
**ANÁLISIS DEL ROL FUNCIONAL DE DOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN
MADS-BOX INDUCIDOS EN RESPUESTA A INCLINACIÓN EN
Pinus radiata D. Don**

**NICOLÁS JAVIER CRUZ ROSERO
DOCTOR EN CIENCIAS MENCIÓN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL**

RESUMEN

La pérdida del crecimiento vertical producto de la inclinación de los tallos en coníferas por algún estrés abiótico genera la formación de madera de reacción. Esta respuesta se debe a tensiones físicas que sufre el árbol al tratar de reorientar su posición original. Esto provoca un cambio en el programa genético, donde la expresión y regulación de genes involucrados, así como los mecanismos moleculares que participan de este proceso, aun no están del todo claro.

En base a lo anterior, en la presente tesis doctoral se propuso analizar el rol funcional de dos factores de transcripción de *Pinus radiata* D. Don tipo MADS-box, expresados diferencialmente en respuesta a inclinación y posteriormente evaluados en *Arabidopsis thaliana*. Plántulas de pino fueron inclinadas en Angulo de 45º y mantenidas por 2,5 horas, identificándose estos dos factores de transcripción. Secuencias parciales de estos factores de transcripción fueron identificadas y aisladas previamente mediante la técnica de Hibridación Sustractiva Supresiva (SSH) en respuesta al estímulo de inclinación en la especie antes indicada. Estas secuencias aisladas desde tallo nos permiten sugerir que estos factores de transcripción tipo MADS-box que responden a inclinación en *P. radiata*, regularían la expresión de genes que codifican para enzimas de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides en *Arabidopsis*. Mediante RACE 5' y 3' se logro obtener el largo completo de dos genes que codifican para factores de transcripción tipo MADS-box, nombrados como *PrMADS10* y *PrMADS11*. *PrMADS10* corresponde a una secuencia de 943 pb, tiene un marco de lectura abierto (ORF) de 582 pb y su secuencia polipeptídica deducida de 193 aa, su número de accesoión GenBank es KM887510. Por su parte, *PrMADS11* corresponde a una secuencia de 871 pb, tiene un marco de lectura abierto (ORF) de 495 pb y su secuencia polipeptídica deducida de 165 aa, su número de accesoión GenBank es KM887511. Las dos secuencias obtenidas muestran un alto porcentaje de identidad con genes que codifican para factores de transcripción del tipo MADS-box presentes en otras especies de plantas. *PrMADS10* y *PrMADS11*

contienen dominios conservados típicos de los MADS-box, correspondientes a los motivos MADS y Kbox, indicando que estas estructuras están presentes en proteínas tipo MIKC. Los niveles de transcrito de *PrMADS10* y *PrMADS11* fueron analizados en tallo de pino inclinado a 45° y control (sin inclinar) a diferentes tiempos de la respuesta. Los análisis de qPCR para ambos genes mostraron una acumulación del transcrito de forma diferencial, siendo mayor en la parte inferior del tallo de pino a los 60 y 120 minutos, cuando es sometido a inclinación. Estos resultados sugieren que *PrMADS10* y *PrMADS11* responden a tiempos tempranos, y su expresión es diferencial en tiempo y en sección de tallo.

