

Expresión de AGP12 y AGP17 durante el desarrollo del Mega gametofito en *Ricinus communis*

Luis Emmanuel Mendoza-Estrada¹

Gerardo Acosta-García²

Gabriel Iturriaga¹

César Leobardo Aguirre-Mancilla¹

Juan Carlos Raya-Pérez¹

Juan Gabriel Ramírez-Pimentel^{1§}

1 Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Roque. Carretera Celaya-Juventino Rosas km 8, Roque, Celaya, Guanajuato, México. CP. 38110. (d21980655@roque.tecnm.mx; gabriel.id@roque.tecnm.mx; cesar.am@roque.tecnm.mx; juan.rp2@roque.tecnm.mx). juan.rp2@roque.tecnm.mx

2 Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Celaya. Avenida Tecnológico y Antonio García Cubas s/n, Celaya, Guanajuato, México. CP. 38010. (gerardo.acosta@itcelaya.edu.mx).

Autor para correspondencia: juan.rp1@roque.tecnm.mx.

Resumen

El desarrollo del gametofito femenino de las angiospermas está controlado por múltiples factores, genéticos, hormonales, posicionales y epigenéticos. Las arabinogalactoproteínas son un grupo de proteínas que actúan tanto de manera estructural como en señalización durante el desarrollo, particularmente del saco embrionario. Durante 2018-2020 se analizó el desarrollo del gametofito femenino en plantas de *Ricinus communis* establecidas en el campo experimental del Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Roque. *Ricinus communis* es una especie que ha cobrado importancia para la producción de biocombustibles y biorremediación. El objetivo del presente trabajo fue analizar la expresión de AGP12 y AGP17 asociado con el desarrollo del gametofito femenino en etapas tempranas de desarrollo, a través de RT-PCR y qRT-PCR, en contraste con genes marcadores de las primeras divisiones celulares que actúan durante la megagametogénesis. Se encontró que ambos genes presentaron patrones de expresión semejantes, con disminución de expresión en el inicio de la meiosis y otra durante la maduración del óvulo y emisión de estigmas.

Palabras clave:

arabinogalactoproteínas, desarrollo reproductivo, diferenciación, megagametofito.



Introducción

El desarrollo del gametofito femenino se encuentra mediado por la expresión de distintos genes correspondientes a factores de transcripción y otras familias de proteínas, incluidos los receptores de la superficie celular. Existen además otros factores posicionales que implican la respuesta a señales químicas y a los niveles hormonales y el transporte de auxinas, que han demostrado una capacidad para regular funciones críticas en la aparición de óvulos y la morfogénesis.

La diversificación de óvulos se ha estudiado utilizando ortólogos de genes reguladores en grupos de angiospermas divergentes (Gasser y Skinner, 2019). La higuera (*Ricinus communis* L.) es un cultivo que ha ganado atención por su uso en la producción de biocombustibles, la capacidad de adaptación que ha tenido en México y la diversificación de subproductos con usos comerciales, además de proponerse como una alternativa para biorremediación de suelos.

Pertenece a la familia de las *Euphorbiaceae* y es monoica, por lo que se facilitó el estudio del desarrollo reproductivo. Puede cultivarse como planta anual o mantenerse como perenne, resultando productivo en ambos casos (LEAL *et al.*, 2022). El mayor productor de semilla de *Ricinus* a nivel mundial es la India con 1 198 000 t, este país representa cerca del 84.18% de la producción total, el segundo país productor es Mozambique con tan solo 85 436 t y representa apenas el 6%. México se encuentra en el lugar 25 a nivel mundial con una producción de 282 t en 2018 (FAOSTAT, 2020).

Debido a su importancia económica, se han impulsado proyectos globales y se cuenta ya con el genoma secuenciado de *R. communis* (txid:3988), se han identificado 31 237 genes en un tamaño aproximado de 350 Mb (Saadaoui *et al.*, 2017). Por estas razones surge como un interesante modelo de estudio con herramientas moleculares ahora disponibles. Las nuevas tecnologías han permitido el estudio de las plantas mediante enfoques genéticos avanzados, la información disponible del genoma, los análisis de transcriptoma, el aislamiento celular sofisticado y las imágenes microscópicas han mejorado la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen en la formación de los gametofitos (Saadaoui *et al.*, 2017; Erbasol *et al.*, 2019).

El estudio del desarrollo de los gametofitos y la semilla se plantea como una oportunidad para mejorar los rendimientos, acelerar la domesticación de los genotipos adaptados a las distintas regiones del país e incluso modificar la composición de aceites, como el producto más valioso y por el cual, se impulsa la producción masiva.

El desarrollo de los gametofitos se lleva a cabo en el meristemo floral, una vez que ha terminado su desarrollo mediado por el gen *wuschel* (WUS) (Thomson y Wellmer, 2019); el gen *wus* es regulado por el factor de transcripción *nozzle/sporocyteless* (NSS/SPL), que activa la expresión de *windrose* (WIH1, 2) en la zona de la nucela del primordio de óvulo, en esta zona los genes *WIH1* y *WIH2* (codifican péptidos pequeños) y el gen *tornado2* (TRN2) son los encargados del desarrollo de la célula madre de la megaspora (MMC).

Algunos genes han sido identificados como responsables del desarrollo de la célula madre de la megaspora (MMC). En arroz (*Oryza sativa* L.), la pérdida de funciones del gen *multiple sporophyte1* (MSP1) presentan un desarrollo de múltiples células parecidas a MMC, aunque presentan la capacidad de sufrir meiosis para generar sacos embrionarios, son anormales y parcialmente estériles. Estas características respaldan la existencia de un mecanismo de inhibición lateral en el primordio del óvulo, permite que el MMC reprime la formación de MMC adicionales en el tejido circundante (Erbasol *et al.*, 2019).

También se ha demostrado que el gen *mneme* (MEM) restringe el desarrollo de células nucleares adyacentes a MMC, MEM se expresa predominantemente en el MMC y codifica una helicasa de ARN de la familia *dead-box*, se ha demostrado que las helicasas de ARN de *dead-box* actúan en la metilación del ADN dirigida por ARN (Schmidt *et al.*, 2011).

