

## Estudio del mucílago de semillas mutantes para conocer el papel de la arabinosa en la pared celular

Paula Gómez de Agüero<sup>1</sup>, Asier Largo-Gosens<sup>2,3</sup>.

- <sup>1</sup> Graduada en Biología, Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales. Universidad de León. [pgomeco1@estudiantes.unileon.es](mailto:pgomeco1@estudiantes.unileon.es)
- <sup>2</sup> Área de Fisiología Vegetal, Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias, Universidad de León.
- <sup>3</sup> Instituto de Biología Molecular, Genómica y Proteómica (INBIOMIC), Universidad de León. [alargs@unileon.es](mailto:alargs@unileon.es)

### Resumen

La pared celular primaria rodea los protoplastos de las células de las plantas y está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosas, pectinas y glicoproteínas. Los dos últimos grupos poseen arabinofuranosa en sus cadenas laterales y, aunque el déficit de este monosacárido produce defectos severos en el desarrollo, todavía se desconoce su función en la pared celular. Para realizar este trabajo se ha estudiado el mucílago de las semillas de *Arabidopsis thaliana*, que es una estructura de fácil extracción con agua y muy rica en pectinas, lo que facilita el análisis de estos polisacáridos. Se han analizado 8 mutantes en genes *RGP* (*RGP1-5*) que codifican para un complejo enzimático encargado de catalizar el último paso en la síntesis de UDP-arabinofuranosa, precursor activado necesario para la síntesis de polímeros que contienen arabinofuranosa. El estudio de los mutantes *rgp* reveló que la reducción de la expresión de *RGP4* y *RGP5* provoca un déficit en la liberación del mucílago, destacando el mutante *rgp5-2*. La superficie de las semillas de los mutantes *rgp5-2* mostró anomalías en las células que sintetizan el mucílago, lo que podría explicar los problemas en la liberación. No obstante, es necesario seguir estudiando los genes *RGP* para intentar comprender mejor el rol de la arabinosa en la pared celular de las plantas.

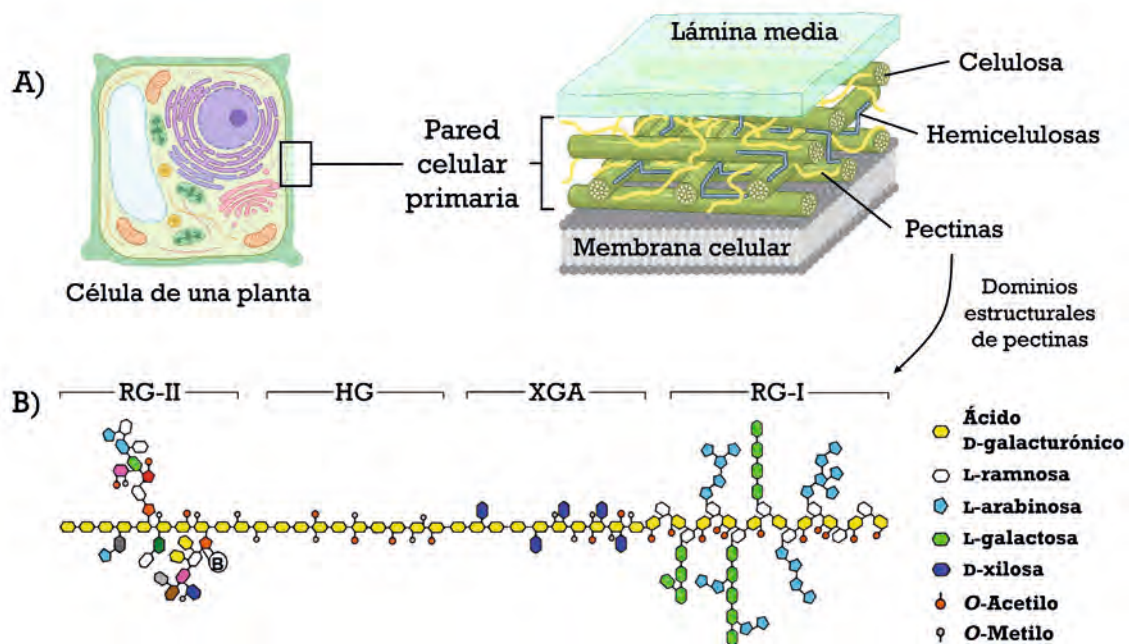
### Palabras clave

*Arabidopsis thaliana*, arabinofuranosa, mucílago, pared celular, *Reversibly Glycosylated Polypeptides* (RGPs).

## Introducción

### La pared celular de las plantas

Todas las células de las plantas están limitadas por una estructura compleja, dinámica y altamente controlada denominada pared celular primaria, la cual desempeña multitud de funciones como la determinación de la morfogénesis, el control de la elongación celular o respuestas de defensa frente a estreses, entre otras (Zhang *et al.*, 2021). Esta estructura consiste en una red heterogénea formada principalmente por polisacáridos como celulosa (25-30 %), hemicelulosas (30 %), pectinas (30-35 %) y glicoproteínas (5-10 %) (**Fig. 1.A**) (Zhang *et al.*, 2021). Las pectinas, además de ser un componente mayoritario, son fundamentales ya que participan en la cohesión y adhesión celular y modifican la flexibilidad de la pared, entre otras funciones (Anderson, 2016). Debido a su gran diversidad, las pectinas se han clasificado tradicionalmente en cuatro dominios estructurales (homogalacturonano, HG; xilogalacturonano, XGA; ramnogalacturonano-I, RG-I; y ramnogalacturonano-II, RG-II) los cuales tienen en común que su cadena principal está formada por ácido galacturónico (GalA), a excepción del RG-I que está formada por repeticiones del disacárido GalA-ramnosa (**Fig. 1.B**) (Anderson, 2016).



**Figura 1. Estructura y composición general de la pared celular primaria de las plantas.** **A)** Esquema de la disposición, estructura y composición de la pared celular primaria. Se incluyen los tres componentes principales de la pared celular primaria: microfibrillas de celulosa, hemicelulosas y pectinas. Imagen creada con BioRender. **B)** Representación de la estructura de los cuatro dominios principales de pectinas (ramnogalacturonano II, RG-II; homogalacturonano, HG; xilogalacturonano, XGA y ramnogalacturonano I, RG-I). Imagen obtenida de Harholt *et al.*, (2010).

