



UCH-FC

DOC-BMCM

M 315

e. 1

Participación *in vivo* de los transportadores  
de nucleótidos azúcar de aparato de Golgi en la  
biosíntesis de hemicelulosas y pectinas de  
*Arabidopsis thaliana*

Entrega a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de  
Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y  
Neurociencias

Facultad de Ciencias  
por  
Lorena Marchant Gutiérrez  
Noviembre, 2004

Director de Tesis: Dr. Ariel Orellana  
Co-Director de Tesis: Dr. Herman Silva

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION  
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

LORENA MARCHANT GUTIÉRREZ

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el exámen de Defensa de Tesis rendido el día 18 de Noviembre del 2004.

Director de Tesis  
Dr. Ariel Orellana L.



Co-Director de Tesis  
Dr. Herman Silva

Comisión de Evaluación de la Tesis  
Dr. Luz María Pérez

Dr. Loreto Holuigue

Dr. Victor Cifuentes

*Dedicado a quienes ocupan mi mente, dan  
sentido a mis emociones y motivan mi vida:*

*mis padres, Judith y Valentín,  
mi amado Claudio,  
mi hijita Kiara  
y mi amiga Lorena.*

Mis más sinceros agradecimientos:

A Ariel por ser mi tutor y contribuir en mi formación como científico, a Herman por haber sido mi profesor, mi guía y mi amigo. Agradezco, además, al Dr. Paul Knox y a la Dra. Elena Alvarez-Buylla por recibirme en sus laboratorios de la Universidad de Leeds en Inglaterra y de la Universidad Autónoma de México respectivamente, donde realicé parte de este trabajo. A los doctores Paul Dupree, Lee Meissel, Liliana Cardemil y Michael Handford por su valiosa y enriquecedora discusión que permanentemente fue contribuyendo a enriquecer el resultado final de esta tesis doctoral.

A Francisca Reyes por su apoyo profesional, cariño y por continuar con este trabajo, empresa en la cual le deseo el mejor de los éxitos.

Muy especialmente quiero agradecer a Anita Mercado quien es un ejemplo de generosidad, buena voluntad y amistad a toda prueba. ¡Gracias Anita, eres la mejor!

Vaya un reconocimiento a todos los integrantes y ex-integrantes del grupo de Ariel y del laboratorio de Genética Molecular Vegetal, en especial a Susana, Marcelo, Ricardo, Alex, Roberto, Barbara, Lorena y Viviana por compartir el día a día durante tanto tiempo.

Agradezco finalmente a todas las instituciones que hicieron posible la realización de este trabajo a través de su apoyo económico, sin el cual, hubiese resultado considerablemente más difícil la obtención de este grado académico: Fundación Andes, Conicyt, Fondecyt, Instituto Milenio y Mecesup.

## INDICE DE MATERIAS

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
1. Función y composición de la pared celular vegetal	<b>5</b>
2. Biosíntesis de hemicelulosas y pectinas	<b>6</b>
3. Mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i> : Una estrategia para estudiar la participación de los transportadores de UDP-glucosa/UDP-galactosa en la síntesis de polisacáridos de pared celular.	<b>9</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>12</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>12</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>12</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>13</b>
1. Material Biológico	<b>13</b>
2. Plásmidos	<b>14</b>
3. Partidores	<b>15</b>
4. Anticuerpos	<b>17</b>
5. Reactivos	<b>18</b>
6. Técnicas generales de Biología Molecular	<b>19</b>
6.1. Preparación de células competentes de <i>Echerichia Coli</i>	<b>19</b>
6.2. Transformación de células competentes de <i>Echerichia Coli</i>	<b>19</b>
6.3. Preparación de DNA plasmidial	<b>20</b>
6.4. Electroforesis de DNA	<b>20</b>
6.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	<b>21</b>
7. Obtención de mutantes insercionales de <i>Arabidopsis thaliana</i> en los genes que codifican para transportadores de nucleótidos azúcar	<b>21</b>
7.1. Búsqueda de mutantes en bancos de mutantes insercionales de <i>Arabidopsis thaliana</i>	<b>21</b>
7.2. Preparación rápida de DNA genómico para análisis por PCR	<b>22</b>
7.3. Verificación del sitio de inserción e identificación de plantas homocigotas	<b>23</b>
8. Análisis de DNA genómico de la mutante insercional <i>utr1</i>	<b>25</b>
8.1. Maxipreparación de DNA genómico para experimentos de Southern-blot	<b>25</b>

8.2. Obtención de sondas radioactivas	25
8.3. Experimentos de Southern-blot	25
9. Análisis de la expresión de los genes <i>UTr1</i> , <i>UTr2</i> , <i>UTr3</i> y <i>UTr7</i>	26
9.1. Preparación de RNA para experimentos de Northern-blot	26
9.2. Obtención de sondas radioactivas	27
9.3. Diseño de sondas específicas para los genes <i>UTr1</i> y <i>UTr3</i>	28
9.4. Experimentos de Northern-Blot	30
9.5. Experimentos de hibridación <i>in situ</i>	31
9.6. Experimentos de RT-PCR	31
10. Técnicas de Microscopía	32
10.1. Fijación e inclusión de material para microscopía óptica y electrónica de transmisión	32
10.2. Tinción con Azul de Toluidina y PAS	32
10.3. Fijación e inclusión de material para microscopía electrónica de barrido	33
11. Experimentos de Inmunofluorescencia	34
11.1. Fijación e inclusión de material para inmunofluorescencia en cortes	34
11.2. Inmunofluorescencia en cortes	34
11.3. Inmunofluorescencia en tejido completo	35
12. Tinción histoquímica de la enzima $\beta$ -glucuronidasa	35
13. Preparación de una fracción de polisacáridos insolubles en alcohol (AIR)	35
<b>RESULTADOS</b>	<b>37</b>
1. Caracterización molecular y fenotípica de una mutante insercional de <i>Arabidopsis thaliana</i> en el gen del transportador de UDP-glucosa / UDP-galactosa <i>UTr1</i> .	37
1.1. Identificación de una planta de <i>Arabidopsis thaliana</i> que posee una inserción del transposón <i>Ds</i> en el gen <i>UTr1</i>	37
1.2. Análisis de la expresión de <i>UTr1</i> y <i>UTr3</i> en plantas silvestres y en la mutante insercional	41
1.2.1. Análisis de la expresión de <i>UTr1</i> y <i>UTr3</i> en plantas silvestres mediante Northern-blot	43
1.2.2. Expresión de <i>UTr1</i> y <i>UTr3</i> en plantas silvestres mediante hibridación <i>in situ</i>	45
1.2.3. Monitoreo de la actividad del promotor de <i>UTr1</i> mediante el análisis de la expresión de <i>GUS</i> en la mutante insercional	47
1.2.4. Análisis de la expresión de <i>UTr1</i> en la mutante insercional	49
1.2.5. Análisis de la expresión de otros transportadores de nucleótidos	

azúcar en la mutante insercional	50
1.3. Estudio morfológico de la mutante <i>utr1</i> utilizando técnicas de microscopía	53
1.3.1. Estudio morfológico mediante microscopía óptica	53
1.3.2. Estudio morfológico mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido	56
1.4. Análisis de la estructura y composición de la pared celular en la mutante <i>utr1</i>	62
1.4.1. Análisis de pectinas mediante inmunofluorescencia con anticuerpos antipolisacaridos de pared celular	62
1.4.2. Análisis de xiloglucano de cotiledones e hipocotilos mediante Espectroscopía de masa (MALDI-TOF)	72
1.5. Caracterización genética de la mutante <i>utr1</i>	74
2. Identificación de mutantes insercionales en los genes que codifican para los transportadores de nucleótidos azúcar UTr2 y Utr7	80
<b>DISCUSIÓN</b>	87
<b>CONCLUSIONES</b>	105
<b>TRABAJO FUTURO</b>	106
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	107

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Resumen de segregación en kanamicina de las líneas <i>utr1</i> y cruzas con silvestre	<b>76</b>
<b>Tabla 2.</b> Resumen de segregación en kanamicina de las cruzas con las líneas Ac	<b>76</b>
<b>Tabla 3.</b> Segregación esperada, en kanamicina o BASTA, de la autopolinización y cruzas con silvestre según el dosaje genético y el número de inserciones	<b>86</b>
<b>Tabla 4.</b> Análisis de segregación de las plantas con inserciones en los genes <i>UTr1</i> , <i>UTr2</i> y <i>UTr7</i>	<b>86</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Modelo propuesto para la biosíntesis de hemicelulosas y pectinas en el aparato de Golgi de células vegetales	7
<b>Figura 2.</b> Identificación de putativas mutantes insercionales en genes de transportadores de nucleótidos azúcar	24
<b>Figura 3.</b> Metodología utilizada para verificar la inserción e identificar las plantas homocigotas	24
<b>Figura 4.</b> Determinación de la especificidad de las sondas de los extremos 3'UTR de <i>UTr1</i> y <i>UTr3</i>	29
<b>Figura 5.</b> Caracterización molecular de la inserción en la mutante <i>utr1</i>	40
<b>Figura 6.</b> Comparación de la secuencia primaria de las proteínas <i>UTr1</i> y <i>UTr3</i>	42
<b>Figura 7.</b> Análisis de la expresión de <i>UTr1</i> y <i>UTr3</i> en plantas silvestres por Northern blot	44
<b>Figura 8.</b> Análisis de la expresión de <i>UTr3/UTr1</i> en plantas silvestres por hibridación <i>in situ</i>	46
<b>Figura 9.</b> Expresión de <i>GUS</i> en la mutante <i>utr1</i>	48
<b>Figura 10.</b> Análisis de los transcritos de <i>UTr1</i> en la mutante <i>utr1</i>	51
<b>Figura 11.</b> Análisis de la expresión de <i>UTr3</i> , <i>UTr2</i> y <i>UTr7</i> en la mutante <i>utr1</i>	52
<b>Figura 12.</b> Análisis morfológico de cotiledones de la mutante <i>utr1</i> por microscopía óptica	54
<b>Figura 13.</b> Análisis morfológico de embriones de la mutante <i>utr1</i> por microscopía óptica	55
<b>Figura 14.</b> Análisis morfológico de la mutante <i>utr1</i> por microscopía electrónica de transmisión	58
<b>Figura 15.</b> Análisis morfológico de la mutante <i>utr1</i> por microscopía electrónica de transmisión	59
<b>Figura 16.</b> Análisis morfológico de embriones <i>utr1</i> por microscopía electrónica de transmisión	60
<b>Figura 17.</b> Análisis estructural de la mutante <i>utr1</i> por microscopía de barrido.	61
<b>Figura 18.</b> Estructura de las pectinas homogalacturonano y ramnogalacturonano I.	63
<b>Figura 19.</b> Imágenes de inmunofluorescencia en cortes de cotiledones con los anticuerpos JIM7 y LM5.	64
<b>Figura 20.</b> Imágenes de inmunofluorescencia de cortes de cotiledón con el anticuerpo	

LM5.	65
<b>Figura 21.</b> Imágenes de inmunofluorescencia en cortes de cotiledones con los anticuerpos LM6, JIM14 y MAC207.	67
<b>Figura 22.</b> Imágenes de inmunofluorescencia de raíces de plántulas con los anticuerpos JIM5 y JIM7.	68
<b>Figura 23.</b> Imágenes de inmunofluorescencia de raíces de plántulas con el anticuerpo LM5.	69
<b>Figura 24.</b> Imágenes de microscopía electrónica de barrido de semillas de <i>A. thaliana</i> .	71
<b>Figura 25:</b> Imágenes de inmunofluorescencia de semillas embebidas en agua con los anticuerpos JIM5 y JIM7.	71
<b>Figura 26.</b> Análisis de la estructura del xiloglucano mediante espectroscopía de masa MALDI-TOF	73
<b>Figura 27.</b> Identificación de revertantes por PCR.	77
<b>Figura 28.</b> Identificación de revertantes homocigotas.	79
<b>Figura 29.</b> Expresión de <i>UTr2</i> y <i>UTr7</i> por RT-PCR.	81
<b>Figura 30.</b> Expresión de <i>UTr2</i> y <i>UTr7</i> por Northern-blot.	82
<b>Figura 31.</b> Hibridación <i>in situ</i> de <i>UTr7</i> .	83
<b>Figura 32.</b> Verificación de la inserción e identificación de plantas homocigotas.	84
<b>Figura 33:</b> Esquema simplificado del metabolismo de azúcares en células vegetales.	92

## ABREVIATURAS

AGP: Proteínas arabinogalactanos

cDNA: Secuencia de DNA codificante

DNA: Acido desoxirribonucleico

EST: Transcritos de secuencias expresadas

GUS: Proteína  $\beta$ -glucuronidasa

kb: Kilobases

KDa: Kilodaltons

NPTII: Proteína neomicina fosfotransferasa II

O.D.: Densidad óptica

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PM: Peso Molecular

RGI: Ramnogalacturonano I

RGII: Ramnogalacturonano II

RNA: Acido ribonucleico

RNAr : Acido ribonucleico ribosomal

RT-PCR: PCR acoplado a una reacción de transcripción reversa

SALK: Salk Institute Genomic Analysis Laboratory

TAIR: Arabidopsis information Resource

5'UTR: Secuencia no traducida del extremo 5' del RNA

3'UTR: Secuencia no traducida del extremo 3' del RNA

wt: Abreviación de la palabra en inglés wild type, que significa silvestre

Reactivos:

DMSO: Dimetil sulfoxido

EDTA: Etilen-diaminotetra-acetato

PIPES: Piperazina-N-N'-bis(acido 2-etano-sulfónico)

SDS: Dodecil sulfato de sodio

## RESUMEN

La pared celular es esencial para la vida de la planta. Es una estructura compleja compuesta por polisacáridos y proteínas. El 70% de los polisacáridos son hemicelulosas y pectinas y solo el 30% es celulosa.

La biosíntesis de polisacáridos no celulósicos ocurre en el aparato de Golgi y requiere de las glicosiltransferasas que incorporan los azúcares en su forma activada al polímero en elongación. Los azúcares son activados en el citoplasma al ser convertidos en nucleótidos azúcar. Por lo tanto, en el aparato de Golgi se requieren transportadores de nucleótidos azúcar para traspasar la barrera topológica entre la síntesis de los nucleótidos azúcar en el citosol y las glicosiltransferasas en el lumen del aparato de Golgi.

Nuestro interés ha sido identificar y caracterizar las proteínas responsables de esta actividad. En nuestro laboratorio se han clonado tres genes de *Arabidopsis thaliana* que codifican para transportadores de nucleótido azúcar: *UTr1*, *UTr2* y *UTr7*. Mediante estrategias bioquímicas se ha determinado que *UTr1* y *UTr7* son transportadores de UDP-glucosa y UDP-galactosa y *UTr2* es un transportador de UDP-galactosa.

Con el propósito de conocer la participación *in vivo* de estas proteínas en la síntesis de hemicelulosas y pectinas, hemos propuesto identificar y caracterizar mutantes de *A.thaliana* en los genes que las codifican.

Hemos identificado una línea atrapadora de genes (gene trap line) que posee una inserción del transposón Ds en el primer exón del gen del transportador de UDP-galactosa y UDP-glucosa *UTr1*.

La expresión del gen reportero *GUS* en la mutante *utr1* revela que *UTr1* es diferencialmente expresado. Análisis por Northern-blot e hibridación in-situ corroboran lo anterior.

Análisis microscópico en cotiledones revelaron un fenotipo a nivel de tejido. Las células de los cotiledones de plántulas y embriones mutantes *utr1* poseen un mayor número de gránulos de almidón en los plastidios y una mayor

cantidad de cuerpos lipídicos en el citoplasma. Usando la técnica de inmunofluorescencia se encontró, en las paredes de las células de los cotiledones, un aumento en la unión de un anticuerpo que reconoce cadenas de (1→4)-β-D-galactosa de la pectina ramnogalacturonano I. Sin embargo, no se observaron diferencias en xiloglucano.

De esta forma, la inserción en el gen *UTr1* generaría una alteración en el metabolismo de los carbohidratos que también afecta la estructura del ramnogalacturoano I. Este resultado también sugiere que la presencia de un gen 83% idéntico en su secuencia aminoacídica (*UTr3*), una característica común en *Arabidopsis*, no es suficiente para eliminar la función del gen *UTr1* en la mutante insercional.

Nosotros proponemos que la función *in vivo* de *UTr1* es transportar UDP-glucosa. Al estar ausente, UDP-glucosa aumenta en el citoplasma y con ello aumenta el pool de hexosas. Estas serían destinadas hacia la síntesis de almidón. Además, la UDP-glucosa puede ser epimerizada a UDP-galactosa y transportada al lumen del Golgi donde es incorporada a las cadenas laterales de ramnogalacturonano I.

Además, hemos identificado mutantes insercionales por T-DNA en los genes *UTr2* y *UTr7*, transportadores de UDP-galactosa y UDP-glucosa/UDP-galactosa respectivamente. Estos genes también poseen una expresión diferencial en *A. thaliana*, lo cual explicaría al menos en parte la existencia de una familia de transportadores de UDP-galactosa y UDP-glucosa.

## SUMMARY

The cell wall is essential for plant life. It is a complex structure composed by polysaccharides and proteins. 70% of the polysaccharides are hemicelluloses and pectins, and only 30% of them are cellulose.

The biosynthesis of non-cellulosic polysaccharides takes place at the Golgi apparatus and requires glycosyltransferases that incorporate activated sugars into an elongation polymer. Sugars are activated by conversion into nucleotide sugars at the cytoplasm. Golgi-localized nucleotide sugar transporters are needed to bypass the topological barrier between nucleotide sugar synthesis in the cytosol and Golgi lumenal glycosyltransferases.

Our goal has been to identify and to characterize the proteins responsible of this activity. In our laboratory it has been cloned three *Arabidopsis thaliana* genes that code for nucleotide sugar transporters: *UTr1*, *UTr2* and *UTr7*. By using biochemical approaches we have shown that *UTr1* and *UTr7* are UDP-glucose and UDP-galactose transporters and *UTr2* is an UDP-galactose transporter.

In order to know the *in vivo* role of these proteins in the synthesis of hemicelluloses and pectins, we have proposed to identify and characterize *A. thaliana* mutants in these genes.

We have identified a gene trap line mutant with a Ds transposon insertion at the first exon of the UDP-glucose and UDP-galactose *UTr1* gene.

The *GUS* expression in *utr1* mutant shows that *UTr1* is differentially expressed. Northern-blots and *in situ* hybridizations analysis are in agreement with this observation.

Microscopic analysis in cotyledons shows a tissue phenotype. The plant mutant cells have more starch granules in the plastids and lipid bodies in the cytoplasm. Using immunofluorescent techniques we found at the cell wall of cotyledons an increase in the binding of an antibody for (1→4)- $\beta$ -D-galactan from rhamnogalacturonan I. However there are no differences in xyloglucan.

Therefore, the insertion in the *UTr1* gene produces an alteration in the metabolism of carbohydrate that also affects the structure of ramnogalacturonan I. These results also suggest that the presence of a gene that have an 83% of identity at the aminoacid level (*UTr3*), a common feature in Arabidopsis, is not sufficient to back up all the *UTr1* gene function in the insertional mutant.

We propose that the *in vivo* function of *UTr1* is to be an UDP-glucose transporter. If it is absent, UDP-glucose and the hexose pool increase at the cytoplasm. The hexoses would be destined to starch syntesis. Moreover, the UDP-glucose could be convert to UDP-galactose and transported to the Golgi where it will be incorporated to the ramnogalacturonan I lateral chains.

In addition, we have identify T-DNA insertional mutants in *UTr2* and *UTr7* genes. These genes are also differentially expressed in Arabidopsis, and this differential expresion would explain the existance of a UDP-glucose and UDP-galactose family.

## INTRODUCCION

### 1. Función y composición de la pared celular vegetal.

Todas las células vegetales poseen una matriz extracelular denominada pared celular, esencial para muchos procesos fisiológicos y de desarrollo de la planta. Esta estructura es responsable de la gran resistencia mecánica de los tejidos vegetales, restringe la expansión del citoplasma, regula el crecimiento, el volumen celular y determina la forma de las células (Buchanan y col., 2000). Además, participa activamente en el proceso de división celular estableciendo los planos de división que determinaran la forma de las células y órganos vegetales (Reiter, 2002). Por último, está involucrada en fenómenos de comunicación entre células y constituye una barrera de protección frente al ataque de patógenos (Carpita y Gibeaut, 1993).

Esta diversidad de funciones se refleja en la heterogeneidad de su composición. La pared celular es una estructura compleja formada por polímeros de azúcar ensamblados en una red organizada que además contiene proteínas estructurales y enzimas. Si bien su composición y morfología varía según los distintos tipos celulares, se ha clasificado en dos: pared celular primaria y secundaria.

La pared celular primaria se forma durante el crecimiento de todas las células vegetales y es una estructura no especializada y similar en todos los tipos celulares. Está compuesta en un 90% por polisacáridos y 10% de proteínas. El 70% de los polisacáridos son hemicelulosas y pectinas y el 30% restante, fibras de celulosa (Carpita y Gibeaut, 1993). La pared secundaria se forma una vez que el crecimiento celular ha cesado y solo en algunos tipos celulares. Es altamente especializada en estructura y composición, reflejando un estado de diferenciación celular. Se caracteriza por poseer un mayor

contenido de celulosa, menor cantidad de pectinas, hemicelulosas y proteínas, y un polímero diferente denominado lignina (Carpita y Gibeaut, 1993).

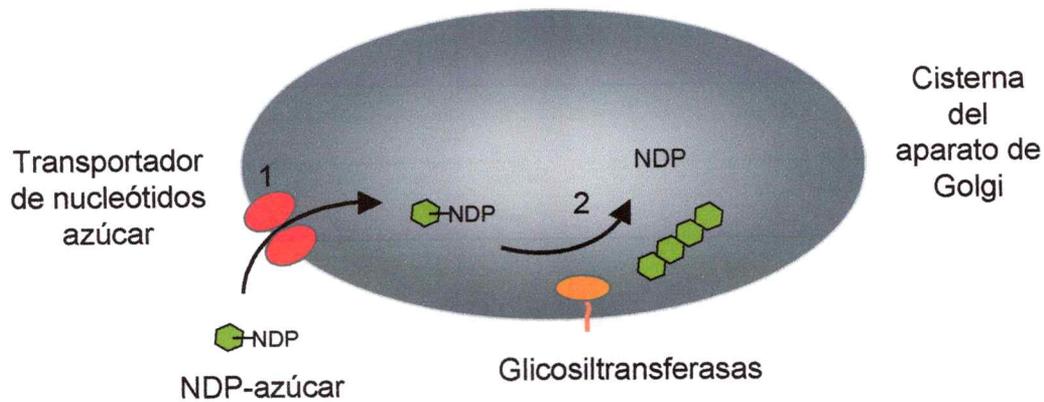
Las fibras de hemicelulosa unen a las microfibrillas de celulosa entre sí, formando la matriz de hemicelulosa-celulosa responsable de la gran resistencia mecánica de la pared celular. La hemicelulosa más abundante en la pared primaria de dicotiledóneas es xiloglucano formada por una cadena lineal de glucosas (1→4-β-D-glucosa) a la cual se unen de manera periódica residuos de xilosa o xilosa-galactosa-fucosa.

Las pectinas son polímeros ricos en azúcares cargados como el ácido galacturónico y en azúcares neutros como ramnosa, arabinosa y galactosa. Son los polisacáridos más solubles presentes en la pared y forman un gel altamente hidratado, en el cual los grupos carboxilos de pectinas vecinas están unidos por iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Una de las pectinas más abundantes en la pared primaria es el homogalacturonano (HG), un homopolímero de (1→4)-α-D-ácido galacturónico que puede tener varios estados de metil-esterificación y acetilación. También puede tener sustituciones complejas con cadenas laterales de galactosa y arabinosa formando el polisacárido Ramnogalacturonano I (RGI).

## **2. Biosíntesis de hemicelulosas y pectinas**

A diferencia de la celulosa que es sintetizada en la membrana plasmática, las hemicelulosas y pectinas son sintetizadas en el lumen del aparato de Golgi. Desde allí son exportadas en vesículas, siguiendo la ruta exocítica, hacia la membrana plasmática donde son ensambladas en la pared celular.

Aunque existe poca información sobre el mecanismo de síntesis de estos polisacáridos y se desconocen la mayoría de las proteínas involucradas, se ha determinado que las enzimas responsables son glicosiltransferasas de aparato de Golgi (Figura 1).



**Figura 1. Modelo propuesto para la biosíntesis de hemicelulosas y pectinas en el aparato de Golgi de células vegetales.** Los nucleótidos azúcar (NDP-azúcar) son sintetizados en el citoplasma y transportados hacia el lumen del aparato de Golgi mediante transportadores de nucleótidos azúcar (1). Allí son utilizados por las glicosiltransferasas que transfieren el azúcar a la cadena de polisacáridos en elongación, liberando el nucleósido difosfato (NDP) (2).

Las glicosiltransferasas son proteínas tipo II de solo un dominio transmembrana que poseen su sitio catalítico en el lumen de las cisternas del aparato de Golgi (Muñoz y col., 1996; Sterling y col., 1998; Wulff y col., 2000; Keegstra y Raikhel, 2001). Utilizan como sustrato los azúcares unidos a un nucleótido, compuestos denominados nucleótidos azúcar. La mayor parte de los azúcares, como galactosa, glucosa y xilosa, están unidos al nucleótido UDP, mientras que fucosa y manosa están unidos a GDP (Seitz y col., 2000). Debido a la complejidad de las hemicelulosas y pectinas, resulta evidente que las células vegetales requieren muchas glicosiltransferasas diferentes para generar los diversos enlaces glicosídicos presentes en los polisacáridos de pared celular. A pesar de ello, hasta la fecha solo se han clonado cuatro genes que codifican para glicosiltransferasas de plantas: la xiloglucano fucosiltransferasa de *A.thaliana* (Perrin y col., 1999; Perrin y col., 2003); la galactosiltransferasa de *Trigonella foenum-graecum* (Edwards y col., 1999); la  $\alpha$ -xilosiltransferasa de *A. thaliana* (Faik y col., 2002) y la xiloglucano galactosiltransferasa de *A. thaliana* (Madson y col., 2003).

Sin embargo debido a que las reacciones de transferencia de azúcares ocurren en el lumen del aparato de Golgi y la síntesis de los nucleótidos azúcar acontece en el citoplasma (Bonin y col., 1997; Dörman y Benning, 1998) se genera un problema topológico. Este problema se resuelve con la participación de proteínas transportadoras de nucleótidos azúcar en la membrana del aparato de Golgi (Figura 1).

Evidencia experimental proveniente de nuestro laboratorio apoya lo anterior, ya que se ha determinado en la membrana del aparato de Golgi de células vegetales actividad transportadora de UDP-glucosa, UDP-ácido glucurónico, UDP-ácido galacturónico, UDP-galactosa y GDP-fucosa (Muñoz y col., 1996; Neckelmann y Orellana, 1998; Wulff y col., 2000). Según las características que poseen los transportadores de nucleótidos azúcar identificados en otras especies, estas debieran ser proteínas de masa molecular entre 35 y 40 KDa y altamente hidrofóbicas, con 8 a 10 fragmentos transmembrana. Considerando que en la biosíntesis de polímeros de azúcar un paso limitante es la disponibilidad del sustrato, estas proteínas transportadoras serían importantes puntos de regulación del proceso.

Con el objetivo de identificar genes de plantas que codifiquen para transportadores de nucleótidos azúcar se ha utilizado la estrategia de "cloning in silico" buscando en el genoma de *Arabidopsis thaliana* secuencias homólogas a transportadores de nucleótidos azúcar caracterizados en otros organismos. De esta forma, en nuestro laboratorio se han clonado dos genes de *Arabidopsis* denominados *UTr1* y *UTr2* cuyas secuencias son homólogas a transportadores de UDP-galactosa de células animales (Miura y col., 1996; Ishida y col., 1996), y un gen homólogo al transportador de UDP-ácido glucurónico de *Caenorhabditis elegans*, *Sqv7* (Herman y col., 1999) denominado *UTr7*. Mediante experimentos de expresión en *Saccharomyces cerevisiae* se ha demostrado que la proteína *UTr1* posee actividad transportadora de UDP-galactosa y UDP-glucosa (Norambuena y col., 2002). De la misma forma se ha determinado que las proteínas *UTr2* y *UTr7* son transportadores de UDP-galactosa y UDP-

galactosa/UDP-glucosa respectivamente (Norambuena, 2004; Segura, 2004). A pesar que estas proteínas han sido caracterizadas bioquímicamente, desconocemos en que tejidos están presentes y cual es su función *in vivo*.

Además, existen en el genoma de *Arabidopsis* otras 4 secuencias homólogas al gen *UTr1* (*UTr3*, *UTr4*, *UTr5* y *UTr6*) que codificarían para proteínas altamente hidrofóbicas de tamaño molecular entre 30 y 50 KDa. Tanto la similitud de secuencia como las evidencias estructurales sugieren que estas proteínas también pueden corresponder a transportadores de nucleótidos azúcar.

### **3. Mutantes de *A. thaliana*: Una estrategia para estudiar la participación de los transportadores de UDP-glucosa/UDP-galactosa en la síntesis de polisacáridos de pared celular**

Una estrategia para analizar la función de una proteína en un organismo es estudiar el efecto generado al mutar el gen que la codifica. Así, plantas mutantes en los genes que codifican para transportadores de UDP-glucosa/UDP-galactosa, son una valiosa herramienta para analizar la participación de estas proteínas en la síntesis de hemicelulosas y pectinas.

Evidencias aportadas por otros organismos nos permiten suponer que la ausencia de un transportador de nucleótidos azúcar en la planta generaría alteraciones cuantitativas y/o cualitativas en la composición de los polímeros que son sintetizados en el aparato de Golgi. En células epiteliales MDCK que poseen una deficiencia de un 98% en el transporte de UDP-galactosa en el aparato de Golgi (Brandli y col., 1988), se encontró que el proteoglican keratan sulfato, que posee galactosa en el polímero de glicosaminoglicano, no fue sintetizado (Toma y col., 1996). Por otra parte, la cepa VRG4 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* mutante en un transportador de GDP-manosa de aparato de Golgi (*Vrg4*) presenta una disminución en el transporte de este nucleótido azúcar en vesículas de Golgi y una disminución en la manosilación

de glicoproteínas y esfingolípidos (Dean y col., 1997). Por último, se ha determinado que la disminución de la fucosilación de proteínas glicosiladas en pacientes con la enfermedad genética "deficiencia de adhesión de linfocitos (LAD)", y que se caracteriza por inmunodeficiencia y alteraciones en el desarrollo del sistema nervioso, se debe a la mutación en un transportador de GDP-fucosa del aparato de Golgi (Lühn y col., 2001).

La planta *A. thaliana* es el modelo idóneo para este tipo de estudios ya que es una excelente herramienta genética y además posee una pared celular primaria típica y similar a la mayoría de las plantas (Zabackis y col., 1995). Otra ventaja es la existencia de bancos de mutantes insercionales generados por distintos grupos de investigación y disponibles para toda la comunidad científica. Las mutantes insercionales son plantas de *Arabidopsis* que poseen en su genoma un segmento de DNA que interrumpe la transcripción normal del gen. Los elementos insercionales más utilizados son transposones (Springer y col., 1995) y el T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* (McKinney y col., 1995; Krysan y col., 1999). En estas plantas se ha identificado el sitio putativo de la inserción en el genoma lo cual permite la rápida identificación de una mutante en un gen específico.

Varios de los genes que hoy conocemos y cuyos productos participan en la síntesis de polisacáridos o son necesarios para el ensamblaje de la pared, se han identificado al analizar plantas de *A. thaliana* mutantes. Muchas de ellas tienen alteraciones en el crecimiento, en la elongación del hipocotilo (particularmente en oscuridad), defectos en las raíces, fragilidad del hipocotilo o células del xilema colapsadas (Reiter y col., 1997; Arioli y col., 1998; Taylor y col., 1999; Nicol y col., 1998; Burk y col., 2001; Bouton y col., 2002). Sin embargo, también se han encontrado otras mutantes en pared celular que no presentan fenotipos morfológicos evidentes y por lo tanto ha sido necesario utilizar técnicas complejas para determinar diferencias cuantitativas y/o cualitativas de polisacáridos de pared celular.

En nuestro laboratorio se ha determinado transporte de nucleótidos azúcar en vesículas de aparato de Golgi de células vegetales. Además se han clonado tres genes de *A. thaliana* que codifican para proteínas transportadoras de UDP-glucosa y/o UDP-galactosa y se han identificado otras tres secuencias homólogas. Nuestro modelo plantea que estos transportadores de nucleótidos azúcar son los responsables de proveer de sustratos a las glicosiltransferasas y por lo tanto serían importantes puntos de control de la síntesis de componentes de pared primaria. Sin embargo hasta el momento no hay evidencia de que estas proteínas estén involucradas en la biosíntesis de polisacáridos no celulósicos. En este sentido, la obtención de plantas con alteraciones en la expresión de los genes de transportadores de nucleótidos azúcar nos permitiría entender, al menos en parte, la función de estas proteínas *in vivo*.

## **Hipótesis**

Los transportadores de nucleótidos azúcar tendrían una expresión diferencial en los distintos tejidos de la planta y participarían en la síntesis de hemicelulosas y pectinas en los tejidos donde se expresan.

