



**universidad
de león**



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**EL MUCÍLAGO DE ARABIDOPSIS COMO
MODELO PARA EL ESTUDIO DE COMPONENTES
DE LA PARED CELULAR**

**ARABIDOPSIS MUCILAGE AS A MODEL FOR
THE STUDY OF CELL WALL COMPONENTS**

Autora: Marina Frontela Sánchez

Tutora: Penélope García Angulo

Cotutor: Asier Largo Gosens

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Julio, 2023

ÍNDICE

1.	Introducción.....	1
2.	Materiales y métodos.....	2
2.1	Búsqueda de artículos para realizar la revisión bibliográfica.....	2
2.2	Tinción del mucílago de semillas.	2
3.	La pared celular de plantas	2
3.1	Estructura y composición.....	3
3.2	Síntesis y modificación de componentes matriciales de la pared celular.....	5
4.	El mucílago de semillas de Arabidopsis.....	6
4.1	El mucílago, modelo de estudio de pared celular de plantas	7
4.2	Biogénesis.....	7
4.4	Estructura.....	9
4.5	Biosíntesis de componentes del mucílago	11
4.5.1	Ramnogalacturonano - I.....	11
4.5.2	Homogalacturonano	13
4.5.3	Xilano	15
4.5.4	Galactoglucomanano	15
4.5.5	Celulosa	16
4.6	Mutantes que afectan a las propiedades del mucílago:.....	17
4.6.1	Extrusión del mucílago.....	17
4.6.2	Adherencia.....	19
5.	Función Biológica del mucílago.....	19
6.	Aplicaciones biotecnológicas de las pectinas.....	20
7.	Conclusión	22

Resumen

El estudio de las paredes celulares de plantas resulta difícil puesto que estas cuentan con multitud de componentes, entre los que destacamos la celulosa, hemicelulosas y pectinas, polisacáridos que interaccionan entre sí, formando una compleja y dinámica red. Por este motivo, en los últimos años se han buscado modelos simplificados de pared celular que faciliten su estudio, siendo el mucílago de *Arabidopsis* de los más empleados. El mucílago es una estructura gelatinosa compuesta principalmente por pectinas, que, en contacto con el agua, se libera de la cubierta de semillas maduras. Esta estructura se divide en una capa adherida a la superficie de la semilla, llamada mucílago adherido, y una parte soluble, denominada mucílago soluble. Está formado por una estructura única, especializada y accesible que presenta componentes similares a los de las paredes celulares primarias. Si a esto le sumamos el hecho de que la modificación de este gel no afecta a la viabilidad de la planta, obtenemos un modelo perfecto para la investigación sobre pared celular. Por todo ello, este trabajo es una revisión actualizada acerca de la estructura y composición del mucílago de semillas de *Arabidopsis*. Además, recoge las aplicaciones biotecnológicas que este posee. Todo ello remarca la importancia que presenta el mucílago para el hallazgo de nuevos genes implicados la síntesis y modificación de pectinas y otros componentes de la pared celular.

Palabras clave: *Arabidopsis*, mucílago, pared celular, pectinas, semilla.

The study of plant cell walls is difficult because they consist of a multitude of components, including cellulose, hemicelluloses and pectins, polysaccharides which interact among them in order to form a complex and dynamic network. For this reason, in recent years many efforts have been made to find new cell wall simplified models that ease their study, with *Arabidopsis* mucilage being one of the most widely used. Mucilage is a gel-like structure composed mainly of pectins, which, in contact with water, extrudes from cells located in the mature seed coat. This structure is divided into a layer attached to the seed surface, called adherent mucilage, and a soluble part, called soluble mucilage. It consists of a unique, specialised and accessible structure with components similar to those of primary cell walls. Adding the fact that the modification of this gel does not affect the viability of the plant, we obtain a perfect model for cell wall research. Therefore, this work is an updated review of the structure and composition of *Arabidopsis* seed mucilage. In addition, it also includes the biotechnological applications it has. All this underlines the importance of mucilage for the discovery of new genes involved in the synthesis and modification of pectins and other cell wall components.

Key words: *Arabidopsis*, cell wall, mucilage, pectins, seed.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Ara	Arabinosa	SBT1.7	Subtilisin-like ser protease1.7
BXL1	Beta-Xylosidase 1	SOS5	Salt-Overly Sensitive 5
CESA	Celulosa sintasa	STK	Seedstick
CSC	Complejo celulosa sintasa	UGRT	UPD-Rha/UPD-Gal transporter
CSLA	Cellulose Synthase-Like a 2	UUAT1	UDP-Uronic Acid Transporter 1
DAP	Día después de la polinización	Xyl	Xilosa
FLY1	Fly Saucer 1		
Gal	Galactosa		
GalA	Ácido galacturónico		
GALT5	Galacturonosyltransferase-Like 5		
GAUT11	Galacturonosyltransferase 11		
Glc	Glucosa		
GT	Glicosiltransferasa		
HG	Homogalacturonano		
IRX	Irregular xylem		
LUH	Leuning homolog		
MA	Mucílago adherido		
MAGT1	Mannan α -galactosyl transferase 1		
Man	Manosa		
MS	Mucílago soluble		
MSC	Célula secretora de mucílago		
MUCI	Mucilage Related		
MUM	Mucilage Modified		
NST azúcar	Transportador de nucleótido de		
PER36	Peroxidasa 36		
PME	Pectin metilesterasa		
PMEI	Inhibidor de pectin metilesterasa		
RG-I	Ramnogalacturonano-I		
RG-II	Ramnogalacturonano-II		
Rha	Ramnosa		
RRT1	RG-I Rhamnosyltransferase 1		

1. Introducción

Las paredes celulares de plantas son estructuras esenciales que rodean sus protoplastos y desempeñan un papel fundamental en la protección, en la comunicación intercelular y en la integridad estructural de estos organismos (Anderson and Kieber, 2020). Esta matriz extracelular altamente compleja presenta una gran diversidad de componentes cuya proporción y arquitectura varía en función de la especie de la que se trate. Esta estructura está compuesta principalmente por una red de celulosa, hemicelulosas, pectinas y proteínas, componentes que interaccionan entre ellos y confieren a la pared celular de plantas funcionalidad, pero haciendo que sea un compartimento muy complejo (Gigli-Bisceglia *et al.*, 2020). Es esta variedad de componentes y su organización la que hacen que su caracterización sea complicada, y los métodos tradicionales de estudio tienen sus limitaciones, porque tienden a romper todos los polisacáridos y las interacciones entre diferentes componentes, perdiéndose mucha información sobre la arquitectura de esta estructura (Parra-Rojas *et al.*, 2019). Además, la dinámica de la pared celular durante el crecimiento y desarrollo celular añade dificultad a su estudio, ya que implica cambios constantes en su estructura y composición (Gigli-Bisceglia *et al.*, 2020). En consecuencia, comprender en detalle la pared celular, sus componentes y cómo interaccionan se ha convertido en un objetivo importante en la investigación. Para ello, se han buscado modelos más simplificados que permitan su estudio donde uno de los modelos más empleados hasta la fecha ha sido el mucílago de semillas de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), una especie angiosperma perteneciente a la familia Brassicaceae que destaca por su empleo en la investigación en plantas (Arsovski *et al.*, 2010; Viudes *et al.*, 2021). El mucílago de esta especie es una estructura gelatinosa e incolora compuesta principalmente por pectinas (Haughn and Western, 2012). Se encuentra encapsulado en las células secretoras de mucílago (MSCs) localizadas en la cubierta de las semillas maduras de *Arabidopsis* (Šola *et al.*, 2019a). Al embeberse en agua, el mucílago se hincha extruyéndose al exterior de las semillas, liberando copiosas cantidades de este gel cuyos componentes son solubles en agua, mantienen su estructura nativa y las interacciones, lo que simplifica el estudio de la arquitectura de esta estructura (Šola *et al.*, 2019a).

Por ello, este trabajo bibliográfico presenta como **objetivo** realizar una revisión actualizada acerca del mucílago de *Arabidopsis*, su estructura, composición y principales genes que participan en la síntesis de sus principales componentes. Además, se revisarán las aplicaciones

biotecnológicas que contiene esta estructura especializada y en especial, su principal componente, las pectinas.

2. Materiales y métodos

2.1 Búsqueda de artículos para realizar la revisión bibliográfica

Para la búsqueda bibliográfica en este trabajo se han utilizado las siguientes fuentes de datos: PubMed, Google Scholar, Scopus y Web of Science. Todas estas bases de datos cuentan con gran variedad de artículos científicos que han podido utilizarse para el desarrollo del tema principal de esta revisión bibliográfica. La búsqueda se ha realizado filtrando información mediante el empleo de diferentes palabras clave o combinaciones de las mismas en los buscadores, donde, en un principio para un enfoque general, se usaron palabras clave como “mucílago”, “Arabidopsis” y “pared celular” para encontrar información acerca de la pared celular, su complejidad y el empleo del mucílago para simplificar su estudio. Posteriormente, se indagó más en profundidad acerca del mucílago de Arabidopsis y la síntesis de sus componentes.

2.2 Tinción del mucílago de semillas.

Para observar la estructura del mucílago en las fotografías que se incluyen en la memoria, se empleó una tinción con rojo de rutenio que tiñe las pectinas (Figura 3) y con calcofluor que permite visualizar la celulosa y otros glucanos como la calosa (Figura 5). Ambas tinciones se realizaron en semillas de Arabidopsis Col-0. (*wild-type*). Las semillas se observaron con el microscopio Nikon SMZ25 con la cámara en modo campo claro o en modo fluorescente utilizando un filtro de UV (excitación: 387 nm; emisión: 440 nm) para la tinción con rojo de rutenio y calcofluor, respectivamente.

3. La pared celular de plantas

Las paredes celulares son estructuras complejas y dinámicas sujetas a una remodelación en respuesta a estímulos externos, diferentes señales ambientales y al desarrollo de las plantas (Molina *et al.*, 2021). Esta matriz extracelular que rodea el protoplasto, brinda protección externa y determina las características mecánicas y morfológicas de la planta durante su desarrollo (Anderson and Kieber, 2020). Su papel es clave para controlar la respuesta a diferentes agentes externos y comprender procesos esenciales en el desarrollo, además, es una gran fuente de componentes que presentan multitud de aplicaciones industriales y comerciales (Soukoulis *et al.*, 2018; Anderson and Kieber, 2020). Por todo ello, comprender la interacción

de sus componentes y su constante dinamismo, sigue siendo el principal objetivo para los científicos.

