
**ANÁLISIS DEL GEN XILOGLUCANO ENDOTRANSGLICOSILASA/HIDROLASA
(*PrXTH1*) INVOLUCRADO EN LA RESPUESTA GRAVITRÓPICA DE
PINUS radiata D. Don**

**CLAUDIO A. VALENZUELA CABEZAS
DOCTOR EN CIENCIAS MENCIÓN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL**

RESUMEN

La pérdida de verticalidad del tallo, tiene un fuerte impacto en el desarrollo de las plantas, esta pérdida de verticalidad le permite a las plantas competir no solo por los nutrientes, a través del crecimiento de las raíces o competir por la luz durante el crecimiento, sino que también posibilita que re-orienten el crecimiento de sus tallos después del viento o la lluvia. Como consecuencia a estos estímulos, se produce una señal fisiológica en el tallo promoviendo la elongación/división y cambios en los componentes estructurales de la pared celular de la zona que conforman la respuesta al estrés de inclinación, logrando así corregir la verticalidad del tallo. De esta manera, se producen cambios en la estructura de la pared celular que está compuesta por varias capas (primaria y secundaria). Estas capas están conformadas principalmente por polisacáridos. Entre estos polisacáridos las microfibrillas (MFs) de celulosa insolubles en agua, están asociadas a mezclas de polisacáridos solubles no celulósicos, siendo las hemicelulosas las que dan cuenta de alrededor de 25% del peso seco de la madera. Las hemicelulosas comprenden xiloglucanos, xilanos, mananos y β -glucanos que conforman la red celulosa-hemicelulosas uno de los componentes estructurales más importante de la pared. En el caso de coníferas las fibras de hemicelulosas están constituidas por xiloglucano que se modifican por acción enzimática de xiloglucano endotransglicosilasa (XTH) que producen el corte endolítico de una cadena de xiloglucano, permitiendo así separarse a las microfibrillas de celulosa, y la reconexión de una extremidad de dos moléculas de xiloglucanos. Una planta en respuesta a la inclinación produce cambios estructurales en la pared celular que le permite responder y re-orientar al vector de gravedad perdido. Estudios de esta respuesta gravitrópica indican la existencia de un control hormonal en el proceso, donde auxina ha sido estudiada e implicada en este fenómeno actuando como señal de transducción entre los sitios de la percepción de gravedad, amiloplastos del parénquima del tejido vascular y células de la columela de la raíz. Por otro lado, etileno también ha sido

sugerido con un rol en el gravitropismo actuando sobre la composición de la pared celular en gimnospermas por alterar la deposición de polisacáridos e inducción de la activación enzimática relacionada con la síntesis de componentes estructurales de la pared celular. Además, estudios moleculares de genes expresados en plántulas inclinadas de *P. radiata* han mostrado expresión diferencial de genes relacionados con remodelación de pared como expansinas, celulasas y xiloglucano endotransglicosilasa/hidrolasa (XTH). Este último gen *XTH* se caracteriza por codificar a proteínas pertenecientes a la familia GH16 presentando dos actividades enzimáticas la endo-transglicosilasa (XET) y la endohidrolasa (XEH) que actúan sobre las hemicelulosas del tipo xiloglucano. El objetivo principal de esta tesis es caracterizar la *XTH* presente en *P. radiata* D. Don y determinar la variación en la expresión de este durante la respuesta a inclinación y la modulación hormonal en los niveles de expresión. En *P. radiata* se identificó un gen *PrXTH1* que se encontraba activo por estrés de inclinación. Los análisis filogenético de la secuencia, y del modelo 3D de *PrXTH1* evidencian que tendría actividad enzimática XET la que fue corroborada por cuantificación de la actividad producida por la proteína recombinante de *PrXTH1* que presentó solo actividad XET y no XEH. El análisis del perfil transcripcional del gen *XTH1* de *P. radiata* mostró una alteración, producto de la inclinación, produciéndose un incremento en los niveles de transcritos en la parte inferior del tallo inclinado, observándose una expresión que empieza en el ápice a las primeras horas y posteriormente esta expresión se va traspasando a las zona media y al final del experimento se induce en la zona basal del tallo. Esto indica una señalización para *XTH* que empieza en el ápice y termina en la zona basal. Con el fin de determinar la modulación de la expresión y la implicancia hormonal en este proceso se determinó y analizó los elementos cis de la zona promotor de *PrXTH1*. Como resultado se determinó distintos elementos reguladores relacionados con auxina, etileno y factores de transcripción como MAD-box, esto sugiere un posible rol de etileno y auxina en la regulación transcripcional de *PrXTH1*. Para evaluar esta regulación, se hicieron tratamientos hormonales de etileno y auxina, los cuales produjeron una inducción en los niveles del transcrito de *PrXTH1*. Este resultado fue consistente con los obtenidos del análisis de la secuencia promotora de *PrXTH1*. La realización de análisis funcionales y los análisis del bioinformáticas del modelo 3D permitirá