Uno de los monosacáridos más importantes de las pectinas es la arabinosa (Ara), llegando a ser de los más abundantes de la pared celular en determinados tejidos (Mariette *et al.*, 2021). La Ara está presente en las cadenas laterales de arabinano y arabinogalactano del RG-I, en algunas cadenas laterales del RG-II y en proteínas estructurales de la pared celular, como las extensinas y las arabinogalactano proteínas (Marzol *et al.*, 2018; Mariette *et al.*, 2021). Debido a su extensa distribución en diversos polímeros de pared y a las diferentes proporciones de este monosacárido dependiendo de la planta, órgano o tejido estudiado, ha sido muy complicado describir las funciones concretas de la presencia de este monosacárido en componentes de la pared celular (Mariette *et al.*, 2021). Sin embargo, sí se ha determinado que la Ara está relacionada con una gran variedad de procesos como la desecación y germinación de las semillas, la maduración y deshidratación de los granos de polen, la elongación de los tubos polínicos, la apertura y cierre de estomas o el crecimiento de los pelos radicales, entre otros (Marzol *et al.*, 2018; Mariette *et al.*, 2021). Además, cabe destacar que la Ara podría ser clave para mantener las propiedades mecánicas de la pared ya que se ha sugerido que la cantidad de arabinano en el RG-I podría generar cambios en la elasticidad de la pared celular y en su capacidad de absorber y retener agua (Arsovski *et al.*, 2009; Rautengarten *et al.*, 2011). Todos estos procesos son clave para el desarrollo de las plantas, por lo que la Ara es un monosacárido esencial y cualquier avance en el estudio de su síntesis e incorporación a los polímeros de pared celular podría ayudar a comprender mejor el papel de la Ara en esta estructura (Mariette *et al.*, 2021).

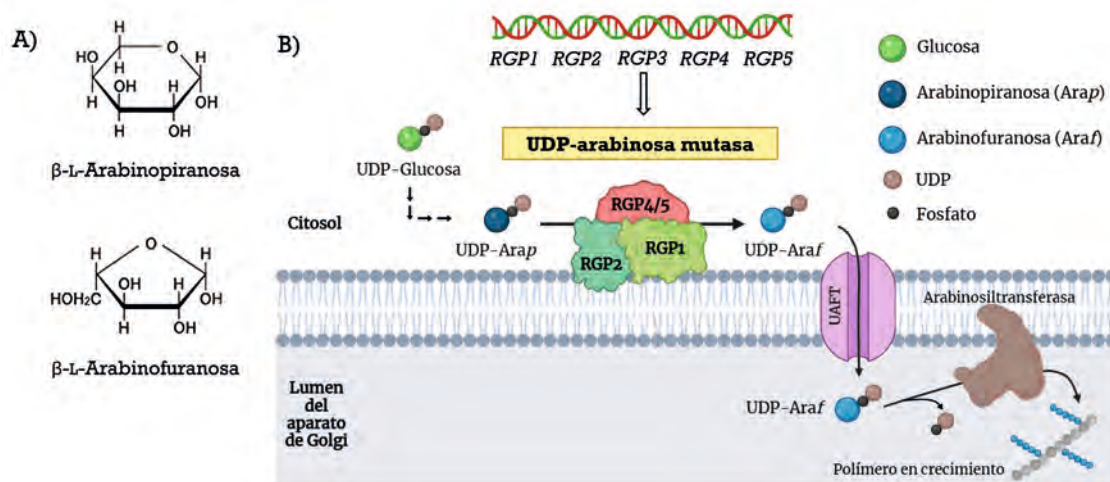
### Síntesis de arabinosa en plantas

Al igual que el resto de monosacáridos, la Ara tiene dos conformaciones (tautómeros): arabinopiranososa (Arap) y arabinofuranosa (Araf) (**Fig. 2.A**). Para la mayor parte de los monosacáridos presentes en la pared celular la forma piranososa es la más frecuente dado que es termodinámicamente más estable, pero precisamente esto no es así en el caso de la Ara, en la que predomina su forma furanosa (Rautengarten *et al.*, 2011). La incorporación de Araf en las pectinas y glicoproteínas de pared es realizada por arabinosiltransferasas (AraTs) en el aparato de Golgi (Rautengarten *et al.*, 2011). El sustrato de las AraTs es el nucleótido-azúcar UDP-Araf, que es transmutado a partir de UDP-Arap por un complejo de proteínas con actividad UDP-arabinosa mutasa en el citoplasma y posteriormente es transferido al lumen del aparato de Golgi por medio del transportador de UDP-Araf (UAFT) (**Fig. 2.B**) (Rautengarten *et al.*, 2011; 2017). El complejo con actividad UDP-arabinosa mutasa está formado por proteínas de la familia *Reversibly Glycosylated Polypeptides* (RGPs), que en *Arabidopsis thaliana* está constituida por cinco miembros (Rautengarten *et al.*, 2011). De entre ellos, tres (RGP1-3) poseen actividad UDP-arabinosa mutasa *in vitro* mientras que los otros dos (RGP4 y 5) no la presentan (Rautengarten *et al.*, 2011). Los complejos proteicos RGP formados son de alto peso molecular y están constituidos por tres subunidades: RGP1 y RGP2 (con actividad mutasa) y un RGP sin actividad, fun-

damentalmente RGP5 (**Fig. 2.B**) (Rautengarten *et al.*, 2011). Las razones de la prevalencia de la forma Araf frente a Arap en paredes celulares de plantas y la presencia de miembros sin actividad UDP-Ara mutasa en los complejos RGP son algunas de las incógnitas que rodean este proceso.