Los miembros de la familia *argonaute* (AGO4, 6 y 9) están asociados con ARN de interferencia pequeños de 24 nucleótidos (ARNip) para silenciar los elementos transponibles (TEs). Las mutantes con pérdida de función de todos los miembros de este grupo, presentan defectos similares a los observados en mutantes *mem* (Hernández-Lagana *et al.*, 2016).

Similar a las mutantes que afectan al grupo AGO4, la pérdida de función de otros componentes de la ruta RdDM (metilación de ADN mediada por ARN), como el suppressor of gene silencing3 (SGS3) y la rna-dependent rna polymerase6 (RDR6), da como resultado múltiples células similares a MMC y sacos embrionarios no reducidos. Además, las células similares a MMC en los mutantes ago9, sgs3 y rdr6 muestran un estado de cromatina distinto al de las células nucleares circundantes (Olmedo-Monfil *et al.*, 2010).

Una vez que la MMC se somete a meiosis, se generan cuatro células megasporas haploides que están marcadas por la acumulación de calosa en sus paredes celulares (Rodkiewicz, 1970). Tres de ellos degeneran a través de muerte celular programada, mientras que uno sobrevive y da lugar a la megaspora funcional (FM). El estado de la cromatina de la FM sugiere que su selección involucra características de cromatina específicas y comunes en comparación con la diferenciación de MMC en *Arabidopsis thaliana* (She *et al.*, 2013).

Además de controlar la entrada en la meiosis, proteínas relacionadas a inhibidores de cinasas (KRPs) parecen ser importantes para la selección de la FM. En las mutantes por pérdida de función de la familia KRP altamente redundante, se confirma el fenotipo MMC múltiple y con frecuencia sobrevive más de una megaspora (Yang y Sundaresan, 2000). Las megasporas sobrevivientes pueden formar múltiples sacos embrionarios que, en casos raros, resultaron en plántulas gemelas después de la fertilización.

En particular, en el tipo silvestre, KRP4 se detectó específicamente en las megasporas degeneradas, pero no en la FM (Rodkiewicz, 1970; Yang y Sundaresan, 2000; She *et al.*, 2013). Se han identificado varias mutantes de *A. thaliana* que afectan la selección de FM. En la mutante antikevorkian, cuyo locus correspondiente aún no se ha determinado, se evita la degradación de las cuatro células de megaspora y todos los productos meióticos parecen capaces de generar un saco embrionario (Yang y Sundaresan, 2000).

Se ha definido un papel crítico para los elementos del citoesqueleto en la organización de los arreglos citoplasmáticos y el posicionamiento de los núcleos durante la megagametogénesis, de hecho, la división nuclear y la celularización se ven gravemente afectadas por las perturbaciones del citoesqueleto: las mutaciones en los genes de *A. thaliana* que codifican las isoformas de β -tubulina (TUBG1, TUBG2) o una subunidad central del complejo que contiene β -tubulina (GCP2) exhiben defectos gametofíticos femeninos en mitosis, posicionamiento nuclear y celularización. Además, se ha demostrado que los genes que codifican kinesina como atnack1/hinkel y stud/tetraspore/atnack2 son necesarios para la adecuada celularización y posicionamiento nuclear durante el desarrollo de los gametofitos femeninos (Erbasol *et al.*, 2019).

Las arabinogalactoproteínas (AGPs) están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, son glicoproteínas extracelulares que constituyen parte amorfa de la pared celular como proteínas estructurales. Poseen hasta el 90% de su peso de azúcar con heterogeneidad en esqueleto protéico y cadenas de carbohidrato, además de la presencia de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) en el extremo carboxi-terminal, que permite el anclaje a la membrana celular. El motivo glicosídico está constituido principalmente de un esqueleto de galactana con uniones β -(1,3) al que se unen cadenas de oligosacárido o polisacárido ricas en galactosa y arabinosa.

El núcleo protéico está compuesto por hidroxiprolina, prolina, serina, alanina y treonina (Showalter y Basu, 2016; Ma *et al.*, 2017; Su y Higashiyama, 2018; Leszczuk *et al.*, 2018). En *Arabidopsis*, existen diversos estudios de la expresión de genes AGP en células individuales de distintos compartimentos del gametofito femenino, que permiten conocer a detalle la expresión diferencial en cada parte del óvulo, por ejemplo, AGP1 se expresa claramente en el funículo y tegumentos cerca del micrópilo, AGP12 en la región calazal, AGP19 en la pared del ovario. Se menciona que su interacción influyó en la función como moléculas señal, al mediar el desarrollo y nutrición del óvulo.

La sobreexpresión de arabinogalactan protein18 (AGP18), que codifica una proteína glicosilada unida a la membrana plasmática que se localiza en las células integumentarias del óvulo meiótico, da como resultado la supervivencia de múltiples células de megasporas que pueden adquirir identidad FM (Demesa y Vielle 2013).

Finalmente, en las triple-mutantes por pérdida de función de los genes del receptor de arabidopsis histone kinase (AHK) la FM a menudo no se especifica, en función de la morfología y la falta de expresión del marcador, lo que resulta en un desarrollo del saco embrionario nulo o anormal.

La expresión de todos los AHK se detecta en el tejido esporofítico calazal y actúa en la vía de señalización de la fitohormona citoquinina (Cheng *et al.*, 2013). También se menciona la importancia de AGP18 como marcador para la localización de primordios para la formación de óvulos y otros órganos (Acosta y Vielle, 2004; Pereira *et al.*, 2014; Leszczuk *et al.*, 2018). Recientemente, se ha reportado en *Torenia fournieri*, que proteínas AGP que son expresadas en las sinérgidas del gametofito femenino, ejercen un papel atrayente para el tubo polínico, por activación de péptidos ricos en cisteína, denominados lure1 y lure3 (Zhong y Qu, 2019), esto pone de manifiesto que además de ser importantes para el desarrollo y diferenciación, también cumplen funciones particulares en el proceso de fecundación.

La naturaleza heterogénea de las AGPs está reflejada en las múltiples funciones que cumplen. Están ancladas en la membrana celular y pueden actuar como moléculas de adhesión que conectan elementos de la pared celular con la membrana plasmática y ya ha sido reportada la localización tisular y subcelular. Además, es reconocido por su importante papel en el desarrollo reproductivo de las plantas, tanto en los órganos masculinos como femeninos (Leszczuk *et al.*, 2019).

