



Instituto de ciencias biológicas

Programa de Doctorado en Ciencias, mención Ingeniería Genética Vegetal

**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

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

Director

Dr Raúl Simón Herrera Faúndez

Septiembre, 2021

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, 2022

“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”

“Alteration in the expression of genes encoding arabinogalactan proteins (AGPs) from *Arabidopsis thaliana* by the *MADS-10* transcription factor from *Pinus radiata* D. Don”

Candidata a Doctor: Tamara Ivonne Méndez Castro

Fecha inicio: Marzo 2014

Fecha término: Septiembre 2021

Profesor guía:

Dr. Raúl Simón Herrera Faúndez

Instituto de ciencias biológicas

Universidad de Talca

2 Norte 685, Casilla 747, Talca

raherre@utalca.cl

Integrantes de la Comisión Evaluadora:

Dr. Javier Canales

Instituto de Bioquímica y Microbiología

Universidad Austral de Chile

Dr. Carlos Figueroa Lamas

Instituto de Ciencias Biológicas

Universidad de Talca

Dr. Rubén Almada

Centro de Estudios Avanzados en Fruticultura (CEAF)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de Talca por apoyarme en mis estudios con la beca Universidad de Talca, por apoyar junto al programa de doctorado las inscripciones a congresos y los gastos que ello conllevó, a su vez por co-financiar parte de mi pasantía en INRA Montpellier.

Quisiera agradecer a los doctores María Alejandra Moya y Raúl Herrera por acogerme en su grupo de laboratorio. Al proyecto Fondecyt Regular 1100612, Fondecyt Regular 1150964, Fondecyt Regular 1201011, por todo el apoyo brindado en compra de insumos, co-financiar pasantía a Francia.

Agradecer a su vez al Dr Christian Dubos, Nataly Berger, por todo el apoyo brindado en INRA Montpellier, Francia. Al Dr Rodrigo Gutierrez y Dra Alejandra Vega por su colaboración con microarreglo, al Dr Patricio Ramos, Dr Carlos Gaete y Dra Daniela Urbina, por estar disponibles a dudas, técnicas y consejos.

A mis compañeros de generación Gabriel, Oscar, Ana Carolina, Claudia y en especial a mi amiga Carolina Parra, por su aingo y perseverancia, fueron un gran apoyo en tiempos en que tuvimos clases juntos y en otras instancias a dudas y apoyo emocional. A Carolina Galleguillos por su compañía en los laboratorios virtuales y su amistad en conjunto con Rasme Hereme. A mis compañeros de laboratorio y colegas bioinformáticos Cristian Carrasco, Angela Méndez, Luis Morales ya Doctores del programa, a Yasmina Stappung por su amistad y por ser un pilar fundamental en la elaboración de mi tesis.

No podría ser todo posible sin el apoyo de Victoria Ruz y directores de escuela Dr Simón Ruiz y Dr Carlos Figueroa, gracias por la gestión.

Y principalmente, agradecer a mi familia y amigos, por estar presentes en todo momento, ha sido un camino difícil de transitar, pero sin ustedes nada habría sido igual.

INDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN GENERAL	8
FORMULACIÓN DEL MARCO TEÓRICO	8
2 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	9
2.1 <i>PINUS RADIATA</i> D.DON O PINO MONTERREY	9
2.2 FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN PRMADS10	10
2.3 MICROARREGLO	13
2.4 GENOTIPADO	14
2.5 PROTEÍNAS RICAS EN HIDROXIPROLINA	14
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
4. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS	18
5.1 OBJETIVO GENERAL	18
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
CAPÍTULO 1	19
INTRODUCCIÓN	19
MATERIALES Y METODOS	22
EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE MICROARRAYS AFFYMETRIX ATH1	23
MICROARREGLO	24
CLASIFICACIÓN FUNCIONAL BASADA EN MAPMAN	24
STRING RED DE INTERACCIÓN	24
FILOGENIA Y PREDICCIÓN DE ELEMENTOS EN CIS	25
EXTRACCIÓN DE ARN Y QPCR	25
SÍNTESIS DE CDNA Y QPCR	26

RESULTADOS	26
SECUENCIA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE <i>PrMADS10</i>	26
MODULACIÓN GENÉTICA EN ARABIDOPSIS QUE SOBREEEXPRESA <i>PrMADS10</i>	29
ANÁLISIS DE INTERACCIÓN DE REDES EN ARABIDOPSIS QUE SOBREEEXPRESA <i>PrMADS10</i> .	36
ANÁLISIS DE MICROÁRREGLO, VISIÓN GLOBAL MEDIANTE REDES	39
ELEMENTOS EN CIS DE UNIÓN A MADS-BOX.	48
DISCUSION	50

