



FACULTADE DE BIOLOXÍA

TRABALLO DE FIN DE GRAO

GRAO EN BIOLOXÍA

# **ADAPTACIÓNS ÁS ALTERACIÓNS DA PAREDE CELULAR EN *Arabidopsis thaliana***

*Kai Lois Baltrusch Montero*  
*Curso 2019-2020*

## ÍNDICE

<b>1. RESUMO</b> .....	3
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>2.1. Compoñentes da parede celular primaria</b> .....	3
<b>2.2. Dinámica e función da parede celular primaria</b> .....	5
<b>2.3. Modelos estruturais da parede celular primaria</b> .....	6
<b>2.4. Efectos da alteración e disrupción de compoñentes da parede celular primaria</b> ...	8
<b>3. OBXECTIVOS</b> .....	9
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	10
<b>4.1. Material vexetal e técnicas de cultivo</b> .....	10
<b>4.2. Extracción de ARN, RT-PCR e clonación dos xenos de interese no vector pMDC7</b> .....	10
<b>4.3. Transformación de Agrobacterium e Arabidopsis thaliana</b> .....	11
<b>4.4. Selección das liñas transxénicas</b> .....	12
<b>4.5. Experimentos de indución por estradiol</b> .....	12
<b>4.7. Análise estatística</b> .....	13
<b>5. RESULTADOS E DISCUSIÓN</b> .....	13
<b>5.1. Obtención de liñas transxénicas de sobreexpresión inducible por estradiol</b> .....	13
<b>5.2. Efectos sobre a lonxitude dos hipocótilos da complementación inducida</b> <b>pMDC7:XXT2 sobre xxt1xxt2</b> .....	13
<b>5.3. Cuantificación de XiG en liñas transxénicas pMDC7:XXT2 sobre xxt1xxt2</b> .....	15
<b>5.4. Efectos da expresión inducida indPGX2 sobre Col e xxt1xxt2 sobre a lonxitude</b> <b>dos hipocótilos</b> .....	16
<b>6. CONCLUSIÓNS</b> .....	17
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	18

## 1. RESUMO

As paredes celulares primarias de plantas conforman unha estrutura moi dinámica e versátil implicada na regulación do crecemento. Están compostas principalmente por celulosa, pectinas e hemicelulosas como o xiloglucano (XiG). Analizar os efectos da alteración ou eliminación experimental dun ou varios destes compoñentes, permite achegarnos á comprensión da estrutura, dinámica e función da parede primaria.

É obxecto deste estudo investigar as respostas de *Arabidopsis thaliana* fronte ás alteracións da parede primaria, producidas mediante mutantes sen XiG e liñas de sobreexpresión inducible por estradiol. Constatáronse diferenzas significativas claras no crecemento de hipocótilos etiolados, entre mutantes sen XiG e liñas complementadas, o que indica posibles efectos do XiG sobre a extensibilidade (aínda que os resultados non descartan que poida deberse a outros factores). Ademais observouse que o debilitamento moderado da rede de pectinas leva a un crecemento de hipocótilos etiolados significativamente maior respecto ao silvestre. Resultados pouco congruentes suxeriron tamén que a disrupción combinada de XiG e pectinas podería aumentar o crecemento de hipocótilos por un debilitamento maior da parede, o que indicaría a existencia dun posible efecto compensatorio entre as redes de pectina e XiG. Por outra banda, foi implementado con éxito un protocolo de extracción e cuantificación de XiG.

## 2. INTRODUCCIÓN

A día de hoxe, moitos aspectos da estrutura tridimensional das paredes celulares primarias de plantas continúan sen estar de todo dilucidados. Isto débese tanto á constitución amorfa, insoluble e complexa dos compoñentes contidos nas paredes, como ás interaccións, xeralmente non-covalentes, dos seus polímeros (Cosgrove, 2018). O papel clave das paredes no crecemento celular sitúa as investigacións entorno a este ámbito baixo o foco dun interese biotecnolóxico innegable (Albersheim, 2011). Este estudo trata de analizar o rol de determinados compoñentes da parede celular primaria e o seu encaixe nos modelos estruturais propostos até o momento.

### 2.1. Compoñentes da parede celular primaria

A parede primaria de *Arabidopsis thaliana* está formada por un 42% de pectinas, 24% de hemicelulosas e un 14% de celulosa (Zabackis et al., 1995). As microfibras de celulosa da parede primaria constitúen o principal soporte mecánico. Cada unha das microfibras está composta por 18 cadeas lineais de  $\beta(1,4)$ -glucano. Son sintetizadas por unha asociación de complexos proteicos hexaméricos en roseta (proteínas CESA) embebidos na membrana plasmática. Xunto con outras proteínas asociadas, conforman o Complexo Celulosa Sintase (CCS) (McFarlane et al., 2014). Cada microfibra orixínase do enfeixamento e cristalización espontánea das cadeas de glucano que son secretadas polo CCS ao apoplasto. É probable que neste proceso de secreción, moléculas hemicelulosas e pectinas

queden atrapadas entre as microfibras (Cosgrove, 2005; Lampugnani et al., 2018).

As pectinas son un grupo diverso e complexo de polisacáridos interconectados e sintetizados no aparello de Golgi. Están compostas principalmente por tres polisacáridos: Homogalacturonano (HG), rhamnogalacturonano I (RG-I) e rhamnogalacturonano II (RG-II). O compoñente principal destes polisacáridos é o ácido galacturónico (GalA). En *Arabidopsis thaliana*, a pectina máis abundante é o HG (23%), seguida de RG-I (11%) e RG-II (8%). HG e RG-II presentan un esqueleto polimérico de  $\alpha(1,4)$ -GalA. RG-I consiste nun motivo repetido de  $\alpha(1,4)$ -GalA e  $\alpha(1,2)$ -rhamnosa. Estes esqueletos poliméricos poden presentar ramificacións de diferentes heteropolisacáridos ou oligosacáridos como  $\alpha(1,5)$ -arabinanos e  $\beta(1,4)$ -galactanos, así como distintos graos de acetilación e metilación. A complexidade química das pectinas supón a implicación na súa síntese dun amplo número de transferases, moitas delas aínda sen describir (Gigli-Bisceglia et al., 2019). As pectinas están interconectadas formando unha matriz de enlaces covalentes e non covalentes. Probablemente están conectadas de xeito covalente a través dos seus esqueletos centrais, como se suxeriu para HG e RG-I (Saffer, 2018). Por outra banda, os HGs transportados dende o aparello de Golgi á parede deesterifícanse de maneira selectiva, permitindo a formación de enlaces cruzados entre os grupos carboxilos resultantes vía  $\text{Ca}^{2+}$  e promovendo unha estrutura de xel (Hongo et al., 2012). RG-II pode presentar enlaces cruzados entre si, vía borato (Funakawa e Miwa, 2015). As pectinas están en íntimo contacto e interactúan amplamente coa celulosa e en menor medida coas hemicelulosas, principalmente a través das súas ramificacións, tanto por un bloqueo físico como por interaccións non covalentes (Gigli-Bisceglia et al., 2019). En conxunto, todos estes enlaces e interaccións dotan a matriz dunha maior rixidez permitindo estabilizar a estrutura da parede (Lampugnani et al., 2018). Desta maneira, as pectinas inflúen sobre a dinámica da parede mediante o control da súa flexibilidade e son, polo tanto, determinantes no crecemento e na proliferación celular. A variación na composición e modificación de pectinas entre distintas células e tecidos pode influír sobre diferentes dinámicas de crecemento que guían o desenvolvemento (Saffer, 2018).

En canto á sinalización celular, as pectinas destacan por ser dianas de ataque de moitos patóxenos. Os produtos da súa degradación son importantes elicitores nas respostas de defensa de plantas. A modificación e degradación controlada de pectinas é fundamental en procesos de maduración de froitos así como en procesos de abscisión e de separación de células (Gigli-Bisceglia et al., 2019). Poligalacturonases (PG) e pectato liases (PL) son enzimas degradantes de pectinas que interveñen na modulación destes procesos e durante o desenvolvemento e a morfoxénese, polo que alteran a estrutura da parede (Xiao et al., 2017).