## **Objetivo General**

Analizar si al alterar la expresión de los genes que codifican para transportadores de nucleótidos azúcar en los tejidos donde se están expresando, es afectada la composición de hemicelulosas y pectinas de la pared celular.

## **Objetivos específicos**

1. Estudiar la expresión de genes de transportadores de nucleótidos azúcar en distintos tejidos de la planta y durante el desarrollo.
2. Obtener y caracterizar plantas mutantes en estos genes.
3. Estudiar los cambios en la estructura y composición de la pared celular de las plantas mutantes obtenidas.

## MATERIALES Y MÉTODOS



### 1. Material Biológico

#### Plantas y condiciones de crecimiento

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres de los ecotipos Columbia (Col-0) y Landsberg erecta (Ler-0).

Las plantas mutantes por inserción de T-DNA fueron facilitadas por el Instituto Torrey Mesa de la Empresa Syngenta (Torrey Mesa Research Institute, <http://www.tnri.org/index.html>) y por el Instituto SIGNAL (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, <http://signal.salk.edu>).

La mutante insercional por transposición *utr1* del banco de Sundaesan (Sundaesan y cols., 1995) fue obtenida a través del Instituto NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, <http://nasc.nott.ac.uk>). Las líneas parentales, que dieron origen a las mutantes insercionales de Sundaesan, Ac (Ac1 y Ac5) y DsE (DsE3 y DsE4) fueron facilitadas por el Instituto ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center, <http://aims.cse.msu.edu/aims/>).

Con el propósito de obtener plantas adultas para mantención de líneas, recolección de tejidos adultos y cruzas, las plantas fueron sembradas en una mezcla 2:1 de tierra de hoja y vermiculita y crecidas en una cámara climatizada a 23°C con un régimen de luz/oscuridad de 16/8 horas.

Con el objeto de obtener plantas para preparación de RNA de estadíos tempranos, análisis de segregación en marcadores de selección y preparación de muestras para técnicas microscópicas, las plantas fueron crecidas en condiciones estériles en placas de medio basal Murashige and Skoog (pH 5.7) con sacarosa 1% p/v y agar 0.9% p/v. Para esterilizar las semillas, se trataron por 5 minutos con una solución de Etanol 70% v/v con agitación constante, luego por 15 minutos con una solución de hipoclorito de sodio 5% v/v y SDS 1% v/v y posteriormente se lavaron 5 veces con 1 ml de agua estéril. Con el objetivo de sincronizar la germinación, antes de transferir las placas con las

semillas a la cámara de cultivo de tejido, se dejan 48 horas a 4°C. Las plantas fueron crecidas a 23°C con un régimen de luz/oscuridad de 16/8 horas.

### Bacterias y condiciones de cultivo

Para los clonamientos se utilizaron bacterias *Escherichia coli* cepa DH5 $\alpha$ , las cuales fueron crecidas en medio Luria Bertoni (LB) líquido (bacto triptona 1% p/v ,extracto de levadura 0.5% p/v y NaCl 1% p/v) o sólido (Medio LB con agar 1.5% p/v) a 37° C por 16 horas.

## 2. Plásmidos

### Plásmidos donados

- APD06f05: Plásmido bluescript II SK con la secuencia del EST de *UTr1* (Asamizu y col., 2000).
- 249D21T7: Plásmido pZL1 con la secuencia del EST de *UTr3* (Donado por Arabidopsis Biological Resource Center).
- GPD426-UTr2myc: Plásmido GPD426myc con la secuencia completa del cDNA de *UTr2* en los sitios *Bam*HI y *Not*I. En el extremo 3' posee el epítipo myc en marco de lectura (Norambuena, 2004).
- H8B10T7: Plásmido bluescript SK, que contiene el EST del RNA ribosomal 18S de *A. thaliana*. (Donado por Dr. Loreto Holuigue).
- pCAMBIA: Plásmido binario comercial que posee la secuencia del gen meomicina fosfotransferasa II (*NPTII*).
- PRL-2: vector binario que posee la fusión del promotor de la proteína PR2 con el gen reportero *GUS* (Donado por Dr. Herman Silva)

### Plásmidos construidos durante esta tesis

- 3'UTR-UTr1: Plásmido bluescript II SK con la secuencia 3'UTR de *UTr1* del EST del plásmido APD06f05, en los sitios *Sac* y *Kpn*.
- pBI-UTr7: Plásmido bluescript II KS con la secuencia cDNA del gen *UTr7* sin el primer exón, clonado en *EcoRV*.
- GPD426-UTr7myc: Plásmido GPD426myc con la secuencia completa del cDNA de *UTr7* en los sitios *BamHI* y *NotI*. En el extremo 3' posee el epítopo myc en marco de lectura.

### 3. Partidores

- 3.1. Partidores con sitios de restricción para clonamientos en los vectores pbluescript y GPD426-myc.

Partidor	Sitio de Restricción	Secuencia
Extremo 5' del 3'UTR de <i>UTr1</i>	<u><i>SacI</i></u>	CAAAAGAGCTCAAGTTTTTCCTC
Extremo 3' del 3'UTR de <i>UTr1</i>	<u><i>KpnI</i></u>	TTTGGGTACCCCAAATTCAAATC
Extremo 5' de <i>UTr7</i>	<u><i>BamHI</i></u>	ATCACTCTTGGATCCCATGGA
Extremo 5' de <i>UTr7</i> , sin el exón 1	<u><i>BamHI</i></u>	GGCATTGGATCCATGGCAATGG
Extremo 3' de <i>UTr7</i>	<u><i>NotI</i></u>	CCAAACGCGGCCGCAATTCTCCTTT

3.2. Partidores utilizados para sintetizar sondas radioactivas y para experimentos de RT-PCR.

Partidor	Secuencia
Extremo 5' de <i>UTr1</i>	TCTAGGATCCTAATGGAGGTCCATGGCTCC
Extremo 3' de <i>UTr1</i>	ATGGCGGCCGCCTTCCACTCTTTTGCTTC
Extremo 5' de <i>UTr2</i>	TTCTAATGTGTAGAGTCAGTGACACACTT
Extremo 3' de <i>UTr2</i>	AACTGGAGGATCTTAGATAGAATCAGGTT
Extremo 5' de <i>UTr7</i>	CATTGCTTCAATGGCAATGG
Extremo 3' de <i>UTr7</i>	CCGGACCGAAATTCTCATTT
Extremo 5' de Actina	CACACTTTCTACAATGAGCT
Extremo 3' de Actina	GCAGTGATCTCTTTGCTCAT3
Extremo 5' de <i>GUS</i>	CTGTGGAATTGATCAGCG
Extremo 3' de <i>GUS</i>	CTCTTCGCTGTACAGTTC
Extremo 5' de <i>NPTII</i>	CAAGATCGATTGCACGCA
Extremo 3' de <i>NPTII</i>	CTATGTCCTGATAGCGGT

3.3. Partidores exactos para la verificación de las inserciones en las mutantes SALK, SYNGENTA y Mutante Ds.

Partidor	Secuencia
Extremo 5' del Ds	ACGGTCGGGAAACTAGCTCTAC
Reverso del exón 2 de <i>UTr1</i>	ATGCAAGATGCTCGAACC
Extremo izquierdo del T-DNA de las líneas SYNGENTA (LB3)	TAGCATCTGAATTTCATAACCAATCTCGATACAC
Extremo izquierdo del T-DNA de las líneas SALK (LBb1SALK)	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT
Internos (directo e inverso) para la mutante <i>utr2-1</i>	ACGAGTCAACTTTCCGGTTTAA ACGACGATTATAATCGCTTCTTT
Internos (directo e inverso) para la mutante <i>utr2-2</i>	GCCACGCTGGTAATGCAAATT CTTTGAGGAGAGATTCAAAGGA

#### 4. Anticuerpos

Todos los anticuerpos utilizados en esta tesis fueron facilitados por el Dr. Paul Knox, Centre for Plant Sciences, University of Leeds, England.

##### Anticuerpos anti-pectinas

- JIM5 y JIM7: Anticuerpos monoclonales anti-Homogalacturonano sin/baja y alta metil-esterificación respectivamente (Willats y col., 2001).
- LM5: Anticuerpo monoclonal que reconoce 4 residuos de galactosa en cadenas de (1→4)-β-D-galactosa de Ramnogalacturonano I (Jones y col., 1997; Willats y col., 1999; McCartney y col., 2000).
- LM6: Anticuerpo monoclonal que reconoce 5 arabinosas en cadenas de (1→5)-α-L-arabinosa de Ramnogalacturonano I. (Willats y col., 1999; McCartney y col., 2000).

##### Anticuerpos anti-proteínas Arabinogalactanos

- MAC207, JIM4, JIM13, JIM16: Anticuerpos monoclonales anti cadenas de galactosa ((1→3)-β-D-galactosa y (1→6)-β-D-galactosa) de proteínas Arabinogalactanos (AGP) de membrana plasmática (Knox y col., 1991).
- JIM14: Anticuerpo monoclonal anti cadenas de galactosa ((1→3)-β-D-galactosa y (1→6)-β-D-galactosa) de proteínas Arabinogalactanos (AGP) de pared celular (Knox y col., 1991).
- LM2: Anticuerpo anti ácido glucurónico unido en β a las cadenas de galactosa ((1→3)-β-D-galactosa y (1→6)-β-D-galactosa) de AGP (Smallwood y col., 1996).

##### Anticuerpo secundario

- Anticuerpo anti-rata acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (SIGMA).

## 5. Reactivos

- De Amersham-Pharmacia Biotech (Uppsala, Suecia) se obtuvieron las columnas Sephadex G-50 y la membrana hybond-N+.
- De BioLabs (New England, USA) se obtuvieron enzimas de restricción, DNA ligasa y marcadores de peso molecular para RNA.
- De Electron Microscopy Sciences (Fort Washington, USA) se obtuvieron todos los reactivos para fijación e inclusión de muestras para técnicas microscópicas.
- De Fermentas (Vilnius, Lithuania) se obtuvieron enzimas de restricción, DNA polimerasa, el Hexalabel DNA kit y el marcador de PM de DNA de 1 kb.
- De Gibco (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) se obtuvo el sistema de purificación de productos de PCR "CONCERT", agarosa, el sistema de transcripción reversa y medios de cultivo de bacterias.
- De Merck (Darmstadt, Alemania) se obtuvieron los solventes de grado analítico y las sales.
- De Perkin Elmer Life Science (Boston, USA) se obtuvo el [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP.
- De PhytoTechnology (Kansas, USA) se obtuvo el medio basal Murashige and Skoog (MS) y el agar para plantas.
- De Promega (Madison, WI, USA), se obtuvo el sistema de purificación de DNA plasmidial "Wizard" y el marcador de PM de DNA de 50 pb.
- De Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) se obtuvieron los antibióticos, el sustrato X-GlcA (5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido) y reactivos químicos generales.

## **6. Técnicas generales de Biología Molecular**

### **6.1. Preparación de células competentes de *Echerichia Coli* (*E. Coli*)**

Se utilizó el método descrito por Inoue (Inoue, 1990). Se inocularon 250 ml de medio SOB (bacto triptona 2% p/v, extracto de levadura 0.5% p/v, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM) con un precultivo de *E. Coli* DH5α crecido durante 16 horas a 37°C, y se creció a 23°C con agitación vigorosa hasta una O.D. a 600 nm de 0.6 unidades de absorbancia. El cultivo se enfrió en hielo por 10 minutos y se centrifugó a 2.500g por 10 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en 80 ml de tampón TB frío (Pipes 10 mM, MnCl<sub>2</sub> 55 mM, CaCl<sub>2</sub> 15 mM, KCl 250 mM), se incubó en hielo por 10 minutos y se centrifugó a 2.500g por 10 minutos a 4°C. Finalmente el pellet se resuspendió en 20 ml de tampón TB frío, se agregó DMSO a una concentración final de 7% v/v y se incubó en hielo por 10 minutos. Las células se congelaron en Nitrógeno líquido en alícuotas de 200 µl.

### **6.2. Transformación de células competentes de *Echerichia Coli* (*E. Coli*)**

Se utilizó el método por shock térmico (Inoue, 1990). A 50 µl de células competentes se le agregaron de 1 a 5 µl de DNA. La mezcla se incubó 30 minutos en hielo, luego 5 minutos a 37°C y finalmente 5 minutos en hielo. A continuación se agregó 1 ml de medio LB sin antibiótico y se incubó por 1 hora a 37°C. Las bacterias se sembraron sobre una placa de LB/agar con antibiótico (según el plásmido) y se incubaron a 37°C toda la noche.

### **6.3. Preparación de DNA plasmidial**

#### Minipreparación de DNA plasmidial

Se utilizó el protocolo descrito por Xiang y col., (Xiang y col., 1994). 1,5 ml de cultivo saturado se centrifugó por 1 minuto a 12.000g. El pellet se resuspendió en 100 µl de solución I (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH8, EDTA 10 mM pH8), se agregaron 200 µl de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%) y se mezcló por inversión. Se agregaron 150 µl de solución III (Acetato de Potasio 5 M, pH 4.7 ajustado con Acido Acético Glacial), se mezcló por inversión y se centrifugó a 12.000g por 5 minutos a 4°C. Al sobrenadante se le agregó 1 ml de Etanol 100% y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 12.000g por 5 minutos a 4°C y el pellet se lavó con Etanol 70%. Luego se resuspendió en 40µl de agua con RNasa A (20 µg/ml) y se incubó a 37°C por 10 minutos.

#### Maxipreparación de DNA plasmidial

Se utilizó el sistema de preparación de DNA Wizard de Promega (Schoenfeld, 1995).

### **6.4. Electroforesis de DNA**

Para separar fragmentos de DNA de tamaños entre 1 a 14 kb o de 150 a 900 pb, se realizaron electroforésis horizontales de agarosa al 1% p/v y al 2% p/v en tampón TAE, respectivamente (Tris 40 mM, CH<sub>3</sub>COONa 20 mM, EDTA 2 mM, pH8). Como marcadores de peso molecular se utilizaron el "Ladder" de 1 kb de Fermentas<sup>®</sup> y el de 50 pb de Promega<sup>®</sup>.

Para resolver diferencias de tamaño entre 4 a 10 pb se utilizaron geles de Agarosa/Nusieve (2% / 1% p/v) según Sjoberg (Sjoberg y col., 2001).

## **6.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Para todas las reacciones de PCR se utilizó DNA polimerasa Taq Fermentas (Vilnius, Lithuania), su tampón correspondiente, mezcla de nucleótidos 0.2 mM, Cloruro de Magnesio 1.5 mM, y 12 pmoles de partidores. La cantidad de templado utilizada fue de aproximadamente 10 ng, con excepción de las amplificaciones desde DNA genómico en las que se utilizaron cantidades variables según la preparación. La temperatura de apareamiento y el tiempo de extensión para amplificaciones desde DNA plasmidial fue de 50 - 55°C por 1.5 minutos respectivamente. En las amplificaciones desde DNA genómico las temperaturas de apareamiento fueron diferentes para cada par de partidores y el tiempo de extensión fue de 3 minutos.

## **7. Obtención de mutantes insercionales de *A. thaliana* en los genes que codifican para transportadores de nucleótidos azúcar**

### **7.1. Búsqueda de mutantes en bancos de mutantes insercionales de *A. thaliana***

La identificación de plantas de *A. thaliana* mutantes en los genes de transportadores de nucleótidos azúcar se realizó mediante bioinformática utilizando los bancos de mutantes insercionales. Estos bancos son colecciones de plantas de *Arabidopsis* que poseen en distintos *locus* del genoma inserciones del T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* o de transposones. El sitio de inserción se ha estimado al comparar la secuencia de DNA genómico adyacente al T-DNA o transposón con la base de datos de los genes de *A. thaliana* (*Arabidopsis* information Resource (TAIR), [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)).

Con las secuencias genómicas de los genes que codifican para transportadores de nucleótidos azúcar obtenidas de TAIR, incluyendo una región de 1 kb río arriba del ATG (zona donde estaría ubicado el promotor), se realizó un alineamiento contra dos bancos de mutantes insercionales por T-DNA: la colección GARLIC de la compañía SYNGENTA y del Instituto Torrey Mesa y la colección SALK del instituto SIGNAL (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory). Luego de analizar los valores de alineación se identificaron putativas mutantes insercionales por T-DNA en los genes *UTr2*, *UTr3*, *UTr4*, *UTr5*, *UTr6* y *UTr7*. En la figura 2 se indican los sitios putativos de inserción en el genoma de las plantas SYNGENTA (flecha roja) y de las plantas SALK (flecha azul). Además, en la colección de mutantes insercionales por transposones derivados del transposón de maíz (elemento Ds) de Sundaresan (Parinov y col., 1999) se encontró una planta que posee una inserción del elemento Ds en el primer exón del gen *UTr1* (Figura 2, flecha verde).

Debido a que un 40% de las mutantes insercionales clasificadas en las colecciones SYNGENTA y SALK no poseen la inserción donde es predicha, es necesario verificar el sitio de inserción en las plantas seleccionadas. Para ello, las semillas obtenidas fueron sembradas y crecidas en tierra y posteriormente se preparó DNA genómico de varias plantas por línea para determinar por PCR la presencia de la inserción.

## **7.2. Preparación rápida de DNA genómico para análisis por PCR**

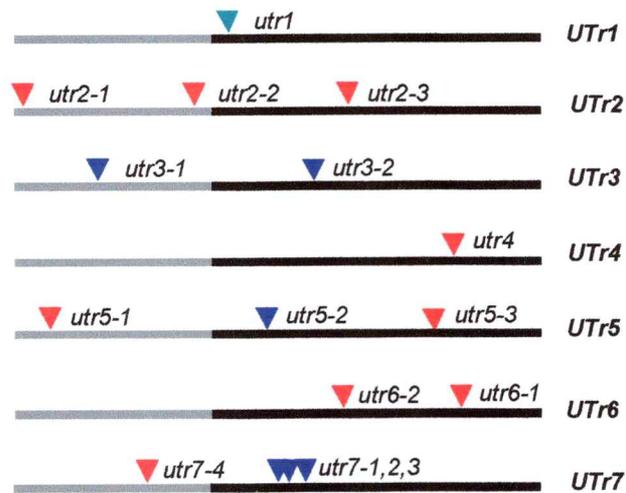
En un tubo Eppendorf de 1.5 ml se congelaron aproximadamente 100 mg de tejido con Nitrogeno líquido y se molió hasta obtener un polvo blanco. Se agregó 0.55 ml de tampón de extracción (Tris-HCl 0.01 M pH9, LiCl 0.4 M, EDTA 25 mM, SDS 1% v/v) y 0.55 ml de Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico (25/24/1). Se agitó en vortex durante 20 segundos, se dejó en hielo por un par de minutos y se centrifugó a 12.000g por 5 minutos. Para realizar una segunda extracción se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un tubo con 0.55 ml de

Isopropanol, mezclando cuidadosamente por inversión. Se precipitó a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugó por 10 minutos a 12.000g. El precipitado fue lavado con Etanol 80% y secado por 30 minutos a temperatura ambiente. El pellet se resuspendió en 100µl de tampón TE (Tris 10 mM pH8, EDTA 1mM) con RNasa A (20 µg/ml) y se incubó a 37°C por 30 minutos. Se obtuvo DNA genómico levemente degradado pero de suficiente calidad para realizar amplificaciones de PCR de hasta 1.5 kb.

### **7.3. Verificación del sitio de inserción e identificación de plantas homocigotas**

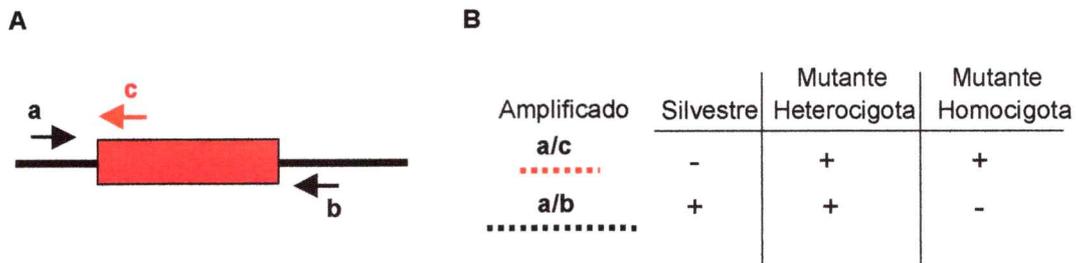
La confirmación de la presencia de la inserción se realizó mediante PCR utilizando partidores del gen cercanos al sitio de inserción y un partidor del borde izquierdo del T-DNA (Figura 3A). Con este partidor (partidor **c**) y uno de los partidores del gen (partidor **a** o **b**, según la orientación de la inserción) es posible amplificar una banda utilizando DNA genómico de la planta, solo si la inserción está en el sitio predicho (Figura 3B). Utilizando esta metodología, se confirmó la inserción en solo seis plantas: *utr1*, *utr2-1*, *utr2-2*, *utr3-1*, *utr6-1* y *utr7-1*.

Adicionalmente esta técnica permite identificar molecularmente si las plantas son homocigotas o heterocigotas para la inserción. Utilizando uno de los partidores del gen (**a** o **b**) y el partidor del T-DNA (**c**) se amplifica una banda al utilizar DNA genómico de la planta mutante sea esta heterocigota u homocigota. Sin embargo, al utilizar ambos partidores del gen (**a** y **b**) solo se amplifica una banda desde DNA genómico de plantas heterocigotas, ya que poseen uno de los alelos en estado silvestre. De esta forma las plantas homocigotas serán aquellas en las que se obtiene un amplificado solo con los partidores (**a** o **b**) y **c** (Figura 3B).



**Figura 2. Identificación de putativas mutantes insercionales en genes de transportadores de nucleótidos azúcar.**

La figura muestra los sitios putativos de inserción del T-DNA o del elemento Ds en los genes de transportadores de nucleótidos azúcar de *A. thaliana*, en las plantas de los bancos SYNGENTA (Rojo), SALK (azul) y colección Sundaesan (verde). En negro se indica la secuencia codificante y en gris la putativa región promotora. Al lado derecho de cada flecha se indica el nombre asignado a cada mutante.



**Figura 3. Metodología utilizada para verificar la inserción e identificar las plantas homocigotas.**

**A:** La figura representa un T-DNA o transposón (en rojo) que está inserto en un gen (línea negra). Las flechas negras son partidores específicos para el gen cercanos al sitio de inserción (a y b) y la flecha roja es un partidor del borde izquierdo del elemento insercional (c).

**B:** Utilizando el partidor c y el partidor a o b se amplifica una banda (amplificado rojo) solo al utilizar DNA genómico de aquellas plantas que efectivamente poseen la inserción (ya sea homocigota o heterocigota). Utilizando los partidores negros a y b es posible amplificar una banda (amplificado negro) solo al utilizar como templado DNA de plantas silvestres y heterocigota.

## **8. Análisis de DNA genómico de la mutante insercional *utr1***

### **8.1. Maxipreparación de DNA genómico para experimentos de Southern-blot**

El DNA genómico fue preparado a partir de hojas de rosetas de plantas adultas utilizando el protocolo descrito por Das (Das y col., 1990). Utilizando este protocolo se obtiene una abundante cantidad de DNA genómico sin degradación, óptimo para experimentos de Southern-blot.

### **8.2. Obtención de sondas radioactivas**

Las sondas radioactivas para los genes *UTr1*, *GUS* y *NPTII* se sintetizaron por la técnica de "random primer" utilizando el sistema "Hexalabel DNA Labeling" de Fermentas<sup>®</sup>. Con los partidores descritos en el punto 3.2 se amplificaron las secuencias de cada gen utilizando los vectores APD06f05, pCAMBIA y PRL-2, respectivamente. Los productos de PCR fueron purificados con el sistema "CONCERT" Matrix Gel Extraction System de Gibco. La mezcla de reacción para sintetizar la sonda consiste en 100ng de producto de PCR purificado, tampón de reacción que incluye los hexanucleótidos (Tris-HCl 0.25 M, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, DTT 5 mM y "random-primer" 7.5 o.u./ml), mezcla de dNTP (dGTP, dATP, dTTP 0.33 mM), 50 µCi de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (Perkin Elmer) y 5 unidades de enzima Klenow (exo-). Se incubó a 37° por 30 minutos y después se eliminaron los dNTP no incorporados mediante cromatografía líquida sobre una columna Sephadex G-50 (Amersham). La radioactividad fue cuantificada en un contador beta BECKMAN LS 5000TD.

### **8.3. Experimentos de Southern-blot**

4 µg de DNA genómico fueron digeridos con enzimas de restricción de corte infrecuente por toda la noche. Los fragmentos obtenidos fueron separados en geles de agarosa al 0.8% en tampón TAE. Una vez finalizada la electroforésis, el gel se incubó por 8 minutos en HCl 0.25N para depurinar el DNA. Luego el

gel se incubó por 30 minutos en solución denaturante (NaOH 0.4 M, NaCl 0.8 M), y por 45 minutos en solución neutralizante (Tris base 0.5 M, NaCl 1.5 M). El DNA fue transferido a una membrana de nylon cargada positivamente (Hybond-N+, Amersham) mediante capilaridad en una solución SSC 10X (SSC 1X: Cloruro de Sodio 0.15 M, Citrato de Sodio 0.015 M, pH7) por 12 horas. Luego de la transferencia el DNA se fijó a la membrana usando luz ultravioleta (Crosslinker model CL-1000, UVP). La prehibridación fue realizada a 65°C por 3 horas en tampón de prehibridación (SSC 5X, Fosfato de Sodio 0.05 M pH6.8, Denhardt's 5X (Denhardt's 1X: Polivinilpirrolidona 0.02% v/v, Albúmina de suero bovino 0.02% v/v, Ficoll 0.02% v/v ), EDTA 1 mM pH8, DNA de espermio de salmón 10 µg/ml, SDS 1% v/v). Luego las membranas fueron hibridadas a 65°C por 16 horas en tampón de hibridación (igual al de prehibridación pero con SDS 0.1%) con la sonda purificada y a una concentración entre 1 a 3 millones de cpm/ml.

En todos los casos las membranas fueron lavadas a 65°C en forma consecutiva con SSC 5X, SDS 0.1% por 15 minutos, en SSC 2X, SDS 0.1% por 30 minutos y en SSC 0.1X, SDS 0.1% por 30 minutos. Las membranas fueron expuestas a un film (KODAK) a -80°C por 12 horas o en una pantalla "Phosphor Screen" (Bio-Rad, California, USA) y analizado en un equipo Molecular Imager FX (Bio-Rad, California, USA).

## **9. Análisis de la expresión de los genes *UTr1*, *UTr2*, *UTr3* y *UTr7***

### **9.1. Preparación de RNA para experimentos de Northern-blot**

#### **Maxipreparación de RNA**

A partir de 1-2 gramos de tejido se obtuvo una preparación de RNA total utilizando el protocolo descrito por Das (Das y col., 1990).

### Preparación rápida de RNA

En aquellos casos donde no se disponía de suficiente cantidad de tejido se utilizó una preparación rápida de RNA total a partir de 100 mg de tejido, utilizando el reactivo TRIzol (Gibco-BRL) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### **9.2. Obtención de sondas radioactivas**

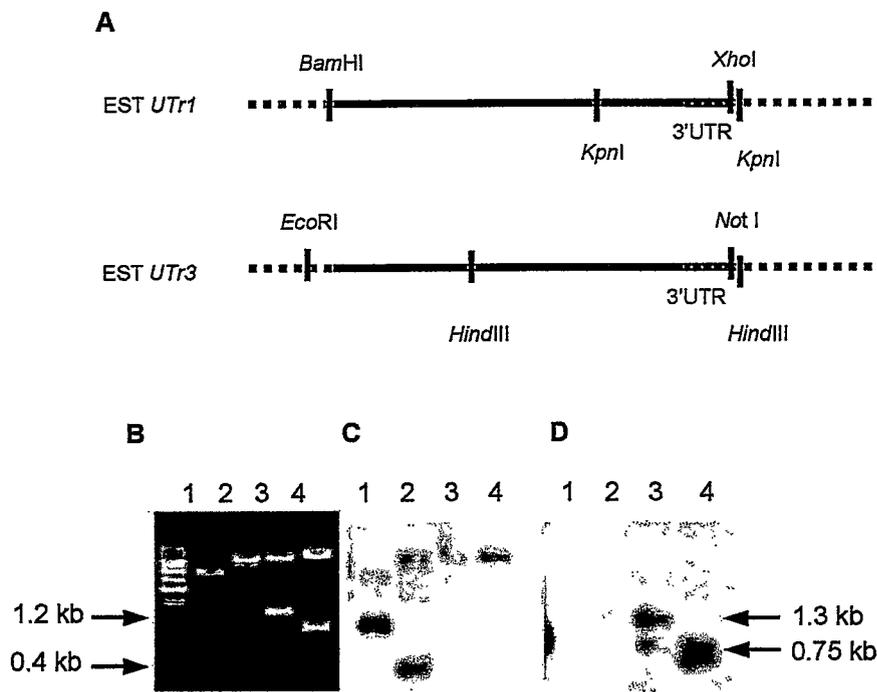
Para sintetizar las sondas radioactivas de los genes *UTr2* y *UTr7* se utilizó la técnica de "random primer" descrita previamente en el punto 8.2. Los cDNA se obtuvieron con los partidores de los extremos 5' y 3' de los genes *UTr2* y *UTr7* indicados en el punto 3.2 y los vectores GPD426UTr2-myc y pBIUTr7 respectivamente. Para la sonda del RNAr 18S de Arabidopsis se utilizó el vector H8B10F7 y los partidores SK y KS del plásmido bluescript. Los productos de PCR se purificaron mediante el sistema CONCERT Matrix Gel Extraction System (Gibco BRL).

Para la síntesis de sondas radioactivas de la región 3'UTR de *UTr1* y *UTr3*, se utilizó la técnica de marcaje por PCR descrita por Mertz y Rashtchian. En un volumen de reacción de 20  $\mu$ l se utilizaron 100 pg del vector pBluescript-3'UTR-UTr1 y del vector 249D21T7 como templado y los partidores de la secuencia 3'UTR de *UTr1* a una concentración final de 250 nM. Además la reacción contiene 3,3  $\mu$ l de una mezcla de dNTP (sin dCTP) 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ l de [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP 3,3  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, 1  $\mu$ l de enzima Taq polimerasa y tampón de reacción de la enzima. Se emplearon 30 ciclos de amplificación con una temperatura de apareamiento de 50°C y un tiempo de extensión de 1.5 minutos. Posteriormente la sonda fue purificada mediante cromatografía líquida en una columna Sephadex G-50 (Amersham) y la radioactividad cuantificada en un contador beta BECKMAN LS 5000TD.

### 9.3. Diseño de sondas específicas para los genes *UTr1* y *UTr3*

Para analizar la expresión específica de *UTr1* y *UTr3* y considerando la homología de sus secuencias codificantes, se diseñaron sondas en base a las regiones no traducidas del extremo 3' de ambos genes. Utilizando el programa "BLAST 2 Sequences" se determinó que la secuencia de 150 pb del extremo 3'UTR de *UTr1* y la secuencia de 100 pb del extremo 3'UTR de *UTr3* no presentan una identidad significativa. Las sondas radioactivas se sintetizaron mediante PCR como se describió en el punto 9.2. Para determinar su especificidad se realizó un Southern-blot con los EST de ambos genes digeridos con distintas enzimas de restricción. Los fragmentos obtenidos fueron separados por electroforesis convencional en geles de Agarosa al 1% en tampón TAE (Figura 4). Al digerir el EST de *UTr1* con las enzimas *Bam*HI/*Xho*I se libera un fragmento de 1.2 kb que corresponde al cDNA de *UTr1* con sus extremos 5'UTR y 3'UTR, mientras que con *Kpn*I se libera un fragmento de 400 pb que contiene parte del cDNA de *UTr1* y su extremo 3'UTR (Figuras 4A y 4B, carriles 1 y 2). Así mismo, al digerir el EST de *UTr3* con las enzimas *Eco*RI/*Not*I se libera un fragmento de aproximadamente 1.3 kb que contiene el cDNA de *UTr3* con sus extremos 5'UTR y 3'UTR y con la enzima *Hind*III se obtiene un fragmento de 750 pb con parte del cDNA de *UTr3* y su extremo 3'UTR (Figuras 4A y 4B, carriles 3 y 4). El protocolo utilizado para el experimento de Southern-blot corresponde al descrito en el punto 8.3. La membrana fue hibridada a 65°C por 16 horas con 10 ml de tampón de hibridación con la sonda de *UTr1* a una concentración de 3 millones de cpm/ml. Luego se lavó a 42°C por 15 minutos en SSC 5X, SDS 0.1% y luego por 30 minutos en SSC 2X, SDS 0.1%. La membrana fue expuesta en una pantalla "Phosphor Screen" (Bio-Rad, California, USA) y analizada en un equipo Molecular Imager FX (Bio-Rad, California, USA). Posteriormente se eliminó la marca radioactiva hirviendo la membrana por 10 minutos en solución SSC 0.1X, SDS 0.1% y se repitió el

procedimiento anterior pero con la sonda de *UTr3*. Como se observa en la figura 4 la sonda de *UTr1* reconoce específicamente los fragmentos que contienen el 3'UTR de *UTr1* y no los que contienen el 3'UTR de *UTr3* (Figura 4C, carriles 1, 2, 3 y 4). Por el contrario, la sonda de *UTr3* reconoce específicamente aquellos fragmentos que contienen la secuencia 3'UTR de *UTr3* y no los que contienen el 3'UTR de *UTr1* (Figura 4D, carriles 1, 2, 3 y 4).