CAPÍTULO 2 **59**

INTRODUCCION	59
DESCRIPCIÓN DE LÍNEAS SALK	60
LÍNEAS SAIL	66
LÍNEAS WISC	67
LÍNEAS GABI-KAT	68
MATERIALES Y METODOS	70
MATERIAL VEGETAL	70
DISEÑO EXPERIMENTAL	71
CONDICIÓN DE CRECIMIENTO PLANTAS EN INRA, MONTPELLIER	74
PREPARACIÓN MEDIO MURASHGE & SKOOG (MS) PARA 1L	74
DESINFECCIÓN DE SEMILLAS	74
DISPERSIÓN DE SEMILLAS	75
GENOTIPADO	75
CONDICIÓN DE CRECIMIENTO PLANTAS EN UNIVERSIDAD DE TALCA	77
EXTRACCIÓN DE ARN Y QPCR	77
SÍNTESIS DE CDNA Y QPCR	78
TASA DE GERMINACIÓN, MEDICIÓN DE PLANTAS Y CONTEO DE HOJAS	78
CORTES Y TINCIÓN	79
FLOROGLUCINOL (PH-HCL)	79
TINCIÓN DE MAÛLE	80
RESULTADOS	80
GENOTIPADO MUTANTES	80
PCR CUANTITATIVA	85
TINCIÓN	87
MEDICIONES FENOTÍPICAS DE PLANTAS 35S:PRMADS10	92
TINCIÓN CON FLOROGLUCINOL LÍNEAS 35S	93
DISCUSION	95

CAPITULO 3 **102**

INTRODUCCION	102
METODOLOGIA	111

ANÁLISIS DE SECUENCIAS	111
ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS , ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y PREDICCIÓN DE MOTIVOS	112
CRIOSECCIÓN	112
EXTRACCIÓN DE AGP	113
INMUNOMARCAJE Y TINCIÓN	114
MICROSCOPIA CONFOCAL	114
RESULTADOS	115
DETERMINACIÓN DE AGPs TOTAL E IDENTIFICACIÓN DE EPÍTOPES	126
DISCUSION	130
CONCLUSIONES	135
CONCLUSIONES GENERALES	137
PRESENTACION A CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES	140
ARTÍCULO CIENTÍFICO	141
REFERENCIAS	142

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 sobreexpresoras, 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 quantified 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 fasciclin sequences were found, which were phylogeny classified.

This proposal gives light on the role that *PrMADS10* could play in response to loss of verticality.

INTRODUCCIÓN GENERAL

FORMULACIÓN DEL MARCO TEÓRICO

Algunas plantas pueden cambiar su orientación y/o crecimiento en respuesta a algún tipo de estrés ambiental (como por ejemplo, luz, nieve, viento, gravedad, flexión artificial), como lo hacen los girasoles al seguir la luz (fototropismo). En el caso de los árboles como es pino, enfrenta diversos tipos de estrés en las plantaciones establecidas entre la sexta y décima región. Los árboles en campo se ven afectados a pendientes, fuertes ráfagas de viento tanto en costa, depresión intermedia y cordillera, y nieve en algunos casos. Lo que conlleva a que frente a este tipo de estímulos ambientales, se presente una respuesta a la de pérdida de verticalidad, generando madera de reacción, conocida en angiospermas como madera de tensión y en gimnospermas como madera de compresión, lo cual induce cambios morfológicos expresados en una mayor proporción de lignina, traqueidas redondeadas, ausencia de pared S₃, mayor ángulo fibrilar en pared S₂, presencia de espacios intercelulares, y una reducción en la proporción de lignina en la lámina media, observado en árboles de 22 años (Diaz-vaz et al., 2007).

La restitución de la verticalidad del tronco se divide en 3 pasos secuenciales: percepción de la gravedad, transducción de la señal y respuesta de crecimiento diferencial (Fukaki and Tasaka, 1999; Ramos et al., 2012a).

Por otro lado, la respuesta gravitrópica está mediada por genes y proteínas, que dan cuenta de un aumento en los contenidos de lignina, cambios morfológicos de las células del xilema, traqueidas y de los ángulos de fibra de celulosa (Allona et al., 1998b; Herrera et al., 2010; Zobell et al., 2010).

