensins in *Arabidopsis* and rice. A conserved family of cell wall proteins form a vegetative and a reproductive clade. *Plant Physiol* **131**: 1313–1326
- Baumberger N, Ringli C, 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**: 1128–1139
- Baumberger N, Steiner M, Ryser U, Keller B, Ringli C** (2003b) 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, Fradkov AF, Lukyanov KA, Staroverov DB, Shakhbazov KS, Terskikh A V, Lukyanov S** (2006) Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Methods* **3**: 281
- Bergonci T, Ribeiro B, Ceciliato PHO, Guerrero-Abad JC, Silva-Filho MC, Moura DS.** (2014) *Arabidopsis thaliana* RALF1 opposes brassinosteroid effects on root cell elongation and lateral root formation. *J Exp Bot.* 65(8):2219-30. doi: 10.1093/jxb/eru099
- 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.* doi: 10.1371/journal.pbio.1001719
- Boisson-dernier A, Roy S, Kritsas K, Grobei MA, Jaciubek M, Schroeder JI, Grossniklaus U** (2009) Disruption of the pollen-expressed FERONIA homologs ANXUR1 and ANXUR2 triggers pollen tube discharge. **3288**: 3279–3288
- Borassi C, Sede AR, Mecchia MA, Salgado Salter JD, Marzol E, Muschietti JP, Estevez JM** (2016) An update on cell surface proteins containing extensin-motifs. *J Exp Bot* **67**: 477–487
- Bosch M, Cheung AY, Hepler PK** (2005) Pectin Methylesterase , a Regulator of Pollen Tube Growth *Plant Physiol.* **138**: 1334–1346.
- Cai G, Cresti M** (2009) Organelle motility in the pollen tube: A tale of 20 years. *J Exp Bot* **60**: 495–508
- Cai G, Faleri C, Del Casino C, Emons AMC, Cresti M** (2011) Distribution of Callose Synthase, Cellulose Synthase, and Sucrose Synthase in Tobacco Pollen Tube Is Controlled in Dissimilar Ways by Actin Filaments and Microtubules. *Plant Physiol* **155**: 1169–1190

- Cannon MC, Terneus K, Hall Q, Tan L, Wang Y, Wegenhart BL, Chen L, Lamport DTA, Chen Y, Kieliszewski MJ** (2008) Self-assembly of the plant cell wall requires an extensin scaffold. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 2226–2231
- Canut H, Albenne C, Jamet E** (2016) Post-translational modifications of plant cell wall proteins and peptides: A survey from a proteomics point of view. *BBA - Proteins Proteomics* **1864**: 983–990
- Cardenas L, Lovy-Wheeler A, Kunkel JG, Hepler PK** (2008) Pollen Tube Growth Oscillations and Intracellular Calcium Levels Are Reversibly Modulated by Actin Polymerization. *Plant Physiol* **146**: 1611–1621
- Certal AC, Almeida RB, Carvalho LM, Wong E, Moreno N, Michard E, Carneiro J, Rodríguez-Léon J, Wu H-M, Cheung AY, et al** (2008) Exclusion of a proton ATPase from the apical membrane is associated with cell polarity and tip growth in *Nicotiana tabacum* pollen tubes. *Plant Cell* **20**: 614–634
- Chang M, Huang S** (2017) Rapid Isolation of Total Protein from Arabidopsis Pollen. *Bio-protocol* **7**: e2227
- Chebli Y, Kaneda M, Zerzour R, Geitmann A** (2012) The Cell Wall of the Arabidopsis Pollen Tube--Spatial Distribution, Recycling, and Network Formation of Polysaccharides. *Plant Physiol* **160**: 1940–1955
- Cheung AY, Wu H, Di Stilo V, Glaven R, Chen C, Wong E, Ogdahl J, Estavillo A.** (2000) Pollen-Pistil Interactions in *Nicotiana tabacum*. *Ann Bot* **85**: 29–37
- Cheung AY, Wu H** (2008) Structural and Signaling Networks for the Polar Cell Growth Machinery in Pollen Tubes. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 547–572
- Choudhary P, Saha P, Ray T, Tang Y, Yang D, Cannon MC** (2015) EXTENSIN18 is required for full male fertility as well as normal vegetative growth in Arabidopsis. *Front Plant Sci* **6**: 553
