



**Instituto de Ciencias Biológicas  
Programa de Doctorado en Ciencias  
Mención Ingeniería Genética Vegetal**

**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**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
MENCIÓN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL

**TALCA, AGOSTO 2018**

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

PROFESOR GUIA:

DR. RAUL HERRERA FAUNDEZ  
Instituto de Ciencias Biológicas  
Universidad de Talca  
2 norte 685, casilla 747, Talca  
raherre@utalca.cl

## AGRADECIMIENTOS

Quiero dejar constancia de mis agradecimientos a todas las personas que contribuyeron en el desarrollo de esta tesis:

Al Dr. Raul Herrera, por la confianza, apoyo incondicional durante la realización de mi tesis doctoral.

A la Dra. Alejandra Moya, por su colaboración en esta tesis.

Al Dr. Patricio Ramos y Dr. Claudio Valenzuela, por guiarme y apoyarme en los ensayos del laboratorio

A la Dra. Lorena Norambuena, por su apoyo en esta tesis.

Al Dr. Ricardo Pérez, por su ayuda en la generación de líneas transgénicas en tabaco y Arabidopsis.

Al Ing. Aliosha Figueroa, por su ayuda en esta tesis.

A mis compañeros, la Dra. Cecilia Opazo, Yerko Quitral, Ada Lopez, Patricio Muñoz y Leonardo San Martín, que me ofrecieron sus conocimientos, me mostraron su cultura, y amistad en un país distinto al mío.

En memoria del Ing. Manuel Haz Alvarez, ExRector de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (Ecuador), por haberme dado la oportunidad de realizar este doctorado.

Al Ing. Roque Vivas Moreira, ExRector de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (Ecuador), por haberme apoyado en este doctorado.

Al Dr. Eduardo Díaz Ocampo, Rector de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (Ecuador), por su apoyo en la culminación de este doctorado.

A la Universidad de Talca y al Programa de Formación de Capital Humano avanzado de la Comisión de Ciencia y Tecnología (CONICYT) por las becas otorgadas que me permitieron la realización de este doctorado. A los proyectos Fondecyt 11121170, 1120289, 1120635 y 1150964, que financiaron esta tesis.

A mi familia y novia, que extraña y vi muy pocas veces durante la realización del doctorado.

A todos los miembros del IBVB, gracias por hacerme sentir como en casa y por su apoyo durante los 6 años que permanecí en Chile.

## 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, aún 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 ángulo de 45° 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 logró 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* sobreexpresando 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*, éste también mostró 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% más 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* mostró 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 xilogénesis y el aumento de la síntesis de lignina.

Los resultados obtenidos en la presente tesis nos permite 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 MADS-boxes 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”.

## INDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<b>I. INTRODUCCION</b>	1
<b>FORMULACION DE LA HIPOTESIS</b>	11
<b>OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS</b>	12
<b>II. MATERIALES Y METODOS</b>	13
<b>2.1 Cultivo de <i>Pinus radiata</i></b>	14
<b>2.2 Experimentos de pérdida de verticalidad en <i>P. radiata</i></b>	14
<b>2.3 Extracción de ARN total</b>	14
<b>2.4 Electroforesis en gel de agarosa</b>	16
<b>2.5 Purificación de templados desde gel agarosa</b>	17
<b>2.6 Elongación de las secuencias con homología a proteína MADS-box</b>	17
<b>2.7 Clonamiento del largo completo de los genes <i>PrMADS10</i> y <i>PrMADS11</i></b>	18
<b>2.8 Análisis bioinformáticos</b>	20
<b>2.9 Análisis del perfil de expresión de los factores de transcripción en <i>P. radiata</i></b>	20
<b>2.10 Expresión de la proteína recombinante PrMADS10 y PrMADS11</b>	21
<b>2.10.1 Cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	21
<b>2.10.2 Transformación por electroporación de <i>S. cerevisiae</i></b>	21
<b>2.10.3 Producción y purificación de proteína recombinante en <i>S. cerevisiae</i></b>	22
<b>2.10.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida</b>	22
<b>2.10.5 Ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSAs)</b>	23
<b>2.11 Transformación estable de <i>Arabidopsis thaliana</i></b>	24
<b>2.11.1 Generación de construcciones genéticas para la transformación estable</b>	24
<b>2.11.2 Obtención de plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i></b>	24
<b>2.11.3 Cultivo de <i>A. thaliana</i></b>	25
<b>2.11.3 Extracción de ARN total de <i>A. thaliana</i></b>	26
<b>2.11.4 Síntesis de ADNc de <i>A. thaliana</i></b>	26
<b>2.12 Análisis del perfil de expresión de genes en Arabidopsis transgénico</b>	26

2.12.1 Análisis de Microarreglos	26
2.12.2 Análisis de genes de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides	27
2.13 Análisis histoquímico en Arabidopsis	28
2.14 Determinación del contenido de lignina en Arabidopsis transgénico	28
<b>III. RESULTADOS</b>	30
3.1 Caracterización de dos secuencias de factores de transcripción tipo MADS-box de <i>P. radiata</i>	31
3.1.1 Obtención de secuencias de largo completo de <i>PrMADS10</i> y <i>PrMADS11</i>	31
3.1.2 Análisis filogenético de <i>PrMADS10</i> y <i>PrMADS11</i>	34
3.2 Determinación del perfil de expresión MADS-box durante la respuesta a inclinación en <i>P. radiata</i>	36
3.3 Evaluación de la interacción de proteínas MADS-box con elementos de respuesta de ADN	37
3.4 Evaluación del efecto de la sobreexpresión de los factores de transcripción de pino en plantas de Arabidopsis	41
3.4.1 Efectos de la expresión constitutiva de <i>PrMADS10</i> y <i>PrMADS11</i> determinados mediante Microarreglos	44
3.4.2 Efectos de la expresión constitutiva de <i>PrMADS10</i> y <i>PrMADS11</i> en la expresión de genes de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides en Arabidopsis	52
3.4.3 Contenido de lignina en líneas transgénicas <i>PrMADS10</i> y <i>PrMADS11</i>	55
<b>IV. DISCUSION</b>	57
4.1 <i>PrMADS10</i> y <i>PrMADS11</i> codifican para factores de transcripción tipo MADS-box	58
4.2 <i>PrMADS10</i> y <i>PrMADS11</i> son expresados diferencialmente en tallo de pino	59
4.3 Genes de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides contienen elementos CArG en sus promotores, reconocidos por MADS-box	60
4.4 La sobre-expresión constitutiva de <i>PrMADS10</i> y <i>PrMADS11</i> regula la inducción positiva y negativa de genes en Arabidopsis	61

<b>4.5 La sobre-expresión constitutiva de <i>PrMADS10</i> y <i>PrMADS11</i> regula la ruta de biosíntesis de fenilpropanpides en <i>Arabidopsis</i></b>	<b>66</b>
<b>4.6 La sobreexpresión de <i>PrMADS10</i> y <i>PrMADS11</i> regulan diferencialmente genes de la ruta de biosíntesis de lignina en <i>Arabidopsis</i></b>	<b>67</b>
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>70</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>73</b>
<b>VII. ANEXOS</b>	<b>87</b>

## INDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Esquema de corte transversal de tallo de pino adulto	2
<b>Figura 2.</b> Ruta de biosíntesis de fenilpropanoides de Arabidopsis	6
<b>Figura 3.</b> Esquema ilustrando plantas inclinadas y sección de tallo seleccionada	7
<b>Figura 4.</b> Respuesta gravitrópica temprana en ápice de <i>P. radiata</i>	9
<b>Figura 5.</b> Gel de agarosa de amplicones obtenidos por RACE	31
<b>Figura 6.</b> Secuencia aminoacídica del largo completo obtenida de PrMADS10 (A) y PrMADS11 (B)	32
<b>Figura 7.</b> Alineamiento múltiple de secuencias aminocídicas de PrMADS10 y PrMADS11	33
<b>Figura 8.</b> Alineamiento de secuencias del motivo MADS-box	34
<b>Figura 9.</b> Análisis filogenético del largo completo de las proteínas predichas de PrMADS10 y PrMADS11 y otras proteínas de factores de transcripción MADS-box	35
<b>Figura 10.</b> Expresión relativa del gen <i>PrMADS10</i> inducida por respuesta gravitropica a tiempos tempranos	36
<b>Figura 11.</b> Expresión relativa del gen <i>PrMADS11</i> inducida por respuesta gravitropica a tiempos tempranos	37
<b>Figura 12.</b> Gel SDS/PAGE y Western blot de las proteínas recombinantes PrMADS10 y PrMAS11 expresadas en <i>S. cerevisiae</i>	38
<b>Figura 13.</b> Gel SDS/PAGE y Western blot de la proteína recombinante PrMADS11 expresada en <i>S. cerevisiae</i> analizada en 4 tiempos diferentes	38
<b>Figura 14.</b> Gel SDS/PAGE y Western blot de las proteínas recombinantes PrMADS10 y PrMAS11 purificadas	39
<b>Figura 15.</b> Ensayo EMSA de PrMADS10 y PrMADS11 con varios elementos de respuesta de ADN tipo CArG	40
<b>Figura 16.</b> Identificación líneas transgénicas T2 de <i>PrMADS10</i> en Arabidopsis	41

<b>Figura 17.</b> Identificación líneas transgénicas T2 de <i>PrMADS11</i> en Arabidopsis	42
<b>Figura 18.</b> Líneas transgénicas sobreexpresando 35S:: <i>PrMADS10</i> y 35S:: <i>PrMADS11</i> en Arabidopsis comparadas con plantas wild type a los 10 días de edad	43
<b>Figura 19.</b> Selección de plantas de Arabidopsis transformadas con el vector pBI121Ø	43
<b>Figura 20.</b> Genes regulados diferencialmente obtenidos mediante análisis de microarreglos	44
<b>Figura 21.</b> Mapa de rutas metabólicas reguladas por <i>PrMADS10</i> (A) y <i>PrMADS11</i> (B) en plantas transgénicas de Arabidopsis obtenidas mediante el programa MapMan	51
<b>Figura 22.</b> Expresión relativa del gen 35S:: <i>PrMADS10</i> en Arabidopsis	52
<b>Figura 23.</b> Niveles de transcrito de los genes de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides en plantas de Arabidopsis sobreexpresando 35S:: <i>PrMADS10</i>	53
<b>Figura 24.</b> Expresión relativa del gen 35S:: <i>PrMADS11</i> en Arabidopsis	54
<b>Figura 25.</b> Niveles de transcrito de los genes de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides en plantas de Arabidopsis sobreexpresando 35S:: <i>PrMADS11</i>	55
<b>Figura 26.</b> Análisis del contenido de lignina en tallos de Arabidopsis sobreexpresando <i>PrMADS10</i> y <i>PrMADS11</i>	56

## INDICE DE TABLAS

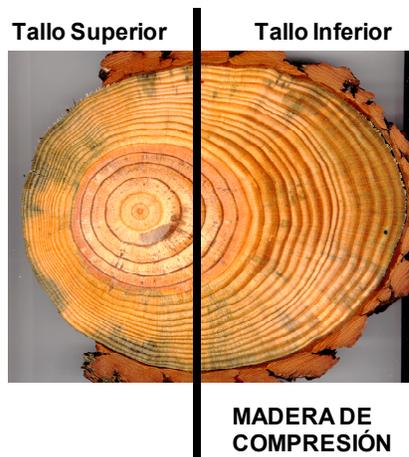
	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Partidores empleados para la obtención de la secuencia completa de los transcritos de los genes PrMADS10 y PrMADS11	18
<b>Tabla 2.</b> Partidores empleados para amplificar los marcos de lectura abiertos sin codón stop, y con sitios de restricción	18
<b>Tabla 3.</b> Partidores empleados para amplificar los marcos de lectura abiertos completos, y con sitios de restricción	18
<b>Tabla 4.</b> Partidores empleados en los ensayos de qPCR	27
<b>Tabla 5.</b> Lista de los 50 genes sobreexpresados en PrMADS10 obtenidos mediante análisis de microarreglos	45
<b>Tabla 6.</b> Lista de los 50 genes sobreexpresados en PrMADS11 obtenidos mediante análisis de microarreglos	46
<b>Tabla 7.</b> Lista de los 50 genes regulados negativamente en PrMADS10 obtenidos mediante análisis de microarreglos	47
<b>Tabla 8.</b> Lista de los 50 genes regulados negativamente en PrMADS11 obtenidos mediante análisis de microarreglos	49

## ABREVIACIONES

AG	Gen Agamous
DEFA	Gen Deficiens
GLO	Gen Globosa
CArG	Elemento de DNA reconocido por proteínas MADS-box
ARNm	ARN mensajero.
ADNc	ADN sintetizado a partir de ARN mensajero
ADNg	ADN genómico
MS	Medio de cultivo semisólido propuesto por Murashige-Skoog
mM	Micromolar
YPD	Medio para crecer levadura
YMM	Medio mínimo para levadura
ORF	Marco abierto de lectura, sección codificante de un gen sin codón terminal
UTR	región no codificante
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	PCR en tiempo real
GUS	Gen de la <i><math>\beta</math>-glucoronidasa</i>
p/v	Relación peso volumen
NaOH	Hidróxido de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
HCl	Ácido clorhídrico
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
EMSA	Ensayo de movilidad electroforética
TGA	Acido tioglicólico
rpm	Revoluciones por minuto
Wt	Línea silvestre
TM	Temperatura de hibridación de partidores con la secuencia de ADN
PM	Peso molecular
KAN	Kanamicina
FT	Factor de transcripción

## **I. INTRODUCCIÓN**

La formación de madera es un proceso complejo en el que las células del xilema y del cambium participan activamente en la síntesis de los metabolitos que forman parte de ella. La madera (xilema secundario) es producida por una sucesión de pasos finamente sincronizados que incluyen división celular, expansión celular, engrosamiento de la pared celular (involucra deposición de celulosa, hemicelulosa, proteínas de pared celular y biosíntesis de lignina), muerte celular programada y formación de duramen. Este proceso requiere de un alto nivel de coordinación y regulación de cientos de genes por una compleja red de transducción de señales (Chaffey, 1999; Lachaud *et al.*, 1999; Plomion *et al.*, 2001; Du y Groover, 2010).



**Figura 1. Esquema de corte transversal de tallo de pino adulto.** La imagen fue tomada desde internet y modificada para ilustrar sección de la madera de compresión.

Los árboles generan madera con características modificadas, llamadas madera de reacción, en respuesta a los estímulos gravitrópicos por efecto de algún tipo de estrés abiótico (viento, nieve o pendiente). La capacidad de responder a la pérdida de verticalidad del tallo es importante para la supervivencia de la mayoría de las plantas terrestres (Timell, 1986; Du y Yamamoto, 2003). La formación de la madera de reacción es capaz de reorientar el crecimiento del tallo inclinado a una orientación vertical. En coníferas, la madera que se forma en el lado inferior del tronco que busca reorientarse hacia la verticalidad recibe el nombre de madera de compresión (Fig. 1). Mast *et al.* (2009) indican que la madera de compresión en coníferas se diferencia perceptiblemente de la madera normal en sus características anatómicas, químicas y físicas.

Las características anatómicas típicas de la madera de compresión son traqueidas redondeadas y de pared gruesa con una mayor proporción de lignina en la capa externa S2 de la pared celular, y ausencia de la capa S3 (Timell, 1986). Químicamente, la madera de compresión, si es comparada con la madera normal, se caracteriza por tener niveles altos de lignina, ricos en unidades condensadas del tipo p-hidroxifenil, cantidad reducida de celulosa y de galactoglucomanano (Timell, 1986; Yeh, 2005; Nanayakkara, 2007). Más aún, se ha destacado que la presencia de madera de compresión da lugar a la formación de defectos tales como grietas y torceduras, los cuales disminuyen la calidad de los productos obtenidos de esta madera (Lomagno y Rozas, 2001; Yeh, 2005). Por otro lado, Young *et al.* (1970) indican que la madera de compresión afecta también la producción de papel, pues se obtiene menos cantidad de pulpa.

De las especies de coníferas que presentan madera compresión, una de gran importancia es *Pinus radiata* D. Don, conocida comúnmente como pino insigne o pino monterrey. Es originario de la costa occidental de los Estados Unidos de Norteamérica, específicamente de California. Fue introducido en Chile en 1885 (Bustamante y Simonetti, 2005), logrando adaptarse exitosamente al clima y suelo del país, inclusive alcanzando crecimientos superiores, y en menor tiempo, a los de su región de origen. En Chile existen 1.391.039 de hectáreas plantadas (INFOR, 2017), lo que representa el 57,6% de las plantaciones totales (2.414.208 hectáreas), con una producción que representa un 2,1% de participación del PIB Forestal total Nacional. Estas cifras difieren levemente de Benedetto (2013) indicando que las plantaciones de *Pinus radiata* tienen 1.438.800 hectáreas, las que se concentran en las regiones del Biobío, del Maule y de la Araucanía, y representan el 65,4% de las plantaciones en Chile, que suman un total de 2,2 millones de hectáreas.

Aunque no se conoce la superficie total afectada por la presencia de madera de compresión en *P. radiata*, y que generalmente se la relaciona con árboles inclinados y curvados. También, se la puede encontrar en rodales con árboles que crecen sin inclinación o con inclinaciones menores (Diaz *et al.*, 2007). Implicando efectos no siempre aceptables sobre los productos que se fabrican con esta madera ya que afecta a: procesos de pulpaje, comportamiento físico y mecánicos de tableros de fibras, de tableros de partículas, incide sobre la permeabilidad de la

madera y en las curvas de secado, afecta la calidad de la madera aserrada y sus productos (Ban *et al.*, 2004; Lindstrom *et al.*, 2004). Esto estaría provocando una afectación directa a la industria nacional, y dada la importancia económica de *P. radiata* es relevante el conocimiento del mecanismo molecular involucrado en la respuesta gravitropica y estrés abiótico, los cuales en gran medida aún son poco conocidos (Herrera *et al.*, 2010; Berthier y Stokes, 2005; Plomion *et al.*, 2000).

La formación de madera es motivo de estudio a nivel celular y bioquímico, sin embargo, la expresión y regulación génica que conduce y modula este proceso siguen siendo poco conocidas (Demura y Fukuda, 2007; Le Provost *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2016). Existe cierta evidencia que auxina y etileno estarían involucrados en este proceso. En *Populus tremula x tremuloides* se aislaron *PttLAX1-PttLAX3* y *PttPIN1-PttPIN3*; genes pertenecientes a la familia AUX1 transportadores de auxina polar; y los resultados sugieren que estos genes participan en la regulación de la formación de la madera (Schrader *et al.*, 2003). En álamos transgénicos con el metabolismo de auxina modificado mostró que la formación de madera aparece alterada (Tuominen *et al.*, 1995).

También, se ha evidenciado transcritos y proteínas de la ruta de biosíntesis de etileno (1-aminociclopropano carboxilasa oxidasa) se inducen durante la formación de madera de compresión en *P. radiata* y *Pinus maritima* (Plomion *et al.*, 2000; Ramos y Herrera, 2013; Ramos *et al.*, 2016). Por otro lado, Valenzuela *et al.* (2014) mostró que xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) es regulado por hormonas y que elementos de respuesta en *cis* se encuentran en la región promotora del gen. Existe más información que valida los genes de transporte de auxina y los genes de biosíntesis de etileno, pero ¿Cuáles son los genes o factores de transcripción que están involucrados en el proceso de formación de madera? Los elementos clave son aún poco conocidos. Los esfuerzos en generar herramientas de selección asistida para el mejoramiento genético forestal en etapas tempranas de desarrollo en árboles que posean condiciones genéticas para generar madera de alta calidad requieren de una mejor comprensión del proceso de formación de este tipo particular de madera y, en este sentido, la identificación y caracterización de los genes involucrados en la transducción de señales en la célula es de gran importancia. Desde hace un tiempo que resulta posible seleccionar al genotipo

directamente en lugar del fenotipo, mediante la denominada Selección Asistida por Marcadores (SAM). La selección asistida por marcadores consiste en identificar una secuencia de ADN que está próxima (o en el mejor de los casos, codifica) al gen (o locus) de interés agronómico y utilizar esta secuencia como herramienta en el proceso de selección, independizándose de la expresión del gen y de su interacción con el ambiente (Olmos, 2004).

Los estudios moleculares y genéticos recientes revelan que un grupo de factores de transcripción con dominio NAC están asociados a pared secundaria en *Arabidopsis* (Zhong *et al.*, 2010). Estas proteínas se refieren a tres miembros identificados originalmente: NO APICAL MERISTEM (NAM), ATAF y CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC). Estos genes son considerados *master switch*, debido a que regulan una cascada de factores de transcripción corriente abajo. Entre ellos MYB46 y sus homólogos cercanos funcionan como reguladores *master switch* de segundo nivel activando el programa de biosíntesis de pared secundaria. Las acciones concertadas de los factores de transcripción conducen a una activación coordinada de genes de biosíntesis de pared secundaria que resulta en la síntesis, transporte y ensamble de los componentes de la pared secundaria tales como, celulosa, hemicelulosa y lignina. La regulación coordinada de la ruta de biosíntesis de lignina es mediada por factores de transcripción MYB específicos de lignina (Patzlaff *et al.*, 2003a; Patzlaff *et al.*, 2003b). Besseau *et al.*, (2007) manifiesta que la ruta de los fenilpropanoides es responsable de la producción de los tres monómeros de lignina llamados monolignoles. La lignina está incrustada en las paredes celulares de la planta, rigidizándolas y volviéndolas impermeables al agua. En la vía de los fenilpropanoides, *p-coumaroyl* CoA se encuentra en la unión de las rutas metabólicas que conducen a flavonoides o compuestos fenilpropanoides. De hecho, *p-coumaroyl* CoA es el sustrato común de dos enzimas: (1) chalcone synthase (CHS), que cataliza la formación del esqueleto flavonoide, y (2) hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transferase (HCT), que conduce a la biosíntesis de dos unidades principales de producción de lignina, nombradas, unidades de guaiacyl y siringyl (Fig. 2). HCT se ha caracterizado recientemente y se ha demostrado que la represión de HCT en *Nicotiana benthamiana* produjo cambios marcados en la concentración de isómeros de caffeoylquinate y en la cantidad y composición de lignina, demostrando así que el HCT funciona en el metabolismo fenilpropanoide en planta (Hoffmann *et al.*, 2004).

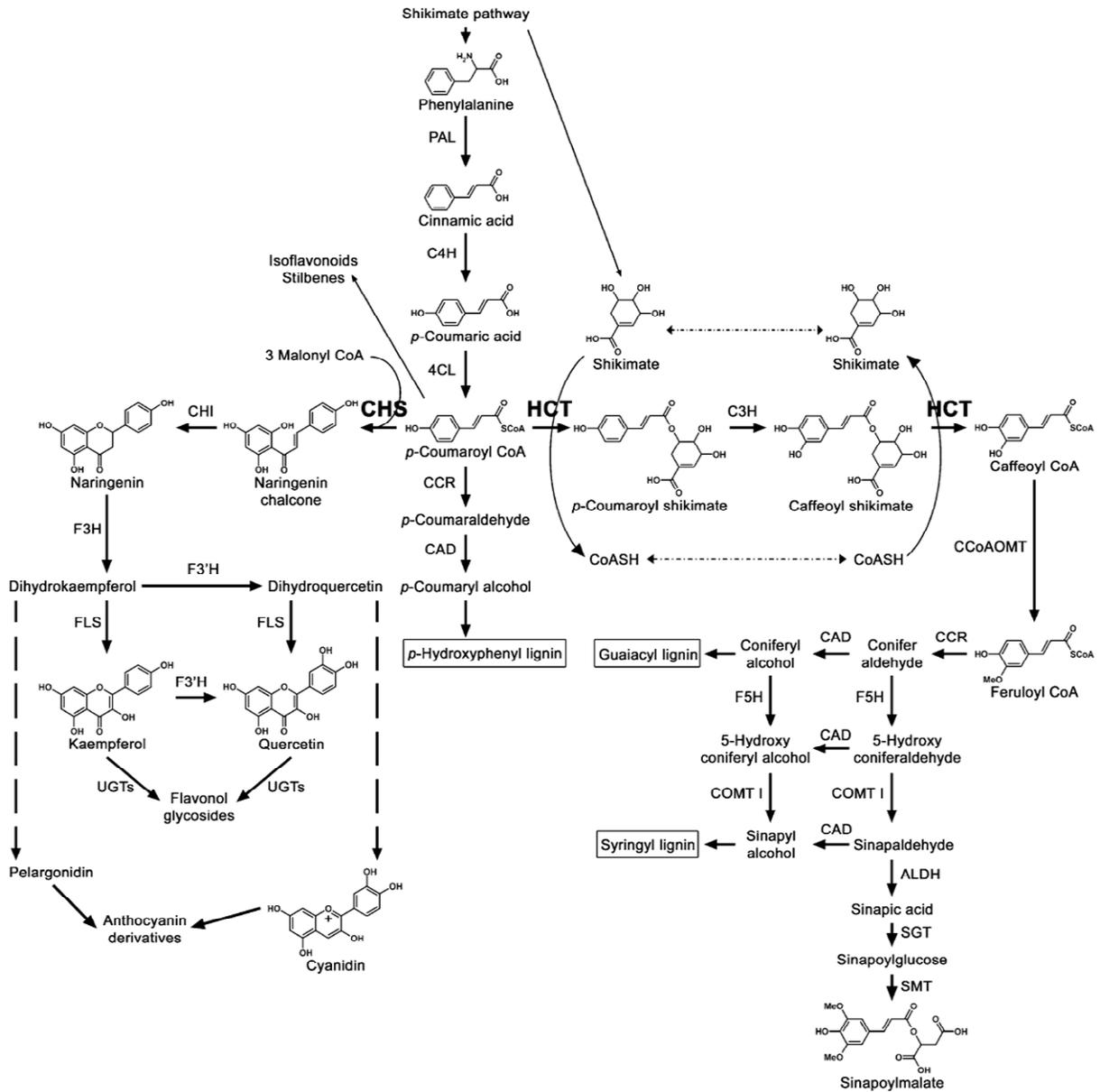
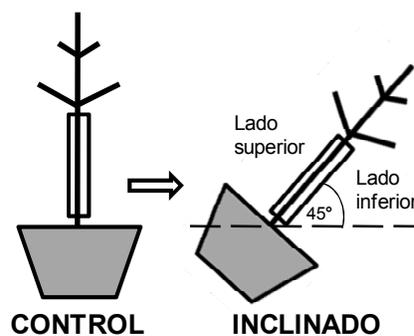


Figura 2. Ruta de biosíntesis de fenilpropanoides de Arabidopsis.