Las proteínas PrMADS10 y PrMADS11 de pino radiata fueron inducidas en *Saccharomyces cerevisiae*. Se logró producir y purificar proteína recombinante utilizando este sistema heterólogo, obteniendo proteínas con una masa de 22 kDa y 19 kDa. Sin embargo, no se pudo determinar si las dos proteínas tienen la capacidad de interactuar con elementos de respuestas presentes en la región promotora de los genes modulados. Para determinar la función de los factores de transcripción de pino se realizó análisis mediante microarreglos. Para ello, se generaron varias líneas transgénicas homocigotas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan *PrMADS10* y *PrMADS11*. Se usó como control la respectiva línea homocigota transformada con el vector vacío (control). El crecimiento, desarrollo y otras características morfológicas observadas de las plantas transgénicas obtenidas fue normal. Para el ensayo de microarreglos se utilizó el chip AraGene-1_0-ST 90k, que contiene aproximadamente 26.000 genes de *Arabidopsis* anotados por Affimetrix. Los resultados de los microarreglos muestran que *PrMADS10* regula la expresión diferencial de 1211 genes y *PrMADS11* regula 947 genes. Cuando se compararon ambos factores de transcripción se observó que regulan 679 genes en común. El ensayo de microarreglos realizado permitió identificar genes que son regulados positiva y negativamente por ambos *PrMADS*. Además, cada factor de transcripción regula genes específicos y otros que son comunes. De los 50 genes seleccionados por su mayor tasa de cambio, se pudo observar que los niveles de expresión son diferentes para ambos casos, pero también, genes expresados en plantas y que expresan ambos genes presentan distintos patrones de expresión, lo cual podría dar cuenta de la diferencia estructural entre ambas proteínas. Se identificaron genes implicados en división celular, hormonas, biosíntesis de celulosa, deposición de lignina, organización y

degradación de la pared celular, tales como: sucrose synthase 4 (SUS4), rhamnose biosynthesis 3, Basic chitinase, microtubule-associated proteins 70-5 (MAP70-5), MYB domain protein, expansina A8 (EXPA8), proline-rich protein 2 (PRP2) y pectin lyase-like superfamily protein, cellulose synthase like A15 (CSLA15) y xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 15 (XTH15). Mediante el programa MapMan se determinó que la totalidad de los genes son regulados diferencialmente por ambos factores de transcripción, observándose que estos codifican proteínas presentes en varias rutas metabólicas, tales como metabolismo de los carbohidratos, metabolismo de aminoácidos, metabolismo secundario, síntesis de pared celular y lípidos. Asimismo, los factores de transcripción estarían modulando el metabolismo secundario, pues se encontró expresión diferencial de genes de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides. Los genes regulados por *PrMADS10* fueron *PAL*, *CHS*, *4CL*, *CCR* y *CCoAOMT* y los regulados por *PrMADS11* fueron *PAL*, *4CL* y *CCoAOMT*, la información obtenida muestra que los dos MADS-box están regulando genes en común, como *PAL*, *4CL* y *CCoAOMT*, sin embargo, *PrMADS10* está regulando otros genes como *CHS* y *CCR*. Para validar estos resultados se realizó un estudio del perfil transcripcional de los genes de esta ruta en plantas transgénicas de *Arabidopsis* sobre expresando los genes *PrMADS10* y *PrMADS11* mediante análisis de qPCR. Los resultados obtenidos para *PrMADS10* mostraron una mayor acumulación de transcritos de los genes *PAL* y *COMT*, este último en la ruta final de la biosíntesis de lignina. En cuanto al *PrMADS11*, este también mostro una mayor acumulación en el gen *PAL*, así como también, una mayor acumulación de los transcritos de los cuatro genes de la ruta biosíntesis de lignina (*CCR*, *CCoAOMT*, *CAD* y *COMT*). Lo anterior, indica que estos genes podrían estar regulando las etapas finales de la biosíntesis de fenilpropanoides, especialmente los que conducen a la síntesis de lignina. Asimismo, para corroborar esta información se evaluó el contenido de lignina para los dos MADS-box, mostrando que el contenido de lignina en las líneas transgénicas T1, T2 y T7 de *PrMADS10* fue 30% superior a las plantas de *Arabidopsis* silvestre (wt) y la línea homocigota transgénica transformada con el vector pBI121 vacío (mock). De igual forma, en *PrMADS11* en las líneas transgénicas T1 y T3 hubo un 25% mas contenido de lignina al ser comparadas con las plantas control. El análisis de los microarreglos indica que los MADS-box estudiados están regulando la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides. Asimismo,