3.1 Estructura y composición

La pared celular se deposita externamente a la membrana plasmática, su composición principal y estructura difiere dependiendo del tipo de células, la especie a la que pertenecen y la etapa de desarrollo en la que se encuentra la planta (Gigli-Bisceglia *et al.*, 2020). En términos generales, se distinguen dos tipos: la pared celular primaria, estructura que poseen las células en etapa de crecimiento activo, una vez finaliza la división celular, y la pared celular secundaria, que se sintetiza únicamente en células especializadas como las de los vasos conductores, y se deposita una vez la célula ha perdido la capacidad de elongarse (Anderson and Kieber, 2020; Gigli-Bisceglia *et al.*, 2020). Entre dos células contiguas encontramos la lámina media, estructura encargada de unir las células adyacentes generando una arquitectura estable (Chebli *et al.*, 2021). La pared celular primaria de plantas dicotiledóneas como *Arabidopsis* (tipo I) está compuesta principalmente por pectinas como el ramnogalacturonano-I (RG-I, 11%), el ramnogalacturonano-II (RG-II 8%) y el homogalacturonano (HG 23%) pero también consta de un elevado porcentaje de hemicelulosas (24%) y celulosa (14%) (Gigli-Bisceglia *et al.*, 2020). En las paredes celulares primarias de especies monocotiledóneas (tipo II) predominan las hemicelulosas (20-45%) seguida de la celulosa (20-30%) y las pectinas (5-10%), pero todo ello varía en función de la especie de la que se trate (Gigli-Bisceglia *et al.*, 2020). Por otro lado, tenemos la pared celular secundaria que presenta como componentes principales la celulosa (40-80%) y la lignina (10-25%), pero también contiene, aunque en menor abundancia, hemicelulosas (10%) como xilanos y mananos (Meents *et al.*, 2018).

La celulosa es el polisacárido predominante en todos los tipos de paredes celulares. Está compuesta por múltiples cadenas de D-glucosa (Glc) unidas mediante enlaces β -(1 \rightarrow 4). Las celulosas sintetasas (CESAs) son proteínas localizadas en la membrana plasmática encargadas de formar las cadenas de β -glucano (Gigli-Bisceglia *et al.*, 2020). Para ello, emplean UPD-Glc que se encuentra en el citosol celular como precursor (Anderson and Kieber, 2020). Las cadenas de glucano se unen entre sí por enlaces de hidrógeno dando lugar a microfibrillas de celulosa que constan de una anchura de unos 3 nm y están formadas por 18-24 cadenas de Glc en paredes celulares primarias (Anderson and Kieber, 2020). El modelo más reciente propone que 18 proteínas CESA se agrupan formando un hexámero de trímeros que da lugar a un complejo funcional de celulosa sintasa (CSC) encargado de producir las microfibrillas de celulosa (Anderson and Kieber, 2020).

Las hemicelulosas forman un grupo amplio y heterogéneo de polisacáridos que se caracterizan por contener una cadena principal en la que las moléculas que la conforman se unen mediante enlaces glucosídicos β -(1→4) (Figura 1) (Anderson and Kieber, 2020; Gigli-Bisceglia *et al.*, 2020). El xiloglucano es una de las hemicelulosas más destacadas debido a su abundancia en la pared celular primaria de tipo I. Se constituye por una cadena principal formada por β -(1→4) glucanos en los que tres de cada cuatro se encuentran sustituidos por cadenas laterales de xilosa y otros monosacáridos como galactosa (Gal) y fucosa, (Anderson and Kieber, 2020; Cosgrove, 2022). Por otro lado, encontramos los xilanos formados por repeticiones de β -(1→4)-D-xilosa (Xyl) que constituyen la cadena principal (Hu *et al.*, 2016) y sus ramificaciones, también de cadenas de xilosa, varían dependiendo de la especie y del tejido. Finalmente, los mananos son hemicelulosas cuya abundancia es menor en la pared celular primaria de tipo I como el glucomanano constituido por unidades alternas de Glc y manosa (Man) (Yu *et al.*, 2018).

Las pectinas forman otro de los principales y más complejos componentes de la pared celular primaria de plantas. Son polisacáridos ácidos de gran importancia, que forman una red continua, intercalándose entre sí, y llevan a cabo un papel en el desarrollo, crecimiento y adaptación al entorno de las plantas (Gigli-Bisceglia *et al.*, 2020). Junto a las hemicelulosas se les considera polisacáridos matriciales (Anderson and Kieber, 2020). Entre los dominios estructurales más importantes que conforman las pectinas destacamos el HG, el RG-I y el RG-II. El HG es un homopolímero no ramificado formado por repeticiones de ácido galacturónico (GalA) con enlace β -(1→4) (Harholt *et al.*, 2010). Comúnmente esta molécula puede metilarse en el grupo carboxilo del C6 o puede ser acetilada en las posiciones O2 y O3 (Anderson and Kieber, 2020).

El RG-I consta de una cadena principal formada por repeticiones de un disacárido en el que se alterna GalA, con enlace α -(1→4), con ramnosa (Rha), con enlace α -(1→2) (Harholt *et al.*, 2010). La Rha del esqueleto principal puede estar sustituida por arabinanos, galactanos y arabinogalactanos de tipo I (Anderson and Kieber, 2020). Los galactanos forman cadenas no ramificadas de β -(1→4)-D-Gal, los arabinanos están formados por una cadena principal que consiste en α -(1→5)-L-Arabinosa (Ara) y puede presentar ramificaciones de cadenas de Ara y, por último, los arabinogalactanos de tipo I que forman cadenas β -(1→4)-d-Gal que pueden contener residuos de Ara terminales (Arsovski *et al.*, 2009).

El RG-II presenta una cadena principal formada por una cadena de GalA, la cual se encuentra sustituida por hasta 6 cadenas formadas por unos 13 monosacáridos diferentes unidos por 21 tipos de enlaces glucosídicos distintos (Figura 1) (Ndeh *et al.*, 2017).

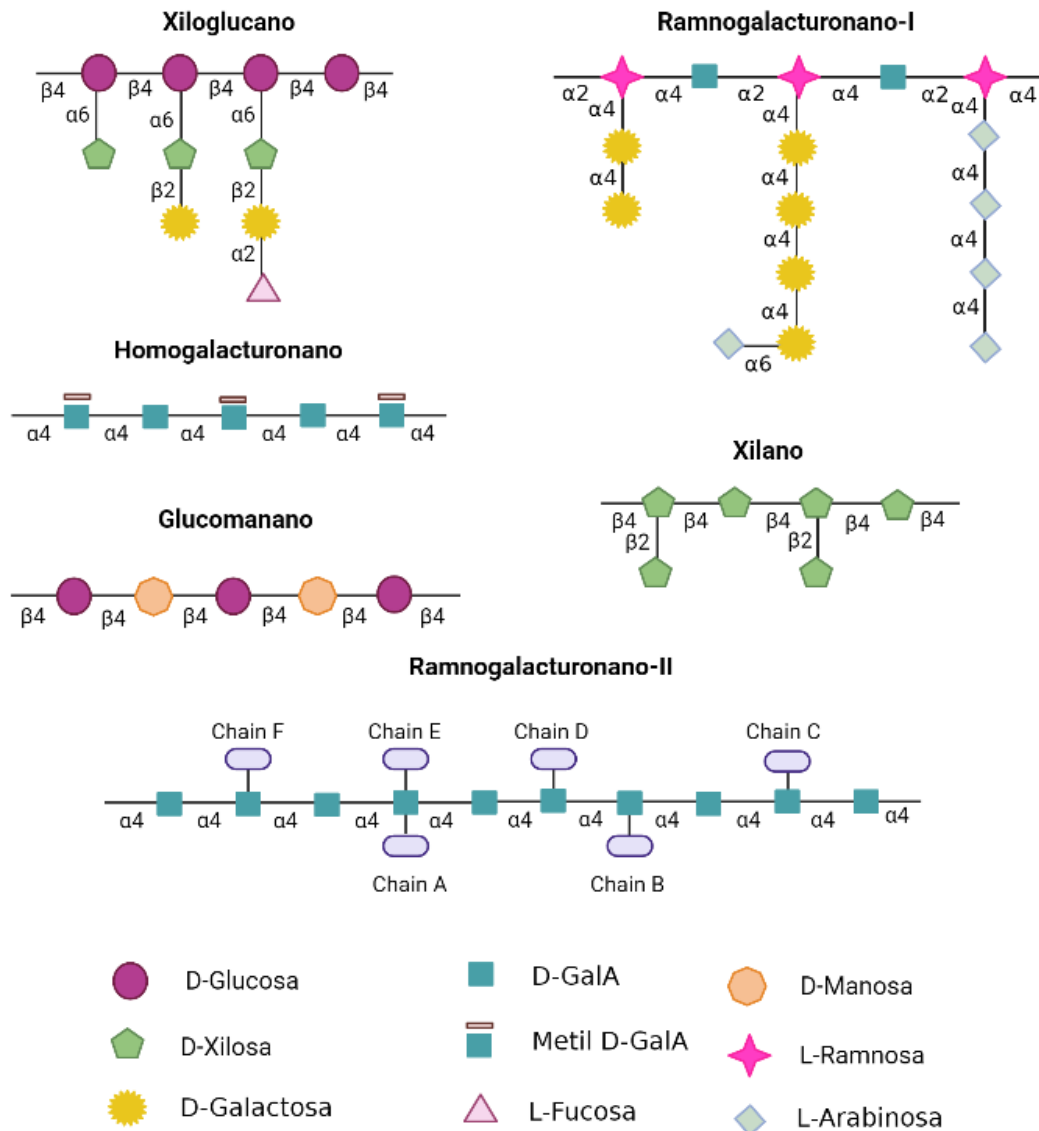


Figura 1. Esquema de la estructura de los principales polisacáridos matriciales de la pared celular. En el esquema se representan parte de las cadenas principales y laterales de los polisacáridos más comunes en paredes celulares primarias tipo I. La representación de las cadenas laterales no es exhaustiva puesto que puede variar en función de la especie o el tejido en el que se encuentren. El esquema de la estructura del RG-II está basada en Ndeh *et al.*, (2017). Imagen creada con Biorender.

3.2 Síntesis y modificación de componentes matriciales de la pared celular

La síntesis tanto de pectinas como hemicelulosas tiene lugar en el aparato de Golgi (Anderson and Kieber, 2020). Los precursores de estos polisacáridos son diferentes UPD/GDP-azúcares que se encuentran en el citosol celular, por lo que para acceder al interior del orgánulo son necesarios los transportadores de nucleótidos de azúcar (NSTs) que se encargan de transportar estos precursores al interior del Golgi (Temple *et al.*, 2016). Una vez en el orgánulo, las proteínas de membrana conocidas como glicosiltransferasas (GTs) se encargan de transferir a la cadena en crecimiento del polisacárido un residuo de azúcar y se cree que existe una GT para cada tipo de enlace (Parra-Rojas *et al.*, 2019). Estas proteínas también se presentan la función

de ensamblar las diferentes cadenas laterales que poseen estos polisacáridos no celulósicos, a esto se debe que se hayan identificado más de 550 GT diferentes (Temple *et al.*, 2016). Una vez terminada su síntesis los polisacáridos matriciales se secretan al apoplasto de la pared celular mediante la fusión de vesículas procedentes del aparato Golgi con la membrana plasmática (Anderson and Kieber, 2020).

Las pectinas son susceptibles a modificaciones que alteran su conformación y los enlaces entre las mismas, afectando las propiedades fisicoquímicas de la pared. Este es el caso del HG, en el cual la mayoría de los residuos ácidos que lo componen se esterifican con grupos metilo durante el proceso de síntesis que tiene lugar en el aparato de Golgi (Anderson and Kieber, 2020). La esterificación con un grupo metilo oculta las cargas negativas que contienen los grupos carboxilo evitando la formación de puentes de Ca^{+2} (Shi *et al.*, 2018). Una vez finalizada su síntesis, el HG se libera al apoplasto donde se puede desesterificar parcialmente por la acción de pectin metilesterasas (PMEs), dejando al descubierto las cargas negativas de estos grupos ácidos y favoreciendo la formación puentes de Ca^{+2} entre estas moléculas, formando una estructura denominada “caja de huevos” (Shi *et al.*, 2018). Esta estructura puede ser más o menos rígida afectando la porosidad y flexibilidad de la pared (Harholt *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2018). La actividad de las PMEs se encuentra regulada por varios factores, entre ellos por la acción de los inhibidores de las PMEs (PMEIs) (Temple *et al.*, 2016). Estas proteínas contienen un extremo N-terminal que interacciona con el extremo C-terminal de la PME inhibiéndola (Saez-Aguayo *et al.*, 2013). Las PMEIs presentan inhibición específica, es decir, cada isoforma es afín o presenta preferencia hacia diferentes tipos estererasas (Temple *et al.*, 2016).