**Figura 4. Determinación de la especificidad de las sondas de los extremos 3'UTR de *UTr1* y *UTr3*.**

**A:** El esquema muestra los sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas para digerir los EST de *UTr1* y *UTr3*.

**B:** Electroforesis de DNA del EST de *UTr1* digerido con *Bam*HI/*Xho*I (carril 1) y *Kpn*I (carril 2) y del EST de *UTr3* digerido con *Eco*RI/*Not*I (carril 3) y *Hind*III (carril 4).

**C:** Southern-blot con sonda radioactiva del 3'UTR de *UTr1*.

**D:** Southern-blot con sonda radioactiva del 3'UTR de *UTr3*.

#### 9.4. Experimentos de Northern-Blot

Para todos los experimentos de Northern-blot se utilizaron 40 µg de RNA los cuales fueron fraccionados en un gel de agarosa al 1.5% en condiciones denaturantes (Formaldehído 1.11% v/v, tampón MOPS 1X (MOPS 10X: 0.2 M, Acetato de Sodio 0.05 M, Na<sub>2</sub>EDTA 0.01 M)). Antes de cargar las muestras en el gel, se denaturaron con 3 volúmenes de buffer de denaturación (Formaldehído 8 % v/v, Formamida 65 % v/v en tampón MOPS), se incubaron a 70°C por 10 minutos y se les agregó 5 µl de una solución 1:1 (Azul de Bromofenol al 1% p/v, EDTA 1 mM, Glicerol 50% v/v : Bromuro de Etidio 0.1 mg/ml).

La metodología utilizada para la transferencia, prehibridación e hibridación fue la misma descrita para los experimentos de Southern-blot (Materiales y Métodos, sección 8.3).

Para los Northern-blot de *UTr2* y *UTr7* las membranas fueron lavadas a 65°C en forma consecutiva por 15 minutos en SSC 5X, SDS 0.1%, por 30 minutos en SSC 2X, SDS 0.1%, y por 30 minutos en SSC 0.1X, SDS 0.1%. Para los Northern-blot de *UTr1* y *UTr3*, los lavados fueron realizados a 42°C en SSC 5X, SDS 0.1% por 15 minutos y luego en SSC 2X, SDS 0.1% por 30 minutos.

Las membranas fueron expuestas en un film (KODAK) a -80°C por 12 horas o en una pantalla "Phosphor Screen" (Bio-Rad, California, USA) y analizadas en un equipo Molecular Imager FX (Bio-Rad, California, USA).

Para retirar la marca radioactiva de las membranas fueron hervidas por 10 minutos en solución SSC 0.1X, SDS 0.1%. De esta forma pudieron ser utilizadas con otra sonda radioactiva.

## 9.5. Experimentos de hibridación *in situ*

Las sondas antisentido marcadas con digoxigenina-11-UTP (digoxigenina-11-uridina-5'-trifosfato) fueron sintetizadas mediante el sistema de transcripción *in vitro* de Roche (Roche Molecular Biochemics, USA). Para la sonda antisentido de *UTr7* se utilizó el vector pBI-UTr7 linearizado con la enzima *Bam*HI y transcrito con la RNA polimerasa T3. Para la sonda antisentido de *UTr3* se utilizó el vector 249D21T7 linearizado con la enzima *Bsm*AI y transcrito con la RNA polimerasa T7.

Los tejidos utilizados (plántulas de 5 días, flores y vainas) fueron fijados y embebidos en Paraplast (VWR, Merck) según Drews (Drews y col., 1991). Se realizaron cortes de 10  $\mu$ m, y se dejaron secar toda la noche sobre portaobjetos cargados positivamente (Superfrost, Fisherbrand). Posteriormente, se realizaron las etapas de la hibridación *in situ*: desparafinización e hidratación, permeabilización, deshidratación, hibridación, lavados y tinción, según Ferrándiz (Ferrándiz y col., 2000).

## 9.6. Experimentos de RT-PCR

Las genotecas de cDNA de cotiledones, hojas, raíces, flores y callos fueron sintetizadas a partir de 1-5  $\mu$ g de RNA utilizando el sistema RT-PCR de Gibco (Invitrogen, Grand Island, NY. USA), siguiendo instrucciones del fabricante. Luego se realizaron reacciones de PCR no cuantitativos para los genes *UTr2*, *UTr7* y actina como control utilizando como templado 1  $\mu$ l del cDNA y los partidores exactos descritos en el punto 3.

## **10. Técnicas de Microscopía**

### **10.1. Fijación e inclusión de material para microscopía óptica y electrónica de transmisión**

El tejido vegetal se fijó en glutaraldehído 3% v/v en tampón Cacodilato de Sodio 0.1 M pH 7,2 por 16 horas y se lavó 3 veces por 1 hora en tampón Cacodilato de Sodio 0.1 M. Luego se incubó por 2 horas en una solución acuosa de Tetroxido de Osmio 1% v/v y se lavó con agua por 30 minutos. Posteriormente se incubó por 2 horas con una solución de Acetato de Uranilo al 1% v/v y se sometió a deshidrataciones sucesivas por 20 minutos de Acetona 50, 70, 90, 95% v/v y tres de 100%. Las muestras se incubaron en una mezcla resina:acetona (1:1) por 18 horas y luego en resina pura (Embed-812, Electron Microscopy Sciences, USA) por 6-8 horas. Se incluyeron en moldes con resina y se polimerizaron a 60°C. Los cortes semifinos (1µm) y finos (100-60 nm) fueron obtenidos en ultramicrotomo Sorvall MT-IIIB. Los cortes semifinos fueron teñidos con Azul de toluidina y PAS (sección Materiales y Métodos 6.2). Los cortes finos fueron teñidos con Acetato de Uranilo 4% en Metanol durante 2 minutos y Citrato de Plomo durante 5 min y observados en un microscopio electrónico Philips Tecnai 12 Bio-Twin (Netherland) a 80 kV.

### **10.2. Tinción con Azul de Toluidina y PAS**

#### Tinción con Azul de Toluidina

Los cortes fueron teñidos con una gota de solución de Azul de Toluidina al 0.5% v/v en Carbonato de Sodio 0.1% v/v pH 11 por 1-6 minutos a 60° C y luego lavados con agua destilada y montados con un reactivo de inclusión rápida (Entellan, Merck) (O'Brien y McCully, 1981).

### Tinción PAS ( Periodic Acid-Schiff's reaction)

Esta tinción ha sido descrita por Hotchkiss (Hotchkiss, 1948) y Hale (Hale, 1957) y permite localizar todo tipo de polisacáridos en una muestra fresca o fijada. La reacción consiste en una oxidación con Ácido Peryódico de los hidroxilos libres presentes en los azúcares a aldehídos, los cuales reaccionan con la fucsina del reactivo de Schiff.

Los cortes semifinos de tejido incluido en resina epóxica fueron colocados en portaobjetos e incubados durante 3-5 min. en Hidróxido de Sodio 0,1 N, enjuagados en agua destilada e incubados en Ácido Peryódico 1,5% v/v durante 15 min. Luego fueron enjuagados con agua destilada y se incubaron en reactivo de Schiff durante 45 min. a 30° C. Se diferenció en agua destilada durante 15 min. Los cortes fueron observados en un microscopio de transmisión Olympus IX70 acoplado a una cámara digital Sony CXC-390 3CCD, con la cuál se adquirieron las imágenes.

### **10.3. Fijación e inclusión de material para microscopía electrónica de barrido**

Las muestras se fijaron en Glutaraldehído 2.5% v/v en tampón fosfato 0.1 M pH 7.4 por 2 horas y lavadas en el mismo tampón 3 veces por una hora. Luego fueron tratadas con Tetroxido de Osmio 1% v/v en tampón fosfato 0.1 M pH 7.4 por 2 horas y lavadas por 15 minutos con tampón fosfato. Posteriormente fueron deshidratadas con lavados sucesivos de Acetona 10, 20, 50, 70, 80, 90 y 100% y secadas por punto crítico con CO<sub>2</sub> líquido. Luego se montaron en soportes de aluminio con pintura de plata y fueron cubiertas por una lámina de oro de aproximadamente 25 nm de espesor. Las muestras se observaron y fotografiaron en un microscopio de barrido Camscan.

## **11. Experimentos de Inmunofluorescencia**

### **11.1. Fijación e inclusión de material para inmunofluorescencia en cortes**

El tejido vegetal fue fijado en Paraformaldehído al 4% v/v en tampón fostafo 0,1 M pH 7,0 durante 4 horas a 4° C. Se lavó durante 2 horas en tampón fosfato 0,1 M pH 7,0 y se sometió a deshidrataciones sucesivas con Etanol 50, 70 y 95% durante 30 min cada uno (4°C). Se preincluyó en LR-White:Etanol 95% (1:1) durante 4 horas y LR-White pura (resina acrílica de alto grado; Electron Microscopy Sciences, USA) durante 6 horas. Se polimerizó en cápsulas de gelatina a 50° C durante 18 horas. Se realizaron cortes de 0.5-1 micrón en un ultramicrotomo Sorvall MT-5000 los cuales fueron colocados en portaobjetos con pocillos (ICN Biomedicals, Ohio, USA) cubiertos con Vectabond (Vector Laboratories, Peterborough, UK).

### **11.2. Inmunofluorescencia en cortes**

Se utilizó el protocolo descrito en McCartney (McCartney y col., 2000). Los cortes fueron bloqueados por una hora en tampón salino fosfato (PBS, NaCl 0.14 M, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 7.8 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM pH 7.2) 3% p/v leche (Svelty, Nestle). Luego fueron incubados por una hora a temperatura ambiente con el primer anticuerpo diluido 10 veces en PBS/leche al 3% p/v. Se lavaron 3 veces por 5 minutos en PBS y se incubaron por 1 hora en oscuridad con el segundo anticuerpo anti-IgG de rata acoplado a Isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma, UK.) diluido 100 veces en PBS/leche. Luego se lavaron 3 veces por 5 minutos en PBS y se incubaron por 5 minutos en una solución del fluorocromo Calcofluor white M2R 0.25 µg/ml (Fluorescent brightner 28, Sigma F-6259, UK). Luego de tres lavados por 5 minutos con PBS, los portaobjetos se montaron con una solución de Glicerol para observar la

fluorescencia (Citifluor AF1, Agar Scientific, UK) y se observaron en un microscopio de epifluorescencia Olympus BH-2.

### **11.3. Inmunofluorescencia en tejido completo**

Se utilizó el protocolo descrito en Willats (Willats y col., 2001). El tejido fue fijado en Paraformaldehído 4% p/v en PIPES 50 mM, EGTA 5 mM, pH 6.9 por toda la noche a 4°C y posteriormente se lavó 3 veces con PBS. Luego se procedió con la inmunofluorescencia de acuerdo al protocolo descrito en la sección 11.2.

### **12. Tinción histoquímica de la enzima $\beta$ -glucuronidasa**

Para localizar la actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa codificada por el gen *GUS* se utilizó el sustrato X-GlcA (5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido), el cual al ser hidrolizado genera un producto de color azul (Jefferson y col., 1987). Las plantas se incubaron a 37° C en oscuridad con una solución X-Glu (X-GlcA 1 mM, Dimetilformamida 0.5%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 7.0, Triton X-100 0.1%) por 12 horas o hasta que aparezca el color azul. Luego fueron fijadas por 30 minutos en solución FAA (Formaldehído 5%, Acido Acético 5%, Etanol 37.5%) e incubadas por 2 minutos en Etanol 50% y Etanol 95% hasta extraer la clorofila.

### **13. Preparación de una fracción de polisacáridos insolubles en alcohol (AIR)**

Aproximadamente 4 gr de tejido fueron congelados con N<sub>2</sub> líquido y molidos en mortero. El polvo fue resuspendido en Etanol 80% y se homogenizó por 1 minuto con un Polytron blender. El homogenizado se centrifugó a 6.000 g por 10 minutos y el residuo insoluble se lavó con Etanol 80% y luego con Etanol 100%. Luego se extrajo con agitación por 1 hora con una mezcla Metanol/Cloroformo (1:1) y se volvió a centrifugar a 6.000g por 10 minutos. El

residuo insoluble se lavó dos veces con acetona y se dejó secar a temperatura ambiente en vacío, obteniéndose aproximadamente 100 mg de AIR.

## RESULTADOS

### 1. Caracterización molecular y fenotípica de una mutante insercional de *Arabidopsis thaliana* en el gen del transportador de UDP-glucosa y UDP-galactosa *UTr1*

#### 1.1. Identificación de una planta de *A. thaliana* que posee una inserción del transposón *Ds* en el gen *UTr1*

El gen de *A. thaliana UTr1* codifica para una proteína de 36.9 KDa con varios dominios transmembrana y que posee actividad transportadora de UDP-glucosa y UDP-galactosa (Norambuena y col., 2002). Con el propósito de evaluar la participación de esta proteína en la biosíntesis de polisacáridos de pared celular *in vivo*, se buscaron plantas de *A. thaliana* mutantes en el gen *UTr1*.

En la colección de mutantes insercionales por transposones (elemento *Ds*) de Sundaresan (Parinov y col., 1999), se identificó una planta que posee una inserción del transposón *Ds* en el gen *UTr1*, la cual denominamos *utr1*. Este transposón tiene un tamaño aproximado de 6.4 Kb y posee entre sus extremos derecho e izquierdo, que contienen las secuencias invertidas repetidas necesarias para el mecanismo de transposición, el gen de la proteína neomicina fosfotransferasa II (*NPTII*) y el gen de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (*GUS*) (Figura 5A). El gen *NPTII* confiere resistencia al antibiótico kanamicina, está bajo el control del promotor 1' del T-DNA y posee la secuencia terminadora de la transcripción de la Octopina sintasa (OCS). Por otra parte el gen *GUS* posee la secuencia terminadora de la transcripción de la Nopalina Sintasa (NOS) pero no posee promotor, de tal manera que si el transposón se inserta rio abajo de una secuencia promotora y en la orientación adecuada, la expresión de *GUS* queda bajo el control de dicho promotor. Por esta razón, las plantas que poseen inserciones de este transposón se denominan "líneas atrapadoras de genes" (gene trap line).

La línea insercional identificada tiene el transposón inserto en el primer exón del gen *UTr1* (Figura 5C). La presencia y orientación de la inserción fue determinada por PCR y Southern-Blot. Para las reacciones de PCR se utilizaron partidores exactos del borde derecho del transposón (partidor c) y del segundo exón de *UTr1* en sentido reverso (partidor b) (Figura 5C). Al utilizar como templado DNA genómico de la mutante insercional *utr1* se amplifica una banda de 435 pb (Figuras 5C y 5D, carril 4). Esto no ocurre al utilizar DNA genómico de plantas silvestres o de la planta parental DsE3, la cual posee el transposón inserto en otro locus del genoma (Figura 5D, carriles 2 y 6). Por otra parte al utilizar el par de partidores a y b del gen *UTr1* (Figura 5B) y DNA genómico de plantas silvestres y de la parental DsE3, se amplifica una banda de 359 pb (Figura 5D, carriles 1 y 5). Esta banda no se amplifica al utilizar como templado DNA genómico de la mutante *utr1*, debido a que la presencia del transposón aumenta considerablemente el tamaño del fragmento de DNA genómico y la polimerasa utilizada no fué suficientemente procesiva (Figura 5D, carril 3). Adicionalmente, este resultado demuestra que la inserción es homocigota ya que ambas copias del gen presentan la inserción (Materiales y Métodos, sección 7.3). Al utilizar los partidores d y e del gen *GUS* (Figura 5C) se amplifica una banda de 1 kb solo desde DNA genómico de plantas *utr1* y no de plantas silvestres.

Para los experimentos de Southern-blot se digirió DNA genómico de plantas silvestres y *utr1* con la enzima de restricción *EcoRI*, cuyos sitios de corte se esquematizan en la figura 5B. Posteriormente el DNA fue hibridado con sondas del cDNA de *UTr1* y *GUS*. En la Figura 5E se observa que al utilizar la sonda del cDNA de *UTr1* y DNA genómico silvestre se obtiene una banda de 665 pb, generada por los sitios de corte *EcoRI* 1 y 2 (Figura 5B y 5E carril 1). Sin embargo al utilizar DNA genómico de la mutante esta banda está ausente y aparece una banda de aproximadamente 2.8 kb (Figura 5E carril 2). El aumento del tamaño de la banda se debería a la presencia del transposón ya que una banda de tamaño similar se observa al hibridar la misma membrana con la

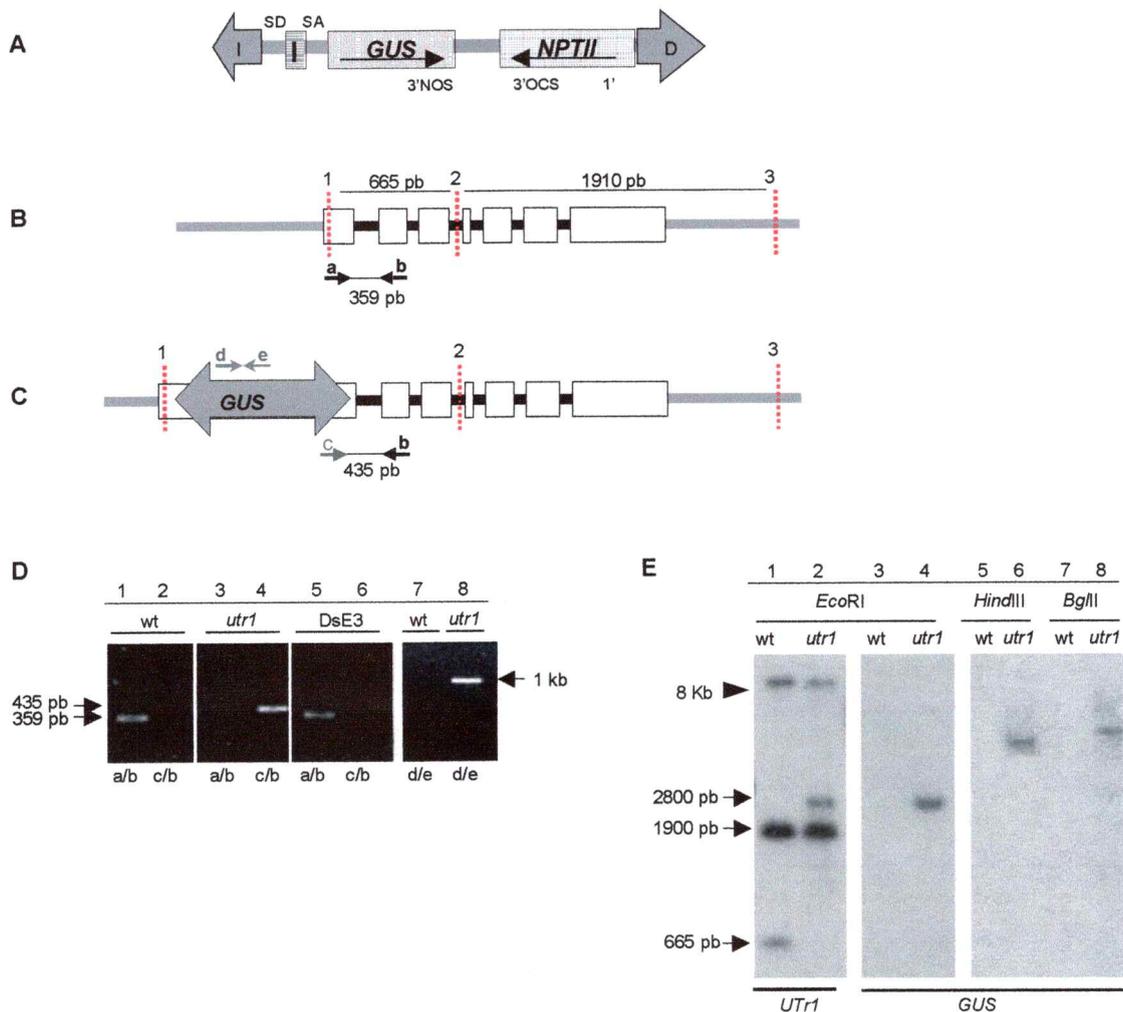
sonda del gen *GUS* (Figura 5E, carriles 3 y 4). Sin embargo, este incremento en el tamaño no corresponde con el tamaño del transposón. Una explicación posible para este resultado inesperado es la existencia de un sitio *EcoRI* dentro de la secuencia del transposón (Sundaresan, comunicación personal). Otra explicación puede ser que el gen *NPTII* se haya escindido del transposón e insertado en otro sitio en el genoma (ver Discusión).

En el carril 1 y 2 del Southern-blot (Figura 5E) se observan dos bandas adicionales: una de 1900 pb y otra de mas de 8 Kb. La primera corresponde a la secuencia generada por los sitios *EcoRI* 2 y 3, y que es reconocida por la sonda de *UTr1* (Figura 5B). La segunda correspondería a una secuencia de DNA que contiene el gen *UTr3*, ya que debido a la homología entre los genes *UTr1* y *UTr3* es esperable que la sonda utilizada reconozca ambos genes. Además al analizar una secuencia genómica de 7 Kb que incluye 2 Kb rio arriba del inicio de *UTr3*, el gen *UTr3* y 2 kb rio abajo del término de *UTr3*, no se encontraron sitios de corte para *EcoRI*.

Por otra parte, al digerir DNA genómico de plantas silvestres y *utr1* con las enzimas de restricción de corte infrecuente *HindIII* y *BglII* (cuyos sitios de corte están fuera de la secuencia genómica de *UTr1*) e hibridar con la sonda del gen *GUS*, se observa la presencia de una sola banda en los carriles de DNA genómico de la planta *utr1* (Figura 5E, carriles 5, 6, 7 y 8). Este resultado sugiere que en el genoma de la planta *utr1* existe solo una inserción del transposón.

Con el propósito de determinar el sitio exacto de la inserción, se secuenció el fragmento de PCR obtenido con los partidores *c* y *b* (Figura 5C y 5D carril 4). Al analizar la secuencia se determinó que el transposón está inserto en el nucleótido 69 que correspondería al aminoácido 23 de su secuencia proteica. Según el programa TMHMM de predicción de dominios transmembrana ([www.cbs.dtu.dk](http://www.cbs.dtu.dk)), la inserción se encontraría en la región que codifica para el primer dominio transmembrana de la proteína, el cual va desde el aminoácido 10 al 29.





**Figura 5. Caracterización molecular de la inserción en la mutante *utr1*.**

**A:** Esquema del transposón o elemento Ds. Las flechas grises representan los extremos derecho e izquierdo del transposón (D e I), SD y SA son las secuencias de consenso dadoras y receptoras de splicing respectivamente, separadas por el primer intrón de la subunidad  $\alpha$  de la proteína G de *A. thaliana* (I). Las flechas sobre los genes *GUS* y *NPTII* indica el sentido del marco de lectura.

**B:** Secuencia genómica del gen *Utr1* (1647 pb). Las cajas blancas representan los exones y las líneas negras los intrones. Las líneas punteadas rojas indican los sitios de corte de la enzima *EcoRI*.

**C:** Esquema del gen *Utr1* con el transposón (doble flecha gris) inserto en el primer exón.

**D:** Electroforesis de agarosa de los productos de PCR obtenidos al utilizar los partidores a y b (a/b), c y b (c/b) y d y e (d/e) y como templado DNA genómico de plantas silvestres (wt), mutante *utr1* (*utr1*) y parental Ds (DsE3) según corresponda.

**E:** Southern-blot de DNA genómico de planta silvestre (wt) y mutante (*utr1*) digerido con las enzimas de restricción *EcoRI*, *HindIII* y *BglII* y utilizando como sondas los cDNA del gen *UTR1*(1 y 2) y del gen *GUS* (3-8).

## 1.2. Análisis de la expresión de *UTr1* y *UTr3* en plantas silvestres y en la mutante insercional.

Al crecer las plantas *utr1* en tierra o en MS/Agar 1% sacarosa y compararlas con las plantas silvestres no se observaron diferencias morfológicas. Tampoco se observan diferencias al crecerlas en condiciones donde se induce el crecimiento y elongación celular, que es cuando existe un mayor requerimiento de polisacáridos de pared celular primaria, como por ejemplo en oscuridad (mayor crecimiento del hipocotilo) y en 3% sacarosa (mayor crecimiento de la raíz). Sin embargo, está descrito que cambios estructurales o de composición de la pared celular no siempre van acompañados de alteraciones morfológicas evidentes (Reiter y col., 1997). Por otra parte y debido a que una posible causa de la ausencia de fenotipo morfológico en plantas mutantes es la redundancia génica, se buscaron secuencias homólogas a *UTr1* (At2g02810) en la base de datos de *A. thaliana*. Encontramos un gen 83% idéntico en su secuencia de cDNA y 87% idéntico en su secuencia protéica (según el programa "BLAST 2 Sequences", [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), el cual denominamos *UTr3* (At1g14360) (Figura 6). A partir de esta información nos pareció muy relevante analizar el patrón de expresión de ambos genes en plantas silvestres y si el patrón de *UTr3* se modifica en la planta mutante.

<b>UTr1</b>	1	MEVHGSGFRRILLLLALCISGIWSAYIYQGVLOETLSTKRFGPDEKRFEHLAFLNLAQSVW
<b>UTr3</b>	1	MESHGSGLRRLVLLLSFCVAGIWAAYIYQGVLOETLSTKKGEDCKRFEHLAFLNLAQNVL
<b>UTr1</b>	61	CLLWSYIMIKLWSNAGNGGAPWWTYWSAGITNTIGPAMGIEALKYISYPAQVLAKSSKMI
<b>UTr3</b>	61	CLVWSYIMIKLWSNGGSGGAPWWTYWSAGITNTIGPAMGIEALKYISYPAQVLAKSSKMI
<b>UTr1</b>	121	PVMLMGTILVYGIRYTFPEYMCFLVAGGVSTFALLKTSSKTIKLAHPNAPLGYALCSLN
<b>UTr3</b>	121	PVMLMGSLVYGIRYTLPEYLCFLVAGGVSMFALLKTSSKTIKLAHPNAPLGYGLCFLN
<b>UTr1</b>	181	LAFDGFNTATQDSTASRYPKTEAWDIMLGMNLWGTIYNLIYMFGLPQIGIGFEATQFCKLH
<b>UTr3</b>	181	LAFDGFNTATQDSTIARYPKTNAWIMLGMNLWGTIYNMVMFGLPHGSGFEAVQFCKOH
<b>UTr1</b>	241	PEAAWDILKYCICGAVGQNFIFMTISNFGSLANTTITTRKFVSIVSSVMSGNPLSLKQ
<b>UTr3</b>	241	PEAAWDILMYCLCGAVGQNFIFLTISNFGSLANTTITTRKFVSIVSSVLSGNPLSSKQ
<b>UTr1</b>	301	WGCVSMVFGGLAYQIYLKWKKLQRMKKKQKS
<b>UTr3</b>	301	WGCVSMVFGGLSYQIYLKWRKLQRMOKKKA-

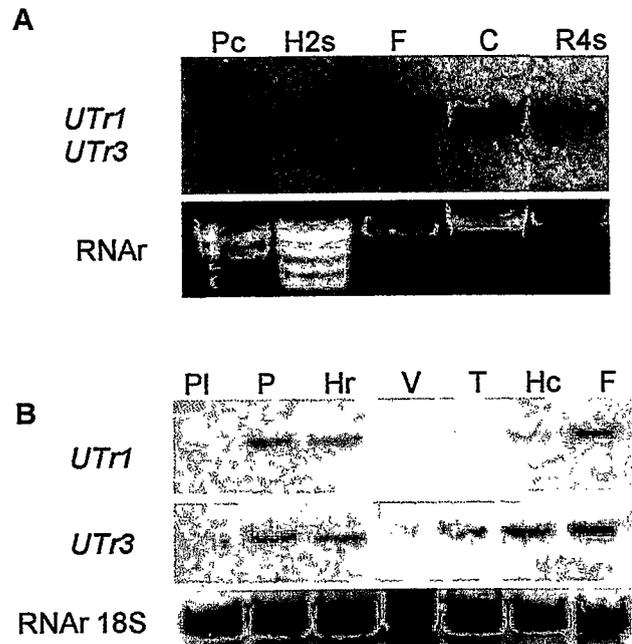
**Figura 6. Comparación de la secuencia primaria de las proteínas UTr1 y UTr3.**

Comparación de las secuencias proteicas de UTr1 (At2g02810) y UTr3 (At1g14360) utilizando el programa ClustalW. Las cajas negras muestran los aminoácidos idénticos y las cajas grises los aminoácidos de función conservada.

### **1.2.1. Análisis de la expresión de *UTr1* y *UTr3* en plantas silvestres mediante Northern-blot.**

Inicialmente la expresión del gen *UTr1* fue determinada mediante Northern-blot utilizando como sonda la secuencia codificante completa. Como se muestra en la figura 7A, el uso de esta sonda reveló la presencia de una sola banda en preparaciones de RNA de plantas completas de 14 días, hojas de rosetas de 2 semanas, flores, callos y raíces de 4 semanas. Al comparar los niveles de expresión entre los diferentes tejidos analizados, se observa una mayor expresión en flores. Sin embargo, debido a que el gen *UTr1* es prácticamente idéntico al gen *UTr3* y sus transcritos son de tamaños similares, la banda observada podría corresponder tanto al RNA de *UTr1* como al RNA de *UTr3*.

Para analizar la expresión de ambos genes en forma independiente se diseñaron sondas de los extremos 3' no traducido de cada gen. Su especificidad se demostró mediante Southern-blot utilizando los EST de *UTr1* y *UTr3* (Materiales y Métodos, sección 9.3). Como control de carga en el Northern-blot se utilizó una sonda radioactiva del RNA ribosomal 18S de *A. thaliana* (Materiales y Métodos, sección 9.2). Como se muestra en la figura 7B, ambos genes se expresan en plántulas de 10 días, plantas completas de 8 semanas, hojas de roseta, vainas, tallos, hojas caulinares y flores con un patrón similar. El tamaño de ambos transcritos es de 1.3 kb (promedio de tres experimentos independientes). Al comparar los niveles de expresión entre los tejidos, se observa una expresión levemente mayor de *UTr1* y *UTr3* en las flores (Figura 7B).



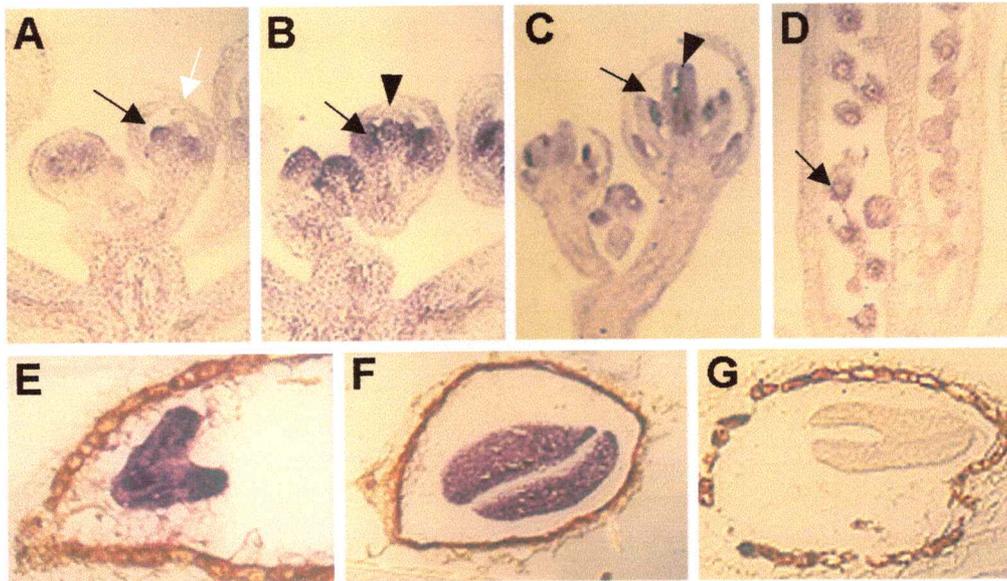
**Figura 7. Análisis de la expresión de *UTR1* y *UTR3* en plantas silvestres por Northern-blot.**

**A:** Northern-blot de *UTR1/UTR3* usando como sonda la secuencia codificante del gen *UTR1* marcada con  $^{32}\text{P}$  y RNA de plantas completas de 14 días, crecidas en MS 1% sacarosa (Pc), hojas de roseta de 2 semanas (H2s), flores (F), callos (C) y raíces de 4 semanas (R4s). En cada carril se cargaron 40  $\mu\text{g}$  de RNA total y se utilizó como marcador de carga la fluorescencia de los RNA ribosomales.

**B:** Northern-blot de *UTR1* y *UTR3* usando como sondas específicas las secuencias 3'UTR de cada gen y RNA de plántulas de 10 días crecidas en MS 1% sacarosa (PI), planta completa de 8 semanas crecidas en tierra (P), hojas de roseta de 6 semanas (Hr), vainas (V), tallos (T), hojas caulinares (Hc) y flores (F). Se utilizó como marcador de carga una sonda radioactiva del RNA ribosomal 18S de *A. thaliana*.