se muestra por qPCR que estos *PrMADS* estarían regulando la rama de biosíntesis de lignina. Por otro lado, el análisis del contenido de lignina en plantas de *Arabidopsis* mostro que sus contenidos totales de lignina, fueron superior al control. Ello permite sugerir que su función sería regular la acumulación de lignina en *Arabidopsis*. Nuestros resultados contribuyen a la comprensión del papel de los factores de transcripción MADS-box que se expresan diferencialmente poco después de la inclinación de los tallos de pino. Esta es la primera investigación que caracteriza *MADS-box* que desempeñan un papel en el desarrollo del tallo, que regula otros genes, así como la xilogenesis y el aumento de la síntesis de lignina. Los resultados obtenidos en la presente tesis nos permiten aceptar la hipótesis planteada “Factores de transcripción tipo MADS-box que responden a inclinación en *P. radiata*, regulan la expresión de genes de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides aumentando la acumulación de lignina en *Arabidopsis*”.

ABSTRACT

The loss of vertical growth, due to the inclination of stems in conifers by abiotic stress, results in reaction wood formation. This response is due to physical stresses that trees undergo when trying to reorient its original position. This causes a change in the genetic program, where both expression and regulation of genes involved, as the molecular mechanisms involved in this process are still unknown.

The aim of this doctoral thesis was to evaluate the functional role of two MADS-box transcription factors of *Pinus radiata* D. Don, differentially expressed in response to bending stress. Pine seedlings were tilted at 45° during 2.5 hours. Partial sequences of MADS-box transcription factors were obtained from a subtractive suppression hybridization (SSH) technique in response to the tilt stimulus in the above species. These isolated sequences from the stem allow suggest that these transcription factors MADS-box type that respond to an inclination in *P. radiata*, would regulate the expression of genes that code for the enzymes of the phenylpropanoid biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. The complete length of two genes encoding the transcription factors MADS-box type, was obtained using RACE 5'- and 3'. The sequences obtained were named *PrMADS10* and *PrMADS11*. *PrMADS10* corresponds to a 943 bp sequence, has an open reading frame (ORF) of 582 bp and polypeptide sequence deduced of 193 amino acids, the GenBank accession number is KM887510. The second sequence, *PrMADS11* corresponds to a sequence of 871 bp, has an open reading frame (ORF) of 495 bp and a polypeptide sequence deduced of 165 amino acids, the accession number GenBank is KM887511. The two sequences obtained show high percentage of identity with genes encoding for transcription factors of the MADS-box type present in other plant species. *PrMADS10* and *PrMADS11* contain conserved domains typical of the MADS-box, corresponding to the MADS and Kbox motifs, indicating that these structures are present in MIKC-like proteins. The transcript levels of *PrMADS10* and *PrMADS11* were analyzed on stems of pine tilted at 45° and control (without tilting) at different response times. The analyzes of qPCR for both genes showed a differential transcript accumulation, being higher in the lower part of the pine stem at 60 and 120 minutes, when it is submitted to inclination. These results suggest that *PrMADS10* and *PrMADS11* respond to early times, and their expression is differential in time and in stem section. The *radiata* pine *PrMADS10* and *PrMADS11* proteins were expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. It was