- Covey PA, Subbaiah CC, Parsons RL, Pearce G, Lay FT, Anderson MA, Ryan CA, Bedinger PA** (2010) A Pollen-Specific RALF from Tomato That Regulates Pollen Tube Elongation. *Plant Physiol* **153**: 703–715
- Dardelle F, Lehner A, Ramdani Y, Bardor M, Lerouge P, Driouich A, Mollet J-C** (2010) Biochemical and Immunocytological Characterizations of Arabidopsis Pollen Tube Cell Wall. *Plant Physiol* **153**: 1563–1576
- Derksen J, Knuiman B, Hoedemaekers K, Guyon A, Bonhomme S, Pierson ES** (2002) Growth and cellular organization of Arabidopsis pollen tubes in vitro. *Sex Plant Reprod* **15**: 133–139
- Diet A, Link B, Seifert GJ, Schellenberg B, Wagner U, Pauly M, Reiter W, 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**: 1630–1641
- Draeger C, Ndinyanka Fabrice T, Gineau E, Mouille G, Kuhn BM, Moller I, Abdou MT, Frey B, Pauly M, Bacic A, Ringli C.** (2015) Arabidopsis leucine-rich repeat extensin (LRX) proteins modify cell wall composition and influence plant growth. *BMC Plant Biol* **15**: 1–11

- Driouich A, Bernard S, Kousar S, Chevalier L, Vitré-gibouin M, Lerouxel O** (2012) Golgi-mediated synthesis and secretion of matrix polysaccharides of the primary cell wall of higher plants. *Front Plant Sci.* **3**: 1–15
- Duan Q, Kita D, Johnson EA, Aggarwal M, Gates L, Wu HM, Cheung AY** (2014) Reactive oxygen species mediate pollen tube rupture to release sperm for fertilization in Arabidopsis. *Nat Commun* **5**: 3129
- Dunser K., Gupta S., Ringli C., and Jurgen Kleine-Vehn** (2017) LRX- and FER-dependent extracellular sensing coordinates vacuolar size for cytosol homeostasis. bioRxiv 231043; doi: <https://doi.org/10.1101/231043>
- Durouflé H, Hervé V, Balliau T, Zivy M, Dunand C, Jamet E** (2017) Proline Hydroxylation in Cell Wall Proteins: Is It Yet Possible to Define Rules? *Front Plant Sci* **8**: 1–10
- Egelund J, Obel N, Ulvskov P, Geshi N, Pauly M, Bacic A, Petersen BL** (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**: 439–451
- Escobar-Restrepo JM, Huck N, Kessler S, Gagliardini V, Gheyselinck J, Yang W, Grossniklaus U.** (2007). The FERONIA receptor-like kinase mediates male-female interactions during pollen tube reception. *Science* **317**(5838):656-60. doi: 10.1126/science.1143562
- Fan L, Wang Y, Wang H, Wu W** (2001) In vitro Arabidopsis pollen germination and characterization of the inward potassium currents in Arabidopsis pollen grain protoplasts. *J Exp Bot* **52**: 1603–1614
- Feng W, Kita D, Peaucelle A, Cartwright HN, Doan V, Duan Q, Liu M-C, Maman J, Steinhorst L, Schmitz-Thom I, et al** (2018) The FERONIA Receptor Kinase Maintains Cell-Wall Integrity during Salt Stress through Ca²⁺ Signaling. *Curr Biol* **28**: 666–675.e5
- Firon N, Nepi M, Pacini E** (2012) Water status and associated processes mark critical stages in pollen development and functioning. *Ann Bot* **109**: 1201–1213
- Frietsch S, Wang Y, Sladek C, Poulsen LR, Romanowsky SM, Schroeder JI, Harper JF** (2007) A cyclic nucleotide-gated channel is essential for polarized tip growth of pollen. 104:
- Ge Z, Bergonci T, Zhao Y, Zou Y, Du S, Liu M-C, Luo X, Ruan H, García-Valencia LE, Zhong S, et al** (2017) Arabidopsis pollen tube integrity and sperm release are regulated by RALF-mediated signaling. *Science* **358**: 1596–1600
- Geitmann A, Steer M** (2006) The architecture and properties of the pollen tube cell wall. *Plant Cell Monogr* **3**: 177–200
- Gille S, Hänsel U, Ziemann M, Pauly M** (2009) Identification of plant cell wall mutants by means of a forward chemical genetic approach using hydrolases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 14699–14704
- Gorres KL, Raines RT** (2010) Prolyl 4-Hydroxylase. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **45**(2): 106–124. doi: 10.3109/10409231003627991.