As hemicelulosas son polisacáridos secretados ao apoplasto e sintetizados por glicosiltransferases localizadas na membrana do aparello de Golgi. A hemicelulosa máis abundante das paredes primarias de espermatófitas (excepto

gramíneas e familias próximas) é o XiG, que representa un 10-20% das hemicelulosas da parede primaria de dicotiledóneas como *Arabidopsis thaliana*. Presenta o mesmo esqueleto central que a celulosa,  $\beta(1,4)$ -glucano, pero diferénciase en que 3 de cada 4 residuos de glicosa (2 de cada 4 en monocotiledóneas comelínidas) presentan ramificacións laterais de xilosa. Á súa vez, a xilosa pode presentar substitucións de fucosa e galactosa. Estas ramificacións dotan o XiG de solubilidade. As ramificacións e modificacións que presentan evitan o enfeixamento lateral e a formación de microfibras, que si se observan na celulosa. A complexidade da biosíntese do XiG e das súas ramificacións implica a participación de moitas enzimas diferentes. Sintases da familia *Celulose Synthase-Like C* (CSLC) actúan como  $\beta(1,4)$ -glucano sintases (utilizando UDP-glicosa como substrato) e producen o esqueleto central. XiG-xilosiltransferases (XXTs) levan a cabo substitucións de xilosa no XiG (Scheller e Ulvskov, 2010; Gigli-Bisceglia et al., 2019). As cadeas de XiG poden atoparse atrapadas entre as microfibras de celulosa ou unirse á celulosa mediante pontes de hidróxeno *in vivo* especialmente en zonas hidrofóbicas, *i.e.*, nos puntos de enfeixamento lateral das microfibras de celulosa, constituíndo conexións XiG-celulosa cuxas modificacións probablemente afecten á rixidez da parede e desta forma ao crecemento celular (Zhang et al., 2016). Tamén se propuxeron enlaces covalentes entre XiG-celulosa (Shinohara et al., 2017) e XiG-pectinas (Popper e Fry, 2008). Outras hemicelulosas menos abundantes en espermatófitas en xeral, e *Arabidopsis thaliana* en concreto, son os xilanos e os mananos; excepto no caso de gramíneas e familias próximas, nas que os xilanos son a hemicelulosa máis abundante. Xilanos, mananos e XiGs, igual que as pectinas, presentan distintos graos de acetilación (Scheller e Ulvskov, 2010). A renovación de XiG parece xogar un papel na remodelación da parede e a expansión celular. En *Arabidopsis thaliana*, estes procesos están mediados por determinadas XiG-endotransglicosidasas/hidrolases (XTH) (Gigli-Bisceglia et al., 2019). Fragmentos de XiG liberados por degradación, de maneira semellante ás pectinas, funcionan como elicitores nas respostas de defensa fronte a patóxenos (Claverie et al., 2018).

## **2.2. Dinámica e función da parede celular primaria**

A parede primaria atópase sometida a estímulos do ambiente e ao control de programas de desenvolvemento. É unha estrutura o suficientemente forte como para resistir ás forzas de tensión xeradas pola presión de turxescencia. O crecemento celular ocorre acorde co balance entre a presión de turxescencia e as propiedades mecánicas da parede. Cando a célula crece, a parede estira de forma irreversible nun proceso de expansión mediado por cambios do seu pH que inflúen sobre a acción distensora de axentes modificantes como as expansinas. A proximidade física entre a membrana e a parede primaria permite unha rápida modulación da súa extensibilidade por vía de  $H^+$ -ATPases da membrana que inflúen sobre o pH da parede (Cosgrove, 2018).

O crecemento celular require unha modificación selectiva da estrutura da parede celular que relaxe a presión de turxescencia, permitindo a entrada de auga para facer medrar a célula até restaurar dita presión. Enténdense como "**afrouxamento**" os procesos moleculares que permiten este relaxamento e que determinan unha extensión irreversible da parede, o cal sempre precisa de intervención proteica; as expansinas serían os axentes afrouxantes mellor coñecidos. Por outra banda, enténdese como "**abrandamento**" os procesos que converten a parede en moldeable baixo forzas mecánicas (*i.e.* alteración da plasticidade e elasticidade), o que non significa necesariamente un maior crecemento celular (*e.g.* en estadios tardíos da maduración, moitos froitos abrandan a medida que as pectinas das súas paredes comezan a desintegrarse, sen que isto supoña crecemento). Plasticidade e extensibilidade implican deformacións irreversibles, mentres que a elasticidade implica deformacións reversibles (Cosgrove, 2018). A extensión da parede implica deslizar, separar e reorientar as microfibras de celulosa, e tanto o xiloglucano (XiG) como as pectinas parecen xogar un papel importante na regulación deste proceso (Zhang et al., 2016). Por outra banda, compoñentes coma as glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) tamén teñen certa influencia sobre o crecemento e morfoloxía da parede (Nguema-Ona et al., 2014).

O crecemento celular non só vén determinado por factores bioquímicos que remodelan a parede, senón que tamén depende de factores como a presión de turxescencia, a xeometría celular ou as células veciñas. As propiedades anisotrópicas entre diferentes zonas da parede de células individuais, ou entre paredes de células diferentes, son claves para orixinar a diversidade morfolóxica observada en células e tecidos de plantas. Conceptualizar e entender o impacto de todos estes factores no contexto tisular é fundamental para dilucidar a maneira na que se modula o crecemento durante a morfoxénese dos tecidos multicelulares (Bassel et al., 2014; Saffer, 2018).

### **2.3. Modelos estruturais da parede celular primaria**

Un dos primeiros modelos estruturais propostos entendía a parede celular primaria como unha complexa e única macromolécula, composta por polisacáridos e proteínas, na que os seus compoñentes estarían interconectados por enlaces covalentes, excepto as unións entre XiG-celulosa (Keegstra et al., 1973). Porén, dado que este modelo non explicaba a extracción secuencial dos polisacáridos da parede, xurdiron novos modelos coma o denominado "modelo multicapa" (*multicoat model*), no cal as hemicelulosas formarían a capa máis profunda e estreitamente enlazada, seguida de capas externas menos interconectadas e de maior facilidade de extracción, coma as pectinas. Outro modelo contemporáneo a este, coñecido como "modelo de rede pegañenta" (*sticky network model*), e baseado tamén nas interaccións non-covalentes, destacaba a posible importancia de "glucanos interconectantes" (*tethering glycans*) como elementos de interconexión entre microfibras de celulosa; chegou a converterse no modelo aceptado

de forma máis ampla durante varios anos (Cosgrove, 2000). En base a el, fóronse desenvolvendo estudos que suxerían a existencia dunha rede de microfibras de celulosa con enlaces cruzados non covalentes mediados por hemicelulosas (principalmente XiG) e que constituiría o soporte principal da parede primaria, embebido nunha matriz separada de pectinas (Carpita e Gibeaut, 1993). Segundo este modelo, a modificación de XiG ou da rede XiG-celulosa sería un dos principais mecanismos de control do crecemento da parede, a través da acción de expansinas- $\alpha$ , XiG-endotransglicosidasas ou  $\beta$ -1,4-endoglicanasas (Cosgrove, 2005).