Se ha reportado que la expresión de AGPs se da principalmente en la ruta de crecimiento del tubo polínico durante el periodo de mayor receptividad del óvulo, lo que sugiere que podrían actuar en como lubricante y también como nutrimento para crear un ambiente más favorable para el crecimiento del tubo polínico en la matriz extracelular a lo largo del pistilo, lo que asegura que se logre la fertilización (Lopes *et al.*, 2016). Posterior a la fecundación, también se ha observado la acumulación de AGPs en la zona basal del embrión en etapa globular, como indicador de la transición a la etapa triangular, lo que remarca la importancia de estas moléculas en la interacción celular durante el desarrollo, esto incluye comunicación celular, transducción de señales y transporte de material (Lopes *et al.*, 2016).

Dado que las AGPs presentaron diferentes patrones de expresión característicos y su importancia en la diferenciación, el objetivo de la investigación fue determinar el posible papel de los genes AGP12, AGP17 y AGP19 durante el desarrollo del gametofito femenino de *R. communis*.

Materiales y métodos

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de biología molecular agroalimentaria del Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Roque, ubicado en el km 8 de la carretera Celaya-Juventino Rosas, Celaya, Guanajuato. Se colectaron inflorescencias de *Ricinus communis* L., establecidas en el campo experimental del Tecnológico de Roque, la colecta se llevó entre los 40 y 70 días después de la siembra, durante el periodo 2018-2020 con manejo según Raya-Pérez *et al.* (2016). Se seleccionaron los botones florales femeninos y se clasificaron en cinco etapas de desarrollo: 2 mm, 3 mm, 4 mm, 5 mm y 6 mm de longitud.

Al considerar el tamaño de 6 mm como la etapa en la que la flor libera los estigmas para ser polinizada, en esta etapa el saco embrionario debe estar bien desarrollado para una correcta fertilización. Los botones florales fueron disectados con la ayuda de un microscopio estereoscopio modelo Zoom Leica^{MR} y un bisturí, se eliminaron los sépalos y la capsula con púas prematuramente desarrolladas y se dejaron expuestos los sacos embrionarios.

Los óvulos fijados en solución fijadora FAA (formaldehído, ácido acético y etanol, 1:1:18) durante un periodo de cinco minutos, se repitió la operación tres veces, se enjuagó con alcohol 70% entre cada operación, las muestras fueron deshidratadas en soluciones seriadas etanol y clarificadas con etanol-ácido láctico (1:3, 1:2, 1:1) durante un periodo de 24, 2 y 2 h respectivamente. Se realizaron observaciones en microscopio invertido Olympus 1X71[®] con diferentes objetivos que van desde 10X, hasta 100X bajo óptica de contraste interferencial de Normanski, fotodocumentado con cámara Olympus DP-70 acoplada al mismo microscopio.

Se realizó extracción de ARN total cinco tamaños diferentes (2 mm, 3 mm, 4 mm, 5 mm y 6 mm), en cinco réplicas, con el reactivo TRIzol (Invitrogen™) según las recomendaciones del fabricante. Los extractos se resuspendieron en un volumen final de 20 l y se determinó la concentración con un equipo NanoDrop™ 1000c con ello se obtuvo valores para rendimiento en $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ y la relación de absorbancia A260/280 cercano a 2 y se verificó la integridad; a través, de electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Para el análisis de expresión a través de RT-PCR y qRT-PCR, se diseñaron oligonucleótidos específicos por homología con los genes correspondientes de *Arabidopsis thaliana* en el genoma de referencia de *Ricinus communis* L. (taxid:3988) y la herramienta BLAST (ncbi).

Se ordenó la síntesis de los oligonucleótidos (T4Oligo™) como sigue: RcActina fw(5'-GCCTGATGGTCAGGTCATCAC-3'), Rev (5'-TAGAGCCACCGATCCAGACAC-3'); RcNZZ Fw (5'-TTGGCTATGCTATTGGGTTCTT-3'), Rev (5'-TGCTACACTTTTGGGGCTCTT-3'); RcSYN1 Fw (5'-GTCAGTACAAGGGAGC AGATT-3'), Rev (5'-CAGGGAAAGATAAACCAAGTAGTC-3'); AGP12 Fw (5'-ACAACATCAT CATTTCGCACCA-3'), Rev (5'-CATCGGAAGTAGGACTTGG-3'); AtAGP17 Fw (5'-CCATT TCTCCAGCTGCTCCA-3'), Rev (5'-CGGGCGGAGCAGGCGGGCTT-3'); AtAGP19 Fw (5'-CCA CCAGCTCCAAAAGTTGC-3'), Rev (5'-GGGCATGGTGATGCCTTTTG-3').

Se llevaron a cabo reacciones RT-PCR punto final, con la enzima MLV- reverse transcriptase (Invitrogen™) con el protocolo provisto por el fabricante en termociclador SimpliAmp (Life technologies™) y para RT-PCR cuantitativo se diseñó un experimento de tipo CT comparativos (##CT) con el apoyo del Software StepOne™ software V2.1, por medio del kit (Mix SYBR green®) para cada etapa de desarrollo (cinco etapas) para medir la expresión de los genes estudiados (AGP12 y AGP19) y el gen de referencia (actina), con dos repeticiones.

En el experimento se utilizó el colorante fluorescente ROXTM como muestra pasiva (incluido en el Mix SYBR green®). Las condiciones de ciclaje fueron programadas en el equipo StepOne™ real-time PCR (Life Technologies™): desnaturalización inicial 95c, 10:00; desnaturalización: 95c, 00:15; alineamiento: 58C, 01:00; 40 ciclos. Se consideró, para la curva de temperatura de fusión (Tm): desnaturalización 95C,00:15; alineamiento 58C, 01:00; desnaturalización 95C, 00:15. los resultados de los análisis fueron analizados en el software StepOne™ v2.1.