- Grierson C, Nielsen E, Ketelaarc T, Schiefelbein J** (2014) Root Hairs. *Arab B* **12**: e0172
- 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. **169**: 127–138
- Guan Y, Guo J, Li H, Yang Z** (2013) Signaling in pollen tube growth: Crosstalk, feedback, and missing links. *Mol Plant* **6**: 1053–1064
- Guerriero G, Fugelstad J, Bulone V** (2010) What do we really know about cellulose biosynthesis in higher plants?. *J Integr Plant Biol* **52**: 161–175
- Gui C-P, Dong X, Liu H-K, Huang W-J, Zhang D, Wang S-J, Barberini ML, Gao X-Y, Muschietti J, McCormick S, et al** (2014) Overexpression of the Tomato Pollen Receptor Kinase LePRK1 Rewires Pollen Tube Growth to a Blebbing Mode. *Plant Cell* **26**: 3538–3555
- Hamilton E, Jensen GS, Maksaev G, Katims A, Sherp AM, Haswell ES** (2015) Mechanosensitive channel MSL8 regulates osmotic forces during pollen hydration and germination. 350:
- Hepler PK, Winship LJ** (2015) The pollen tube clear zone: Clues to the mechanism of polarized growth. *J Integr Plant Biol* **57**: 79–92
- Hieta R, Myllyharju J** (2002) Cloning and characterization of a low molecular weight prolyl 4-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana*: Effective hydroxylation of proline-rich, collagen-like, and hypoxia-inducible transcription factor ??-like peptides. *J Biol Chem* **277**: 23965–23971
- Higashiyama T, Takeuchi H** (2015) The Mechanism and Key Molecules Involved in Pollen Tube Guidance. *Annu Rev Plant Biol* **66**: 393–413
- Holdaway-Clarke TL, Hepler PK** (2003) Control of pollen tube growth: Role of ion gradients and fluxes. *New Phytol* **159**: 539–563
- Hony D, Twell D** (2004) Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Genome Biol* **5**: R85.1-R.85.13
- Huck N** (2003) The *Arabidopsis* mutant *feronia* disrupts the female gametophytic control of pollen tube reception. *Development* **130**: 2149–2159
- Hwang I, Harper JF, Liang F, Sze H** (2000) Calmodulin activation of an endoplasmic reticulum-located calcium pump involves an interaction with the N-terminal autoinhibitory domain. *Plant Physiol* **122**: 157–168
- Iwano M, Entani T, Shiba H, Kakita M, Nagai T, Mizuno H, Miyawaki A, Shoji T, Kubo K, Isogai A, Takayama Seiji.** (2009) Fine-Tuning of the Cytoplasmic Ca²⁺ Concentration Is Essential for Pollen Tube Growth. *Plant Physiol* **150**: 1322–1334
- Jiang L** (2005) VANGUARD1 Encodes a Pectin Methyltransferase That Enhances Pollen Tube Growth in the *Arabidopsis* Style and Transmitting Tract. *Plant Cell Online* **17**: 584–596
- Kaothien P, Sung HO, Shuai B, Wengier D, Cotter R, Kelley D, Kiriakopolos S, Muschietti J, McCormick S** (2005) Kinase partner protein interacts with the LePRK1 and LePRK2 receptor kinases and plays a role in polarized pollen tube growth. *Plant J* **42**: 492–503

- Kaya H, Iwano M, Takeda S, Kanaoka MM, Kimura S, Abe M, Kuchitsu K** (2015) Apoplastic ROS production upon pollination by RbohH and RbohJ in Arabidopsis. *Plant Signal Behav* **10**: 14–16