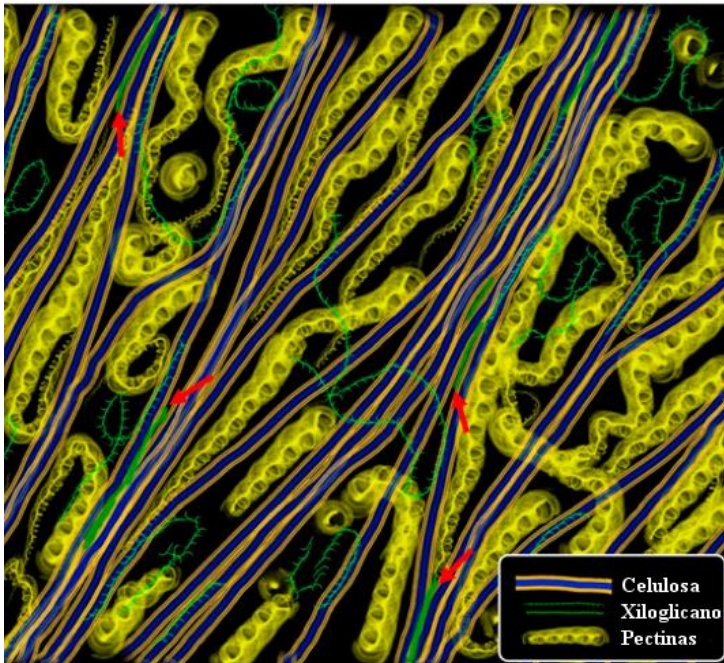
Con todo, estudos posteriores puxeron en dúbida este modelo: Mutantes de *Arabidopsis thaliana* sen XiG son viables e presentan un fenotipo de crecemento reducido ( Cavalier et al., 2008; Park e Cosgrove, 2012a). Estudos nos cales se realizou unha retirada enzimática de XiG (Park e Cosgrove, 2012b) e estudos de microscopía de forza atómica, nos que se analizaron os movementos de paredes primarias en expansión (Zhang et al., 2017), tamén cuestionan este modelo. Isto suxire que o papel das hemicelulosas na estruturación da parede celular non resulta ser tan esencial como se supuña inicialmente (Wang et al., 2015).

En contraste co modelo anterior, propúxose recentemente un modelo de parede celular primaria que consistiría nunha rede fibrilar interconectada vía un enfeixamento lateral, no que a transferencia de forzas entre as microfibras da parede ocorrería a través de unións estreitas celulosa-celulosa; zonas onde as microfibras de celulosa presentarían o referido enfeixamento lateral (Zhang et al., 2016; Daniel J. Cosgrove, 2018). Adicionalmente, algunhas destas unións celulosa-celulosa están mediadas por XiG, a través de pontes de hidróxeno unidas preferentemente a zonas hidrofóbicas. Isto converte estas unións en susceptibles a afrouxamentos da tensión de parede, mediante enzimas ou outras proteínas que selectivamente se dirixan a estes sitios e que inducirían unha rápida extensión irreversible das paredes (Park e Cosgrove, 2012b; Zhang et al., 2016).

Estudos recentes suxiren que o afrouxamento, o abrandamento e outras propiedades da parede celular son procesos independentes, que se atopan definidos por distintos aspectos da estrutura e, seguramente, por diferentes compoñentes da parede celular. Seguindo esta liña, sinálase que a mecánica de tensións da parede (producidas dentro do plano lamelar) depende principalmente das redes de celulosa, mentres que a mecánica de indentación (deformacións que se saen do plano lamelar) depende tanto das redes de celulosa coma do homogalacturonano. Polo tanto, as zonas de enfeixamento lateral celulosa-celulosa, serían puntos quentes biomecánicos, e o seu afrouxamento liberaría as tensións e permitiría a extensión irreversible da parede celular (Zhang et al., 2019).

En definitiva, o modelo de parede primaria actual describe unha parede cunha organización lamelar de redes microfibrilares de celulosa máis ou menos estables, rodeadas dunha matriz de polisacáridos metabolicamente máis activos. Cada lamela presenta microfibras dispostas paralelamente e interconectadas nalgúns puntos a través de

enfeixamentos laterais, formando unha reticulación anisótropa. En cada lamela a dirección das microfibras de celulosa varía, estando separadas entre si uns 40nm e embebidas nunha matriz de pectinas que estabilizan a súa mobilidade lateral. Hemicelulosas e pectinas estarían unidas en distinta proporción ás microfibras, sendo de maior importancia as unións pectina-celulosa. Hemicelulosas como o XiG intervirían nalgunhas das unións entre estas microfibras (Fig. 1) (Cosgrove, 2018; Zhang et al., 2019).



**Figura 1.** Modelo gráfico dunha lamela da parede primaria. As microfibras de celulosa están representadas con caras hidrofóbicas (azul) e caras hidrofílicas (laranja). O XiG (verde) atópase unido ás zonas hidrofóbicas das microfibras. As frechas vermellas indican zonas de enfeixamento lateral celulosa-celulosa nas que intervén o XiG. As pectinas (amarelo) ocupan o espazo entre microfibras e únense ás superficies hidrofílicas. Adaptado de Cosgrove, 2018.

#### 2.4. Efectos da alteración e disrupción de compoñentes da parede celular primaria

En condicións silvestres, as plantas en xeral e *Arabidopsis thaliana* en concreto, sofren modificacións da súa parede primaria. Unha vez segregadas ao apoplasto ou integradas na parede, tanto celulosa, hemicelulosas como pectinas poden ser modificadas *in vivo*.

En comparación cos demais compoñentes da parede celular, as pectinas degrádanse con maior facilidade ante situacións de estrés ambiental. Exemplo disto son a mobilización de carbohidratos dende as pectinas durante períodos de desnutrición ou a degradación de pectina inducida por patóxenos. Tanto pectinas intactas como fragmentos de pectina presentan receptores quinase na membrana plasmática, indicando que a integridade das pectinas está notablemente monitoreada polas células (Gigli-Bisceglia et al., 2019). A perda de función do xen *PGX1* resulta en hipocótilos máis curtos e a sobreexpresión de *PGX2* aumenta lixeiramente a lonxitude dos mesmos; ambos son xenes codificantes de poligalacturonases, o que indica que estas enzimas xogan un papel importante na modulación da dinámica e función da parede (Xiao et al., 2014; Xiao et al., 2017).

A inactivación artificial de *XXT1* e *XXT2*, dous xenes redundantes de *Arabidopsis thaliana* que codifican para a XiG-xilosiltransferase XXT, causa fenotipos sen XiG. Observouse que plántulas mutantes de *Arabidopsis thaliana* sen XiG (*xxt1xxt2*) presentaban pelos radicais anómalos e inchados, ademais de hipocótilos máis curtos. Plantas

*xxt1xx2* adultas carecen de XiG detectable e presentan fenotipos de crecemento reducido, tipicamente con rosetas de menor tamaño e pecíolos máis curtos, xunto con paredes celulares con máis plasticidade e elasticidade, pero menor extensibilidade; en comparación cos controis salvaxes (Park e Cosgrove, 2012a). Ademais, presentan alteracións na mecánica estomatal (Rui e Anderson, 2016), desorganización nos microtúbulos corticais, hipocótilos curtos (Xiao et al., 2016), irregularidade na disposición das microfibras de celulosa (Anderson et al., 2010) e unha resposta a pH ácido ou a expansina- $\alpha$  reducida. Todo isto posiblemente tamén indique un certo rol do XiG na modulación das propiedades biomecánicas da parede (Park e Cosgrove, 2012a). A expresión de *OsXXT1* en *Arabidopsis thaliana* rescata os defectos nos pelos radicais de mutantes *xxt1xx2*, indicando que os xenes *XXT* están altamente conservados (Gigli-Bisceglia et al., 2019).

A influencia do XiG sobre a extensibilidade podería deberse ao seu papel clave en zonas de enfeixamento lateral de microfibras de celulosa, consistindo nunha diana para proteínas que permitan o afrouxamento dos puntos quentes biomecánicos e que liberarían as tensións necesarias para permitir unha maior extensión irreversible da parede celular (Zhang et al., 2019). A ausencia de XiG, xunto coa aparición de mecanismos compensatorios, podería ser o motivo polo que se reduce a extensibilidade (Park e Cosgrove, 2012a). Estudos nos que se ensaiaron tratamentos combinados de hidrolases, que degradaban celulosa ou XiG, resultaron en alteracións na elasticidade e na plasticidade da parede pero non na extensibilidade. Conclúese que para afectar este parámetro, é precisa a acción de enzimas bifuncionais (e.g. Cel12A, unha  $\beta$ -1-4-endoglicanase de fungos) ou proteínas como expansinas- $\alpha$  que actúen selectivamente sobre XiG e celulosa, en zonas estruturalmente inaccesibles para outras enzimas; que se corresponderían con puntos quentes biomecánicos descritos anteriormente (Zhang et al., 2019).