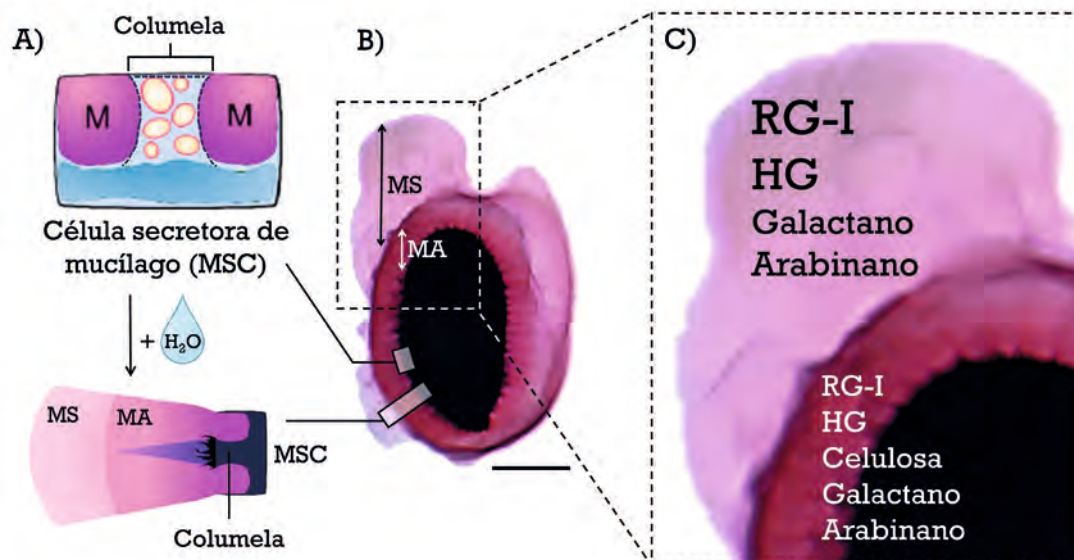
El mucílago: un modelo simplificado para el estudio de la pared celular primaria

La gran complejidad química que presenta la pared celular y el elevado número de interacciones entre sus componentes dificulta en gran medida el estudio de esta estructura (Zhang *et al.*, 2021). Por este motivo, recientemente, se ha fomentado el uso de modelos simplificados de pared celular, como es el caso del mucílago de las semillas de *A. thaliana* (Western *et al.*, 2001). El mucílago es una matriz gelatinosa sintetizada en un tipo de células especializadas localizadas en la epidermis de las semillas denominadas células secretoras de mucílago (MSCs) (**Fig. 3.A**) (Western *et al.*, 2001). Este mucílago se deposita de forma deshidratada hacia el exterior de la célula formando en el centro de la MSC una estructura denominada columela (**Fig. 3.A**). En presencia de agua, el mucílago se hidrata y se libera en dos capas: el mucílago soluble en agua (MS) y el mucílago adherido a la semilla (MA) (**Fig. 3.B**) (Saez-Aguayo y Largo-Gosens, 2022).



**Figura 2. Estructura de los tautómeros de Ara y esquema simplificado de la síntesis y utilización de UDP-Araf.** **A)** Representación esquemática de los dos tautómeros de la Ara. Los azúcares se muestran en la proyección de Haworth (modificado de Kotake *et al.*, 2016). **B)** Esquema simplificado de la síntesis y utilización de UDP-arabinofuranosa en plantas. En la síntesis y utilización de la UDP-Araf participan varias proteínas como el complejo RGP con actividad UDP-Ara mutasa, los transportadores de UDP-Araf de la membrana del aparato de Golgi (UAFTs) y las arabinosiltransferasas. Imagen basada en Rautengarten *et al.*, (2017) y creada con BioRender.

En cuanto a su composición, ambas capas tienen una gran cantidad de RG-I y HG, además de otros componentes (**Fig. 3.C**), haciendo que el mucílago sea un buen modelo para el estudio de pectinas (Šola *et al.*, 2019; Saez-Aguayo y Largo-Gosens, 2022). Es por ello que esta estructura ha sido utilizada para comprender aspectos de la síntesis o metabolismo de la Ara en la pared celular. Un ejemplo son los mutantes en *BXL1*, un gen que codifica para una arabinofuranosidasa capaz de modificar las cadenas laterales de arabinanos del RG-I presentes en el mucílago y cuyos mutantes *bxl1* mostraron problemas en la liberación de esta estructura tras la hidratación de las semillas (Arsovski *et al.*, 2009). Otro caso es el de los mutantes *uaft2*, que codifican para un transportador de Araf (UAFT2) y presentan alteraciones en la estructura del mucílago, así como una menor adherencia de este (Parra-Rojas *et al.*, 2019). En otro estudio, se observó que cuando se afecta la expresión de *RGP1* y *RGP2* en líneas ARNi que reducen la expresión de ambos genes se producen cambios en la estructura del mucílago (Rautengarten *et al.*, 2011). Sin embargo, en este trabajo no se estudiaron en detalle los cambios producidos y tampoco se estudiaron los posibles papeles del resto de miembros *RGP* en la síntesis de esta estructura. Este análisis podría ayudar a entender cómo se produce la síntesis de UDP-Araf en plantas y su posterior incorporación en los polímeros presentes en el mucílago, lo que a su vez ayudaría a comprender cuál es la implicación de la Araf en la pared celular.



**Figura 3. Estructura y composición del mucílago de las semillas de *A. thaliana*.** **A)** Esquema de la localización del mucílago (M) dentro de las MSCs y de la posición de la columela. Imagen creada con BioRender. **B)** Semilla madura teñida con rojo de rutenio durante la liberación del mucílago. Se observa una capa compacta de MA (mucílago adherido) y una difusa de MS (mucílago soluble). Barra de escala: 150  $\mu$ m. **C)** Imagen donde se incluyen los principales componentes de cada capa (en negro para MS y en blanco para MA) expresados de mayor a menor abundancia. Ramnogalacturonano I (RG-I); homogalacturonano (HG).

## Objetivo

El objetivo de este trabajo es seleccionar las proteínas RGP con un posible rol en la síntesis de componentes del mucílago de las semillas de *Arabidopsis thaliana* mediante un fenotipado en mutantes insercionales de ADN-T de los genes *RGP*.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Las semillas genotipo salvaje ecotipo Columbia-o (Col-o WT) y de ocho mutantes insercionales de ADN-T para los genes *RGP* de *A. thaliana* (**Tabla 1**) se obtuvieron de ABRC (<http://abrc.osu.edu/>) y de uNASC (<https://arabidopsis.info/>) y se seleccionaron mutantes homocigotos por PCR.

Las semillas fueron recolectadas de plantas de *A. thaliana* crecidas en cámaras de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas de luz a 23 °C y 8 horas de oscuridad a 21 °C, y con una humedad del 40 %. Cada planta creció individualmente sobre alveolos de 25 mL que contenían una mezcla de sustrato universal (Projar) y vermiculita en proporción 4:1. Las plantas se regaron a capacidad de campo cada tres días y se fertilizaron cada dos riegos hasta que salieron los primeros botones florales. A partir de las silicuas formadas se recolectaron las semillas utilizadas en este trabajo.