- Kaya H, Nakajima R, Iwano M, Kanaoka MM, Kimura S, Takeda S, Kawarazaki T, Senzaki E, Hamamura Y, Higashiyama T, Takayama S, Abe M, Kuchitsu K.** (2014) Ca²⁺-Activated Reactive Oxygen Species Production by Arabidopsis RbohH and RbohJ Is Essential for Proper Pollen Tube Tip Growth. **26**: 1069–1080
- Kieliszewski MJ** (2001) The latest hype on Hyp- O -glycosylation codes. *Phytochemistry* **57**: 319–323
- Kobe B, Kajava A V** (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* **11**: 725–32
- Kohorn BD, Kohorn SL** (2012) The cell wall-associated kinases , WAKs , as pectin receptors. *Front Plant Sci.* 2012; 3: 88. doi: 10.3389/fpls.2012.00088
- Koski MK, Hieta R, Böllner C, Kivirikko KI, Myllyharju J, Wierenga RK** (2007) The active site of an algal prolyl 4-hydroxylase has a large structural plasticity. *J Biol Chem* **282**: 37112–37123
- Krichevsky A, Kozlovsky S V., Tian GW, Chen MH, Zaltsman A, Citovsky V** (2007) How pollen tubes grow. *Dev Biol* **303**: 405–420
- Li Y-Q, Mareck A, Faleri C, Moscatelli A, Liu Q, Cresti M** (2002) Detection and localization of pectin methylesterase isoforms in pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L. *Planta* **214**: 734–740
- Liang F, Sze H** (1998) A high-affinity Ca²⁺ pump, ECA1, from the endoplasmic reticulum is inhibited by cyclopiazonic acid but not by thapsigargin. *Plant Physiol* **118**: 817–825
- Liu X, Wolfe R, Welch LR, Domozych DS, Popper ZA, Showalter AM** (2016) Bioinformatic identification and analysis of extensins in the plant kingdom. *PLoS One* **11**: 1–21
- Löcke S, Fricke I, Mucha E, Humpert ML, Berken A** (2010) Interactions in the pollen-specific receptor-like kinases-containing signaling network. *Eur J Cell Biol* **89**: 917–923
- Loraine AE, McCormick S, Estrada A, Patel K, Qin P** (2013) RNA-Seq of Arabidopsis Pollen Uncovers Novel Transcription and Alternative Splicing. *Plant Physiol* **162**: 1092–1109
- Lu Y, Chanroj S, Zulkifli L, Johnson MA, Uozumi N, Cheung A, Sze H** (2011) Pollen Tubes Lacking a Pair of K⁺ Transporters Fail to Target Ovules in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**: 81–93
- MacAlister CA, Ortiz-Ramírez C, Becker JD, Feijó JA, Lippman ZB** (2016) Hydroxyproline O-arabinosyltransferase mutants oppositely alter tip growth in *Arabidopsis thaliana* and *Physcomitrella patens*. *Plant J* **85**: 193–208
- Mangano S, Juárez SPD, Estevez JM** (2016) ROS Regulation of Polar Growth in Plant Cells. *Plant Physiol* **171**: 1593–1605
- Marzol E, Borassi C, Bringas M, Sede A, Rodríguez Garcia DR, Capece L, Estevez JM** (2018) Filling the Gaps to Solve the Extensin Puzzle. *Mol Plant* **7**;11(5):645-658. doi: 10.1016/j.molp.2018.03.003.

- Matsushima N, Miyashita H** (2012) Leucine-rich repeat (LRR) domains containing intervening motifs in plants. *Biomolecules* **2**: 288–311
- Mccormick S** (2004) Control of Male Gametophyte Development. *The Plant Cell*, Vol. 16, S142–S153.