La familia de factores de transcripción tipo MYB comprende una de las clases más abundantes de factores de transcripción en plantas (Riechmann *et al.* 2000). Por ejemplo, el genoma de Arabidopsis codifica más de 120 proteínas diferentes R2R3-MYB (Stracke *et al.*, 2001). Zhang *et al.* (2010) señalan que los genes *MYB* de pino, eucalipto, Populus y Arabidopsis están filogenéticamente relacionados, existiendo genes ortólogos entre Populus y Arabidopsis. En base a estos conocimientos se generaron plantas transgénicas de Arabidopsis sobreexpresando PtrMYB3 observando un incremento en la deposición de celulosa, xilano y

lignina (Zhang *et al.*, 2010). Estas proteínas se caracterizan por la presencia de un dominio de unión a ADN, conocido como el dominio MYB, que se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína. Hasta la fecha, la mayoría de las proteínas R2R3-MYB han sido implicadas en el control del metabolismo de fenilpropanoides o la diferenciación celular terminal, y que un subconjunto de proteínas R2R3-MYB podría regular aspectos de la formación del xilema (Patzlaff *et al.* (2003a).

Patzlaff *et al.* (2003a) caracterizaron un miembro de la familia de factores de transcripción R2R3-MYB que regula la lignificación, el mismo que fue clonado a partir de una biblioteca de cDNA que se construyó a partir de RNA aislado de xilema de pino en diferenciación. Ellos encontraron que MYB4 de *Pinus taeda* (PtMYB4) se expresa en células que están en proceso de lignificación. Realizando ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSAs), también demostraron que la proteína recombinante PtMYB4 es capaz de unirse a los motivos de ADN conocidos como elementos AC. Estos elementos están presentes en los promotores de genes que codifican enzimas de biosíntesis de lignina. Utilizando levaduras mostraron que PtMYB4 podía activar la transcripción en un elemento AC. Al sobreexpresar PtMYB4 en plantas transgénicas de tabaco se alteró la acumulación de transcritos correspondientes a los genes que codifican para enzimas de biosíntesis de lignina. Además, aumentó la deposición de lignina y se extendió a otros tipos de células que normalmente no lignifican. Con esta investigación se pudo demostrar que solamente PtMYB4 es suficiente para inducir lignificación en un sistema heterólogo.



**Figura 3.** Esquema ilustrando plantas inclinadas y sección de tallo seleccionada

Para poder identificar cuáles son los genes y factores de transcripción que participan en respuesta gravitrópica, en laboratorio las plantas pueden ser inclinadas a diferentes ángulos (Fig. 3) (Plomion *et al.*, 2000; Herrera *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2012; Ramos y Herrera, 2013). Durante la inclinación se inducen genes, y se ha demostrado que algunos de ellos se expresan diferencialmente tanto en la parte superior o inferior del tallo inclinado. Con esta técnica, además de inducir una batería de genes, se podrían seleccionar genes candidatos para estudiar el proceso de formación madera de compresión (lado inferior) en coníferas.

Lo más reciente que se conoce sobre la inducción de genes durante inclinación, es un estudio realizado por Herrera *et al.* (2010), donde se demuestra que existe una respuesta gravitrópica rápida en ápices de *P. marítima* cuando las plantas son inclinadas con un ángulo mayor a 30°, sin embargo, no se observó respuesta alguna en la base del tallo a tiempos tempranos de exposición a inclinación. Someter plántulas a ángulos menores de inclinación no permitía separar la respuesta gravitrópica de la fototrópica, así, el mayor efecto se logró a 45° de inclinación. En el estudio se identificaron proteínas asociadas a respuesta gravitrópica temprana, que se conocen tienen función relacionada a energía y metabolismo primario.

En otro trabajo, induciendo respuesta gravitrópica en plántulas de *P. radiata* de un año de edad, se generaron ocho bibliotecas a partir de tallo inclinado y sin inclinar a diferentes tiempos mediante Hibridación Sustractiva Supresiva (SSH), que contenían un total de 2.653 ESTs con tamaños de fragmentos entre 100 y 1.500 pb. Después de la secuenciación se realizó la categorización funcional. De ellos, las categorías funcionales más representadas fueron comunicación celular y transducción de señales seguido de síntesis de proteínas y metabolismo (Ramos *et al.*, 2012). Además, en su investigación mediante fotografía continua observó que los ápices de las plántulas de *P. radiata* inclinadas se reorientaban a su posición vertical inicial a las 2,5 horas, lo cual resultaba evidente luego de una semana de inclinación (Fig. 4), y realizando ensayos histoquímicos se determinó que la acumulación de lignina en tallo inclinado comienza a observarse los 15 días (Ramos, 2010).

De las bibliotecas SSH generadas por Ramos (2010) se realizó un análisis bioinformático, en este estudio se identificaron varias secuencias que codifican para factores de transcripción. Dos de estas secuencias codifican para factores de transcripción tipo MADS-box, los cuales se encuentran expresados diferencialmente en tiempo y sección del tallo (lado inferior) comparados con el control (plantas sin inclinar). Estas dos secuencias que codifican para factores de transcripción tipo MADS-box fueron seleccionados para el desarrollo de esta tesis doctoral.



**Figura 4.** Respuesta gravitrópica temprana en ápice de *P. radiata*

Las proteínas MADS se refieren a cuatro miembros identificados originalmente, formando su nombre con la primera letra de cada uno: MINICHROMOSOME MAINTENANCE1 (MCM1), AGAMOUS (AG), DEFICIENS (DEFA) y SERUM RESPONSE FACTOR (SRF). Shore y Sharrocks (1995) indican que los MADS-box son una familia de factores de transcripción que se encuentran ampliamente distribuidos en organismos eucarióticos incluyendo levaduras, plantas, insectos y animales. Sin embargo, en plantas los MADS-box semejantes como AGAMOUS (AG), DEFA y GLOBOSA (GLO) juegan un rol fundamental durante el desarrollo de plantas. El genoma de *Arabidopsis* contiene 107 genes MADS-box, de los cuales, el 84% son de función desconocida (Parenicova *et al.*, 2003). Estos factores de transcripción tienen un motivo MADS-box de aproximadamente 60 residuos de

aminoácidos, y cuya secuencia es altamente conservada en toda la super familia. Las proteínas MADS-box reconocen un sitio DNA que contiene la secuencia CC(A/T)<sub>6</sub>GG, conocida como elemento CArG, y es considerado que su acción la ejecuta como dímero (Riechmann *et al.*, 1996; Shore y Sharrocks, 1995). En cuanto a la caracterización de este factor de transcripción existen trabajos realizados en *Populus* y pino. Cseke *et al.* (2003), identificó un gen MADS-box específico de tejido vascular de *Populus tremuloides* (PTM5) que es expresado en diferenciación de xilema primario, secundario, y floema. En cambio en *P. radiata* se han detectado varios transcritos MADS, donde PrMADS4 a PrMADS9 fueron detectados en brotes vegetativos, órganos florales y raíces, todos ortólogos a TOMATO MADS3 (TM3). Su expresión fue más abundante en tejido floral joven comparado con tejido adulto (Walden *et al.*, 1998). Los otros miembros de la familia MADS-box estudiados en esta misma especie estarían implicados en regular estructuras reproductivas femeninas (Mouradov *et al.*, 1999a; Mouradov *et al.*, 1998) y desarrollo de cono (Mouradov *et al.*, 1999b).

Durante los últimos años la evidencia indica un rol de los MADS-box como reguladores del tiempo de floración, así como también otros procesos reproductivos. Sin embargo, también se expresan en las raíces, tallos y hojas (Aswath y Kim, 2005). Una de estas funciones se muestra cuando las plantas de *Arabidopsis* expresan constitutivamente dos genes *SHP1* y *SHP2* (previamente conocidos como *AtAGL1* y *AtAGL5*, respectivamente). Estos genes controlan la diferenciación de la zona dehiscente y promueven la lignificación de células adyacentes de órganos reproductivos (Liljegren *et al.*, 2000). Otro estudio revela que la fibra de algodón provee un excelente sistema para estudiar elongación celular y biosíntesis de pared celular. Para se sobreexpresó *GhMADS11* en levadura. Los resultados obtenidos sugieren que la proteína GhMADS11 tiene función en la elongación celular de la fibra y su dominio MADS y dominio parcial K-box son suficientes para esta función (Li *et al.*, 2011). Por otro lado, experimentos transgénicos en *P. tremuloides* en sistemas heterólogos como tabaco y *Arabidopsis* indican que los genes *PTM3/4* participan en desarrollo floral (Cseke *et al.*, 2005). En cambio *PTM5* está involucrado en el desarrollo vegetativo de esta misma especie (Cseke *et al.*, 2007).

Con esta información surge la interrogante sobre si los factores de transcripción MADS-box inducidos por inclinación en la parte inferior de tallo de pino, podrían estar involucrados en otros procesos del desarrollo de plantas. Sugiriéndose, que estos factores de transcripción estarían involucrados directamente en procesos de desarrollo de tallo, regulando genes de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides aumentando la acumulación de lignina.

Tomando en consideración que el desarrollo de madera de compresión en pino radiata es un problema para la industria forestal, los *PrMADS1-9* han sido detectados en brotes vegetativos y órganos florales y estarían implicados en regular estructuras reproductivas femeninas, desde librerías SSH generadas desde tallo de pino inclinado se identificaron dos secuencias que codifican para factores de transcripción tipo MADS-box, hasta la fecha no se ha caracterizado ningún factor de transcripción tipo MADS de respuesta a inclinación y que se exprese diferencialmente en tallo. Es importante el estudio del mecanismo molecular de los genes expresados en respuesta gravitrópica en pino.

Por ello, en esta tesis doctoral se propuso establecer la relación entre dos factores de transcripción tipo MADS-box, que responden al estímulo gravitrópico inducido en la parte inferior del tallo en plantas de un año de edad de *P. radiata*.

## **FORMULACION DE LA HIPOTESIS**

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.

## **OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS**

### **Objetivo general:**

Establecer el rol funcional entre dos factores de transcripción tipo MADS-box, que responden a inclinación en *P. radiata*, y regulan la biosíntesis de lignina.

### **Objetivos específicos:**

1. Caracterizar dos secuencias de factores de transcripción tipo MADS-box de *P. radiata* identificadas previamente en bibliotecas SSH.
2. Determinar el perfil de expresión de los factores de transcripción MADS-box durante la respuesta a inclinación en *P. radiata*.
3. Evaluar unión entre proteínas MADS-box y elementos de respuesta de ADN tipo CArG.
4. Evaluar el efecto de la expresión de dos factores de transcripción MADS-box de pino, identificando genes de respuesta y cuantificando su impacto en la biosíntesis de lignina en Arabidopsis.

## **II. MATERIALES Y METODOS**

## **2.1 Cultivo de *Pinus radiata***

Se utilizaron plántulas de *P. radiata* de un año de edad, obtenidas a partir de semillas de plantas clonales, provenientes de cruzamientos de polinización abierta, es decir, medios hermanos. Esto permitió analizar los niveles de expresión de los factores de transcripción en individuos con similar background genético. Las plantas se mantuvieron a 25°C en cámara de crecimiento con un régimen de fotoperiodo de día largo (16 horas luz/8 horas de oscuridad).

## **2.2 Experimentos de pérdida de verticalidad en *P. radiata***

Para realizar los ensayos de respuesta gravitrópica las plantas fueron sometidas a inclinación de 45°. Se utilizaron un total de 35 plantas, de ellas, 15 plantas se mantuvieron en posición vertical como control y 20 sujetas a inclinación por diferentes tiempos (60 y 120 min). Se utilizaron tiempos tempranos de muestreo tomando en consideración que experimentos anteriores mostraron la expresión diferencial de genes MADS-box a las 2,5 horas luego de la inclinación. Dado que la expresión diferencial detectada era en un lado del tallo, primero se separaron las acículas del tallo y posteriormente se realizó un corte longitudinal para separar la parte superior de la parte inferior del tallo. Todas las muestras fueron colocadas en nitrógeno líquido. Posteriormente se realizó la extracción de RNA total a cada muestra. Luego se procedió a sintetizar el RNA total en cDNA para cada muestra a estudiar.

## **2.3 Extracción de ARN total**

El ARN total fue extraído desde tallos de pino lado superior e inferior, según protocolo modificado a partir de Chang *et al.* (1993). La extracción se inició pulverizando 200 mg de tejido de tallo, todas las muestras fueron congeladas con Nitrógeno líquido y colocadas en un molino con bolas de acero a una frecuencia de 30 Hz por 2 min. Las muestras de tejido molido fueron colocadas en un tubo eppendorf, con 1 mL de buffer de extracción

(2% CTAB, 2% PVP K-30 (soluble), 100mM Tris-HCl (pH 8.0), 25mM EDTA, 2.0 M NaCl, 0.5 g/l espermidina 2%  $\beta$ -mercaptoetanol) previamente calentado a 65 °C.

Posteriormente, se dejó incubar por 10 min a 65 °C, mezclando por inversión cada 3 min, para luego agregar mismo volumen de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 y se centrifugó por 10 min a 12.000 rpm a temperatura ambiente. Se recolectó el sobrenadante y se agregó igual volumen de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1, y se centrifugó por 10 min a 12.000 rpm. Se recolectó el sobrenadante y se adicionó  $\frac{1}{4}$  volumen de LiCl 10 M, mezclando suavemente por inversión. La mezcla se precipitó a 4 °C por toda la noche. Al día siguiente, se centrifugaron los tubos a 4 °C por 30 min a 12.000 rpm, y se eliminó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 500  $\mu$ l de tampón STE (1M NaCl, 10 mM Tris HCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0) a 65 °C con agitación suave. Al sobrenadante se le agregó 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 y se centrifugó a 12.000 rpm por 15 min a 4 °C. Se rescató el sobrenadante y a la fase orgánica se agregó 150  $\mu$ l de tampón STE para una re-extracción, se mezcló bien por inversión y se centrifugó a 12.000 rpm por 15 min, el sobrenadante fue transferido al tubo previamente utilizado y se le adicionó 60  $\mu$ l de acetato de sodio 3M y 1 mL de etanol absoluto previamente enfriado a -20 °C. Se incubó a -20 °C por 2 h. Finalmente, se centrifugó a 4 °C a 12.000 rpm por 20 min, el pellet se lavó con etanol 70% y se centrifugó a 12.000 rpm por 10 min, el pellet se secó por 30 min a 37 °C y se resuspendió en 22  $\mu$ L de agua libre de nucleasas.

La integridad del los ARNs totales fue visualizada en geles de agarosa al 1,5% en tampón TAE 1X (5,7 % v/v ácido acético; 2 M Tris HCl; 100 mM EDTA pH 8,0) realizando la electroforesis a 40 volts. En cada pocillo se cargó 1  $\mu$ L de muestra de ARN disuelta en 2  $\mu$ L de tampón de carga con gel red 5X.

Cada muestra de ARN de 20  $\mu$ L se trató con DNAsa Promega (RQ1 ase-Free DNase) y se mezcló con 5  $\mu$ L de DNAsa (1 U/ $\mu$ l), 5  $\mu$ L de Buffer tampón 10X y 20  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O. La reacción se incubó a 37 °C por 30 min. Luego se agregó H<sub>2</sub>O libre de nucleasas llevándolo hasta un volumen final de 100  $\mu$ L. El lavado se desarrolló agregando 100  $\mu$ l de cloroformo alcohol isoamílico 24:1. Luego se centrifugó a 12.000 rpm por 10 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y adicionó 1 mL etanol (-20 °C), precipitando a -20 °C toda la

noche. Finalmente se centrifugó a 12.000 rpm por 30 min a 4 °C y el pellet se secó a 37 °C por 30 min y se resuspendió en 15 µL de agua libre de nucleasas.

Nuevamente se analizó la integridad de ARN por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE 1X y su concentración fue medida en espectrofotómetro ND-1000 UV (Nanodrop Technology) a 260 nm. Para corroborar la calidad del tratamiento se realizó una reacción de PCR con partidores de actina u otro gen de interés y se visualizó en gel de agarosa al 1,5%.

## **2.4 Electroforesis en gel de agarosa**

Para migrar DNAs, RNAs y cDNAs se utilizó geles de agarosa, a una determinada concentración p/v, en tampón TAE 1x (TAE 50X: 2.0 M Tris Base, 1.0 M ácido acético glacial; 50 mM EDTA, pH 8,0). La suspensión de agarosa en TAE fue calentada en microondas hasta completar su desagregación. Cuando la mezcla alcanzó una temperatura aproximada de 50°C, fue vertida en una cámara de electroforesis para su solidificación. Un volumen (5µL) de muestra fue mezclado con un 1/3 en volumen de una solución colorante (tampón de carga) (15 mM EDTA pH 8,0; 50% glicerol; 5% SDS; y 0,05% azul de bromofenol) y mezclado con gel red. Las muestras así preparadas, fueron depositadas en los pocillos preformados de los geles. La electroforesis fue conducida a 50 mA.

Las bandas de DNA fueron visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta (longitud de onda 312 nm) y registradas mediante fotografía digital. En cada corrida electroforética se utilizaron estándares de tamaño molecular adecuados, según los tamaños en pares de bases (pb) esperados para cada muestra analizada.

## **2.5 Purificación de templados desde gel agarosa**

La purificación desde gel se realizó con el kit UltraClean 15 DNA Purification (Mo Bio Laboratories, Inc.). Se procedió a cortar la banda desde el gel de agarosa y se le adicionó 3 volúmenes de Ultra Salt provisto por el fabricante, en relación a los gramos del trozo de agarosa y se incubó a 55 °C hasta fundir la agarosa completamente. Posteriormente se resuspendió la Utra Bind por vortex y se le adicionó 5 ul de Ultra Bind a la banda previamente fundida, incubando por 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó por cinco segundos a máxima velocidad, removiendo el sobrenadante. El sedimento fue resuspendido en Ultra Wash/EtOH para ser centrifugado nuevamente. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se secó a 37 °C por 15 minutos. El sedimento se resuspendió en 20 µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, dejando incubar por 5 minutos a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó a máxima velocidad por 3 minutos, rescatando el sobrenadante y almacenándolo a -20 °C.

## **2.6 Elongación de las secuencias con homología a proteína MADS-box**

Para la elongación de las dos secuencias parciales que presentaban homología con el factor de transcripción tipo MADS-box se diseñaron partidores para RACE utilizando el programa Primer premier 3.0 disponible online (Tabla 1).

Las reacciones de PCR RACE 5'- y -3' fueron realizadas utilizando el “Universal primer A Mix” (Clontech) y los partidores gen-específicos, los cuales eran internos a la secuencia previamente aislada. El ciclo térmico utilizado para la amplificación de los respectivos RACE, fue 94 °C por 4 min, seguido de 25 ciclos de 94 °C por 30 seg, 69 °C por 30 seg y 72 °C por 1 min 30 seg y finalmente una extensión de 72 °C por 3 min. Se obtuvieron varios productos de PCR, que fueron clonados en el vector pGEM-T y enviados a secuenciar a Macrogen Inc. (Seul, Korea).

**Tabla 1.** Partidores empleados para la obtención de la secuencia completa de los transcritos de los genes que codifican para MADS-box

Gen	Secuencia	TM
<i>PrMADS10</i>	RACE 5'-GGCTGCGAAGATAACCCTAGATGCAAG-3'	69,4
	RACE 3'-CAGATCTCCGTCGGCAGTTAAAGGAAC-5'	69,6
<i>PrMADS11</i>	RACE 5'-CGGACGCGAGTTAACCCCTATTTCAAG-3'	68,3
	RACE 3'-GGACAGCCGAATCTTGAGCCTGAAA-5'	69,1

Las dos secuencias de ESTs seleccionadas fueron nombradas *PrMADS10* y *PrMADS11*

## 2.7 Clonamiento de la secuencia de largo completo de los genes *PrMADS10* y *PrMADS11*

Una vez obtenido el resultado de la secuenciación, se procedió a diseñar partidores específicos para amplificar el largo completo de los genes *PrMADS10* y *PrMADS11* con sus respectivos sitios de restricción *Bam*HI/*Sac*I y *Sba*I/*Sac*I respectivamente (Tabla 2 y 3). Los fragmentos génicos amplificados mediante PCR, fueron ligados al vector de clonamiento pGEM®-T Easy, siguiendo los procedimientos recomendados por el fabricante. La mezcla de ligación fue utilizada para transformar células *E. coli* DH5 $\alpha$  quimio-competentes. La selección de células transformadas se realizó por cultivo de la mezcla de transformación, sobre medio sólido LB, suplementado con 25  $\mu$ g/mL ampicilina, 0,5 mM/ml IPTG y 80  $\mu$ g/mL XGal, colocadas en una estufa a 37 °C.

**Tabla 2.** Partidores empleados para amplificar los marcos de lectura abiertos sin codón stop, y con sitios de restricción

Gen	Secuencia	TM
<i>PrMADS10</i>	Fw: 5'-GGATCCATGGCCGGCGAGAAAAGAA-3' ( <i>Bam</i> HI)	57
	Fv: 5'-GAGCTCAATCTTTGATTCGGACGAC-3' ( <i>Sac</i> I)	
<i>PrMADS11</i>	Fw: 5'-TCTAGAATGGCCCGCGAGAAAATAGAAAT-3' ( <i>Xba</i> I)	58
	Fv: 5'-GAGCTCATATGGTGGAGGAGATATTAATT-3' ( <i>Sac</i> I)	

Para screening de ADNc y clonamiento en vector de expresión pYES2.1/V5-His-TOPO

**Tabla 3.** Partidores empleados para amplificar los marcos de lectura abiertos completos, y con sitios de restricción

Gen	Secuencia	TM
<i>PrMADS10</i>	Fw: 5'-GGATCCATGGCCGGCGAGAAAAGAA-3' ( <i>Bam</i> HI)	57
	Fv: 5'-GAGCTCTCAATATGGTGGAGGAGATATTA-3' ( <i>Sac</i> I)	
<i>PrMADS11</i>	Fw: 5'-TCTAGAATGGCCCGCGAGAAAATAGAAAT-3' ( <i>Xba</i> I)	58
	Fv: 5'-GAGCTCTTAATATGGTGGAGGAGATATTA -3' ( <i>Sac</i> I)	

Para screening de ADNc y clonamiento en vector pBII21

Los sistemas de selección y reporte de transformación, provistos por el plásmido pGEM®-T en células *E. coli DH5α*, permiten discriminar entre células transformadas con vector autoligado (colonias azules) y colonias transformadas con el inserto ligado al vector (colonias blancas). Se colectó colonias blancas, las que fueron individualmente cultivadas para su desarrollo, en 5 ml de medio líquido LB suplementado con 25 µg/mL de ampicilina. El cultivo fue mantenido con agitación constante por 16 horas.

El cultivo obtenido fue centrifugado y el residuo fue procesado para extraer su DNA plasmidial, utilizando el producto comercial QIAprep Spin Miniprep Kit. El DNA aislado fue visualizado en gel de agarosa al 1%.

Los insertos contenidos en los plásmidos fueron secuenciados en ambos sentidos de la hebra de ADN. Las secuencias obtenidas fueron ensambladas utilizando el módulo Contig del software Genious 4.6.1. Para identificar y remover los segmentos de secuencias pertenecientes al vector, se utilizó el sistema VecScreen provisto en la página Web de National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>). Con las secuencias así procesadas, se realizó un Blastn en NCBI, obteniendo su identidad por homología a secuencias preexistentes en bases de datos genéticas.

Los fragmentos génicos amplificados mediante PCR, también fueron clonados en el vector de expresión pYES2.1/V5-His-TOPO y en el vector binario pBI121. La mezcla de ligación fue utilizada para transformar células *E. coli DH5α* quimio-competentes. La selección de células transformadas para el vector pYES2.1/V5-His-TOPO se la realizó por cultivo de la mezcla de transformación, sobre medio sólido LB, suplementado 25 µg/mL ampicilina a 37 °C. Para el vector binario pBI121, éste se hizo mediante medio sólido LB suplementado con los antibióticos con 100 µg/mL rifampicina, 25 µg/mL gentamicina y 50 µg/mL kanamicina. Las colonias transformadas positivamente fueron analizadas mediante PCR, digestión enzimática, y confirmadas mediante secuenciación.

## 2.8 Análisis bioinformáticos

La predicción de ambas secuencias de aminoácidos se realizó mediante la herramienta de traducción disponible en ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>). Ambas secuencias fueron comparadas contra la base de datos no redundante NCBI del organismo Viridiplantae mediante BLAST (blastn), obteniendo su identidad por homología a secuencias preexistentes en bases de datos genéticas, por PROSITE (<http://prosite.expasy.org>) para la búsqueda de dominios proteicos, familias y sitios funcionales. La masa molecular de las proteínas fue predicha mediante la herramienta bioinformática TagIdent, disponible en internet.

El alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas fue desarrollado usando el método ClustalW con el programa Bioedit Sequence Alignment Editor V7.0. El análisis filogenético fue realizado con el resultado de ClustalW, usando el programa MEGA 4 a través del método Bootstrap N-J Tree (con 5000 bootstrap trials) (Tamura *et al.*, 2007).

## 2.9 Análisis del perfil de expresión de los factores de transcripción en *P. radiata*

De las secuencias que codifican para los factores de transcripción en estudio, se diseñaron partidores específicos de las regiones UTR utilizando el programa Primer premier 3.0 disponible online. Posteriormente se realizaron los respectivos qPCR para determinar la expresión relativa a diferentes tiempos de generada la respuesta gravitrópica, tanto de la parte superior como inferior del tallo de pino (Tabla 4). Las reacciones de qPCR y la cuantificación fueron realizadas en el equipo Mx3000P PCR detection system (Stratagene, USA) siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante. Triplicados de ADNc fueron usados para minimizar el error experimental. El error estándar y el promedio del análisis de expresión de las tres replicas biológicas de cada muestra fueron comparados mediante análisis de varianza (ANOVA) y se utilizó la prueba t-student, estableciendo diferencias significativas a (\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001). Para todos los análisis y figuras se utilizó el software GraphPad Prism 5.

## 2.10 Expresión de la proteína recombinante PrMADS10 y PrMADS11

### 2.10.1 Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

Se utilizaron dos medios de cultivo: el medio YPD (extracto de levadura 1% p/v, peptona 2% p/v, glucosa 2% p/v). Para obtener medio semisólido se adicionó agar bacteriológico al 1,5% p/v. El medio YMM (base nitrogenada de levadura 0,17% p/v, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5% p/v, glucosa 2% p/v, mezcla de aminoácidos 1 al 0,7% p/v, mezcla de aminoácidos 2 al 0,4% p/v; detalles de las composiciones de estas soluciones se pueden ver en anexo 1). Para medio sólido se adicionó agar bacteriológico al 1,5% p/v. Se dispuso de estufas e incubadoras con agitación a 28°C para los cultivos semisólidos y líquidos, respectivamente. La cepa utilizada fue INVSc-1, es una cepa diploide de crecimiento rápido ideal para la expresión. INVSc-1 tiene el siguiente genotipo: *MATa his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52 MAT his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52*.