**Tabla 1. Genes, mutantes y primers empleados.** Se incluye el código de cada gen, el código de cada mutante insercional de ADN-T y la secuencia de los primers empleados en la RT-PCR.

Gen	Código	Primer	Secuencia (5' → 3')	Mutante (código)
<i>RGP1</i>	At3g02230	RGP1 Fw	ATGGTTGAGCCGGCGAACAC	<i>rgp1-1</i> (GK_652F12)
		RGP1 Rv	AGCTTTAGTGGGTGGGTTAAG	<i>rgp1-2</i> (GK_844C11)
<i>RGP2</i>	At5g15650	RGP2 Fw	ATGGTTGAGCCGGCGAATAC	<i>rgp2-1</i> (SALK_132152)
		RGP2 Rv	AGCTTTGCCACTGGCTGCTGG	<i>rgp2-2</i> (SALK_148500)
<i>RGP4</i>	At5g50750	RGP4 Fw	ATGGCGGGCTACAACCTCGA	<i>rgp4-1</i> (SALK_094267)
		RGP4 Rv	TCACTTGGCCTTGACATCTT	<i>rgp4-2</i> (SALK_150951)
<i>RGP5</i>	At5g16510	RGP5 Fw	ATGTCTTTGGCCGAGATAAAC	<i>rgp5-1</i> (GK_105B02)
		RGP5 Rv	AGCGCTAGAATTAACAGAATTCC	<i>rgp5-2</i> (WiscDsLox264E12)
<i>UBQ21</i>	At5g25760	UBI21 Fw	GCTCTTATCAAAGGACCTTCGG	—
		UBI21 Rv	CGAACTTGAGGAGGTTGCAAAG	

### Análisis de expresión de genes *RGP* en mutantes insercionales de ADN-T

Para analizar la expresión de los genes *RGP1*, *RGP2* y *RGP5* en Col-o WT y en los mutantes de *A. thaliana* se tomó un fragmento de hoja de la roseta. Sin

embargo, para analizar la expresión del gen *RGP4* se recogieron 6 silicuas 6 días después de la polinización del gineceo (DAP) siguiendo las indicaciones descritas en Western *et al.*, (2001), ya que *RGP4* solo se expresa en semillas en desarrollo (Rautengarten *et al.*, 2011). Este material se obtuvo de tres réplicas biológicas crecidas en las mismas condiciones.

El material vegetal obtenido se homogeneizó y se utilizó TRIzol-Reagent (Fisher Scientific) para extraer el ARN de los mutantes en los genes *RGP1*, *RGP2* y *RGP5*, y se empleó el kit RNeasy Plant Mini (Qiagen) para extraer el ARN de los mutantes en *RGP4* y evitar la presencia de contaminantes. Tras determinar la concentración y pureza del ARN total se realizó la retrotranscripción utilizando el kit High-Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems). La RT-PCR se hizo utilizando la enzima OptiTaq DNA polymerase (Eurx) junto con unos *primers* específicos que amplifican toda la región codificante para cada uno de los genes (**Tabla 1**). Para la normalización de dicha expresión se utilizó el gen de referencia *UBQ21*.

#### Ensayo de liberación de mucílago soluble

Para la extracción del mucílago soluble las semillas se embebieron 10 mg de semillas en 1 mL de agua destilada, se pusieron en agitación constante en una noria a temperatura ambiente y se recogió el mucílago soluble liberado a distintos tiempos. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis de ácidos urónicos (que en el mucílago es fundamentalmente GalA) por el método del m-hidroxibifenil (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973) adaptado a placas de 96 pocillos. Para poder cuantificar se utilizó una recta patrón de GalA en concentraciones conocidas (0-100 µg/mL).

#### Análisis citológico de la superficie de la semilla y del mucílago adherido

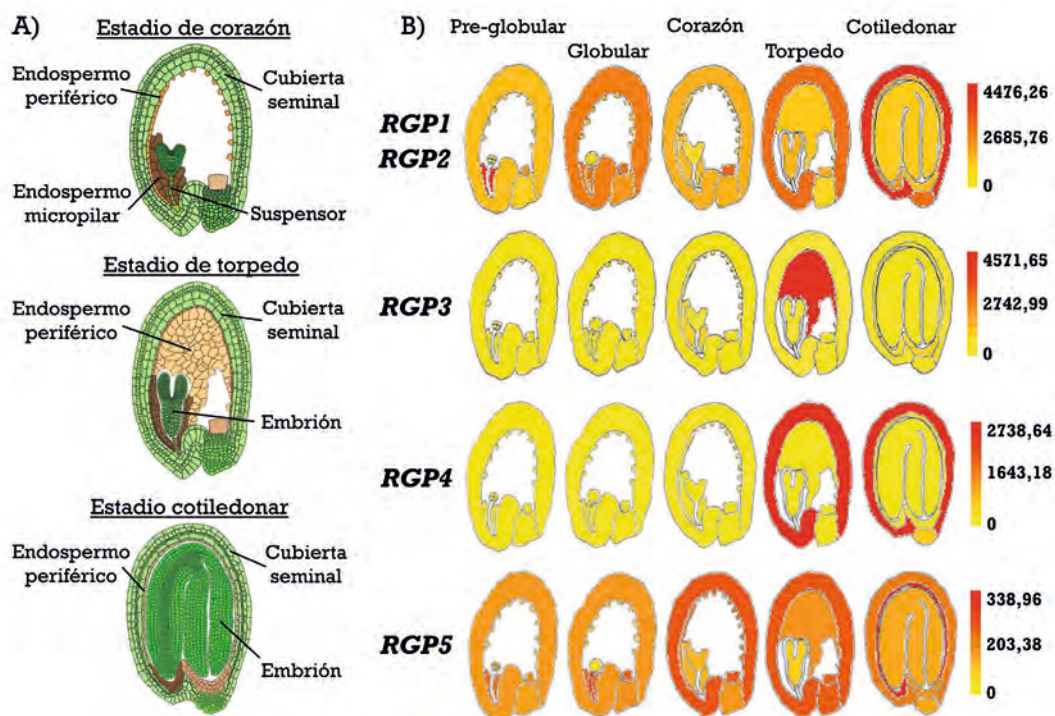
Para analizar cambios en la estructura de la superficie de la semilla y en la liberación del mucílago adherido se seleccionó el mutante *rgp5-2* ya que es el que más defectos fenotípicos presentó en ensayos anteriores. La superficie de las semillas se observó con el microscopio estereoscópico Nikon SMZ25 empleando el campo claro para ver la morfología de las células secretoras de mucílago y de la columela, y empleando luz UV a 400 y 460 nm para detectar la autofluorescencia emitida en la superficie de la semilla, probablemente debida a la celulosa cristalina.