possible to produce and purify both recombinant proteins using heterologous system. The proteins showed a mass of 22 kDa (PrMADS10) and 19 kDa (PrMADS11); however, it was not possible to determine whether the two proteins have the ability to interact with response elements present in the promoter region of the modulated genes. In order to determine the function of pine transcription factors, a microarray analysis was performed. For this, several homozygous transgenic lines were generated in *Arabidopsis thaliana* overexpressing *PrMADS10* and *PrMADS11*. The respective homozygous line transformed with the empty vector (control) was used as control. The growth, development and other measured morphological characteristics of the transgenic plants obtained were normal. The AraGene-1_0-ST 90k chip, which contains approximately 26.000 *Arabidopsis* genes annotated by Affimetrix, for microarray assays was used. The result the microarray showed that *PrMADS10* regulates the expression of 1211 genes while *PrMADS11* regulates 947 genes. When both transcription factors are compared, they are regulating 679 genes in common. The microarray assay performed allowed to identify genes that are regulated positively and negatively by both *PrMADS*. In addition, each transcription factor regulates specific genes and others that are common. Of the 50 genes selected for their highest rate of change it is interesting that the expression levels are different for both cases, but at the same time, genes expressed in both constructs present different pattern of expression and could account for the structural difference between both proteins. Genes involved in cell division, hormones, cellulose biosynthesis, lignin deposition, cell wall organization and degradation were identified, such as sucrose synthase 4 (SUS4), rhamnose biosynthesis 3, Basic chitinase, microtubule-associated proteins 70-5 (MAP70-5), MYB domain protein, expansin A8 (EXPA8), proline-rich protein 2 (PRP2) and pectin lyase-like superfamily protein, cellulose synthase like A15 (CSLA15) and xyloglucan endotransglucosylase / hydrolase 15 (XTH15). The MapMan program determined that all genes are differentially regulated by both transcription factors and that these are present in several metabolic pathways such as carbohydrate metabolism, amino acid metabolism, secondary metabolism, cell wall and lipids. It would also be modulating the secondary metabolism, was found differential expression of genes of the phenylpropanoid biosynthetic pathway. The genes regulated by *PrMADS10* are *PAL*, *CHS*, *4CL*, *CCR* and *CCoAOMT* and those regulated by *PrMADS11* were *PAL*, *4CL* and *CCoAOMT*, the information

obtained shows that the two MADS-box genes are regulated in common, such as *PAL*, *4CL* and *CCoAOMT*, however, *PrMADS10* is regulating other *CHS* and *CCR* genes. To validate those genes, a transcriptional profile of the genes involved in this route was carried out in transgenic plants of *Arabidopsis* overexpressing *PrMADS10* and *PrMADS11* by means of analysis of qPCR. The results obtained for *PrMADS10* show a greater accumulation of transcripts of the *PAL* and *COMT* genes, the latter in the final pathway of lignin biosynthesis. For *PrMADS11*, it also showed a greater accumulation in the *PAL* gene, as well as a greater accumulation of the transcripts of the 4 genes of the lignin biosynthetic pathway (*CCR*, *CCoAOMT*, *CAD* and *COMT*). The results suggest that these genes could regulate the final stages of the biosynthesis of phenylpropanoids, especially those leading to lignin synthesis. In order to corroborate this information, the lignin content for the two MADSboxes was evaluated, showing that the lignin content in the T1, T2 and T7 transgenic lines of *PrMADS10* was 30% higher than the wild-type *Arabidopsis* (wt) and the transgenic homozygous line transformed with the empty pBI121 vector (mock). Likewise, *PrMADS11* in the transgenic lines T1 and T3 there was a 25% more lignin content when compared to the control plants. The results of the microarrays analyzes showed that the MADS-box studied are regulating the biosynthesis pathway of phenylpropanoids. Likewise, the results of the qPCR for these *PrMADS* indicate that they would be regulating the lignin biosynthesis branch. Moreover, the analysis of the lignin content in plants of *Arabidopsis* that overexpress showed that their total contents of lignin was superior to 30 and 25% respectively, when they were compared against the controls; this allows to suggest that their function would be to regulate the accumulation of lignin in *Arabidopsis*, results that could be extrapolated to pine plants. Moreover, the analysis of the lignin content in *Arabidopsis* plants showed that their total lignin contents were superior to the control. This suggests that its function would be to regulate the accumulation of lignin in *Arabidopsis*. Our results contribute to the understanding the role of transcription factors MADS-box that are differentially expressed shortly after the inclination of pine stems. This is the first research that characterizes *MADS-box* that play a role in stem development, regulates other genes, as well as xylogenesis and increased lignin synthesis. The results obtained in this thesis allow us to accept the hypothesis "Transcription factors MADS-box type that respond to

tilt in *P. radiata*, regulate the expression of genes of the phenylpropanoid biosynthesis pathway increasing the lignin accumulation in Arabidopsis”.