- Mecchia M, Santos-Fernandez G, Duss N, Somoza S, Boisson-Dernier A, Gagliardini V, Martínez-Bernardini A, Ndinyanka Fabrice T, Ringli C, Muschietti J, et al** (2017) RALF4/19 peptides interact with LRX proteins to control pollen tube growth in Arabidopsis. 5467:
- Messerli MA, Créton R, Jaffe LF, Robinson KR** (2000) Periodic increases in elongation rate precede increases in cytosolic Ca²⁺during pollen tube growth. *Dev Biol* **222**: 84–98
- Michard E, Lima PT, Borges F, Silva AC, Portes MT, Carvalho JE, Gilliam M, Liu L, Obermeyer G, Feijó JA** (2011) RESEARCH ARTICLE Glutamate Receptor – Like Genes Form Ca²⁺ Channels in Pollen Tubes and Are Regulated by Pistil. *Science* (80-) **332**: 434–437
- Mingossi FB, Matos JL, Rizzato AP, Medeiros AH, Falco MC, Silva-Filho MC, Moura DS** (2010) SacRALF1, a peptide signal from the grass sugarcane (*Saccharum* spp.), is potentially involved in the regulation of tissue expansion. *Plant Mol Biol* **73**: 271–281
- Miyazaki S, Murata T, Sakurai-ozato N, Kubo M, Demura T, Fukuda H** (2009) Report ANXUR1 and 2 , Sister Genes to FERONIA / SIRENE , Are Male Factors for Coordinated Fertilization. *Curr Biol* **19**: 1327–1331
- Møller SR, Yi X, Velásquez SM, Gille S, Hansen PLM, Poulsen CP, Olsen CE, Rejzek M, Parsons H, Zhang Y, et al** (2017) Identification and evolution of a plant cell wall specific glycoprotein glycosyl transferase, ExAD. *Sci Rep* **7**: 1–15
- Morato do Canto A, Ceciliato PHO, Ribeiro B, Ortiz Morea FA, Franco Garcia AA, Silva-Filho MC, Moura DS** (2014) Biological activity of nine recombinant AtRALF peptides: Implications for their perception and function in Arabidopsis. *Plant Physiol Biochem* **75**: 45–54
- Mori T, Kuroiwa H, Higashiyama T, Kuroiwa T** (2006) Generative Cell Specific 1 is essential for angiosperm fertilization. *Nat Cell Biol* **8**: 1–3
- Mouline K, Véry A-A, Gaymard F, Boucherez J, Pilot G, Devic M, Bouchez D, Thibaud J-B, Sentenac H** (2002) Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K(+) channel in Arabidopsis. *Genes Dev* **16**: 339–350
- Murphy E, Smet I De** (2014) Understanding the RALF family : a tale of many species. *Trends Plant Sci* **19**: 664–671
- Muschietti JP, Wengier DL** (2018) How many receptor-like kinases are required to operate a pollen tube. *Curr Opin Plant Biol* **41**: 73–82
- Myllyharju J, Koivunen P** (2005) Characterization of a Second Arabidopsis thaliana Prolyl 4-Hydroxylase with Distinct Substrate Specificity. *J Biol Chem*. **280**: 1142–1148
- Ndinyanka Fabrice T, Vogler H, Draeger C, Munglani G, Gupta S, Herger AG, Knox JP, Grossniklaus U, Ringli C** (2017) LRX Proteins play a crucial role in pollen grain and pollen tube cell wall development. *Plant Physiol* **176**: pp.01374.2017

- Obermeyer G, Kolb H -A** (1993) K⁺ Channels in the Plasma Membrane of Lily Pollen Protoplasts. *Bot Acta* **106**: 26–31
- Ogawa-Ohnishi M, Matsushita W, Matsubayashi Y** (2013) Identification of three hydroxyproline O-arabinosyltransferases in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Chem Biol* **9**: 726–730
- Okuda S, Tsutsui H, Shiina K, Sprunck S, Takeuchi H, Yui R, Kasahara RD, Hamamura Y, Mizukami A, Susaki D, Kawano N, Sakakibara T, Namiki S, Itoh K, Otsuka K, Matsuzaki M, Nozaki H, Kuroiwa T, Nakano A, Kanaoka MM, Desselhaus T, Sasaki N, Higashiyama T.** (2009) Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. *Nature* **458**: 357–361
- Palanivelu R, Preuss D** (2006) Distinct short-range ovule signals attract or repel *Arabidopsis thaliana* pollen tubes in vitro. *BMC Plant Biol.* **9**: 1–9 doi: 10.1186/1471-2229-6-7.