Para analizar la liberación del mucílago adherido se eliminó la capa de mucílago soluble mediante un lavado con agua destilada durante 5 minutos en agitación y posteriormente, el mucílago adherido se tiñó durante 5 minutos con una solución de rojo de rutenio al 0,05 % (p/v). Finalmente, las semillas se observaron con un microscopio estereoscópico NexiusZoom 1902 para realizar una valoración general de los defectos en la liberación del mucílago y Nikon SMZ25 para observar los detalles de la superficie de las semillas

### Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se han realizado con el programa informático GraphPad Prism v8.0.1. Para evaluar la normalidad de los datos se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov y para analizar la existencia de diferencias significativas entre los mutantes y el genotipo silvestre se realizó el test de Mann-Whitney. El grado de significancia se indicó en las gráficas correspondientes mediante asteriscos en función de los siguientes valores: \* para  $p < 0,05$ , \*\* para  $p < 0,01$  y \*\*\* para  $p < 0,001$ .

### Resultados y discusión



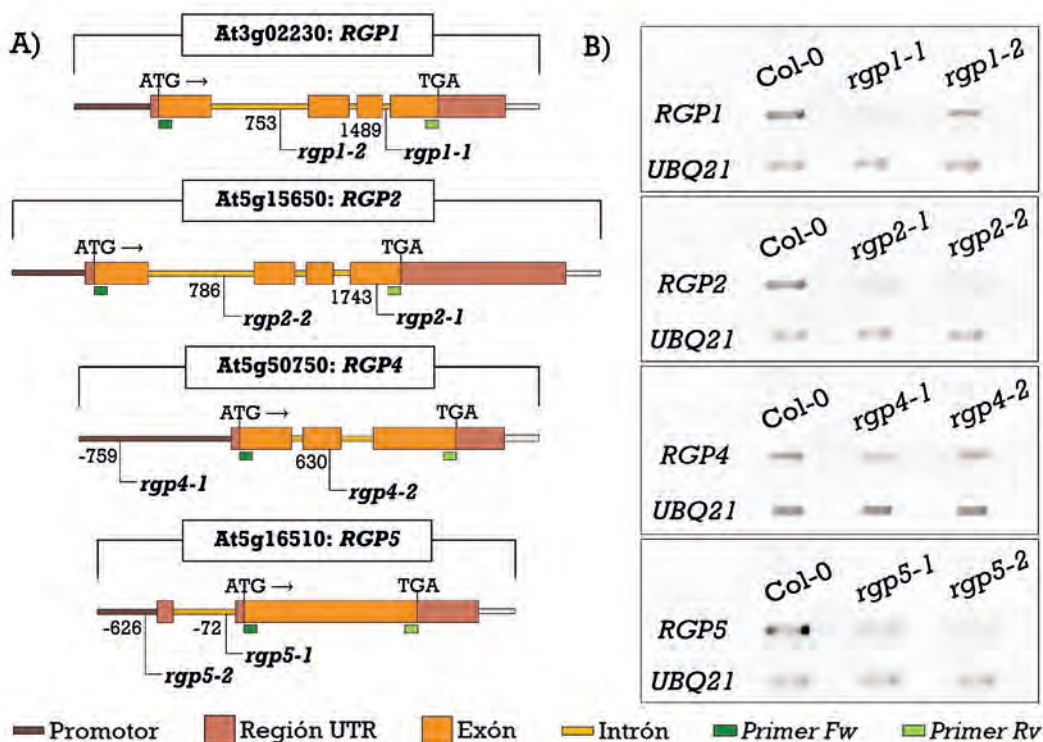
**Figura 4.** Los genes *RGP1*, *RGP2*, *RGP4* y *RGP5* se expresan en el tegumento durante el desarrollo de semillas Col-0 WT de *A. thaliana*. **A)** Dibujo esquemático de los tejidos de la semilla en distintas etapas de su maduración. **B)** Expresión específica de los genes *RGP1-5* en los tejidos de la semilla en distintos estadios de la embriogénesis de *A. thaliana*. Los valores absolutos de expresión en la escala de color fueron obtenidos de la base de datos Efp Browser (Winter *et al.*, 2007).

Aunque existen pruebas de que *RGP1* y *RGP2* participan en la síntesis del mucílago (Rautengarten *et al.*, 2011) no se ha demostrado si hay más miembros de la familia *RGP* que pudieran estar participando en este proceso. El análisis *in silico* de la expresión de estos genes en el tegumento de la semilla durante su desarrollo reveló que todos los genes *RGP*, salvo el *RGP3*, se expresan en el tegumento de la semilla (**Fig. 4**). Además, la expresión de estos genes tiene lugar en las etapas embrionarias de torpedo y cotiledonar con un patrón muy similar al de otros genes con