4. El mucílago de semillas de Arabidopsis

El mucílago de semilla es una estructura gelatinosa compuesta principalmente por pectinas y hemicelulosas, aunque tanto su composición, como su estructura varía en función de la especie de la que se trate (Šola *et al.*, 2019a; Viudes *et al.*, 2021). Actualmente, se conocen más de 110 familias de angiospermas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas capaces de producir mucílago (Yang *et al.*, 2012; Viudes *et al.*, 2021). El mucílago sobre el que se han realizado un mayor número de estudios es el de Arabidopsis. En esta especie, el gel se encuentra encapsulado en las MSCs localizadas en la superficie de la semilla. Cuando una de estas semillas se hidrata, el mucílago absorbe agua, incrementando su tamaño y extruyéndose hacia el exterior de la semilla, en un fenómeno que se conoce como mixospermia (Western *et al.*, 2000; Šola *et al.*, 2019a). El mucílago de Arabidopsis está producido principalmente por pectinas las cuales

conforman el 90% (RG-I y HG), siendo el 10% restante compuestos minoritarios como celulosa y hemicelulosas (galactoglucomannano y xilano principalmente) que a pesar de su escasez juegan un papel relevante en el mantenimiento de las propiedades de este gel (Voiniciuc *et al.*, 2015b; Šola *et al.*, 2019a).

4.1 El mucílago, modelo de estudio de pared celular de plantas

Emplear el mucílago como un modelo para el estudio de pared celular y sus componentes, en especial las pectinas, presenta numerosas ventajas: las semillas maduras de *Arabidopsis*, al ser hidratadas, extruyen una elevada cantidad de gel con gran contenido de pectinas, siendo este muy accesible, lo que facilita su análisis bioquímico y citológico a nivel del laboratorio debido a su fácil extracción (Haughn and Western, 2012). Por otro lado, el periodo de desarrollo que presentan las MSC es de unos 13 días desde de la polinización de la planta, tiempo no muy elevado que hace que estas condiciones sean fácilmente reproducibles en el laboratorio, pudiendo obtener gran cantidad de semillas de *Arabidopsis* maduras capaces de secretar mucílago (Francoz *et al.*, 2015). Este gel además presenta beneficios a la hora de llevar a cabo estudios que requieren manipulación genética. Como se ha mencionado anteriormente la pared celular realiza funciones de gran relevancia, por lo que la modificación de sus componentes puede llevar a la inviabilidad de la planta, siendo en ocasiones letal, lo que limita el análisis de los genes implicados en su síntesis (Haughn and Western, 2012). Por ello, el empleo de mucílago presenta una gran ventaja, ya que se puede utilizar para estudios que impliquen la manipulación de genes de la pared celular sin afectar la viabilidad de la planta, esto puede ser muy útil para descubrir nuevos genes relacionados con la síntesis, secreción y modificación de la pared celular o para el estudio de interacciones y dinamismo de sus componentes (Arsovski *et al.*, 2010; Haughn and Western, 2012).

4.2 Biogénesis

Las células productoras de mucílago son inicialmente células hexagonales epidérmicas que a lo largo del desarrollo de la semilla y durante la embriogénesis se transforman en MSCs capaces de producir grandes cantidades de polisacáridos complejos que formarán la estructura gelatinosa que es el mucílago (Western *et al.*, 2000).

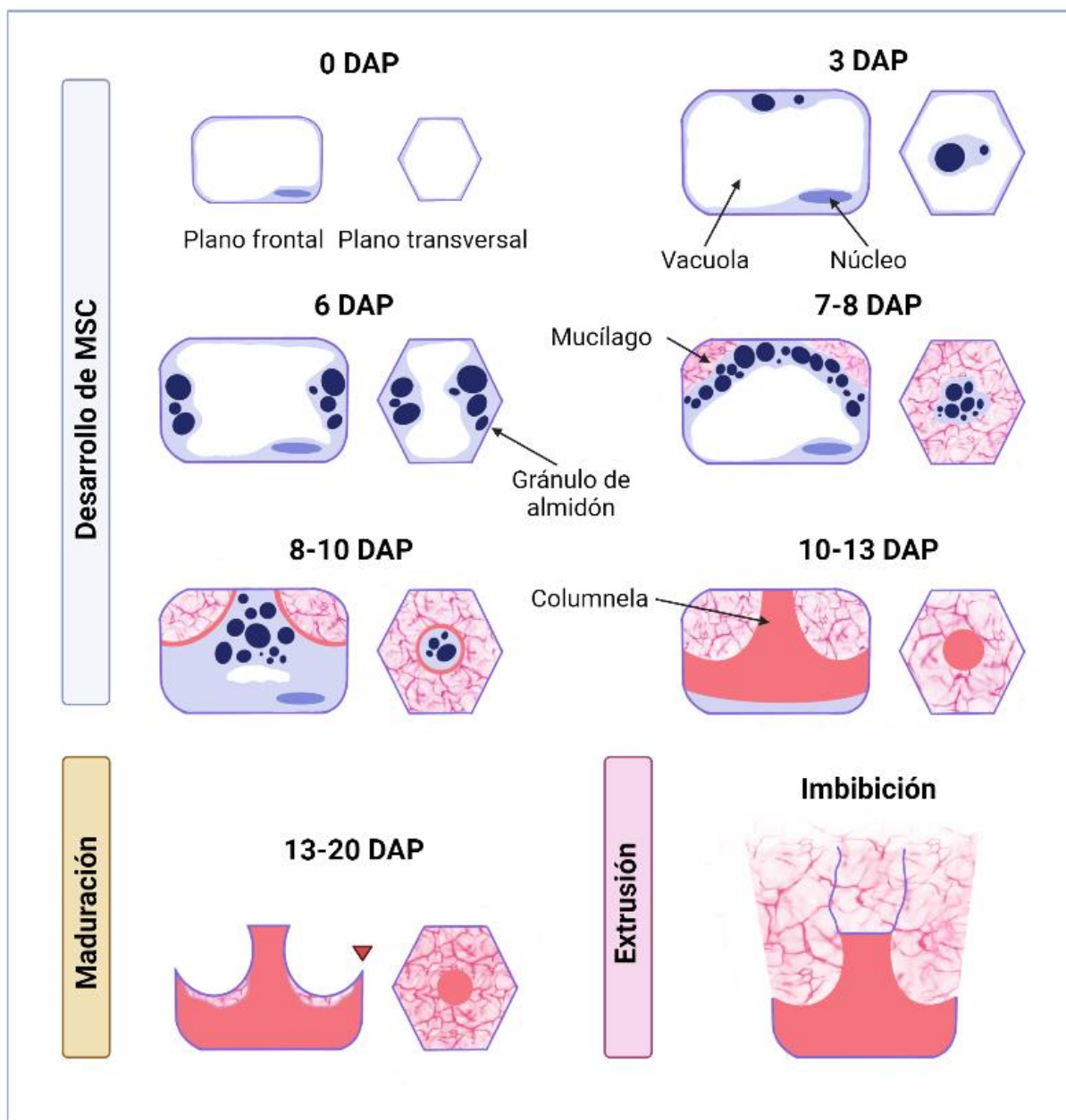


Figura 2. Esquema del desarrollo morfológico de las células secretoras de mucílago (MSCs). La ilustración muestra un plano frontal y otro transversal de cada uno de los estadios del proceso de biosíntesis del mucílago comenzando desde 0 días después de la polinización (DAPs) hasta la mixospermia del gel. El triángulo rojo (13-20 DAP) marca la pared celular primaria radial en la que ocurre la rotura para que pueda darse la extrusión del mucílago. Imagen creada con Procreate y Biorender.

Todo comienza con la polinización, donde el polen fecunda el óvulo maduro de la planta que dará lugar al comienzo del desarrollo de las semillas productoras de mucílago. Cuatro días después de la polinización (DAP), la MSC incrementa unas cuatro veces su tamaño original debido a un aumento en la vacuolización de la misma, dando lugar a la expansión de la pared celular primaria lo que desplaza el citoplasma hacia los márgenes de la célula (Figura 2) (Francoz *et al.*, 2015). De 3 al 7 DAPs comienza la producción de inclusiones que están constituidas por amiloplastos que contienen gránulos de almidón. Estos gránulos acaban

depositándose en la parte central de la MSC, siendo el almidón mayor fuente de carbono necesaria para la síntesis del mucílago (Western *et al.*, 2000). La deposición de los amiloplastos en una sola zona central de la célula forma una especie de columna junto con el citoplasma, que genera un bolsillo en el apoplasto de la célula rodeado por la membrana plasmática y la pared celular primaria distal (Figura 2). Al mismo tiempo, comienza la secreción del mucílago al bolsillo hasta los 9 o 10 DAPs (Western *et al.*, 2000). Se cree que esta matriz de polisacáridos se sintetiza en el Golgi donde es empaquetada en vesículas que se liberan al apoplasto de forma asimétrica, a esto se debe a que su secreción sea polar hacia el exterior de la semilla (Šola *et al.*, 2019a). A partir de 10 DAPs, comienza la formación de la columnela y el material citoplasmático se sustituye por pared celular secundaria mientras los gránulos de almidón reducen su tamaño progresivamente (Francoz *et al.*, 2015). Diferentes complejos CSCs situados en la membrana plasmática producen microfibrillas de celulosa que rodean la columnela y presentan un rol muy importante en el mantenimiento de la adhesión del mucílago en la superficie de la semilla (Šola *et al.*, 2019a). A los 13 DAP finaliza la embriogénesis, la columnela ha ensanchado y el citoplasma ha desaparecido casi por completo, quedando una pequeña porción en el fondo celular que desaparecerá durante la deshidratación que sufrirá la semilla (Francoz *et al.*, 2015). En este punto también se produce una leve modificación de la pared celular radial (Figura 2), en la que esta se debilita para favorecer la extrusión del mucílago al hidratarse la semilla (Western *et al.*, 2000). Una vez la MSC ha alcanzado la madurez la semilla lleva a cabo un proceso de desecación sumiendo a la semilla en un estado de latencia o dormancia. Debido a esto, el mucílago se deshidrata, pudiendo aguantar en este estado por días o años hasta ser embebido en agua (Francoz *et al.*, 2015).

4.4 Estructura

Antes de su hidratación, el mucílago de *Arabidopsis* se encuentra retenido en un bolsillo cuyo volumen aproximado es de $3500 \mu\text{m}^3$, 47 veces menos que el volumen que ocupa esta estructura tras su liberación ($165400 \mu\text{m}^3$) (Šola *et al.*, 2019a). Al humedecerse las pectinas al ser hidrofílicas, interaccionan con el agua, aumentando el volumen del gel y expandiéndose, esto provoca la rotura de la pared radial que rodea al bolsillo de mucílago (Figura 2) liberándose el mismo y formando una cápsula de unos $300 \mu\text{m}$ alrededor de la semilla en la que se pueden distinguir dos capas, el mucílago adherido (MA) y el mucílago soluble (MS) (Western *et al.*, 2000; Šola *et al.*, 2019a). La pared celular primaria escindida no se libera, sino que queda unida a la columnela por un extremo (Figura 3) (Western *et al.*, 2000).