- Parre E, Geitmann A** (2005) Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of *Solanum chacoense*. 582–592
- Pearce G, Yamaguchi Y, Munske G, Ryan CA** (2010) Structure-activity studies of RALF, Rapid Alkalinization Factor, reveal an essential -YISY- motif. *Peptides* **31**: 1973–1977
- Pierson ES, Miller DD, Callaham DA, Shipley AM, Rivers BA, Cresti M, Hepler PK** (1994) Pollen tube growth is coupled to the extracellular calcium ion flux and the intracellular calcium gradient: effect of BAPTA-type buffers and hypertonic media. *Plant Cell* **6**: 1815–1828
- Potock M, Mark A, Radek B, Smirnoff N, Viktor Á** (2006) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. 742–751
- Punwani JA, Drews GN** (2008) Development and function of the synergid cell. *Sex Plant Reprod* **21**: 7–15
- Qin Y, Leydon AR, Manziello A, Pandey R, Mount D, Denic S, Vasic B, Johnson MA, 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.* doi: 10.1371/journal.pgen.1000621
- Rangaraju S, Khoo KK, Feng Z-P, Crossley G, Nugent D, Khaytin I, Chi V, Pham C, Calabresi P, Pennington MW, et al** (2010) Potassium channel modulation by a toxin domain in matrix metalloprotease 23. *J Biol Chem* **285**: 9124–9136
- Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D** (2001) Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry.* doi: 10.1016/S0031-9422(01)00113-3
- Ringli C** (2010) The hydroxyproline-rich glycoprotein domain of the *Arabidopsis* LRX1 requires Tyr for function but not for insolubilization in the cell wall. *Plant J* **63**: 662–669
- Röckel N, Wolf S, Kost B, Rausch T, Greiner S** (2008) Elaborate spatial patterning of cell-wall PME and PME1 at the pollen tube tip involves PME1 endocytosis, and reflects the distribution of esterified and de-esterified pectins. *Plant J* **53**: 133–143
- Rounds CM, Lubeck E, Hepler PK, Winship LJ** (2011) Propidium Iodide Competes with Ca²⁺ to Label Pectin in Pollen Tubes and *Arabidopsis* Root Hairs. *Plant Physiol.* **157**: 175–187. doi:

10.1104/pp.111.182196.

- Rubinstein AL, Marquez J, Suarez-Cervera M, Bedinger PA** (1995) Extensin-like Glycoproteins in the Maize Pollen Tube Wall. *Plant Cell* **7**: 2211–2225
- Saito F, Suyama A, Oka T, Yoko-O T, Matsuoka K, Jigami Y, Shimma Y-I** (2014) Identification of Novel Peptidyl Serine α -Galactosyltransferase Gene Family in Plants. *J Biol Chem* **289**: 20405–20420
- Salem T, Mazzella A, Barberini ML, Wengier D, Motillo V, Parisi G, Muschiatti J** (2011) Mutations in two putative phosphorylation motifs in the tomato pollen receptor kinase LePRK2 show antagonistic effects on pollen tube length. *J Biol Chem* **286**: 4882–4891
- Schenk ST, Schikora A** (2015) Staining of Callose Depositions in Root and Leaf Tissues. *Bio-protocol* **5**: e1429
- Schiott M, Romanowsky SM, Baekgaard L, Jakobsen MK, Palmgren MG, Harper JF** (2004) A plant plasma membrane Ca²⁺ pump is required for normal pollen tube growth and fertilization. *Proc Natl Acad Sci* **101**: 9502–9507
- Sede AR, Borassi C, Wengier DL, Mecchia MA, Estevez JM, Muschiatti JP** (2018) Arabidopsis pollen extensins LRX are required for cell wall integrity during pollen tube growth. *FEBS Lett* **592**: 233–243
- Shi J, Cui M, Yang L, Kim YJ, Zhang D** (2015) Genetic and Biochemical Mechanisms of Pollen Wall Development. *Trends Plant Sci* **20**: 741–753