A sobreexpresión de XiG-hidrolases (XTH31-XTH32) por si soa non ten efectos notorios sobre a extensibilidade da parede xa que é preciso un proceso de afrouxamento dos puntos quentes biomecánicos que require unha acción enzimática bifuncional (endoglicanase e celulase) ou de proteínas especializadas como as expansinas- $\alpha$  (Kaewthai et al., 2013; Park e Cosgrove, 2015). As alteracións de pectinas e XiG posiblemente sexan percibidas pola célula e poderían resultar en axustamentos compensatorios no programa de desenvolvemento (Park e Cosgrove, 2012a; Saffer, 2018).

### **3. OBXECTIVOS**

O principal obxectivo deste traballo é estudar diferentes modos de disrupción ou complementación inducible de compoñentes da parede celular, para caracterizar as respostas fenotípicas de *Arabidopsis thaliana* no marco teórico

dunha rede aparentemente redundante de XiG e pectinas. A tal fin, elaboráronse unha serie de liñas transxénicas e tratáronse de comprobar as seguintes hipóteses:

- O XiG ten efectos sobre a extensibilidade da parede.
- O debilitamento de pectinas pode levar a un maior crecemento celular.
- A disrupción combinada de XiG e pectinas aumenta o crecemento, ou ben frea o crecemento por activación dun mecanismo compensatorio que faga a parede máis ríxida.
- As redes de pectina e XiG son parcialmente redundantes.

Por outra banda, pretendeuse optimizar un protocolo de extracción e cuantificación de XiG, tanto para futuros estudos do grupo de investigación como para a análise de liñas transformadas neste traballo.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material vexetal e técnicas de cultivo

Como control silvestre e para a creación de liñas transxénicas empregouse o ecotipo Columbia (Col) de *Arabidopsis thaliana*. A liña mutante *xxt1xxt2* procedente do *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC) stock no. CS16349 empregouse tanto como control negativo como para a creación de liñas transxénicas. Todas as sementes, excepto as sementadas en terra, foron esterilizadas cun primeiro lavado de etanol ao 70% (v/v) e Tween ao 0,05% (v/v) durante 10min, e un segundo lavado durante 1min con etanol ao 100%. En todos os casos, as sementes foron estratificadas a 4°C durante polo menos 24h antes da xerminación.

### 4.2. Extracción de ARN, RT-PCR e clonación dos xenes de interese no vector pMDC7

Extraeuse ARN tanto a partir de follas como de flores de Col utilizando *Spectrum Plant Total RNA Kit* (Sigma-Aldrich). Cuantificouse a concentración de ARN utilizando o NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Todo isto realizouse seguindo as instrucións dos fabricantes.

Co fin de obter o ADN complementario (ADNc) ao ARNm extraído, procedeuse á súa retrotranscrición mediante RT-PCR. 500ng de ARN foron retrotranscritos a ADNc empregando *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific). Empregáronse cebadores específicos para amplificar por PCR os xenes *EXPA5* e *PGX2*

**Táboa 1.** *Secuencias dos cebadores tanto directo (D) como inverso (I).* utilizados para a amplificación dos xenes *EXPA5* e *PGX2*. Tamén se mostra a temperatura de anelamento (*Ta*) utilizada.

Xenes diana	Secuencia cebadores (5' → 3')	Ta utilizada
<i>PGX2</i>	D: CACCATGGTGTCCACTATCTCCGGT I: GATCACCGGATGCAAGACG	60°C
<i>EXPA5</i>	D: CACCATGGGAGTTTTAGTAATCTCGCTTCTC I: TTAATACCGAAACTGCCCTCCG	65°C

a partir do ADNc (Táboa 1). Tras electroforese extraeuse o ADN amplificado mediante *GeneJet Gel Extraction Kit* (Thermo Fisher Scientific).

Os xenes *EXPA5* e *PGX2* foron clonados no vector de entrada *pENTR/D-TOPO*, utilizando o *pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit* (Invitrogen). *XXT2* e *XTH31* xa se dispuñan clonados no vector de entrada *pENTR223*, ABRC stock no. G25215 (*XXT2*) e G24683 (*XTH31*).

Bacterias *E. coli* foron transformadas co plásmido de entrada resultante mediante un procedemento de choque térmico e logo cultivadas en placas de selección nun medio LB ao 2% (p/v), con agar ao 1,5% (p/v) e unha concentración final de kanamicina de 50µg/mL, e incubadas durante 24h a 37°C. As bacterias seleccionadas incubáronse nun medio LB líquido, igual ao anterior pero sen agar, en axitación a 200rpm, 37°C e durante 12-24h. Finalmente extraeuse o DNA plasmídico empregando *GeneJet Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific).

Para comprobar a inserción correcta de *EXPA5* no plásmido de entrada, realizouse unha electroforese tras a dixestión coa enzima de restrición TaqI. A inserción correcta de *PGX2* no plásmido de entrada foi comprobada por secuenciación polo grupo de investigación. No caso das construcións con *pENTR223* non foi necesario comprobar as insercións xa que os xenes viñan correctamente inseridos de fábrica.

Posteriormente estas construcións foron clonadas no plásmido de destino *pMDC7* mediante recombinación LR. As concentracións de todos os plásmidos en disolución foron medidas con NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) seguindo as instrucións dos fabricantes.

Para amplificar o vector de expresión resultante da LR, volvéronse transformar bacterias *E. coli* e incubáronse a 37°C durante 12-24h en placa de selección con medio LB ao 2% (p/v), con agar ao 1,5% (p/v) e 100µg/mL de espectinomicina. Procedeuse á incubación das bacterias seleccionadas nun medio LB líquido, igual ao anterior pero sen agar, en axitación a 200rpm, 37°C e durante 12-24h con espectinomicina á mesma concentración. A continuación, elaboráronse minipreps de todas as construcións (*pMDC7:PGX2*, *pMDC7:EXPA5*, *pMDC7:XXT2* e *pMDC7:XTH31*). Os plásmidos purificados *pMDC7:PGX2* e *pMDC7:EXPA5* foron comprobados por electroforese tras dixestión coas enzimas de restrición Sall e SacI, respectivamente.

### **4.3. Transformación de *Agrobacterium* e *Arabidopsis thaliana***

A transformación de *Agrobacterium* realizouse por electroporación cos plásmidos mencionados, empregando un MicroPulser (Biorad). As bacterias transformadas foron seleccionadas en placas con medio 2X YT deshidratado ao 3,1% (p/v), agar ao 1,5% (p/v) e rifampicina e espectinomicina a unha concentración final de 100µg/mL cada unha. As placas foron incubadas durante 48h. Tras selección, cultivouse un inóculo de cada selección en 5mL de medio líquido 2X YT, igual ao anterior pero sen agar. Incubouse en axitación a 200rpm, 28°C e durante 12-24h.

Posteriormente, reinoculáronse 2,5mL do cultivo sobre 250mL de medio líquido 2X YT, igual ao anterior pero sen rifampicina, e voltouse incubar.

As construcións mencionadas foron transformadas en Col e *xt1xt2* mediante a técnica de inmersión floral. Como medio de infiltración empregáronse 250mL dunha disolución de sacarosa ao 5% (p/v) e Silwet L-77 ao 0,02% (v/v). Tras centrifugación dos cultivos de *Agrobacterium*, as células precipitadas se resuspenderon no medio de infiltración e realizouse a inmersión floral somerxendo as flores neste medio. Transformáronse 8 plantas para cada liña transxénica.