ahondar en la caracterización de la función de PrXTH1 y aclarar su participación en el proceso de respuesta a inclinación en el tallo de *P. radiata*.

ABSTRACT

The loss of stem verticality has a strong impact on the plant's development, it allows not only compete for nutrients through root growth or compete for light during growth but also enables re-orient the growth of their stems after wind or rain. Due to these stimuli, a physiological signal in promoting stem differential elongation/division of cells and changes in the cell wall structural components in the area where is forming gravitropic effect response, thus achieving the verticality of the shaft to correct occurs. Thus, are producing several changes in cell wall structure composed of layers (primary and secondary). These layers are composed primarily of polysaccharides like cellulose microfibrils (MFs) (water insoluble), are associated with mixtures of soluble non-cellulosic polysaccharides, hemicelluloses being which account for about 25% of the dry weight of wood. Hemicelluloses include xyloglucans, xylans, mannans and β -glucans comprise the cellulose-hemicellulose one of the most important structural components of the wall network. In the case of softwood fibers, hemicelluloses are composed of xyloglucans which are modified by enzymatic action of xyloglucan endotransglycosylase (XTH) producing the endolithic cutting chain xyloglucan allowing separation of the cellulose microfibrils, and the reconnection of a limb Xyloglucans two molecules. A plant in response to the inclination produces structural changes in the cell wall that allows the plant to respond and reorient the stem. Is gravitropic response studies indicate the existence of a hormonal control in the process, which has been studied auxin and involved in this phenomenon acting as a signal transduction between the sites of the perceived severity, amyloplasts vascular parenchymal tissue and cells columella root. Moreover, ethylene has also been suggested to play a role in the Gravitropism acting on the composition of the cell wall in gymnosperms by altering the deposition of polysaccharides and induction of the enzyme activation related to the synthesis of structural components of the cell wall. In addition, molecular studies of genes expressed in pine seedlings inclined have shown differential expression of genes related to remodeling wall as expansins, cellulases and xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase (XTH). XTH latter gene characterized by encoding a protein belonging to the family GH16 enzyme activities presenting two endotransglycosylase (XET) and endo-hydrolase (XEH) that act on hemicelluloses type of xyloglucan. The main objective of this thesis is to characterize the XTH present

in *Pinus radiata* D. Don and determine the variation in expression of this during the response to tilt and hormonal modulation in expression levels. In *P. radiata* just one PrXTH1 gene that was active tilt stress was identified. The sequence analysis and phylogenetic PrXTH1 3D model would demonstrate that the XET enzyme was confirmed by quantification of the activity produced by the recombinant protein presented alone PrXTH1 not XEH. The analysis showed an impaired transcriptional profile, product of inclination, producing an increase in transcript levels in the bottom of the inclined stem, showing an expression begins at the apex and the first hour and this expression is to be subsequently transferring to the middle and end of the experiment zone is induced in the basal area of the stem. This indicates a signaling XTH beginning at the apex and ends at the basal area. In order to determine the expression modulation and hormonal implication in this process is determined and analyzed the cis promoter elements of PrXTH1. As a result, various regulatory elements associated with auxin, ethylene, and transcription factors such as Mad-box is determined, this suggesting a possible role of ethylene and auxin PrXTH1 transcriptional regulation. To assess this hormonal regulation of ethylene and auxin treatments were made. This testing showed a positive effect by induction in transcript levels for both ethylene and auxin so this result was consistent with that obtained from analysis of the promoter sequence PrXTH1. Conducting analysis and functional analysis of the bioinformatics 3D model will delve into the characterization of the function of PrXTH1 and clarify their involvement in the response process in stem inclination *P. radiata*.