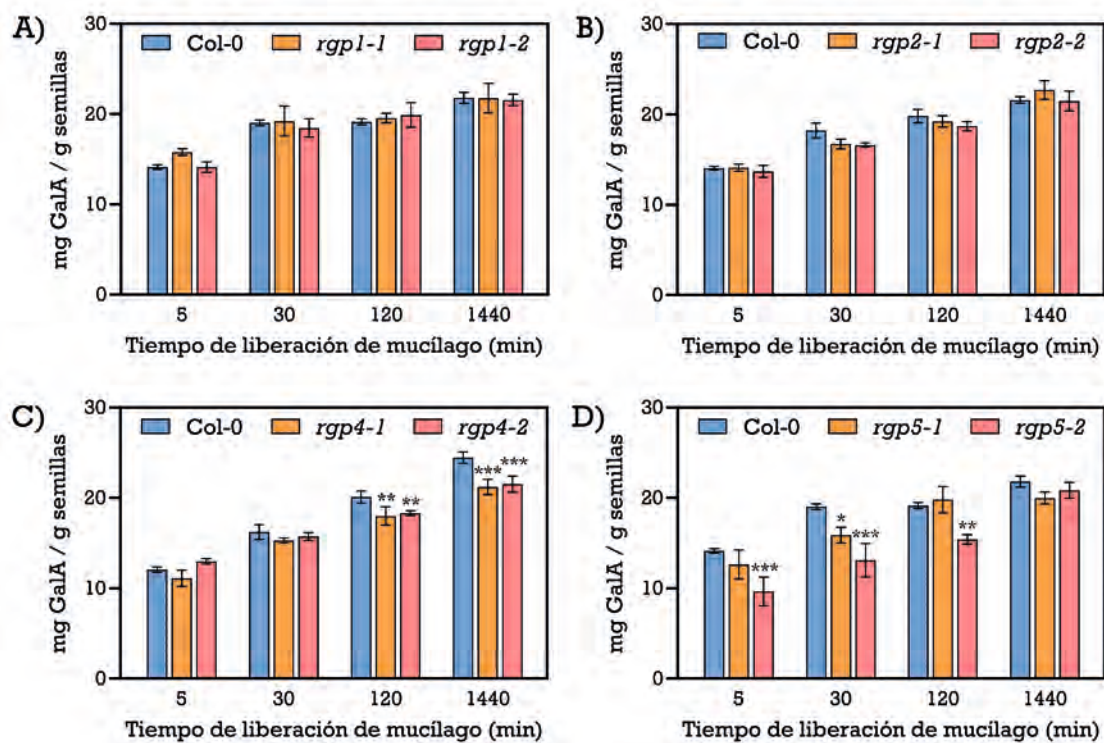


un papel en la síntesis del mucílago, como *MUM2*, *MUM4* y *GATL5* (Western *et al.*, 2001; Macquet *et al.*, 2007; Kong *et al.*, 2011). Esto indicaría que *RGP1*, *RGP2*, *RGP4* y *RGP5* podrían tener un papel en la biosíntesis de las pectinas del mucílago. Por otro lado, el gen *RGP3* tiene una alta expresión, pero de forma exclusiva en el endospermo (**Fig. 4**), lo que descarta su participación en la síntesis del mucílago y, por lo tanto, no se ha incluido en el resto de análisis realizados.

Con el objetivo de evaluar los posibles cambios provocados por la reducción de la expresión de los genes de la familia *RGP* se seleccionaron dos líneas mutantes insercionales de ADN-T que fueran homocigotas para cada uno de ellos (**Fig. 5.A**) y se analizó el efecto de las mutaciones en la expresión de su correspondiente gen (**Fig. 5.B**). Los resultados revelaron que todas las inserciones de ADN-T producían un efecto *knock-down* en la expresión de sus correspondientes genes, siendo en los mutantes *rgp1-1*, *rgp2-2*, *rgp4-1* y *rgp5-2* donde se produjo una mayor disminución de la expresión.



**Figura 5. La expresión de los genes *RGP1*, *RGP2*, *RGP4* y *RGP5* disminuye en sus correspondientes líneas mutantes. A)** Representación esquemática de la estructura de los genes *RGP1*, *2*, *4* y *5*. Se indican tanto los codones de inicio (ATG) y parada (TGA), como la posición (en pb) de los mutantes insercionales de ADN-T. También se representan las regiones UTRs, exones, intrones y los promotores de cada gen. Se incluye el sitio de unión de los *primers Fw* y *Rv* usados en la RT-PCR. Datos obtenidos de TAIR (<http://arabidopsis.org>). **B)** Análisis de la expresión de los genes *RGP1*, *2*, *4* y *5* en sus correspondientes líneas mutantes y Col-o WT mediante RT-PCR utilizando *primers* específicos para cada gen. La expresión del gen *UBQ21* se utilizó como referencia.



**Figura 6. Los mutantes en *RGP4* y *RGP5* muestran defectos en la tasa de liberación de mucilago tras la hidratación de las semillas.** Se representa la cuantificación de GalA liberado en el mucilago soluble de las semillas Col-0 WT y líneas mutantes en (A) *RGP1*, (B) *RGP2*, (C) *RGP4* y (D) *RGP5*. Las barras de error representan el SE de 3 réplicas biológicas por genotipo. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a Col-0 WT (test de Mann-Whitney, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Para caracterizar fenotípicamente los mutantes *rgp*, primero se evaluó si presentaban defectos en la liberación del MS mediante la cuantificación del GalA obtenido tras la imbibición de las semillas en agua a lo largo del tiempo (Fig. 6). Los mutantes en *RGP1* (Fig. 6.A) y *RGP2* (Fig. 6.B) no presentaron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de GalA en comparación con Col-0 WT, lo que sugiere que estas mutaciones no provocaron deficiencias en la liberación del MS. En contraposición, los mutantes en *RGP4* (Fig. 6.C) y *RGP5*, sobre todo la línea *rgp5-2*, (Fig. 6.D) presentaron una reducción en la cantidad de GalA liberado en comparación con Col-0 WT, lo que implica una deficiencia en el MS liberado. Teniendo en cuenta que *RGP1* y *RGP2* eran los miembros que presentaban actividad UDP-arabinosa mutasa *in vitro*, estos resultados parecen sorprendentes. Sin embargo, se ha observado que *RGP1* y *RGP2* tienen una redundancia funcional y podrían tener un efecto compensatorio, dado que en los mutantes simples nunca se han observado grandes defectos morfológicos (Rautengarten *et al.*, 2011). Este efecto compensatorio radica en que la deficiencia en la actividad mutasa en los mutantes en *RGP1* podría ser compensada por *RGP2*,