### 1.2.2. Expresión de *UTr1* y *UTr3* en plantas silvestres mediante hibridación *in situ*.

Mediante la técnica de hibridación *in situ* y utilizando las sondas de los extremos 3' UTR, se intentó analizar si existía una expresión diferencial en los distintos tipos de tejidos presentes en las flores. Sin embargo, no se registró señal positiva. Se utilizó entonces una sonda antisentido de un fragmento del EST de *UTr3* que contiene los últimos 183 nucleótidos de la secuencia codificante más el 3'UTR. Con esta sonda se analizaron cortes de inflorescencias, vainas y plántulas de 8 días. En los cortes de inflorescencias en estadíos 1, 2 y 3, estadíos iniciales del desarrollo floral, se observa una débil expresión en el meristema inflorescente (datos no mostrados). En estadío 5, se observa expresión de *UTr1* y/o *UTr3* en los primordios de los estambres (Figura 8A), los cuales están encerrados por los sépalos y los pétalos aún en desarrollo. Posteriormente en el estadío 6 se desarrollan en el centro de la inflorescencia los dos carpelos, que posteriormente en el estadío 7 se fusionan y dan origen al ovario (Figura 8B y 8C). En estos estadíos la expresión de *UTr1* y/o *UTr3* se observa en los primordios de los estambres y de los carpelos (Figura 8B y 8C). En flores maduras se observa expresión en los óvulos dentro del ovario (Figura 8D). En ningún estadío se observó expresión en pétalos o sépalos. Al analizar cortes de vainas se observa una fuerte expresión en embriones en estadío de corazón y cotiledones doblados (Figuras 8E y 8F). La figura 8G corresponde al control negativo al utilizar la sonda sentido. En cortes de plántulas de 8 días observamos expresión en el meristema foliar y en las hojas en formación (datos no mostrados). Considerando la homología entre *UTr1* y *UTr3* la sonda utilizada en estos experimentos probablemente reconoce a ambos genes. Aún así, estos resultados sugieren que *UTr1* y/o *UTr3* no tienen una expresión constitutiva y se expresan solo en determinados tipos celulares y en etapas tempranas durante el desarrollo.



**Figura 8. Análisis de la expresión de *UTr3/UTr1* en plantas silvestres por hibridación *in situ*.**

**A:** Corte longitudinal de una inflorescencia en estadio 4 y 5. Se observa expresión en los primordios de los estambres (flecha negra). La flecha blanca muestra los sépalos y pétalos que están encerrando a los primordios de estambres y al meristema inflorescente.

**B:** Corte longitudinal de inflorescencia en estadio 6. Se observa expresión en los primordios de los carpelos (cabeza de flecha) y continúa la expresión en los primordios de los estambres (flecha negra).

**C:** Corte longitudinal de inflorescencia en estadio 7. Los carpelos se han extendido y se están fusionando. Se mantiene la expresión en los carpelos (cabeza de flecha) y en los estambres (flecha negra).

**D:** Corte longitudinal del ovario.

**E:** Embrión en estadio de corazón.

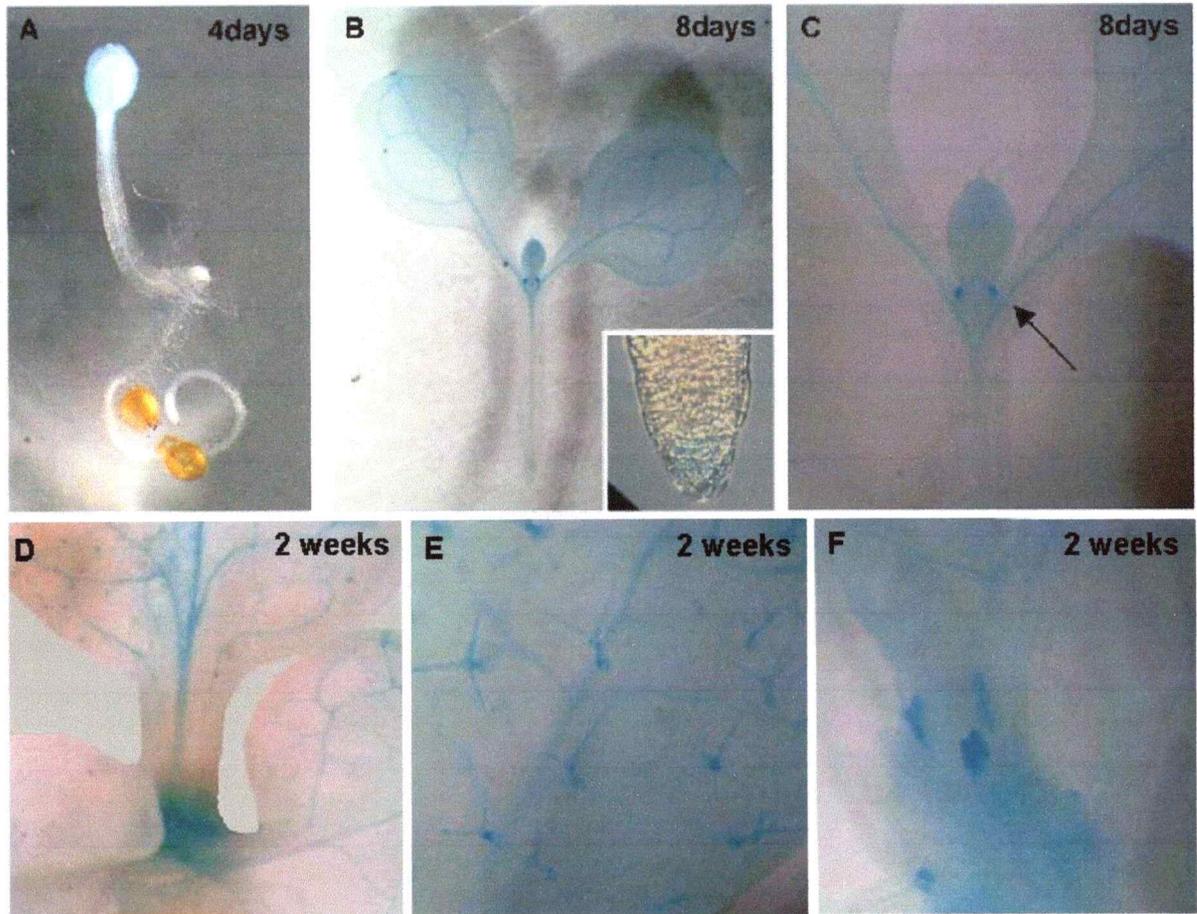
**F:** Embrión en estadio de cotiledones doblados.

**G:** Control negativo. Embrión en estadio torpedo hibridado con la sonda sentido.

### **1.2.3. Monitoreo de la actividad del promotor de *UTr1* mediante el análisis de la expresión de *GUS* en la mutante insercional.**

La mutante insercional es una herramienta adicional para analizar la expresión específica del gen *UTr1* debido a que en ella el gen reportero *GUS* está bajo la dirección del promotor de *UTr1*. En plántulas mutantes de 4 y 8 días *GUS* se expresa en los cotiledones, particularmente en las estipulas, en el sistema vascular y en la punta de la raíz (Figura 9A, 9B, 9C). El mismo patrón se observa en plantas de 4 y 8 días crecidas en oscuridad (datos no mostrados). En plantas de 2 semanas, la expresión se mantiene en el sistema vascular y se observa además en la zona de abscisión de las hojas, en los tricomas y en las glándulas de néctar ubicadas en la base de las flores (Figura 9D, 9E, 9F). Estos resultados muestran que el gen *UTr1* se expresa en tejidos y tipos celulares específicos, complementando los resultados obtenidos por los experimentos de hibridación *in situ*.

A diferencia de lo obtenido en los experimentos anteriores, la expresión de *GUS* en las flores es muy baja. Una posible explicación para esta semejanza es la participación de los intrones en la regulación de la expresión del gen *UTr1*, fenómeno que se ha descrito para algunos genes de plantas. Por ejemplo, en fusiones del promotor de  $\alpha$ -tubulina de arroz con el gen reportero *GUS* se ha observado que la presencia del primer intrón del gen es necesaria para obtener un alto nivel y un patrón correcto de expresión (Fiume y col., 2004; Rose, 2002).



**Figura 9. Expresión de *GUS* en la mutante *utr1*.**

**A:** Plántula de 4 días. Se observa expresión de *GUS* en los cotiledones y débilmente en la punta de la raíz.

**B y C:** Plántula de 8 días. Se observa expresión de *GUS* en el sistema vascular (B), en la punta de la raíz (inserto) y en las estípulas en la base de las hojas (flecha negra)(C).

**D, E y F:** Planta de dos semanas. La expresión esta restringida al sistema vascular, la zona de abscisión en la base de las hojas (D), los tricomas (E) y las glándulas de néctar en las flores (F).

#### 1.2.4. Análisis de la expresión de *UTr1* en la mutante insercional

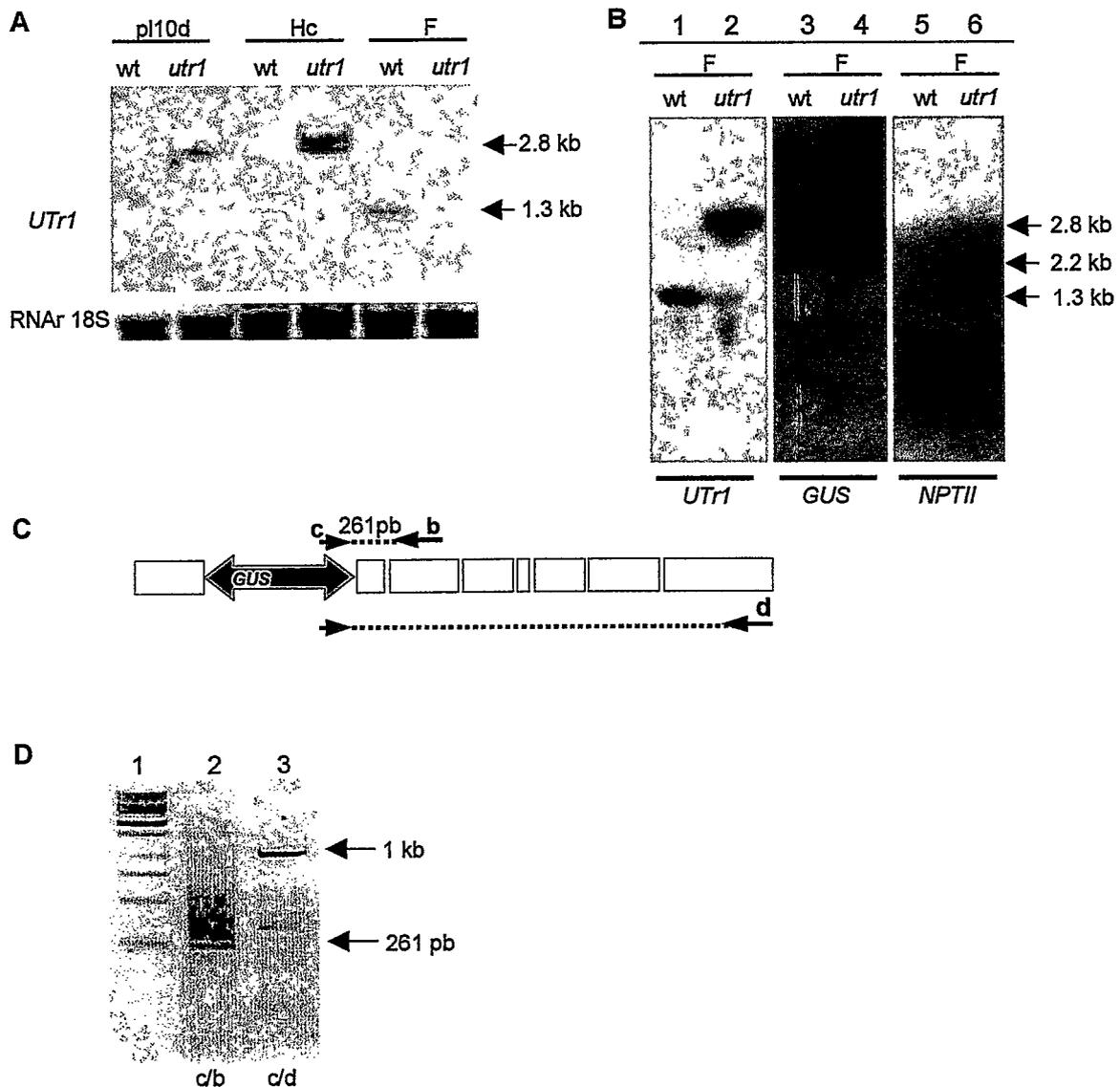
Utilizando la sonda específica para *UTr1* se analizó la expresión de este gen en una preparación de RNA total de plantas silvestres y de la línea *utr1*. Los RNA fueron obtenidos de plántulas de 10 días crecidas en MS 1% sacarosa, hojas caulinares y flores. En los RNA provenientes de plantas *utr1* no se observa la banda de 1.3 kb presente en el RNA de plantas silvestres, en cambio aparece un transcrito de aproximadamente 2.8 kb (promedio de tres experimentos independientes) (Figura 10A). La presencia de este RNA puede ser explicada por una fusión entre el RNA de *UTr1* y el RNA de *GUS* ya que el transposón posee sitios aceptores de splicing delante de la secuencia del gen *GUS* que facilitan la generación de proteínas de fusión (Sundaresan y col., 1995) (Figura 5A). Para evaluar esta posibilidad, se realizó un Northern-blot con sondas cDNA de los genes *GUS* y *NPTII*. Al hibridar RNA de flores con la sonda de *GUS* se observa la presencia de una banda de aproximadamente 2.8 kb solo en el RNA de plantas *utr1* (Figura 10B, carriles 3 y 4). Esta banda es similar al transcrito observado al hibridar la misma membrana con la sonda de *UTr1* (Figura 10B, carriles 2 y 4). Al utilizar una sonda del gen *NPTII* se observa una banda de aproximadamente 2.2 kb en el RNA de plantas mutantes *UTr1* (Figura 10B, carriles 5 y 6). Estos experimentos sugieren que el transcrito de 2.8 kb contiene secuencias de los genes *UTr1* y *GUS*.

Para caracterizar mejor este transcrito, se realizó un RT-PCR utilizando combinaciones de partidores del transposón y del gen (Figura 10C). Con el partidor del borde derecho del transposón (c) y el partidor reverso del segundo exón del gen *UTr1* (b), se amplifica una banda de 261 pb. Con el partidor c y un partidor del extremo 3' del gen (d) se amplifica una banda de aproximadamente 1 kb (Figura 10D). Entonces, el transcrito de 2.8 kb observado en los experimentos de Northern-blot con la sonda del extremo 3'UTR de *UTr1* estaría constituido por parte del primer exón de *UTr1*, el gen *GUS*, al menos una parte del extremo derecho del transposón y el resto de la secuencia del gen *UTr1*

incluyendo el extremo 3'UTR. Además este resultado proporciona otra evidencia para suponer que el gen *NPTII* se ha escindido del transposón (ver Discusión).

#### **1.2.5. Análisis de la expresión de otros transportadores de nucleótidos azúcar en la mutante insercional.**

Para descartar que la ausencia de fenotipo sea por la sobreexpresión de otros genes de función similar, se analizó la expresión de otros transportadores de nucleótidos azúcar. Al hibridar la misma membrana del Northern-blot de la figura anterior (Figura 10A) con la sonda para *UTr3* se observa la presencia de una sola banda de igual intensidad y tamaño tanto en los RNA de plantas silvestres como de plantas mutantes (Figura 11A, panel inferior). Al analizar la expresión de los genes *UTr2* y *UTr7* en la mutante *utr1* se observa un patrón de expresión similar en todos los tejidos analizados (plantas silvestres y mutantes *utr1*) (Figura 11B y 11C). Por lo tanto la ausencia del transcrito normal de *UTr1* no produce un aumento en la expresión de otros transportadores de nucleótidos azúcar.



**Figura 10. Análisis de los transcritos de *UTr1* en la mutante *utr1*.**

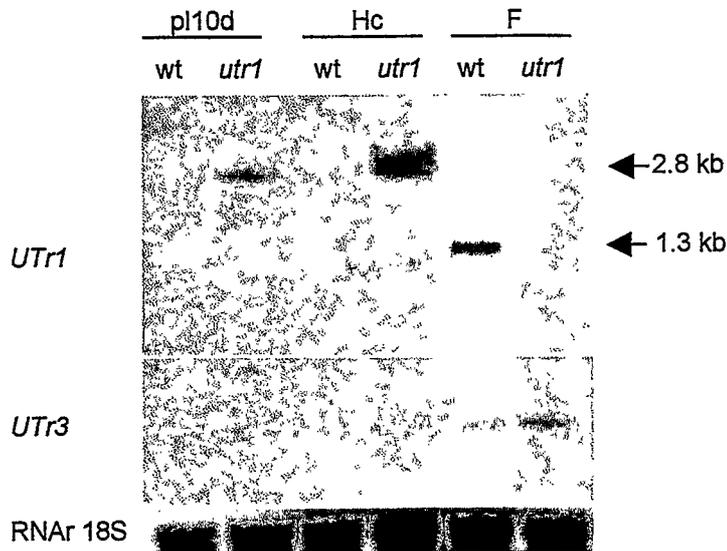
**A:** Northern-blot de *UTr1*. En cada carril se cargaron 40 µg de RNA total de plántulas de 10 días crecidas en MS 1% sacarosa (PI), Hojas caulinares (Hc) y Flores (F) obtenidos de plantas silvestres (wt) y de la mutante *utr1*.

**B:** Northern-blot de *UTr1*, *GUS* y *NPTII*. En cada carril se cargaron 40 µg de RNA total de Flores (F) obtenidos de plantas silvestres (wt) y de la mutante *utr1*.

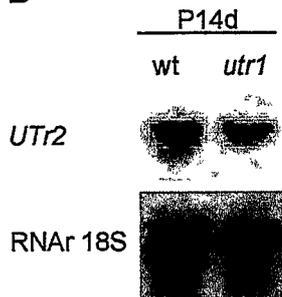
**C:** Esquema de la secuencia cDNA del gen *UTr1* obtenida por transcripción reversa. Las cajas blancas representan los exones y la doble flecha gris el transposón. Con una flecha y una letra minúscula se señalan los partidores utilizados en los experimentos de RT-PCR.

**D:** Electroforesis de agarosa al 1% para analizar los productos de RT-PCR a partir de RNA de la planta mutante *utr1*. El carril 1 corresponde al marcador de 1 kb.

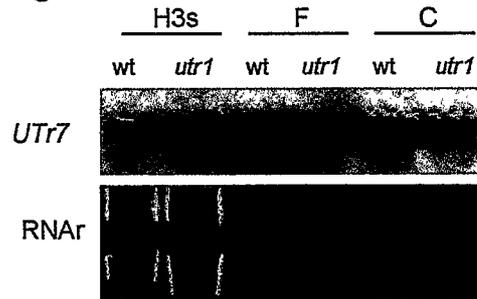
**A**



**B**



**C**



**Figura 11. Análisis de la expresión de *UTr3*, *UTr2* y *UTr7* en la mutante *utr1*.**

**A:** Northern-blot de *UTr1* y *UTr3*. En cada carril se cargaron 40  $\mu$ g de RNA total de plántulas de 10 días crecidas en MS 1% sacarosa (pl10d), hojas caulinares (Hc) y flores (F) obtenidos de plantas silvestres (wt) y mutante *UTr1* (*utr1*). La membrana fue hibridada con la sonda específica de *UTr1*, luego con la sonda específica de *UTr3* y finalmente con una sonda para el RNAr 18S.

**B:** Northern-blot de *UTr2*. En cada carril se cargaron 40  $\mu$ g de RNA total de plantas de 2 semanas crecidas en MS 1% sacarosa (P2s) y plantas de 4 semanas (P4s) obtenidos de plantas silvestres y mutante *utr1*. Se utilizó como marcador de carga una sonda radioactiva del RNA ribosomal 18S de *A. thaliana*

**C:** Northern-blot de *UTr7*. En cada carril se cargaron 40  $\mu$ g de RNA total de plantas completas de 2 semanas crecidas (P), hojas de 3 semanas (H3s), flores (F) y callos (C) obtenidos de plantas silvestres y mutante *utr1*. Se utilizó como marcador de carga la fluorescencia de los RNA ribosomales.

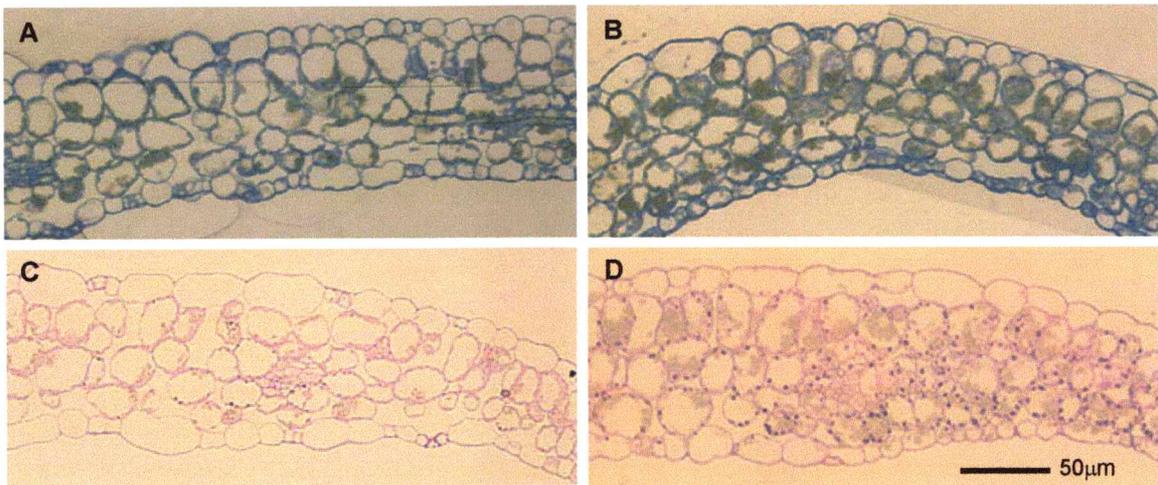
### **1.3. Estudio morfológico de la mutante *utr1* utilizando técnicas de microscopía.**

#### **1.3.1. Estudio morfológico mediante microscopía óptica.**

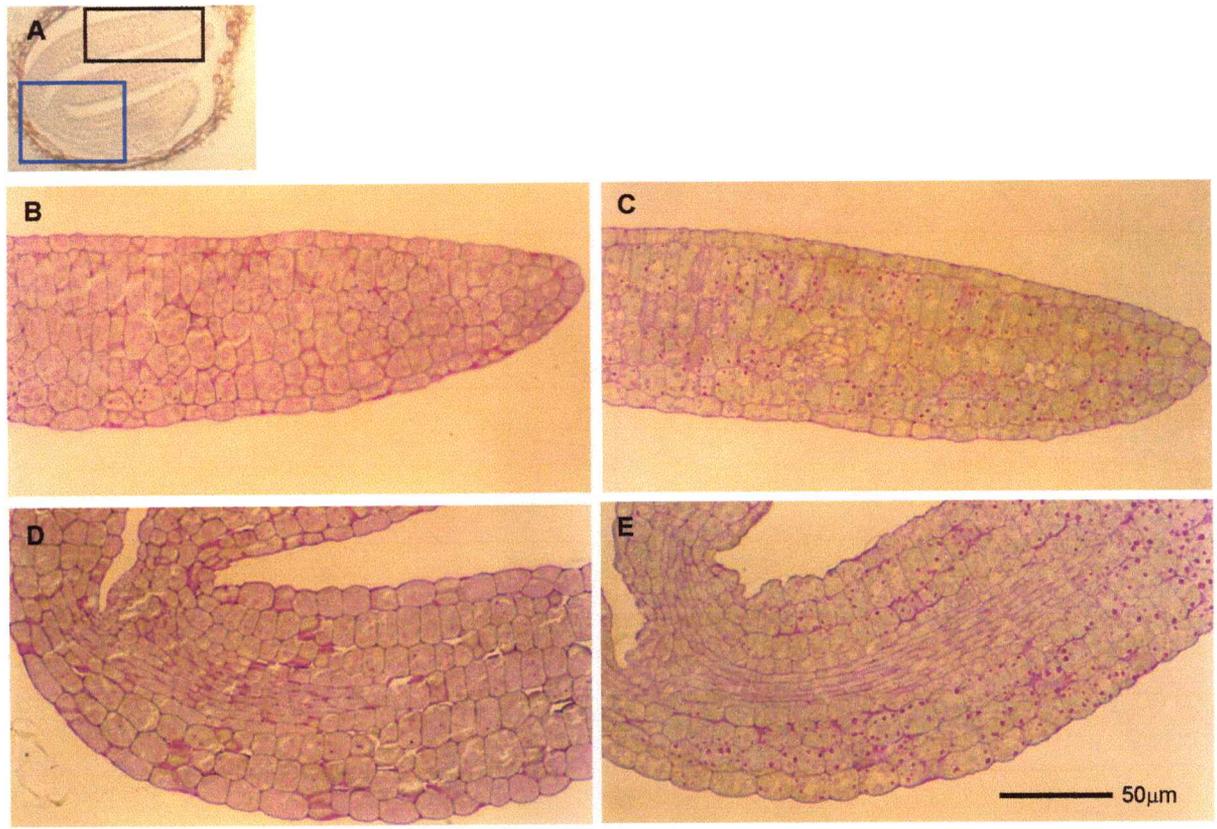
Con el fin de analizar la existencia de un fenotipo a nivel de tejido, se prepararon cortes de cotiledones que sabemos expresan *UTR1* y los analizamos por microscopía óptica. Para ello se crecieron plántulas de *A. thaliana* en medio MS 1% sacarosa por 5 días, luego se fijaron y se incluyeron en resina epóxica (sección Materiales y Métodos 10.1). El tejido se orientó de tal forma de obtener cortes longitudinales semifinos de cotiledones. Estos fueron teñidos con azul de toluidina y observados al microscopio. Como se muestra en la figura 12, las células del parenquima en empalizada y esponjoso de los cotiledones de plántulas mutantes *utr1* tienen un citoplasma mucho más teñido que los cortes de plántulas silvestres (Figuras 12A y 12B). Al utilizar PAS, una tinción general para polisacáridos, (sección Materiales y Métodos 10.2) también se observa un patrón de tinción diferente en las células de las plántulas mutantes observándose además un gran número de puntos color púrpura que corresponderían a gránulos de almidón (Figuras 12C y 12D).

Siguiendo la misma metodología se analizaron embriones en estadio de cotiledones doblados (Figura 13A). En los cortes teñidos con PAS se observó el mismo patrón, esto es un citoplasma más denso y una mayor cantidad de puntos púrpura, tanto en los cotiledones (Figuras 13B y 13C) como en la radícula (órgano embrionario que da origen al hipocotilo y a la raíz) (Figuras 13D y 13E).

En otros tejidos analizados como hipocotilo de plántulas de 5 días y hojas de plantas de 2 semanas no se observaron diferencias en relación con las plantas silvestres (datos no mostrados).



**Figura 12. Análisis morfológico de cotiledones de la mutante *utr1* por microscopía óptica.**  
**A y B:** Cortes longitudinales de cotiledón de plántulas de 5 días Ler-0 wt y *utr1* teñidos con azul de toluidina.  
**C y D:** Cortes longitudinales de cotiledón de plántulas de 5 días Ler-0 wt y *utr1* teñidos con PAS.



**Figura 13. Análisis morfológico de embriones de la mutante *utr1* por microscopía óptica.**

**A:** Corte de embrión wt en estadio de cotiledones doblados sin teñir. El recuadro negro indica la zona de los cotiledones (figuras B y C) y el recuadro azul destaca la región próxima de la radícula (figuras D y E).

**B y C:** Corte de cotiledones wt y mutante *utr1* respectivamente.

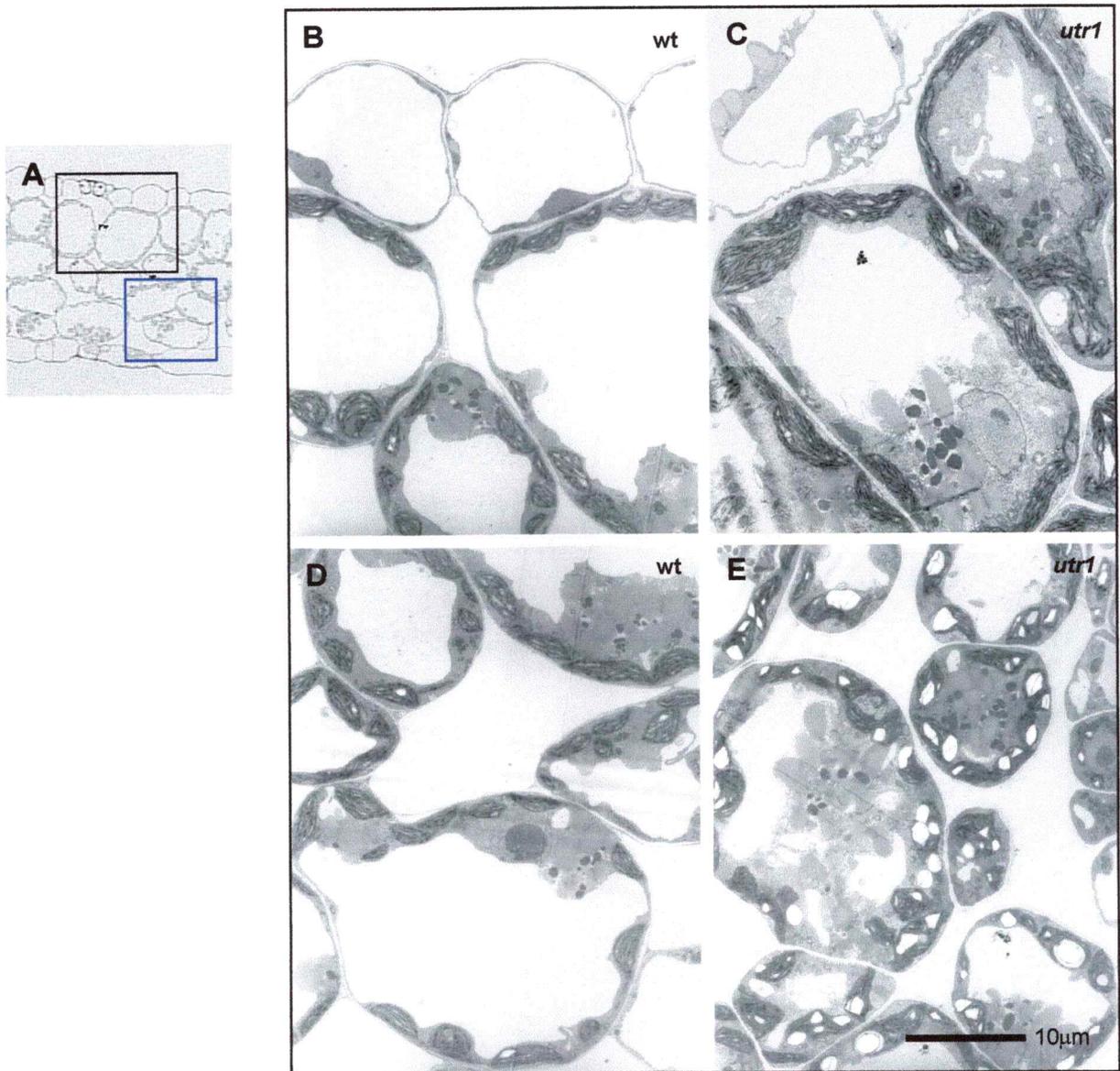
**D y E:** Cortes en la radícula de embriones wt y mutante *utr1* respectivamente.

### 1.3.2. Estudio morfológico mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido

Para analizar la ultraestructura de las células de los cotiledones, se obtuvieron cortes finos de las preparaciones anteriores, y se prepararon para ser visualizados por microscopía electrónica (Materiales y Métodos, sección 10.1). Como se observa en la figura 14, las células del parénquima en empalizada de los cotiledones de las plantas *utr1* de 5 días tienen un citoplasma más denso, con vacuolas más pequeñas y un mayor número de cuerpos lipídicos (Figuras 14B y 14C). Estas diferencias también se observan en las células del esponjoso (Figuras 14D y 14E). Además, en las células del esponjoso se observa un aumento del número y tamaño de los gránulos de almidón en el interior de los cloroplastos, en relación con las células de plántulas silvestres, corroborando lo observado por microscopía óptica en los cortes teñidos con PAS. Las figuras 15A y 15B muestran una magnificación de un cloroplasto representativo de células de cotiledones de plantas silvestres y *utr1*, respectivamente. Se aprecia el gran tamaño de los gránulos de almidón reconocidos por su morfología característica (Ledbetter y Porter, 1970) (Figura 15B y 15C). La figura 15D muestra una magnificación de los cuerpos lipídicos presentes en las células de las plántulas *utr1* donde también se reconocen los glioxisomas.

Al comparar las imágenes de microscopía electrónica de transmisión de cortes de embriones silvestres y *utr1* se observa que estos últimos también poseen un aumento en el número y tamaño de los gránulos de almidón de los cloroplastos (Figura 16A y 16B). Esta notoria diferencia es relevante ya que los materiales de reserva mayoritarios en los embriones maduros son lípidos y proteínas (Lin y col., 1999; Meinke y col., 1994). Además los cuerpos proteicos presentes en los embriones *utr1* tienen una morfología diferente a los de los embriones silvestres (Figura 16C y 16D).