Se conoce como MA a la capa gelatinosa que se encuentra más próxima a la superficie de la semilla. Esta capa está fuertemente adherida a la semilla, por lo que para su extracción es necesario llevar a cabo digestiones enzimáticas, emplear productos químicos agresivos o separaciones mecánicas, aunque aún así estos métodos no proporcionan su completa extracción y pueden llevarse por delante parte de la pared primaria o secundaria (Haughn and Western, 2012). El MA se compone principalmente de pectinas (80%), aunque a diferencia del soluble, el cual está formado por pectinas casi en su totalidad, encontramos una fracción considerable de celulosa y hemicelulosas (20%) (Šola *et al.*, 2019a). La pectina más abundante en ambas capas es RG-I que no presenta ramificaciones en su estructura, aunque el MA contiene una mayor cantidad de RG-I ramificado con residuos de Ara y Gal (Haughn and Western, 2012).

Desde la columnela hasta el final del MA se extienden unos rayos compactos de celulosa de unos 80 μm que se desenrollan de la columnela tras la extrusión, siendo esta estructura de gran relevancia para la adhesión y liberación del gel (Griffiths *et al.*, 2015). La red de pectinas se entrelaza con las microfibrillas de celulosa sirviendo como andamio para mantener su estructura (Macquet *et al.*, 2007). Macquet *et al.* (2007) proponen que este MA puede subdividirse en dos dominios. Una primera capa más cercana a la superficie celular que contiene celulosa y HG con un grado moderado de metilesterificación y otra capa más cercana al MS con menor contenido en celulosa y HG altamente metilesterificado además de residuos de Ara no identificados en la anterior. El HG no metilesterificado puede entrelazarse mediante enlaces iónicos de Ca^{2+} produciendo un mayor grado de adherencia y compactación en la capa del MA (Harholt *et al.*, 2010).

Por otro lado, el MS es la capa más alejada de la superficie de la semilla. Esta no forma una capa compacta, sino que es difusa y no posee una forma definida. Su grado de adherencia es muy bajo por lo que puede ser extraída mediante el uso de quelantes leves o por agitación en agua (Haughn and Western, 2012). Su contenido en pectinas es del 96 %, predominando el RG-I sin ramificar, mientras que la celulosa y hemicelulosas componen el 4 % en este caso (Šola *et al.*, 2019a). Como es de esperar, en esta capa el HG presenta un mayor grado de metilesterificación lo que explica su estructura dispersa y poco compacta, ya que las moléculas de HG al estar metilesterificadas no forman puentes de calcio con otras pectinas impidiendo las uniones y la alta cohesión de sus moléculas (Šola *et al.*, 2019a).

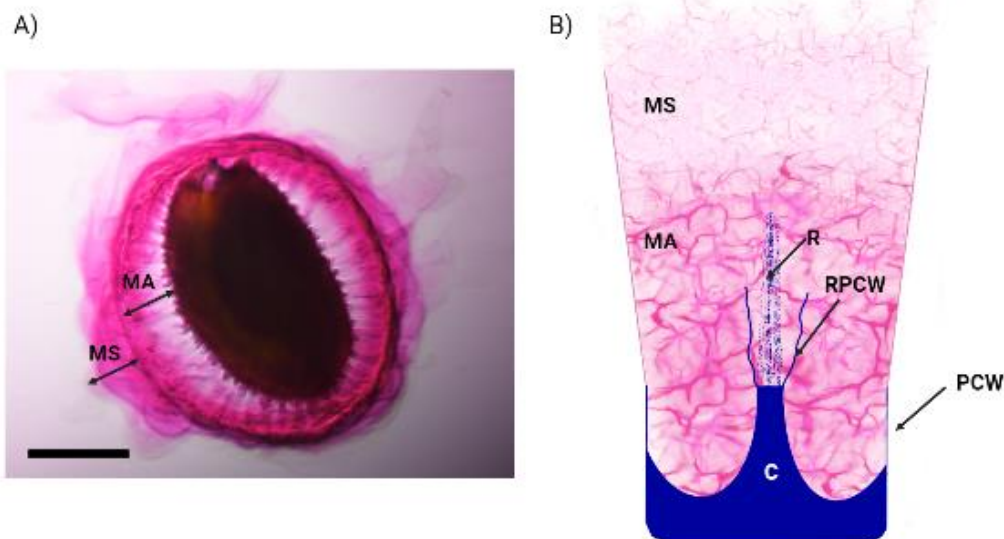


Figura 3. Estructura mucílago de *Arabidopsis* tras la extrusión. A, semilla de *Arabidopsis* madura teñida empleando rojo de rutenio. Se observa una capa compacta de mucílago adherido (MA) y una difusa de mucílago soluble (MS). Barra de escala: 150 μ m. Imagen propia modificada con Biorender. B, esquema de MSC tras la liberación del gel donde se representa la columnela (C), la pared celular primaria (PCW), la pared celular primaria radial (RPCW), el rayo de celulosa (R) y la capa de MA y MS. Imagen creada con Procreate y modificada con Biorender.

4.5 Biosíntesis de componentes del mucílago

El empleo del mucílago de *Arabidopsis* ha permitido conocer nuevos genes y factores de transcripción implicados en la síntesis de pectinas (RG-I y HG), de hemicelulosas (xilano y galactoglucomanano) y de las microfibrillas de celulosa presentes en el mucílago, todo ello supone un gran avance para comprender la interacción entre los componentes y el rol que desempeñan tanto en la pared celular como en el mucílago.

4.5.1 Ramnogalacturonano - I

Las pectinas componen aproximadamente el 90% del mucílago de semillas de *Arabidopsis*, siendo el RG-I la más abundante (Šola *et al.*, 2019a). Al igual que en la pared celular vegetal el RG-I hallado en el mucílago de *Arabidopsis* está compuesto por una cadena principal en la que se alterna GalA y Rha (Harholt *et al.*, 2010), pero en este caso el esqueleto principal que conforma la pectina está escasamente ramificado (Šola *et al.*, 2019a). Uno de los primeros pasos para producir esta pectina es sintetizar sus precursores en el citosol celular, donde en el caso del mucílago, tiene relevancia el papel de MUCILAGE-MODIFIED 4/RHAMNOSE BIOSYNTHESIS 2 (MUM4/RHM2), gen encargado de codificar la enzima que produce UPD-L-Rha a partir de UPD-D-Glc, siendo este uno de los primeros pasos para poder suministrar Rha a la cadena principal de este polisacárido (Usadel *et al.*, 2004; Western *et al.*, 2004; Oka *et*

al., 2007). El fenotipo de su mutación (*mum4*) se caracteriza por una reducción de la cantidad total de mucílago, además de un aplanamiento de la columnela (Western *et al.*, 2004). Por otro lado, no se han descrito todavía genes relacionados con la síntesis de UDP-GalA con un rol en la síntesis de mucílago. Una vez sintetizados los precursores, estos tienen que acceder al lumen del Golgi a través de los transportadores NST donde serán ensamblados para sintetizar las pectinas. En la síntesis del RG-I destacamos el papel de dos familias de transportadores: UPD-RHA/UPD-GAL TRANSPORTER 2, 4 y 6 (UGRT2, 4 y 6), encargados de suministrar UPD-Rha y UDP-URONIC ACID TRANSPORTER 1 (UUAT1) que suministra mayoritariamente UPD-Ácido Glucorónico, precursor de UPD-GalA, al interior del lumen del Golgi (Rautengarten *et al.*, 2014; Saez-Aguayo *et al.*, 2017, Saez-Aguayo *et al.*, 2021). Se ha observado como mutaciones en ambos transportadores muestran menor contenido de Rha y GalA en el MS, sugiriendo un papel coordinado de ambos en la síntesis de RG-I (Saez-Aguayo *et al.*, 2017).

RG-I RHAMNOSYLTRANSFERASE 1 (RRT1) es la transferasa encargada de añadir residuos de ramnosa al esqueleto principal de este polisacárido en el lumen del aparato de Golgi (Takenaka *et al.*, 2018). Aunque se encarga de alargar la cadena principal del RG-I, no es la responsable de comenzar su síntesis ya que se ha demostrado su preferencia para actuar en cadenas de RG-I con más de cinco monosacáridos de longitud, quedando por descubrir las enzimas implicadas en el inicio de su síntesis (Takenaka *et al.*, 2018). El fenotipo observado en *rrt1* presenta una disminución del contenido total del mucílago en un 42% y un aumento en la masa total de polisacáridos extraídos en comparación con el fenotipo control, pero todavía no se ha encontrado razón que justifique este segundo hecho (Takenaka *et al.*, 2018).

GALACTURONOSYLTRANSFERASE-LIKE5 (GATL5)
GALACTURONOSYLTRANSFERASE11 (GAUT11) y MUCILAGE-RELATED70 (MUCI70) son tres enzimas de las cuales sabe que poseen un rol en la biosíntesis de dominios de pectinas, incluido el RG-I, debido a que mutaciones en los genes que las codifican reducen el halo de mucílago liberado además de los niveles de precursores como Rha y GalA en el mismo (Kong *et al.*, 2013; Voiniciuc *et al.*, 2018; Šola *et al.*, 2019a). Voiniciuc *et al.* (2018) proponen que la síntesis de RG-I y HG en el mucílago se produce de forma coordinada y/o la síntesis de un polímero es necesaria para la síntesis del otro. Por tanto, mutantes que afectan la síntesis de una de estas pectinas, también presentan cambios en la otra estructura (Voiniciuc *et al.*, 2018). Los autores proponen que tanto GAUT11 como MUCI70 son indispensables para la producción RG-I en las células secretoras de mucílago de *Arabidopsis* mientras que por otro

lado GALT5 tan solo jugaría un papel en la organización final o en el tamaño de las pectinas. Aun así, se ha demostrado que GAUT11 puede sintetizar cadenas de HG *in vitro*, por lo que se ha propuesto que este gen participe en la síntesis de este polisacárido y este proceso es esencial para una correcta síntesis del RG-I en el mucílago (Voiniciuc *et al.*, 2018). Se ha determinado que GATL5 no tiene actividad *in vitro* a la hora de sintetizar HG (Kong *et al.*, 2013), por tanto, se ha propuesto que esta proteína, junto con MUCI70 podrían sintetizar la cadena principal de RG-I en el mucílago, aunque faltaría determinar su actividad exacta para poder comprobarlo (Voiniciuc *et al.*, 2018).