### 2.10.2 Transformación por electroporación de *S. cerevisiae*

Se mezcló una alícuota de células electrocompetentes con 100 ng del vector pYES2.1 solubilizado en 0,1 – 5 µL de agua nanopura desionizada. Esta mezcla se agregó a la cubeta de electroporación de 2 mm de paso y se incubó por 4 minutos en hielo. La electroporación se llevó a cabo en el equipo Gene Pulser Xcell Electroporation System (BIORAD®), en donde se configuró a 1,5 kV, 25 µF y 200 Ω, y por un tiempo de 4,5 – 5 ms se dio un pulso (Becker y Guarante, 1991). Con el objeto de permitir la recuperación de las células se agregó 1 mL de medio YPD, traspasándose el contenido de la cubeta a un tubo Eppendorf, incubándose por 1 h con agitación a 28°C. Después de esto, el tubo se centrifugó a 3.000 rpm por 4 min y se lavó con medio YMM. Se tomaron 100 µL y se sembraron en una placa con YMM. Los 900 µL restantes se sedimentaron y se suspendieron en un volumen mínimo para ser también sembrados, las placas fueron colocadas en estufa a 28°C. Luego se analizó las colonias que hayan aparecido, correspondientes a una célula que adquirió, por el vector, la propiedad de vivir en un medio auxotrófico.

### **2.10.3 Producción y purificación de proteína recombinante en *S. cerevisiae***

La producción y purificación de proteínas se realizó de acuerdo a NATURE METHODS (2008). Al largo completo de las secuencias codificantes de *PrMADS10* y *PrMADS11*, se les agregó los sitios de restricción *BamHI/SacI* y *SbaI/SacI* respectivamente, los sitios de restricción fueron agregados mediante PCR. Luego el producto de amplificación fue clonado en el vector de expresión pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen). La cepa INVSc-1 de *S. cerevisiae* fue usada para la expresión de la proteína recombinante. El crecimiento de la levadura y la inducción de la proteína fueron realizadas de acuerdo a lo descrito por el fabricante (Novagen). La proteína recombinante fue purificada por cromatografía de afinidad en una columna Ni-NTA (Qiagen) bajo condiciones denaturantes. Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), y para visualizarlas se usó tinción con azul de Coomassie. También, se determinó la eficiencia en la producción de la proteína recombinante. Para ello se realizó la inducción a diferentes tiempos (12, 24, 36 y 48 horas).

### **2.10.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida**

Se utilizó electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) para separar las proteínas y realizar la inmunodetección de *PrMADS10* y *PrMADS11* recombinante. Se utilizó una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN® Tetra Cell con módulo Mini Trans-Blot®, BioRad. La solución del gel separador consistió de 12,5% acrilamida-bisacrilamida 40:1, en un tampón 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 y 1,6 % SDS. La polimerización se inició con la adición de 0,03% de persulfato de amonio y 0,18% de TEMED. El gel espaciador contenía 6% de acrilamida-bisacrilamida 40:1, en un tampón 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 y 0,6% SDS. Los agentes polimerizantes se añadieron en la misma proporción utilizada para el gel separador.

Las muestras analizadas fueron mezcladas con 1/2 volumen de tampón Laemmli 2X (125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4,6 % SDS; 20 % glicerol; 10 %  $\beta$ -mercaptoetanol y 0,1 % azul de bromofenol). La mezcla resultante fue hervida en baño térmico por 5 minutos antes de ser aplicada al gel. El tampón de electroforesis contiene 25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 192 mM glicina y 0,1% SDS. La electroforesis fue conducida a 50 mA hasta que el frente de migración alcanzó el borde inferior del gel.

La visualización de la migración electroforética se realizó sumergiendo el gel en una solución de fijado-desteñido (30% etanol; 10% ácido acético) durante 30 minutos. Luego, el gel fue teñido durante 1 hora, con una solución que contenía 0,3% azul brillante de coomassie R-250, 50% metanol y 10% ácido acético. El gel fue posteriormente desteñido utilizando la solución de fijado-desteñido anterior, revelando la presencia de bandas proteicas. En cada corrida electroforética se aplicó una mezcla de proteínas de peso molecular conocido y se estimó el peso molecular aparente de las proteínas de interés.

### **2.10.5 Ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSAs)**

A la empresa Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT). 8180 N. McCormick Blvd. Skokie, Illinois 60076. USA, se enviaron a sintetizar varios elementos de respuesta tipo CA<sub>r</sub>G, con sus respectivas secuencias mutadas, para usarlas como control. Al elemento de DNA se le agregó un ribonucleótido biotinilado. Cada ensayo de unión contenía 0,6  $\mu$ g de proteína purificada, de acuerdo al protocolo establecido por Sablowski *et al.* (1994). Cada reacción que contenía la proteína purificada con su respectivo elemento de respuesta fue incubada por 30 minutos, y luego cargada en gel nativo 6% w/v poliacrilamida y sometido a electroforesis por 90 minutos a 100V. Después de la electroforesis, el gel fue transferido a una membrana de nylon, para luego ser expuesta a luz UV para su fijación. Por último se realizó la detección con reactivo quimioluminiscente no radioactivo.

## **2.11 Transformación estable de *Arabidopsis thaliana***

### **2.11.1 Generación de construcciones genéticas para la transformación estable**

La región codificante de los genes *PrMADS10* y *PrMADS11* fue amplificada desde cDNA obtenido de tallo de *P. radiata* inducidos a respuesta gravitrópica, utilizando partidores específicos con los sitios de restricción para su clonamiento en el vector. Una vez secuenciados, los genes fueron liberados desde el vector pGEM-T por digestión enzimática e insertados en orientación sentido en los sitios *Bam*HI y *Sac*I de vector binario pBI121 (ver anexo 2). De esta forma el gen quedó bajo el control del promotor CaMV 35S, la construcción obtenida se denominó 35S::*PrMADS10*. La construcción final fue analizada por digestión enzimática (*Bam*HI y *Sac*I) y mediante secuenciación para confirmar su correcta secuencia. De igual forma, el vector pBI121 fue digerido por las enzimas *Xba*I y *Sac*I para reemplazar al gen de la  $\beta$ -glucoronidasa (GUS), para obtener la construcción denominada 35S::*PrMADS11* (ver anexo 3).

### **2.11.2 Obtención de plantas transgénicas de *A. thaliana***

El vector binario con las construcciones 35S::*PrMADS10* y 35S::*PrMADS11*, fue introducido mediante electroporación en cepas de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Las bacterias transformadas fueron cultivadas y seleccionadas en medio YM semisólido (0.04% p/v de extracto de levadura, 1% p/v manitol, 1.7 mM NaCl, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 2.2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 1.5% agar) con los siguientes antibióticos: 100 µg/mL rifampicina, 25 µg/mL gentamicina y 50 µg/mL kanamicina. Luego de 48 horas de incubación a 28 °C varias colonias fueron chequeadas mediante PCR para determinar si. Habían sido transformadas positivamente. Se usaron partidores específicos del vector pBI121 y de las secuencias específicas de *PrMADS*.

Las bacterias recombinantes fueron utilizadas para transformar plantas de *A. thaliana* Col-0 por medio de infección de yemas florales (“floral-dip”) siguiendo el protocolo descrito por Clough y Bent (1998) con algunas modificaciones (Logemann *et al.*, 2006).

La selección de individuos transgénicos fue realizada mediante la aplicación de antibiótico. Para ello, las semillas fueron colocadas en placas petri conteniendo medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 25 mg/L de sulfato de kanamicina. Para confirmar que las plantas de *Arabidopsis* contenían el inserto de interés se extrajo ADN genómico (ADNg), para luego, con los partidores de largo completo realizar PCR convencional a cada línea transgénica generada. Además, se determinó que estas plantas produjeron los transcritos *PrMADS* realizando análisis del cDNA mediante PCR y qPCR. Se obtuvieron varias líneas homocigotas independientes para cada construcción que sobreexpresaban el factor de transcripción, y una línea homocigota transformada con el vector vacío (control).

### 2.11.3 Cultivo de *A. thaliana*

Para el cultivo de plantas de *A. thaliana* del ecotipo Columbia-0 (Col-0) y líneas transgénicas, se empleó sustrato compuesto por vermiculita, perlita y turba (1:1:1), medio hidropónico y medio de cultivo semisólido propuesto por Murashige-Skoog (MS). Se utilizó *A. thaliana* (Col-0) porque el método de inmersión floral funciona bien en este ecotipo (Zhang *et al.*, 2006).

Plantas de *Arabidopsis* fueron cultivadas bajo las mismas condiciones medioambientales controladas que pino.

La solución del medio hidropónico fue preparada a 100X, cuya composición fue la siguiente: KNO<sub>3</sub> 125 mM, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 150 mM, MgSO<sub>4</sub> 75 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, KCl 5 mM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 5 mM, MnSO<sub>4</sub> 1 mM, ZnSO<sub>4</sub> 200 μM, CuSO<sub>4</sub> 150 μM, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 7,5 μM, Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 10 mM y Sprint 330 7,7 mM (Fe quelado en ácido dietilentriaminopenta acético), el pH fue ajustado a 5. Para obtener una solución 1x se diluyó en agua corriente. Para el crecimiento de las plantas y cosecha de semillas se utilizó Arasystem, diseñado especialmente para *A. thaliana*. Las semillas germinadas fueron colocadas en vasos conteniendo lana de roca y embebida en medio hidropónico. Una vez sembradas, a los vasos se les colocó un soporte y fueron

cubiertas con una película plástica en la parte superior, manteniéndose así, hasta que todas las plantas presentaran roseta vegetativa, tras lo cual se procedió a retirar la película plástica. Las plantas fueron mantenidas en este medio hasta que comenzaron a secarse, momento en el cual se dejó de suministrarles el medio, con el fin de recolectar semillas

El medio MS semisólido contenía: MS 0,216% p/v, MES 0,05% p/v, sacarosa 1% p/v, pH 5,7 y fitoagar 0,8% p/v. Las placas fueron puestas de manera horizontal para el caso de los ensayos de germinación (por 7 días) y de manera vertical para los ensayos de largo de raíz (por 10 días) y biomasa (por 21 días), en condiciones de temperatura constante a 22°C, fotoperiodo de 16/8 (h luz/oscuridad) y luminosidad de 4.000 lux.

### **2.11.3 Extracción de ARN total de *A. thaliana***

El método de extracción de ARN total de tallo de Arabidopsis transgénico es el mismo que se utilizó para pino, (observar en este mismo apartado (2.3)).

### **2.11.4 Síntesis de ADNc de *A. thaliana***

Los templados de ADNc fueron sintetizados usando 1,0 µg de ARN total tratado con DNAsa usando el sistema comercial “kit First strand cDNA Synthesis de Thermo Scientific” de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El producto de la reacción de RT de una hebra fue diluido 10 veces y 2,0 µL fueron usados para cada reacción de qPCR.

## **2.12 Análisis del perfil de expresión de genes en plantas transgénicas de Arabidopsis**

### **2.12.1 Análisis de Microarreglos**

cRNA biotinilado fué sintetizado a partir de 5 µg de RNA total de tallos de Arabidopsis de tres meses, utilizando el kit IVT de Affymetrix de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El cRNA fue usado para hibridar microarreglos de expresión de ATH1 GeneChip. Los datos de Affymetrix se normalizaron en R (Gautier *et al.*, 2004) usando RMA (Irizarry *et al.*, 2003) con bioconductor. Los genes con al menos una tasa de cambio

de 2 veces fueron considerados diferencialmente expresados mediante t-test y p-value <0,05. K-means clustering de Expander 7.11 (<http://acgt.cs.tau.ac.il/expander/>) se utilizó para analizar los datos de los microarreglos.

Se utilizó el software MapMan (versión 3.6.0RC) (Thimm *et al.*, 2004; Usadel *et al.*, 2005) para visualizar datos de expresión génica en el contexto de una visión general metabólica. MapMan utiliza una ontología específica de la planta que clasifica los genes en categorías jerárquicas bien definidas, denominadas BINs y subBINs (Teixeira *et al.*, 2014). El diagrama muestra genes regulados positiva y negativamente en rojo y azul, respectivamente. El conjunto de datos obtenidos del análisis de microarrays (AraGene-1\_0-ST) se comparó con Ath\_AGI\_TAIR9\_Jan2010 integrado en MapMan de TAIR.

### 2.12.2 Análisis de genes de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides

Para realizar este ensayo se sintetizaron partidores específicos de genes que codifican para enzimas de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides en Arabidopsis (Tabla 4).

**Tabla 4.** Partidores empleados en los ensayos de qPCR

Accesión	Gen	Primer forward	Primer reverse
KM887510	<i>PrMADS10</i>	CATAAGTCGCCCATGAAGG	GATCACGGAAGACGACGATT
KM887511	<i>PrMADS11</i>	AACGACGGACAGCCGAATCT-3'	GTCTCTCGCCATGCATATTT
AT5G18380	<i>AtS16</i>	GGCGACTCAACCAGCTACTGA	GTCCATAGCTGCGCATATCTC
AT5G15710	<i>AtF-box</i>	TTTCGGCTGAGAGGTTTCGAGT-3'	GATCCAAGACGTAAGCAGATCAA
AT4G05320	<i>AtUbiquitin10</i>	GGCCTTGTATAATCCCTGATGAATAAG	AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAGT
AT2G37040.1	<i>AtPAL1</i>	AAGTCCTATCTTCTTTCTTTCTTTT	CTTGTGTGCCCGTTAATCT
AT3G51240.2	<i>AtF3H</i>	TAGGCTCGGTGTGTTTTGTG	AAACCCAACGCGTCAAATAC
AT5G13930.1	<i>AtCHS</i>	CTTGCCTTCTATCTGCCTACCTAC	TCCAGCACATATCACATATCACATC
AT5G08640.2	<i>AtFLS1</i>	AACAACCAGCGATACAACA	CCCATTCTTCACTCGCTTC
AT5G63590.1	<i>AtFLS3</i>	GGCGAAGATGGATAAGGAGAAGAC	GACATAAGGGTTAAACTTGGGAACG
AT5G42800.1	<i>AtDFR</i>	TTGTTTCGTGCCACCGTTCG	TCCTTCCTCAGATAAATCAGCCTTC
AT4G22880.1	<i>AtLDOX</i>	ACTTCTTTCATCTTGCGTATCCTG	TCGTTGCTTCTATGTAATCACTTGG
AT5G54160.1	<i>AtCOMT1</i>	AGTGACGAACATTGCGTGAA	TGTTTGGTTGAGAGGCTTGA
AT1G15950.1	<i>AtCCR1</i>	CCATTGAAGTTGCTTTTGTGTTG	TGGCCAAAGAACTGAGTGT
AT1G72680.1	<i>AtCAD1</i>	TGTGCTGGAATCACGGTTTA	AACTTAACCGCCATGTGTCC
AT4G26220.1	<i>AtCCoAOMT</i>	CTATCTGCCGTCGGATCAGT	TGGTGAATGCGATTGAAA

El cDNA y los partidores específicos fueron alicuotados en SYBR Green PCR máster mix. Las reacciones de PCR cuantitativo (qPCR) se llevaron a cabo utilizando el equipo Mx3000P (Stratagene®) y el sistema Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green

q PCR Master Mix (Agilent Technologies®), siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante. Se utilizaron tres replicas técnicas para cada gen en estudio, comparados con sus respectivos controles. Como controles se usó cDNA de plantas de Arabidopsis sin transformar y plantas transformadas con el vector pBI121 vacío. La expresión relativa se normalizó usando tres genes de referencia de expresión estable, *F-box*, *UBQ10* (Remans *et al.*, 2008) y *S16* (Kim *et al.*, 2006).

### **2.13 Análisis histoquímico en Arabidopsis**

Se realizaron cortes transversales del tallo de arabidopsis mediante criostato. Se obtuvieron laminas de aproximadamente 30 µm, para realizar pruebas histoquímicas de lignificación. Las laminas fueron teñidas con 1% floroglucinol (w/v) in 6M HCL, montadas en 3M HCL/50% glicerol, y después de ser observarlas por microscopia fueron fotografiadas digitalmente. Se usaron plantas sin transformar como control.

### **2.14 Determinación del contenido de lignina en plantas transgénicas de Arabidopsis**

La lignina fue extraída de acuerdo a lo descrito por Campbell y Ellis (1992). Los resultados fueron expresados en µg de lignina por gramo de peso fresco (FW). Este ensayo consiste en tres pasos, que se los detalla a continuación:

**Preparación de la pared celular.** Se pesó 250 mg de tejido fresco y se le agregó 1,5 ml de buffer fosfato (pH7,2) y se sonicó 3 minutos. Se incubó a 40°C por 3 minutos y se centrifugó a 13.200 rpm por 10 min. Se descartó el sobrenadante y añadió 1,5 ml de etanol al 80% y se sonicó por 3 min. Se incubó a 80°C por 10 min, luego se centrifugó a 13.200 rpm por 5 min. Nuevamente se descartó el sobrenadante y se añadió 1,5 ml de etanol al 80% y se sonicó por 3 min. Se volvió a incubar a 80°C por 10 min, luego se centrifugó a 13.200 rpm por 5 min. Se añadió 1.5 ml de acetona, y sonicó por 3 min, se centrifugó a 13.200 rpm por 10 min y descartó el sobrenadante.

**Hidrólisis.** Para realizar este proceso se añadió 950 ul de 1M NaOH, y se dejó a

temperatura ambiente durante 16 h, luego se añadió 950  $\mu$ l de 1M HCl, y centrifugó a 13.200 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante. Se añadió 1 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril (sdH<sub>2</sub>O), y sonicó por 3 min, se centrifugó a 13.200 rpm por 5 min (se lavó dos veces).

**Ensayo TGA.** En este proceso se añadió 750  $\mu$ l de sdH<sub>2</sub>O, 250  $\mu$ l de HCl al 37%, y 100  $\mu$ l ácido tioglicólico (Mercaptoessigsäure, thioglykolsäur, Aldrich) en los pellets, y se incubó a 80°C por 3 horas. Después se centrifugó 13.200 rpm por 10 min, y se descargó el sobrenadante en contenedor de residuos. Se añadió 1 ml de sdH<sub>2</sub>O y sonicó por 3 min, se centrifugó a 13.200 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante. Se añadió 1 ml de 1M NaOH, y se dejó a temperatura ambiente por 16 horas con agitación leve (150 rpm). Se centrifugó a 13.200 rpm por 5 min, y el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo, se añadió 200  $\mu$ l de HCl concentrado (37%) en cada tubo. Se vorteseó por 5 seg e incubó a 4°C por 4 h, luego se centrifugó a 13.200 rpm a 4°C por 10 min y se descartó el sobrenadante. Por último se disolvieron los pellets en 1 ml de 1M NaOH, y se midió la absorbancia de las muestras a 280 nm.

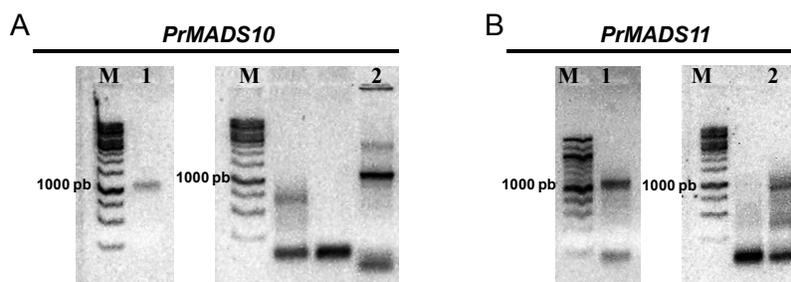
### **III. RESULTADOS**

### 3.1 Caracterización de dos secuencias de factores de transcripción tipo MADS-box de *P. radiata*

#### 3.1.1 Obtención de secuencias de largo completo de *PrMADS10* y *PrMADS11*

Se obtuvieron las secuencias de largo completo para dos genes PrMADS-box. Una de las secuencias denominada originalmente *PrMADBT* fue nombrada *PrMADS10*, dado que es la décima secuencia tipo MADS, descrita para el género y corresponde a una secuencia de 943 pb, que contiene 111 y 250 pb de secuencias 5'-y 3'- UTR, respectivamente (Fig. 5A). *PrMADS10* tiene un marco de lectura abierto (ORF) de 582 pb y una secuencia polipeptídica deducida de 193 aa. La proteína deducida PrMADS10 corresponde a un polipéptido con 22 kDa (pI 9.42). El número de acceso GenBank es KM887510.

A su vez, la secuencia denominada *PrMADBJ* fue finalmente nombrada *PrMADS11*, corresponde a una secuencia de 871 pb y contiene 103 y 270 pb de secuencias 5'-y 3'- UTR, respectivamente. *PrMADS11* tiene un marco de lectura abierto (ORF) de 495 pb y su secuencia polipeptídica deducida de 165 aa. La proteína deducida PrMADS11 corresponde a polipéptido con 19 kDa (pI 6,01). El número de acceso GenBank es KM887511 (Fig. 5B).

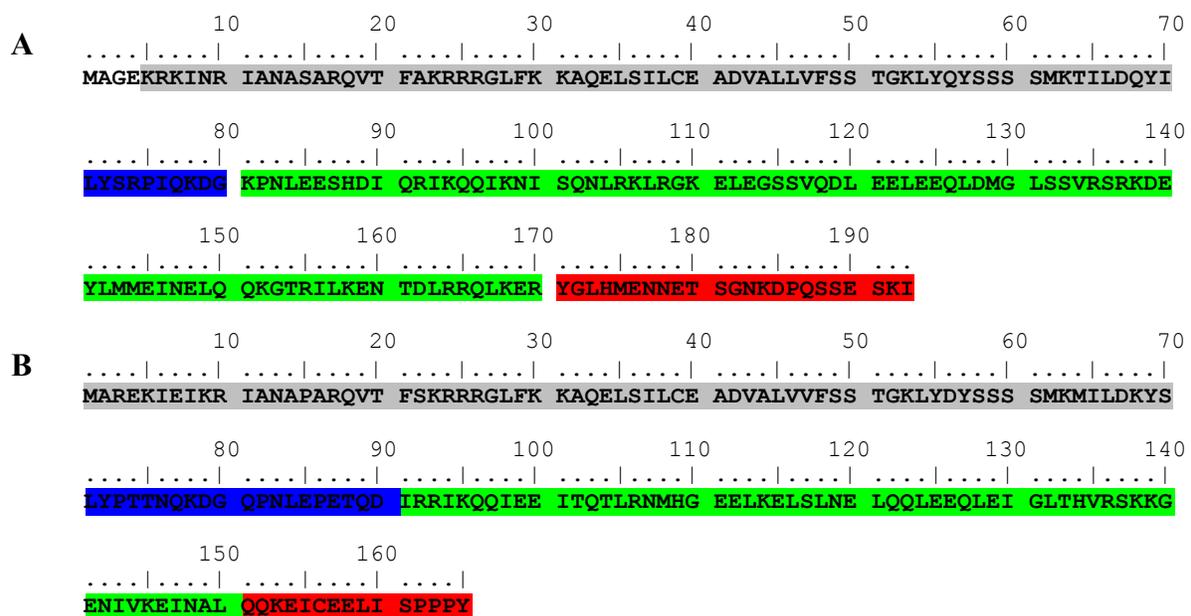


**Figura 5.** Gel de agarosa para amplicones obtenidos por RACE. *PrMADS10* (A) y *PrMADS11* (B). M: Marcador de peso molecular 1Kb. 1: amplificación 5' y 2: amplificación 3'.

Las dos secuencias nucleotídicas del largo completo obtenidas presentaron un alto porcentaje de identidad con genes que codifican para factores de transcripción del tipo MADS-box.

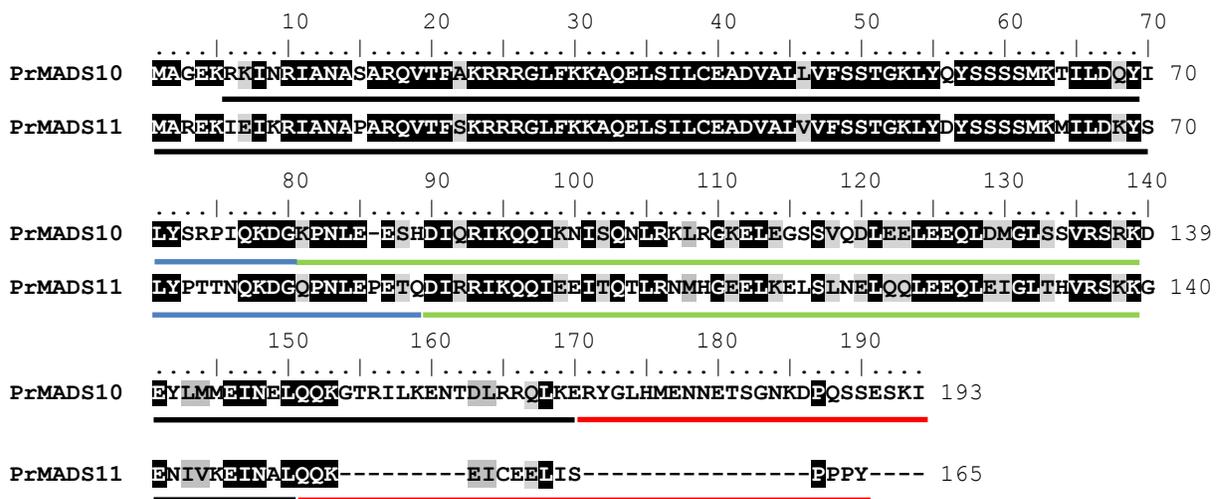
Así, PrMADS10 presentó identidad con secuencias de otras especies como *Picea sitchensis* (83%) (número de accesión GenBank EF677316) y *Picea abies* (82%) (número de accesión GenBank EU332978). Por otro lado, PrMADS11 presentó un alto porcentaje de identidad con genes de especies como *Pinus tabuliformis* (96%) (número de accesión GenBank KJ711078), *Picea sitchensis* (87%) (número de accesión GenBank EF677402) y *Picea glauca* (86%) (número de accesión GenBank BT105463).

De la secuencia de nucleótidos, se obtuvo la secuencia aminoacídica para cada factor de transcripción. Los resultados obtenidos muestran que ambas secuencias, PrMADS10 y PrMADS11 contienen dominios conservados típicos de MADS-box, correspondiente a los motivos MADS y Kbox, indicando que estas estructuras están presentes en proteínas tipo MIKC (MADS-box, Interferente, K-box, C-terminal). Al analizar el número de aminoácidos del dominio MADS-box mediante Blastp para PrMADS10 se observaron 66 aminoácidos (Fig. 6A) y para PrMADS11 se observaron 70 aminoácidos (Fig. 6B). El dominio K-box muestra 90 aminoácidos para PrMADS10 y 66 aminoácidos para PrMADS11.



**Figura 6. Secuencia aminoacídica del largo completo obtenida para PrMADS10 (A) y PrMADS11 (B).** En gris se muestra el dominio MADS, en azul se indica el dominio Intermitente, en verde el dominio K-box y con rojo se indica el C-terminal.