- Showalter AM, Keppler B, Lichtenberg J, Gu D, Welch LR** (2010) A Bioinformatics Approach to the Identification, Classification, and Analysis of Hydroxyproline-Rich Glycoproteins. *Plant Physiol* **153**: 485–513
- Shpak E, Barbar E, Leykam JF, Kieliszewski MJ** (2001) Contiguous Hydroxyproline Residues Direct Hydroxyproline Arabinosylation in *Nicotiana tabacum*. *J Biol Chem* **276**: 11272–11278
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, et al** (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*. doi: 10.1038/msb.2011.75
- Steinhorst L, Kudla J** (2013) Calcium a central regulator of pollen germination and tube growth. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1833**: 1573–1581
- Stratford S, Barnes W, Hohorst DL, Sagert JG, Cotter R, Golubiewski A, Showalter AM, McCormick S, Bedinger P** (2001) A leucine-rich repeat region is conserved in pollen extensin-like (Pex) proteins in monocots and dicots. *Plant Mol Biol* **46**: 43–56
- Takeuchi H, Higashiyama T** (2016) Tip-localized receptors control pollen tube growth and LURE sensing in Arabidopsis. *Nature* **531**: 245–248
- Twell D** (2011) Male gametogenesis and germline specification in flowering plants. *Sex Plant Reprod* **24**: 149–160
- Twell D** (2006) A blossoming romance: Gamete interactions in flowering plants. *Nat Cell Biol* **8**: 14–

- Velasquez SM, Ricardi MM, Dorosz JG, Fernandez P V., Nadra AD, Pol-Fachin L, Egelund J, Gille S, Harholt J, Ciancia M, et al** (2011) O-glycosylated cell wall proteins are essential in root hair growth. *Science* (80-) **332**: 1401–1403
- Velasquez SM, Ricardi MM, Poulsen CP, Oikawa A, Dilokpimol A, Halim A, Mangano S, Denita Juarez SP, Marzol E, Salgado Salter JD, et al** (2015) Complex regulation of prolyl-4-hydroxylases impacts root hair expansion. *Mol Plant* **8**: 734–746
- Verger S, Hamant O** (2018) FERONIA Defends the Cell Walls against Corrosion. *Curr Biol* **28**: R193–R194
- Vidali L, Hepler PK** (2001) Actin and pollen tube growth. *Protoplasma* **215**: 64–76
- Wallace IS, Anderson CT** (2012) Small molecule probes for plant cell wall polysaccharide imaging. *Front Plant Sci* **3**: 89
- Wang X, Wang K, Yin G, Liu X, Liu M, Cao N** (2018) Pollen-Expressed Leucine-Rich Repeat Extensins Are Essential for Pollen Germination and Growth 1 [OPEN]. **176**: 1993–2006
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson G V., Provart NJ** (2007) An “electronic fluorescent pictograph” Browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* **2**: 1–12
- Zhao C, Zayed O, Yu Z, Jiang W, Zhu P, Hsu C, Zhang L** (2018) Leucine-rich repeat extensin proteins regulate plant salt tolerance in Arabidopsis. doi: 10.1073/pnas.1816991115
- Zhu L, Chu LC, Liang Y, Zhang XQ, Chen LQ, Ye D** (2018) The arabidopsis CrRLK1L protein kinases BUPS1 and BUPS2 are required for normal growth of pollen tubes in the pistil. *Plant J* **95**: 474–486
- Zinkl GM, Zwiebel BI, Grier DG, Preuss D** (1999) Pollen-stigma adhesion in Arabidopsis : a species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine. **5440**: 5431–5440
- Zou Y, Aggarwal M, Zheng WG, Wu HM, Cheung AY** (2011) Receptor-like kinases as surface regulators for RAC/ROP-mediated pollen tube growth and interaction with the pistil. *AoB Plants* **11**: 1–14