#### **4.4. Selección das liñas transxénicas**

Tras a maduración das sementes, procedeuse á selección das plantas transformadas da T<sub>0</sub>. Xermináronse sobre placas de selección con 25µg/mL de higromicina nun medio con 2,2g/L de sales MS (Murashige and Skoog), 0,5g/L de hidrato de MES (ácido 2-N-morfolino-etanesulfónico), con agar ao 0,8% (p/v) e pH axustado a 5,8 con KOH. Foron crecidas a 22°C cun fotoperíodo de 16h luz/8h escuridade durante 7-10 días en crecemento horizontal. As plántulas transformadas resultantes da selección foron transferidas a terra.

Para a identificación de mutantes T<sub>1</sub> cunha soa inserción de T-DNA xermináronse en placa as sementes procedentes de distintas liñas T<sub>1</sub> sobre un medio igual ao anterior e baixo as mesmas condicións de crecemento, para observar a segregación mendeliana. Consideráronse dunha soa inserción a aquelas liñas cun 75% de plántulas T<sub>2</sub> resistentes.

#### **4.5. Experimentos de indución por estradiol**

Para os experimentos de indución por estradiol e análise da lonxitude de hipocótilos etiolados, as sementes foron xerminadas e cultivadas en placas de Petri sobre un medio con 2,2g/L de sales MS (Murashige and Skoog), 0,5g/L de hidrato de MES (ácido 2-N-morfolino-etanesulfónico), con agar ao 1,5% (p/v) e pH axustado a 5,8 con KOH. DMSO ou estradiol foron engadidos cunha concentración final de 5µM. O material vexetal foi exposto a 4-5h de luz para activar a xerminación e logo mantido durante 5-6 días en escuridade, a 22°C e en crecemento vertical. A lonxitude dos hipocótilos de plántulas etioladas en condicións de crecemento vertical mediuse con SmartRoot en ImageJ. Estes hipocótilos foron colleitados en etanol ao 70% (v/v) e posteriormente observáronse e fotografáronse no microscopio motorizado LEICADM6000+LEICACTR6000. As imaxes foron editadas con Gimp 2.8.22.

Para o experimento de indución por estradiol e posterior cuantificación de XiG, xermináronse e crecéronse plántulas transformadas cunha soa inserción en matraces Erlenmeyer de 25mL; con 6mL de medio líquido como o descrito arriba pero sen agar, con estradiol ou con DMSO cunha concentración final de 10µM. Estes cultivos realizáronse en axitación leve (90rpm).

#### 4.6. Extracción e cuantificación de xiloglucano

Colleítáronse as plántulas (procedentes do experimento de indución en medio de cultivo líquido) a primeira hora da mañá. Separáronse as vainas das sementes para evitar a súa interferencia na medición colorimétrica e pesáronse 100mg de material vexetal por mostra. Seguidamente o material foi conxelado en N<sub>2</sub> líquido e homoxeinizado, para logo ser lavado unha vez con etanol de 80°, dúas veces con etanol de 100° e un lavado con acetona. Todos os lavados foron seguidos de centrifugación a 5000g e descarte do sobrenadante.

As mostras lavadas foron secadas a temperatura ambiente para finalmente ser tratadas con KOH a unha concentración de 240g/L, en axitación suave (90rpm) a 37°C durante 12h. Posteriormente procedeuse a unha centrifugación a 5000g e retirada do sobrenadante (co XiG en disolución) para a súa neutralización con ácido acético glacial.

A tintura para o ensaio colorimétrico realizouse en base a protocolos procedentes doutros estudos (Kooiman, 1960, Pauly et al., 1999) e consistiu na mistura de 40µL de mostra neutralizada sen diluír, 30µL de KI (6,6g/L) e 200µL de NaSO<sub>4</sub> (0,2g/mL). As absorbancias foron medidas a 640nm con NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) ou cun espectrofotómetro para microplaca (Thermo Fisher Scientific), seguindo as instrucións dos fabricantes.

#### 4.7. Análise estatística

A significancia estatística foi avaliada utilizando tests t de Student. As diferenzas significativas son expresadas cun valor de \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$ . As gráficas e as análises estatísticas foron realizadas co programa GraphPad Prism 8.0.

### 5. RESULTADOS E DISCUSIÓN

#### 5.1. Obtención de liñas transxénicas de sobreexpresión inducible por estradiol

Para analizar a resposta á disrupción da parede primaria, os xenes *PGX2* e *EXPA5*, obtidos por RT-PCR, e *XXT2* e *XTH31*, procedentes do *Arabidopsis Biological Resource Center*, foron clonados no vector *pMDC7*; un vector de sobreexpresión inducible por estradiol derivado de *per8* (Curtis e Grossniklaus, 2003). A elección destes xenes deriva do seu potencial papel disruptor da integridade estrutural da parede primaria. *PGX2* codifica para unha poligalacturonase cuxa sobreexpresión ten potenciais efectos fenotípicos debido á afectación da rede de pectinas (Xiao et al., 2017). *EXPA5* codifica unha expansina- $\alpha$  con potencial debilitante das unións XiG-pectinas e cuxa sobreexpresión ten mostrado un crecemento incrementado en células da raíz (Xu et al., 2014). *XXT2* codifica unha XiG-xilosiltransferase necesaria para a formación de XiG (Park e Cosgrove, 2012a). *XTH31* codifica unha XiG-hidrolase cuxa sobreexpresión ten mostrado leves reducións no crecemento xusto despois da xerminación

(Kaewthai et al., 2013). Os efectos sobre a parede das liñas *pMDC7:EXPA5* sobre Col e *pMDC:XTH31* sobre Col non foron analizadas neste estudo. Xunto coas demais liñas, servirán para futuros experimentos de cruces e mutantes combinados.

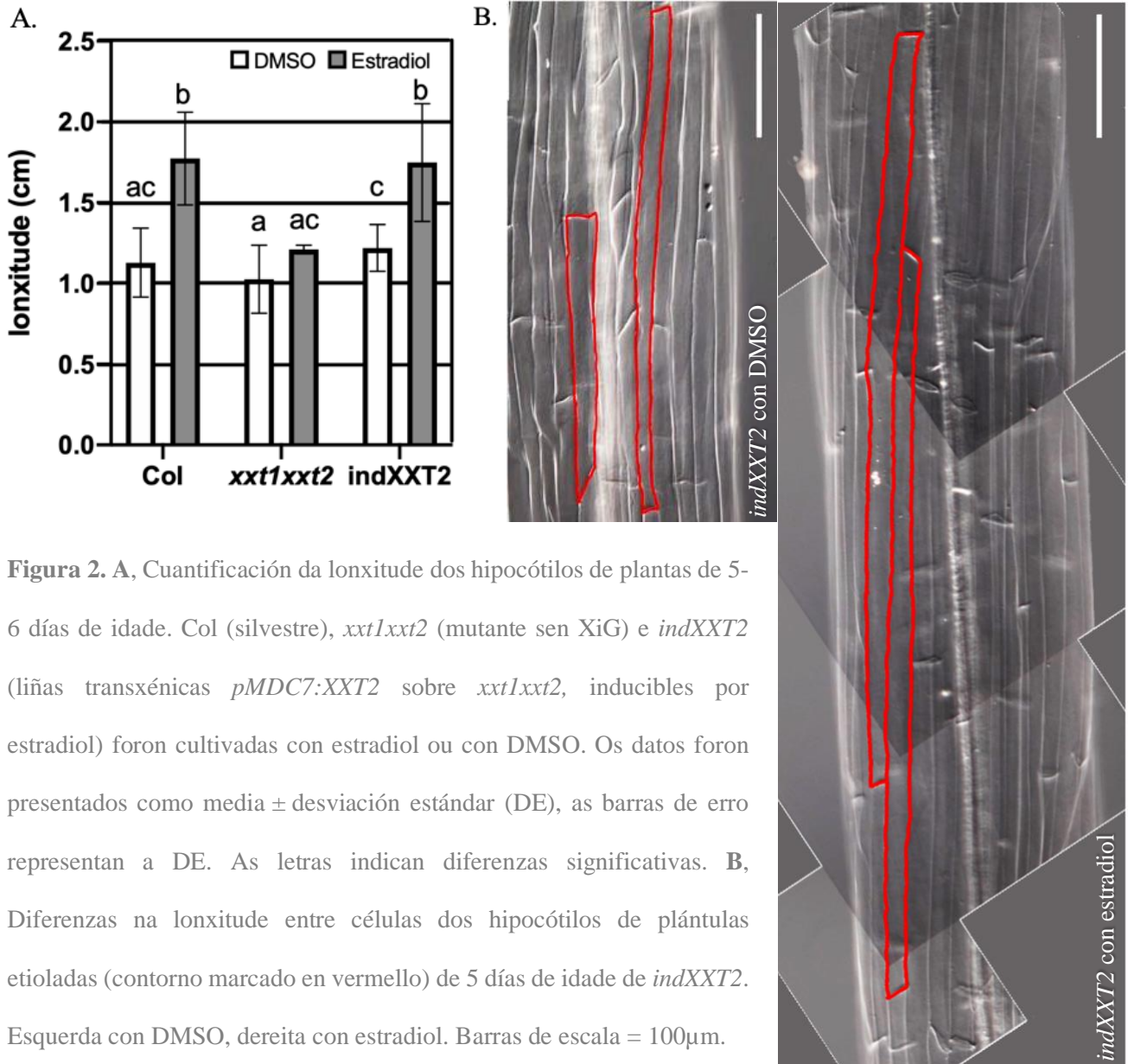
As liñas transxénicas da T<sub>1</sub> obtidas foron: 8 liñas de *pMDC7:PGX2* sobre Col e 7 sobre *xxt1xxt2*, 8 de *pMDC7:EXPA5* sobre Col, 12 de *pMDC7:XXT2* sobre *xxt1xxt2* (das cales se identificaron 3 liñas cunha soa inserción) e 11 de *pMDC7:XTH31* sobre Col (das cales se identificaron 4 liñas cunha soa inserción).