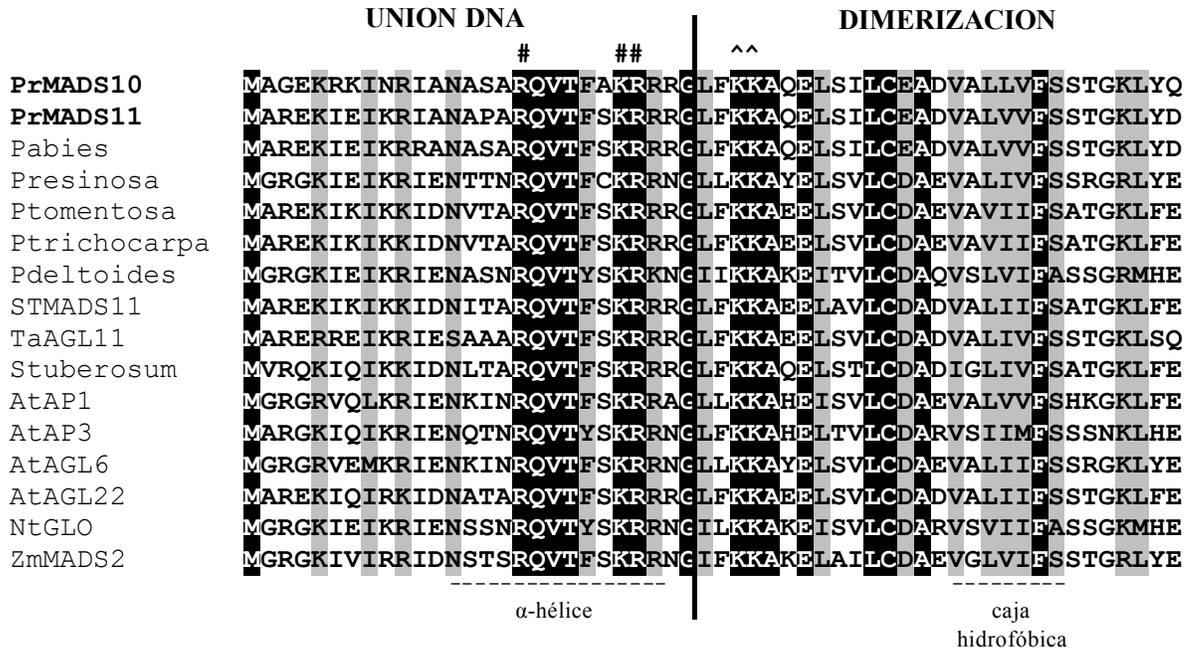
El alineamiento múltiple entre las secuencias totales de PrMADS10 y PrMADS11 determinó que ambas secuencias presentan un 69% de identidad, lo que indica que existe divergencia entre ellas. Esta divergencia se observa en el dominio K-box y aumenta en el C-terminal, debido a que la secuencia de PrMADS11 es más corta y tiene 28 aminoácidos menos que PrMADS10. Pero al analizar el dominio MADS-box entre ambas secuencias se observó que se encuentra altamente conservado en las dos secuencias estudiadas (Fig. 7).



**Figura 7. Alineamiento múltiple de secuencias aminocídicas de PrMADS10 y PrMADS11.** Gaps se indican mediante guiones, letras con negro son aminoácidos idénticos, letras con gris son aminoácidos similares. Región con líneas negras indica el dominio MADS-box, región con línea azul indica el dominio Intermitente, región con línea verde indica el dominio K-box, y la región con línea roja indica C-terminal.

También se realizó un alineamiento múltiple del motivo conservado MADS de PrMADS10 y PrMADS11 con otras proteínas de diferentes especies vegetales (pino, Populus, trigo, café, papa, Arabidopsis, tabaco y maíz), donde se observó que ambas secuencias presentan un alto nivel de conservación aminoacídica con otros MADS-box de todas las especies analizadas. Los aminoácidos conservados en todas las especies vegetales analizadas son: metionina, arginina, glutamina, valina, treonina, lisina, alanina, glutámico, leucina, cisteina y fenilalanina. También, se observó un potencial sitio de fosforilación de la proteína dependiente de calmodulina quinasas (QVTFS). Por otro lado, se encontró un alto grado de similitud entre los residuos que forman parte del

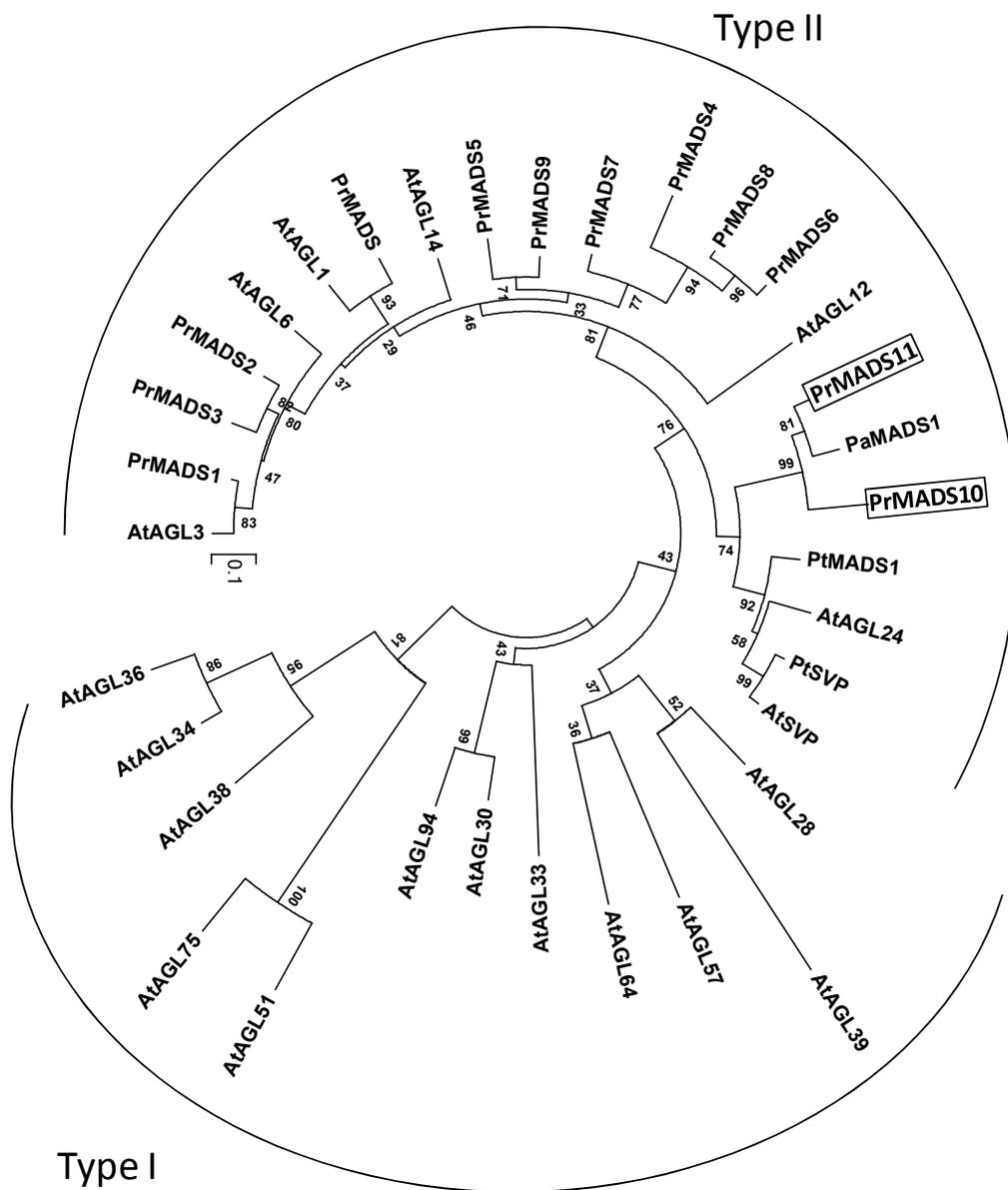
dominio que participa en la interacción proteína ADN, y aquellos residuos que estarían encargados de formar dímeros de proteínas (Fig. 8).



**Figura 8. Alineamiento de secuencias del motivo MADS-box.** El motivo MADS-box comprende 56 aminoácidos ubicados generalmente en el extremo N-terminal de las secuencias. Aminoácidos idénticos que son conservados entre todos los miembros de las familias están sombreados con negro, aminoácidos similares se muestran en gris. Aminoácidos básicos que juegan un rol crítico en unión a DNA por SRF son indicados con (#) (Shore y Sharrocks, 1995). Una caja hidrofóbica hexamerica conservada se indica en líneas continuas. La localización del posible DNA-binding  $\alpha$ -hélice también es indicado. Dos residuos de lisinas conservadas en SRF son indicadas (^) (Sharrocks *et al.*, 1993). Secuencias corresponden a los siguientes números de acceso de Genbank: Pabies (*P. abies*, ACA04880), Presinosa (*P. resinosa*, AAD01266), Ptomentosa (*P. tomentosa*, AAR92206), Ptrichocarpa (*P. trichocarpa*, XP\_002301093), Pdeltoides (*P. deltoides*, EU029172), TaAGL11 (*T. aestivum*, ABF57916), STMADS11 (*C. arabica*, ADU56833), Stuberosum (*S. tuberosum*, AAB94006), AtAP1 (*A. thaliana*, CAA78909), AtAP3 (*A. thaliana*, BAA04665), AtAGL6 (*A. thaliana*, NP\_182089), AtAGL22 (*A. thaliana*, AEC07320), NtGLO (*N. tabacum*, Q03416) y ZmMADS2 (*Z. mays*, AAG09919).

### 3.1.2 Análisis filogenético de PrMADS10 y PrMADS11

El análisis filogenético mostró una distribución de las secuencias agrupadas en dos clados principales. Las proteínas PrMADS10 y PrMADS11 fueron agrupadas en el mismo subclado correspondiente al clado II, que presentan una estructura tipo MIKC (Fig. 9).

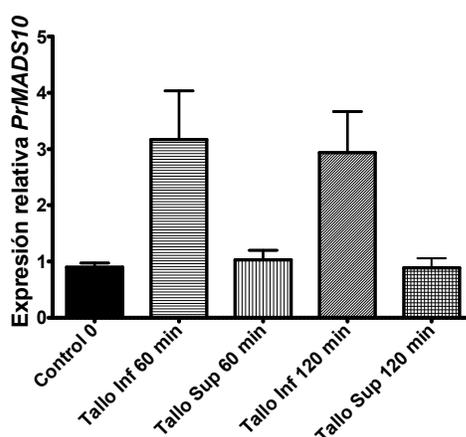


**Figura 9. Análisis filogenético del largo completo de las proteínas predichas de PrMADS10 y PrMADS11 y otras proteínas de factores de transcripción MADS-box.** El número en cada nodo del árbol indica el número de veces que el grupo de proteínas fueron agrupadas juntas, con un número de replicas de 1.000 veces. Secuencias corresponden a los siguientes números de accesoión de Genbank: PaMADS1 (*P. abies*, ACA04880), PtMADS1 (*P. tomentosa*, AAR92206), PtSVP (*P. trichocarpa*, XP\_002310310), PrMADS (*P. radiata*, AAD09206), PrMADS8 (*P. radiata*, AAC27353), PrMADS7 (*P. radiata*, AAB80810), PrMADS6 (*P. radiata*, AAB80809), PrMADS5 (*P. radiata*, AAB80808), PrMADS4 (*P. radiata*, AAB80807), PrMADS9 (*P. radiata*, AAB80806), PrMADS1 (*P. radiata*, AAD09207), PrMADS2 (*P. radiata*, AAB58907), PrMADS3 (*P. radiata*, AAD09342), AtSVP (*A. thaliana*, NP\_179840), AtAGL1 (*A. thaliana*, AEE79831), AtAGL3 (*A. thaliana*, NP\_564214), AtAGL6 (*A. thaliana*, NP\_182089), AtAGL12 (*A. thaliana*, AEE35216), AtAGL14 (*A. thaliana*, AEE83062), AtAGL24 (*A. thaliana*, AEE84922), AtAGL28 (*A. thaliana*, AEE27300), AtAGL30 (*A. thaliana*, AEC05661), AtAGL33 (*A. thaliana*, AEC07824), AtAGL34 (*A. thaliana*, AED93593), AtAGL36 (*A. thaliana*, AED93581), AtAGL38 (*A. thaliana*, AEE34356), AtAGL39 (*A. thaliana*, AED93653), AtAGL51 (*A. thaliana*, AEE82144), AtAGL57 (*A. thaliana*, AEE74037), AtAGL64 (*A. thaliana*, AEE31158), AtAGL75 (*A. thaliana*, AED94653) y AtAGL94 (*A. thaliana*, AEE34947).

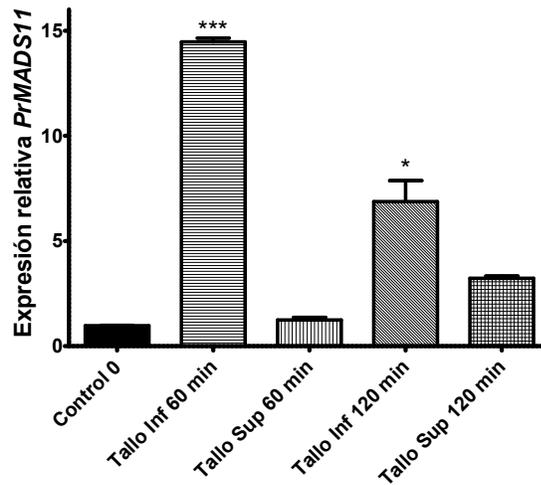
En el árbol filogenético se observa que PrMADS10 y PrMADS11 están relacionados a PaMADS1 o DAL2 correspondiente a *P. abies*. Además, las secuencias proteicas de interés, también se encuentran asociadas a un subclado que están clasificadas aquellas similares a SVP, AGL y MADS, como PtSVP (*P. trichocarpa*) y AtSVP (*A. thaliana*); AtAGL24 (*A. thaliana*); PtMADS1 (*P. tomentosa*).

### 3.2 Determinación del perfil de expresión MADS-box durante la respuesta a inclinación en *P. radiata*

Los análisis de los niveles de transcritos realizados para *PrMADS10* mostraron que la mayor acumulación (2 veces) ocurre en la parte inferior del tallo a los 60 y 120 minutos de haber realizado el ensayo de inclinación. La acumulación de los transcritos de *PrMADS10* no presentó variación en la parte superior del tallo comparado con el control (Fig. 10). De igual manera, en el perfil de expresión de *PrMADS11* se observó que la mayor acumulación de transcritos también ocurrió en la parte inferior del tallo. Esta acumulación fue 14 veces mayor a los 60 minutos de iniciada la respuesta. No se observó variación en la acumulación de los transcritos en la parte superior del tallo a los 60 minutos. Estos genes se expresaron diferencialmente en el tiempo y en la sección de tallo de pino analizado (Fig. 11).



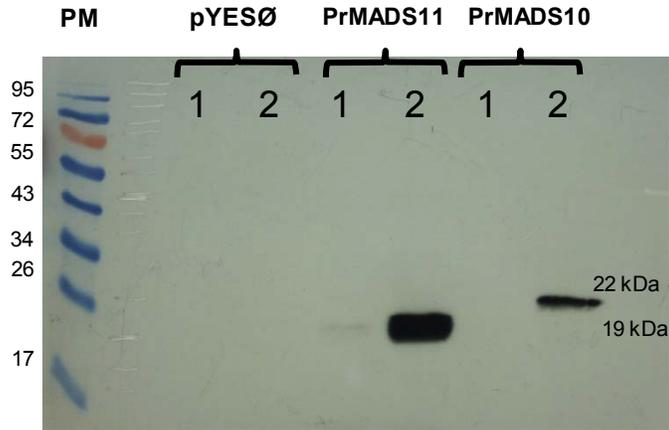
**Figura 10. Expresión relativa del gen *PrMADS10* inducida por inclinación a tiempos tempranos.** Los niveles de transcritos del gen *PrMADS10* fueron evaluados mediante qPCR a partir de cDNA sintetizado desde RNA total de tallo de pino. La expresión relativa se calculó usando el gen normalizador *Prq18S* y los valores corresponden a la media del error estándar a partir de 3 replicas biológicas.



**Figura 11. Expresión relativa del gen *PrMADS11* inducida por inclinación a tiempos tempranos.** Los niveles de transcritos del gen *PrMADS11* fueron evaluados mediante qPCR a partir de cDNA sintetizado desde RNA total de tallo de pino. La expresión relativa se calculó usando el gen normalizador *Prq18S* y los valores corresponden a la media del error estándar a partir de 3 replicas biológicas.

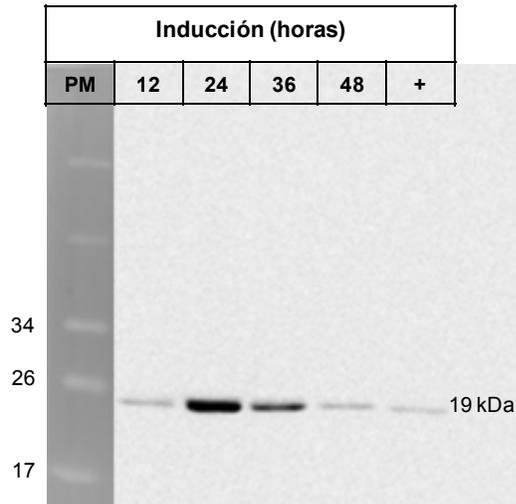
### 3.3 Evaluación de la interacción de proteínas MADS-box con elementos de respuesta de ADN

Las proteínas PrMADS10 y PrMADS11 de pino radiata fueron inducidas en el sistema heterólogo *Saccharomyces cerevisiae*. Una vez realizada la transformación, se seleccionó un clon de cada proteína. Se separaron los extractos crudos de tres clones, un clon control y los respectivos clones MADS-box (PrMADS10 y PrMADS11). En los carriles del extracto crudo del clon pYESØ no se observó proteína alguna, lo cual es esperado y muestra que no hay inducción para ninguna proteína endógena. Las bandas obtenidas en los carriles de los clones inducidos presentan una masa de 19 kDa para PrMADS11 y 22 kDa para PrMADS10 (Fig. 12). La masa molecular de las proteínas corresponde a los tamaños esperados comparándolos con el identificador de peso molecular.



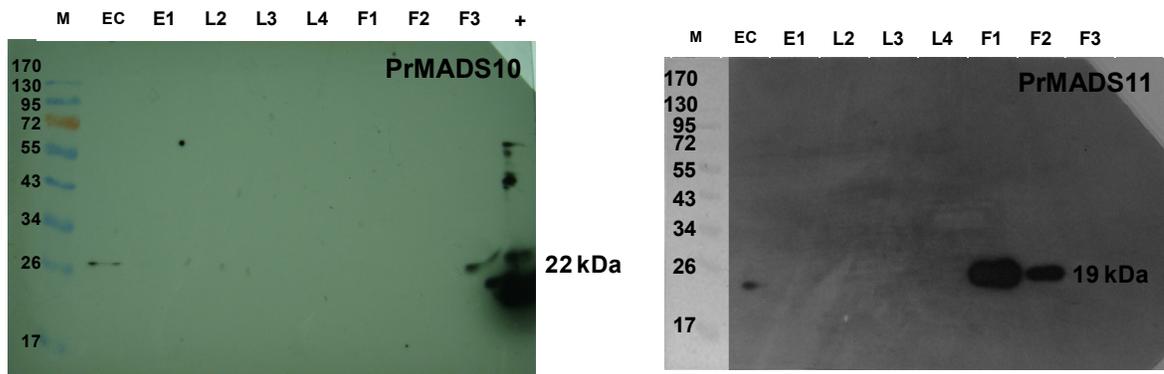
**Figura 12.** Gel SDS/PAGE y Western blot de las proteínas recombinantes PrMADS10 y PrMAS11 expresadas en *S. cerevisiae*. M, masa molecular en kDa; Carril 1, extracto crudo de proteína sin inducir; Carril 2, extracto crudo de proteínas inducidas con GAL. pYESØ se utilizó como control.

También se determinó la eficiencia en la producción de la proteína recombinante PrMADS11 que fue inducida mediante GAL a diferentes tiempos (12, 24, 36 y 48 horas). Como se observa en todas las etapas de inducción se muestra una proteína del tamaño esperado, donde su mayor abundancia ocurre a las 24 horas, tiempo en el que hay una mayor producción de proteína recombinante (Fig. 13).



**Figura 13.** Gel SDS/PAGE y Western blot de la proteína recombinante PrMADS11 inducida en *S. cerevisiae* analizada en 4 tiempos diferentes. PM, masa molecular en kDa, se indican las horas de inducción. (+) positivo, extracto crudo PrMADS11 obtenido previamente.

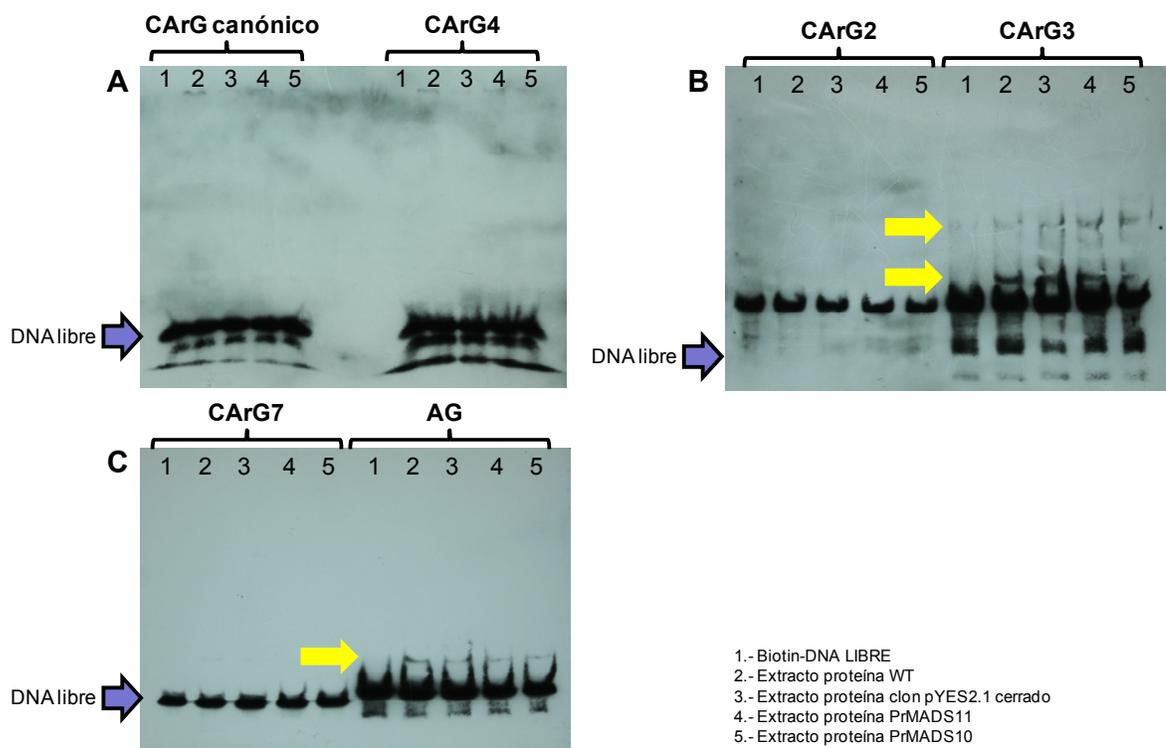
Una vez conocida la eficiencia de producción de proteína en *S. cerevisiae*, las proteínas recombinantes fueron inducidas durante 24 horas, posteriormente la proteína fue purificada. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular, en el segundo carril se separó extracto crudo (EC) de los clones inducidos PrMADS10 y PrMADS11, donde se observa una banda esperada para cada clon. El carril denominado E1 corresponde al extracto crudo separado de la proteína de interés. L2, L3, L4 corresponde a los respectivos lavados con concentraciones bajas de Imidazol. F1, F2 y F3 corresponde a las fracciones eluidas de las proteínas purificadas. Donde la proteína purificada PrMADS10 es recuperada en la fracción 3, y su señal corresponde a la misma obtenida en el EC, mientras que la proteína purificada PrMADS11 es recuperada en la fracción 1 y 2, y su señal corresponde a la misma obtenida en el EC. (Fig. 14).



**Figura 14. Gel SDS/PAGE y Western blot de las proteínas recombinantes PrMADS10 y PrMAS11 purificadas.** M, masa molecular en kDa; Carril EC, extracto crudo; Carril E1, extracto crudo sin proteínas de interés; L2, L3, L4, lavados; F1, F2, F3, elución de las proteínas de interés. (+) positivo, extracto crudo PrMADS11 obtenido previamente.

Una vez obtenidas las proteínas recombinantes purificadas para PrMADS10 y PrMADS11 se procedió a realizar los ensayos de movilidad electroforética (EMSA). Teniendo como antecedentes que los factores de transcripción MADS-box reconocen elementos de respuesta del tipo CA<sub>r</sub>G, previo a la síntesis de los elementos de respuesta se realizó un análisis *in silico* de los promotores de varios genes que codifican para enzimas de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides en *Arabidopsis*. Se analizó la Fenilalanina amoniasa (PAL), enzima clave de la ruta de fenilpropanoides que cataliza la deaminación de fenilalanina a ácido trans-cinámico, un precursor de lignina y la ruta de biosíntesis de flavonoides; Cinnamoil-CoA reductasa (CCR); cinnamil alcohol dehidrogenasa (CAD),

cataliza los pasos de biosíntesis de monolignoles, y la hidroxicinnamoil transferasa (HCT) (Fig. 2). El análisis mostró que todos los genes que codifican para las enzimas mencionadas anteriormente, contienen elementos CArG en sus promotores. Este resultado sugiere que las proteínas del tipo MADS-box podrían estar regulando la transcripción de los genes de la ruta de fenilpropanoides.



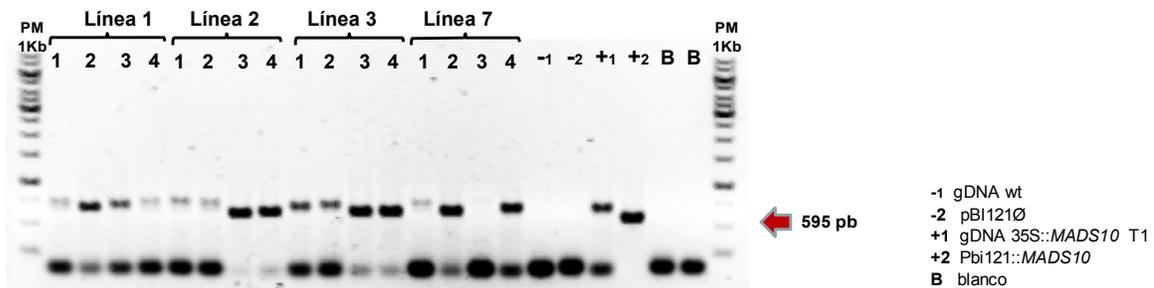
**Figura 15. Ensayo EMSA de PrMADS10 y PrMADS11 con varios elementos de respuesta de ADN tipo CArG.** Elementos de respuesta CArG canónico y CArG4 (A), elementos de respuesta CArG2 y CArG3 (B) y elementos de respuesta CArG7 y AG (C). Flecha azul indica el ADN libre y la flecha amarilla indica señal inespecífica. También se muestra la leyenda de cada carril.