Recientemente, se ha reportado que el factor de transcripción (FT) de la familia MADS-BOX denominado *PrMADS10*, se expresa diferencialmente en tallo inclinado (Ramos et al., 2012b), el cual reconoce sitios del DNA denominadas CArG-box. Este FT podría estar implicado en modular la respuesta a inclinación dado que su perfil de expresión alcanza el máximo de expresión en la acumulación de transcritos en tiempos tempranos a una hora de 3,3 veces y de 3 veces dos horas de la inclinación.

2 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1 Pinus radiata D. Don o Pino Monterrey

Pinus radiata D. Don es una de las especies arbóreas ampliamente distribuida en nuestro país, correspondiendo al 61% de las plantaciones forestales (2019), pertenece a la familia de las *pináceas*, género *Pinus*. Es una gimnosperma (planta vascular y espermatofita con producción de semillas desnudas). Éstas plantas presentan una mayor altura y grosor de tronco que en su lugar de origen (Li et al., 2009a).

Es un organismo diploide ($2n=24$) que posee una alta variación genética (Devey et al., 1996). Es originario de Estados Unidos de América (estado de California), el cual se ha introducido en distintos países (España, Nueva Zelanda), llegando a la ciudad de Concepción en Chile en 1888 (Li et al., 2009a). Su genoma es de gran tamaño, el promedio del género es de 29 pg lo que es igual a 28362Mbp (Niu et al., 2013) que es bastante mayor si se compara con angiospermas que van de 540 a 2000 Mbp (Niu et al., 2013) por lo cual dificulta la secuenciación del mismo y hasta la fecha se ha trabajado con SSH (Ramos et al., 2012a), microarreglo (Cruz, Méndez et al., 2019; Li et al., 2012) y RNA-seq de pino (datos no publicados).

La especie se adapta con facilidad a las distintas condiciones edafoclimáticas del país. Sin embargo, la calidad de suelo, pendiente y variabilidad climática a que se ven expuestas las plantaciones de pino en Chile, inducen un crecimiento anormal del tronco o tallo por gravitropismo. Las plantaciones están afectas a distintos estímulos ambientales, tales como fuertes vientos y nieve (Ramos et al., 2012), generando una pérdida de crecimiento vertical del tronco, afectando la calidad de la madera, con lo cual disminuyen los retornos de las empresas forestales. Se ven afectados procesos durante el tratamiento de la pulpa, el comportamiento físico y mecánico de tableros de fibras y de partículas, incide sobre la permeabilidad de la madera y curvas de secado (Diaz-vaz et al., 2007).

2.2 Factor de transcripción PrMADS10

PrMADS10 se expresa diferencialmente en el sector inferior del tallo en plántulas de un año sometidas a inclinación (Cruz, Méndez et al., 2019), donde se presenta una mayor proporción de lignina, traqueidas redondeadas, observándose al hacer cortes transversales y teñir con solución de fluroglucinol-HCl (Ramos y Herrera, 2013). Es un FT del tipo MADS-box, que juegan papeles importantes en una amplia diversidad de organismos eucariotas. En plantas se ha comprobado que participan en desarrollo floral, principalmente lo que se conoce como el modelo ABC (Immink et al., 2010). Su acrónimo proviene de las iniciales de los genes de *MINICHROMOSOME MAINTENANCE1* (*MCM1*) que se requiere para la respuesta a feromonas en *Saccharomyces cerevisiae*, gen *AGAMOUS* (*AG*) de *Arabidopsis thaliana*, el gen *DEFICIENS* (*DEF*) de *Antirrhinum majus*, ambos genes involucrados en el desarrollo de órganos florales y el gen *SERUM RESPONSE FACTORS* (*SRF*) de *Homo sapiens* implicado en

la transcripción de genes específicos de músculo (De Bodt et al., 2003; Curto-Prieto, 2003).

En plantas, se reconocen dos subfamilias génicas para MADS-box: tipo I y tipo II. La subfamilia tipo I se dividen a su vez en 3 grupos ($M\alpha$, $M\beta$ y $M\gamma$) en función de la presencia o ausencia de motivos conservados en la región carboxilo-terminal de la proteína (De Bodt et al., 2003; Yoo et al., 2006). Por otra parte, la subfamilia génica tipo II se ha dividido en los grupos MICK^C y MICK*.