Al analizar las plántulas utilizando microscopía electrónica de barrido no se observan diferencias en la superficie de las células de la epidermis de cotiledones, hojas o del hipocotilo, ni en la superficie de los tricomas, como se ha reportado para otras mutantes en pared celular (Figura 17) (Vanzin y col., 2002; Madson y col., 2003).

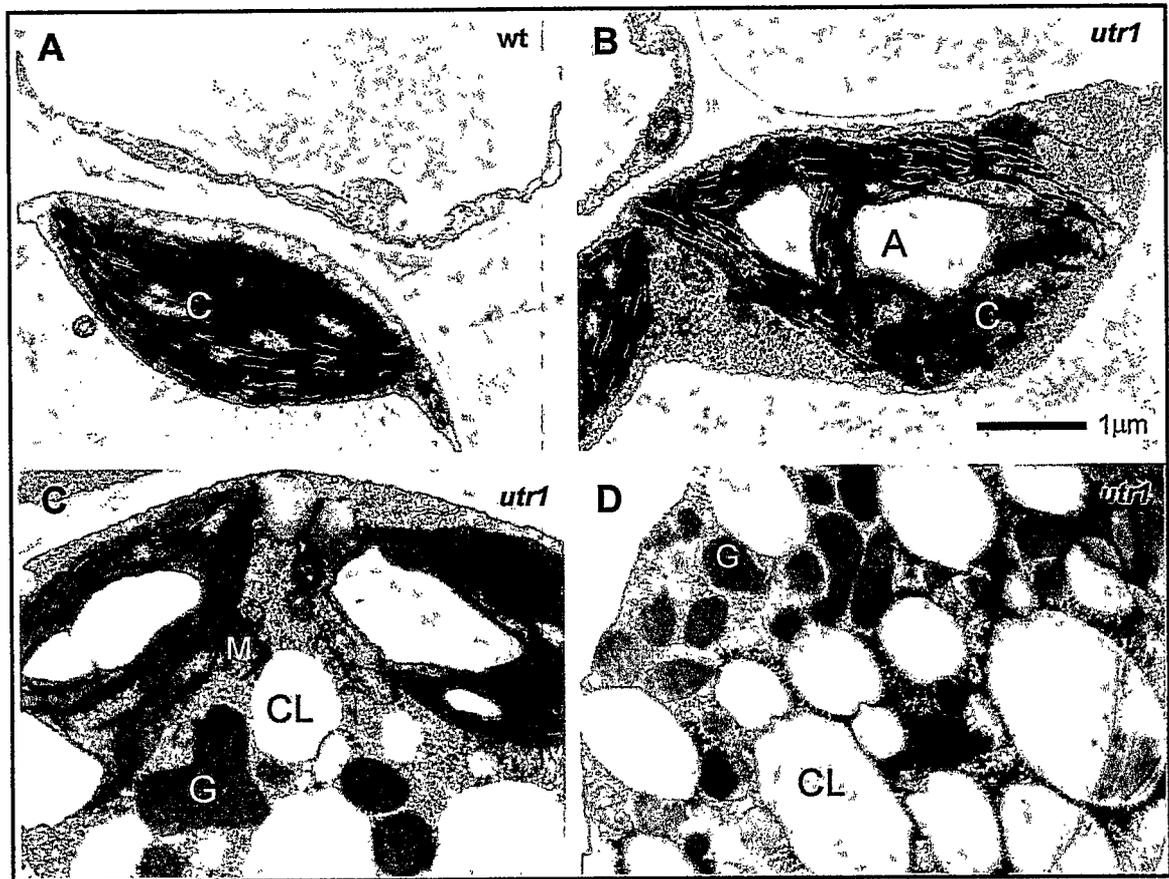


**Figura 14.** Análisis morfológico de la mutante *utr1* por microscopía electrónica de transmisión.

**A:** Corte longitudinal de cotiledón visualizado por microscopía óptica donde se muestra en un recuadro negro las células del parenquima en empalizada y en el recuadro azul las células del esponjoso.

**B y C:** Células del parenquima en empalizada de plantas wt y *utr1* respectivamente.

**D y E:** Células del esponjoso de plantas wt y *utr1* respectivamente.

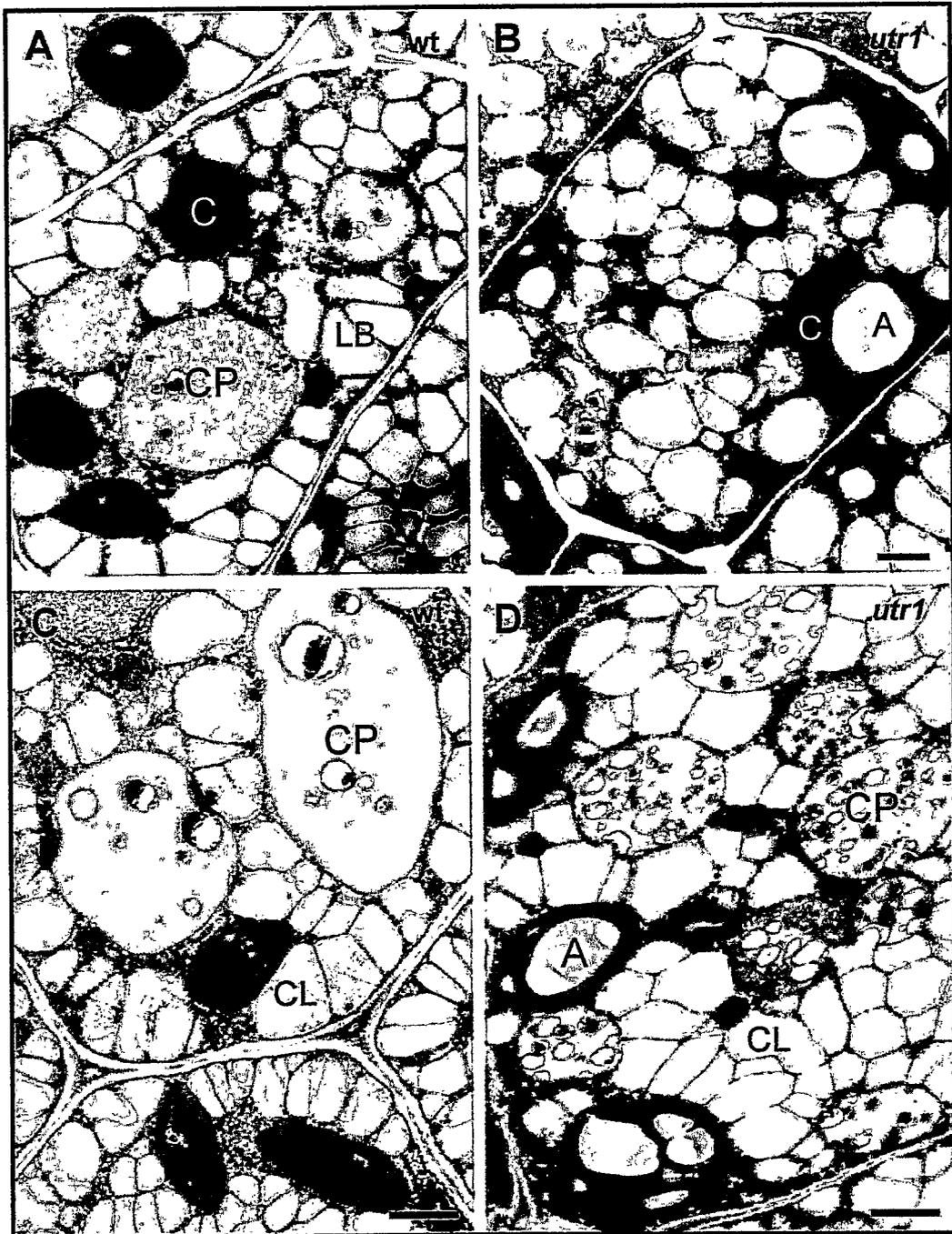


**Figura 15.** Análisis morfológico de la mutante *utr1* por microscopía electrónica de transmisión.

**A:** Cloroplasto (C) de células del esponjoso de cotiledones de plántulas silvestres

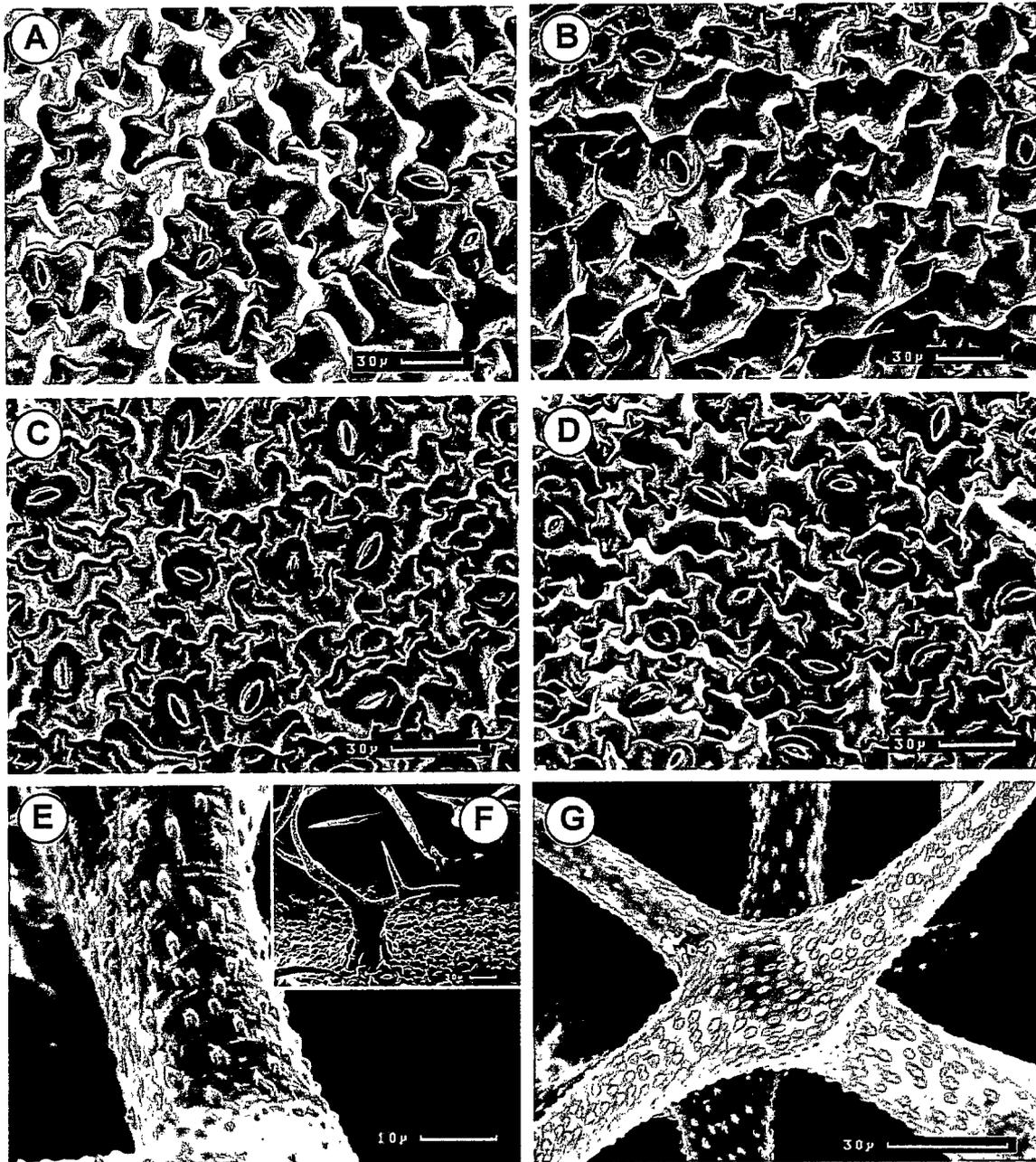
**B:** Cloroplasto (C) de células del esponjoso de cotiledones de plántulas *utr1*; A: Gránulo de almidón.

**C y D:** Detalle de célula de esponjoso de cotiledones de plántulas *utr1*; CL: Cuerpo Lipídico, G: Glioxisoma, M: Mitocondria.



**Figura 16.** Análisis morfológico de embriones *utr1* por microscopía electrónica de transmisión.

A y C: Células de cotiledones de embriones silvestres en estadio de cotiledones doblados.  
 B y D: Células de cotiledones de embriones silvestres en estadio de cotiledones doblados; A: Gránulo de Almidón, CL: Cuerpo Lipídico, CP: Cuerpo proteico, C: Cloroplasto.



**Figura 17. Análisis estructural de la mutante *utr1* por microscopía de barrido.**

**A y B:** Epidermis de cotiledón de plántulas wt y *utr1* respectivamente.

**C y D:** Epidermis de hojas de plántulas wt y *utr1* respectivamente.

**E y G:** Superficie de los tricomas de plántulas wt y *utr1* respectivamente.

**F:** Tricoma de planta wt.

#### **1.4. Análisis de la estructura y composición de la pared celular en la mutante *utr1*.**

El estudio de modificaciones estructurales de la pared celular de *A. thaliana* es difícil por la complejidad de los polisacáridos y por la falta de información sobre la composición de hemicelulosas y pectinas en los diferentes tejidos. Además, existe una limitación técnica dado por las metodologías disponibles para ello. Por esta razón se ha propuesto utilizar técnicas inmunológicas para el análisis estructural de pectinas y técnicas espectroscópicas para determinar cambios en la composición de la hemicelulosa xiloglucano.

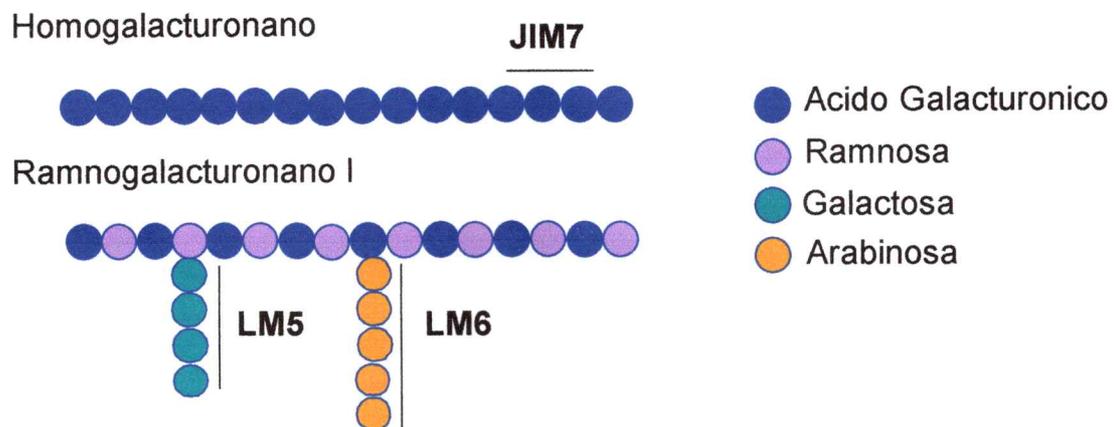
##### **1.4.1. Análisis de pectinas mediante inmunofluorescencia con anticuerpos antipolisacáridos de pared celular.**

Utilizando anticuerpos monoclonales que reconocen epitopes específicos de la cadena principal o de cadenas laterales (Materiales y Métodos, sección 4), se analizaron plántulas de 5 días *utr1* y silvestres mediante dos aproximaciones experimentales diferentes: inmunofluorescencia en cortes de cotiledones e inmunofluorescencia en tejido completo de raíces. Además se analizó el mucílago rico en pectinas secretado por las semillas embebidas en agua.

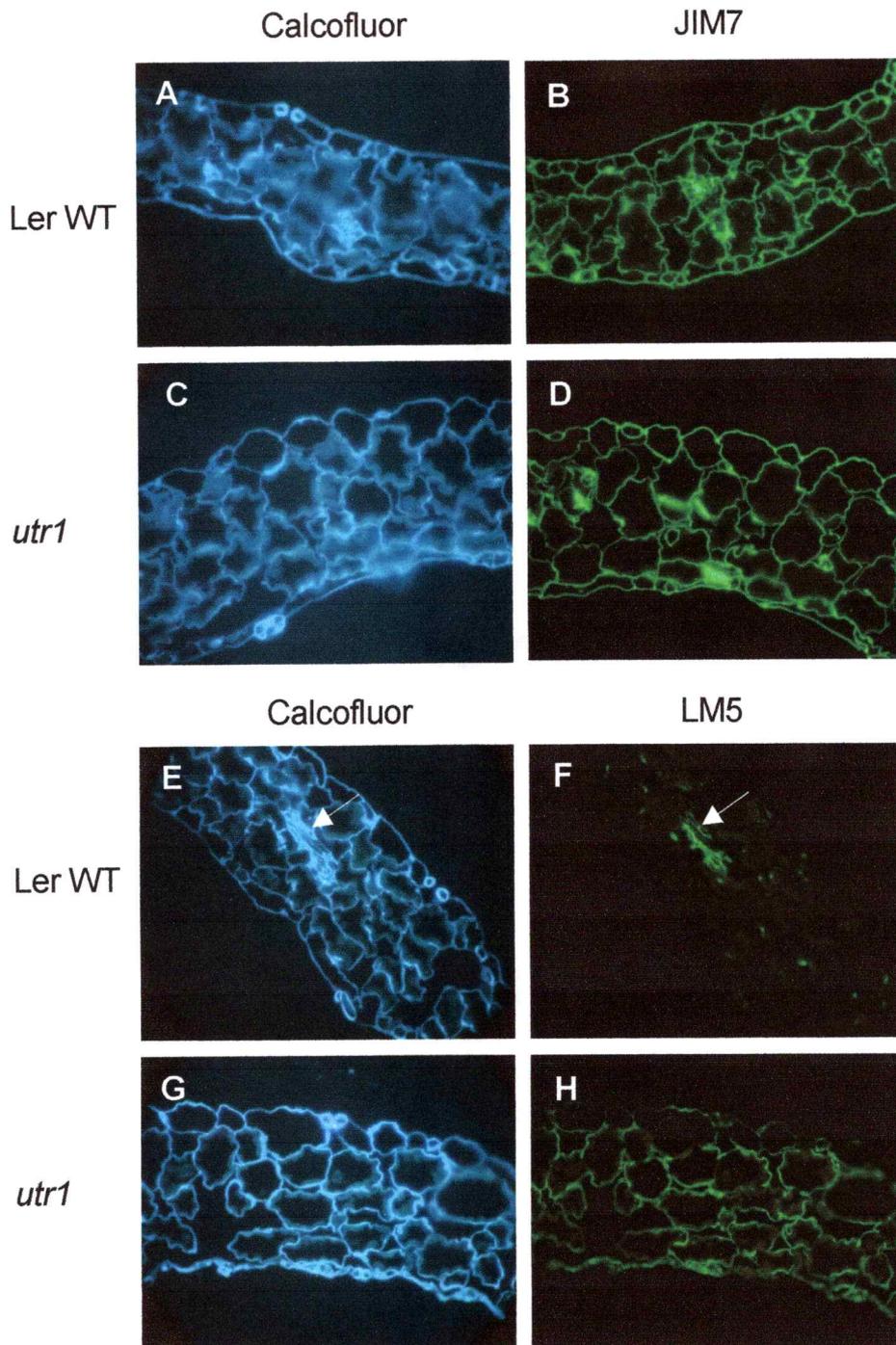
Al realizar una inmunofluorescencia en cortes de cotiledones de plántulas silvestres y *utr1* con el anticuerpo monoclonal anti-homogalacturonano JIM7 (Figura 18) se observa una marca fluorescente en los contornos de todas las células, similar a la marca fluorescente obtenida con calcofluor (Figuras 19A, 19B, 19C y 19D). Este último es un reactivo que se une a la celulosa y por lo tanto destaca toda la pared celular. Al utilizar el anticuerpo monoclonal LM5 que reconoce 4 galactosas de la cadena (1→4)-β-D-galactosa de la pectina ramnogalacturonano I (Figura 18), se observa en los cortes de cotiledones

silvestres una marca fluorescente solo en las paredes de las células que conforman los haces vasculares. Sin embargo en los cortes de los cotiledones de plántulas *utr1* la fluorescencia se observa en la mayoría de los contornos de las células tanto del parenquima como del esponjoso (Figuras 19F y 19H). Con una mayor magnificación se aprecia que la marca fluorescente dada por LM5 no es continua en la pared celular (Figura 20C y 20D) y está ausente en la pared de las células de la epidermis superior (Figura 20A y 20B).

Estos resultados sugieren que en la mutante *utr1* existen diferencias en las cadenas laterales de (1→4)-β-D-galactosa de la pectina ramnogalacturonano I ya que el anticuerpo presenta una mayor unión en relación con las plántulas silvestres.



**Figura 18. Estructura de las pectinas homogalacturonano y ramnogalacturonano I.** La figura muestra los epítomos de los anticuerpos JIM7 (cadenas de ácido galacturónico), LM5 (cadenas de (1→4)-β-D-galactosa) y LM6 (cadenas de (1→5)-α-L-arabinosa).

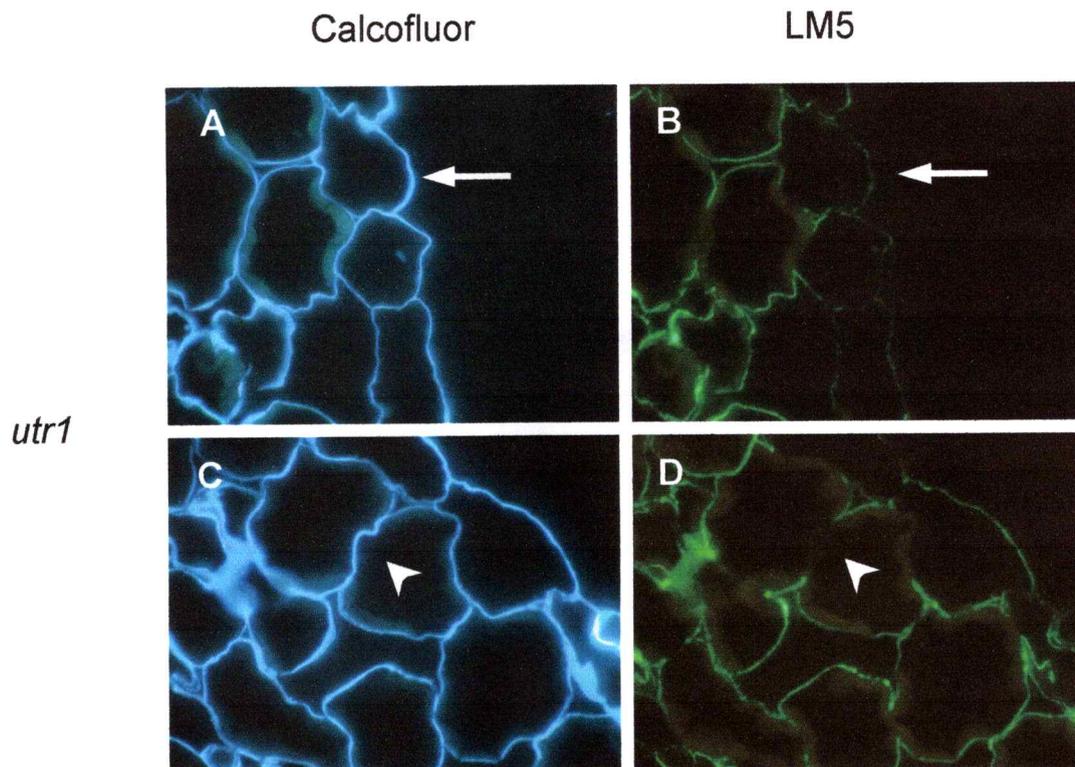


**Figura 19.** Imágenes de inmunofluorescencia en cortes de cotiledones con los anticuerpos JIM7 y LM5.

B y D: Inmunofluorescencia con el anticuerpo JIM7 en cortes de cotiledones silvestres Ler-0 y *utr1*.

F y H: Inmunofluorescencia con el anticuerpo LM5 en cortes de cotiledones silvestres Ler-0 y *utr1*. La flecha blanca indica un haz vascular presente en el corte.

A, C, E y G: Imágenes de fluorescencia al ultravioleta de la tinción con calcofluor como control de cada corte.



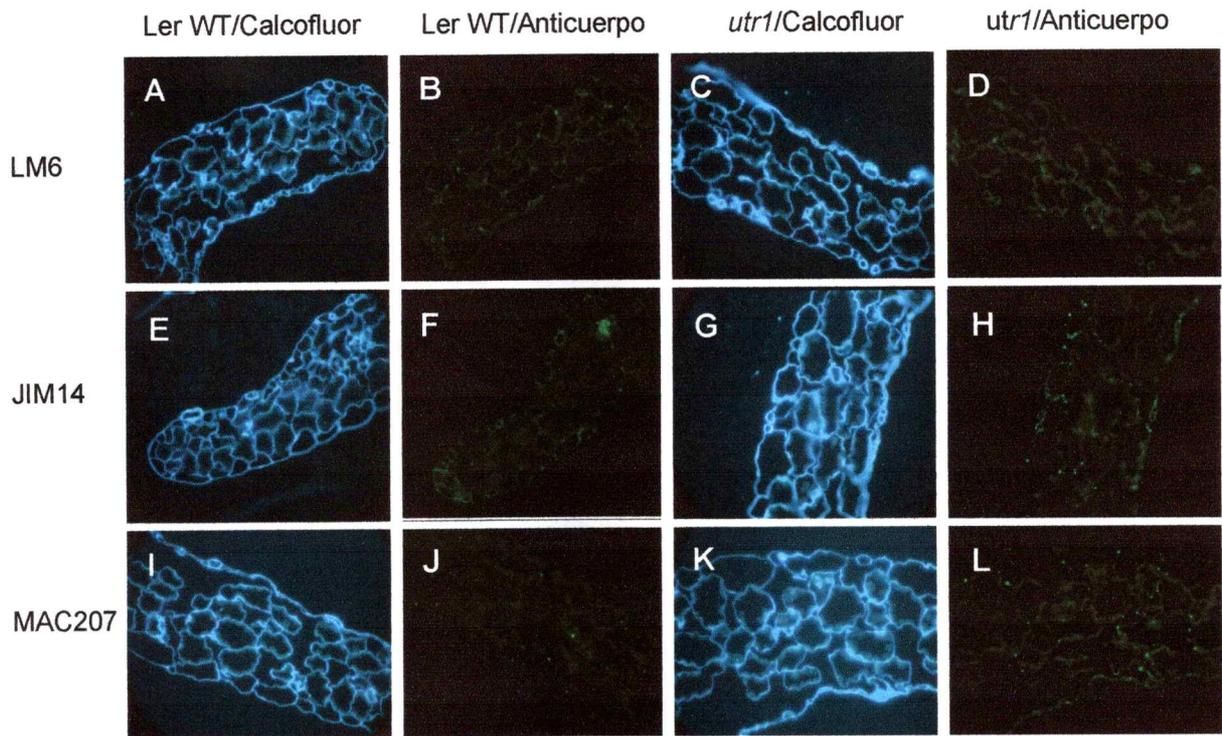
**Figura 20.** Imágenes de inmunofluorescencia de cortes de cotiledón con el anticuerpo LM5.

Las flechas indican las zonas donde hay ausencia de unión del anticuerpo: en la epidermis superior (**A** y **B**) y en las células del parénquima (**C** y **D**). Para cada inmunofluorescencia se muestra la imagen de fluorescencia al ultravioleta de la tinción con calcofluor como control del corte.

Las diferencias obtenidas con el anticuerpo LM5 no se observaron al utilizar el anticuerpo monoclonal LM6 que reconoce las cadenas laterales de arabinosas de ramnogalacturonano I (Figura 21B y 21D).

Utilizando la misma estrategia se analizó el anticuerpo LM8 que reconoce xilogalacturonano, y los anticuerpos monoclonales JIM4, MAC207, JIM16 y JIM14 que tienen como epítopes las cadenas de galactosa (1→3)-β-D-galactosa y (1→6)-β-D-galactosa de proteínas arabinogalactanos (AGP) de membrana plasmática y de pared celular. En todos esos casos la unión de los anticuerpos fue bastante débil, tanto en plantas silvestres como *utr1*. La figura 21 muestra los resultados obtenidos con JIM14 y MAC207. De estos resultados se concluye que no hay diferencias en las cadenas de galactosa (1→3)-β-D-galactosa y (1→6)-β-D-galactosa de AGP de las células de cotiledones de las plántulas *utr1*.

Se realizaron experimentos de inmunofluorescencia en raíces de plántulas completas de 5 días utilizando los anticuerpos JIM5 y JIM7 para homogalacturonano y LM5 para cadenas laterales de (1→4)-β-D-galactosa de la pectina ramnogalacturonano I (Williats y col., 2001). Los resultados muestran que los anticuerpos monoclonales JIM5 y JIM7 generan una marca fluorescente intensa en las raíces principales y en las laterales, excluyéndose en éstas últimas del ápice (Figuras 22A, 22B, 22C, 22G, 22H, 22I). Los patrones observados para plántulas silvestres y mutantes son iguales. Al analizar el anticuerpo LM5 se observa marca solo en las células en descamación de la zona de elongación de la raíz principal, tanto de plantas silvestres como *utr1* (Figura 23). Por lo tanto no se observaron diferencias en las cadenas de (1→4)-β-D-galactosa de RG I de las raíces de plántulas mutantes *utr1* como se observó en cotiledones.

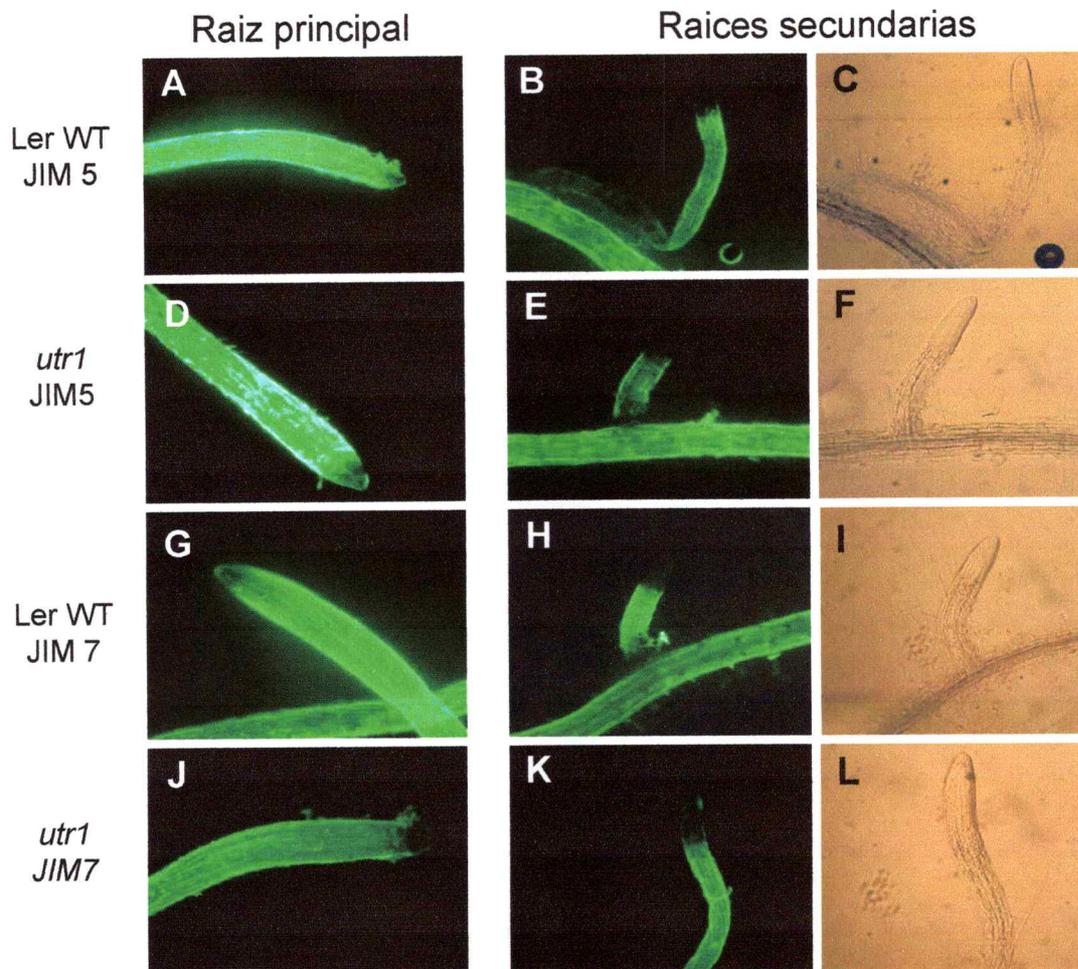


**Figura 21.** Imágenes de inmunofluorescencia en cortes de cotiledones con los anticuerpos LM6, JIM14 y MAC207.

**A-D:** Inmunofluorescencia en cortes de cotiledones silvestres (B) y *utr1* (D) con el anticuerpo LM6. A y C corresponden a la imagen de fluorescencia al ultravioleta de la tinción con calcofluor de cada corte.

**E-H:** Inmunofluorescencia de cotiledones silvestres (F) y *utr1* (H) con el anticuerpo JIM14. E y G corresponden a la imagen de fluorescencia al ultravioleta de la tinción con calcofluor de cada corte.

**I-L:** Inmunofluorescencia de cotiledones silvestres (J) y *utr1* (L) con el anticuerpo MAC207. I y K corresponden a la imagen de fluorescencia al ultravioleta de la tinción con calcofluor de cada corte.