Al realizar los diferentes ensayos de interacción proteína (PrMADS10 y PrMADS11) con los elementos de ADN (CArG canónico, CArG2, CArG3, CArG4, CArG7 y AG), no se logró observar una señal específica de retardo en las membranas de nylon. En el carril 1 se aplicó ADN libre, en el carril 2 y 3 se separaron extractos crudos de proteínas control, en el carril 4 y 5 se separaron los extractos crudos de las proteínas en análisis PrMADS10 y PrMADS11, respectivamente. El ensayo se realizó tres veces y los resultados obtenidos no fueron concluyentes, probablemente porque las proteínas de interés no se unen a los elementos de respuesta diseñados, o que el buffer fosfato utilizado disminuya la

eficiencia de interacción, así como también, la pérdida de actividad de las proteínas debido a desnaturalización durante el ensayo (Fig. 15).

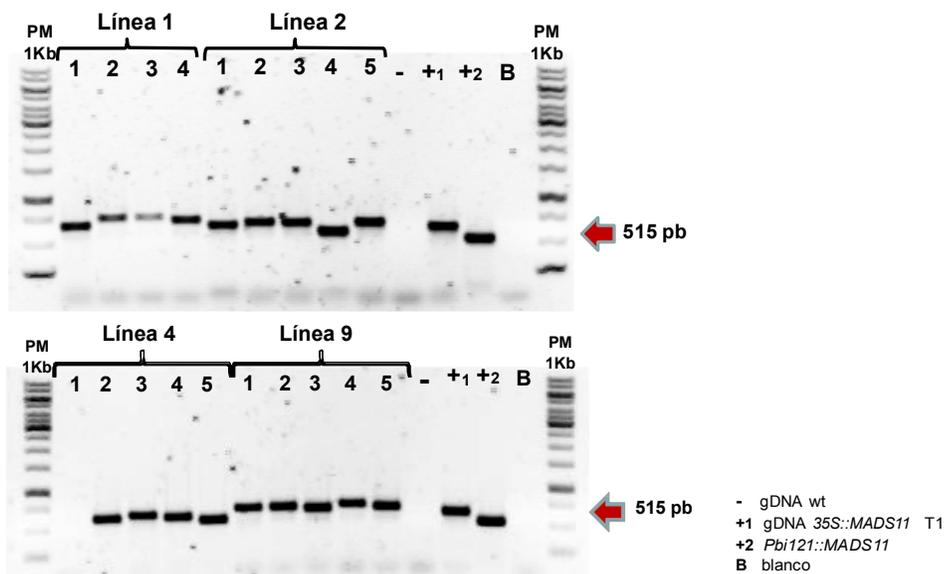
### 3.4 Evaluación del efecto de la sobreexpresión de los factores de transcripción de pino en plantas de *Arabidopsis*

Para *PrMADS10* se analizaron 4 plantas obtenidas de 4 líneas transgénicas independientes (1, 2, 3 y 7), después de visualizar el producto de amplificación se determinó que todas las plantas analizadas fueron positivas (ver anexo 4). El producto de amplificación esperado es de 595 pb. En los carriles identificados con los números 1, 2, 3 y 4 corresponde a cada planta analizada para las 4 líneas transgénicas independientes (Fig. 16).



**Figura 16. Identificación líneas transgénicas T2 de *PrMADS10* en *Arabidopsis*:** Amplificación por PCR del segmento intergenético 35S::*PrMADS10*, utilizando DNA obtenido de plantas de 2 semanas de edad. PM, marcador de peso molecular; 1, 2, 3 y 4 representa el número plantas evaluadas por línea transgénica. A la derecha se observan los códigos de los respectivos controles.

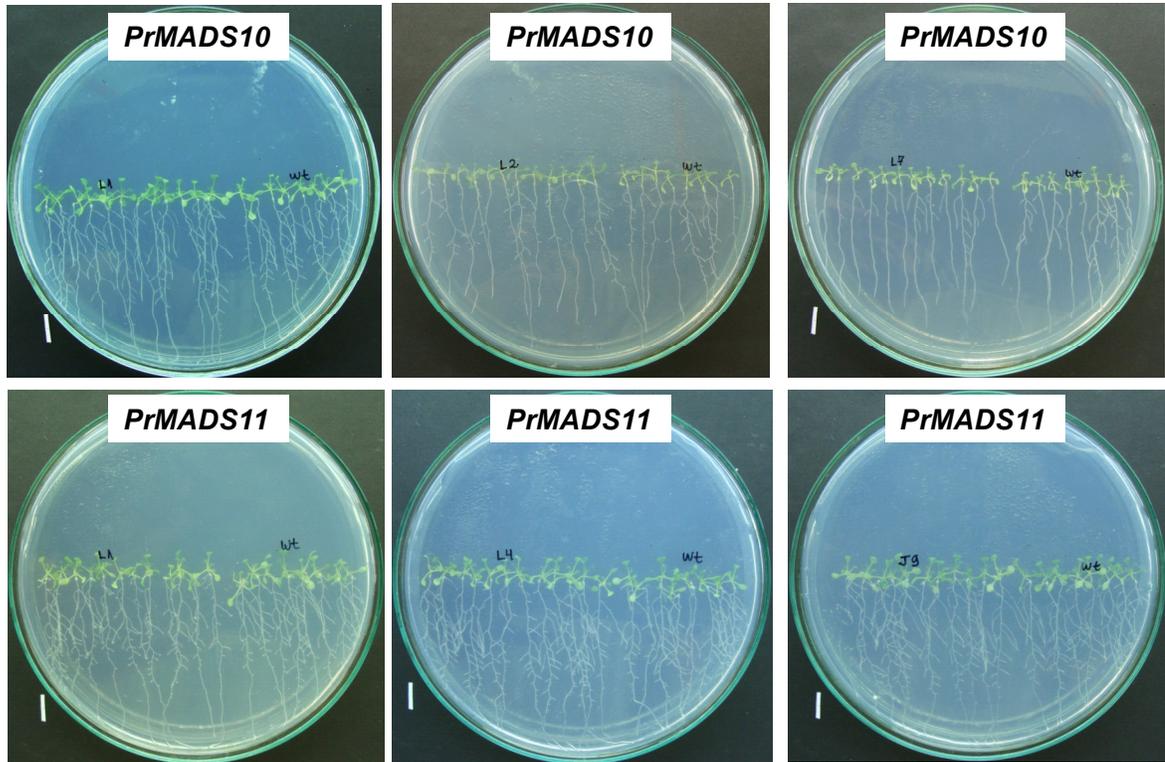
En el caso de *PrMADS11*, se analizaron 5 plantas obtenidas de 4 líneas transgénicas independientes (1, 2, 4 y 9), determinándose que todas las plantas analizadas fueron positivas. El producto de amplificación esperado es de 515 pb. Los carriles identificados con los números 1, 2, 3, 4 y 5 corresponde a cada planta analizada para las 4 líneas transgénicas independientes (Fig. 17).



**Figura 17. Identificación líneas transgénicas T2 de *PrMADS11* en *Arabidopsis*:** Amplificación por PCR del segmento intergenético *35S::PrMADS11*, utilizando DNA obtenido de plantas de 2 semanas de edad. PM, marcador de peso molecular; 1, 2, 3, 4 y 5 representa el número plantas evaluadas por línea transgénica. A la derecha se observan los códigos de los respectivos controles.

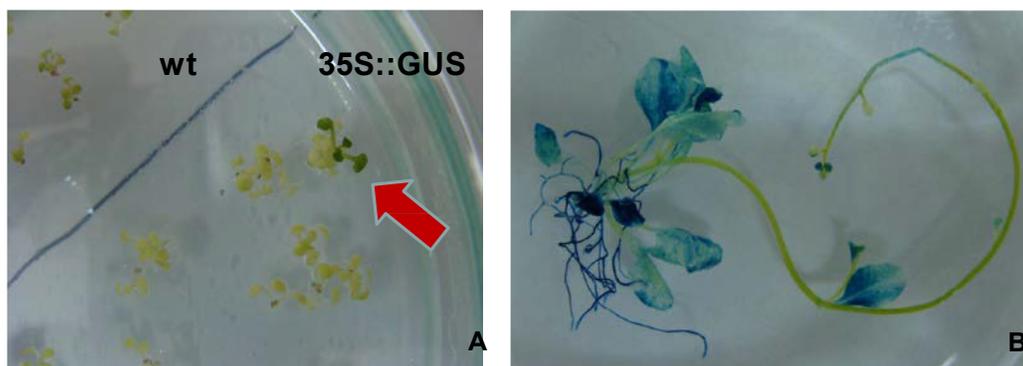
Además, se determinó que expresaban efectivamente el gen. En la tercera generación se obtuvieron cuatro líneas homocigotas independientes que sobreexpresan *35S::PrMADS10* y tres líneas homocigotas independientes que sobreexpresan *35S::PrMADS11* en *Arabidopsis*.

Una vez obtenidas las líneas homocigotas en plantas transgénicas que sobreexpresan *35S::PrMAS10* y *35S::PrMAS11*, el crecimiento de 3 líneas independientes de cada MADS-box fue observado y comparado con plantas silvestres sin transformar. Al realizar el análisis después de los 10 días de establecidas las semillas en medio MS se observó que todas las líneas transgénicas homocigotas obtenidas tenían un crecimiento normal y similar a las plantas silvestres tanto para raíces como para la roseta (Fig. 18).



**Figura 18.** Líneas transgénicas sobreexpresando 35S::*PrMADS10* y 35S::*PrMADS11* en *Arabidopsis* comparadas con plantas wild type a los 10 días de edad. MADBT corresponde a 35S::*PrMADS10* y MADBJ corresponde a 35S::*PrMADS11*. A la izquierda abajo de la figura se observa una línea blanca, indica 1 cm de longitud. Líneas transgénicas comparadas con plantas silvestre (wt) crecidas en medio MS.

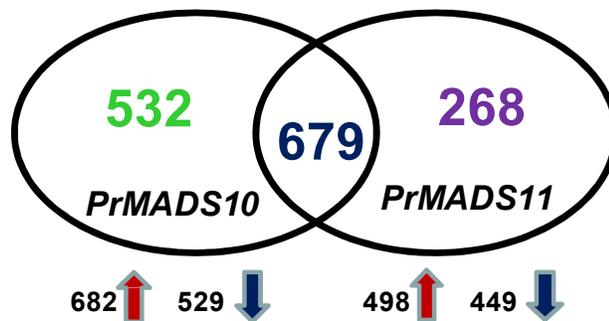
Además, se obtuvo una línea homocigota transformada con el vector vacío, que se utilizó como control. Al realizar el análisis histoquímico a esta línea se logró observar actividad GUS constitutiva en la totalidad de la planta (hojas, raíz y tallo) (Fig. 19).



**Figura 19.** Selección de plantas de *Arabidopsis* transformadas con el vector pBI121Ø. (A) Semillas en medio MS + 25 ug/ml KAN. Este genotipo fue usado como control en los análisis de plantas que sobreexpresan el *PrMADS10*. Flecha roja indica planta que resiste el efecto de la KAN. (B) Localización histoquímica de actividad GUS de planta T2 de *Arabidopsis*.

### 3.4.1 Efectos de la sobre-expresión constitutiva de *PrMADS10* y *PrMADS11* determinados mediante Microarreglos

Para desarrollar esta técnica se utilizó ARN de tallo de plantas wt de *A. thaliana* y las líneas transgénicas 1, 2, 4, y 1, 2, 3 que sobreexpresan constitutivamente *PrMADS10* y *PrMADS11*, respectivamente. Seleccionándose los genes diferencialmente expresados a partir del test estadístico t-test. A partir del microarreglo realizado con muestras wt (control) y de plantas que sobreexpresan constitutivamente *PrMADS10* y *PrMADS11*, fue posible discriminar a partir de los 26.000 genes que contiene el chip del genoma conocido de *A. thaliana*. Los resultados obtenidos muestran que *PrMADS10* y *PrMADS11* están regulando diferencialmente un total de 1211 y 947 genes respectivamente. De los cuales, se observa una regulación positiva y negativa de genes, y que al ser comparados entre sí, ambos *PrMADS* están regulando genes en común (Fig. 20).



**Figura 20. Genes regulados diferencialmente obtenidos mediante análisis de microarreglos.** Genes que están siendo regulados positivamente por *PrMADS10* y *PrMADS11* se muestran con flecha roja y los regulados negativamente con flecha azul. En la intersección de los círculos se muestran genes que son regulados en común.

En la tabla 5 se listan los 50 genes que son regulados positivamente por *PrMADS10*. Del mismo modo, es posible apreciar que los primeros 30 genes de la lista (señalados con \*), son comunes con aquellos regulados por *PrMADS11* (Tabla 6).

**Tabla 5. Lista de los 50 genes sobreexpresados en *PrMADS10* obtenidos mediante análisis de microarreglos**

#	AGI	Exp log2	valor-p	Descripción
1	AT3G09922*	5,236965	< 0,0001	induced by phosphate starvation1
2	AT4G24890*	5,106929	< 0,0001	purple acid phosphatase 24
3	AT1G17710*	4,609309	< 0,0001	Pyridoxal phosphate phosphatase-related protein
4	AT5G20790*	4,160189	< 0,0001	unknown
5	AT3G61410*	4,096904	< 0,0001	unknown
6	AT1G23110*	3,996620	< 0,0001	unknown
7	AT5G17220*	3,879406	< 0,0001	glutathione S-transferase phi 12
8	AT2G11810*	3,879177	< 0,0001	monogalactosyldiacylglycerol synthase type C
9	AT3G44510*	3,822542	< 0,0001	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
10	AT5G62162*	3,822351	< 0,0001	MIR399C; miRNA
11	AT1G08310*	3,747737	< 0,0001	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
12	AT3G14790*	3,627629	< 0,0001	rhamnose biosynthesis 3
13	AT2G34202*	3,590818	< 0,0001	MIR399D; miRNA
14	AT5G08030*	3,576700	< 0,0001	PLC-like phosphodiesterases superfamily protein
15	AT1G73220*	3,514955	< 0,0001	organic cation/carnitine transporter1
16	AT2G04038*	3,475171	< 0,0001	basic leucine-zipper 48
17	AT2G45135*	3,472529	< 0,0001	RING/U-box superfamily protein
18	AT2G45130*	3,428042	< 0,0001	SPX domain gene 3
19	AT3G25240*	3,409143	< 0,0001	Protein of unknown function (DUF506)
20	AT4G40060*	3,372438	< 0,0001	homeobox protein 16
21	AT3G05630*	3,344036	< 0,0001	phospholipase D P2
22	AT3G04530*	3,306227	< 0,0001	phosphoenolpyruvate carboxylase kinase 2
23	AT2G34210*	3,276185	< 0,0001	Transcription elongation factor Spt5
24	AT1G67600*	3,263454	< 0,0001	Acid phosphatase/vanadium-dependent haloperoxidase-related protein
25	AT3G59884*	3,257812	< 0,0001	MIR827a; miRNA
26	AT4G36350*	3,245868	< 0,0001	purple acid phosphatase 25
27	AT3G02040*	3,226288	< 0,0001	senescence-related gene 3
28	AT5G03545*	3,133800	< 0,0001	unknown
29	AT4G12090*	3,095886	< 0,0001	Cornichon family protein
30	AT1G19200*	3,077976	< 0,0001	Protein of unknown function (DUF581)
31	AT3G03530*	3,051678	< 0,0001	non-specific phospholipase C4
32	AT4G01380	3,036311	< 0,0001	plastocyanin-like domain-containing protein
33	AT5G44562*	3,018643	< 0,0001	other RNA
34	AT3G25233*	3,014201	< 0,0001	unknown
35	AT4G36850*	3,007531	< 0,0001	PQ-loop repeat family protein / transmembrane family protein
36	AT4G17220	2,982318	< 0,0001	microtubule-associated proteins 70-5
37	AT3G09285*	2,938896	< 0,0001	unknown
38	AT3G02550*	2,927774	< 0,0001	LOB domain-containing protein 41
39	AT5G53048	2,912617	< 0,0001	other RNA
40	AT5G20150	2,903948	< 0,0001	SPX domain gene 1
41	AT2G38940*	2,823404	< 0,0001	phosphate transporter 1;4
42	AT1G22150*	2,798568	< 0,0001	sulfate transporter 1;3
43	AT5G42610	2,784726	< 0,0001	Protein of unknown function (DUF607)
44	AT5G01220	2,765221	< 0,0001	sulfoquinovosyldiacylglycerol 2
45	AT3G47420	2,750339	< 0,0001	phosphate starvation-induced gene 3
46	AT4G01390*	2,704407	< 0,0001	TRAF-like family protein
47	AT5G02200	2,652068	< 0,0001	far-red-elongated hypocotyl1-like
48	AT3G43190*	2,648941	< 0,0001	sucrose synthase 4
49	AT5G20410	2,641083	< 0,0001	monogalactosyldiacylglycerol synthase 2
50	AT3G12500*	2,639956	< 0,0001	basic chitinase

\* Corresponde a genes que son regulados en común por *PrMADS10* y *PrMADS11*

Es interesante el hecho que *PrMADS11* también modula la sobreexpresión de 40 genes en común con *PrMADS10*, entre ellos, los involucrados en “phosphate starvation”, metabolismo secundario, síntesis de azúcares o en remodelación de componentes de la pared celular, y otros comunes con *PrMADS10* (Tabla 6). Sin embargo, 10 genes son diferentes de los reportados para éste último. Estos tales como: basic leucine-zipper 48, microtubule-associated proteins 70-5, SPX domain gene 1, monogalactosyldiacylglycerol synthase 2, purple acid phosphatase 7, phosphate starvation-induced gene 2. Es destacable que el gen “Phosphate starvation 1” es el que presenta el mayor índice de cambio, así como otros factores de transcripción, cuya expresión sería modulada por MADS10.

**Tabla 6. Lista de los 50 genes sobreexpresados en *PrMADS11* obtenidos mediante análisis de microarreglos**

#	AGI	Exp log2	valor-p	Descripción
1	AT3G09922*	6,477149	< 0,0001	induced by phosphate starvation1
2	AT4G24890*	5,861070	< 0,0001	purple acid phosphatase 24
3	AT1G17710*	5,645392	< 0,0001	Pyridoxal phosphate phosphatase-related protein
4	AT5G20790*	4,736931	< 0,0001	unknown
5	AT3G61410*	4,632091	< 0,0001	unknown
6	AT4G36350*	4,595696	< 0,0001	purple acid phosphatase 25
7	AT2G45130*	4,551193	< 0,0001	SPX domain gene 3
8	AT2G45135*	4,503947	< 0,0001	RING/U-box superfamily protein
9	AT5G17220*	4,495138	< 0,0001	glutathione S-transferase phi 12
10	AT2G34202*	4,488584	< 0,0001	MIR399D; miRNA
11	AT2G11810*	4,332355	< 0,0001	monogalactosyldiacylglycerol synthase type C
12	AT3G25240*	4,320188	< 0,0001	Protein of unknown function (DUF506)
13	AT1G23110*	4,220128	< 0,0001	unknown
14	AT5G62162*	4,201944	< 0,0001	MIR399C; miRNA
15	AT1G08310*	4,113036	< 0,0001	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
16	AT3G48346	4,102265	< 0,0001	unknown
17	AT3G44510*	4,044805	< 0,0001	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
18	AT3G03530*	3,876539	< 0,0001	non-specific phospholipase C4
19	AT5G49600	3,859950	< 0,0001	Protein of unknown function, DUF538
20	AT2G34210*	3,834179	< 0,0001	Transcription elongation factor Spt5
21	AT1G22150*	3,791073	< 0,0001	sulfate transporter 1;3
22	AT3G59884*	3,771812	< 0,0001	MIR827a; miRNA
23	AT5G44562*	3,753842	< 0,0001	other RNA
24	AT3G14790*	3,719084	< 0,0001	rhamnose biosynthesis 3
25	AT1G19200*	3,693582	< 0,0001	Protein of unknown function (DUF581)
26	AT3G09285*	3,682474	< 0,0001	unknown
27	AT3G12500*	3,680396	< 0,0001	basic chitinase
28	AT5G08030*	3,663934	< 0,0001	PLC-like phosphodiesterases superfamily protein
29	AT3G04530*	3,654325	< 0,0001	phosphoenolpyruvate carboxylase kinase 2
30	AT3G05630*	3,636340	< 0,0001	phospholipase D P2
31	AT1G67600*	3,588728	< 0,0001	Acid phosphatase/vanadium-dependent haloperoxidase-related protein
32	AT2G46880	3,586647	< 0,0001	purple acid phosphatase 14
33	AT1G73220*	3,581673	< 0,0001	organic cation/carnitine transporter1
34	AT4G13700	3,567971	< 0,0001	purple acid phosphatase 23
35	AT3G02550*	3,487778	< 0,0001	LOB domain-containing protein 41

36	AT2G01880	3,398099	< 0,0001	purple acid phosphatase 7
37	AT3G43190*	3,374672	< 0,0001	sucrose synthase 4
38	AT3G02040*	3,365231	< 0,0001	senescence-related gene 3
39	AT4G12090*	3,355102	< 0,0001	Cornichon family protein
40	AT3G25233*	3,312143	< 0,0001	unknown
41	AT4G36850*	3,293316	< 0,0001	PQ-loop repeat family protein / transmembrane family protein
42	AT2G38940*	3,254354	< 0,0001	phosphate transporter 1;4
43	AT5G15120	3,213470	< 0,0001	Protein of unknown function (DUF1637)
44	AT4G40060*	3,198391	< 0,0001	homeobox protein 16
45	AT2G02990	3,197116	< 0,0001	ribonuclease 1
46	AT4G01390*	3,184965	< 0,0001	TRAF-like family protein
47	AT5G63130	3,169751	< 0,0001	Octicosapeptide/Phox/Bem1p family protein
48	AT1G73010	3,146030	< 0,0001	phosphate starvation-induced gene 2
49	AT1G08165	3,125898	< 0,0001	unknown
50	AT5G03545*	3,125454	< 0,0001	unknown

\* Corresponde a genes que son regulados en común por *PrMADS10* y *PrMADS11*

En la Tabla 6 se puede observar que ambos *PrMADS* son capaces de regular la inducción de 40 genes en común, y que 26 genes son regulados negativamente. Asimismo, fue posible observar que los niveles de expresión de estos genes comunes son diferentes entre ambos factores de transcripción. Por otro lado, tres RNAs pequeños son expresados diferencialmente para ambos constructos. Adicionalmente, otros genes de elongación del tallo, metabolismo secundario, síntesis de azúcares o de remodelación de componentes de la pared celular también se encuentran en esta lista.

En tanto de los genes regulados negativamente, el factor de transcripción MYB50 es común a ambos *PrMADS*. Sin embargo, varios otros factores de transcripción son regulados negativamente por *PrMADS10* (Tabla 7). Así también, es posible apreciar otros genes como los de vías metabólicas de terpenos, remodelación de la pared (expansina A8, PL), de hormonas (SAUR-like auxin-responsive protein family), y en especial de respuesta de defensa a estrés biótico y abiótico.

**Tabla 7. Lista de los 50 genes regulados negativamente en *PrMADS10* obtenidos mediante análisis de microarreglos**

#	AGI	Exp log2	valor-p	Descripción
1	AT1G78950*	-3,175858	< 0,0001	Terpenoid cyclases family protein
2	AT5G22490*	-3,128111	< 0,0001	O-acyltransferase (WSD1-like) family protein
3	AT3G57460*	-3,068076	< 0,0001	catalytics;metal ion binding
4	AT3G56700*	-3,021951	< 0,0001	fatty acid reductase 6
5	AT2G40080	-2,911532	< 0,0001	Protein of unknown function (DUF1313)
6	AT5G22570*	-2,837256	< 0,0001	WRKY DNA-binding protein 38
7	AT2G24850*	-2,733642	< 0,0001	tyrosine aminotransferase 3
8	AT5G42900	-2,689934	< 0,0001	cold regulated gene 27

9	AT1G57750*	-2,643456	< 0,0001	cytochrome P450, family 96, subfamily A, polypeptide 15
10	AT5G13330*	-2,555322	< 0,0001	related to AP2 6l
11	AT4G33790*	-2,550806	< 0,0001	Jojoba acyl CoA reductase-related male sterility protein
12	AT1G57560*	-2,547406	< 0,0001	myb domain protein 50
13	AT1G02450*	-2,529570	< 0,0001	NIM1-interacting 1
14	AT5G28080*	-2,520749	< 0,0001	Protein kinase superfamily protein
15	AT2G21140*	-2,516221	< 0,0001	proline-rich protein 2
16	AT1G07050	-2,500567	< 0,0001	CCT motif family protein
17	AT1G17665	-2,482214	< 0,0001	unknown
18	AT5G38000*	-2,481264	< 0,0001	Zinc-binding dehydrogenase family protein
19	AT1G30040	-2,469362	< 0,0001	gibberellin 2-oxidase
20	AT5G26220*	-2,457037	< 0,0001	ChaC-like family protein
21	AT2G23910	-2,352856	< 0,0001	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
22	AT3G44860*	-2,328096	< 0,0001	farnesoic acid carboxyl-O-methyltransferase
23	AT3G28220*	-2,299028	< 0,0001	TRAF-like family protein
24	AT4G33980	-2,275514	0,000313	unknown
25	AT2G21660	-2,270620	< 0,0001	cold, circadian rhythm, and rna binding 2
26	AT3G07650	-2,257918	0,000303	CONSTANS-like 9
27	AT5G44568*	-2,254225	< 0,0001	unknown
28	AT5G20630	-2,206100	< 0,0001	germin 3
29	AT1G66380	-2,183270	< 0,0001	myb domain protein 114
30	AT4G38825*	-2,173956	< 0,0001	SAUR-like auxin-responsive protein family
31	AT1G68050	-2,169232	0,000238	flavin-binding, kelch repeat, f box 1
32	AT5G45960*	-2,143155	< 0,0001	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
33	AT3G46490*	-2,137032	< 0,0001	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
34	AT3G05770	-2,108378	< 0,0001	unknown
35	AT4G25860	-2,096574	0,000263	OSBP(oxysterol binding protein)-related protein 4A
36	AT3G20810	-2,095407	0,000286	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
37	AT5G37970*	-2,073330	0,000227	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
38	AT5G37940	-2,069647	0,000294	Zinc-binding dehydrogenase family protein
39	AT3G60160*	-2,068075	0,000278	multidrug resistance-associated protein 9
40	AT2G40610	-2,063696	0,000256	expansin A8
41	AT1G55525*	-2,063222	0,000270	other RNA
42	AT5G48250	-2,050964	0,000392	B-box type zinc finger protein with CCT domain
43	AT4G17470	-2,032053	0,000727	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
44	AT1G28050*	-2,015980	0,000217	B-box type zinc finger protein with CCT domain
45	AT1G14250	-1,991780	0,000204	GDA1/CD39 nucleoside phosphatase family protein
46	AT5G01900	-1,964912	0,000244	WRKY DNA-binding protein 62
47	AT3G59270	-1,963751	0,000233	FBD-like domain family protein
48	AT5G25460*	-1,948608	0,000250	Protein of unknown function, DUF642
49	AT5G63180	-1,902099	0,000222	Pectin lyase-like superfamily protein
50	AT1G75780	-1,882480	0,000208	tubulin beta-1 chain

\* Corresponde a genes que son regulados en común por *PrMADS10* y *PrMADS11*

Por otro lado, si bien *PrMADS11* regula negativamente 26 genes en común de los reportados para *PrMADS10*, otros genes son específicamente regulados por este factor de transcripción (Tabla 8). Así, genes como xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 15 (XTH15), MYB76, cellulose synthase like A15 (CSLA15), Pectin lyase-like superfamily protein, trichome birefringence-like 26 (TBL26), Fatty acid hydroxylase superfamily, Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein, protein kinase superfamily protein, son regulados negativamente por *PrMADS11*.