Un aspecto destacable es que del RG-I del mucílago de *Arabidopsis* no se encuentra ramificado o en su defecto lo está escasamente (Šola *et al.*, 2019a), presentando esta característica un importante papel en su estructura, hidratación, extrusión y adhesión. Se ha observado la presencia limitada de residuos de Gal y Ara en las cadenas laterales del RG-I presente en el mucílago, pero poco se sabe acerca de su síntesis (Arsovski *et al.*, 2009; Šola *et al.*, 2019a). Aun así, esta síntesis de las cadenas laterales tiene que tener lugar durante la síntesis y deposición del RG-I en el mucílago, porque se han descrito enzimas encargadas de la remodelación de las cadenas laterales de esta pectina con un rol en mucílago como MUCILAGE-MODIFIED 2 (MUM2) y BETA-XYLOSIDASE 1 (BXL1) (Arsovski *et al.*, 2009). MUM2 codifica una glicosilhidrolasa denominada β -galactosidasa encargada de modificar la cadena lateral del RG-I, removiendo galactanos durante el desarrollo de las MSCs (Dean *et al.*, 2007). De manera similar actúa BXL1, enzima bifuncional que actúa como β -D-xilosidasa/ α -L-arabinofuranosidasa y retira α -(1 \rightarrow 5)-L-Ara de las cadenas laterales de arabinano de RG-I (Arsovski *et al.*, 2009). Estas remodelaciones favorecen la correcta hidratación del mucílago y su posterior liberación (Arsovski *et al.*, 2009). Se ha observado como mutantes *bxl1* al ser hidratados presentan un abombamiento en su pared celular primaria en vez de una rotura inmediata, corroborando lo expuesto anteriormente (Arsovski *et al.*, 2009). Por otro lado, los mutantes *mum2* presentan un nivel elevado de residuos de Ara y Gal lo que sugiere la necesidad de la actividad coordinada de MUM2 y BXL1 para la remodelación de las cadenas laterales del RG-I (Dean *et al.*, 2007; Arsovski *et al.*, 2009).

4.5.2 Homogalacturonano

El segundo dominio de pectina más abundante en el mucílago de *Arabidopsis* es el HG, homopolímero formado por repeticiones de GalA que carecen de ramificación (Harholt *et al.*, 2010). La síntesis de esta pectina en el mucílago, al igual que el RG-I, comienza en el aparato de Golgi (Shi *et al.*, 2018), donde GAUT11 añade GalA, desde UDP-GalA, al esqueleto de la

molécula, mientras que GALT5, aunque se ha propuesto que participe en la síntesis de RG-I, podría regular la longitud final del HG (Voiniciuc *et al.*, 2018). En el mismo aparato de Golgi, los grupos carboxilos del HG son metilesterificados, siendo esta modificación muy importante para las propiedades fisicoquímicas de la red de pectinas. Aun así, las metiltransferasas que realizan esta acción en el mucílago no han sido descritas todavía. Una vez sintetizado, el grado de metilesterificación del HG es controlado por las PME y PMEIs apoplásticas, lo cual puede generar la formación de “cajas de huevos” entre moléculas de HG, que afectan a propiedades fisiológicas del gel como la elasticidad, la porosidad y la adherencia a la semilla (Shi *et al.*, 2018). La única PME descrita en mucílago de *Arabidopsis* hasta la fecha es PME58, cuyos mutantes muestran un aumento en grado de metilesterificación del MS (Turbant *et al.*, 2016). Por otro lado, se han descrito dos proteínas encargadas de inhibir la actividad de las PMEs, se trata de PME14, PME16 (Saez-Aguayo *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2018). Ambos mutantes *pme16* y *pme14* muestran un descenso del grado final de metilesterificación del HG debido a un aumento en la actividad PME (Saez-Aguayo *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2018). Otra proteína encargada de controlar el grado de metilesterificación es la SUBTILISIN-LIKE SER PROTEASE1.7 (SBT1.7), lo hace indirectamente mediante la degradación proteolítica de las PMEs (Rautengarten *et al.*, 2008; Saez-Aguayo *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2018). Por último, destacamos la acción de FLY SAUCER 1 (FLY1) una ubiquitina ligasa E3 encargada de reciclar las PMEs, marcándolas para su degradación (Voiniciuc *et al.*, 2013). Los mutantes *fly1* y *sbt1.7* presentan un menor grado de metilesterificación lo que conlleva a un incremento en la adhesión del mucílago empeorando la extrusión del mismo (Rautengarten *et al.*, 2008; Saez-Aguayo *et al.*, 2013; Turbant *et al.*, 2016).

Detrás de todo este proceso encontramos una red compleja reguladora encargada de la coordinación que determina el grado final de metilesterificación del HG. Actualmente se conocen dos factores de transcripción involucrados en esta tarea. SEEDSTICK (STK) activa la expresión del gen PME16 y reprime la expresión de SBT1.7 (Shi *et al.*, 2018) y LEUNING_HOMOLOG/MUCILAGE MODIFIED 1 (LUH/MUM1) que regula positivamente la acción de SBT1.7 y PME16 (Saez-Aguayo *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2018). Estos dos factores de transcripción pueden además reprimirse mutuamente consiguiendo así regula las modificaciones llevadas a cabo durante la maduración del HG (Shi *et al.*, 2018).

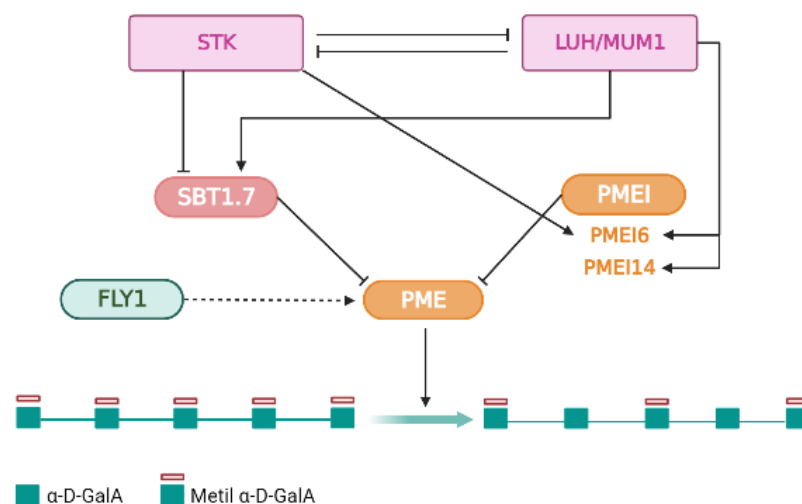


Figura 4. Esquema de la regulación de la metilesterificación del HG. El factor de transcripción STK inhibe la actividad de la proteasa SBT1.7 y regula positivamente la expresión de PMEI6. LUH/MUM1 regula positivamente tanto la actividad de la proteasa SBT1.7 como de los inhibidores de PMEs (PMEI6 y PMEI14). SBT1.7 degrada las PMEs y las PMEIs inhiben la actividad de las PMEs, regulando así indirectamente el grado de metilación del HG. Por otro lado, FLY1 juega un papel sobre las PMEs, marcándolas y reciclándolas para su degradación. Todo ello forma una red reguladora encargada de determinar el grado de metilesterificación del HG.

4.5.3 Xilano

El xilano es la hemicelulosa que predomina en el mucílago de *Arabidopsis*, formando un 3-5% del total (Hu *et al.*, 2016). Se encuentra constituida por repeticiones de Xyl que forman la cadena principal y en este caso se sustituyen por unidades individuales de β - (1→2)- D-Xyl en las posiciones 4-Xyl o 2,4-Xyl (Hu *et al.*, 2016; Šola *et al.*, 2019a). Entre sus funciones destacamos el papel que desarrolla permitiendo adherir las pectinas a la superficie de las semillas además de entrelazar las fibrillas de celulosa entre sí y con diferentes pectinas como el RG-I manteniendo su integridad (Voiniciuc *et al.*, 2015a).

La cadena principal de este homopolímero se sintetiza en el aparato de Golgi donde diferentes xilosiltransferasas conocidas como IRREGULAR XYLEM (IRX) se encargan de añadir las unidades del precursor al esqueleto principal (Hu *et al.*, 2016). Actualmente se conocen tres enzimas, IRX9, IRX10 e IRX14, que en el caso del mucílago llevan a cabo la tarea de elongar el esqueleto principal añadiendo Xyl mientras que MUCILAGE-RELATED 21 (MUCI21) se encarga de adicionar las cadenas laterales (Voiniciuc *et al.*, 2015a; Ralet *et al.*, 2016)

4.5.4 Galactoglucomanano

El galactoglucomanano altamente ramificado es otra de las hemicelulosas halladas en el mucílago de *Arabidopsis*, este constituye aproximadamente un 2,5% del gel (Voiniciuc *et al.*,

2015b). Se encuentra constituido por unidades alternas de Glc y Man unidas mediante un enlace β -(1 \rightarrow 4) (Yu *et al.*, 2018). CELLULOSE SYNTHASE-LIKE A 2 (CSLA2) es la enzima que utiliza GDP-Glc y GDP-Man para sintetizar el glucomanano que forma la cadena principal del galactoglucomanano producido por las MSCs (Voiniciuc *et al.*, 2015b). Por otro lado, casi todas las Man de esta molécula son sustituidas con residuos de Gal, esta función la llevan a cabo dos α -1,6-galactosiltransferasas conocidas como MANNAN α -GALACTOSYL TRANSFERASE1 (MAGT1) y MUCILAGE-RELATED 10 (MUCI10) (Voiniciuc *et al.*, 2015b; Yu *et al.*, 2018). Se cree que la función de esta hemicelulosa también es interaccionar con la celulosa que forma el rayo manteniendo su integridad (Yu *et al.*, 2018).

4.5.5 Celulosa

La celulosa del mucílago, al igual que en la pared celular, está formada por la unión de cadenas de β -glucanos enlazadas mediante enlaces de hidrógeno. Estas cadenas están generadas por las proteínas de membrana CESA que se agrupan formando un CSC (Anderson and Kieber, 2020). La diferencia que presenta este componente en el mucílago de Arabidopsis respecto a la pared celular primaria es su abundancia, puesto que en el gel es un componente minoritario que se encuentra casi exclusivamente en la capa de MA, siendo entorno al 12-19% de esta estructura (Macquet *et al.*, 2007). A pesar de su escasez juega un importante papel en la estructura, adhesión y extrusión del mismo.

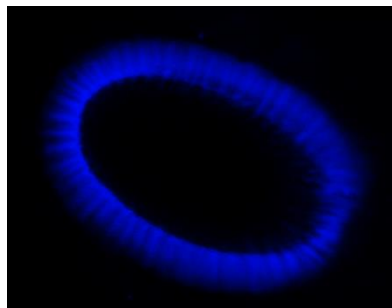


Figura 5. Rayos de celulosa teñidos con calcofluor tras la extrusión de mucílago en semilla de Arabidopsis Col 0.

Durante la biosíntesis de mucílago y rodeando la columna citoplasmática generada en el centro de la célula, se ha observado la expresión de CESA3, CESA5 y CESA10, esto no implica que sean las únicas proteínas transmembrana presentes en los CSCs encargados de producir el rayo de celulosa característico del MA (Griffiths *et al.*, 2015). CESA10 está presente en la síntesis de celulosa en el mucílago, pero no es imprescindible para la misma, mientras que CESA5 participa en la biosíntesis, formación del rayo y adherencia de la celulosa e interacciona con CESA3, imprescindible también en la formación del rayo de celulosa característico del MA

(Griffiths *et al.*, 2015; Griffiths and North, 2017). La columna citoplasmática se transforma en columnela mediante la formación de una pared secundaria en la que se va a depositar celulosa entre otros componentes gracias a la acción de CESA5, CESA2 y CESA9, hasta desplazar completamente el citoplasma (Griffiths and North, 2017).