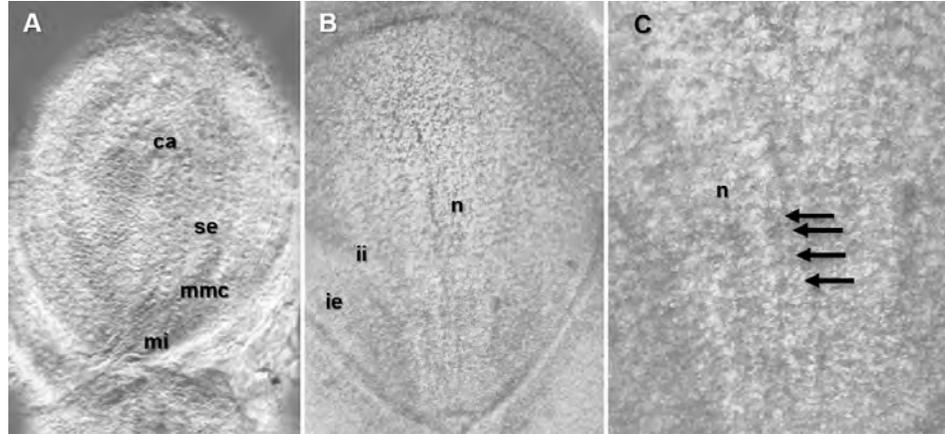
Resultados y discusión

Determinación de etapas de desarrollo

El análisis microscópico mostró que, en la etapa correspondiente a 2 mm, el desarrollo morfológico interno aún no es evidente. Se aprecia el establecimiento del eje micropilar-calazal y el espacio del saco embrionario; en relación con las estructuras externas, las púas de la cápsula aún no se han extendido y análisis microscópico no revela estructuras internas claramente diferenciadas; sin embargo, los ejes de desarrollo están definidos posicionalmente desde etapas más tempranas (Figura 1A).



Figura 1. Diferenciación en las primeras etapas de desarrollo del gametofito femenino de *R. communis*. A) etapa estudiada (2 mm) del botón floral, presentó una estructura temprana del desarrollo del gametofito femenino en el cual se observó la distribución del saco embrionario (se), la zona de la calaza (ca) y del micrópilo (mi) y la célula madre de la megaspora (mmc); B) 3 mm, se apreció la estructura del óvulo, los tegumentos internos (ii) y externos (ie) y C) detalle en la etapa de 3 mm. Las flechas indican las células de la tétrada, posterior a la meiosis en la zona de la nucela (n).



En la segunda etapa de desarrollo seleccionada (3 mm), se observa la diferenciación celular que ocurre al interior del óvulo; en la zona próxima a la calaza se distingue una única célula diferenciada, correspondiente a la célula madre de la megaspora MMC, esta célula se vuelve evidente por la expansión localizada y un engrosamiento de la pared celular (Figura 1B). En esta misma etapa de 3 mm se observa la primera división meiótica de la MMC para la formación de una diada, lo cual dirige la progresión en el desarrollo del gametofito femenino durante la esporogénesis (Figura 1C).

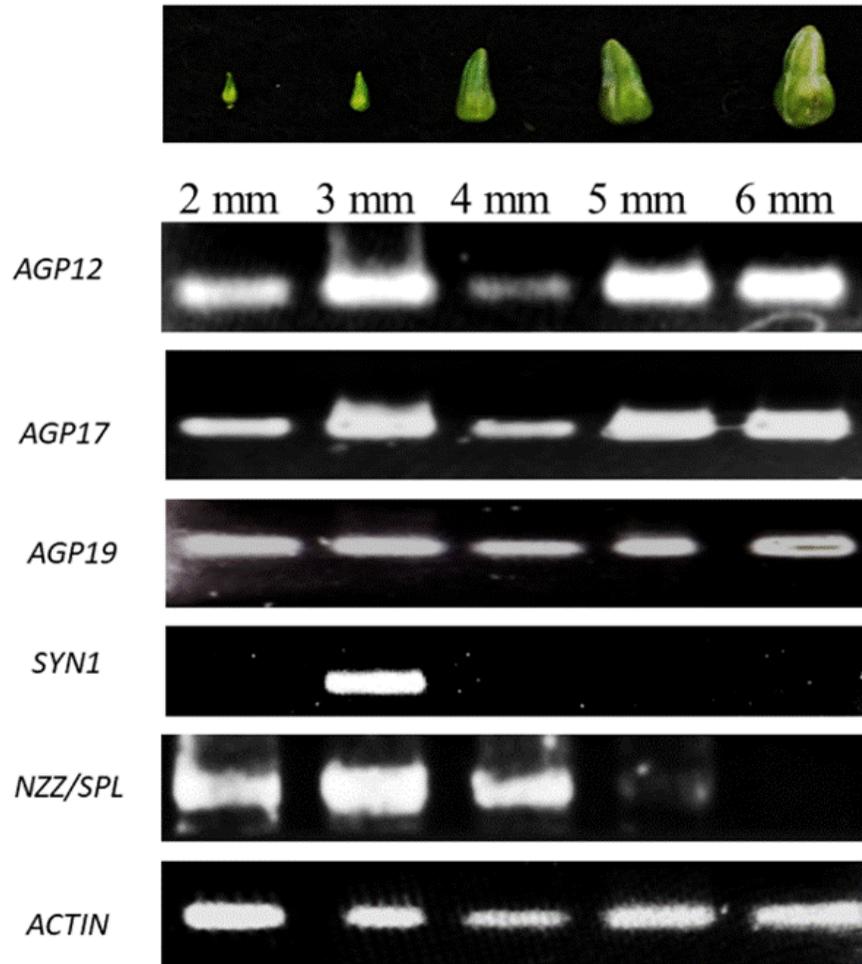
Análisis de expresión de AGP12, AGP17 y AGP19

El análisis de expresión de los genes AGP12, 17 y 19 por RT-PCR indicó que los tres genes se expresan continuamente durante el desarrollo del botón floral desde la etapa inicial de 2 mm hasta la última etapa de desarrollo analizada correspondiente a 6 mm, en contraste con los marcadores *synapsis1* (SYN) y *nozzle/sporocyteless* (NZZ/SPL), que mostraron una clara temporalidad de expresión, semejante a la reportada, en *Arabidopsis*, por Wils y Kaufmann (2016), el patrón de expresión de las AGPs confirma la conservación de función y expresión en diferentes familias de dicotiledóneas. Sin embargo, la interacción con otros tipos de AGP induce cambios en los niveles de expresión, que se verificaron mediante qRT-PCR.

El gen SYN se usa como marcador de desarrollo correspondiente al inicio de la meiosis en la célula madre de la megaspora, mientras SPL/NZZ se relacionan con la diferenciación de la célula arqueospora, un evento previo a la definición de la célula madre de la megaspora, se observó que la expresión de este gen es evidente hasta después de la etapa de 4 mm, cuando ya se han completado las divisiones meióticas (Figura 2).