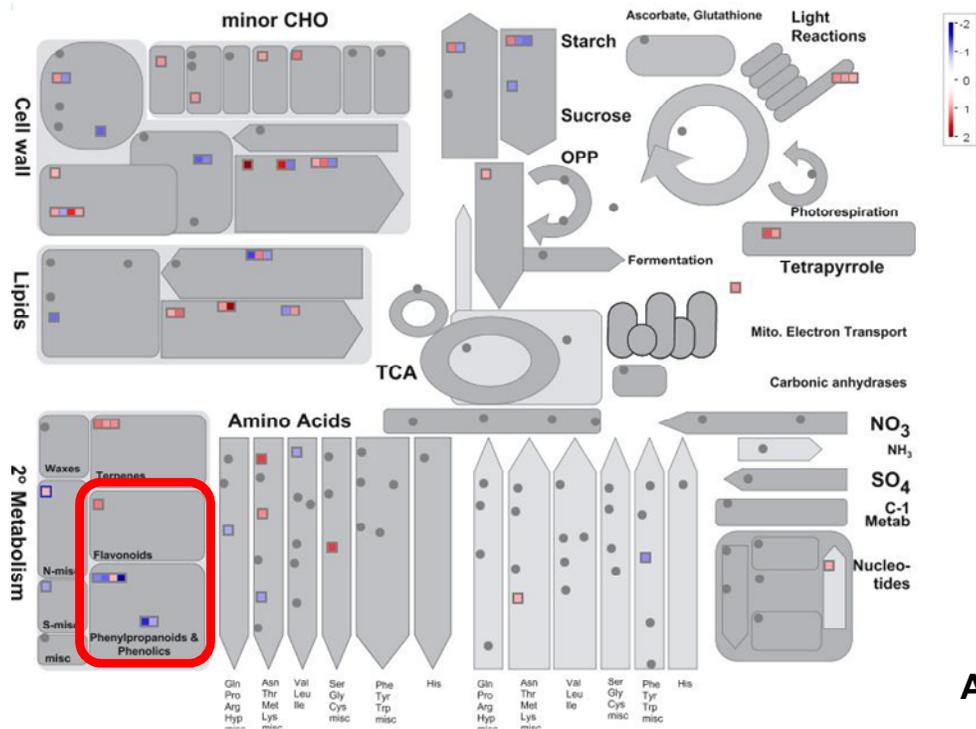
**Tabla 8. Lista de los 50 genes regulados negativamente en *PrMADS11* obtenidos mediante análisis de microarreglos**

#	AGI	Exp log2	valor-p	Descripción
1	AT3G28220*	-3,074885	< 0,0001	TRAF-like family protein
2	AT4G33790*	-2,696383	< 0,0001	Jojoba acyl CoA reductase-related male sterility protein
3	AT1G57750*	-2,654259	< 0,0001	cytochrome P450, family 96, subfamily A, polypeptide 15
4	AT3G57460*	-2,617402	< 0,0001	catalytics;metal ion binding
5	AT5G22490*	-2,566697	< 0,0001	O-acyltransferase (WSD1-like) family protein
6	AT3G56700*	-2,560263	< 0,0001	fatty acid reductase 6
7	AT5G45960*	-2,490393	< 0,0001	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
8	AT5G26220*	-2,449143	< 0,0001	ChaC-like family protein
9	AT5G07700	-2,445342	< 0,0001	myb domain protein 76
10	AT5G22570*	-2,427862	< 0,0001	WRKY DNA-binding protein 38
11	AT1G14250*	-2,408555	< 0,0001	GDA1/CD39 nucleoside phosphatase family protein
12	AT1G78950*	-2,297922	< 0,0001	Terpenoid cyclases family protein
13	AT5G13330*	-2,297186	< 0,0001	related to AP2 6l
14	AT3G44860*	-2,295243	< 0,0001	farnesoic acid carboxyl-O-methyltransferase
15	AT3G60160*	-2,217280	< 0,0001	multidrug resistance-associated protein 9
16	AT2G24850*	-2,203757	< 0,0001	tyrosine aminotransferase 3
17	AT5G44568*	-2,129554	< 0,0001	unknown
18	AT1G57560*	-2,120199	< 0,0001	myb domain protein 50
19	AT4G38825*	-2,025365	< 0,0001	SAUR-like auxin-responsive protein family
20	AT3G58120	-2,019443	< 0,0001	Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein
21	AT3G46490*	-2,003967	< 0,0001	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
22	AT1G35750	-2,003580	< 0,0001	pumilio 10
23	AT1G52750	-2,003452	< 0,0001	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
24	AT4G13410	-1,950793	< 0,0001	Nucleotide-diphospho-sugar transferases superfamily protein
25	AT2G40200	-1,935908	< 0,0001	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
26	AT1G60590	-1,934347	< 0,0001	Pectin lyase-like superfamily protein
27	AT2G21140*	-1,915502	< 0,0001	proline-rich protein 2
28	AT1G78000	-1,902013	< 0,0001	sulfate transporter 1;2
29	AT5G37970*	-1,897355	0,001026	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
30	AT5G25460*	-1,874632	< 0,0001	Protein of unknown function, DUF642
31	AT1G55525*	-1,841628	0,001081	other RNA
32	AT1G02450*	-1,819631	< 0,0001	NIM1-interacting 1
33	AT5G38000*	-1,815578	0,000976	Zinc-binding dehydrogenase family protein
34	AT4G26660	-1,801206	0,000625	unknown
35	AT4G14130	-1,797036	< 0,0001	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 15
36	AT5G01015	-1,776602	0,001000	unknown
37	AT2G23620	-1,772984	0,000556	methyl esterase 1
38	AT2G23010	-1,758301	0,001923	serine carboxypeptidase-like 9
39	AT3G23635	-1,756197	0,001053	ROTUNDIFOLIA like 13
40	AT4G01080	-1,749975	0,000588	TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 26
41	AT5G28080*	-1,738155	0,000571	Protein kinase superfamily protein
42	AT1G22330	-1,736652	0,001957	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein
43	AT3G15550	-1,733048	0,002000	unknown
44	AT1G20610	-1,731779	0,001961	Cyclin B2;3
45	AT2G30766	-1,727706	0,000606	unknown
46	AT3G45140	-1,719875	0,001429	lipoygenase 2
47	AT1G73600	-1,712810	0,001833	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
48	AT1G02205	-1,706932	0,001860	Fatty acid hydroxylase superfamily
49	AT2G42380	-1,698053	0,001852	Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein
50	AT3G01840	-1,694395	0,001887	Protein kinase superfamily protein

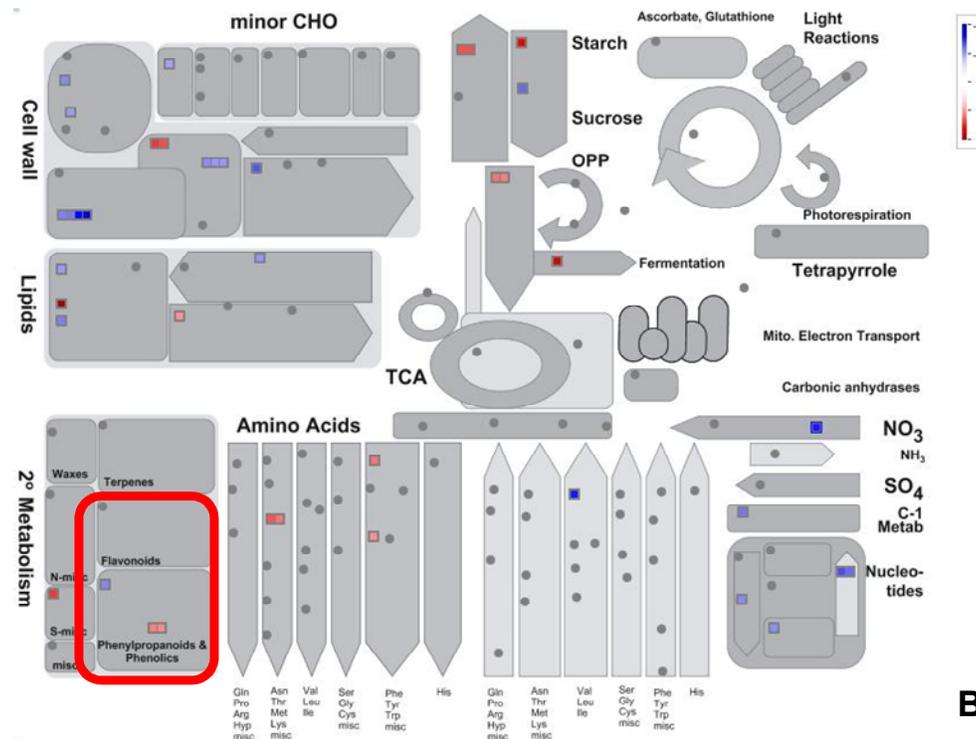
\* Corresponde a genes que son regulados en común por *PrMADS10* y *PrMADS11*

En la Figura 21 se observan 62 cuadrados coloreados para *PrMADS10* y 40 para *PrMADS11*, que representan aquellos genes que afectan una vía o que desencadenan la acción de otros. En color rojo se muestran los genes que están siendo regulados positivamente, junto a los regulados negativamente en azul. Los resultados obtenidos nos muestran una vista general de distintas categorías funcionales, que están siendo reguladas por estos MADS de pino (ver anexo 5), tales como metabolismo mayor y menor CHO, metabolismo de aminoácidos, metabolismo nucleotídico, fermentación, lípidos, metabolismo secundario y pared celular (Fig. 21).

Si analizamos la ruta fenilpropanoides, se puede observar que varios genes son regulados positiva y negativamente, y muestran un aumento o disminución en sus niveles de expresión, siendo ésta diferencial entre ambos MADS-box analizados. Los genes regulados por *PrMADS10* son *PAL*, chalcona sintasa (*CHS*), 4-coumarate-CoA ligasa (*4CL*), cinnamoyl-CoA reductasa (*CCR*) y Caffeoyl-CoA O-methyltransferasa (*CCoAOMT*) y los regulados por *PrMADS11* son *PAL*, *4CL* y *CCoAOMT*. La información obtenida muestra que los dos MADS-box están regulando genes en común, como es el caso de *PAL*, *4CL* y *CCoAOMT*, sin embargo, *PrMADS10* esta regulando adicionalmente *CHS* y *CCR*.



A

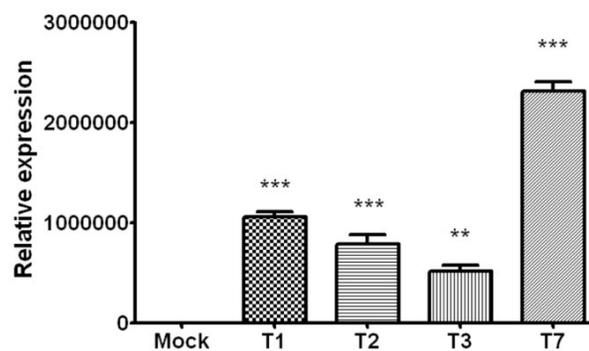


B

Figura 21. Mapa de rutas metabólicas reguladas por *PrMADS10* (A) y *PrMADS11* (B) en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, obtenido mediante el programa MapMan. Genes que están siendo regulados positivamente se muestran en rojo, junto a los regulados negativamente en azul. El círculo rojo muestra la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides.

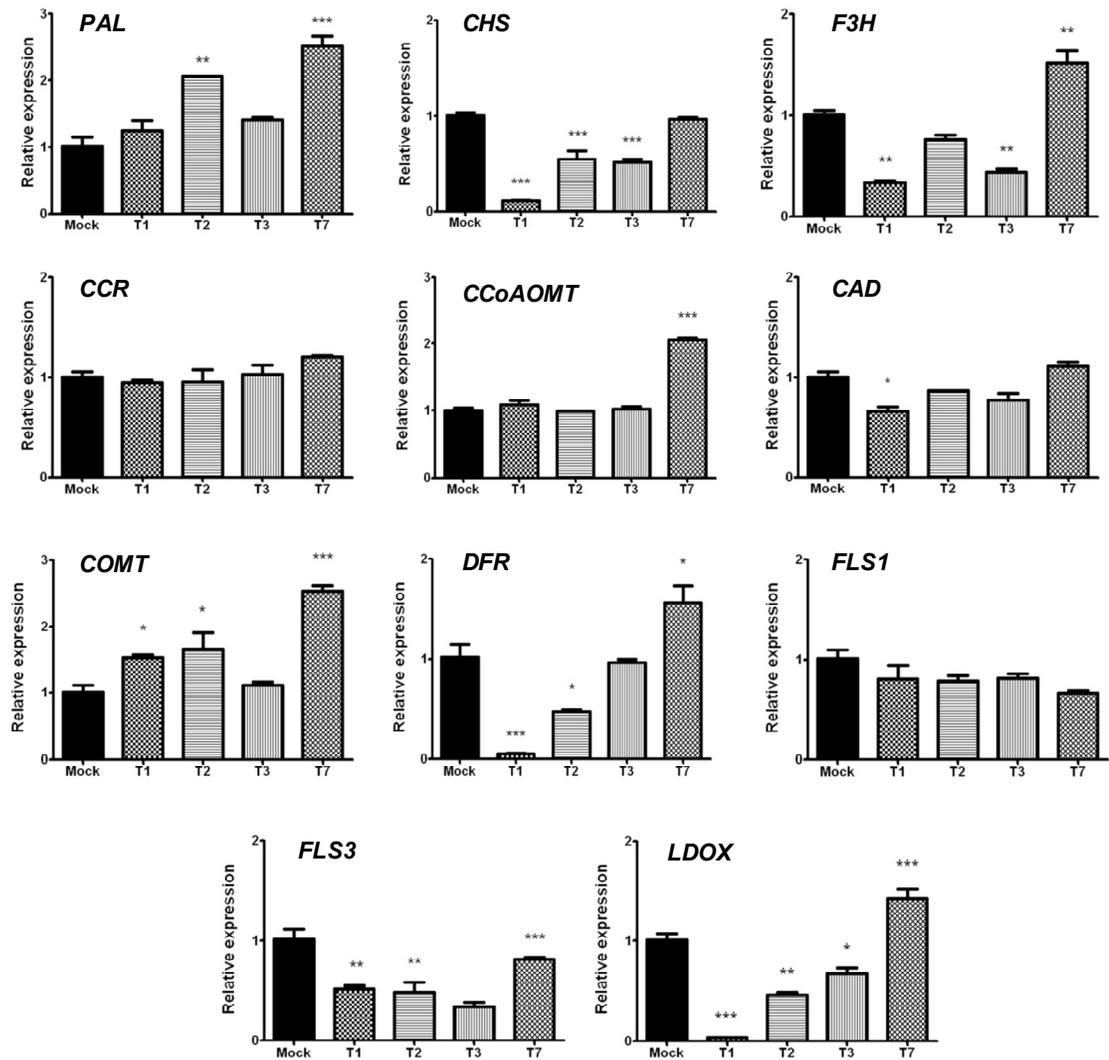
### 3.4.2 Efectos de la expresión constitutiva de *PrMADS10* y *PrMADS11* en la expresión de genes de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides en *Arabidopsis*

Los niveles de acumulación de los transcritos correspondientes a cada gen fue analizada para cada línea transgénica obtenida. Los resultados mostraron que las cuatro líneas sobreexpresan *PrMADS10* en un rango de 500.000 a 2.500.000 veces, comparado con la línea transgénica que contiene el vector vacío (mock) (Fig. 22).



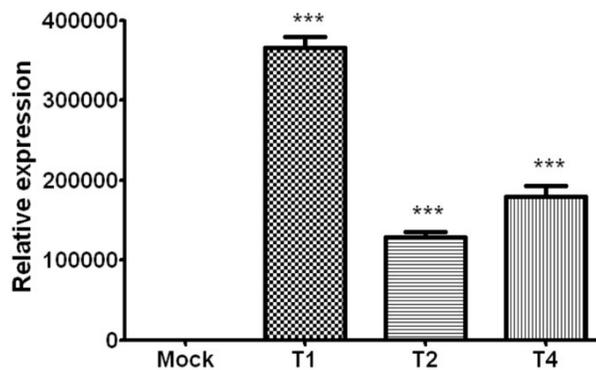
**Figura 22. Expresión relativa del gen *PrMADS10* en *Arabidopsis*.** Los niveles de transcritos del gen *PrMADS10* fueron evaluados mediante qPCR a partir de cDNA sintetizado desde RNA total de tallo de plantas transgénicas. La expresión relativa se calculó usando el gen normalizador *AtFbox* y las barras representan la media (y el error estándar) obtenida a partir de 3 replicas biológicas. (Mock) control vector vacío.

Posteriormente, se analizó la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides, el análisis de los datos obtenidos de las líneas *PrMADS10*, T2 y T7 mostró un incremento en la acumulación de transcritos del gen *PAL*. En la rama del metabolismo de flavonoides, se observó un patrón similar en la línea 7 en transcritos para flavonona 3-hidrolasa (*F3H*), dihidroflavovonol 4-reductasa (*DFR*) y leucoantocianidin dioxigenasa (*LDOX*), que incrementan su abundancia. El gen *CHS* fue reprimido en todas las líneas transgénicas. Las otras líneas muestran una represión en la expresión de *DFR*, flavonol sintasa 3 (*FLS3*) y *LDOX*. En el caso de la otra rama del metabolismo de fenilpropanoides (ruta de lignina), solamente los transcritos del gen de la caffeic acid O-methyl transferase (*COMT*) aumentaron en las líneas transgénicas T1, T2 y T7, pero todos los otros genes relacionados a la ruta de biosíntesis de monolignoles solo mostró cambios significativos en su expresión en la línea T7 (Fig. 23).



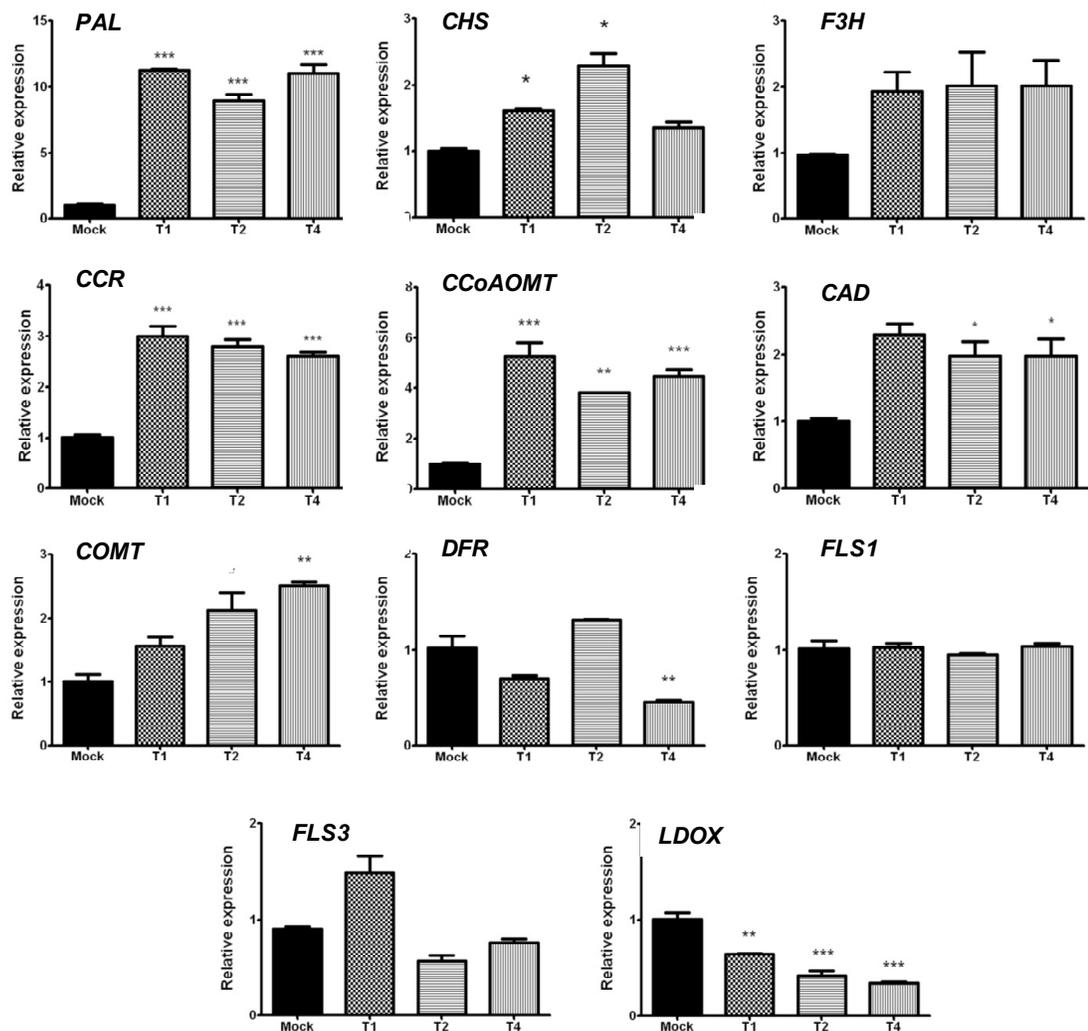
**Figura 23.** Niveles de transcritos de los genes de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides en plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresaron el gen *PrMADS10*. Las barras representan la media (y el error estándar) obtenida a partir de 3 replicas biológicas. La expresión relativa se calculó usando el gen normalizador *AtFbox*. Los asteriscos indican la significancia estadística entre las plantas transformadas, respecto del vector vacío (Mock) y las muestras de tallo de las diferentes líneas transgénicas (\*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\*,  $P < 0.001$ , test de Student).

En el caso de *PrMADS11* los niveles de acumulación del transcrito para cada línea transgénica obtenida muestran que éstas sobreexpresan *PrMADS11* en un rango de 140.000 a 360.000 veces comparado con mock (Fig. 24).



**Figura 24. Expresión relativa del gen *PrMADS11* en *Arabidopsis*.** Los niveles de transcritos del gen *PrMADS11* fueron evaluados mediante qPCR a partir de cDNA sintetizado desde RNA total de tallo de plantas transgénicas. La expresión relativa se calculó usando el gen normalizador *AtFbox* y las barras representan la media (y el error estándar) obtenida a partir de 3 replicas biológicas. (Mock) control vector vacío.

Los niveles de expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides, de las tres líneas T1, T2 y T4 de *PrMADS11*, mostraron un incremento en la acumulación de transcritos para *PAL*. En el caso de la rama del metabolismo de fenilpropanoides, los genes relacionados a la ruta de biosíntesis de monolignoles *CCR*, *CCoAOMT*, cinnamyl alcohol dehidrogenasa (*CAD*), y *COMT*, aumentaron los niveles de transcritos, mostrando cambios significativos en su expresión para las líneas T1, T2 y T4. En la rama del metabolismo de flavonoides, *CHS* incrementó sus niveles de expresión, siendo significativo para las líneas T1 y T2, en cambio el patrón observado en las líneas evaluadas no mostró cambios significativos en sus niveles de transcritos o fueron reprimidos en *DFR*, flavonol sintasa 1 (*FLS1*), *FLS3*, *LDOX*. Finalmente, solo la línea T1 mostró un pequeño incremento en los niveles de transcritos para *FLS3* respecto del control, pero significativo respecto de las otras líneas transgénicas (Fig. 25).

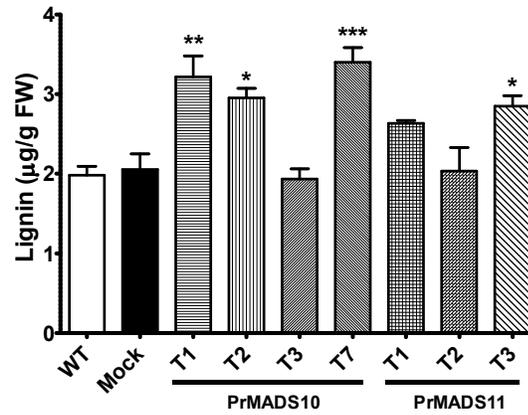


**Figura 25.** Niveles de transcritos de los genes de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides en plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresaron el gen *PrMADS11*. Las barras representan la media (y el error estandar) obtenida a partir de 3 replicas biológicas. La expresión relativa se calculó usando el gen normalizador *AtFbox*. Los asteriscos indican la significancia estadística entre las plantas transformadas, respecto del vector vacío (Mock) y las muestras de tallo de las diferentes líneas transgénicas (\*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\*,  $P < 0.001$ , test de Student).

### 3.4.3 Contenido de lignina en líneas transgénicas *PrMADS10* y *PrMADS11*

La lignina fue extraída de varias líneas independientes, expresando de *PrMADS10* y *PrMADS11*. Este análisis mostró que el contenido de lignina en las líneas transgénicas T1, T2 y T7 de *PrMADS10* fue un 30% superior a las plantas de *Arabidopsis* “wild type” y mock. De igual forma para *PrMADS11*, en las líneas transgénicas T1 y T3

hubo un 25% más de lignina al ser comparadas con los controles “wild type” y mock (Fig. 26).



**Figura 26. Análisis del contenido de lignina en tallos de Arabidopsis sobreexpresando *PrMADS10* y *PrMADS11*.** Las barras representan la media (y el error estándar) obtenida a partir de 3 replicas biológicas. Los asteriscos indican la significancia estadística entre las plantas transformadas, respecto del control wild type y vector vacío (Mock) y las muestras de tallo de las diferentes líneas transgénicas (\*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\*,  $P < 0.001$ , test de Student).

## **IV. DISCUSSION**

#### 4.1 *PrMADS10* y *PrMADS11* codifican para factores de transcripción tipo MADS-box

En este estudio se reporta la caracterización de dos genes que codifican para factores de transcripción de pino radiata (*PrMADS10* y *PrMADS11*) inducidos en respuesta a inclinación. No se ha reportado en literatura la caracterización de estos factores de transcripción, ni tampoco su rol en respuesta a inclinación de pino. La obtención del largo completo de ambos genes, permitió la realización de varios ensayos, tales como, transformación de plantas de *A. thaliana*, análisis de la expresión relativa de los genes de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides, así como también, la cuantificación del contenido de lignina en las líneas transgénicas sobreexpresando estos dos MADS-box.