## **5.2. Efectos sobre a lonxitude dos hipocótilos da complementación inducida *pMDC7:XXT2* sobre *xxt1xxt2***

Para analizar o papel do XiG na parede celular, comparáronse as lonxitudes de hipocótilos de plántulas etioladas das liñas transxénicas dunha soa inserción *pMDC7:XXT2* sobre *xxt1xxt2*, con Col como control positivo (con niveis normais de XiG) e *xxt1xxt2* como control negativo (mutante sen XiG) (Fig. 2A). As plántulas foron crecidas con DMSO (control) ou estradiol. O obxectivo deste experimento foi intentar restaurar a produción de XiG no mutante sen XiG *xxt1xxt2* mediante a expresión inducida de *XXT2*. Os resultados mostran diferenzas significativas claras ( $***P<0,001$ ) entre plantas transxénicas *pMDC7:XXT2* sobre *xxt1xxt2* (*indXXT2*) crecidas con estradiol e as crecidas con DMSO. Tamén destacan as diferenzas significativas ( $***P<0,001$ ) entre *indXXT2* con estradiol e o control negativo *xxt1xxt2*. Aprécianse ademais diferenzas significativas ( $***P<0,001$ ) entre *indXXT2* con DMSO e Col con estradiol. Sorprendentemente Col con DMSO dá uns resultados anormalmente baixos.

De xeito engadido obsérvanse diferenzas claras ao microscopio (>10%) na lonxitude das células do hipocótilo das plántulas etioladas de 6 días de idade, entre liñas transxénicas *indXXT2* con estradiol ou con DMSO (Fig. 2B).

O debilitamento forte da parede celular nas liñas sen XiG (neste caso, *indXXT2* con DMSO e *xxt1xxt2*) produce un fenotipo de hipocótilos curtos (Xiao et al., 2016). Neste sentido, os resultados serían consistentes coas predicións teóricas, o que podería indicar unha indución do casete de expresión e unha complementación exitosas. Sen embargo, os resultados do control positivo non encaixan. Isto pode deberse a que as sementes de Col eran vellas e á consecuente taxa baixa de xerminación, resultando nuns valores mostrais moi baixos ( $n\leq 7$ ) en comparación cos valores mostrais de *indXXT2* ( $n\geq 18$ ). Podería deberse tamén a algún efecto químico descoñecido do estradiol ou a que a placa de Col con estradiol tivese unhas condicións de crecemento lixeiramente distintas (diferenzas de humidade, firmeza do agar, entrada de luz, etc.). Polo tanto, non se pode confirmar que estivese habendo algún tipo de efecto fenotípico por motivo da expresión de *XXT*. En definitiva, non podemos comprobar ao completo a hipótese de que o XiG estea xogando algún papel na extensibilidade da parede e influíndo no crecemento celular.



**Figura 2.** **A,** Cuantificación da lonxitude dos hipocótilos de plantas de 5-6 días de idade. Col (silvestre), *xxt1xxt2* (mutante sen XiG) e *indXXT2* (liñas transxénicas *pMDC7:XXT2* sobre *xxt1xxt2*, inducibles por estradiol) foron cultivadas con estradiol ou con DMSO. Os datos foron presentados como media  $\pm$  desviación estándar (DE), as barras de erro representan a DE. As letras indican diferenzas significativas. **B,** Diferenzas na lonxitude entre células dos hipocótilos de plántulas etioladas (contorno marcado en vermello) de 5 días de idade de *indXXT2*. Esquerda con DMSO, dereita con estradiol. Barras de escala = 100 $\mu$ m.

### 5.3. Cuantificación de XiG en liñas transxénicas *pMDC7:XXT2* sobre *xxt1xxt2*

A posta a punto dun protocolo de extracción e tintura de XiG permitiu a comprobación do método de transformación. Utilizáronse dúas liñas transxénicas *pMDC7:XXT2* sobre *xxt1xxt2* dunha soa inserción (3 e 8), susceptibles de producir incrementos medibles nos contidos de XiG en exposición a estradiol. A tal fin, primeiro se elaborou unha recta patrón a partir de concentracións coñecidas de XiG e observouse unha resposta lineal na absorbancia ( $R_2= 0,9548$ ). Por outra banda, efectuouse o procedemento de extracción de XiG a partir de plántulas de Col, de *xxt1xxt2* e das liñas transxénicas *pMDC7:XXT2* sobre *xxt1xxt2*, para posterior análise colorimétrica; o extracto de *xxt1xxt2* foi utilizado como branco asumindo que tiña unha concentración de XiG nula. Os valores de absorbancia obtidos permitiron extrapolar as concentracións estimadas, representadas na Táboa 2. Estes resultados demostran o éxito do método de extracción e tintura, e ademais, suxiren que as liñas transxénicas cunha soa inserción *pMDC7:XXT2* producen incrementos medibles en XiG debido á indución por estradiol, aínda que non

chegan aos valores do silvestre (Col). En cambio, os mutantes sen XiG ou as liñas transxénicas non inducidas, presentan valores de absorbancia baixos, asociados á ausencia de XiG.

**Táboa 2.** Resultados do experimento de cuantificación de XiG. 3 e 8 son mostras de dúas liñas

transxénicas distintas de *pMDC7:XXT2* sobre *xxt1xxt2* que foron cultivadas con DMSO (D) ou estradiol (E).

Liña	[XiG] estimada ( $\mu\text{g/mL}$ )
Col	201,92
indXXT2-3E	69,71
indXXT2-8E	52,88
indXXT2-3D	24,04
indXXT2-8D	-14,42*

\*O valor negativo débese á normalización da absorbancia con respecto ao branco (extracto de *xxt1xxt2*).