La celulosa, a pesar de ser un componente minoritario en el mucílago, juega un papel relevante en el proceso de extrusión. Alrededor de la columna citoplasmática generada en las MSCs que se transformará en la columnela, encontramos una red de microtúbulos encargados del movimiento dinámico y unidireccional de los complejos CESA implicados en la síntesis de microfibrillas de celulosa (Figura 6). Este movimiento circular provoca la deposición de las microfibrillas de celulosa en forma de espiral alrededor de la columnela, en posición paralela a la pared celular primaria exterior (Griffiths *et al.*, 2015). La red de pectinas se encarga de mantener unidas y estables las fibras de celulosa (Griffiths *et al.*, 2015). En el momento de la extrusión, la celulosa se desenrolla y se libera junto con el mucílago, generando un rayo que se extiende de forma perpendicular desde la columnela hasta aproximadamente el final de la zona del MA (Griffiths *et al.*, 2015). Este rayo se encuentra adherido a la columnela por interacción de las fibrillas de celulosa con la misma mediante enlaces de hidrógeno (Šola *et al.*, 2019a).

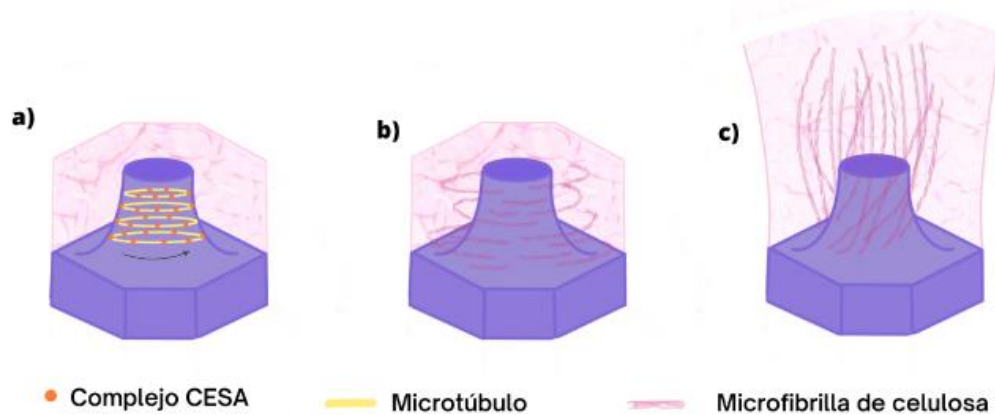


Figura 6. Modelo de orientación de la celulosa durante la síntesis y extrusión de mucílago. A, movimiento de los complejos CESA alrededor de la columnela, dirigidos por la acción de los microtúbulos. B, deposición de celulosa alrededor de la columna citoplasmática. C, disposición de las microfibrillas de celulosa tras la extrusión del mucílago al ser embebido en agua. Imagen creada con Procreate y Biorender

4.6 Mutantes que afectan a las propiedades del mucílago:

4.6.1 Extrusión del mucílago

Una vez conocidos los componentes que forman el mucílago, se puede comprender como interactúan entre ellos y su función a la hora de entrar en contacto con el agua para liberar el gel de las MSCs. Tras hidratarse, el mucílago se libera con gran fuerza y velocidad, formando

una cápsula alrededor de la semilla en pocos segundos. Las pectinas conforman la mayor parte de esta estructura y al ser polisacáridos altamente hidrofílicos cargados negativamente, en contacto con el agua generan una presión osmótica capaz de generar la extrusión y la fuerza necesaria para romper la pared primaria radial que rodea al bolsillo en el que se encuentra depositado el mucílago (Figura 5) (Deng *et al.*, 2012). Esta pared celular primaria que se ha roto, se mantiene parcialmente unida por un extremo a la columnela de la MSC, aunque el mecanismo por el que se da esta unión actualmente es incierto, pero puede deberse a enlaces iónicos que ocurren entre las pectinas de la pared celular primaria y la columnela (Arsovski *et al.*, 2009; Šola *et al.*, 2019a). Para que se dé la rotura, previamente, este extremo tangencial de la pared celular primaria que se encuentra adyacente a la siguiente célula debe ser modificada y debilitado para favorecer la rotura y extrusión. Esta labor la llevan a cabo varias enzimas entre ellas la peroxidasa 36 (PER36/PRX36), la cual se expresa de forma previa a la secreción del mucílago y se encarga de añadir grupos hidroxilo a diferentes polisacáridos como las pectinas de la pared celular primaria que rodea al bolsillo degradándolos (Kunieda *et al.*, 2013; Francoz *et al.*, 2015).

Para una correcta mixospermia del mucílago es muy importante la modificación y remodelación de sus componentes. Como se menciona anteriormente una de las características del mucílago es que el RG-I que lo comprende se encuentra escasamente ramificado, esto se debe a la acción de diferentes enzimas entre las que encontramos a BXL1 y MUM2 (Arsovski *et al.*, 2009). Esta modificación favorece a la correcta hidratación del gel haciendo que pueda expandirse en contacto con el agua (Arsovski *et al.*, 2009; Deng *et al.*, 2012). Algunas de las escasas cadenas de Gal del RG-I que no son eliminadas por MUM2, son oxidadas por RUBY una galactosidasa capaz de fortalecer la unión entre la lámina media de la pared celular primaria que rodea al bolsillo y las propia MSC, incrementando la fuerza que necesita la célula para liberar el gel (Šola *et al.*, 2019b). Por ello es imprescindible en este caso la acción de MUM2, puesto que si no se eliminasen estas Gal de las cadenas laterales RUBY fortalecería extremadamente las uniones y la extrusión sería inviable (Šola *et al.*, 2019b). La modificación del HG también supone un papel muy importante en los enlaces que se generan dentro de la red de pectinas, puesto que un bajo grado de metilación supone la formación de puentes de Ca^{+2} entre moléculas de HG fortaleciendo las uniones, perjudicando la extrusión (Voiniciuc *et al.*, 2013). De hecho, mutantes en *PMEI6* presentaron una reducción en la liberación del mucílago, promovido por un incremento en la actividad PME (Sáez-Aguayo *et al.*, 2013). La cubierta de la semilla tras la hidratación, presentaba unas MSCs abombadas, lo que denotaba una correcta hidratación de

las pectinas del mucílago, pero no se conseguía una correcta libración del mucílago (Saez-Aguayo *et al.*, 2013). Por todo ello una buena regulación del sistema de metilación y desmetilación de HG es necesaria para la correcta mixospermia del mucílago (Harholt *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2018).

4.6.2 Adherencia

Al hidratarse, en la estructura del mucílago extruido se distinguen dos capas descritas anteriormente. El MS se desprende fácilmente y puede extraerse sin complicaciones. Sin embargo, el MA forma la capa más próxima a la estructura de la semilla y está fuertemente unida a ella (Haughn and Western, 2012). Gracias a este modelo se ha conseguido averiguar qué componentes participan en la adherencia del mucílago de *Arabidopsis* y cómo interaccionan entre ellos para lograr este suceso. Hasta la fecha se conocen dos mecanismos independientes que participan en este proceso.

En el primer caso participa el RG-I, pectina que se une a las microfibrillas de celulosa a través de cadenas de xilanos mediante enlaces no covalentes (Ralet *et al.*, 2016). MUCI21 es una de las xilosiltransferasa encargada de añadir moléculas de xilosa a la cadena del polisacárido en formación. El xilano formado une el RG-I a la cadena β -glucano generada por la proteína CESA5 que forma parte de los CSCs encargados de producir celulosa en el mucílago de *Arabidopsis*. Mutaciones en los genes que codifican ambas proteínas muestran una severa reducción de MA (Griffiths *et al.*, 2016).

En el segundo mecanismo participa la proteína conocida como SALT- OVERLY SENSITIVE 5 (SOS5) y el receptor quinasa FEI2 (Griffiths and North, 2017). El proceso por el cual median la adhesión está por determinar, pero Griffiths *et al.* (2016) proponen ambos que llevan a cabo un proceso de organización de los rayos de celulosa. Por un lado, FEI2 organiza y localiza la maquinaria encargada de sintetizar la celulosa en la membrana plasmática, lo que permite a SOS5 encargarse de la orientación de las microfibrillas de celulosa uniéndolas a pectinas mediante la acción de galactoglucomanos (Griffiths *et al.*, 2016). Mutantes *sos5* y *fei2* muestran una ausencia de los rayos de celulosa, lo que disminuye la adherencia del gel, demostrando su implicación en el proceso de adhesión del mucílago (Griffiths *et al.*, 2016).

5. Función Biológica del mucílago

Para la mayoría de especies, la producción de mucílago supone un gran gasto energético y metabólico por lo que es lógico suponer que esta estructura gelatinosa concede ventajas

adaptativas a aquellas especies que la poseen (Tsai *et al.*, 2021). Uno de los roles que se le atribuye al mucílago es su participación en la dispersión de las semillas. Al ser liberado, el mucílago permanece adherido a la superficie de la semilla y, gracias a su naturaleza gelatinosa, aumenta la unión de la misma al sustrato (Yang *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2021). Además, la extrusión del mucílago varía tanto la estructura externa como el volumen y densidad de la semilla, lo que afecta a la flotabilidad logrando que en presencia de agua esta se hunda o flote (Saez-Aguayo *et al.*, 2014). En algunas especies la presencia de mucílago se asocia a mejorar la flotabilidad, mientras que en otras favorece el hundimiento, lo cual genera bastante controversia sobre si en estos casos la estructura presenta beneficios o si por el contrario es perjudicial (Saez-Aguayo *et al.*, 2014). Por último, su participación en la dispersión de semillas puede deberse a que al fin y al cabo el mucílago genera una especie de capa protectora sobre la semilla que puede lograr que esta atraviese intacta el tracto intestinal de animales que son los primeros en participar en la labor de dispersión (Tsai *et al.*, 2021).

Dependiendo de la especie, el mucílago puede estar relacionado con la germinación de las semillas, aunque debido su gran variedad es difícil atribuir una única función que se cumpla en todas ellas. A bajas temperaturas la solubilidad de oxígeno aumenta, pudiendo así el mucílago actuar como una barrera impidiendo su acceso a la semilla y evitando su germinación (Yang *et al.*, 2012). En condiciones de sequía, el mucilago puede actuar como un pequeño reservorio de agua, hidratándose para proporcionar agua en caso de necesidad, ayudando a sobrellevar una situación de estrés abiótico (Tsai *et al.*, 2021). Esta teoría se complementa con que, aparentemente, existe una relación entre las especies que producen mucílago y su hábitat, siendo más frecuente la presencia de este gel en plantas que crecen en lugares cálidos y áridos (Tsai *et al.*, 2021).

6. Aplicaciones biotecnológicas de las pectinas.

Es importante resaltar la relevancia que presentan las pectinas, componente mayoritario del mucílago de *Arabidopsis*, para entender el por qué resulta interesante conocer más acerca de su síntesis e interacción con el resto de componentes de la pared. Estos polisacáridos ácidos presentan el rol de establecer enlaces covalentes entre las microfibrillas de celulosa y otros polímeros de la pared celular de las plantas, ayudando así, junto con el resto de componentes a mantener el turgor de las células y participar en el crecimiento y estabilidad de las mismas (Chandel *et al.*, 2022). Gracias a sus propiedades gelificantes y estabilizadoras, las pectinas

presentan numerosas aplicaciones industriales, destacando en el sector farmacéutico, biomédico y en la industria alimentaria.