Las secuencias deducidas de aminoácidos obtenidas para ambas proteínas, *PrMADS10* y *PrMADS11*, fueron comparadas con secuencias de otras proteínas MADS-box de distintas especies disponibles en los bancos de datos. Ello, mostró que las secuencias de interés contienen dominios conservados típicos de los MADS-box (MADS-box, Intermitente, K-box y C-terminal) (Kaufmann *et al.*, 2005). Al comparar ambas secuencias se observó que presentan un 69% de identidad. Ello indica que existe divergencia entre ellas, pero esa divergencia se observa solo en el dominio K-box de las secuencias y aumenta en el C-terminal, debido a que *PrMADS11* tiene 28 aminoácidos menos que *PrMADS10*. Según Shore y Sharrocks (1995) el dominio MADS-box es una secuencia conservada de 56 aminoácidos, de la cual 16 aminoácidos de ambos factores de transcripción de pino radiata son idénticos en todos los miembros de las familias comparadas. En el dominio MADS-box de ambas secuencias también están presentes características estructurales, tales como un sitio potencial de fosforilación para la proteína dependiente de calmodulina quinasas (QVTFS) con una señal de localización nuclear (Cseke *et al.*, 2003). En este dominio se encuentra la región de interacción DNA-proteína y dimerización (Shore y Sharrocks, 1995).

Las secuencias de interés *PrMADS10* y *PrMADS11* fueron agrupadas en el clado II. En este clado, agrupan todas las proteínas que presentan una estructura tipo MIKC (MADS-box, Intermitente, K-box y C-terminal) (Becker y Theissen, 2003; Gramzow y Theissen

2010; Smaczniak *et al.*, 2012). Por otro lado, se observó que PrMADS10 y PrMADS11 están relacionados al gen PaMADS1 de *P. abies*. PaMADS1 se expresa principalmente en tejido de cono femenino y masculino, controlando el desarrollo de éstos (Tandre *et al.*, 1998). Además, las secuencias proteicas de interés, también se encuentra asociadas a PtSVP (*P. trichocarpa*) y AtSVP (*A. thaliana*); AtAGL24 (*A. thaliana*); PtMADS1 (*P. tomentosa*). PtSVP es una proteína de la familia SVP (Short Vegetative Phase), muy cercana a AtSVP que es un regulador negativo floral (Silva *et al.*, 2015). Esta secuencia es conservada, tanto en angiospermas como gimnospermas. Igualmente, PrMADS10 y PrMADS11 son cercanos a AtAGL24, un regulador importante que promueve la identidad de la inflorescencia en Arabidopsis, su expresión ocurre en el ápice de los brotes en el momento de la transición floral (Liu *et al.*, 2008).

#### **4.2 PrMADS10 y PrMADS11 son expresados diferencialmente en tallo de pino**

Las evidencias sugieren que MADS-box estarían regulando el desarrollo floral en plantas. En el caso presente, las secuencias fueron aisladas desde bibliotecas sustractivas SSH en el lado inferior del tallo y responden a tiempos tempranos luego de inclinación del tallo (Ramos *et al.*, 2012). Esto permite inferir que su rol en pino, no es exclusivamente para desarrollo floral, sino más bien, en respuesta al estrés de inclinación, modulando la expresión de genes de tejido vegetativo y particularmente de pared celular. Al inclinar plántulas de pino, se determinaron los niveles de transcritos de *PrMADS10* y *PrMADS11* en tallo a los 60 y 120 minutos luego de la inclinación. La sobre-expresión de estos dos genes, ocurren en la parte inferior del tallo de pino, segmento donde luego se evidencia madera de compresión (Timell, 1986). No se observa mayor variación en la acumulación de los transcritos en la parte superior del tallo. Los resultados de qPCR obtenidos en esta investigación coinciden con aquellos previamente reportados por Ramos (2010), de cuyas bibliotecas sustractivas en pino radiata, se aisló ESTs que codifican ambos MADS-box, y que se encontraban presentes solo en las librerías construídas para la parte inferior del tallo a diferentes tiempos de inclinación. Estos resultados sugieren que *PrMADS10* y *PrMADS11* responden a tiempos tempranos, y su expresión es diferencial en tiempo y en sección de tallo de pino. Estos cambios en los niveles de expresión de ambos genes que

codifican para factores de transcripción MADS-box estarían regulando rutas metabólicas que modifiquen la anatomía de la madera. Allona *et al.*, (1998) reportaron diferentes eventos moleculares en pino relacionados con modificaciones de la pared celular en respuesta a la pérdida de verticalidad, tales como, señalización de calcio, síntesis de hormonas, como auxina y etileno, además de un amplio grupo de factores de transcripción. Los trabajos de Allona *et al.*, (1998) y Ramos *et al.*, (2012) son complementarios en reportar nuevos genes en respuesta a inclinación. Sin embargo en ellos, no hay mención de la expresión diferencial de MADS-box.

Distintos MADS-box han sido descritos en pino radiata, así, *PrMADS4* al *9* fueron detectados en brotes vegetativos, órganos florales y raíces (Walden *et al.*, 1998). Los *PrMADS1* al *3* estudiados estarían implicados en regular estructuras reproductivas femeninas (Mouradov *et al.*, 1998; Mouradov *et al.*, 1999a) y desarrollo de cono (Mouradov *et al.*, 1999b). En *Populus deltoides* también se ha identificado un gen MADS-box que se expresa durante desarrollo de flor y órganos vegetativos (Zhang *et al.*, 2008). En cambio Cseke *et al.* (2003), identificó un gen MADS-box específico de tejido vascular en *Populus tremuloides* (PTM5), aislado de xilema y floema de árboles maduros (aproximadamente de 7 años de edad), que es expresado en diferenciación de xilema primario, secundario y floema. Por ello, si bien éste factor de transcripción está asociado a floración, su rol es en tejido vegetativo.

#### **4.3 Genes de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides contienen elementos CARG en sus promotores, reconocidos por MADS-box**

Para evaluar la interacción de proteínas MADS-box con elementos de respuesta de ADN, las proteínas PrMADS10 y PrMADS11 fueron inducidas en el sistema heterólogo *Saccharomyces cerevisiae*. Esta técnica ha sido usada exitosamente en la detección de interacciones proteína-ácidos nucleicos (Yakhnin *et al.*, 2012; Hellman y Fried, 2007). Las proteínas tipo MADS-box reconocen un sitio DNA que contiene la secuencia CC(A/T)<sub>6</sub> GG, conocida como elemento CARG, y que juega un rol en la interacción con la proteína (Riechmann *et al.*, 1996; Shore y Sharrocks, 1995). Debido a esto, se analizaron

varios genes que codifican para enzimas de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides en *Arabidopsis*. En este sentido, se analizó PAL, enzima clave de la ruta de fenilpropanoides, un precursor de lignina y la ruta de biosíntesis de flavonoides (Bagal *et al.*, 2012). También se analizó la enzima HCT, que se encuentra río abajo de la PAL, y las enzimas CCR y CAD, que se encuentran al final de ruta y que catalizan los pasos de biosíntesis de monolignoles (Besseau *et al.*, 2007). El análisis mostró que todos los genes que codifican para las enzimas mencionadas anteriormente, contienen elementos CArG en sus promotores. Este resultado *in silico* nos planteó la idea que las proteínas PrMADS10 y PrMADS11 podrían reconocer estos elementos de DNA y regular la transcripción de los genes de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides (rama de la biosíntesis de lignina).

Los resultados obtenidos para el EMSA no fueron favorables o tan claros después del análisis, pudiendo existir varios factores para lo sucedido, las proteínas de interés no se unen a los elementos de respuesta diseñados, o que probablemente el buffer fosfato utilizado disminuya la eficiencia de interacción, así como también, la pérdida de actividad de las proteínas debido a desnaturalización durante el ensayo (Zhang *et al.*, 1992). Hellman y Fried (2007), mencionan otros problemas que pueden ocurrir cuando la unión no es detectada. Entre ellos, se cuenta que la proteína está inactiva, la unión ocurre pero se disocia durante la electroforesis, la unión ocurre pero se disocia en el pocillo, periodo de electroforesis demasiado largo, así como también, puede ocurrir la degradación de ácidos nucleicos.

#### **4.4 La sobre-expresión constitutiva de *PrMADS10* y *PrMADS11* regula la inducción positiva y negativa de genes en *Arabidopsis***

Aunque no se obtuvieron resultados en los ensayos EMSA, se exploraron otras alternativas para la caracterización de los genes MADS, como es el caso de los microarreglos. Mediante esta técnica, en pino taeda se ha analizado la formación de madera madura y madera de compresión, identificando genes involucrados en la biosíntesis de ligninas, citoesqueleto y proteínas de pared (Whetten *et al.*, 2001). El alto

nivel de especificidad de los microarreglos de oligonucleótidos está siendo usado para identificar sistemáticamente miembros de familias multigénicas de factores de transcripción y proteínas asociadas a pared celular, para determinar su expresión en tejidos vasculares secundarios (Plomion *et al.*, 2005).

El ensayo de microarreglos, realizado en esta tesis, permitió identificar los genes que son regulados positiva y negativamente por ambos *PrMADS*. Además, cada factor de transcripción regularía genes específicos y otros que son comunes a ambos. De los 50 genes seleccionados por su mayor tasa de cambio es interesante que los niveles de expresión de aquellos genes comunes entre ambos son diferentes, lo que podría dar cuenta de una diferencia estructural entre ambas proteínas. De los primeros 50 genes inducidos por *PrMADS10* en las líneas transgénicas de *Arabidopsis*, es interesante mencionar que 40 de ellos son regulados en común con *PrMADS11*. Ambos genes presentan alta identidad en los primeros dos dominios de la proteína, sin embargo, la falta del dominio carboxilo terminal en este factor de transcripción (*PrMADS11*), podría explicar la diferencia en la expresión de genes de respuesta. Resalta la presencia de aquellos involucrados en “phosphate starvation”, así como otros factores transcripción que aumentan el nivel de sus transcritos (Tabla 5 y 6). De los genes que son regulados por ambos factores de transcripción podemos nombrar sucrose synthase 4 (SUS4). En *Arabidopsis*, una familia multigénica codifica seis isoformas SUS (SUS1-6). La implicación de SUS en la síntesis de UDP-glucosa y ADP-glucosa ha sido vinculada a la biosíntesis de celulosa y almidón en *Arabidopsis* (Baroja *et al.*, 2012). También rhamnose biosynthesis 3 es regulado positivamente por ambos *PrMADS*. Este gen proporciona ramnosa para la síntesis de la pared celular, así como para la producción de metabolitos secundarios. Su participación en la biosíntesis de la pared celular ha sido propuesta (Madduri *et al.*, 2001). Basic chitinase también es regulado positivamente por ambos *PrMADS*, este gen codifica una proteína implicada en la transducción de señal mediada por etileno que conduce a la inhibición del crecimiento de plántulas y la inducción de la quitinasa en *Arabidopsis* (Chen y Bleecker, 1995). Por otro lado, el gen microtubule-associated proteins 70-5 (MAP70-5) es regulado positiva y específicamente por *PrMADS10*. Este gen regula la pared secundaria en células de

madera. Se ha demostrado que *AtMAP70-5* y *AtMAP70-1* son esenciales para definir los polímeros de pared celular secundaria y son aplicados en el córtex celular de células formadoras de madera (Pesquet *et al.*, 2010). Estos resultados nos sugieren que *PrMADS10* y *PrMADS11*, están regulando positivamente varios genes implicados en la formación de madera, tales como los que codifican proteínas asociadas al metabolismo secundario, síntesis de azúcares o en remodelación de componentes de la pared celular.

El factor de transcripción MYB50 es regulado negativamente por ambos *PrMADS*, pero MYB114 y MYB76 son regulados específicamente por *PrMADS10* y *PrMADS11*, respectivamente (Tabla 7 y 8). Se conoce que estos factores de transcripción regulan positivamente el gen *PAL* y que la regulación coordinada de la ruta de biosíntesis de lignina es mediada por factores de transcripción MYB específicos de lignina (Patzlaff *et al.*, 2003a; Patzlaff *et al.*, 2003b). Estos resultados sugieren que los *PrMADS* podrían estar regulando negativamente la acumulación de lignina en pino radiata, debido a que los genes *MYB* de pino, eucalipto, *Populus* y *Arabidopsis* están filogenéticamente relacionados, existiendo genes ortólogos entre *Populus* y *Arabidopsis* (Zhang *et al.* 2010). Por otro lado, los MYB también están relacionados con la pared celular, y han sido intensamente investigados en diferentes especies, de los cuales se ha mostrado que son los principales “*master switches*” de la biosíntesis de la pared celular secundaria (Wang y Dixon, 2012).

Es interesante la expresión que presenta expansina A8 (EXPA8), que es regulada negativamente y es específica de *PrMADS10*. Las evidencias indican que las expansinas están involucradas en el proceso de formación de la pared secundaria del xilema (Miloni *et al.*, 2001). Otro estudio comparó 6 genes de expansinas identificadas en bibliotecas de ADNc aisladas de tallos inclinados en *P. radiata*, para sugerir su posible mecanismo de acción a nivel molecular. Las estructuras de las proteínas predichas se construyeron mediante la metodología de modelado comparativo. Los resultados sugirieron la participación de diferentes proteínas de expansinas en la diseminación y remodelación de la matriz de la pared celular compleja, durante la respuesta de reorientación a la inclinación en *P. radiata* (Mateluna *et al.*, 2017). Otros genes que son

regulados negativamente por ambos *PrMADS* son proline-rich protein 2 (PRP2) y pectin lyase-like superfamily protein. Sin embargo, genes como cellulose synthase like A15 (CSLA15) y xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 15 (XTH15) son regulados específicamente por *PrMADS11*. Todos estos genes han sido reportado con participación activa en la organización y remodelación de la pared celular (Ihsan *et al.*, 2017). La pared celular está compuesta, entre otros, por polisacáridos (celulosa, hemicelulosa, pectinas), y proteínas. Proline rich proteins (PRPs) y expansinas son algunas de las clases conocidas de proteínas de pared celular con *scaffold* covalente y glicosilación (Boron *et al.*, 2014; Suzuki *et al.*, 2015). Las pectinas son componentes principales de las paredes celulares primarias de las plantas terrestres, que son importantes para mantener la integridad estructural celular (Ridley *et al.*, 2001). También las enzimas participan en la remodelación de la pared celular, incluyendo xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH). Esta enzima modifica xiloglucano, la principal hemicelulosa encontrada en las paredes celulares primarias de arboles de pino (Valenzuela *et al.*, 2014). PrXTH1 fue clonada y caracterizada, presentando actividad transglicosilasa, no así actividad hidrolasa, ello sugiere que ésta enzima extendería el oligosacárido de xiloglucano. La presencia de elementos de respuesta a MADS en la región promotora del gen indicaría que su expresión podría ser regulado por éste factor de transcripción. En las transformantes de Arabidopsis, XTH presentó expresión diferencial, lo cual es concomitante con la presencia de elementos de respuesta al factor de transcripción en el genoma de Arabidopsis.

En *Picea glauca* se observó, por ensayos de microarreglos, la expresión diferencial en xilema de genes, como cellulose synthase like y microtubule-associated protein (Pavi *et al.*, 2008). Además, se obtuvieron secuencias que codifican para factores de transcripción que son regulados positivamente en xilema comparados con acículas y tejido de floema, tales como MYB y bHLH. También es interesante el aislamiento de genes de la familia MADS-box que fueron regulados positivamente en *P. glauca*. Estos mismos genes fueron expresados diferencialmente en los ensayos de esta tesis, por efecto de la expresión constitutiva del factor de transcripción MADS.

Usando árboles adultos de *P. radiata* en respuesta a gravitropismo, se observó que el transcriptoma de xilema fue significativamente alterado, esta alteración ocurrió en la zona de madera de compresión y madera opuesta (Li *et al.*, 2013). En el microarreglo ensayado, se identificó genes implicados en división celular, biosíntesis de celulosa, deposición de lignina, microtubulos, siendo mayormente regulados en la zona del tronco que en madera de compresión. Genes como: Tubulin beta 1, Sucrose synthase, Proline-rich protein, pectin lyase-like fueron expresados diferencialmente en las *Arabidopsis* transgénicas, así como, en árboles adultos de pino (Li *et al.*, 2013).

En *Pinus taeda* se construyó un microarreglo conteniendo aproximadamente un set de 1500 clones-unigenes, con el fin de identificar genes expresados preferencialmente en tejido de xilema en diferenciación (Yang *et al.*, 2004). De todos los genes expresados diferencialmente, cuatro de ellos fueron identificados también en la presente tesis y que corresponden a: Tubulin alpha chain, cellulose synthase gene family, sucrose synthase y expansin. Este grupo de genes son activos, en alguna manera, durante el proceso de remodelación de la pared. Dada la sobre-expresión del factor de transcripción MADS en plantas de *Arabidopsis*, tales genes también podrían estar regulados.

El ensayo de microarreglos también nos permitió establecer qué vías metabólicas de *Arabidopsis* modulaban su expresión al sobreexpresar *PrMADS10* y *PrMADS11* en plantas transgénicas de *Arabidopsis*. Aswath y Kim (2005) manifiestan que la introducción de genes MADS-box en plantas de tabaco o *Arabidopsis* bajo el control de un promotor constitutivo ha demostrado ser una herramienta útil en el análisis de las funciones de estos genes. Como es el caso de la caracterización de un gen llamado *SAG1* de la conífera *Picea mariana*, que es homólogo a *AGAMOUS* (Rutledge *et al.*, 1998). La sobreexpresión de *SAG1* produce conversión homeótica floral en plantas transgénicas de *Arabidopsis* (de sépalo a carpelo y pétalo a estambre). Otro caso, es la sobreexpresión de un gen MADS-box (*PtAP3*) de *Populus tomentosa* en plantas transgénicas de tabaco provoca un fenotipo de crecimiento rápido y floración temprana (An *et al.*, 2011).

El estudio de los genes MADS-box en plantas fue inicialmente impulsado por su importancia en el desarrollo de flores (De Bodt *et al.*, 2003). Los factores de transcripción MADS-box estudiados en diferentes especies de plantas, tales como, AGAMOUS (AG), AGAMOUS-LIKE 1-6 (AGL1-6), APÉTALA 1-3 (AP1-3), PISTILATA (PI) (*A. thaliana*), GLOBOSA (GLO), PLENA (PLE), SQUAMOSA (SQA), DEFICIENS-homologo 24749 (DEFH24/49) (*Antirrhinum majus*), pMADS1-2 (*Petunia hybrida*) están regulando el desarrollo de órgano floral (Shore y Sharrocks, 1995). Por otro lado, en *Populus deltoides* fue aislado un gen MADS-box (*PdPI*), expresado durante el desarrollo de flor y en diferentes órganos vegetativos, sugiriendo que *PdPI* tiene múltiples funciones en el desarrollo de *P. deltoides*. En coníferas, los estudios de expresión indican que los genes MADS-box identificados hasta el momento se transcriben en estróbilos masculinos y femeninos. Algunos también se expresan en órganos vegetativos, tales como el gen *PrMADS3*, AGL6-like de pino de Monterrey (*Pinus radiata*), que también se transcribe en el primordio de la acícula (Mouradov *et al.*, 1998). Durante los últimos años la evidencia apuntó a definir el rol de los MADS-box como reguladores del tiempo de floración, así como también otros procesos reproductivos. Sin embargo, también se expresan en las raíces, tallos y hojas (Aswath y Kim, 2005).

#### **4.5 La sobre-expresión constitutiva de *PrMADS10* y *PrMADS11* regula la ruta de biosíntesis de fenilpropanpides en *Arabidopsis***

Las plantas transgénicas que sobre-expresan los factores de transcripción *PrMADS10* y *PrMADS11* no presentaron los fenotipos antes descritos para MADS-box. Estos factores de transcripción, aún siendo del tipo MADS, no estarían regulando la floración en plantas, sugiriendo otras funciones. Al analizar mediante MapMan la totalidad de los genes regulados diferencialmente por ambos factores de transcripción, se observó distintas categorías funcionales, tales como metabolismo mayor y menor CHO, metabolismo de aminoácidos, metabolismo nucleotídico, fermentación, lípidos, metabolismo secundario y pared celular (Fig. 21). Dentro de la ruta de metabolismo secundario, encontramos la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides, que según nuestra hipótesis estaría siendo regulada por los MADS-box. Se pudo observar que los genes de

ésta vía, mostraron un aumento y disminución diferencial de los niveles de acumulación de transcritos y ésta fue diferente para ambos MADS-box analizados. 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 es el caso de *PAL*, *4CL* y *CCoAOMT*. Sin embargo, *PrMADS10* estaría regulando otros genes *CHS* y *CCR*. Estos genes a excepción de *4CL*, fueron validados mediante qPCR.

Patzlaff *et al.* (2003a) reportaron que el factor de transcripción PtMYB4 reconoce elementos AC del promotor del gen *PAL*, y en plantas transgénicas de tabaco sobreexpresando el gen *PtMYD4*, alteró la acumulación de transcritos correspondientes a los genes que codifican enzimas de biosíntesis de lignina. Además, aumentó la deposición de lignina, y se extendió a otros tipos de células que normalmente no lignifican. Así, se demostró que solamente PtMYB4 era suficiente para inducir lignificación en un sistema heterólogo. En cambio en *Arabidopsis* se han generado plantas transgénicas sobreexpresando PtrMYB3 de *Populus*, observando un incremento en la deposición de celulosa, xilano y lignina (Zhang *et al.*, 2010).

#### **4.6 La sobreexpresión de *PrMADS10* y *PrMADS11* regulan diferencialmente genes de la ruta de biosíntesis de lignina en *Arabidopsis***

Para *PrMADS10* se observó un aumento en los niveles de transcritos del gen *COMT* (Fig. 23), casi en los mismos niveles de *PAL*. Si los niveles de *COMT* aumentan debiera modificar sinapil alcohol, que es el último paso para la síntesis de uno de los monómeros de lignina (siringil). Por otro lado, *PrMADS11* incrementó los niveles de los transcritos para *PAL*, así como también, los 4 genes estudiados de la ruta de monolignoles *CCR*, *CCoAOMT*, *CAD*, *COMT* (Fig. 25) y los de la ruta de flavonoides, reprimiéndose o mantenido sus transcritos basales. Sólo *CHS* incrementó sus transcritos en las líneas T1 y T2 (Fig. 25). De igual forma, si los transcritos de *COMT* y *CAD* aumentan, se esperaría que modifiquen sinapil alcohol y *p*-Coumaril alcohol, etapa final para la síntesis de lignina (siringil y *p*-hidroxifenil, respectivamente). Esto es corroborado por estudios

previos donde se ha sugerido que el nivel de transcripción *C3H* podría ser importante en la dirección del flujo de metabolitos hacia la producción de lignina, y que la transcripción de *CCoAOMT*, *CCR* y *CAD* es modulada de acuerdo con la demanda metabólica (Anterola *et al.*, 2002). El resultado neto del aumento de la transcripción de estos genes puede dar lugar a un aumento en el flujo a través de la porción monolignol de la ruta de biosíntesis de la lignina (Patzlaff *et al.*, 2003a).

Los resultados anteriores sugieren que los factores de transcripción PrMADS10 y PrMADS11 podrían estar regulando positivamente el drenaje de precursores hacia la ruta de biosíntesis de lignina. El análisis mostró que el contenido de lignina en las líneas transgénicas de *PrMADS10* y *PrMADS11* fue superior a las plantas de *Arabidopsis* “wild type” y mock. (Fig. 26). Así, las plantas transgénicas que sobreexpresaron los genes *PrMADS10* y *PrMADS11*, están regulando la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides. La acumulación de transcritos de los genes de la ruta y el análisis del contenido de lignina, sugieren que hay aumento, comparado con los controles de *Arabidopsis*. Ello, podría ser uno de los mecanismos de respuesta a inclinación en pino. Plántulas de un año de pino fueron inclinadas y luego de 15 días mostraron evidencias en la acumulación de lignina y engrosamiento de la pared (Ramos *et al.*, 2013). La modificación en las características de la pared se acelera por la aplicación de etileno. Ello sugiere que la remodelación de la pared puede estar regulada inicialmente por MADS, sin embargo, contribuye en la respuesta un equilibrio hormonal.

Hasta la fecha, la mayoría de las proteínas R2R3-MYB han sido implicadas en el control del metabolismo de fenilpropanoides o la diferenciación celular terminal, y que un subconjunto de proteínas R2R3-MYB podría regular aspectos de la formación del xilema. Por otro lado, cuando se expresan constitutivamente dos genes tipo MADS-box denominados *SHATTERPROOF* (*SHP1* y *SHP2*), controlan la diferenciación de la zona dehiscente y promueven la lignificación de células de órganos reproductivos en *Arabidopsis* (Liljegren *et al.*, 2000). No solo los factores de transcripción MYB y MADS han sido asociados a la regulación de la acumulación de lignina en plantas, también se ha identificado una peroxidasa de *Zinnia elegans* (*ZePrx*), implicada en la biosíntesis de la

lignina (Gabaldón *et al.*, 2005). En este estudio, se encontró que esta peroxidasa es sensible a un aumento de hormonas que controlan la lignificación del xilema. Por otro lado, estudios realizados en *Arabidopsis* sugieren que AtPrx52 está finamente regulado de la misma manera como ZePrx, confirmando la implicación de esta proteína en el biosíntesis de las ligninas (Herrero *et al.*, 2014). Adicionalmente, se reveló que la fibra de algodón provee un excelente sistema para estudiar elongación celular y biosíntesis de pared celular (Li *et al.*, 2011). Para demostrar esto, se expresó constitutivamente *GhMADS11* en levadura, los resultados obtenidos sugieren que la proteína GhMADS11 tiene función en la elongación celular de la fibra, y sus dominios MADS y parcial K-box son suficientes para esta función.

Sumado a las funciones tradicionales de genes del tipo MADS-box (regulación de la floración), se han reportado nuevas funciones en desarrollo vegetal (Aswath y Kim, 2005). Esto incluye la expresión diferencial de estos genes en otros órganos de las plantas, tales como, raíces, tallos y hojas. La presente tesis provee información en la caracterización de dos genes MADS aislados desde tallo de pino radiata y expresados diferencialmente en respuesta a inclinación, que podrían estar regulando la síntesis y acumulación de lignina en *Arabidopsis*. Nuestros hallazgos proporcionan información útil para una mayor exploración de la interacción genética y sugieren mecanismos reguladores complejos implicados en la respuesta a la inclinación del tallo. Del mismo modo, se reporta evidencia del control de genes río abajo que serían modulados por estos MADS-box.

## **V. CONCLUSIONES**

Se logró obtener el largo completo de dos genes que codifican para factores de transcripción tipo MADS-box, una de las secuencias fue nombrada *PrMADS10*, y tiene un marco de lectura abierto de 582 pb, su número de accesoión GenBank es KM887510. A su vez, la otra secuencia nombrada *PrMADS11*, tiene un marco de lectura abierto de 495 pb, y su número de accesoión GenBank es KM887511.

Los análisis de expresión mostraron una respuesta en los niveles de transcritos de *PrMADS10* y *PrMADS11* en plántulas de pino radiata, observándose una tasa de aumento de dos y catorce veces respectivamente. La mayor acumulación ocurrió en la parte inferior del tallo después de 60 minutos de ser sometidos a efecto gravitópico temprano inducido. Lo que demuestra una respuesta rápida de los *PrMADS* después de la inclinación de las plantas de pino.