Estos tienen cuatro dominios: dominio conservado MADS (M) de una longitud aproximada de 60 residuos aminoacídicos que tiene una estructura secundaria α -hélice seguida de una hoja β -plegada y posee la capacidad de unirse al DNA. A continuación, se encuentra el dominio variable de interferencia (I) que consiste de aproximadamente 30 residuos aminoacídicos. Luego, sigue el dominio queratina-like (K) que participa en interacciones proteína-proteína y está constituido por tres estructuras de tipo α -hélice. Por último, la región C-terminal o dominio C continúa con una estructura de α -hélice, siendo la sección más variable y tiene por función formar complejos de proteínas (Zobell et al., 2010).

La diferenciación entre los grupos MICK^C y MICK*, se debe al número de exones en el dominio I y las diferencias estructurales en el dominio K (Henschel et al., 2002; Jiménez et al., 2009). A su vez, el grupo MICK* pueden dividirse en clase S y clase P.

Los FT MADS-box actúan como homo o heterodímeros y se unen a la caja CArG (5'-CC(A/T)6GG-3') de elementos en *cis* localizados en secuencias promotoras de genes blancos (Zobell et al., 2010).

La secuencia de PrMADS10 tiene un CDS de 582 pb que en base a clasificación por filogenia, se agrupa con FTs tipo II, principalmente del tipo MICK*, además, mediante expresión relativa,

es posible evidenciar que la mayor acumulación de transcritos se produce en el lado inferior de plantulas de un año de pino.

Se ha reportado que genes clasificados en el grupo MICK*, participan en la formación de carpelos, sépalos, pistilo y estambre, como así también, existen aquellos que actúan como represores, durante la transición floral (Crevillén y Dean, 2011; Mouradov et al., 1998a). A su vez, en tejido vegetativo, genes como *StMADS11* y *StMADS16*, presentan alta expresión en todos los estadios de desarrollo de *Solanum tuberosum*, similares a *AtAGL15* que se expresa en desarrollo embrionario y germinación de semillas, o como *AtAGL17* el cual presenta una mayor expresión en tejido radicular, llamados genes “huérfanos” (Carmona et al., 1998; Kim et al., 2005). Estos genes en el caso de gimnospermas, participan en la transición vegetativa de fase juvenil a reproductiva (Theissen et al., 1996) .

Como la acumulación de transcritos de *PrMADS10* ocurre a tiempos tempranos de las plántulas inclinadas (una hora a 2,5 horas) y en tallo inferior, se presume que podría estar involucrado en gatillar la expresión o represión de genes de pared celular. Pudiendo ser, en parte responsable, que se reestablezca el crecimiento vertical del tallo.

Si bien, la mayor de los genes MADS-box se expresan en floración y otros procesos reproductivos, como se expuso anteriormente, hay evidencia de que también se expresan en raíz, hojas (*AtSVP*) (Aswath y Kim, 2005a). Se han identificado factores de transcripción del tipo MADS-box en *Populus deltoides*, expresados durante el desarrollo floral y órganos vegetativos (Zhang et al., 2008a). En contraste, se identificó un gen MADS-box de tejido vascular específico en *P. tremuloides* (*PTM5*) (Cseke et al., 2003a), que se expresa en la diferenciación de xilema primario-secundario y floema. Por lo tanto, los MADS-box están asociados principalmente en floración, sin embargo, en pino, a la fecha hay 11 MADS-box reportados donde al menos 2 se

expresan en tallo (*PrMADS10-PrMADS11*) aun así, no se ha indagado si estos genes tienen expresión en otro tipo de tejido.

En la presente tesis, se presentan otros genes podría estar alterando *PrMADS10*, tanto por datos del microarreglo como visión global (en modelo heterólogo), como en muestras y cortes de pino inclinado a distintos tiempos.

2.3 Microarreglo

Nicolás Cruz, en el desarrollo de su tesis doctoral (Nicolás Cruz, 2018), realizó mediante Floral-dip la incorporación de la secuencia de *PrMADS10* y *PrMADS11* en *Arabidopsis thaliana*, en un vector binario con expresión constitutiva, por lo cual estos genes se sobreexpresaron de forma independiente, generando al menos 4 líneas por gen. El Dr. Cruz puso énfasis en estudiar los efectos de regulación sobre la síntesis de lignina, lo cual no es abordado en el presente trabajo. En esta tesis solo se enfocará el análisis realizado con *PrMADS10*. De esas líneas (L1-L2-L3-L7) que contenían el inserto y que sobreexpresaban *PrMADS10* y con muestras de tallo de plantas control, se realizó un ensayo de microarreglo, ensayo que se realizó junto con la Dra Andrea Vega en el laboratorio del Dr Rodrigo Gutierrez, en la Pontificia Universidad Católica de Chile. A partir de esta colaboración, se analizaron los datos considerando los resultados de las líneas transgénicas como un pool versus lo obtenido de las plantas controles, pudiendo contrastar que genes presentaban una expresión diferenciada.