Figura 2. Expresión génica durante el desarrollo del botón floral y gametofito femenino. Los genes AGP 12, 17 y 19 muestran expresión en las cinco etapas previas a la emergencia de los espermatozoides, mientras que SYN1 marca la primera división de la MMC y el ingreso a la meiosis; NZZ/SPL define la expresión a partir de la etapa de 5 mm. El gen de actina se usó como control de expresión en el ensayo RT-PCR. En la parte superior se muestra el aspecto del botón floral en cada etapa analizada.



El proceso de maduración del gametofito femenino en *R. communis* resultó perfectamente comparable con el modelado en *Arabidopsis*, por lo que se pueden distinguir cada una de las etapas de desarrollo y se asume que la expresión génica reportada es aplicable en este modelo de estudio; esto se confirmó al realizar los análisis de expresión.

En *Arabidopsis*, NZZ/SPL participan en los procesos de desarrollo de la antera y del óvulo, así como en la identidad de los tejidos del estambre (Wils y Kaufmann, 2016), lo que explica, hasta cierto punto el hecho de que la expresión prevalece más allá de la especificación de la célula arqueospora. A pesar de que se observaron diferencias de intensidad en las bandas amplificadas, no se consideran como evidencia de diferencias en los niveles reales de expresión, por lo que fue necesario realizar análisis cuantitativos de expresión.

La expresión de AGP17 promueve la remodelación de la membrana y se ha reportado que se expresa durante el proceso de desarrollo y reproducción vegetal en especies como *Quercus subery* y *Capsicum annuum*, dado el papel que desempeñan en el desarrollo se esperaban variaciones en los niveles de expresión (Verdugo-Perales *et al.*, 2018; Pérez-Pérez *et al.*, 2019).

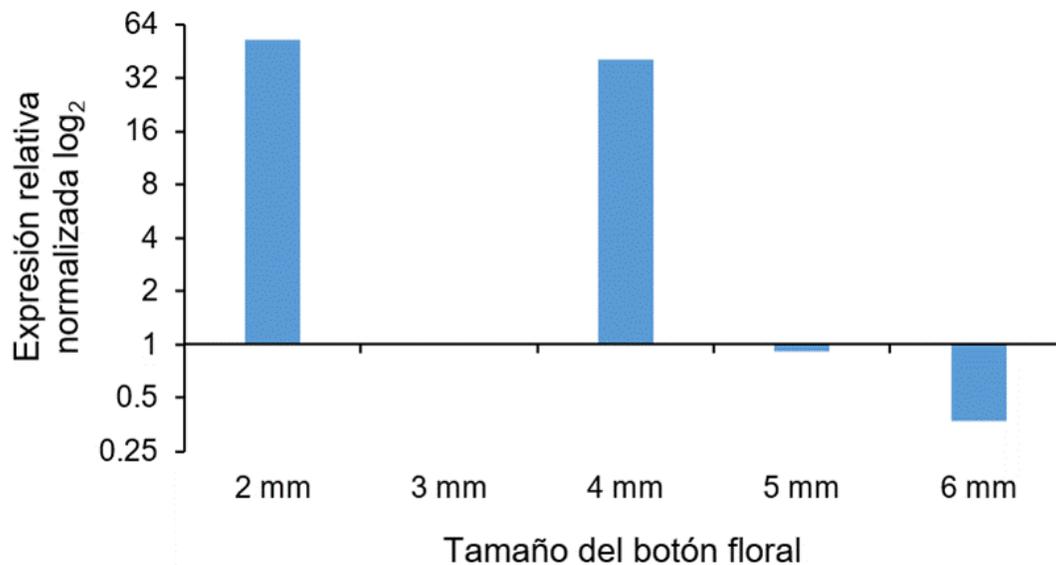
La actividad específica de AGP19, reportada se asocia con el desarrollo de los haces vasculares, particularmente al diferenciar elementos de xilema. Los transcritos de AGP19 son más abundantes en raíces y flores, moderadamente abundantes en tallos, plántulas y silicuas y son prácticamente ausentes en las hojas (Yang *et al.*, 2011). Para el gen AGP12 no ha sido publicado el patrón de expresión, pero existen datos de expresión global obtenidos por estrategias basadas en microarreglos, según datos de The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR), AGP12 se expresa en carpelos, hoja caulinar, estructura colectora de la hoja, cotiledón, flor, pedicelo, células guardia, hipocótilo, meristemo floral, ápice de la hoja, base de la lámina foliar, pétalo, peciolo, embrión, polen, raíz, semilla, sépalo, meristemo apical, estambres y tallos; la mayor expresión se detecta en el filamento del estambre (TAIR, 2020), sin mencionar la temporalidad de la expresión.

En trabajos recientes, se evidencia la expresión diferencial de las AGPs durante la maduración de frutos, como el tomate; se sugiere incluso que las AGPs pueden funcionar como marcadores de expresión para el proceso de maduración del fruto (Kutyrieva-Nowak *et al.*, 2023).

Cuantificación relativa de la expresión de los genes AGP12 y AGP17

El análisis de la expresión por qRT-PCR del gen AGP12, normalizado con gen de referencia, mostró un patrón intermitente, en la etapa previa al inicio de la gametogénesis femenina (2 mm) presenta un expresión 52 veces mayor que la etapa de 3 mm donde comienza la diferenciación celular y la meiosis, nuevamente en la etapa de 4 mm se observó un aumento en la expresión de 41 veces, en relación a la misma etapa, en la etapa de 5 mm la expresión se reduce prácticamente como en la etapa de 3 mm y finalmente en la etapa de 6 mm la expresión relativa disminuyó a la mitad de la etapa de referencia (3 mm) (Figura 3).