Se logró producir y purificar proteína recombinante de PrMADS10 y PrMADS11, inducidas en el sistema heterólogo *S. cerevisiae*, pero no se logró determinar si las dos proteínas de interés tienen la capacidad de interactuar con DNA.

Los análisis de expresión relativa de los genes de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides en plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan *PrMADS10* y *PrMADS11*, mostró que ambos factores de transcripción estarían regulando los genes de la rama de biosíntesis de lignina; por otro lado, el análisis del contenido de lignina mostró que sus contenidos totales de lignina fue superior al 30 y 25% para *PrMADS10* y *PrMADS11* respectivamente, al ser comparados contra los controles. Esto nos permite sugerir que los *MADS-box* estudiados estarían regulando la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides, aumentando la acumulación de lignina en plantas.

Los resultados obtenidos en la presente tesis nos permite 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*”.

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 a dos *MADS-box* que desempeñan un rol en tallo, que regulan otros genes, la mayoría de estos genes regulan procesos de formación de pared celular y aumento de la síntesis de lignina en Arabidopsis.

## **VI. BIBLIOGRAFÍA**

Allona, I., Quinn, M., Shoop, E., Swope, K., Cyr, S., Carlis, J., Riedl, J., Retzel, E., Campbell, M., Sederoff, R. and Whetten R. (1998) Analysis of xylem formation in pine by cDNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 95(16):9693-9698.

An, X., Ye, M., Wang, D., Wang, Z., Cao, G., Zheng, H. and Zhang, Z. (2011) Ectopic expression of a poplar APETALA3-like gene in tobacco causes early flowering and fast growth. *Biotechnology Letters*, 33:1239–1247.

Anterola, A., Jeon, J., Davin, L. and Lewis, N. (2002) Transcriptional control of monolignol biosynthesis in *Pinus taeda*: factors affecting monolignol ratios and carbon allocation in phenylpropanoid metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 18272-18280.

Aswath, C. and Kim, S. (2005) Another story of MADS-Box genes - their potential in plant biotechnology. *Plant Growth Regulation*, 46(2), 177–188.

Bagal, U., Leebens-Mack, J., Lorenz, W. and Dean, J. (2012) The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm-specific lineage. *BMC Genomics*, 13(Suppl 3):S1.

Ban, W., Mancosky, D. and Lucia, L. (2004) Evaluation of the pulping response of juvenil and mature black spruce compression wood. *Cellulose Chemistry and Technology*, 38(1-2):79-85.

Baroja, E., Muñoz, F., Li, J., Bahaji, A., Almagro, G., Montero, M., Etxeberria, E., Hidalgo, M., Sesma, M. and Pozueta, J. (2012) Sucrose synthase activity in the *sus1/sus2/sus3/sus4* *Arabidopsis* mutant is sufficient to support normal cellulose and starch production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 109(1):321-326.

Becker, D. and Guarante, L. (1991) High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods in Enzymology*, 194:182-187.

- Becker, A., and Theissen, G. (2003) The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3):464-489.
- Benedetto, A. (2013): Plantaciones forestales efectuadas durante el año 2012. Disponible en: [http://www.conaf.cl/wp-content/files\\_mf/1381758152PlantacionesForestales2012.pdf](http://www.conaf.cl/wp-content/files_mf/1381758152PlantacionesForestales2012.pdf)
- Berthier, S. and Stokes, A. (2005) Righting response of artificially inclined maritime pine (*Pinus pinaster*) saplings to wind loading. *Tree Physiology*, 26: 73–79.
- Besseau, S., Hoffmann, L., Geoffroy, P., Lapierre, C., Pollet, B. and Legrand, M. (2007) Flavonoid Accumulation in *Arabidopsis* Repressed in Lignin Synthesis Affects Auxin Transport and Plant Growth. *The Plant Cell*, 19:148–162.
- Boron, A., Van J., Nektarios, M., Mouille, G., Adriaensen, D., Verbelen, J., Höfte, H. and Vissenberg, K. (2014) Proline-rich protein-like PRPL1 controls elongation of root hairs in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 65(18):5485-95.
- Bustamante, R. and Simonetti, J. (2005) Is *Pinus radiata* invading the native vegetation in Central Chile? Demographic responses in a fragmented forest. *Biological Invasions*, 7:243-249.
- Chaffey, N. (1999) Cambium: old challenges - new opportunities. *Trees* 13:138-151.
- Campbell, M. and Ellis, E. (1992) Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures: Induction of phenylpropanoid metabolism. *Planta*, 186:409-417.
- Chang, S., Puryear, J. and Cairney, J. (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11:113-116.

Chen, Q. and Bleecker, A. (1995) Analysis of Ethylene Signal-Transduction Kinetics Associated with Seedling-Growth Response and Chitinase Induction in Wild-Type and Mutant *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 108:597-607.

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

Cseke, L., Cseke, S., Ravinder, N., Pandey, A. and Podila, G. (2007) Identification of PTM5 protein interaction partners, a MADS-box gene involved in aspen tree vegetative development. *Gene*, 391:209-222.

Cseke, L., Cseke, S., Ravinder, N., Taylor, L., Shankar, A., Sen, B., Thakur, R., Karnosky, D. and Podila, G. (2005) SEP-class genes in *P. tremuloides* and their likely role in reproductive survival of poplar trees. *Gene*, 358:1-16.

Cseke, L., Zheng, J. and Podila, G. (2003) Characterization of PTM5 in aspen trees: a MADS-box gene expressed during woody vascular development. *Gene*, 318: 55–67.

De Bodt, S., Raes, J., Van de Peer, Y. and Theißen, G. (2003) And then there were many: MADS goes genomic. *TRENDS in Plant Science*, 8(10):475-483.

Demura, T. and Fukuda, H. (2007) Transcriptional regulation in wood formation. *TRENDS in Plant Science* 12(2):64-70.

Diaz, J., Fernandez, A., Valenzuela, L. and Torres, M. (2007) Madera de compresión en *Pinus radiata* D. DON: I, Características anatómicas. *Ciencia y tecnología*, 9(1):29-43

Du, S. and Yamamoto, F. (2003) Ethylene evolution changes in the stems of *Metasequoia glyptostroboides* and *Aesculus turbinata* seedlings in relation to gravity-induced reaction wood formation. *Trees*, 17:522-528.

Du, J. and Groover, A. (2010) Transcriptional regulation of secondary growth and wood formation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 1:17-27.

Gautier, L., Cope, L., Bolstad, B. and Irizarry, R. (2004) Affy-analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics*, 20:307-315.

Gramzow, L., and Theissen, G. (2010) A hitchhiker's guide to the MADS world of plants. *Genome Biology*, 11:214.

Hellman, L. and Fried, M. (2007) Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) for Detecting Protein-Nucleic Acid Interactions. *Nature Protocols*, 2(8):1849-1861.

Herrera, R., Krier, C., Lalanne, C., Maodo Ba, E., Stokes, A., Salin, F., Fourcaud, T., Claverol, S. and Plomion, C. (2010) (Not) Keeping the stem straight: a proteomic analysis of maritime pine seedlings undergoing phototropism and gravitropism. *BioMed Central in Plant Biology*, 10: 217.

Hoffmann, L., Besseau, S., Geoffroy, P., Ritzenthaler, C., Meyer, D., Lapierre, C., Pollet, B., and Legrand, M. (2004). Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant Cell*, 16:1446-1465.

INFOR (2017) El sector forestal chileno 2017. Disponible en: [http://wef.infor.cl/sector\\_forestal/sectorforestal.php#/10](http://wef.infor.cl/sector_forestal/sectorforestal.php#/10)

Ihsan, M., Ahmad, N., Shah, Z., Rehman, H., Aslam, Z., Ahuja, I., Bones, A. and Ahmad, J. (2017). Gene Mining for Proline Based Signaling Proteins in Cell Wall of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 8:233.

- Irizarry, R., Bolstad, B., Collin, F., Cope, L., Hobbs, B. and Speed, T. (2003) Summaries of Affymetrix GeneChip probe-level data. *Nucleic Acids Research*, 31(4):1-8.
- Jefferson, R. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 5:387-405.
- Kaufmann, K., Melzer, R., and Theissen, G. (2005) MIKC-type MADS-domain proteins: Structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. *Gene*, 347(2):183-198.
- Kim, D., Bovet, L., Kushnir, S., Noh, E., Martinoia E. and Lee, Y. (2006) AtATM3 Is Involved in Heavy Metal Resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 140:922-932.
- Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Lachaud, S., Catesson A. and Bonnemain, J. (1999) Structure and functions of the vascular cambium. *Comptes Rendus de L'Academie de Sciences - Series III - Sciences de la Vie-Life Sciences*, 8:633-650.
- Le Provost, G., Paiva, J., Pot, D., Brach, J and Plomion, C. (2003) Seasonal variation in transcript accumulation in wood-forming tissues of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) with emphasis on a cell wall glycine-rich protein. *Planta*, 217:820-830.
- Li, X., Yang, X. and Wu, H. (2013) Transcriptome profiling of radiata pine branches reveals new insights into reaction wood formation with implications in plant gravitropismo. *BMC Genomics*, 14:768.

- Li, Y., Ning, H., Zhang, Z., Wu, Y., Jiang, J., Su, S., and Li, X. (2011) A cotton gene encoding novel MADS-box protein is preferentially expressed in fibers and functions in cell elongation. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 43(8):607-617.
- Liljegren, S. J., Ditta, G. S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J. L., and Yanofsky, M. F. (2000) SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in Arabidopsis. *Nature*, 404(6779):766-770.
- Lindstrom, H., Harris, P. and Sorensson, C. (2004) Stiffness and wood variation of 3-year old *Pinus radiata* clones. *Wood Science and Technology*, 38:579-597.
- Liu, C., Chen, H., Er, H., Soo, H., Kumar, P., Han, J., Liou, Y. and Yu, H. (2008) Direct interaction of AGL24 and SOC1 integrates flowering signals in Arabidopsis. *Development*, 135:1481-1491.
- Logemann, E., Birkenbihl, R., Ülker, B. y Somssich, E. (2006) An improved method for preparing Agrobacterium cells that simplifies the Arabidopsis transformation protocol. *Plant Methods*, 2:16.
- Lomagno, J. and Rozas, C. (2001) Determinación de la madera de compresión en *Pinus radiata* D. Don. *Maderas. Ciencia y Tecnología*, 3(1-2):63-67.
- Love, J., Björklund, S., Vahala, J., Hertzberg, M., Kangasjärvi, J. and Sundberg, B. (2009) Ethylene is an endogenous stimulator of cell division in the cambial meristem of Populus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 106(14):5984-5989.
- Madduri, K., Waldron, C. and Merlo, D. (2001) Rhamnose Biosynthesis Pathway Supplies Precursors for Primary and Secondary Metabolism in *Saccharopolyspora spinosa*. *Journal of Bacteriology*, 183(19):5632-5638.

Mast, S., Donaldson, L., Torr, K., Phillips, L., Flint, H., West, M., Strabala T. and Wagner, A. (2009) Exploring the ultrastructural localisation and biosynthesis of  $\beta(1,4)$ -galactan in *Pinus radiata* compression wood. *Plant Physiology*, 150:573-583.

Mateluna, P., Valenzuela, F., Morales, L., Herrera, R. and Ramos, P. (2017) Transcriptional and computational study of expansins differentially expressed in response to inclination in radiata pine. *Plant Physiology and Biochemistry*, 115:12-24.

Milioni, D., Sado, P., Stacey, N., Domingo, C., Roberts, K. and McCann, M. (2001) Differential expression of cell-wall-related genes during the formation of tracheary elements in the *Zinnia* mesophyll cell system. *Plant Molecular Biology*, 47:221-238.

Mouradov, A., Hamdorf, B., Teasdale, R., Kim, J., Winter, K. and Theißen G. (1999a) A *DEF/GLO*-like MADS-Box Gene From a Gymnosperm: *Pinus radiata* Contains an Ortholog of Angiosperm B Class Floral Homeotic Genes. *Developmental Genetics*, 25:245-252.

Mouradov, A., Glassick, T., Hamdorf, B. and Teasdale, R. (1999b) Molecular control of early cone development in *Pinus radiata*. *Protoplasma*, 208:3-12.

Mouradov, A., Glassick, T., Hamdorf, B., Murphy, L., Marla, S., Yang, Y., and Teasdale, R. (1998) Family of MADS-box genes expressed early in male and female reproductive structures of Monterey pine. *Plant Physiology*, 117:55-61.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.

Nanayakkara, B. (2007) Chemical characterization of compression wood in plantation grown *Pinus radiata*. PhD thesis. University of Waikato, 187 p.

NATURE METHODS (2008) Protein production and purification. *Nature Publishing Group*, 5(2):135-146.

Olmos, S. (2004) Selección asistida por marcadores moleculares y su aplicación en el mejoramiento genético de trigo. *Agrotecnia*, 12:23-31.

Parenicova, L., Folter, S., Kieffer, M., Horner, D., Favalli, C., Busscher, J., Cook, H., Ingram, R., Kater, M., Davies, B., Angenent, G. and Colombo, L. (2003) Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in Arabidopsis: new openings to the MADS world. *The Plant Cell*, 15:1538-1551.

Patzlaff, A., McInnis, S., Courtenay, A., Surman, C., Newman, L., Smith, C., Bevan, M., Mansfield, S., Whetten, R., Sederoff, R. and Campbell, M. (2003a) Characterisation of a pine MYB that regulates lignification. *The Plant Journal*, 36:743-754.

Patzlaff, A., Newman, L. J., Dubos, C., Whetten, R. W., Smith, C., McInnis, S. and Campbell, M. (2003b) Characterisation of Pt MYB1, an R2R3-MYB from pine xylem. *Plant Molecular Biology*, 53(4):597-608.

Pavy, N., Boyle, B.,<sup>1</sup> Nelson, C., Paule, C., Giguère, I., Caron, S., Parsons, L., Dallaire, N., Bedon, F., Bérubé, H., Cooke, J. and Mackay, J. (2008) Identification of conserved core xylem gene sets: conifer cDNA microarray development, transcript profiling and computational analyses. *New Phytologist*, 180:766-786.

Pesquet, E., Korolev, A., Calder, G. and Lloyd, C. (2010) The microtubule-associated protein AtMAP70-5 regulates secondary wall patterning in Arabidopsis wood cells. *Current Biology*, 20(8):744-749.

Plomion, C., Richardson, T. and Mackay, J. (2005) Advances in forest tree genomics. *New Phytologist*, 166:713-717.

- Plomion, C., Leprovost, G. and Stokes, A. (2001) Wood formation in trees. *Plant Physiology*, 127:1513-1523.
- Plomion, C., Pionneau, C., Brach, J., Costa, P., and Bailleres, H. (2000) Compression wood responsive proteins in developing xylem of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Plant Physiology*, 123(3): 959-970.
- Ramos, P., Guajardo, J., Moya-León, M. and Herrera, R. (2016) A differential distribution of auxin and flavonols in radiata pine stem seedlings exposed to inclination. *Tree Genetics and Genomes*, 12:42.
- Ramos, P. and Herrera, R. (2013) Anatomical changes of xylem cells in stem of *Pinus radiata* seedlings exposed to inclination and ethylene. *Biologia Plantarum*, 57(3):525-530.
- Ramos, P., Le Provost, G., Gantz, C., Plomion, C. and Herrera, R. (2012) Transcriptional analysis of differentially expressed genes in response to stem inclination in young seedlings of pine. *Plant Biology*, 14(6):923-933.
- Ramos, P. (2010) Activación de genes en la respuesta gravitrópica y papel de biosíntesis y transducción de señales hormonales del etileno en *Pinus radiata* D. DON. Tesis Doctoral. Universidad de Talca, Chile. 169 p.
- Remans, T., Smeets, K., Opdenakker, K., Mathijsen, D., Vangronsveld, J. and Cuypers, A. (2008) Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. *Planta*, 227:1343-1349.
- Riechmann, J., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O., Samaha, R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J., Ghandehari, D., Sherman, B. and Yu, G. (2000) *Arabidopsis* transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290:2105-2110.

- Riechmann, J., Krizek, B. and Meyerowitz, E. (1996) Dimerization specificity of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA, and AGAMOUS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 93:4793-4798.
- Ridley, B., O'Neill, M. and Mohnen, D. (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57:929-967.
- Rutledge, R., Regan, S., Nicolas, O., Fobert, P., Cote, C., Bosnich, W., Kauffeldt, C., Sunohara, G., Seguin, A. and Stewart, D. (1998) Characterization of an *AGAMOUS* homologue from the conifer black spruce (*Picea mariana*) that produces floral homeotic conversions when expressed in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 15:625-634.
- Sablowski, R., Moyano, E., Culianez-Macia, F., Schuch, W., Martin, C. and Bevan, M. (1994) A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes. *The EMBO Journal*, 13:128-137.
- Schrader, J., Baba, K., May, S., Palme, K., Bennett, M., Bhalerao, R. and Sandberg, G. (2003) Polar auxin transport in the wood-forming tissues of hybrid aspen is under simultaneous control of developmental and environmental signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100:10096-10101.
- Shore, P. and Sharrocks, A. (1995) The MADS-box family of transcription factors. *European Journal of Biochemistry*, 229:1-13.
- Silva, C., Puranik, S., Round, A., Brennich, M., Jourdain, A., Parcy, F., Hugouvieux, V. and Zubieta, C. (2015) Evolution of the Plant Reproduction Master Regulators LFY and the MADS Transcription Factors: The Role of Protein Structure in the Evolutionary Development of the Flower. *Frontiers in Plant Science*, 6:1193.

- Sharrocks, A., Gille, H. and Shaw, P. (1993) Identification of amino acids essential for DNA binding and dimerization in p67<sup>SRF</sup>: Implications for a novel DNA-binding motif. *Molecular and Cellular Biology*, 13:123-132.
- Smaczniak, C., Immink, R., Angenent, G. and Kaufmann, K. (2012) Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development*, 139:3081-3098.
- Stracke, R., Werber, M. and Weisshaar, B. (2001) The *R2R3-MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology*, 4:447-456.
- Suzuki, H., Oshita, E., Fujimori, N., Nakajima, Y., Kawagoe, Y. and Suzuki, S. (2015) Grape expansins, VvEXPA14 and VvEXPA18 promote cell expansion in transgenic *Arabidopsis* plant. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 120:1077-1085.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24 (8):1596-1599.
- Tandre, k., Svenson, M., Svensson, M. and Engström, P. 1998. Conservation of gene structure and activity in the regulation of reproductive organ development of conifers and angiosperms. *The Plant Journal*, 15(5):615-623.
- Teixeira, P., Thomazella, D., Reis, O., Vital do Prado, P., Scatolin do Rio, M., Lorencini, G., Lacerda, G., Negri, V., Costa, J., Mieczkowski, P. and Guimarães, G. (2014) High-Resolution Transcript Profiling of the Atypical Biotrophic Interaction between *Theobroma cacao* and the Fungal Pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *The Plant Cell*, 26(11):4245-4269.

Thimm, O., Blaesing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L., Rhee, S. and Stitt, M. (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal*, 37:914-939.

Timell, T. (1986) Compression wood in gymnosperms: its causes and control. Springer-Verlag 2150 p.

Tuominen, H., Sitbon, F., Jacobsson, C., Sandberg, G., Olsson, O., and Sundberg, B. (1995) Altered Growth and Wood Characteristics in Transgenic Hybrid Aspen Expressing Agrobacterium-Tumefaciens T-DNA Indoleacetic-Acid Biosynthetic Genes. *Plant Physiology*, 109(4):1179-1189.

Usadel, B., Nagel, A., Thimm, O., Redestig, H., Blaesing, O., Palacios-Rojas, N., Selbig, J., Hannemann, J., Piques, M. and Steinhauser, D. (2005) Extension of the visualization tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, display of corresponding genes, and comparison with known responses. *Plant Physiology*, 138:1195-204.

Valenzuela, C., Ramos, P., Carrasco, C., Moya, M. and Herrera, R. (2014) Cloning and characterization of a xyloglucan endo-transglycosylase/hydrolase gene expressed in response to inclination in radiata pine seedlings. *Tree Genetics & Genomes*, 10:1305-1315.

Walden, A., Wang, D., Walter, C. and Gardner, R. (1998) A large family of TM3 MADS-box cDNAs in *Pinus radiata* includes two members with deletions of the conserved K domain. *Plant Science*, 138:167-176.

Wang, H. and Dixon, R. (2012) On-off switches for secondary cell wall biosynthesis. *Molecular Plant*, 5(2):297-303.

Whetten, R., Sun, Y., Zhang, Y. and Sederoff, R. (2001) Functional genomics and cell wall biosynthesis in loblolly pine. *Plant Molecular Biology*, 47(1-2):275-91.

Yakhnin, A., Yakhnin, H. and Babitzke, P. (2012) Gel Mobility Shift Assays to Detect Protein–RNA Interactions. *Methods in Molecular Biology*, 905:201-211.

Yang, S., Zyl, L., No, E. and Loopstra, C. (2004) Microarray analysis of genes preferentially expressed in differentiating xylem of loblolly pine (*Pinus taeda*). *Plant Science*, 166:1185-1195.

Yeh, T. (2005) Chemical and structural characterizations of juvenile wood, mature wood, and compression wood of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) PhD thesis. North Carolina State University 196 p.

Young, W., Laidlaw, R. and Packman, D. (1970) Pulping in british-grown softwood. Pt. VI. The pulping properties of sitka spruce compression wood. *Holzforschung*, 3:86-98.

Zhang, B., Su, X. and Zhou, X. (2008) A MADS-box gene of *Populus deltoides* expressed during flower development and in vegetative organs. *Tree Physiology*, 28:929-934.

Zhang, J., Elo, A. and Helariutta, Y. (2010) Arabidopsis as a model for wood formation. *Current Opinion in Biotechnology*, 22:1-7.

Zhang, X., Asiedu, C., Supakar, P. and Ehrlich, M. (1992) Increasing the activity of affinity-purified DNA binding proteins by adding high concentrations of nonspecific proteins. *Analytical Biochemistry*, 201:366-74.

Zhang, X., Henriques, R., Lin, S., Niu, Q. and Chua, N. (2006) Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols*, 1(2):1-6

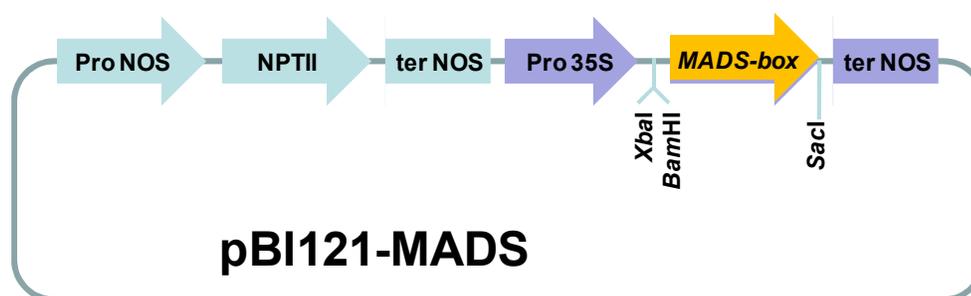
Zhong, R., Lee, C., and Ye, Z. (2010) Evolutionary conservation of the transcriptional network regulating secondary cell wall biosynthesis. *Trends in Plant Science*, 15(11):625-632.

## **VII. ANEXOS**

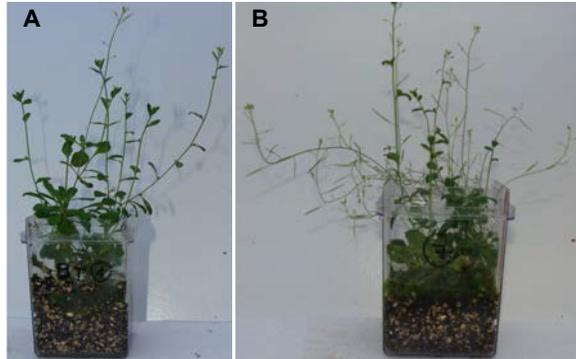
**ANEXO 1.** Composiciones de mezclas de aminoácidos empleados para la elaboración de medio YMM.

<b>Mezcla aminoácidos 1 (0.1 gL<sup>-1</sup> c/u)</b>	<b>Mezcla aminoácidos 2 (0.05 gL<sup>-1</sup> c/u)</b>
Adenina	Ácido aspártico
Arginina	Histidina
Cisteína	Isoleucina
Leucina	Metionina
Lisina	Fenilalanina
Treonina	Prolina
Triptófano	Serina
Uracilo	Tirosina
	Valina

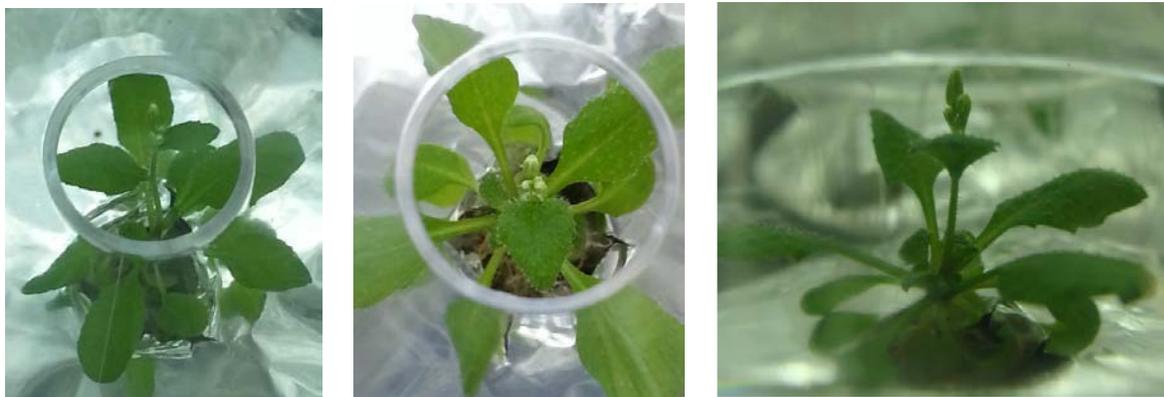
**ANEXO 2.** Representación esquemática del vector binario pBI121 para la sobreexpresión de dos *PrMADS-box* en plantas transgénicas de Arabidopsis.



**ANEXO 3.** Plantas transgénicas T1 de Arabidopsis. (A) *35S::PrMADS10* (B) *35S::PrMADS11*



**ANEXO 4.** Plantas transgénicas T2 de Arabidopsis *35S::PrMADS10* en medio de cultivo MS. Plántulas de Arabidopsis después de 7 días de aclimatización en cámara de crecimiento, y 26 días en total desde que se sembraron las semillas en placas con MS+Kan.



**ANEXO 5. Clasificación de las categorías funcionales para *MADS-box* obtenidos mediante MapMan. Comparación de genes regulados diferencialmente por *PrMADS10* y en común con *PrMADS11* (A), y genes regulados diferencialmente por *PrMADS11* y en común con *PrMADS10* (B).**