2.4 Genotipado

Las colecciones de mutantes indexadas por secuencias de T-DNA, contienen mutantes de inserción para la mayoría de los genes de *A. thaliana*, y han desempeñado un papel importante en la investigación de biología vegetal durante casi dos décadas. Al proporcionar una gran fuente de alelos mutantes, para la caracterización in vivo de la función génica, este recurso se ha aprovechado miles de veces para estudiar una amplia gama de problemas en biología vegetal (O'Malley et al., 2015). Por esto, se solicitaron semillas a distintas líneas (SALK, SAIL, WISC, GABI-KAT), con el fin de observar si presentaban cambios morfológicos y de expresión. Para el estudio, se seleccionaron genes de pared, factores de transcripción y relacionados a deficiencia de fosfato que tuviesen expresión diferencial de acuerdo a los datos del microarreglo.

2.5 Proteínas ricas en hidroxiprolina

Las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) son una superfamilia de proteínas diversa, asociadas a la pared celular primaria y secundaria (Johnson et al., 2017; Liu y Free, 2016). Estas proteínas presentan importantes roles funcionales en diversos aspectos como: expansión celular, crecimiento y desarrollo de raíces, diferenciación del xilema, embriogénesis somática, inicio de gametogénesis femenina, autoincompatibilidad, señalización, tolerancia a la sal, diferentes tensiones y respuestas a patógenos.

¿Qué tienen en común los genes clasificados en esta superfamilia? Estos genes tienen hidroxilación diversa de prolina (Pro) a hidroxiprolina (Hyp), donde la glicosilación de Hyp es un fenómeno exclusivo y común de las plantas.

Los HRGP se dividen en tres familias multigénicas, desde el rango del grupo menos glicosilado hasta el más glicosilado, las proteínas ricas en Pro (PRPS) están mínimamente glicosiladas, las extensinas (EXT) están moderadamente y las proteínas arabinogalactanos (AGP) están altamente glicosiladas, pero además, existen muchos híbridos o quimeras los cuales podrían ser clasificados en más de un grupo al contener en su secuencia características de extensinas como de AGPs (Nothnagel, 1997; Showalter, 1993).

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La respuesta a inclinación en plántulas de pino de un año desencadena una seguidilla de activaciones y desactivaciones de genes, provocando el engrosamiento de la pared celular en las células de la zona inferior del tallo. donde En esta zona del tallo, se observa una acumulación de lignina, de modo tal que al cabo de unas horas, en plántulas, estas son capaces de enderezar el tallo y volver a su crecimiento normal, sin embargo, conservan la curvatura en la base del tallo, como consecuencia, son raleadas o eliminadas, ya que la curvatura disminuye la calidad de la madera.

No hay mucha claridad de lo que ocurre en la formación de madera de compresión, principalmente en tiempos tempranos de desarrollo. Se han reportado evidencias en madera juvenil y adulta expuesta mecánicamente a inclinación (Li et al., 2012). Este grupo de investigación analizó plantaciones de madera juvenil (11 años) y madura (30 años). En el caso de tiempos tempranos, se construyó un experimento de inclinar plántulas de un año y mediante análisis de transcritos por RNAseq se determinó la acumulación de transcritos para tiempos tempranos (0h, 2,5h, 10h y 24h). se Con la información generada se estableció la relación de

genes que presentaban expresión diferencial en los distintos tiempos de los ensayos y genes que se analizó la expresión diferencial del grupo de genes del microarreglo.

En consideración de lo anterior, en esta tesis se analizó el microarreglo, al sobreexpresar *PrMADS10* en *A. thaliana*, considerando genes que de expresaran diferencialmente en distintas categorías. Complementariamente, se analizaron los datos reportados en pino de 11 y 30 años expuestos a inclinación y se contrarestaron con datos de RNA-seq de plántulas de un año.

4. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS

“La expresión del factor de transcripción MADS10 de *Pinus radiata* D. Don altera diferencialmente la expresión y cantidad de proteínas de arabinogalactanos (AGPs) en *Arabidopsis thaliana* por su expresión constitutiva y en pino al ser inclinado”.

5. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

5.1 Objetivo general

“Estudiar el efecto de inducción del gen *PrMADS10* sobre la expresión de (AGPs) proteínas de arabinogalactanos, enfatizando *Fasciclin-like 11* en *Arabidopsis* y en pino.”

5.2 Objetivos específicos

1. Analizar microarreglo a partir de líneas sobrepresoras de *PrMADS10* en *Arabidopsis thaliana*.
2. Evaluar los niveles de expresión de genes candidatos (*AtEXT3*, *AtEXT4*, *AtFLA2*, *AtFLA9*, *AtFLA11*) en muestras de tallo.
3. Analizar “*in silico*” elemento (s) en *Cis* de unión a MADS-box en secuencias de genes candidatos en *Arabidopsis thaliana*.
4. Genotipar grupo de genes de pared, deficiencia de fosfato y factores de transcripción, junto con determinar acumulación de lignina en líneas mutantes.
5. Analizar los niveles de AGP en tallo, comparando antes y después de inducir la expresión de *PrMADS10* en pino.

Capítulo 1

“PrMADS10 factor de transcripción que se expresa en la zona inferior de tallos de pino inclinados: potencial papel en la modificación de las propiedades de la pared celular de las plantas y anatomía de la madera”

INTRODUCCIÓN

En este capítulo, se aborda, la identificación del factor de transcripción del tipo MADS-box, que se clasifica mediante alineamiento de secuencias y filogenia como del tipo II (MIRC^c). Para ello, se generó líneas transgénicas de *Arabidopsis*, que expresan de forma constitutiva este FT. Se realizó un microarreglo con muestras de ARN de tallo, tanto de las líneas transgénicas y plantas control. El análisis transcriptómico, para el primer objetivo de esta tesis, es “analizar la expresión diferencial de genes en el microarreglo a partir de líneas sobrepresoras de *PrMADS10* en *Arabidopsis thaliana*”. En ello, se buscó describir a grandes rasgos su vinculación con la inducción y represión de la expresión de genes en diversas categorías.

Se presentan los aportes realizados al artículo científico publicado y al análisis del microarreglo en general, centrando la mirada en genes de pared y de la superfamilia de proteínas de arabinogalactanos (AGPs). contemplando el segundo objetivo de esta tesis, fue “evaluar los niveles de expresión de genes candidatos (*AtFLA11*, *AtAGP17*, *AtEXT3*, *AtEXT4*) de muestras de tallo”, junto con el tercer objetivo que dice relación en “analizar *in silico* elemento (s) en CIS de unión a MADS-box en secuencias de genes candidatos en *Arabidopsis thaliana*”.

Los mecanismos moleculares que subyacen a las respuestas de inclinación en árboles no están claros. En este estudio, se identifica el FT del tipo MADS-box expresado diferencialmente, a tiempos tempranos, cuando plántulas de *P. radiata* son inclinados. El gen de largo completo

(CDS) es de 582 pb, que codifica para un FT de la familia MADS-box tipo II. Al medir la expresión relativa, se observó una mayor acumulación de transcritos en la parte inferior de los tallos de pino inclinados. El análisis del transcriptoma por microarreglo, reveló que 1.219 genes son expresados diferencialmente cuando se comparan plantas transgénicas y plantas control, teniendo 690 y 529 genes regulados inducidos y reprimidos, respectivamente. Se reportó que los genes expresados diferencialmente pertenecen a diferentes procesos biológicos, remodelación de pared celular y funciones metabólicas para la síntesis de fenilpropanoides principalmente. Curiosamente, el contenido de lignina fue un 30% más alto en las plantas transgénicas en comparación con las plantas control (Nicolás Cruz, 2018). Los FT expresados diferencialmente y los genes fenilpropanoides se analizaron utilizando STRING. Varios FT, MYB y NAC mostraron interacciones con genes de la vía fenilpropanoide. Estos resultados implican a *PrMADS10* como factor regulador, desencadenando la expresión de otros factores de transcripción y genes implicados en la síntesis de lignina. La pérdida de verticalidad en árboles provoca cambios morfológicos en la pared celular, que afectan la calidad de la madera. La respuesta molecular subyacente implica la expresión de genes particulares, la señalización de calcio y la síntesis de hormonas como auxinas y etileno (Allona et al., 1998a; Li et al., 2009b). La remodelación de la pared celular secundaria (SCW) está regulada por dos grandes familias de FT: R2R3-MYB y NAC (Demura y Fukuda, 2007; Li et al., 2009c; Pavy et al., 2008; Wang y Dixon, 2012; Zhong et al., 2007).

