
ALTERACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PROTEÍNAS DE ARABINOGALACTANO (AGPS) DE ARABIDOPSIS THALIANA POR EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN MADS-10 DE PINUS RADIATA D. DON

**TAMARA IVONNE MÉNDEZ CASTRO
DOCTORADO EN CIENCIAS
(MENCIÓN EN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL)**

RESUMEN

Pinus radiata es una especie leñosa, ampliamente distribuida en Chile, con una gran adaptabilidad a distintas condiciones ambientales, sin embargo, el establecimiento de plantaciones en laderas o zonas afectas por fuertes vientos, promueve la pérdida de verticalidad del tallo, generando un crecimiento excéntrico del tronco. Ello constituye un problema importante para la industria forestal. Plántulas de pino de un año han sido inclinadas con un ángulo de 45°. En la zona inferior del tronco se ha reportado la expresión diferencial del factor de transcripción PrMADS10, lo cual ocurre a tiempos tempranos de inclinación. Al sobreexpresar este PrMADS10 en *Arabidopsis*, bajo el control del promotor CaMV::35S, fue posible observar cambios significativos en la expresión de genes que podrían estar modulados por este factor de transcripción. Un grupo de estos genes se relacionan a modificaciones de pared celular (EXPA8-EXT3), como es el control de los ángulos de las fibrillas de celulosa (FLA11), la adhesión, proteínas altamente glicosiladas denominadas hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs), donde están clasificadas las proteínas de arabinogalactano (AGPs) y dentro de estas fasciclin-like con dominio FAS que les otorga adhesión celular. Los resultados mostraron una alta significancia, considerándose aquellos que presentaron un p-value <0.05 y algunos factores de transcripción como MAP70.5 y genes que están involucrados en respuesta a estrés como es deficiencia de fosfato. Para esto se solicitó líneas de *Arabidopsis* que tuviesen inserto T-DNA, se genotipó y se realizó cortes histológicos con tinciones para observar si esto se relaciona a la acumulación de lignina, comparado con tinción de floroglucinol en líneas 35S. En plantas leñosas como álamo y eucaliptus, se ha reportado una mayor concentración de AGPs en madera de tensión que es análoga a la de compresión en gimnospermas. A su vez, se caracterizó mutantes de AtFLA11 en

Arabidopsis, observando resistencia a tracción en tallo. Se presume que este tipo de proteína de arabinogalactano pueda estar involucrada en la remodelación de la pared en pino y facilite la recuperación del crecimiento normal del tallo. Con estos antecedentes se propone la siguiente hipótesis: “El factor de transcripción MADS10 de *Pinus radiata* D. Don altera diferencialmente la expresión y cantidad de proteínas de arabinogalactanos (AGPs) en *Arabidopsis thaliana*”. Para someter a prueba esta hipótesis, se evaluó el efecto de inducir la expresión de PrMADS10 en un sistema heterólogo como es *Arabidopsis thaliana*, considerando al menos cuatro líneas sobrepresoras, que se analizaron mediante microarreglo, a partir de esto se buscaron elementos en cis in silico en la zona promotora de los genes candidatos. Se cuantificó la concentración de AGPs totales en muestras de líneas sobreexpresadas versus el control, a su vez se indagó la búsqueda de secuencias de fasciclin-like en datos de pino de 11 a más años versus datos de RNA-seq de pino al ser inclinado a 45°, encontrando al menos 12 secuencias completas, las que fueron clasificadas por filogenia. Esta propuesta espera dar luces sobre el rol que PrMADS10 podría jugar en la respuesta a pérdida de verticalidad.

ABSTRACT

Pinus radiata is a woody species, widely distributed in Chile, with great adaptability to different environmental conditions, however, the establishment of plantations on slopes or areas affected by strong winds, promotes the loss of verticality of the stem, generating an eccentric growth of the trunk. This is a major problem for the forestry industry. One year old pine seedlings have been tilted at a 45° angle. Differential expression of the transcription factor PrMADS10 has been reported in the lower part of the trunk, which occurs at early times of inclination. By overexpressing PrMADS10 in *Arabidopsis*, under the control of the CaMV::35S promoter, significant changes in the expression of genes that could be modulated by this transcription factor was observed. A group of these genes are related to cell wall modifications (EXPA8-EXT3), such as those that control cellulose fibrils angles (FLA11); adhesion, highly glycosylated proteins called hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs). Within this group of proteins Arabinogalactan proteins (AGPs) were found, which are classified and within them fasciclin-like with FAS domain gives the property of cell adhesion. Results showed significant differences for a group of genes. Transcription factors such as MAP70.5 and genes involved in response to stress such as phosphate starvation were those that presented a p value <0.05. *Arabidopsis* lines that had a T-DNA insert were requested from seeds libraries. The plants were genotyped and histological sections were made to observe changes in the cell wall, correlating the accumulation of lignin, compared with floroglucinol to *Arabidopsis* PrMADS10::35S lines. In woody plants such as poplar and eucalyptus, a higher concentration of AGPs have been reported in tension wood, analogous to what is observed in gymnosperms as compression wood. In turn, AtFLA11 mutants have been characterized in *Arabidopsis*, observing stem tensile strength. It is presumed that this type of arabinogalactan protein may be involved in cell Wall remodeling in pine and facilitate the recovery of normal stem growth. Based on this background, the following hypothesis is proposed: "The MADS10 transcription factor from *Pinus radiata* D. Don differentially alters the expression and quantity of arabinogalactan proteins (AGPs) in *Arabidopsis*

thaliana." To test this hypothesis, the effect of inducing the expression of PrMADS10 in a heterologous system such as *Arabidopsis thaliana* was evaluated, considering at least four over-expressing lines, which were analyzed by microarray, also cis elements were searched in silico in the promoter region of candidate genes. The concentration of total AGPs was quantify in overexpressed lines compared to control, in turn, fasciclin-like sequences in pine were searched from 11 years old tree and compared to the RNA-seq data obtained when pine was inclined at 45°. Twelve complete fascilin sequences were found, which were phylogeny classified. This proposal gives light on the role that PrMADS10 could play in response to loss of verticality.