Se ha demostrado que las pectinas y sus derivados pueden ayudar a combatir la diabetes y la obesidad puesto que reducen los niveles tanto de colesterol como de Glc en sangre (Chandel *et al.*, 2022). Además, se han empleado pectinas en el tratamiento de cáncer, particularmente, del cáncer de colon (Freitas *et al.*, 2021). Las pectinas segmentadas en pequeños fragmentos tienen la propiedad de unirse e inhibir ciertas proteínas como lo es la galectina-3 implicada en la progresión y metástasis de varios tipos de cáncer incluido el de colon, siendo un aspecto atractivo para innovar en tratamientos quimioterapéuticos (Freitas *et al.*, 2021).

En la industria alimentaria, las pectinas son comúnmente empleadas para la fabricación de mermeladas, gelatinas, zumos y productos de consumo diario debido a su acción gelificante y emulsificante (Chandel *et al.*, 2022). Presentan también un papel antioxidante gracias a su capacidad para quelar iones metálicos, por lo que pueden añadirse a diferentes alimentos aumentando así esta propiedad en ellos (Chandel *et al.*, 2022). Algunas de las moléculas que conforman las pectinas como el GalA, la Rha o la Gal tienen propiedades prebióticas ya que estimulan la actividad y el crecimiento bacteriano en el tracto intestinal (Chandel *et al.*, 2022). Gracias a esto, la hidrólisis de pectinas da lugar a productos que pueden ser tratados y administrados como suplementos alimenticios. Dentro de la industria alimentaria sostenible, se ha empezado a utilizar como envase para alimentos, películas a base de pectinas que presentan bajo coste de obtención, biodegradabilidad y conservación de las características de los alimentos envasados, garantizando la calidad del producto (Freitas *et al.*, 2021).

Para poner en marcha todas estas aplicaciones es necesario un método efectivo para la extracción y estudio de pectinas. Generalmente a nivel industrial se emplea la extracción ácida y la precipitación alcohólica para su obtención, pero estos métodos son poco sostenibles, generan gran impacto ambiental y además pueden modificar la estructura nativa de estos polisacáridos ácidos (Freitas *et al.*, 2021; Chandel *et al.*, 2022). Por todo ello se buscan modelos más sostenibles que permitan tanto el estudio como la producción y extracción de pectinas y otros componentes sin afectar su estructura y el mucílago de las semillas de *Arabidopsis* cumple con este objetivo.

Conocer a fondo la biosíntesis de los elementos que conforman este gel y cómo interaccionan va a permitir ampliar el área de investigación acerca de la pared celular. A parte de servir como modelo para el estudio de pared celular el mucílago puede llegar a tener otras diversas

aplicaciones biomédicas y biotecnológicas. Al estar generado por un solo tipo de célula (MSC), su modificación, en la mayoría de casos no afecta a la viabilidad de la planta, lo que abre las puertas al sector de la ingeniería genética (Tsai *et al.*, 2021). Su fácil capacidad de extrusión al embeberse en agua supone una ventaja, puesto que mediante la alteración genética se puede modificar la semilla para que secrete en el mucílago elevadas cantidades de una proteína concreta deseada que podría ser usada como anticuerpos o para la elaboración de vacunas. Esto mejora considerablemente el proceso de producción, conservación y extracción de la proteína.

No solo en el sector biosanitario conocer a fondo las propiedades y composición del mucílago puede ser útil, sino que también pueden extrapolarse a nivel industrial puesto que todas las aplicaciones de las pectinas presentadas anteriormente podrían mejorarse o ampliarse. Un ejemplo específico en la industria lo plantean Tsai *et al.* (2012), proponen que la inhibición de la biosíntesis de mucílago en semillas empleadas para la extracción de aceites supondría una mejora económica ya que el exceso de este gel ralentiza el proceso y puede llegar a impedir la elaboración del producto.

7. Conclusión

El empleo de mucílago de *Arabidopsis* como modelo para el estudio de pared celular ha permitido gracias a su fácil manejo a nivel del laboratorio identificar de forma sencilla y rápida mutantes que afectan a las principales propiedades del gel, la adhesión y la extrusión. Esto ha permitido describir nuevos genes implicados a la síntesis, interacción y remodelación de sus componentes, especialmente de las pectinas. Conocer a fondo la estructura, composición y biogénesis de este gel especializado no solo supone un avance para la comprensión y estudio de la pared celular primaria, sino que con ello se puede sacar el máximo partido a sus aplicaciones industriales y biotecnológicas.

REFERENCIAS

- Anderson, C. T. and Kieber, J. J. (2020) "Dynamic Construction, Perception, and Remodeling of Plant Cell Walls", *Annual Review of Plant Biology*, 71, pp.39-69. doi:10.1146/annurev-arplant-081519.
- Arsovski, A. A., Haughn, G.W and L. Western, T. L. (2010) "Seed coat mucilage cells of *Arabidopsis thaliana* as a model for plant cell wall research", *Plant Signaling & Behavior*, 5(7), pp. 796–810. doi: 10.1104/pp.122.2.345
- Arsovski, A. A., Popma, T. M., Haughn, G. W., Carpita, N. C., McCann, M. C. and Western, T. L. (2009) "AtBXL1 encodes a bifunctional β -D-xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase required for pectic arabinan modification in *Arabidopsis* mucilage secretory cells", *Plant Physiology*, 150(3), pp. 1219–1234. doi:10.1104/pp.109.138388.
- Chandel, V., Biswas, D., Roy, S., Vaidya, D., Verma, A. and Gupta, A. (2022) "Current Advancements in Pectin: Extraction, Properties and Multifunctional Applications", *Foods*. doi:10.3390/foods11172683.
- Chebli, Y., Bidhendi, A. J., Kapoor, K. and Geitmann, A. (2021) "Cytoskeletal regulation of primary plant cell wall assembly", *Current Biology*, 31(10), pp. 681–R695. doi:10.1016/j.cub.2021.03.092.
- Cosgrove, D. J. (2022) "Building an extensible cell wall", *Plant Physiology*. s, 189(3), pp. 1246–1277. doi:10.1093/plphys/kiac184.
- Dean, G. H., Zheng, H., Tewari, J., Huang, J., Young, D. S., Yeen, T. H., Western, T. L., Carpita, N. C., McCann, M. C., Mansfield, S. D. and Haughn, G. W. (2007) "The *Arabidopsis* MUM2 gene encodes a β -galactosidase required for the production of seed coat mucilage with correct hydration properties", *Plant Cell*, 19(12), pp. 4007–4021. doi:10.1105/tpc.107.050609.
- Deng, W., Jeng, D. S., Toorop, P. E., Squire, G. R. and Iannetta, P. P. M. (2012) "A mathematical model of mucilage expansion in myxospermous seeds of *Capsella bursa-pastoris* (shepherd's purse)", *Annals of Botany*, 109(2), pp. 419–427. doi:10.1093/aob/mcr296.
- Francoz, E., Ranocha, P., Burlat, V. and Dunand, C. (2015) "*Arabidopsis* seed mucilage secretory cells: Regulation and dynamics", *Trends in Plant Science*, pp. 515–524. doi:10.1016/j.tplants.2015.04.008.
- Freitas, C. M. P., Coimbra, J. S. R., Souza, V. G. L. and Sousa, R. C. S. (2021) "Structure and applications of pectin in food, biomedical, and pharmaceutical industry: A review", *Coatings*. doi:10.3390/coatings11080922.
- Gigli-Bisceglia, N., Engelsdorf, T. and Hamann, T. (2020) "Plant cell wall integrity maintenance in model plants and crop species-relevant cell wall components and underlying guiding principles", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77, pp. 2049–2077. doi:10.1007/s00018-019-03388-8.
- Griffiths, J. S., Crepeau, M. J., Ralet, M. C., Seifert, G. J. and North, H. M. (2016) "Dissecting Seed Mucilage Adherence Mediated by FEI2 and SOS5", *Frontiers in Plant Science*. doi:10.3389/fpls.2016.01073.
- Griffiths, J. S. and North, H. M. (2017) "Sticking to cellulose: exploiting *Arabidopsis* seed coat mucilage to understand cellulose biosynthesis and cell wall polysaccharide interactions", *New Phytologist*, 214(3), pp. 959–966. doi:10.1111/nph.14468.
- Griffiths, J. S., Šola, K., Kushwaha, R., Lam, P., Tateno, M., Young, R., Voiniciuc, C., Dean, G., Mansfield, S. D., Debolt, S. and Haughn, G. W. (2015) "Unidirectional movement of cellulose synthase complexes in *Arabidopsis* seed coat epidermal cells deposit cellulose involved in mucilage extrusion, adherence, and ray formation", *Plant Physiology*. 168(2), pp. 502–520. doi:10.1104/pp.15.00478.
- Harholt, J., Suttangkakul, A. and Scheller, H. V. (2010) "Biosynthesis of pectin", *Plant Physiology*. 153(2), pp. 384–395. doi:10.1104/pp.110.156588.
- Haughn, G. W. and Western, T. L. (2012) "*Arabidopsis* seed coat mucilage is a specialized cell wall that can be used as a model for genetic analysis of plant cell wall structure and function", *Frontiers in Plant Science*. doi:10.3389/fpls.2012.00064.
- Hu, R., Li, J., Wang, X., Zhao, X., Yang, X., Tang, Q., He, G., Zhou, G. and Kong, Y. (2016) "Xylan synthesized by Irregular Xylem 14 (IRX14) maintains the structure of seed coat mucilage in *Arabidopsis*", *Journal of Experimental Botany*, 67(5), pp. 1243–1257. doi:10.1093/jxb/erv510.
- Kong, Y., Zhou, G., Abdeen, A. A., Schafhauser, J., Richardson, B., Atmodjo, M. A., Jung, J., Wicker, L., Mohnen, D., Western, T. and Hahn, M. G. (2013) "GALACTURONOSYLTRANSFERASE-LIKE5 is