El gen del factor de transcripción MADS-box pertenece a una familia multigénica altamente conservada previamente identificada en una amplia gama de genomas eucariotas (Messenguy y Dubois, 2003). Estas proteínas son los principales reguladores del desarrollo de las plantas y la expresión del gen se ha descrito en raíces, tallos, zonas de abscisión, hojas, óvulos en desarrollo

y embriones (Alvarez-Buylla et al., 2000; Aswath y Kim, 2005b). Además, la formación de complejos MADS-box, permite que tengan diversas funciones (Egea-Cortines et al., 1999; Honma y Goto, 2001). Se sabe que estos FT están involucrados en la floración (Theissen y Saedler, 2001), en los procesos de maduración de la fruta (Manning et al., 2006; Vrebalov et al., 2002) y biosíntesis de antocianinas (Jaakola et al., 2010; Nesi et al., 2001).

Las proteínas MADS-box comparten un dominio de unión al ADN altamente conservado, con una longitud de 56 a 60 residuos de aminoácidos. Las proteínas MADS-box reconocen un motivo conservado [CC(A+T-rich)6GG] conocido como elemento CArG-box y el papel funcional se realiza como un dímero de proteína (Riechmann et al., 1996; Shore y Sharrocks, 1995). Incluso, si la mayoría de los informes han relacionado su papel en la floración, varios autores han demostrado que los genes MADS-box, se expresan al diferenciar el xilema primario / secundario y el floema durante la formación de la madera en álamo (Cseke et al., 2003b). En eucalipto, se ha detectado FTs MADS-box en tejidos vegetativos (Dias et al., 2005) y tejido de xilema de “white spruce” (Pavy et al., 2008). En *P. radiata* (PrMADS 1 a 9) se han identificado nueve genes MADS-box, que se han detectado en brotes vegetativos, órganos florales y raíces. PrMADS 4 a 9 se expresan más abundantemente en tejido de flores jóvenes que en tejido adulto y son miembros del clado TM3 (Walden et al., 1998). Pero *PrMADS1* es un ortólogo del clado AGL2 y, *PrMADS2*, *PrMADS3* son miembros del clado AGL6, desempeñando un posible papel en la regulación del desarrollo reproductivo (Mouradov et al., 1998b, 1999a).

El análisis funcional de los FTs de árboles no es una tarea fácil, por lo que el uso de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* puede ayudar a proporcionar pistas sobre su papel funcional. Por ejemplo, la expresión de los genes MADS-box 3 y 4 (PTM3 / 4) de *Populus tremuloides* en *Arabidopsis* muestran que participan en el desarrollo floral (Cseke et al., 2005), mientras que

PTM5 participa en el desarrollo vegetativo (Cseke et al., 2007). La expresión constitutiva de dos miembros de FTs del tipo MADS-box en Arabidopsis, *SHP1* y *SHP2* (anteriormente conocidos como *AtAGL1* y *AtAGL5*, respectivamente), promueve la lignificación de células adyacentes a los órganos reproductores (Liljegren et al., 2000). En éste capítulo se reporta la identificación y caracterización de *PrMADS10*. Este gen *MADS-box* tiene mayores niveles de expresión en los tallos de pino radiata inclinado, tejidos que también acumulan rápidamente lignina (Ramos et al., 2012b).

¿*PrMADS10* es un regulador de la síntesis de lignina? ¿Qué otros genes están modulados por la sobreexpresión de *PrMADS10*? Estas preguntas fueron respondidas sobreexpresando heterológamente *PrMADS10* de longitud completa en Arabidopsis, llevando a cabo un ensayo de microarreglos y realizando un análisis MapMan (Thimm et al., 2004; Usadel et al., 2005) para obtener una descripción metabólica de genes expresados diferencialmente.

Cabe mencionar que no se realizó búsqueda de expresión de *PrMADS10* en otros tejidos, ya que al ser plántulas de un año, no generan inflorescencia. En este sentido, se puso énfasis en la expresión de estos genes en tallo y no se analizó otros tejidos como acículas y raíz, que pudieran ser también regulados en su expresión.