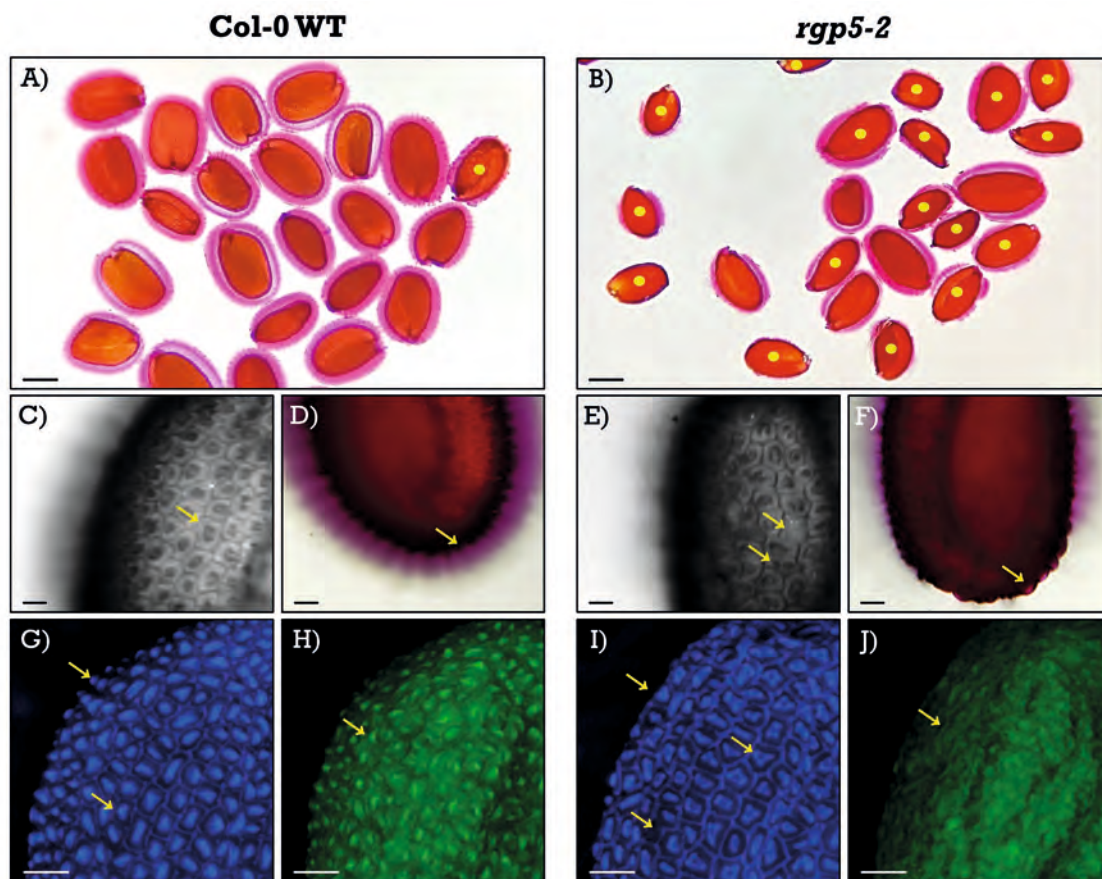
y viceversa, de modo que la actividad global del complejo no se reduciría significativamente (Rautengarten *et al.*, 2011). Sin embargo, poco se conoce sobre la función de RGP4 y RGP5 en el complejo proteico, aunque se ha propuesto que podrían tratarse de un estabilizador estructural del complejo o un regulador de la actividad enzimática (Mariette *et al.*, 2021). Por tanto, la ausencia de estas proteínas podría comprometer la integridad del complejo enzimático, disminuyendo considerablemente su actividad (Mariette *et al.*, 2021). No obstante, para poder afirmar todo esto sería necesario evaluar si realmente hay una disminución de la actividad UDP-Ara mutasa en estos mutantes.

Un aspecto que llama la atención es que los mutantes en *RGP4* presentaron una menor liberación de mucílago a tiempos largos, y la cantidad liberada nunca alcanzó niveles similares a las semillas Col-0 WT tras 24 horas en agua (**Fig. 6.C**). En contraste, los mutantes en *RGP5* mostraron una deficiencia en la liberación de mucílago en los primeros tiempos de análisis, y la cantidad de MS obtenido fue muy similar a Col-0 WT al final del ensayo (**Fig. 6.D**). Todo esto podría significar que, en realidad, los mutantes en *RGP4* presentan una reducción en la cantidad general de MS liberado, mientras que los mutantes en *RGP5* muestran un retraso severo en su liberación.

De entre todos los mutantes analizados, *rgp5-2* reducía en mayor medida la expresión de este gen y presentó los mayores defectos fenotípicos. El análisis citológico con la tinción rojo de rutenio mostró que *rgp5-2* presentaba una liberación completa del mucílago en un número reducido de semillas (**Fig. 7.B**), fenotipo que ha sido observado en mutantes que afectan a genes implicados en la síntesis del mucílago como *BXL1* o *GATL5* (Arsovski *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2011). Además, la superficie de las semillas de este mutante reveló alteraciones en la morfología de las células del tegumento (con una pérdida de la forma hexagonal) y defectos en el desarrollo y/o incluso ausencia de la columela (**Fig. 7.E**).

También se observó una reducción de la autofluorescencia a 400 y 460 nm en las columelas de las MSCs de dichas semillas. Esta menor fluorescencia probablemente sea debida a una menor proporción de celulosa cristalina, que es clave para la síntesis y liberación del mucílago (Griffiths *et al.*, 2015) (**Fig. 7.I y 7.J**). Todos estos cambios indican que, aunque haya células que hayan sintetizado mucílago con capacidad de absorber agua, este permanece retenido en la célula y no se libera (**Fig. 7.F**). Estas alteraciones morfológicas en las MSCs se han observado previamente en mutantes en *MUM4* y *GATL5*, que presentaron ausencia de liberación de esta estructura, probablemente por deficiencias en su síntesis (Western *et al.*, 2001; Kong *et al.*, 2011). Por otro lado, mutantes que afectan a la estructura de las pectinas, como *pmei6* que regula el grado de metilación del HG, o *bxl1* que regula el tamaño de las cadenas laterales de arabinano del RG-I, mostraron defectos en la liberación de esta estructura (Arsovski *et al.*, 2009; Saez-Aguayo *et al.*, 2013). Varios de estos trabajos han propuesto que la estructura y composición de las pectinas es clave en el proceso de liberación del mucílago, dado que podría afectar a la capacidad de hidratación de esta estructura y/o a las propiedades mecánicas de la

pared celular distal de las MSCs, regulando la presión necesaria para la correcta liberación del mucílago (Arsovski *et al.*, 2009; Saez-Aguayo *et al.*, 2013). El entender cómo modificaciones en la estructura de las pectinas pueden afectar a la capacidad de hidratación y/o a las propiedades mecánicas de la pared celular es clave, dado que ambas propiedades regulan múltiples procesos del desarrollo de las plantas.