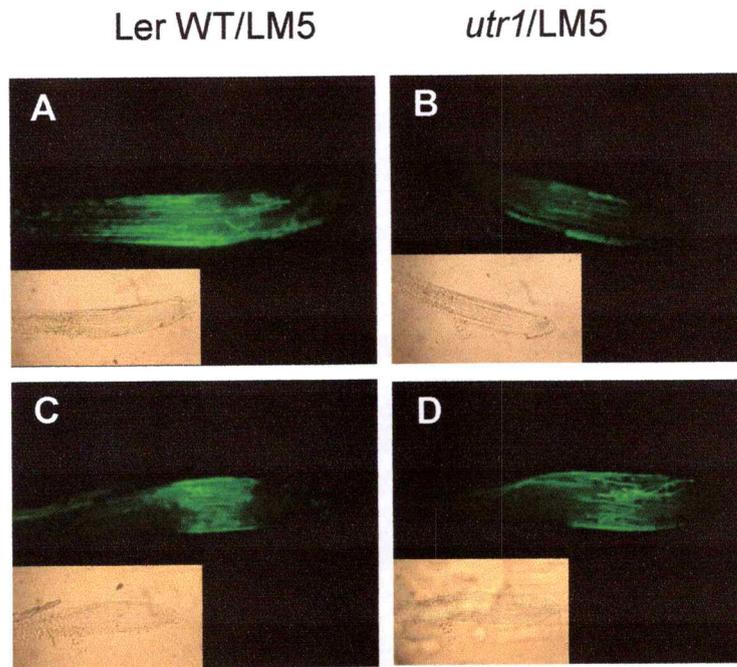


**Figura 22.** Imágenes de inmunofluorescencia de raíces de plántulas con los anticuerpos JIM5 y JIM7.

A - F: Inmunofluorescencia de raíces de plántulas silvestres (A y B) y *utr1* (D y E) con el anticuerpo JIM5.

G-L: Inmunofluorescencia de raíces de plántulas silvestres (G y H) y *utr1* (J y K) con el anticuerpo JIM7.

C, F, I y L: Imágenes de microscopía óptica de B, E, H y K respectivamente.

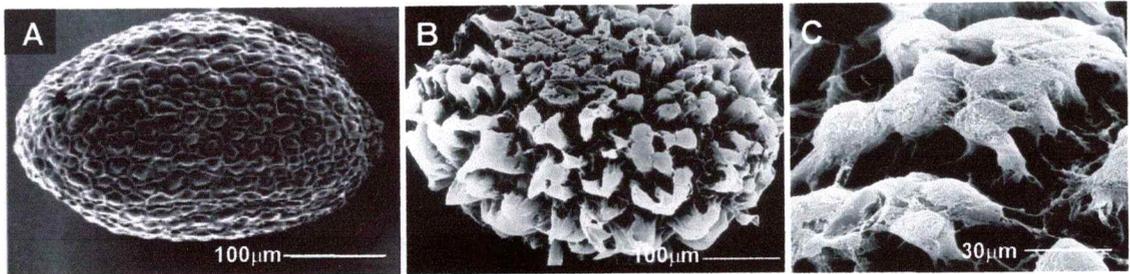


**Figura 23.** Imágenes de inmunofluorescencia de raíces de plántulas con el anticuerpo LM5.

**A y C:** Inmunofluorescencia de raíces de plántulas silvestres con el anticuerpo LM5.

**B y D:** Inmunofluorescencia de raíces de plántulas *utr1* con el anticuerpo LM5. En cada caso se muestra en el recuadro inferior izquierdo las imágenes de microscopía óptica.

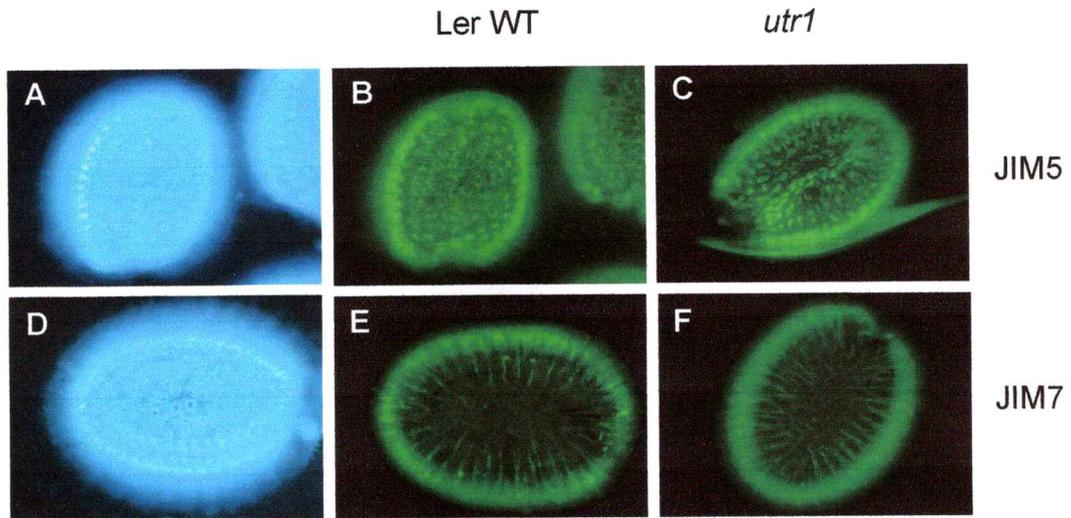
Las células de la columnela en la superficie de las semillas de *Arabidopsis* secretan una gran cantidad de mucílago al estar embebidas en agua. (Western y col., 2000, Windsor y col., 2000). La figura 24 muestra imágenes de microscopía electrónica de barrido de semillas de *A. thaliana* secas (Figura 24A) y luego de 16 horas de incubación en agua (Figura 24B y 24C), donde se aprecia la gran cantidad de polisacáridos secretados por las células de la columnela. Este mucílago está compuesto principalmente por los polisacáridos celulosa y pectina. Al utilizar el reactivo fluorescente calcofluor para  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glucanos se observa una fuerte marca fluorescente que confirma la presencia de celulosa en el mucílago (Figura 25A). La pectina más abundante es homogalacturonano con diferentes grados de metilesterificación (Willats y col., 2001), la cual es reconocida por los anticuerpos JIM5 y JIM7. La marca de JIM7 se observa en forma de rayos a través del mucílago y parecen reflejar los puntos de secreción desde la superficie de la semilla. Sin embargo la marca parece estar ausente en la superficie de la testa (Figura 25E). En contraste, la marca de JIM5 es más abundante en la zona interna en el centro de las células de la columnela (Figura 25B). Al observar los patrones de marca de estos anticuerpos en semillas de la mutante *utr1* no se observan diferencias. (Figuras 25B, 25C, 25E y 25F). Los anticuerpos monoclonales LM5 y LM6 no se unen al mucílago secretado por las semillas silvestres o *utr1*, lo cual indica la ausencia de cadenas de galactosa y arabinosa en los polisacáridos secretados (datos no mostrados).



**Figura 24.** Imágenes de microscopia electrónica de barrido de semillas de *A. thaliana*.

**A:** Semilla de Arabidopsis seca.

**B y C:** Semillas de Arabidopsis luego de ser incubadas en agua por 16 horas. En C se puede apreciar la gruesa capa de mucilago secretado.



**Figura 25:** Imágenes de inmunofluorescencia de semillas embebidas en agua con los anticuerpos JIM5 y JIM7.

**A y D:** Imagen de fluorescencia al ultravioleta de la tinción con calcofluor de semillas silvestres y *utr1*.

**B y C:** Imágenes de inmunofluorescencia de semillas silvestres Ler-0 y *utr1* con el anticuerpo JIM5.

**E y F:** Imágenes de inmunofluorescencia de semillas silvestres Ler-0 y *utr1* con el anticuerpo JIM7.

#### **1.4.2. Análisis de xiloglucano de cotiledones e hipocotilos mediante Espectroscopía de masa (MALDI-TOF)**

El xiloglucano es una cadena lineal de glucosas a la cual se unen de manera periódica residuos de xilosa o xilosa-galactosa-fucosa (Figura 26A). Al digerirlo con una enzima endo- $\beta$ -glucanasa que corta solo aquellos enlaces glicosídicos donde la glucosa no está sustituida, se forman oligosacáridos de 2, 3 y 4 glucosas (Figura 26A). Estos fragmentos pueden ser analizados mediante cromatografía líquida de intercambio aniónico o espectroscopía de masa.

Plántulas silvestres y mutantes fueron crecidas en placas y cosechadas a los cinco días, separando los cotiledones de los hipocotilos. 5 cotiledones y 5 hipocotilos silvestres y mutantes fueron molidos en nitrógeno líquido, lavados en alcohol y el material insoluble obtenido fue digerido con la enzima Xiloglucanasa (Figura 26A). Los oligosacáridos liberados fueron analizados por Espectroscopía de masa MALDI-TOF determinándose la abundancia relativa de cada ion. Como se puede apreciar en la figura 26B, no hay diferencias significativas entre los oligosacáridos de cotiledones e hipocotilos de plantas mutantes y plantas silvestres. Estos resultados muestran que no existirían cambios en la estructura de la hemicelulosa xiloglucano de cotiledones e hipocotilo de la planta mutante *utr1*.



### 1.5. Caracterización genética de la mutante *utr1*.

Con el objetivo de verificar genéticamente los resultados obtenidos por técnicas moleculares (Resultados sección 1.1) se realizaron análisis de segregación de la mutante y de la cruce con plantas silvestres. Al germinar semillas de la mutante en el antibiótico kanamicina se observó un 100% de resistencia, lo cual indica que la mutante es homocigota (Tabla 1). Además al germinar en kanamicina semillas de la F1 de la cruce de la mutante con plantas silvestres (línea 110a, Tabla 1) también se observa un 100% de resistencia, lo cual correlaciona con que todas las plantas de la F1 son heterocigotas. La progenie F2 de estas plantas heterocigotas tienen una segregación en kanamicina aproximada a 3:1, lo cual es consistente con una inserción única del transposón Ds en el genoma (líneas 110a3 y 110a4, Tabla 1). Posteriormente, al analizar la segregación de la F3, se obtienen plantas homocigotas (100% resistentes en kanamicina) (Tabla 1, línea 110a2-6) y heterocigotas (segregación cercana al 3:1) (Tabla 1, líneas 110a2-8 y 110a2-10).

Para determinar si la mutación es dominante o recesiva se analizó por microscopía óptica la presencia del fenotipo descrito en la figura 12 en plántulas de 5 días de la F1 de la cruce de plantas *utr1* con plantas silvestres. Se obtuvieron cortes seriados teñidos con PAS de 3 plantas provenientes de 2 cruces independientes. Ninguna de las plántulas analizadas presentó el fenotipo de la mutante, lo cual sugiere que el carácter observado es recesivo, ya que no está presente en plántulas heterocigotas.

Hasta el momento nuestros resultados sugieren que la inserción del elemento Ds en el gen *UTR1* es responsable del fenotipo observado en las células de los cotiledones. No obstante, para tener un 100% de certeza es necesario analizar mutantes alélicas y verificar en ellas la presencia del mismo fenotipo o bien, revertir la mutante consiguiendo el fenotipo silvestre.

Con el fin de obtener nuevamente una planta silvestre a partir de la mutante, utilizamos una estrategia alternativa al intentar eliminar el transposón

del gen *UTr1*. Para ello cruzamos la planta *utr1* con la línea Ac, que posee en su genoma el gen que codifica para la transposasa en forma homocigota y el gen *NPTII* como marcador de selección. Se espera que en la F1 el elemento Ds salte desde el gen *UTr1* y se pierda o se inserte en otro locus del genoma (Springer y col., 1995).

Se realizaron cruzas con dos líneas Ac (Ac1 y Ac5) en ambos sentidos. La F1 fue 100% resistente a kanamicina (Tabla 2). Las posibles revertantes se identificaron mediante PCR, utilizando DNA genómico de plantas individuales de la F1 y los partidores del extremo Ds (**c**) y del segundo exón del gen *UTr1* (**b**) (Figura 27A). De 36 plantas analizadas, se encontraron 4 líneas (112a1, 113a3, 113b1, 114b8) donde no se amplifica la banda de 435 pb con los partidores **c** y **b** (Figura 27B). Además, en estas 4 plantas es posible amplificar el gen *GUS* lo cual sugiere que el transposón se insertó en otra región del genoma.

De estas 4 plantas se recolectó la F2 y se analizó su segregación. Al crecerlas en kanamicina segregan de acuerdo a la presencia de dos genes *NPTII* en condición heterocigota (Tabla 2).

**Tabla 1. Resumen de segregación en kanamicina de las líneas *utr1* y cruzas con silvestre.**  
 Nt: número total de semillas sembradas, Nr: número de plantas resistentes, Ns: número de plantas susceptibles, R/S: Razón resistentes/susceptibles

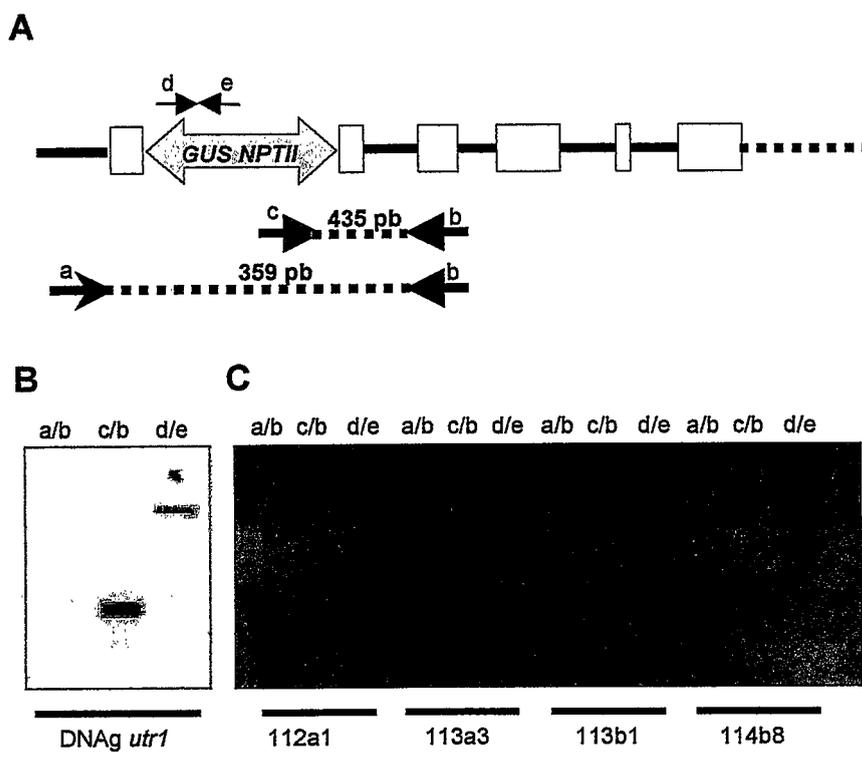
Línea	Nt	Nr	Ns	R/S
<i>utr1</i> Homo	114	80	0	100%
<b><u><i>utr1</i> X WT</u></b>				
F1 (110a)	13	13	0	100%
F2 (110a3)	30	17	7	3:1 *
F2 (110a4)	37	26	10	3:1 *
F3 (110a2-6)	117	117	0	100%
F3 (110a2-8)	129	104	25	3:1 *
F3 (110a2-10)	126	96	30	3:1 *

\* Ajusta a 3:1 por análisis estadístico de  $\chi^2$ , con un P de 0.9.

**Tabla 2. Resumen de segregación en kanamicina de las cruzas con las líneas Ac.**  
 Nt: número total de semillas plantadas, Nr: número de plantas resistentes, Ns: número de plantas susceptibles, R/S: Razón resistentes/susceptibles

Línea	Nt	Nr	Ns	Razón R/S
F1(112a)	16	16	0	100%
F1(112b)	19	19	0	100%
F1(113a)	6	6	0	100%
F1(113b)	8	8	0	100%
F1(114b)	22	22	0	100%
F2 (114a1)	76	66	8	15:1 <sup>°</sup>
F2 (114b8)	43	30	3	15:1 <sup>°</sup>
F2(113a3)	69	57	6	15:1 <sup>°</sup>

<sup>°</sup> Ajusta a 15:1 por análisis estadístico de  $\chi^2$ , con un P de 0.9.



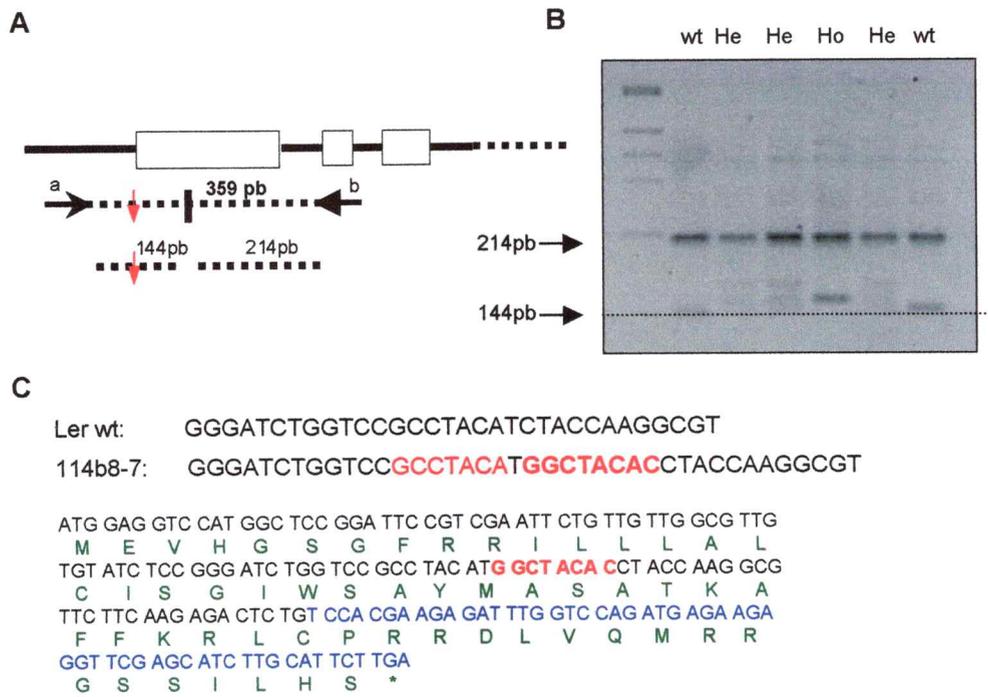
**Figura 27. Identificación de revertantes por PCR.**

**A:** Esquema de la secuencia genómica del gen *UTr1* con la inserción del transposón en el primer exón. Utilizando los partidores *c* y *b* se amplifica una banda de 435pb solo si el transposón está presente en el genoma.

**B:** Electroforesis de agarosa al 2% de los productos de PCR obtenidos al utilizar DNA genómico de 4 líneas revertantes y los partidores *a/b*, *c/b* y *d/e*. Como control se muestran los productos de PCR obtenido con DNA genómico de la mutante *utr1*.

Para identificar dentro de la F2, las plantas que efectivamente tuvieron la inserción se buscaron aquellas que poseían una secuencia duplicada de 6 a 8 pb en el nucleótido 69 (sitio de inserción). Esta huella se genera durante la inserción del transposón y permanece en el sitio de inserción cuando el transposón salta. Se analizaron 13 plantas de la línea 114b8, amplificando por PCR con los partidores a y b y luego digiriendo el fragmento con la enzima *ClaI* (Figura 28A). De esta forma se obtienen dos fragmentos de 144 pb y 214 pb. De existir la huella (indicado por la flecha roja) el fragmento de 144 pb debiera aumentar su tamaño en 6, 7 u 8 pb, a diferencia del fragmento de 214 pb que se mantiene invariable. Para resolver la diferencia de tamaño se realizaron geles de Agarosa/Nusieve (2%-1%). Como se observa en la figura 28B, en las plantas revertantes la banda de 144 pb migra a un tamaño molecular mayor. En aquellas plantas heterocigotas (He) para la huella se observa un duplete de menor intensidad mientras que en la planta homocigota para la huella se observa claramente el aumento de tamaño de la banda de 144 pb. Al secuenciar este fragmento encontramos una duplicación de 8 pb cercano al sitio de inserción (indicado en letras rojas, Figura 28C). Esta secuencia genera un corrimiento en el marco de lectura y un codón de término en el segundo exón (Figura 28C).

Entonces, si bien no se generó una planta silvestre, se obtuvo una nueva mutante en el gen *UTr1*. Esta mutante alélica constituye una herramienta interesante para verificar que la ausencia de la proteína UTr1 es responsable del fenotipo observado en la mutante insercional.



**Figura 28. Identificación de revertantes homocigotas.**

**A:** Esquema de la estrategia utilizada. La flecha roja representa la huella que deja el transposón en el sitio de inserción. La línea naranja representa el sitio de corte de la enzima de restricción Clal.

**B:** Electroforésis de Nusieve:Agarosa de los productos de PCR obtenidos con DNA genómico de plantas silvestres (wt) y heterocigotas (He) u Homocigotas (Ho) para la huella y digeridos con la enzima Clal.

**C:** Secuencia del fragmento pequeño de una planta silvestre y de la planta 114b8-7 (homocigota para la huella). Las letras fucsias corresponden a la secuencia duplicada que genera la huella de 8pb extra presente en la revertantes, indicada por las letras rojas. En letras mayúsculas se indica la secuencia proteica en la revertante: las letras negras corresponden a la secuencia proteica normal y en letras verdes la secuencia proteica anormal al correrse el marco de lectura. Este corrimiento del marco de lectura origina un codón de término TGA en el segundo exón (letras azules).

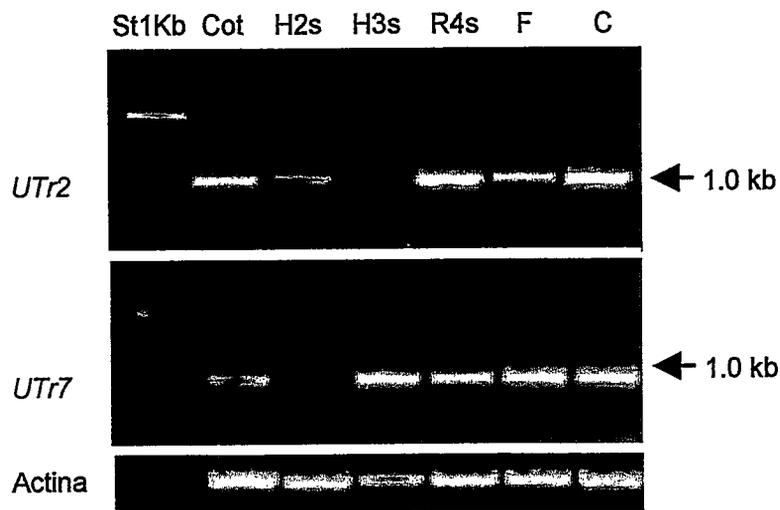
## 2. Identificación de mutantes insercionales en los genes que codifican para los transportadores de nucleótidos azúcar *UTr2* y *UTr7*.

El gen *UTr2* codifica para una proteína altamente hidrofóbica, con varios dominios transmembrana y que posee actividad transportadora de UDP-galactosa. Además la forma quimérica *UTr2*-GFP muestra una localización subcelular similar a marcadores de aparato de Golgi (Norambuena 2004). Por otra parte el gen *UTr7* codifica para una proteína de varios segmentos transmembrana con actividad transportadora de UDP-glucosa y UDP-galactosa (Segura 2003).

La expresión de *UTr2* y *UTr7* fue analizada por RT-PCR y Northern-blot. Los experimentos de RT-PCR muestran que ambos genes son expresados en distintos tejidos, tales como cotiledones, hojas de rosetas, raíces, flores y callos (Figura 29). Sin embargo al analizar la expresión por Northern-blot, observamos que existen diferencias en los niveles de expresión de ambos genes. *UTr2* se expresa con mayor intensidad en raíces de 4 semanas y en callos generados desde raíces y *UTr7* se expresa débilmente en todos los tejidos y con mayor intensidad en callos (Figura 30A y 30B).

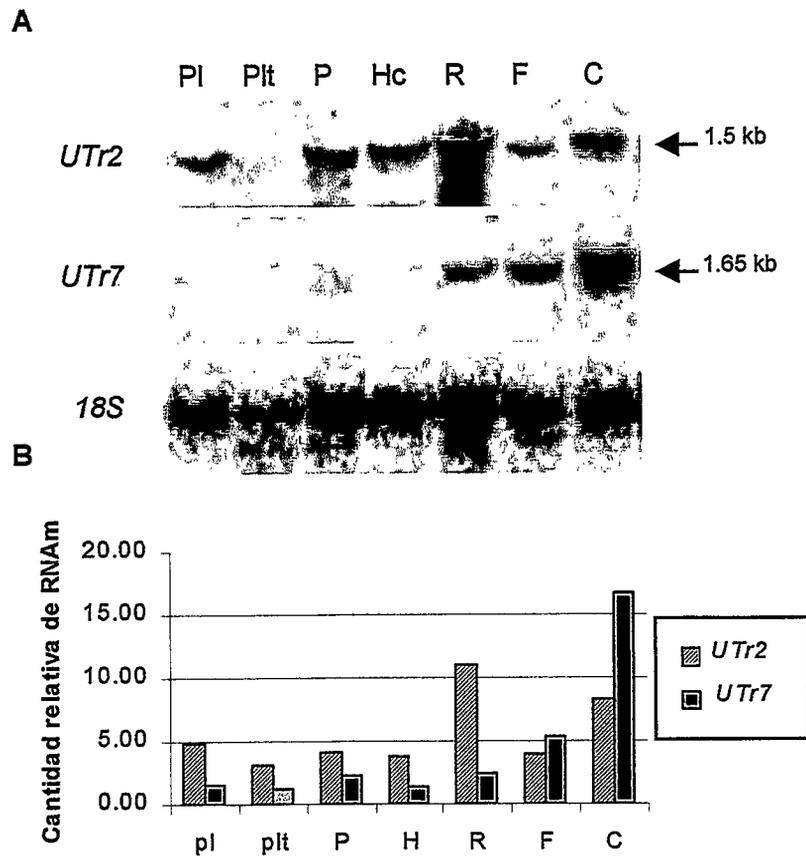
Si bien los resultados de Northern-blot de *UTr7* muestran que este gen se expresa en todos los órganos de la planta, experimentos de hibridación *in situ* revelaron que esta expresión es diferencial. En la figura 31 observamos que en cortes de flores, *UTr7* se expresa solo en el receptáculo de la flor (Figura 31A) y en el estigma de flores maduras (Figura 31F). A diferencia de *UTr1/UTr3* no se encontró marca en los otros órganos de la flor ni en estadíos florales más tempranos (datos no mostrados). En cortes de tallos se observa expresión principalmente en las zonas de intersección de los tallos primarios con los secundarios (zona de absición) (Figuras 31B y 31E). El patrón más interesante corresponde a la expresión en el sistema vascular tanto de la raíz como del hipocotilo de plántulas de 6 días (Figuras 31C y 31D), probablemente en células de la endodermis y/o corteza que rodean al xilema. El mismo patrón se observa

en embriones en estadio de cotiledones doblados (Figura 31G) donde se marcan las células que darán origen al sistema vascular de la raíz y de los cotiledones.



**Figura 29. Expresión de *UTr2* y *UTr7* por RT-PCR.**

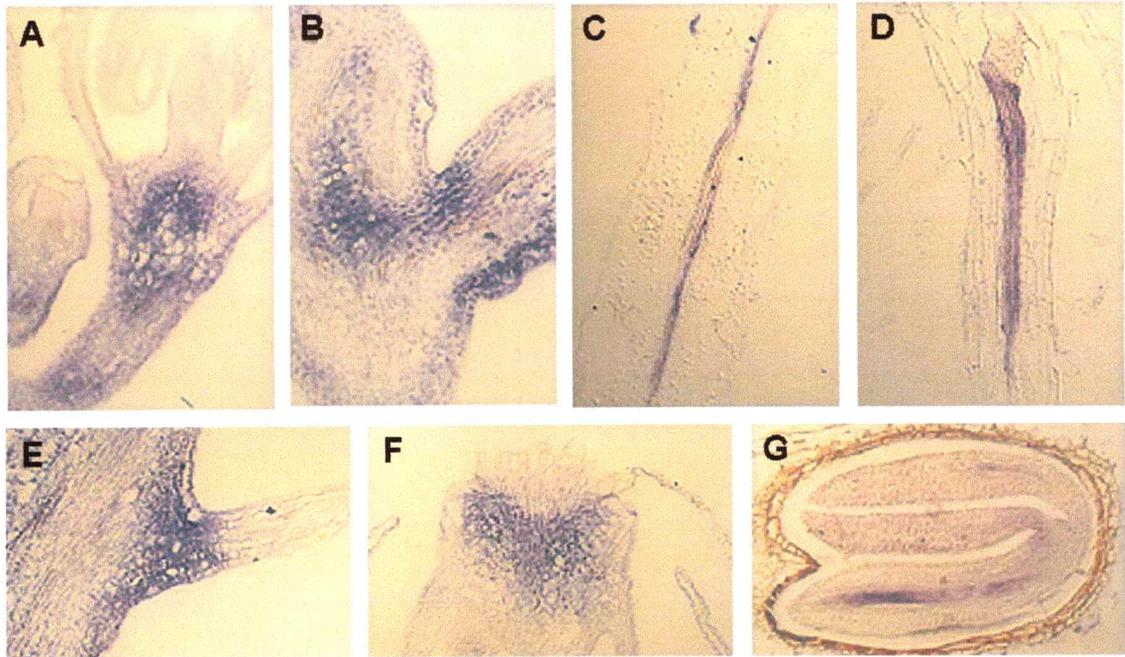
Electroforesis de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos con partidores exactos para *UTr2*, *UTr7* y Actina como control y utilizando como templado cDNA de cotiledones (Cot), hojas de rosetas de 2 semanas (H2s) y de 3 semanas (H3s), raices de 4 semanas (R4s), flores (F) y callos (C).



**Figura 30. Expresión de *UTr2* y *UTr7* por Northern-blot.**

**A:** Autoradiografía de una membrana hibridada 3 veces consecutivas con sondas radioactivas para *UTr2*, *UTr7* y el RNA ribosomal 18S. Cada carril contiene 40µg de RNA total de plántulas completas de 10 días crecidas en MS 1% sacarosa (PI), plántulas completas de 10 días crecidas en tierra (Plt), tejidos aéreos de planta de 4 semanas (P), hojas caulinares (Hc), raíces de 4 semanas (R), flores (F) y callos (C).

**B:** Cantidad relativa de RNAm al normalizar con la señal obtenida del RNAr 18S, previa cuantificación por Phosphoimager.



**Figura 31. Hibridación *in situ* de UTr7.**

**A:** Corte longitudinal de flor madura.

**B y E:** Secciones longitudinales del tallo cerca de la flor.

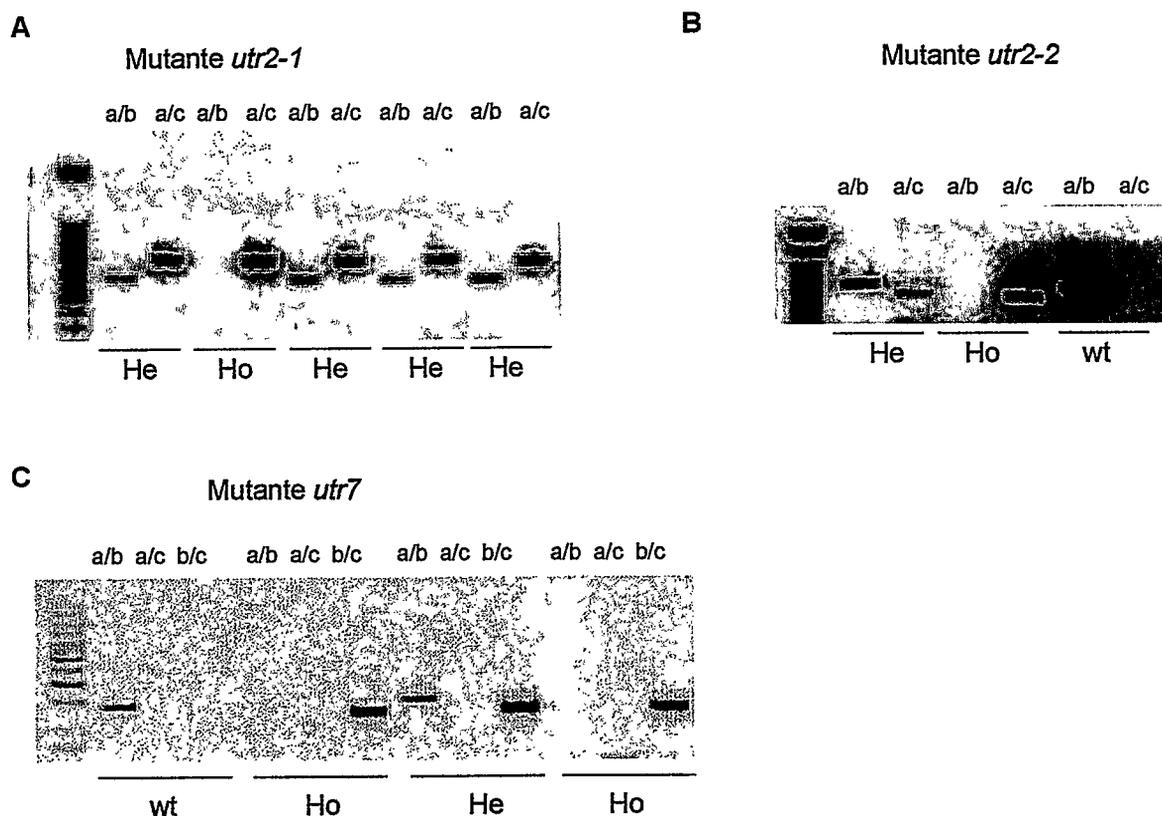
**C:** Corte longitudinal de hypocotilo.