Figura 3. Cuantificación relativa de la expresión de AGP12. Botones florales de *Ricinus communis* L., durante el desarrollo previo a la fecundación

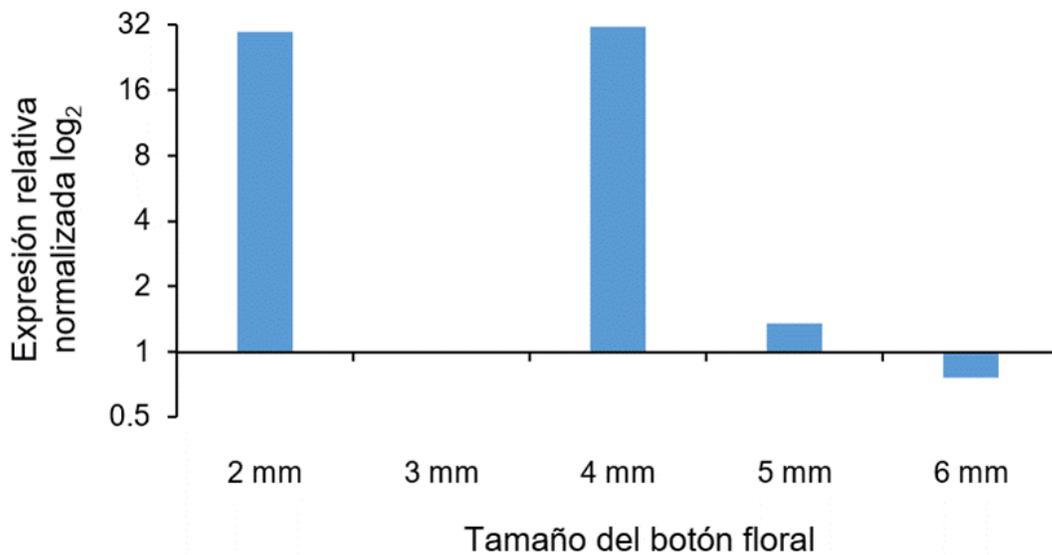


Fisiológicamente, en las etapas donde ocurren los incrementos de expresión, corresponden a etapas donde se llevan a cabo eventos de diferenciación, mientras que las etapas con menor expresión corresponden a eventos de división celular, meiosis en la etapa de 3 mm y divisiones mitóticas en la etapa de 4 mm, con un proceso semejante al observado en el desarrollo del megagametofito de *A. thaliana* (Acosta and Vielle, 2004).

Los resultados de la cuantificación de la expresión del gen AGP17 normalizados con el gen de actina, muestran que en la etapa de 2 mm la expresión es 29.8 veces mayor que en la etapa de referencia de 3 mm, en la etapa posterior al inicio del desarrollo del gametofito femenino (4 mm) el gen de interés incrementó su expresión 31.2 veces más que la etapa de referencia, la etapa de 5 mm se observa un aumento en la expresión de 1.3 con respecto a la de referencia, al igual que la etapa anterior a los 6 mm de desarrollo con una expresión 0.8 veces mayor a la referencia, no se presentó variación numérica entre las etapas de 2 y 4 mm.

Este hallazgo permite relacionar AGP17 con el desarrollo del gametofito femenino, ya que los reportes previos solo han relacionado homólogos de este gen con procesos de señalización intercelular en procesos de defensa y en el establecimiento de relaciones simbióticas, aunque se menciona, por similitud en el patrón de glicosilación, en el proceso de atracción del tubo polínico para la doble fertilización del gametofito femenino (Mizukami *et al.*, 2016) (Figura 4).

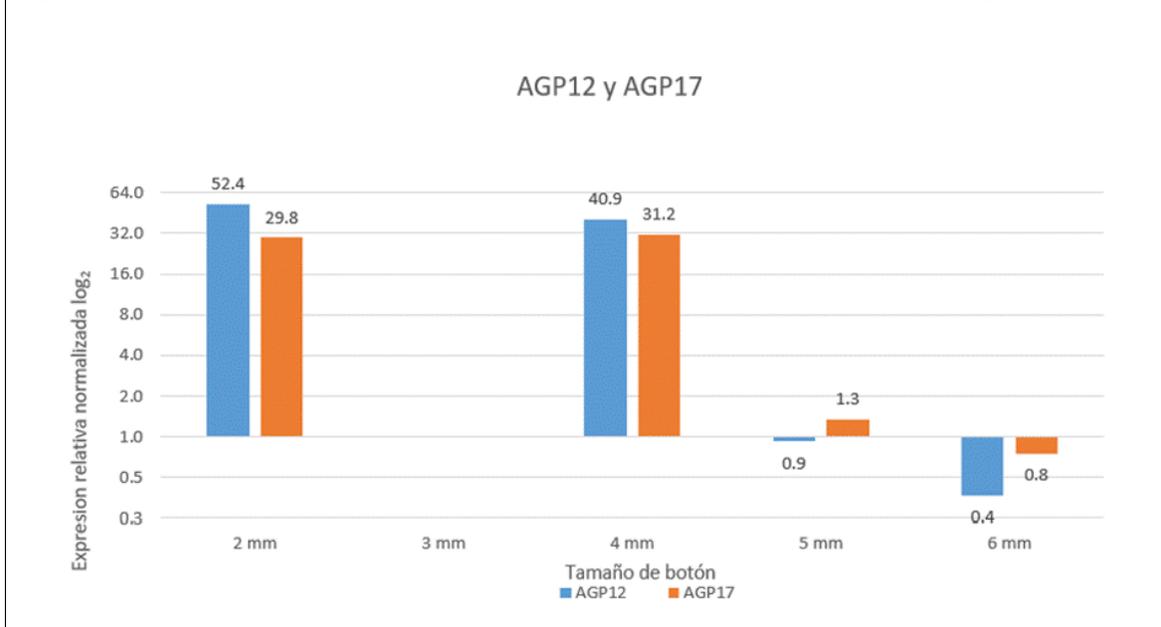
Figura 4. Cuantificación relativa de la expresión del gen AGP17. Durante el desarrollo del botón floral de *Ricinus communis* L., exhibe un patrón de expresión semejante a AGP12, con incremento de expresión en las etapas de diferenciación celular.



La comparación de la expresión relativa en las etapas estudiadas mostró comportamiento semejante para el gen AGP12 y AGP17, pero con variación en el nivel de inducción, esto sugiere que ambos genes pueden actuar en conjunto en las etapas mostradas; a partir de la etapa de 5 mm presentan una expresión reprimida (Figura 5).



Figura 5. Comparación de la expresión relativa del gen AGP12 y AGP17. Durante el desarrollo del gametofito.