#### 5.4. Efectos da expresión inducida *indPGX2* sobre *Col* e *xxt1xxt2* sobre a lonxitude dos hipocótilos

Para analizar o efecto de perturbacións moderadas da rede XiG-pectinas, empregouse a sobreexpresión inducida da poligalacturonase PGX2. Comparáronse as plántulas etioladas de 6 días de idade, de liñas transxénicas *pMDC7:PGX2* sobre *Col* e sobre *xxt1xxt2*, cos controis *Col* e *xxt1xxt2*, respectivamente. As plántulas foron cultivadas con DMSO ou estradiol. As liñas transxénicas utilizadas tiñan un número descoñecido de insercións, podendo ser isto unha explicación para a variación das lonxitudes entre as mesmas.

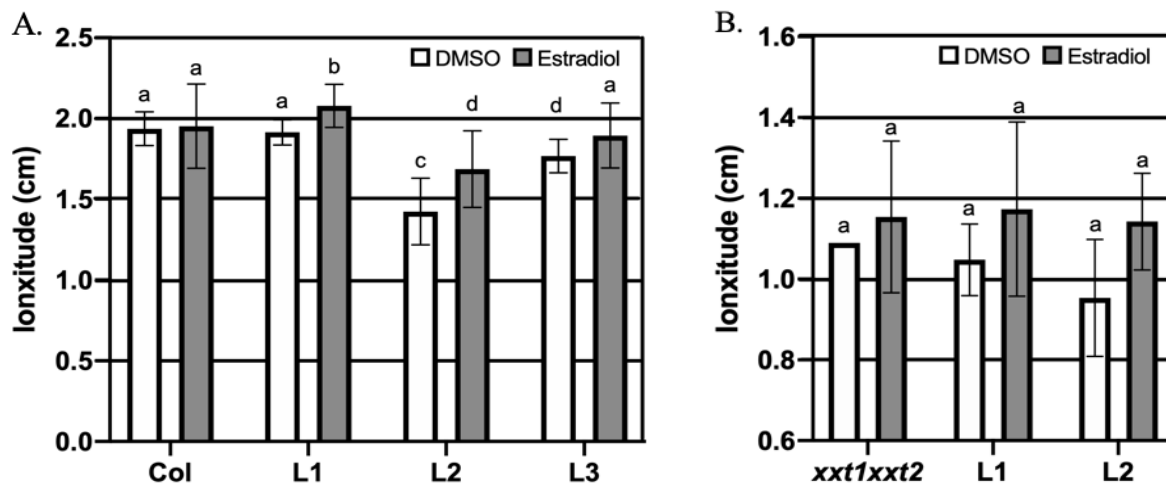
No caso de *pMDC7:PGX2* sobre *Col* obsérvanse diferenzas significativas entre todas as liñas transxénicas crecidas con estradiol fronte ás que se creceron con DMSO (L1: \*\*P=0,0064; L2: \*\*P=0,0096; L3: \*P=0,0478) (Fig. 3A).

Probablemente isto indique un éxito na indución da expresión de PGX2, que produciría o afrouxamento da parede celular e favorecería a extensibilidade. Estes resultados son consistentes coas conclusións doutros estudos similares nos que marcaxes de activación (*activation tagging*) de PGX2 en *Col*, que implicaban a sobreexpresión deste xen, producían hipocótilos un pouco máis longos (Xiao et al., 2017). Polo tanto, confirmaríase a hipótese de que este debilitamento moderado da parede celular está asociado a un maior crecemento celular.

No caso das liñas *pMDC7:PGX2* sobre *xxt1xxt2*, non se observaron diferenzas significativas entre os tratamentos (L1: P=0,2785; L2: P=0,0632) (Fig. 3B). Aínda así, as mostras crecidas con estradiol presentan lonxitudes lixeiramente maiores. Cabe destacar que os valores mostrais foron extremadamente baixos ( $n \leq 6$ ), polo que non se pode chegar a ningunha conclusión clara. En xeral, en todos os experimentos, as sementes do control *xxt1xxt2* ou as transxénicas cun fondo *xxt1xxt2* mostraron taxas de xerminación moi baixas, posiblemente debido á falta de XiG que produciría algún efecto descoñecido. Á vista dos resultados, non se pode comprobar a hipótese de que a perturbación combinada da rede XiG-pectinas dificultase máis o crecemento por activación dun posible efecto compensatorio que aumente a rixidez da parede. Si se pode intuír que este debilitamento engadido podería producir

unha maior extensibilidade da parede, e polo tanto, maior crecemento dos hipocótilos inducidos (a pesar de que o control *xxt1xxt2* tamén mostre estas diferenzas). Para comprobar cal das hipóteses plantexadas podería ser correcta (crecemento maior por un debilitamento maior da parede, ou ben crecemento menor por activación dun mecanismo compensatorio) será preciso optimizar o experimento, por exemplo con sementes máis frescas que den taxas de xerminación maiores.

Os resultados agardados das liñas inducibles sobre un fondo *xxt1xxt2* deberían ser consistentes con estudos *in vitro* nos que se observa unha maior extensibilidade da parede en mutantes *xxt1xxt2* (en comparación co silvestre) cando a rede de pectinas se degrada enzimaticamente ou se modifica con quelantes de  $Ca^{2+}$  (Park e Cosgrove, 2012a). O que podería suxerir tamén que en ausencia de XiG as pectinas xogan un papel máis importante na manutención da rixidez, soporte e dinámica da parede, exercendo un efecto compensatorio. Existen varias evidencias noutros estudos que apoian a hipótese dos mecanismos compensatorios da rede XiG-pectinas: plántulas *xxt1xxt2* etioladas teñen unha moi baixa proporción de residuos de rhamnosa substituídos cunha cadea lateral (Cavalier et al., 2008), indicando que en ausencia de XiG a estrutura de RG-I é remodelada en prol dun efecto compensatorio (Saffer, 2018); de xeito análogo, plantas con niveis anormalmente baixos de HG presentan XiGs máis ríxidos, suxerindo que o XiG tamén podería ser modificado para adaptarse aos defectos na función das pectinas (Phyo et al., 2017).



**Figura 3.** Cuantificación da lonxitude de hipocótilos de plántulas etioladas de 6 días de idade. Os datos foron presentados como media  $\pm$  desviación estándar (DE), as barras de erro representan a DE. As letras indican diferenzas significativas. **A**, Col (silvestre) e L1/L2/L3 (distintas liñas transxénicas *pMDC7:PGX2* sobre *Col*) foron cultivadas con estradiol ou con DMSO. **B**, *xxt1xxt2* (mutante sen XiG) e L1/L2 (distintas liñas transxénicas *pMDC7:PGX2* sobre *xxt1xxt2*) foron cultivadas con estradiol ou con DMSO.

## 6. CONCLUSIÓNS

Á vista dos resultados, non podemos comprobar completamente a hipótese de que o XiG estea xogando algún papel na extensibilidade da parede e que inflúa no crecemento celular, pero si observamos diferenzas significativas claras

no crecemento de hipocótilos etiolados, entre mutantes sen XiG e liñas complementadas, que indican posibles efectos do XiG sobre a extensibilidade. Confírmase a hipótese de que o debilitamento moderado da rede de pectinas leva a un crecemento de hipocótilos etiolados significativamente maior respecto ao silvestre. Sen embargo, non se obtiveron resultados congruentes sobre a disrupción combinada de XiG e pectinas. Si foi implementado con éxito un protocolo de extracción e cuantificación de XiG.