**D:** Corte longitudinal de la zona de transición raiz-hipocotilo

**F:** Estigma (flor).

**G:** Embrión en estadio de cotiledones doblados.

Con el objetivo de estudiar la función *in vivo* de estos transportadores de nucleótidos azúcar, hemos identificado desde los bancos de datos SYNGENTA y SALK dos plantas de *A. thaliana* que poseen inserciones del T-DNA en el gen *UTr2* (*utr2-1* y *utr2-2*) y una en el gen *UTr7* (*utr7-1*) (Materiales y métodos, sección 7.1). Mediante PCR se identificaron para cada mutante plantas homocigotas para la inserción (Materiales y Métodos sección 7.3) (Figura 32).



**Figura 32. Verificación de la inserción e identificación de plantas homocigotas.**

Electroforesis de agarosa al 2% de los productos de PCR obtenidos al utilizar como templado DNA genómico de plantas mutantes *utr2-1*, *utr2-2* y *utr7-1* (A, B y C). En cada carril se indican los partidores utilizados (Materiales y Métodos, sección 7.3). En la zona inferior se indica si la planta es heterocigota (He), homocigota (Ho) o silvestre (S), según el resultado del PCR.

Para analizar genéticamente si estas mutantes tienen más de una inserción se germinaron semillas provenientes de una autopolinización (F2) de varias plantas por cada línea, en sus respectivos marcadores de selección (el antibiótico kanamicina para las mutantes SALK y el herbicida BASTA para las mutantes SYNGENTA) y se analizaron las razones de susceptibilidad / resistencia. Además se analizó la segregación de la F1 proveniente de la cruce de cada una de las líneas con plantas silvestres. Con los resultados de segregación, de la autopolinización y de la cruce con silvestre es posible determinar si las plantas poseen una o más inserciones y además confirmar el genotipo (Tabla 3). Las plantas heterocigotas *utr2-1*, *utr2-2* y *utr7-1* identificadas molecularmente presentaron razones de segregación de la autopolinización cercanas a 3:1 y de la F1 de la cruce con plantas silvestres cercanas a 1:1, (razones validadas según el test de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) con un  $p=0.95$ ) (Tabla 4). Por otra parte las plantas identificadas molecularmente como homocigotas fueron un 100% resistentes (Tabla 4).

Estos resultados sugieren que las mutantes *utr2-1*, *utr2-2* y *utr7-1* tienen una inserción única en el genoma y además validan la metodología molecular empleada para identificar las plantas homocigotas.

Estas tres mutantes crecen normalmente y no tienen diferencias visibles en comparación con plantas silvestres. A pesar de ello, actualmente estamos trabajando en su caracterización molecular, buscando fenotipos menos evidentes y determinando la composición de polisacáridos de pared celular mediante técnicas espectroscópicas y cromatográficas. Debido a que en las mutantes *utr2-1* y *utr2-2* el T-DNA está en la putativa región promotora se analizó si las inserciones fueron capaces de eliminar la expresión del gen. Los resultados demostraron que las plantas *utr2-1* expresan normalmente el transcrito *UTr2* y contrariamente a lo esperado, las plantas *utr2-2* sobreexpresan un transcrito ligeramente mayor al de las plantas silvestres (Vergara A., comunicación personal). Al analizar las raíces de plantas mutantes *utr2-2* crecidas por 14 días en medio MS 1% sacarosa líquido, se observa un

mayor número de raíces secundarias que en las plantas silvestres (Vergara A., comunicación personal). La confirmación de este fenotipo y los resultados de los análisis de composición de polisacáridos de esta mutante insercional nos entregara valiosa información sobre la participación *in vivo* del transportador de UDP-galactosa UTr2.

**Tabla 3.** Segregación esperada, en kanamicina o BASTA, de la autopolinización y cruce con silvestre según el dosaje genético y el número de inserciones.

GENOTIPO	AUTOPOLINIZACIÓN	CRUZA CON SILVESTRE
	(F2)	(F1)
Heterocigota 1 inserción	3:1	1:1
Homocigota 1 inserción	100%	100%
Heterocigota 2 inserciones	15:1	3:1
Homocigota 2 inserciones	100%	100%

**Tabla 4.** Análisis de segregación de las plantas con inserciones en los genes *UTr1*, *UTr2*, y *UTr7*.

Nt=número total de semillas plantadas, Nr=número de plantas resistentes, Ns=número de plantas susceptibles, R/S=Razón resistentes/susceptibles.

Mutante	AUTOPOLINIZACION (F2)			CRUZA CON SILVESTRE (F1)			Genotipo
	Nt	Nr/Ns	R/S	Nt	Nr/Ns	R/S	
<i>utr2-1-1</i>	140	82/28	3:1 *	29	16/13	1:1 <sup>o</sup>	Heterocigota
<i>utr2-1-2</i>	177	80/26	3:1 *	28	11/17	1:1 <sup>o</sup>	Heterocigota
<i>utr2-1-3</i>	124	62/27	3:1 *	27	14/12	1:1 <sup>o</sup>	Heterocigota
<i>utr2-1-4</i>	214	138/47	3:1 *	18	11/6	1:1 <sup>o</sup>	Heterocigota
<i>utr2-2-2</i>	94	91/0	100% R	25	25/0	100%R	Homocigota
<i>utr2-2-3</i>	141	93/30	3:1 *	23	8/15	1:1 <sup>o</sup>	Heterocigota
<i>utr2-2-4</i>	118	90/21	3:1 *	6	4/2	1:1 <sup>o</sup>	Heterocigota
<i>utr7-1-1</i>	152	75/22	3:1 *	-	-		Heterocigota
<i>utr7-1-2</i>	81	25/10	3:1 *	-	-		Heterocigota
<i>utr7-1-3</i>	62	57/0	100% R	-	-		Homocigota
<i>utr7-1-5</i>	141	139/0	100% R	-	-		Homocigota

\* Ajusta a 3:1 por análisis estadístico de  $\chi^2$ , con un P de 0.90.

<sup>o</sup> Ajusta a 1:1 por análisis estadístico de  $\chi^2$ , con un P de 0.90.

- No determinado.

## DISCUSIÓN

En plantas, UDP-galactosa y UDP-glucosa son sustratos para la síntesis de varios glicoconjugados y polisacáridos de pared celular entre los que se encuentran xiloglucano, ramnogalacturonano I, galactanos, glucomananos y galactomananos. Además, galactosa se encuentra en el árbol de azúcares de proteoglicanos como los arabinogalactanos (AGP) y en otras proteínas galactosiladas de pared como las extensinas (Brett y Waldron, 1996). Los antecedentes disponibles al día de hoy sugieren que las reacciones de transferencia de galactosa desde UDP-galactosa a polisacáridos ocurren en el lumen del aparato de Golgi. Por otro lado, UDP-glucosa también es utilizada en el aparato de Golgi; sin embargo, estudios recientes indican que UDP-glucosa además es sustrato de glucosiltransferasas que se localizan en el lumen del retículo endoplásmico. El hecho que UDP-galactosa y UDP-glucosa sean utilizados en el lumen de estos organelos sugiere que se requieren proteínas que transporten estos nucleótidos azúcar desde el citoplasma hacia el interior del organelo.

En nuestro laboratorio hemos propuesto que el transporte de UDP-glucosa y UDP-galactosa es crucial para la síntesis de polisacáridos, por lo tanto postulamos que al eliminar la(s) proteína(s) responsable(s) del transporte de estos nucleótidos azúcar se alteraría la síntesis de polisacáridos que contienen glucosa y galactosa. Recientemente describimos que el gen de *A. thaliana* *UTr1* codifica para un transportador de UDP-glucosa y UDP-galactosa (Norambuena y col., 2002). De esta forma, la alteración en la expresión de *UTr1* podría afectar la síntesis o estructura de los polisacáridos que contienen galactosa y glucosa. Con este objetivo se caracterizó una planta mutante de *Arabidopsis* denominada *utr1* que presenta una inserción de un transposón en el primer exón del gen *UTr1*.

## 1. Caracterización molecular de una mutante insercional de *A. thaliana* en el gen del transportador de UDP-glucosa / UDP-galactosa *UTr1*.

La mutante *utr1* fue caracterizada molecularmente mediante experimentos de PCR y Southern-blot (Figura 5), con lo cual se determinó que la inserción se encuentra en el nucleótido 69 del primer exón y en la orientación adecuada para que la expresión del gen *GUS*, presente en el transposón, quede bajo el control del promotor de *UTr1*. Además la inserción está en ambas copias del gen (homocigota) y es única dentro del genoma.

Analizando el experimento de Southern-blot de la figura 5 encontramos que la banda de 665 pb generada al cortar DNA genómico de plantas silvestres con la enzima *EcoRI* e hibridar con la sonda del cDNA de *UTr1*, desaparece en el DNA genómico de plantas *utr1* y aparece una banda de 2800 pb. Este aumento de tamaño se explica por la presencia del transposón entre los dos sitios *EcoRI*. Sin embargo el incremento en el tamaño de la banda no corresponde con el esperado ya que el tamaño del transposón es de aproximadamente 6.4 kb. Una posible explicación es que el gen *NPTII* (incluyendo su promotor y posiblemente parte del extremo derecho del transposón) se haya escindido e insertado en otro sitio dentro del genoma. Si esto fuese así, la resistencia a kanamicina no estaría ligada con la mutación en *UTr1*. Por esta razón se está analizando si en la F3 de una cruce de *utr1* con plantas silvestres todas las plantas resistentes a kanamicina poseen la inserción en *UTr1*.

Al analizar la expresión de *UTr1* en la línea insercional no se observó el transcrito de 1.3 kb presente en plantas silvestres y en cambio se observó un transcrito de 2.8 kb. Este RNA estaría conformado por la secuencia del gen *GUS* (de 2 kb aproximadamente) y la secuencia de *UTr1* (1.3 kb) ya que en los experimentos de Northern-blot las sondas de *UTr1* y *GUS* reconocen la misma banda de aproximadamente 2.8 kb (Figura 10). La presencia de estos transcritos aberrantes generados por la fusión de fragmentos del gen endógeno

con el gen reportero *GUS* del transposón ha sido previamente reportada en otra mutante del mismo origen (Springer y col., 1995). Estos arreglos del RNA serían generados por la presencia en el transposón de secuencias de consenso dadoras yceptoras de splicing, localizadas río arriba del ATG del gen *GUS* (Sundaresan y col., 1995). Como el transposón se insertó en un exón, se produce un splicing entre los sitios dadores y aceptores del transposón, generándose la fusión entre parte del primer exón del gen *UTr1* y *GUS*. Sin embargo, como el transcrito de 2.8 kb es reconocido por la sonda del extremo 3'UTR de *UTr1*, esta fusión además contendría el resto de la secuencia de *UTr1*. Los experimentos de RT-PCR sugieren que también se produjo una fusión entre parte del extremo derecho del transposón (secuencia no codificante) y el segundo exón de *UTr1* (Figura 10). Este resultado es difícil de explicar debido a que el gen *GUS* posee la secuencia de término de la transcripción NOS de la proteína Nopalina Sintasa y además a continuación del gen *GUS* se encuentra el gen *NPTII* en sentido opuesto. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, existe la posibilidad de que este último gen no se encuentre dentro del transposón. Basándonos en estos resultados podemos especular que el transcrito aberrante estaría compuesto por los primeros 69 nucleótidos del primer exón de *UTr1*, la secuencia del gen *GUS*, una secuencia del extremo derecho del transposón y el resto de la secuencia del gen *UTr1* incluyendo el extremo 3'UTR.

La presencia de este transcrito anómalo nos obliga a preguntarnos si es posible que se genere una proteína con actividad transportadora de nucleótidos azúcar. Analizando el mapa del transposón Ds se concluye que la proteína *GUS* se genera por reiniciación de la traducción en su propio ATG ya que río arriba de los sitios dadores de splicing existen tres codones de término. Por lo tanto no sería posible una fusión proteica entre el primer exón de *UTr1* y *GUS*. Además, el transcrito de *GUS* tiene su propio término de la traducción que impide la formación de una fusión proteica hacia el extremo carboxilo. Por lo tanto, la línea insercional *utr1* sería una mutante en el gen *UTr1* en la cual el

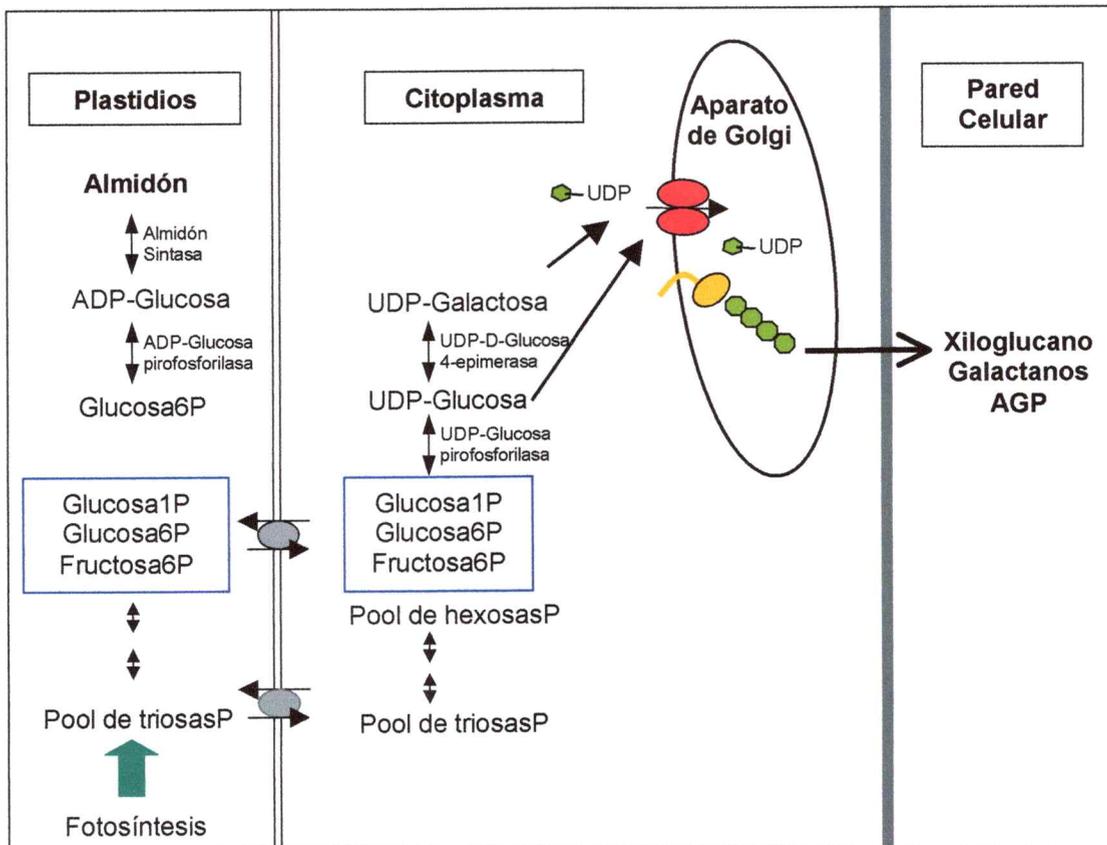
transcrito híbrido generado no sería capaz de originar una proteína funcional. Sin embargo, para verificar la ausencia de la proteína contamos con sueros de conejos inmunizados con péptidos diseñados en base a la secuencia carboxilo terminal de la proteína UTr1. Utilizando estos anticuerpos esperamos en el futuro evidenciar la ausencia de la proteína UTr1 en la planta *utr1*.

## 2. Caracterización fenotípica de la mutante *utr1*.

Al crecer la mutante *utr1* observamos que no tiene un fenotipo morfológico evidente. Sin embargo existen mutantes, como las mutantes *mur*, que a pesar de tener alteraciones en la composición de polisacáridos de pared celular no poseen fenotipos morfológicos a simple vista (Reiter y col., 1997). Con el fin de evaluar si la mutante *utr1* presenta alteraciones a nivel de los tejidos realizamos observaciones histológicas de órganos que sabemos expresan el gen *UTr1*. Es así como observamos que en cotiledones de 5 días existen diferencias morfológicas en las células: poseen vacuolas de menor tamaño y mayor cantidad de citoplasma, un mayor número de cuerpos lipídicos y un aumento en el tamaño y la cantidad de los gránulos de almidón en los cloroplastos (Figuras 12 y 14). El almidón es un polímero insoluble de  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)glucosas con ramificaciones de  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)glucosas que en tejidos verdes forma gránulos cristalinos de 1  $\mu$ m de diámetro. Aparentemente estas alteraciones se originarían en estadios embrionarios, ya que en cortes de cotiledones y radículas de embriones teñidos con PAS se observan una gran cantidad de puntos color púrpura que corresponden a gránulos de almidón según fue corroborado por microscopía electrónica de transmisión, de manera similar a lo observado en cotiledones de plántulas de 5 días (Figura 13). Normalmente las semillas maduras tienen como reservas principales proteínas y lípidos y solo en muy escasa cantidad gránulos de almidón (Lin y col., 1999; Meinke y col., 1994). Este fenotipo indicaría que la ausencia de este

transportador de UDP-glucosa y UDP-galactosa produce una alteración en el metabolismo celular, principalmente en el metabolismo de carbohidratos, en estadíos tempranos del desarrollo de la planta.

Para explicar este fenotipo debemos tener en cuenta que el metabolismo de los carbohidratos en las células vegetales es muy complejo. Contempla vías anabólicas y catabólicas que utilizan "pools" de intermediarios conectados mediante reacciones enzimáticas reversibles. Uno de los pools principales es el de las hexosas fosfato (glucosa-1P, glucosa-6P y fructosa-6P), el cual tiene distintos destinos. Un 30% se destina hacia la síntesis de componentes de pared celular principalmente vía síntesis de UDP-glucosa a partir de glucosa-1P por la enzima UDP-glucosapirofosforilasa. A su vez, UDP-glucosa puede ser convertida a UDP-galactosa por la enzima UDP-glucosaepimerasa y ambos nucleótidos azúcar pueden ser transportados hacia el aparato de Golgi para la síntesis de polisacáridos de pared y glicoproteínas. El pool de hexosas también puede conducir a la síntesis de almidón en los plastidios. En ellos, por la acción de la enzima ADP-glucosapirofosforilasa, la glucosa-1P es convertida a ADP-glucosa (paso limitante) el cual es sustrato de la enzima Almidón sintasa responsable de la síntesis de almidón (Buchanan y col., 2000) (Figura 33).



**Figura 33:** Esquema simplificado del metabolismo de azúcares en células vegetales.

Considerando lo anterior, proponemos que al disminuir el transporte de UDP-glucosa y/o UDP-galactosa en el aparato de Golgi se produce un aumento de estos nucleótidos azúcar en el citoplasma y por consecuencia en el pool citoplasmático de hexosas fosfato. Este excedente de hexosas fosfato podría ser destinado al cloroplasto y utilizarse como sustrato para la síntesis de almidón como compuesto de reserva de carbono. Sin embargo, si consideramos que el carbono utilizado para la síntesis de almidón puede provenir de la fotosíntesis dentro del cloroplasto, el aumento de almidón podría ser consecuencia de una alteración en la razón de síntesis/degradación del almidón o en la exportación de carbonos desde el cloroplasto (hexosas fosfato y/o triosas fosfato).

Por otra parte y con el objetivo de encontrar un fenotipo en la pared celular se analizaron los polisacáridos con galactosa de las células de los cotiledones. Utilizando anticuerpos monoclonales anti-pectinas se observó mayor unión de un anticuerpo que reconoce 4 residuos de galactosa en cadenas de (1→4)-β-galactanos de la pectina ramnogalacturonano I (RGI) (Figura 17). Este resultado fue contrario al esperado ya que un aumento en la unión indicaría un incremento en la cantidad de unidades de galactosa en la cadena lateral del RGI. Sin embargo modificaciones estructurales de las cadenas laterales, como por ejemplo decoraciones con otros azúcares, pueden alterar el epítipo y por lo tanto producir cambios en la unión del anticuerpo. Para discriminar entre estas dos posibilidades es necesario cuantificar la galactosa presente en una preparación purificada de pectinas de cotiledones de plantas mutantes.

Para explicar un aumento de galactosa en pectinas de pared celular podemos plantear al menos dos explicaciones diferentes: La primera es que en respuesta a la ausencia de *UTr1* se inducen otras proteínas transportadoras de nucleótidos azúcar y por lo tanto se genera un aumento de UDP-galactosa y/o UDP-glucosa en el aparato de Golgi. Sin embargo, en la mutante *utr1* la expresión de otros transportadores de nucleótidos azúcar como *UTr2* y *UTr7* no está alterada. Una segunda explicación es que, aun cuando la proteína *UTr1* transporta UDP-galactosa y UDP-glucosa *in vitro*, en la planta se comporta como un transportador de UDP-glucosa más que de UDP-galactosa. Los experimentos de medición de transporte en levaduras muestran que *UTr1* transporta 10 veces más UDP-glucosa que UDP-galactosa (Norambuena y col., 2002). Entonces, considerando los cambios celulares de la mutante *utr1*, proponemos que al disminuir el transporte de UDP-glucosa hacia el aparato de Golgi, este nucleótido azúcar aumenta en el citoplasma. La UDP-glucosa citoplasmática puede epimerizar a UDP-galactosa por acción de la UDP-D-glucosa-4-epimerasa y ser transportada hacia el lumen del Golgi. Allí sería incorporada a polisacáridos de pared, específicamente a cadenas de galactosa

de RGI. Además, el aumento en la UDP-glucosa genera un aumento en el pool de hexosas lo cual ya sea directa o indirectamente (como se comentó anteriormente) se traduce en un aumento del almidón en los cloroplastos.

De manera similar a nuestros resultados, plantas transgénicas que tienen una baja actividad de la enzima UDP-glucosa epimerasa y que fueron crecidas en presencia de galactosa, fueron más sensibles a los efectos tóxicos de la galactosa, acumulan UDP-galactosa, tienen un mayor contenido de almidón en hojas y una mayor cantidad de galactosa en la pared celular (Dormann y col., 1998). Los autores sugieren que al disminuir la actividad de la enzima que transforma la UDP-galactosa a UDP-glucosa, aumenta el contenido de UDP-galactosa en el citoplasma afectando el metabolismo de los carbohidratos y aumentando la incorporación de galactosa a polímeros de pared celular.

En *Arabidopsis* los azúcares glucosa y galactosa se encuentran presentes en RG I, RG II, xiloglucano y proteínas arabinogalactanos (AGP) (Zabackis y col., 1995). Debido a las técnicas disponibles pudimos analizar RG I, xiloglucano y cadenas  $\beta$ -(1→3) y  $\beta$ -(1→6) galactosa de AGP de plántulas de 5 días. Sin embargo a pesar que todos los polisacáridos previamente mencionados son sintetizados en el aparato de Golgi solo se encontraron alteraciones en las cadenas de galactosa de RGI. Este resultado puede ser explicado de varias formas:

La primera tiene relación con la idea que la síntesis de distintos polímeros de azúcar es realizada por asociaciones de proteínas diferentes, e incluso en diferentes cisternas del aparato de Golgi (Seifert y col., 2002; Moore y col., 1991). Estudios realizados en la mutante *rhd1*, deficiente en la isoforma 4 de la UDP-D-glucosa-4-epimerasa, muestran que células corticales de la raíz presentan los epítopes de  $\beta$ -(1→6) galactosa de AGP pero no los epítopes galactosilados de xiloglucano (Seifert y col., 2002). Los autores plantean el modelo de "canal de sustrato" ("substrate channeling") donde sugieren que el

flujo de galactosa desde UDP-galactosa a diferentes productos está compartimentalizado al nivel de las distintas isoformas de las epimerasas presentes en el citoplasma. Entonces la proteína RDH1 citoplasmática podría estar específicamente asociada con un transportador de UDP-galactosa y una xiloglucano galactosiltransferasa de Golgi. A su vez, en el mismo tipo celular, una isoforma alternativa estaría formando un complejo diferente para la síntesis de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) galactosa de AGP. Entonces, según este modelo, en los cotiledones de la mutante *utr1* la UDP-galactosa ingresaría al aparato de Golgi por un transportador de UDP-galactosa, como por ejemplo UTr2, asociado a una galactosiltransferasa específica para la síntesis de cadenas de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)galactosa de RGI.

Una segunda explicación es que variaciones en la concentración de la UDP-galactosa en el aparato de Golgi afectan diferencialmente a galactosiltransferasas de xiloglucano o de cadenas de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)galactosa de RGI según sus constantes de Michaelis-Menten ( $K_m$ ). Estudios realizados en cultivos de células animales aportan evidencias que nos permiten suponer que la síntesis de un determinado polisacárido puede ser regulado por la concentración de nucleótidos azúcar. En células epiteliales MDCK que poseen una deficiencia de un 98% en el transporte de UDP-galactosa en el aparato de Golgi (Brandli y col., 1988), se estudió la biosíntesis de distintos proteoglicanos que contienen galactosa. Se encontró que keratan sulfato no fue sintetizado, mientras que la síntesis de condroitin y heparan sulfato es normal (Toma y col., 1996). En este trabajo los autores sugieren que las  $K_m$  para las galactosiltransferasas son distintas siendo la  $K_m$  de la galactosiltransferasa de keratan sulfato mayor a la  $K_m$  de las galactosiltransferasas de condroitin y heparan sulfato.

Una tercera posibilidad se basa en la existencia de glicosiltransferasas integrales de membrana en el aparato de Golgi denominadas Csl (Cellulose synthase like) por su similitud a la celulosas sintaza de membrana plasmática. Estas proteínas de 6 a 12 dominios transmembrana tomarían los sustratos en el

citósol y formarían el polímero de azúcar liberándolo hacia el lumen del aparato de Golgi. Si bien hasta la fecha este tipo de glicosiltransferasas solo se han identificado en membrana plasmática, se ha propuesto que la síntesis de los esqueletos de los polisacáridos en el aparato de Golgi ocurriría por este mecanismo (Gibeaut, 2000).

Por último, se ha determinado que arabinosas y galactosas de RGI de paredes de tejidos de lino en crecimiento tienen un rápido recambio (Gorshkova y col., 1997) y que algunas hemicelulosas como xiloglucano, galactomananos, mananos y los galactanos presentes como ramificaciones en RGI, de la pared de células del endosperma y de los cotiledones de algunas especies, constituyen una reserva de carbonos para el crecimiento de la planta después de la germinación (Buckeridge y col., 2000, Buchanan y col., 2000) De esta forma, las cadenas de galactosa de RGI podrían ser particularmente sensibles a los niveles de azúcar del citoplasma. Por lo tanto frente a un aumento de hexosas y/o de UDP-glucosa en el citoplasma, disminuiría el recambio de galactosa desde el polisacárido hacia el citoplasma, lo que se traduciría en un aumento de este azúcar en RGI.

Hasta el momento hemos encontrado fenotipo solo en estadios tempranos del desarrollo (embriones y plántulas) aún cuando el gen *UTr1* se expresa en tejidos adultos y principalmente en flores. Con el objetivo de analizar otros tejidos, se cuantificaron monosacáridos totales a partir de una fracción insoluble en alcohol (AIR) que contiene polisacáridos de pared celular de hojas de plantas mutantes de 4 semanas, la cual fue hidrolizada, reducida, derivatizada a alditoles acetatos y cuantificada por cromatografía de gas (Reiter y col. 1997). Se determinó la cantidad de ramnosa, fucosa, arabinosa, xylosa, manosa y galactosa de las plantas mutante *utr1* y plantas silvestres del mismo ecotipo (Ler-0). No se encontraron diferencias en los porcentajes de monosacáridos de plantas mutantes y plantas silvestres (los análisis se hicieron por triplicado) (datos no mostrados). Sin embargo, mediante esta técnica no es

posible determinar azúcares cargados, tales como ácido-glucurónico y ácido-galacturónico, y tampoco glucosa debido a la gran señal que da la glucosa proveniente del almidón, siendo este uno de los sustratos que en su forma activada (UDP-glucosa) es transportado por UTr1. Además por tratarse de una preparación de polisacáridos totales de hojas (hemicelulosas, pectinas y celulosa), pequeñas diferencias en un polisacárido determinado podrían ser enmascaradas. A pesar de que no hemos encontrado cambios fenotípicos en plantas adultas, no hemos descartado que estos ocurran, sobre todo cuando observamos que el gen *UTr1* se expresa en una amplia variedad de órganos.

Una observación interesante que surge de nuestros resultados es que a pesar de la existencia del gen *UTr3*, un gen 83% idéntico, existe un fenotipo en estadíos tempranos del desarrollo de la planta. Una explicación para la ausencia de redundancia génica en plantas es la expresión de los genes en órganos diferentes. Sin embargo, nuestros resultados muestran que *UTr1* y *UTr3* tienen un patrón de expresión similar (Figura 7). Entonces, al menos en embriones y plántulas, UTr3 no sería suficiente para suplir la deficiencia de UTr1. Probablemente al eliminar la expresión de ambos genes se generaría un fenotipo mucho más drástico. Otra explicación es que estas dos proteínas sean destinadas a organelos diferentes o distintos subcompartimientos de un organelo, lugares en los que cumplirían funciones diferentes. Debido a que la proteína UTr3 no ha sido caracterizada bioquímicamente, una tercera posibilidad es que tengan diferentes preferencias de sustrato o se asocien funcional y físicamente con glicosiltransferasas distintas. De esta forma UTr1 y UTr3 participarían en la síntesis de polisacáridos distintos.

Para analizar estas posibilidades estamos buscando plantas mutantes en *UTr3*. Identificamos una planta que posee una inserción del T-DNA en la putativa región promotora del gen *UTr3*, sin embargo experimentos de Northern-blot revelaron que el gen se expresa normalmente. Por otra parte,

utilizando la estrategia de RNA interferencia estamos intentando eliminar la expresión de ambos genes simultáneamente (Chuang y col., 2000). Se obtuvieron 32 plantas transgénicas con las secuencias sentido y antisentido de *UTr3* para inducir RNA interferencia. Resultados preliminares obtenidos al analizar los niveles de expresión de *UTr3* en 10 plantas transgénicas muestran una menor expresión en 4 de ellas. Estudios posteriores utilizando estas plantas nos podrían ayudar a complementar y profundizar los datos obtenidos con la mutante *utr1*.

Por otro lado, hasta el momento no ha sido posible demostrar *in planta* que éste transportador esté en el aparato de Golgi, a pesar que *UTr1* es capaz de revertir una línea celular mutante deficiente en el transporte de UDP-galactosa de aparato de Golgi (Norambuena y col., 2002). Sin embargo, experimentos de localización subcelular de una proteína quimérica *UTr1*-GFP, muestran una localización similar a un marcador de retículo endoplasmático (Norambuena, 2004). Además el extremo carboxilo terminal de la secuencia aminoacídica de *UTr1* posee el motivo KKQK, el cual podría actuar como señal de retención en el retículo (Jackson y col., 1990). De esta forma las evidencias no nos permiten descartar que la proteína se localice en el retículo endoplásmico o alternativamente que se encuentre en ambos organelos.

Se ha descrito que UDP-glucosa es transportada al lumen del retículo endoplásmico, compartimento en el cuál es utilizada por una glucosiltransferasa que participa en el mecanismo de control de calidad del plegamiento de proteínas (Ellgaard y col., 1999). Sin embargo si bien se ha determinado transporte de UDP-glucosa en retículo endoplasmático hasta la fecha no se han identificado las proteínas responsables (Castro y col., 1999). Por lo tanto, una hipótesis alternativa para explicar nuestros resultados, sería considerar que *UTr1* es un transportador de UDP-glucosa de retículo endoplásmico, y que al estar ausente, el sistema de control de calidad de proteínas del retículo falla y por lo tanto se acumularían proteínas mal plegadas

en este organelo. En forma análoga a lo planteado en el modelo anterior, la disminución en el transporte de UDP-glucosa aumentaría el contenido de este sustrato en el citoplasma, situación que podría inducir la canalización de azúcares a elementos de reserva tales como el almidón en el cloroplasto. Por otra parte, la UDP-glucosa puede epimerizar a UDP-galactosa e ingresar al aparato de Golgi en donde podría ser incorporada a RGI.