Los genes AGP12 y AGP17 forman parte de una familia de genes de aproximadamente 50 miembros, con funciones relacionadas con la señalización, diferenciación y estructura de los tejidos vegetales, por lo que no es difícil de entender que puede haber funciones redundantes y a la vez, queda en manifiesto la importancia de los procesos en los que están involucrados, por lo que evolutivamente se han conservado dichos genes y se reiteran para asegurar que las funciones queden cubiertas.

Estructuralmente AGP17 tiene mayor semejanza con AGP18 y AGP19, pero el patrón de expresión que se reporta en el presente trabajo de investigación resultó ser semejante a AGP12. A través de análisis con anticuerpos anti-AGPs, se han localizado AGPs en la diada, tétrada y en megaspóra funcional, por lo que se infiere el papel en la señalización por AGPs para el desarrollo de esta célula (Pinto *et al.*, 2019).

Aún quedan muchas interrogantes sobre la función precisa de las AGPs en el desarrollo de los gametofitos, pero la caracterización puntual de los patrones de expresión es una pieza clave en la comprensión de los procesos de desarrollo. Además, se ha reportado el incremento de niveles de AGPs por acción de estrés abiótico, tal como los genes OsAGP1, OsAGP15y OsELA3 reportados en arroz (*Oryza sativa*) al someter las plantas a ciclos de desecación-rehidratación, cuya expresión además respondió a la presencia de ABA, esto puede relacionarse naturalmente con el proceso de deshidratación que experimentan las semillas ortodoxas al llegar a la madurez.

Sin descartar que la alta proporción de azúcares podría actuar en la protección de los tejidos y proteínas durante la desecación natural y la acumulación de ABA, que impide que la semilla germine antes de completar su proceso de maduración, de la misma manera, se reportó la disminución en los niveles de AGPs en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) sometidas a estrés por salinidad con relación a la inhibición de la expansión celular característica de esa condición y a carencia de oxígeno.

Por otro lado, se mencionan experimentos llevados a cabo con tomate (*Solanum lycopersicum*) en condiciones de hipoxia y anoxia, que provoca la disminución de la expresión de genes específicos de AGPs, (SIAGP1, SIAGP2 y SIAGP4); además, disminuyó la expresión de los genes de AGPs en respuesta a otros tipos de estrés, como el producido por calor y metales pesados (Mareri *et al.*, 2019).

Conclusiones

En *R. communis*, los genes NZZ/SPL y SYN1, homólogos a los correspondientes de *Arabidopsis*, mantienen patrones semejantes a la planta modelo y funcionan como marcadores de las primeras etapas de desarrollo del gametofito femenino. Los genes AGP12 y AGP17 mostraron expresión en el gametofito femenino durante todo su desarrollo con un decremento en expresión en la etapa correspondiente a la diferenciación e inicio de la división de la célula madre de la megaspora, para posteriormente incrementar la expresión y disminuye nuevamente para proceder a la maduración del gametofito femenino.

Agradecimientos

Al Tecnológico Nacional de México, por el apoyo otorgado para la realización del proyecto, clave 6565.18-P. Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por la beca de maestría otorgada al primer autor Luis Emmanuel Mendoza-Estrada.

Bibliografía

- 1 Acosta-García, G. and Vielle-Calzada, J. P. 2004. A classical arabinogalactan protein is essential for the initiation of female gametogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 16(10):2614-2628. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.024588>.
- 2 Cheng, C. Y.; Mathews, D. E.; Eric-Schaller, G. and Kieber, J. J. 2013. Cytokinin-dependent specification of the functional megaspore in the *Arabidopsis* female gametophyte. *The Plant Journal*. 73(6):929-940. <https://doi.org/10.1111/tpj.12084>.
- 3 Demesa-Arévalo, E. and Vielle-Calzada, J. P. 2013. The classical arabinogalactan protein AGP18 mediates megaspore selection in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 25(4):1274-1287.
- 4 Erbasol, I.; Palovaara, J. and Groß-Hardt, R. 2019. Development and function of the flowering plant female gametophyte. Ed. *Current Topics in Developmental Biology*. 131(1):401-434. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.11.016>.
- 5 FAOSTAT. 2020. Producción nacional de semilla de higuera en México 2018. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- 6 Gasser, C. S. and Skinner, D. J. 2019. Development and evolution of the unique ovules of flowering plants. *Current topics in developmental biology*. 131(1):373-399. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.10.007>.
- 7 Hernández-Lagana, E.; Rodríguez-Leal, D.; Lúa, J. and Vielle-Calzada, J. P. 2016. A multigenic network of ARGONAUTE4 clade members controls early megaspore formation in *Arabidopsis*. *Genetics*. 204(3):1045-1056. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.188151>.
- 8 Kutryeva-Nowak, N.; Leszczuk, A.; Zajac, A.; Kalaitzis, P. and Zdunek, A. 2023. Arabinogalactan protein is a molecular and cytological marker of particular stages of the tomato fruit ripening process. *Scientia Horticulturae*. 3(10):1-10. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111718>.
- 9 Leal, J. F. V.; Cuellar-Núñez, L.; Vivanco-Vargas, M.; Solís-Lozano, J. A.; Díaz-Calzada, M. E. and Méndez-Gallegos, S. D. J. 2022. Agribusiness potential of castor oil plant (*Ricinus communis* L.) in Mexico. *Agro Productividad*. 15(1) <https://doi.org/10.32854/agrop.v15i5.2267>.
- 10 Leszczuk, A. E.; Szczuka, E. and Zdunek, A. 2019. Arabinogalactan proteins: Distribution during the development of male and female gametophytes. *Plant Physiology and Biochemistry*. 135:9-18. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.11.023>.
- 11 Lopes, A. L.; Costa, M. L.; Sobral, R.; Costa, M. M.; Amorim, M. I. and Coimbra, S. 2016. Arabinogalactan proteins and pectin distribution during female gametogenesis in *Quercus suber* L. *Annals of Botany*. 117(6):949-961.