En definitiva, a obtención exitosa de liñas transxénicas de expresión inducible por estradiol, servirá para futuros cruces que xeren mutantes combinados con maiores efectos disruptores sobre a parede e que axuden a dilucidar a función dos seus compoñentes. Xunto a isto, será preciso investigar a síntese e modificación da parede e a maneira na que responde fronte a estímulos do desenvolvemento e do ambiente, para poder comprender mellor a súa estrutura e a regulación do seu crecemento.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Albersheim, P. (Ed.), 2011. Plant cell walls: from chemistry to biology. Garland Science, New York, NY.
- Anderson, C.T., Carroll, A., Akhmetova, L., Somerville, C., 2010. Real-Time Imaging of Cellulose Reorientation during Cell Wall Expansion in Arabidopsis Roots. *Plant Physiol.* 152, 787–796.
- Bassel, G.W., Stamm, P., Mosca, G., Barbier de Reuille, P., Gibbs, D.J., Winter, R., Janka, A., Holdsworth, M.J., Smith, R.S., 2014. Mechanical constraints imposed by 3D cellular geometry and arrangement modulate growth patterns in the Arabidopsis embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 8685–8690.
- Carpita, N.C., Gibeaut, D.M., 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3, 1–30.
- Cavalier, D.M., Lerouxel, O., Neumetzler, L., Yamauchi, K., Reinecke, A., Freshour, G., Zobotina, O.A., Hahn, M.G., Burgert, I., Pauly, M., Raikhel, N.V., Keegstra, K., 2008. Disrupting Two *Arabidopsis thaliana* Xylosyltransferase Genes Results in Plants Deficient in Xyloglucan, a Major Primary Cell Wall Component. *Plant Cell* 20, 1519–1537.
- Claverie, J., Balacey, S., Lemaître-Guillier, C., Brulé, D., Chiltz, A., Granet, L., Noirot, E., Daire, X., Darblade, B., Héloir, M.-C., Poinssot, B., 2018. The Cell Wall-Derived Xyloglucan Is a New DAMP Triggering Plant Immunity in *Vitis vinifera* and *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 9, 1725.
- Cosgrove, D.J., 2018. Diffuse Growth of Plant Cell Walls. *Plant Physiol.* 176, 16–27.
- Cosgrove, D.J., 2005. Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 850–861.
- Cosgrove, D.J., 2000. Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiol. Biochem.* 38, 109–124.
- Curtis, M.D., Grossniklaus, U., 2003. A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis

- of Genes in Planta. *Plant Physiol.* 133, 462–469.
- Funakawa, H., Miwa, K., 2015. Synthesis of borate cross-linked rhamnogalacturonan II. *Front. Plant Sci.* 6.
- Gigli-Bisceglia, N., Engelsdorf, T., Hamann, T., 2019. Plant cell wall integrity maintenance in model plants and crop species-relevant cell wall components and underlying guiding principles. *Cell. Mol. Life Sci.*
- Hongo, S., Sato, K., Yokoyama, R., Nishitani, K., 2012. Demethylesterification of the Primary Wall by PECTIN METHYLESTERASE35 Provides Mechanical Support to the *Arabidopsis* Stem. *Plant Cell* 24, 2624–2634.
- Kaewthai, N., Gendre, D., Eklöf, J.M., Ibatullin, F.M., Ezcurra, I., Bhalerao, R.P., Brumer, H., 2013. Group III-A *XTH* Genes of *Arabidopsis* Encode Predominant Xyloglucan Endohydrolases That Are Dispensable for Normal Growth. *Plant Physiol.* 161, 440–454.
- Keegstra, K., Talmadge, K.W., Bauer, W.D., Albersheim, P., 1973. The Structure of Plant Cell Walls: III. A Model of the Walls of Suspension-cultured Sycamore Cells Based on the Interconnections of the Macromolecular Components. *Plant Physiol.* 51, 188–197.
- Kooiman, P., 1960. A method for the determination of amyloid in plant seeds. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 79,
- Lampugnani, E.R., Khan, G.A., Somssich, M., Persson, S., 2018. Building a plant cell wall at a glance. *J. Cell Sci.* 131, jcs207373.
- McFarlane, H.E., Döring, A., Persson, S., 2014. The Cell Biology of Cellulose Synthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65, 69–94.
- Nguema-Ona, E., Vicré-Gibouin, M., Gotté, M., Plancot, B., Lerouge, P., Bardor, M., Driouich, A., 2014. Cell wall O-glycoproteins and N-glycoproteins: aspects of biosynthesis and function. *Front. Plant Sci.* 5.
- Park, Y.B., Cosgrove, D.J., 2015. Xyloglucan and its Interactions with Other Components of the Growing Cell Wall. *Plant Cell Physiol.* 56, 180–194.
- Park, Y.B., Cosgrove, D.J., 2012a. Changes in cell wall biomechanical properties in the xyloglucan-deficient *xxt1/xxt2* mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 158, 465–475.
- Park, Y.B., Cosgrove, D.J., 2012b. A Revised Architecture of Primary Cell Walls Based on Biomechanical Changes Induced by Substrate-Specific Endoglucanases. *Plant Physiol.* 158, 1933–1943.
- Pauly, M., Albersheim, P., Darvill, A., York, W.S., 1999. Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. *Plant J.* 20, 629–639.
- Phyo, P., Wang, T., Xiao, C., Anderson, C.T., Hong, M., 2017. Effects of Pectin Molecular Weight Changes on the Structure, Dynamics, and Polysaccharide Interactions of Primary Cell Walls of *Arabidopsis thaliana* : Insights from Solid-State NMR. *Biomacromolecules* 18, 2937–2950.

- Popper, Z.A., Fry, S.C., 2008. Xyloglucan–pectin linkages are formed intra-protoplasmically, contribute to wall-assembly, and remain stable in the cell wall. *Planta* 227, 781–794.
- Rui, Y., Anderson, C.T., 2016. Functional Analysis of Cellulose and Xyloglucan in the Walls of Stomatal Guard Cells of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 170, 1398–1419.
- Saffer, A.M., 2018. Expanding roles for pectins in plant development: Pectins and plant development. *J. Integr. Plant Biol.* 60, 910–923.
- Scheller, H.V., Ulvskov, P., 2010. Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 263–289.
- Shinohara, N., Sunagawa, N., Tamura, S., Yokoyama, R., Ueda, M., 2017. The plant cell-wall enzyme AtXTH3 catalyses covalent cross-linking between cellulose and cello-oligosaccharide. *Sci. Rep.* 7, 46099.
- Wang, T., Park, Y.B., Cosgrove, D.J., Hong, M., 2015. Cellulose-Pectin Spatial Contacts Are Inherent to Never-Dried *Arabidopsis* Primary Cell Walls: Evidence from Solid-State Nuclear Magnetic Resonance. *Plant Physiol.* 168, 871–884.
- Xiao, C., Barnes, W.J., Zamil, M.S., Yi, H., Puri, V.M., Anderson, C.T., 2017. Activation tagging of *Arabidopsis* POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION2 promotes hypocotyl elongation, leaf expansion, stem lignification, mechanical stiffening, and lodging. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 89, 1159–1173.
- Xiao, C., Somerville, C., Anderson, C.T., 2014. POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION1 Functions in Cell Elongation and Flower Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26, 1018–1035.
- Xiao, C., Zhang, T., Zheng, Y., Cosgrove, D.J., Anderson, C.T., 2016. Xyloglucan Deficiency Disrupts Microtubule Stability and Cellulose Biosynthesis in *Arabidopsis*, Altering Cell Growth and Morphogenesis. *Plant Physiol.* 170, 234–249.
- Xu, P., Cai, X.-T., Wang, Y., Xing, L., Chen, Q., Xiang, C.-B., 2014. HDG11 upregulates cell-wall-loosening protein genes to promote root elongation in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 65, 4285–4295.
- Zablackis, E., Huang, J., Muller, B., Darvill, A.G., Albersheim, P., 1995. Characterization of the Cell-Wall Polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* Leaves. *Plant Physiol.* 107, 1129–1138.
- Zhang, T., Tang, H., Vavylonis, D., Cosgrove, D.J., 2019. Disentangling loosening from softening: insights into primary cell wall structure. *Plant J.* 100, 1101–1117.
- Zhang, T., Vavylonis, D., Durachko, D.M., Cosgrove, D.J., 2017. Nanoscale movements of cellulose microfibrils in primary cell walls. *Nat. Plants* 3, 17056.
- Zhang, T., Zheng, Y., Cosgrove, D.J., 2016. Spatial organization of cellulose microfibrils and matrix polysaccharides in primary plant cell walls as imaged by multichannel AFM. *Plant J.* 85, 179–192.