Estudios recientes aportan evidencias que apoyan esta nueva hipótesis sobre la participación de UTr1 en el control de calidad del plegamiento de proteínas. En condiciones de stress el plegamiento de proteínas en el retículo disminuye, acumulándose en él proteínas mal plegadas. Esto induce una respuesta conocida como UPR (Unfolded Protein Response) caracterizada por la inducción de la expresión de genes que participan en el plegamiento de proteínas como por ejemplo chaperonas (Ellgaard y col., 1999). Para identificar genes de Arabidopsis que son inducidos durante la respuesta UPR plántulas de 6 días fueron tratadas con tunicamicina o DTT. Se obtuvo RNA total con el cual se hibridó un conjunto de oligonucleótidos genómicos con sondas para mas de 8.200 genes de Arabidopsis (Affymetrics Gene Chips). Se identificaron 46 genes cuya expresión esta inducida 2.5 veces en relación con el control. Entre ellos se encuentran genes que codifican para proteínas chaperonas (Calreticulina2, BipL (Luminal Binding Protein) y Calnexina1, entre otras), proteínas que participan en la formación de enlaces disulfuros, en degradación de proteínas, en glicosilación y modificaciones postraduccionales, trafico vesicular etc. Sorprendentemente el gen *UTr1* es inducido 8.7 veces en presencia de tunicamicina y 6.8 veces en presencia de DTT (Martínez y Chrispeels, 2003). Además buscando en la secuencia promotora se encontró la secuencia de consenso para el elemento regulador en cis de la respuesta UPR (UPR cis-acting element) CC-N12-CCACG. Actualmente estamos analizando la participación de UTr1 en la respuesta UPR analizando la expresión de genes que codifican para proteínas chaperonas en la mutante *utr1* y evaluando la existencia de fenotipos condicionales inducidos por stress.

Para confirmar que el fenotipo se debe a la presencia de la inserción y no a una mutación puntual no detectada en un gen diferente, se requieren estudios de ligamiento de la presencia de la inserción y el fenotipo, en la F2 y F3 de una cruce con plantas silvestres. Sin embargo debido a que el fenotipo descrito se determina mediante técnicas de microscopía, es difícil realizar un análisis que involucre un gran número de plantas.

Otras metodologías para confirmar que el fenotipo observado es producto de la mutación en el gen *UTr1* son la identificación de mutantes alélicas de fenotipos similares y la complementación de las mutantes mediante la transformación con el gen silvestre. Una estrategia alternativa fué revertir la mutante haciendo saltar el transposón desde el gen *UTr1*. Al cruzar la mutante *utr1* con plantas que poseen la enzima transposasa se obtuvo una planta que no posee el transposón en el gen *UTr1*. Sin embargo se generó un codón sin sentido en el segundo exón y por lo tanto obtuvimos una mutante alélica. Además, recientemente obtuvimos una nueva línea insercional, proveniente de la colección GABY, que posee el T-DNA en el último exón del gen *UTr1* (Pauly M. comunicación personal). De esta forma, la identificación de dos o más mutantes alélicas independientes con fenotipos similares nos permitiría confirmar que la mutación de *UTr1* es responsable de las alteraciones celulares descritas en este trabajo.

### 3. Los genes de transportadores de UDP-glucosa y UDP-galactosa constituyen una familia génica con un patrón de expresión diferencial.

Hasta el momento se han identificado 6 secuencias homólogas al transportador de UDP-glucosa/UDP-galactosa *UTr1*, denominadas *UTr2*, 3, 4, 5 y 6. Por estudios bioquímicos sabemos que el gen *UTr2* codifica para un transportador de UDP-galactosa (Norambuena, 2004). Además se ha clonado y caracterizado el gen *UTr7*, clonado por homología con el transportador de *C.elegans* SQV7, cuya proteína corresponde a un transportador de UDP-galactosa/UDP-glucosa (Segura, 2003). Si bien no se ha determinado la función de las proteínas codificadas por los otros genes, el hecho que el gen *UTr3* codifica para una proteína 92% similar a *UTr1* y el gen *UTr4* para una proteína 88% similar a *UTr2* sugiere que *UTr3* y *UTr4* serían transportadores de UDP-glucosa y/o UDP-galactosa. La existencia de varios transportadores de UDP-glucosa y/o UDP-galactosa en *Arabidopsis* podría tener relación con el hecho de que en las células vegetales además de la glicosilación de proteínas se sintetizan complejos polímeros de azúcar. En la planta existen tejidos y tipos celulares diferentes, cada uno de los cuales requiere de un preciso patrón de elongación celular y morfogénesis el cual esta regulado por distintas señales, hormonas y factores ambientales. Esto hace que la pared celular presente variaciones entre un tipo celular y otro. De esta forma, aún cuando existan transportadores de nucleótidos azúcar con propiedades bioquímicas similares, podrían tener patrones de expresión diferentes.

Los experimentos de expresión muestran que todos los genes analizados (*UTr1*, *UTr2*, *UTr3* y *UTr7*) se expresan en todos los tejidos. Sin embargo, los genes *UTr1* y *UTr3* tienen una mayor expresión en flores, *UTr2* en raíces y callos y *UTr7* en callos. Además, los experimentos de hibridación *in situ* y la tinción histoquímica de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa en la mutante *utr1* muestran que si bien *UTr1* se expresa en todas las estructuras de la planta el transcrito

estaría restringido a ciertos tipos celulares (Figura 8 y 9). Al igual que *UTr1*, la expresión de *UTr7* es muy interesante ya que posee un patrón bien definido en las células de la endodermis y/o corteza que rodean al xilema de la raíz y el hipocotilo de plántulas de 6 días y en embriones en estadio de cotiledones doblados. Estos resultados sugieren que los transportadores de nucleótidos azúcar descritos participarían en la síntesis de polisacáridos en tejidos diferentes. Debido a que la composición y estructura de la pared celular varía entre un tipo celular y otro, pueden incluso participar en la síntesis de glicoconjugados distintos o estar regulados por condiciones fisiológicas distintas.

Además, la existencia de varios genes que codifican para transportadores de UDP-glucosa y/o UDP-galactosa puede ser un indicio de propiedades funcionales diferentes. Aún cuando los transportadores *UTr1*, *UTr2* y *UTr7* han sido caracterizados bioquímicamente en un sistema heterólogo, desconocemos si la misma actividad de transporte se conserva *in vivo*. Si bien *UTr1*, *UTr2* y *UTr7* transportan UDP-galactosa y adicionalmente dos de ellas UDP-glucosa, desconocemos cuál es la afinidad de sustrato de cada una y por ende cuál es la preferencia de sustrato *in vivo*. Además por no disponer de los sustratos radioactivos que se utilizan para realizar los experimentos de transporte, no se ha podido evaluar la capacidad de transportar todos los nucleótidos azúcar que existen. Hay que considerar que en la síntesis de polisacáridos en plantas se utilizan azúcares como ácido glucurónico, arabinosa, xilosa, ramnosa y apiosa.

Finalmente y como se discutió previamente los distintos transportadores de UDP-glucosa y/o UDP-galactosa podrían estar interactuando con glicosiltransferasas distintas mediante la formación de complejos y por lo tanto participando en la síntesis de polímeros distintos.

#### 4. Identificación de plantas insercionales en los genes *UTr2*, *UTr6* y *UTr7*

Como segundo objetivo de esta tesis se propuso identificar mutantes en todos los genes de transportadores de nucleótidos azúcar caracterizados en el laboratorio. Este objetivo se facilitó enormemente por la existencia de los bancos de mutantes insercionales por T-DNA. Sin embargo fue necesario verificar la inserción, determinar que no exista una segunda inserción en el genoma e identificar las plantas homocigotas. De 15 líneas insercionales descritas solo fue posible confirmar 7 lo cual refleja la presencia de mutantes mal clasificadas en los bancos de mutantes insercionales.

Mediante PCR se identificaron plantas homocigotas para la inserción en las líneas *utr2-1*, *utr2-2* y *utr7*. Desafortunadamente ninguna de ellas tiene un fenotipo morfológico evidente. Sin embargo, aún cuando los transportadores de nucleótidos azúcar serían puntos de control en la síntesis de polisacáridos de pared, está descrito que alteraciones en la composición de dichos polímeros no siempre van acompañadas de fenotipos drásticos (Reiter y col., 1997). Un aspecto interesante en relación con la mutante en el gen *UTr6* es que de aproximadamente 30 plantas analizadas no se identificó ninguna planta homocigota. Esto sugiere fuertemente que poseer mutadas ambas copias del gen resulta letal para la planta y por lo tanto sería interesante caracterizar bioquímicamente la proteína UTr6.

La línea *utr2-1* tiene la inserción río arriba del inicio de la transcripción, en lo que hemos denominado putativa región promotora. Sin embargo, al analizar la expresión de *UTr2* en las plantas insercionales se observa que se expresa normalmente, por lo tanto esta línea no es mutante en dicho gen.

Las líneas *utr2-2* y *utr7* son nuevas herramientas para estudiar la participación de sus proteínas en la biosíntesis de polisacáridos de pared celular y por lo tanto están siendo caracterizadas molecular y fenotípicamente.

Durante el desarrollo de esta tesis se cumplieron los objetivos propuestos: se analizó la expresión de los genes de transportadores de nucleótidos azúcar, se identificaron mutantes insercionales en dichos genes y se caracterizó una de ellas. Sin embargo, la ausencia de fenotipos visibles o fácilmente identificables en las plantas insercionales sugiere que el proceso de síntesis de polisacáridos es más complejo de lo que en un inicio se pensó y la planta tiene mecanismos compensatorios que garantizan un normal crecimiento y desarrollo. En el transcurso de este trabajo y producto de la secuenciación del genoma de *Arabidopsis* se descubrieron nuevas secuencias homólogas que codificarían para transportadores de nucleótidos azúcar y por lo tanto debido a la posible redundancia funcional que puede existir entre sus proteínas, la obtención de mutantes dobles podría generar fenotipos más drásticos e interesantes.

Adicionalmente, las nuevas evidencias sobre la posible participación del transportador UTr1 en el mecanismo de control de calidad de proteínas en el retículo, abren una nueva e interesante línea de investigación, ya que hasta la fecha no se ha descrito la proteína responsable.

## CONCLUSIONES

1. Los genes de los transportadores de UDP-glucosa y UDP-galactosa *UTr1*, *UTr2* y *UTr7* de *Arabidopsis thaliana* se expresan diferencialmente.
2. Los genes homólogos *UTr1* y *UTr3* tienen un patrón de expresión similar.
3. Hemos identificado una planta de *A. thaliana* que posee una inserción única y homocigota del transposón Ds en el primer exón del gen *UTr1*. Esta inserción interrumpe la transcripción normal del gen.
4. En la mutante insercional *utr1* existe un fenotipo a nivel celular a pesar de la presencia del gen *UTr3*. Las células de cotiledones de plántulas y embriones *utr1*, tienen vacuolas más pequeñas, mayor cantidad de cuerpos lipídicos y mayor número de gránulos de almidón en los cloroplastos, en relación con las plantas silvestres.
5. La inserción en el gen *UTr1* afectaría la estructura del ramnogalacturonano I en sus cadenas laterales de (1→4)-β-galactanos sin alterar la estructura de otros polisacáridos que contienen glucosa y galactosa como xiloglucano y cadenas β-(1→3) y β-(1→6) galactosa de arabinogalactanos.
6. Se generó una mutante alélica a *utr1* que presenta un codón de término en el segundo exón.
7. Hemos identificado mutantes insercionales en los genes *Utr2* y *UTr7*.

## TRABAJO FUTURO

- Verificar la ausencia de la proteína UTr1 en la mutante *utr1* mediante el uso de anticuerpos específicos en fracciones enriquecidas de aparato de Golgi. Así mismo sería interesante medir el transporte de UDP-glucosa y UDP-galactosa en fracciones subcelulares de retículo y aparato de Golgi de plantas mutantes y compararlo con las plantas silvestres.

- Identificar al menos uno de los fenotipos descritos en esta tesis en las mutantes alélicas de *utr1*, ya sea la mutante generada al escindir el transposón o la mutante insercional GABY, de tal manera de demostrar que es la ausencia del gen *UTr1* lo que ocasiona dichas alteraciones.

- Obtener mutantes dobles en los genes *UTr1* y *UTr3*. Debido a la homología de sus secuencias, en la mutante *utr1* *UTr3* podría estar supliendo, al menos en parte, la función de *UTr1*. De esta forma, al eliminar la expresión de ambos genes se espera obtener un fenotipo más drástico y analizar el real efecto de la ausencia de estas proteínas en las células vegetales.

- Buscar alteraciones a nivel de la pared celular en las mutantes en los genes de los transportadores de nucleótidos azúcar *UTr2* y *UTr7*, con el objetivo de conocer la participación de dichas proteínas en el mecanismo de síntesis de polisacáridos.

## BIBLIOGRAFÍA

Arioli, T., Peng, L., Betzner, A.S., Bum, J., Wittke, W., Herth, W., Camilleri, C., Höfte, H., Plazinski, J., Birch, R., Cork, A., Glover, J., Redmond, J., Williamson, R.E. (1998). Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. *Science* 279: 717-720.

Asamizu, E., Nakamura, Y., Sato, S., Tabata, S. (2000). A large scale analysis of cDNA in *Arabidopsis thaliana*: Generation of 12,028 non-redundant expressed sequence tags from normalized and size-selected cDNA libraries. *DNA research* 7:175-180.

Baldwin, T.C., Handford, M.G., Yuseff, M.I., Orellana, A., Dupree, P. (2001). Identification and characterization of GONST1, a golgi-localized GDP-mannose transporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13:2283-2295.

Bonin, C.P., Potter, I., Vanzin, G.F., Reiter, W.D. (1997) The MUR1 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes an isoform of GDP-D-mannose-4,6-dehydratase, catalyzing the first step in the de novo synthesis of GDP-L-fucose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2085-2090.

Bouton, S., Leboeuf, E., Mouille, G., Leydecker, M.T., Talbotec, J., Granier, F., Lahaye, M., Hofte, H., Truong, H.N. (2002) QUASIMODO1 encodes a putative membrane-bound glycosyltransferase required for normal pectin synthesis and cell adhesion in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14:2577-2590.

Brandli, A.W., Hansson, G.C., Rodriguez-Bolulan, E., Simons, K. (1988). A polarized epithelial cell mutant deficient in translocation of UDP-galactose into the Golgi complex. *J. Biol. Chem.* 263: 16283-16290.

Brett, C.T. y Waldron, K.W. (1996). *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*. Second Edition, Chapman and Hall, London, UK.

Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (2000). Chapter 2, "Biochemistry and Molecular Biology of Plants", Ed. American Society of Plant Physiologists, Maryland, USA.

Buckeridge, M.S., Santos, H.P., Tiné, M.A.S. (2000). Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant physiology and Biochemistry* 38:141-156.

Burk, D.H., Liu, B., Zhong, R., Morrison, W.H., Ye, Z.H. (2001) A katanin-like protein regulates normal cell wall biosynthesis and cell elongation. *Plant Cell* 13:807-827.

Burget, E.G., Reiter, W.D. (1999). The mur4 mutant of *arabidopsis* is partially defective in the de novo synthesis of uridine diphospho L-arabinose. *Plant Physiol* 121:383-389.

Burget, E.G., Verma, R., Molhoj, M., Reiter, W.D. (2003). The biosynthesis of L-arabinose in plants: molecular cloning and characterization of a Golgi-localized UDP-D-xylose 4-epimerase encoded by the MUR4 gene of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15:523-531.

Carpita, N.C., Gibeut, D.M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the cell wall during growth. *The Plant Journal* 3:1-30.

Castro, O., Yin Chen, L., Parodi, A., Abejón, C. (1999). Uridine diphosphate-glucose transport into the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*: in vivo and in vitro evidence. *Molecular Biology of the Cell* 10: 1019-1030.

Chen, H., Nelson, R., Sherwood, J. (1994). Enhanced recovery of transformants of *Agrobacterium tumefaciens* after freeze-thaw transformation and drug selection. *Biotech.* 16: 664-669.

Chen, L., Carpita, N.C., Reiter, W.D., Wilson, R.H., Jeffries, C., McCann, M.C. (1998) A rapid method to screen for cell-wall mutants using discriminant analysis of Fourier transform infrared spectra. *Plant J* 16:385-392.

Chuang, C., Meyerowitz, E.M., (2000). Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:4985-4990.

Clough, S., Bent, A. (1998). Floral dip: a simplified for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16: 735-743.

Cosgrove, D. (1998). Cell wall loosening by expansins. *Plant Physiology* 118:333-339.

Darley, C.P., Forrester, A.M., McQueen-Mason, S.J. (2001). The molecular basis of plant cell wall extension. *Plant Mol. Biol.* 47:179-195.

Das, O.P., Cruz-Alvarez, C., Chaudhuri, S., Messing, J. (1990). Molecular methods for genetic analysis of maize. *Methods Mol. Cell. Biol.* 1:213-222.

Dean, N., Foster, J. (1996). The yeast VRG4 gene is required for normal golgi functions and defines a new family of related. *J. Biol. Chem.* 271: 3837-3845.

Dean, N., Zhang, Y.B., Poster, J.B., (1997) The VRG4 gene is required for GDP-mannose transport into the lumen of the Golgi in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 272:31908-31914.

Dörmann, P. and Benning, C. (1998) The role of UDP-glucose epimerase in carbohydrate metabolism of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 13:641-652.

Drews, G.N., Bowman, J.L., Meyerowitz, E.M. (1991). Negative regulation of the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* by the *APETALA2* product. *Cell* 65:991-1002.

Edwards, M.E., Dickson, C.A., Chengappa, S., Sidebottom, C., Gidley, M.J., Reid, J.S.G. (1999). Molecular characterisation of a membrane-bound galactosyltransferase of plant cell wall matrix polysaccharide biosynthesis. *Plant Journal* 19: 691-697.

Ellgard, L., Molinari, M., Helenius, A. (1999). Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* 286:1882-1888.

Faik, A., Chieshe, C., Sterling, J., Maclachlan, G. (1997). Xyloglucan galactosyl and fucosyltransferase activities from pea epicotyl microsomes. *Plant Physiology* 114:245-254.

Faik, A., Proce, N.J., Raikhel, N.V., Keegstra, K. (2002). An *Arabidopsis* gene encoding an  $\alpha$ -xylosyltransferase involved in xyloglucan biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:7797-7802.

- Ferrándiz, C., Gu, Q., Martienssen, R., Yanofsky, M.F. (2000). Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER. *Development* 127:725-734.
- Fiume, E., Christou, P., Giani, S., Breviario, D. (2004). Introns are key regulatory elements in rice tubulin expression. *Planta* 218:693-703.
- Freshour, G., Clay, R.P., Fuller, M.S., Albersheim, P., Darvill, A.G., Hahn, M.G. (1996). Developmental and Tissue-Specific Structural Alterations of the Cell-Wall Polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* Roots. *Plant Physiol* 110:1413-1429.
- Freshour, G., Bonin, C.P., Reiter, W.D., Albersheim, P., Darvill, A.G., Hahn, M.G. (2003). Distribution of fucose-containing xyloglucans in cell walls of the mur1 mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 131:1602-1612.
- Gibeaut, D. (2000). Nucleotide sugars and glycosyltransferases for synthesis of cell wall matrix polysaccharides. *Plant Physiol. Biochem.* 38:69-80.
- Goubet, F., Jackson, P., Deery, M.J., Dupree, P. (2002) Polysaccharide analysis using carbohydrate gel electrophoresis: a method to study plant cell wall polysaccharides and polysaccharide hydrolases. *Anal. Biochem.* 300:53-68.
- Hale, A.J. (1957). The histochemistry of polysaccharides. *Intern.Rev. Cytol.* 6:193-263.
- Hendriks, J.H.M., Kolbe, A., Gibon, Y., Stitt, M., Geigenberger, P. (2003). ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of *Arabidopsis* and other plant species. *Plant Physiology* 133:838-849.
- Herman, T., Horvitz, R. (1999). Three proteins involved in *Caenorhabditis elegans* vulval invagination are similar to components of a glycosylation pathway. *PNAS* 96: 974-979.
- Holland, N., Holland, D., Helentjaris, T., Dhugga, K.S., Xoconostle-Cazares, B., Delmer, D.P. (2000). A comparative analysis of the plant cellulose synthase (CesA) gene Family. *Plant Physiology* 123:1313-1323.
- Hotchkiss, R.D. (1948). A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. *Arch. Biochem.* 16:131-141.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1991). High efficiency transformation of *E.Coli* with plasmids. *Gen* 30: 96(1): 23-28.
- Ishida, N., Miura, N., Yoshioka, S., Kawakita, M. (1996). Molecular cloning and characterization of a novel isoform of the human UDP-galactose transporter, and of related complementary DNAs belonging to the nucleotide-sugar transporter gene family. *J.Biochem (Tokyo)* 120: 1074-1078.
- John, M., Röhrig, H., Schimdt, J., Walden, R., and Schell, J. (1997). Cell signalling by oligosaccharides. *Trends in Plant Sciences* 2:111-115.
- Jones, L., Seymour, G., Knox, J.P. (1997). Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1-4)- $\beta$ -D-galactan. *Plant Physiology* 113:1405-1412.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., and Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6, 3901-3907.

Keegstra, K., Raikhel, N. (2001). Plant glycosyltransferases. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:219-224.

Knox, J.P., Linstead, P.J., Peart, J., Cooper, C., Roberts, K. (1991). Developmentally regulated epitopes of cell surface arabinogalactan proteins and their relation to root tissue pattern formation. *The Plant Journal* 1:317-326.

Koncz, C., Chua, N., Schell, J. (1992). *Methods in Arabidopsis Research*. First Edition, World Scientific Publishing, Singapore.

Krysan, P.J., Young, J.C., Sussman, M.R. (1999). T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11:2283-2290.

Ledbetter, M y Porter, K. (1970). "Introduction to the fine structure of plant cells". Springer-Verlag (Eds). Berlin- Alemania.

Lerouxel, O., Choo, T.S., Seveno, M., Usadel, B., Faye, L., Lerouge, P., Pauly, M. (2002). Rapid structural phenotyping of plant cell wall mutants by enzymatic oligosaccharide fingerprinting. *Plant Physiol* 130:1754-1763.

Lin, Y., Sun, L., Nguyen L.V., Rachubinski, R.A., Goodman, H.M. (1999). the Pex16p homolog SSE1 and storage organelle formation in *Arabidopsis* seeds. *Science* 284:328-330.

Luhn, K., Wild, M.K., Eckhardt, M., Gerardy-Schahn, R., Vestweber, D. (2001). The gene defective in leukocyte adhesion deficiency II encodes a putative GDP-fucose transporter. *Nat Genet* 28:69-72.

Madson, M., Dunand, C., Li, X., Verma, R., Vanzin, G.F., Caplan, J., Shoue, D., Carpita, N., Reiter, W-D. (2003). The Mur 3 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a Xyloglucan galactosyltransferase that is evolutionarily related to animal exostosins. *Plant Cell*. 15:1662-70.

Martinez, M.I., Chrispeels M.J. (2003). Genomic analysis of the unfolded protein response in *Arabidopsis* shows its connection to important cellular processes. *The Plant Cell* 15: 561-576.

McCann, M.C., Hammouri, M., Wilson, R., Belton, P., Roberts, K. (1992). Fourier transform infrared microspectroscopy is a new way to look at plant cell walls. *Plant Physiology* 100:1940-1947.

McCartney, L., Ormerod, A., Gidley, M., Knox, J.P. (2000). Temporal and spatial regulation of pectic (1-4)- $\beta$ -D-galactan in cell walls of developing pea cotyledons:implication for mechanical properties. *The Plant Journal*: 22:105-113.

McCartney, L., Steele-King, C.G., Jordan, E. and Knox, J.P. (2003). Cell wall pectic (1 $\rightarrow$ 4) beta-d-galactan marks the acceleration of cell elongation in the *Arabidopsis* seedling root meristem. *The Plant Journal* 33, 447-454.

McKinney, E.C., Ali, N., Traut, A., Feldmann, K.A., Belostotsky, D.A., McDowell, J.M., Meagher, R.B. (1995). Sequence-based identification of T-DNA insertion mutations in *Arabidopsis*: actin mutants act2-1 and act4-1. *Plant J* 8:613-622.

Meinke, D.W., Franzmann, L.H., Nickle, T.C., Yeung, E.C. (1994). Leafy cotyledon mutants of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 6:1049-1064.

Mertz, L.M., Rashtchian, A. PCR radioactive labeling system: A rapid method for synthesis of high specific activity DNA probes. *Focus* 16: 45-48.

Miura, N., Ishida, N., Hoshino, M., Yamauchi, M., Hara, T., Ayusawa, D., Kawakita, M. (1996). Human UDP-galactose translocator: molecular cloning of a complementary DNA that complements the genetic defect of a mutant cell line deficient in UDP-galactose translocator. *J.Biochem (Tokyo)* 120: 236-241.

Mohnen, D. (1999). Biosynthesis of pectins and galactomannans. In: P.B.M. (Ed.) *Carbohydrates and their derivatives including tannins, cellulose and related lignins*, vol 3. Elsevier, Amsterdam, 497-527.

Moore, P.J., Swords, K.M., Lynch, M.A., Staehelin, L.A. (1991). Spatial organization of the assembly pathways of glycoproteins and complex polysaccharides in the Golgi apparatus of plants. *J.Cell Biol.* 112:589-602.

Muñoz, P., Norambuena, L., Orellana, A. (1996). Evidence for a UDP-glucose transporter in golgi apparatus-derived vesicles from pea and its possible role in polysaccharide biosynthesis. *Plant Physiol.* 112: 1585-1594

Neckelmann, G., Orellana, A. (1998). Metabolism of uridine-5'-diphosphate-glucose in golgi vesicles from pea stems. *Plant Physiol.* 117: 1007-1014.

Nicol, F., His, I., Jauneau, A., Vernhettes, S., Canut, H., Hofte, H. (1998) A plasma membrane-bound putative endo-1,4-beta-D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in *Arabidopsis*. *Embo J.* 17:5563-5576.

Norambuena, L., (2004). Transporte de UDP-Galactosa en el Aparato de Golgi de células vegetales. Tesis de Doctorado, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Norambuena, L., Marchant, L., Beminsone, P., Hirschberg, C.B., Silva, H., Orellana, A. (2002). Transport of UDP-galactose in plants. Identification and functional characterization of AtUTr1, an *Arabidopsis thaliana* UDP-galactos/UDP-glucose transporter. *J. Biol. Chem.* 277:32923-32929.

O'Brien, T.P., McCully, M.E. (1981). *The study of plant structure principles and selected methods*. Bradford House Pty. Ltd., South Melbourne, Australia.

Parinov, S., Sevugan, M., Ye, D., Yang, W., Kumaran, M., Sundaresan, V. (1999). Analysis of flanking sequences from Dissociation insertion lines: A database for reverse genetics in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 11: 2263-2270.

Pauly, M., Andersen, L.N., Kauppinen, S., Kofod, L.V., York, W.S., Albersheim, P., Darvill, A. (1999) A xyloglucan-specific endo-beta-1,4-glucanase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast, purification and characterization of the recombinant enzyme. *Glycobiology* 9:93-100.

Perrin, R.M., DeRocher, A.E., Bar-Peled, M., Zeng, W., Norambuena, L., Orellana, A., Raikhel, N., Keegstra, K. (1999). Xyloglucan fucosyltransferase, an enzyme involved in plant cell wall biosynthesis. *Science* 284: 1976-1979.

Perrin, R.M., Zhonghua, J., Wagner, T.A., O'Neill, M., Sarria, R., York, W., Raikhel, N., Keegstra, K. (2003). Analysis of Xyloglucan fucosylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 132:76-778.

Reiter, W-D., Chapple, C., Somerville, C.R. (1997). Mutants of Arabidopsis with altered cell wall polysaccharide composition. *Plant Journal* 12: 335-345.

Reiter, W-D. (2002). Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Current opinion in plant biology* 5:536-542.

Rose, A.B. (2002). Requirements for intron mediated enhancement of gene expression in Arabidopsis. *RNA* 8:1444-1453.

Sarria, R., Wagner, T.A., O'Neill, M.A., Faik, A., Wilkerson, C.G., Keegstra, K., Raikhel, N.V. (2001) Characterization of a family of Arabidopsis genes related to xyloglucan fucosyltransferase1. *Plant Physiol.* 127:1595-1606.

Segura, M. (2003). Expresión y caracterización del transportador Atsqv7 de Arabidopsis thaliana homólogo al gen sqv7 de caenorhabditis elegans. Tesis de Ingeniero en Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Seifert, G.J., Barber, C., Wells, B., Dolan, L., Roberts, K. (2002). Galactose biosynthesis in Arabidopsis: genetic evidence for substrate channeling from UDP-D-Galactose into cell wall polymers. *Current Biology* 12:1840-1845.

Seitz, B., Klos, C., Wurm, M., Tenhaken, R. (2000). Matrix polysaccharide precursors in Arabidopsis cell walls are synthesized by alternate pathways with organ-specific expression patterns. *Plant J.* 21:537-546.

Schoenfeld, T. (1995). DNA purification: Effects of bacterial strains carrying the endA1 genotype on DNA quality isolated with Wizard plasmid purification systems. *Promega Notes* 53, 12.

Schultz, C., Gilson, P., Oxley, D., Youl, J., Bacic, A. (1998). GPI-anchors on arabinogalactan proteins: implications for signalling in plants. *Trends in Plant Science* 3:426-431.

Showalter, A. (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell* 5:9-23.

Sjoberg, M., Salazar, T., Espinosa, C., Dagnino, A., Avila, A., Eggers, M., Cassorla, F., Carvallo, P., Mericq MV. (2001). Study of GH sensitivity in Chilean patients with idiopathic short stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 86:4375-81.

Smallwood, M., Beven, A., Donovan, N., Neill, S.J., Peart, J., Roberts, K., Knox, J.P. (1994). Localization of cell wall proteins in relation to the developmental anatomy of the carrot root apex. *The Plant Journal* 5:237-246.

Smallwood, M., Yates, E., Williats, W., Martin, H., Knox, J.P. (1996). Immunochemical comparison of membranes-associated and secreted arabinogalactan-proteins in rice and carrot. *Planta* 198:452-459.

Smith, D., Yanai, Y., Liu, Y.G., Ishiguro, S., Okada, K., Shibata, D., Whittier, R.F., Fedoroff, N.V. (1996). Characterization and mapping of Ds-GUS-T-DNA lines for targeted insertional mutagenesis. *Plant J.* 10:721-732.

Springer, P.S., McCombie, R., Sundaresan, V., Martienssen, R. (1995). Gene trap tagging of PROLIFERA, an essential MCM2-3-5-like gene in Arabidopsis. *Science* 268:877-880.

Springer, P. (2000). Gene Traps: Tools for plant development and genomics. *The Plant Cell* 12:1007-1020.

Sterling, J., Wulff, C., Norambuena, L., Orellana, A., Mohnen, D. (1998). Subcellular localization and topology of polygalacturonate  $\alpha$ -4-galacturonosyltransferase in *Pisum sativum*. Abstracts Keystone symposia on molecular and Cellular Biology. Plant Cell Biology, Taos, N.M. USA p.42.

Sundaresan, V., Springer, P., Volpe, T., Haward, S., Jones, J.D., Dean, C., Ma, H., Martienssen, R. (1995) Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes Dev.* 9:1797-1810.

Taylor, N.G., Scheible, W., Cutler, S., Somerville, C.R., Turner, S.R. (1999). The *irregular xylem3* locus of *Arabidopsis* encodes a cellulose synthase required for secondary cell wall synthesis. *The Plant Cell* 11:769-779.

The *Arabidopsis* genome initiative (2000). The *Arabidopsis* initiative analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796-815.

Toma, L., Pinhal, M.A.S., Dietrich, C.P., Nader, H.B., and Hirschberg, C.B. (1996). Transport of UDP-galactose into the Golgi lumen regulates the biosynthesis of proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 271: 3897-3901.

Vanzin, G.F., Madson, M., Carpita, N.C., Raikhel, N., Keegstra, K., Reiter, W-D. (2002). The *mur2* mutant of *Arabidopsis thaliana* lacks fucosylated xyloglucan because of a lesion in fucosyltransferase AtFUT1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 3340-3345.

Western, T.L., Skinner, D.J., Haughn, G.W. (2000). Differentiation of mucilage secretory cells of the *Arabidopsis* seed coat. *Plant Physiology* 122:345-356.

Willats, W., Steele-King, C., Marcus, S., Knox, J.P. (1999a). Side chains of pectic polysaccharides are regulated in relation to cell proliferation and cell differentiation. *The Plant Journal* 20:619-628.

Willats, W. G., McCartney, L., and Knox, J. P. (2001a). In-situ analysis of pectic polysaccharides in seed mucilage and at the root surface of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 213, 37-44.

Willats, W., Orfila, C., Limberg, G., Buchholt, H., W.M. van Alebeek, G., Voragen, A., Marcus, S., Christensen, T., Mikkelsen, J., Murray, B., Knox, J.P. (2001b). Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls. *The Journal of Biological chemistry* 276:19404-19413.

Windsor, J.B., Symonds, J.B., Mendenhall, J., Lloyd, A.M. (2000). *Arabidopsis* seed coat development: morphological differentiation of the outer integument. *Plant Journal* 22:483-493.

Wulff, C., Norambuena, L., Orellana, A. (2000). GDP-fucose uptake into the Golgi apparatus during xyloglucan biosynthesis requires the activity of a transporter-like protein other than the UDP-glucose transporter. *Plant Physiology* 122:867-77.

Xiang, C., Wang, H., Shiel, P., Berger, P., Guerra, D.J. (1994). A modified alkaline lysis miniprep protocol using a single microcentrifuge tube. *Biotechniques* 17: 30-32.

Xu, W., Purugganan, M., Polisensky, D., Antosiewicz, D., Fry, S., Braam, J. (1995). *Arabidopsis* TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase. *The Plant Cell* 7: 1555-1567.

Zabackis, 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.