**Figura 7. La línea mutante *rgp5-2* presenta defectos en el desarrollo de las MSCs y la liberación del mucílago. A-B)** Tinción del mucílago adherido con rojo de rutenio de semillas (A) Col-o WT y (B) *rgp5-2*. Se indica con un punto amarillo las semillas que muestran defectos en la liberación de mucílago. Barras de escala: 200  $\mu$ m. **C-F)** Detalle de las MSCs de las semillas (C-D) Col-o WT y (E-F) *rgp5-2* tras la liberación del mucílago y teñidas con rojo de rutenio. Barras de escala: (C-E) 20  $\mu$ m, (D-F) 50  $\mu$ m. **G-J)** Detalle de la autofluorescencia de la superficie de las semillas de (G-H) Col-o WT y (I-J) *rgp5-2* excitadas con luz a 400 nm (G-I) y 460 nm (H-J). Barras de escala: 50  $\mu$ m. Las flechas señalan las diferencias respecto a la morfología de las células y la columela y respecto a la liberación del mucílago.

## Conclusiones

Los genes *RGP1*, *RGP2*, *RGP4* y *RGP5* se expresan en el tegumento de las semillas de *A. thaliana* en las fases de síntesis de mucílago, lo que sugiere su

implicación en este proceso. Se han seleccionado dos líneas mutantes alélicas de ADN-T para cada gen que afectan a la expresión de su gen correspondiente. Los mutantes en *RGP4* y *RGP5* presentaron defectos en la liberación del mucílago, siendo la línea *rgp5-2* la que mostró mayores defectos en esta liberación. Además, la superficie de las semillas de *rgp5-2* manifestó defectos en la morfología de las células secretoras de mucílago y en la formación de la columela. Es necesario seguir estudiando los genes *RGP* para intentar comprender mejor el rol de la Ara en la pared celular de las plantas.

### **Bibliografía**

- Anderson, C. T. 2016. We be jammin': an update on pectin biosynthesis, trafficking and dynamics. *Journal of Experimental Botany*, 67(2):495-502.
- Arsovski, A. A., Popma, T. M., Haughn, G. W., Carpita, N. C. *et al.* 2009. *AtBXL1* encodes a bifunctional beta-D-xylosidase/alpha-L-arabinofuranosidase required for pectic arabinan modification in *Arabidopsis* mucilage secretory cells. *Plant Physiology*, 150(3):1219-1234.
- Blumenkrantz, N. y Asboe-Hansen, G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54(2):484-489.
- Griffiths, J. S., Šola, K., Kushwaha, R., Lam, P. *et al.* 2015. Unidirectional movement of cellulose synthase complexes in *Arabidopsis* seed coat epidermal cells deposit cellulose involved in mucilage extrusion, adherence, and ray formation. *Plant Physiology*, 168(2):502-520.
- Harholt, J., Suttangkakul, A. y Vibe Scheller, H. 2010. Biosynthesis of pectin. *Plant Physiology*, 153(2):384-395.
- Kong, Y., Zhou, G., Yin, Y., Xu, Y. *et al.* 2011. Molecular analysis of a family of *Arabidopsis* genes related to galacturonosyltransferases. *Plant Physiology*, 155(4):1791-1805.
- Kotake, T., Yamanashi, Y., Imaizumi, C. y Tsumuraya, Y. 2016. Metabolism of L-arabinose in plants. *Journal of Plant Research*, 129(5):781-792.
- Macquet, A., Ralet, M. C., Loudet, O., Kronenberger, J. *et al.* 2007. A naturally occurring mutation in an *Arabidopsis* accession affects a beta-D-galactosidase that increases the hydrophilic potential of rhamnogalacturonan I in seed mucilage. *The Plant Cell*, 19(12):3990-4006.
- Mariette, A., Kang, H. S., Heazlewood, J. L., Persson, S. *et al.* 2021. Not just a simple sugar: arabinose metabolism and function in plants. *Plant & Cell Physiology*, 62(12):1791-1812.
- Marzol, E., Borassi, C., Bringas, M., Sede, A. *et al.* 2018. Filling the gaps to solve the extensin puzzle. *Molecular Plant*, 11(5):645-658.
- Parra-Rojas, J. P., Largo-Gosens, A., Carrasco, T., Celiz-Balboa, J. *et al.* 2019. New steps in mucilage biosynthesis revealed by analysis of the transcriptome of the

- UDP-rhamnose/UDP-galactose transporter 2 mutant. *Journal of Experimental Botany*, 70(19):5071-5088.
- Rautengarten, C., Birdseye, D., Pattathil, S., McFarlane, H. E. *et al.* 2017. The elaborate route for UDP-arabinose delivery into the Golgi of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(16):4261-4266.
- Rautengarten, C., Ebert, B., Herter, T., Petzold, C. J. *et al.* 2011. The interconversion of UDP-arabinopyranose and UDP-arabinofuranose is indispensable for plant development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23(4):1373-1390.
- Saez-Aguayo, S. y Largo-Gosens, A. 2022. Rhamnogalacturonan-I forms mucilage: behind its simplicity, a cutting-edge organization. *Journal of Experimental Botany*, 73(11):3299-3303.
- Saez-Aguayo, S., Ralet, M. C., Berger, A., Botran, L. *et al.* 2013. PECTIN METHYLESTERASE INHIBITOR6 promotes *Arabidopsis* mucilage release by limiting methylesterification of homogalacturonan in seed coat epidermal cells. *The Plant Cell*, 25(1):308-323.
- Šola, K., Dean, G. H. y Haughn, G. W. 2019. *Arabidopsis* seed mucilage: a specialised extracellular matrix that demonstrates the structure-function versatility of cell wall polysaccharides. En *Annual Plant Reviews Online*, J.A. Roberts (Ed.) Vol 2(4):1085-1115.
- Western, T. L., Burn, J., Tan, W. L., Skinner, D. J. *et al.* 2001. Isolation and characterization of mutants defective in seed coat mucilage secretory cell development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 127(3):998-1011.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R. *et al.* 2007. An “electronic fluorescent pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE*, 2(8):e718.
- Zhang, B., Gao, Y., Zhang, L. y Zhou, Y. 2021. The plant cell wall: biosynthesis, construction, and functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(1):251-272.