- involved in the production of Arabidopsis seed coat mucilage", *Plant Physiology*, 163(3), pp. 1203–1217. doi:10.1104/pp.113.227041.
- Kunieda, T., Shimada, T., Kondo, M., Nishimura, M., Nishitani, K. and Hara-Nishimura, I. (2013) "Spatiotemporal secretion of PEROXIDASE36 is required for seed coat mucilage extrusion in Arabidopsis", *Plant Cell*, 25(4), pp. 1355–1367. doi:10.1105/tpc.113.110072.
 - Macquet, A., Ralet, M. C., Kronenberger, J., Marion-Poll, A. and North, H. M. (2007) "In situ, chemical and macromolecular study of the composition of Arabidopsis thaliana seed coat mucilage", *Plant and Cell Physiology*, 48(7), pp. 984–999. doi:10.1093/pcp/pcm068.
 - Meents, M. J., Watanabe, Y. and Samuels, A. L. (2018) "The cell biology of secondary cell wall biosynthesis", *Annals of Botany*, 121(6), pp. 1107–1125. doi:10.1093/aob/mcy005.
 - Molina, A., Miedes, E., Bacete, L., Rodríguez, T., Mélida, H., Denancé, N., Sánchez-Vallet, A., Rivière, M.-P., López, G., Freydisier, A., Barlet, X., Pattathil, S., Hahn, M. and Goffner, D. (2021) "Arabidopsis cell wall composition determines disease resistance specificity and fitness", *Plant Biology*. doi:10.1073/pnas.2010243118/-DCSupplemental.
 - Ndeh, D., Rogowski, A., Cartmell, A., Luis, A. S., Baslé, A., Gray, J., Venditto, I., Briggs, J., Zhang, X., Labourel, A., Terrapon, N., Buffet, F., Nepogodiev, S., Xiao, Y., Field, R. A., Zhu, Y., O'Neill, M. A., Urbanowicz, B. R., York, W. S., Davies, G. J., Abbott, D. W., Ralet, M. C., Martens, E. C., Henrissat, B. and Gilbert, H. J. (2017) "Complex pectin metabolism by gut bacteria reveals novel catalytic functions", *Nature*. 544(7648), pp. 65–70. doi:10.1038/nature21725.
 - Oka, T., Nemoto, T. and Jigami, Y. (2007) "Functional analysis of Arabidopsis thaliana RHM2/MUM4, a multidomain protein involved in UDP-D-glucose to UDP-L-rhamnose Conversion", *Journal of Biological Chemistry*, 282(8), pp. 5389–5403. doi:10.1074/jbc.M610196200.
 - Parra-Rojas, J. P., Largo-Gosens, A., Carrasco, T., Celiz-Balboa, J., Arenas-Morales, V., Sepúlveda-Orellana, P., Temple, H., Sanhueza, D., Reyes, F. C., Meneses, C., Saez-Aguayo, S. and Orellana, A. (2019) "New steps in mucilage biosynthesis revealed by analysis of the transcriptome of the UDP-rhamnose/UDP-galactose transporter 2 mutant", *Journal of Experimental Botany*, 70(19), pp. 5071–5088. doi:10.1093/jxb/erz262.
 - Ralet, M. C., Crépeau, M. J., Vigouroux, J., Tran, J., Berger, A., Sallé, C., Granier, F., Botran, L. and North, H. M. (2016) "Xylans provide the structural driving force for mucilage adhesion to the Arabidopsis seed coat", *Plant Physiology*, 171(1), pp. 165–178. doi:10.1104/pp.16.00211.
 - Rautengarten, C., Ebert, B., Moreno, I., Temple, H., Herter, T., Link, B., Doñas-Cofré, D., Moreno, A., Saéz-Aguayo, S., Blanco, F., Mortimer, J. C., Schultink, A., Reiter, W. D., Dupree, P., Pauly, M., Heazlewood, J. L., Scheller, H. V. and Orellana, A. (2014) "The Golgi localized bifunctional UDP-rhamnose/UDP-galactose transporter family of Arabidopsis", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(31), pp. 11563–11568. doi:10.1073/pnas.1406073111.
 - Rautengarten, C., Usadel, B., Neumetzler, L., Hartmann, J., Büssis, D. and Altmann, T. (2008) "A subtilisin-like serine protease essential for mucilage release from Arabidopsis seed coats", *Plant Journal*, 54(3), pp. 466–480. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03437.x.
 - Saez-Aguayo, S., Parra-Rojas, J. P., Sepúlveda-Orellana, P., Celiz-Balboa, J., Arenas-Morales, V., Sallé, C., Salinas-Grenet, H., Largo-Gosens, A., North, H. M., Ralet, M. C. and Orellana, A. (2021) "Transport of UDP-rhamnose by URG2, URG4, and URG6 modulates rhamnogalacturonan-I length", *Plant Physiology*, 185(3), pp. 914–933. doi:10.1093/PLPHYS/KIAA070.
 - Saez-Aguayo, S., Ralet, M. C., Berger, A., Botran, L., Ropartz, D., Marion-Poll, A. and North, H. M. (2013) "PECTIN METHYLESTERASE INHIBITOR6 promotes Arabidopsis mucilage release by limiting methylesterification of homogalacturonan in seed coat epidermal cells", *Plant Cell*, 25(1), pp. 308–323. doi:10.1105/tpc.112.106575.
 - Saez-Aguayo, S., Rautengarten, C., Temple, H., Sanhueza, D., Ejsmentewicz, T., Sandoval-Ibañez, O., Doñas, D., Parra-Rojas, J. P., Ebert, B., Lehner, A., Mollet, J. C., Dupree, P., Scheller, H. V., Heazlewood, J. L., Reyes, F. C. and Orellana, A. (2017) "UUAT1 is a golgi-localized UDP-uronic acid transporter that modulates the polysaccharide composition of arabidopsis seed mucilage", *Plant Cell*, 29(1), pp. 129–143. doi:10.1105/tpc.16.00465.

- Saez-Aguayo, S., Rondeau-Mouro, C., Macquet, A., Kronholm, I., Ralet, M. C., Berger, A., Sallé, C., Poulain, D., Granier, F., Botran, L., Loudet, O., de Meaux, J., Marion-Poll, A. and North, H. M. (2014) "Local Evolution of Seed Flotation in Arabidopsis", *PLoS Genetics*, 10(3). doi:10.1371/journal.pgen.1004221.
- Shi, D., Ren, A., Tang, X., Qi, G., Xu, Z., Chai, G., Hu, R., Zhou, G. and Kong, Y. (2018) "MYB52 negatively regulates pectin demethylesterification in seed coat mucilage", *Plant Physiology*, 176(4), pp. 2737–2749. doi:10.1104/pp.17.01771.
- Šola, K., Dean, G. H. and Haughn, G. W. (2019a) "Arabidopsis seed mucilage: A specialised extracellular matrix that demonstrates the structure-function versatility of cell wall polysaccharides", *Annual Plant Reviews Online*, 2(4), pp. 1085–1115. doi:10.1002/9781119312994.apr0691.
- Šola, K., Gilchrist, E. J., Ropartz, D., Wang, L., Feussner, I., Mansfield, S. D., Ralet, M. C. and Haughn, G. W. (2019b) "RUBY, a putative galactose oxidase, influences pectin properties and promotes cell-to-cell adhesion in the seed coat epidermis of arabidopsis", *Plant Cell*, 31(4), pp. 809–831. doi:10.1105/tpc.18.00954.
- Soukoulis, C., Gaiani, C. and Hoffmann, L. (2018) "Plant seed mucilage as emerging biopolymer in food industry applications", *Current Opinion in Food Science*, 22, pp. 28–42. doi:10.1016/j.cofs.2018.01.004.
- Takenaka, Y., Kato, K., Ogawa-Ohnishi, M., Tsuruhama, K., Kajiura, H., Yagyu, K., Takeda, A., Takeda, Y., Kunieda, T., Hara-Nishimura, I., Kuroha, T., Nishitani, K., Matsubayashi, Y. and Ishimizu, T. (2018) "Pectin RG-I rhamnosyltransferases represent a novel plant-specific glycosyltransferase family", *Nature Plants*, 4, pp. 669–676. doi:10.1038/s41477-018-0217-7.
- Temple, H., Saez-Aguayo, S., Reyes, F. C. and Orellana, A. (2016) "The inside and outside: Topological issues in plant cell wall biosynthesis and the roles of nucleotide sugar transporters", *Glycobiology*, 6(9), pp. 913–925. doi:10.1093/glycob/cww054.
- Tsai, A. Y. L., McGee, R., Dean, G. H., Haughn, G. W. and Sawa, S. (2021) "Seed Mucilage: Biological Functions and Potential Applications in Biotechnology", *Plant and Cell Physiology*, 62(12) pp. 1847–1857. doi:10.1093/pcp/pcab099.
- Turbant, A., Fournet, F., Lequart, M., Zabijak, L., Pageau, K., Bouton, S. and Van Wuytswinkel, O. (2016) "PME58 plays a role in pectin distribution during seed coat mucilage extrusion through homogalacturonan modification", *Journal of Experimental Botany*, 67(8), pp. 2177–2190. doi:10.1093/jxb/erw025.
- Usadel, B., Kuschinsky, A. M., Rosso, M. G., Eckermann, N. and Pauly, M. (2004) "RHM2 Is Involved in Mucilage Pectin Synthesis and Is Required for the Development of the Seed Coat in Arabidopsis", *Plant Physiology*, 134(1), pp. 286–295. doi:10.1104/pp.103.034314.
- Viudes, S., Dunand, C. and Burlat, V. (2021) "Myxospermy evolution in brassicaceae: A highly complex and diverse trait with arabidopsis as an uncommon model", *Cells*, 10(9). doi:10.3390/cells10092470.
- Voiniciuc, C., Dean, G. H., Griffiths, J. S., Kirchsteiger, K., Hwang, Y. T., Gillett, A., Dow, G., Western, T. L., Estelle, M. and Haughn, G. W. (2013) "Flying saucer1 is a transmembrane RING E3 ubiquitin ligase that regulates the degree of pectin methylesterification in Arabidopsis seed mucilage", *Plant Cell*, 25(3), pp. 944–959. doi:10.1105/tpc.112.107888.
- Voiniciuc, C., Engle, K. A., Günl, M., Dieluweit, S., Schmidt, M. H. W., Yang, J. Y., Moremen, K. W., Mohnen, D. and Usadel, B. (2018) "Identification of key enzymes for pectin synthesis in seed mucilage", *Plant Physiology*, 178(3), pp. 1045–1064. doi:10.1104/pp.18.00584.
- Voiniciuc, Cătălin, Günl, M., Schmidt, M. H. W. and Usadel, B. (2015a) "Highly branched xylan made by IRREGULAR XYLEM14 and MUCILAGE-RELATED21 links mucilage to arabidopsis seeds", *Plant Physiology*, 169(4), pp. 2481–2495. doi:10.1104/pp.15.01441.
- Voiniciuc, Cătălin, Schmidt, M. H. W., Berger, A., Yang, B., Ebert, B., Scheller, H. V., North, H. M., Usadel, B. and Günl, M. (2015b) "MUCILAGE-RELATED10 produces galactoglucomannan that maintains pectin and cellulose architecture in arabidopsis seed mucilage", *Plant Physiology*, 169(1), pp. 403–420. doi:10.1104/pp.15.00851.
- Western, T. L., Skinner, D. J. and Haughn, G. W. (2000) "Differentiation of Mucilage Secretory Cells of the Arabidopsis Seed Coat 1", *Plant Physiology*, 122(2), pp. 345–356. doi: 10.1104/pp.122.2.345
- Western, T. L., Young, D. S., Dean, G. H., Tan, W. L., Samuels, A. L. and Haughn, G. W. (2004) "Mucilage-Modified4 Encodes a Putative Pectin Biosynthetic Enzyme Developmentally Regulated by Apetala2, Transparent Testa Glabra1, and Glabra2 in the Arabidopsis Seed Coat", *Plant Physiology*, 134(1), pp. 296–306. doi:10.1104/pp.103.035519.

- Yang, X., Baskin, J. M., Baskin, C. C. and Huang, Z. (2012) "More than just a coating: Ecological importance, taxonomic occurrence and phylogenetic relationships of seed coat mucilage", *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 14(6), pp. 434–442. doi:10.1016/j.ppees.2012.09.002.
- Yu, L., Lyczakowski, J. J., Pereira, C. S., Kotake, T., Yu, X., Li, A., Mogelsvang, S., Skaf, M. S. and Dupree, P. (2018) "The patterned structure of galactoglucomannan suggests it may bind to cellulose in seed mucilage", *Plant Physiology*, 178(3), pp. 1011–1026. doi:10.1104/pp.18.00709.