- 12 Ma Y.; Yan C.; Li H.; Wu W.; Liu Y.; Wang Y.; Chen Q. and Ma H. 2017. Bioinformatics prediction and evolution analysis of arabinogalactan proteins in the plant kingdom. *Front Plant Sci.* 8:66
- 13 Mareri, L. , M. Romi, and G. Cai 2019. Arabinogalactan proteins: actors or spectators during abiotic and biotic stress in plants plant biosystems. *PLANT BIOSYSTEMS* 153(1):173-185.
- 14 Mizukami, A. G.; Inatsugi, R.; Jiao J.; Kotake, T.; Kuwata, K.; Ootani, K.; Okuda, S.; Sankaranarayanan, S.; Sato, Y.; Maruyama, D.; Iwai, H.; Gare #nau, E.; Sato, C.; Kitajima, K.; Tsumuraya, Y.; Mori, H.; Yamaguchi, J.; Itami, K.; Sasaki, N. and Higashiyama T. 2016. The amor arabinogalactan sugar chain induces pollen tube competency to respond to ovular guidance. *Current Biology.* 26:1091-1097.
- 15 Olmedo-Monfil, V.; Durán-Figueroa, N.; Arteaga-Vázquez, M.; Demesa-Arévalo, E.; Autran, D.; Grimanelli, D. and Vielle-Calzada, J. P. 2010. Control of female gamete formation by a small RNA pathway in *Arabidopsis*. *Nature.* 464(7288):628-632.
- 16 Pereira, A. M.; Masiero, S.; Nobre, M. S.; Costa, M. L.; Solís, M. T.; Testillano, P. S. and Coimbra, S. 2014. Differential expression patterns of arabinogalactan proteins in *Arabidopsis thaliana* reproductive tissues. *Journal of Experimental Botany.* 65(18):5459-5471.
- 17 Pérez-Pérez, Y.; Carneros, E.; Berenguer, E.; Solís, M. T.; Bárány, I.; Pintos, B.; Gómez-Garay, A.; Risueño, M. C. and Testillano, P. S. 2019. Pectin de methylesterification and AGP increase promote cell wall remodeling and are required during somatic embryogenesis of *Quercus suber*. *Front. Plant Sci.* 9:1915
- 18 Pinto, S. C.; Mendes, M. A.; Coimbra, S. and Tucker, R. 2019. Revisiting the female germline and its expanding tool. *Trends in Plant Science.* 24(5):455-467. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.02.003>.
- 19 Raya-Pérez, J. C.; Ramírez-Pimentel, J. G.; Covarrubias-Prieto, J.; Chablé-Moreno, F. and Aguirre-Mancilla, C. L. 2016. Manejo agronómico de la higuera (*Ricinus communis* L.). *Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica.* 21 1-10 pp.
- 20 Rodkiewicz, B. 1970. Callose in cell walls during meiosis in angiosperms. *Planta.* 93(1):39-47.
- 21 Saadaoui, E.; Martín-Gómez, J. J.; Ghazel, N.; Yahia, K.; Tlili, B. N. and Cervantes, E. 2017. Genetic variation and seed yield in Tunisian castor bean (*Ricinus communis* L.). *Botanical Sciences.* 95(2):271-281.
- 22 Schmidt, A.; Wuest, S. E.; Vijverberg, K.; Baroux, C.; Kleen, D. and Grossniklaus, U. 2011. Transcriptome analysis of the *Arabidopsis* megaspore mother cell uncovers the importance of RNA helicases for plant germline development. *PLoS biology.* 9(9):e1001155. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001155>.
- 23 She, W.; Grimanelli, D.; Rutowics, K.; Whitehead, M.; Pucio, M.; Kotlinski, M. and Baroux, C. 2013. Chromatin reprogramming during the somatic to reproductive cell fate transition in plants. *Development.* 140(19):4008-4019.
- 24 Showalter, A. M. and Basu, D. 2016. Glycosylation of arabinogalactan proteins essential for development in *Arabidopsis*. *Commun Integr Biol.* 9(3):1-7.
- 25 Su, S. and Higashiyama, T. 2018. Arabinogalactan proteins and their sugar chains: functions in plant reproduction, research methods, and biosynthesis. *Plant reproduction.* 31(1):67-75.
- 26 TAIR. 2020. The *Arabidopsis* information resource. Búsqueda dirigida: locus AT3G13520. Base de datos bioinformáticos. Phoenix bioinformatics. (<https://arabidopsis.org>).
- 27 Thomson, B. and Wellmer, F. 2019. Molecular regulation of flower development. In *current topics in developmental biology.* Academic Press. 131:185-210.

- 28 Verdugo-Perales, M.; Vélez-Rocha, R.; León-Félix, J.; Osuna-Enciso, T.; Heredia, J. B.; Osuna-Castro, J. A. and Sañudo-Barajas, J. A. 2018. Gene expression of an arabinogalactan lysine-rich protein CaAGP18 during vegetative and reproductive development of bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *Biotech.* 8(1):5-15.
- 29 Wils, C. R. and Kaufmann, K. 2016. Gene regulatory networks controlling inflorescence and flower development in *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et biophysica acta. Gene Regulatory Mechanisms.* 18660(1):95-1015.
- 30 Yang, J.; Zhang, Y.; Liang, Y. and Showalter, A. M. 2011. Expression analyses of AtAGP17 and AtAGP19, two lysine rich arabinogalactan proteins, in *Arabidopsis*. *Plant Biology.* 13(3):431-438.
- 31 Yang, W. C. and Sundaresan, V. 2000. Genetics of gametophyte biogenesis in *Arabidopsis*. *Current opinion in plant biology.* 3(1):53-57.
- 32 Zhong, S. S. and Qu, L. J. 2019. Peptide/receptor like kinase mediated signaling involved in male female interactions. *Current Opinion in Plant Biology.* 51 7-14.



Expresión de AGP12 y AGP17 durante el desarrollo del Mega gametofito en *Ricinus communis*

Journal Information
Journal ID (publisher-id): remexca
Title: Revista mexicana de ciencias agrícolas
Abbreviated Title: Rev. Mex. Cienc. Agríc
ISSN (print): 2007-0934
Publisher: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Article/Issue Information
Date received: 01 January 2025
Date accepted: 01 March 2025
Publication date: 02 April 2025
Publication date: Feb-Mar 2025
Volume: 16r
Issue: 1
Electronic Location Identifier: e3407
DOI: 10.29312/remexca.v16i2.3407

Categories

Subject: Artículo

Palabras clave:

Palabras clave:

arabinogalactoproteínas
desarrollo reproductivo
diferenciación
megagametofito

Counts

Figures: 5

Tables: 0

Equations: 0

References: 32

Pages: 0