MATERIALES Y METODOS

Se cultivaron plántulas de un año de *Pinus radiata* D. Don (pino radiata), en un vivero local, a partir de semillas obtenidas de una población de polinización abierta (medios hermanos). Las plántulas de alrededor de 30 cm de altura se mantuvieron a 20 ° C, y siguiendo el protocolo establecido previamente (Ramos et al., 2012; Ramos et al., 2012b). Se recolectaron nueve plántulas inclinadas en cada momento de muestreo; sus tallos se cortaron en diferentes partes a

lo largo del eje longitudinal en los lados inferior y superior, se juntaron, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta la extracción del ARN. Además, se tomaron muestras de plántulas "no inclinadas" como control. Se siguió el procedimiento de inclinación previo (Ramos et al., 2012b).

Expresión génica mediante microarrays Affymetrix ATH1

Para las hibridaciones de microarrays, el ARN total se procesó usando el kit de etiquetado de diana de un ciclo GeneChip (Affymetrix). Se sintetizó ARNc biotinilado a partir de $5\ \mu\text{g}$ de ARN total de tallos de Arabidopsis (tres meses de edad) utilizando el kit Affymetrix IVT de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usó ARNc para hibridar microarreglos de expresión de ATH1 GeneChip. Se utilizaron tres plantas no transformadas como controles y cuatro líneas transgénicas se consideraron como réplicas biológicas. Los datos de Affymetrix se normalizaron en R (<http://www.r-project.org/>) usando RMA (Irizarry et al., 2003). Para detectar genes regulados diferencialmente, los datos transformados \log_2 normalizados se analizaron utilizando la estadística de producto de rango, como se describió anteriormente (Hong et al., 2006; Koziol, 2010). Los datos se procesaron con herramientas bioinformáticas disponibles en el sitio web de VirtualPlant (<http://www.virtualplant.org>). Para el mapa de calor, se usó Expander 7.11 (<http://acgt.cs.tau.ac.il/expander/>). K-medias de 3 agrupaciones se obtuvieron a partir de datos de microarrays. Los conglomerados se obtuvieron con una iteración máxima de 50 métricas de distancia utilizadas con correlación de Pearson. Los gráficos circulares de GO se obtuvieron con PANTHER14.1 DB y la ontología génica gráfica se obtuvo con GOrilla (Eden et al., 2009).

Microarreglo

Los valores de intensidad de la señal sin procesar, se normalizaron primero con el método RMA utilizando el paquete affy en lenguaje R (Campain y Yang, 2010; Gautier et al., 2004), y las sondas se mapearon a los identificadores de Locus del genoma de Arabidopsis. Los genes con un cambio de al menos 2 veces y un valor de $p < 0,05$ en el análisis del producto de rango se consideraron expresados diferencialmente. Los datos de microarrays se analizaron utilizando agrupación de K-medias de Expander 7.11 (<http://acgt.cs.tau.ac.il/expander/>).

Clasificación funcional basada en MapMan

Los datos de expresión génica, en un contexto de descripción metabólica se visualizaron utilizando el software MapMan (versión 3.6.0RC) (Thimm et al., 2004; Usadel et al., 2005). MapMan utiliza una ontología específica de plantas, que clasifica los genes en categorías jerárquicas bien definidas, denominadas BIN y suBINS (Teixeira et al., 2014). El diagrama muestra genes regulados positiva y negativamente en rojo y azul, respectivamente. El conjunto de datos obtenido del análisis de microarrays (AraGene-1_0-ST) se comparó con Ath_AGI_TAIR9_Jan2010 integrado en MapMan de TAIR.

STRING red de interacción

String es una base de datos donde se pueden establecer interacciones directas (físicas) conocidas y predichas, así como interacciones indirectas (funcionales) basadas en la coexpresión, la co-localización o la minería de texto y otras (Szklarczyk et al., 2019, 2015). Se seleccionaron genes expresados diferencialmente relacionados con factores de transcripción y aquellos genes implicados en la síntesis de lignina y se interrogó al servidor web para descubrir posibles redes

de asociación proteína-proteína. La base de datos fue interrogada por última vez el 28 de marzo (2019).

Filogenia y predicción de elementos en CIS

Se utilizó Clustal W y el software BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0 para el alineamiento global. Para la filogenia se utilizó MEGAX (Kumar et al., 2018), con la opción de Maxima parsimonia con bootstrap de 500 pasos.

Para buscar y descargar la zona promotora de los genes seleccionados, se utilizó PLANTPANv.2 (Chow et al., 2016) y JASPAR (Fornes et al., 2020), comparando entre ambas las zonas de unión.

Extracción de ARN y qPCR

Método Trizol

Muestras de hoja de al menos 3 plántulas (100mg) fueron incorporadas en tubos Eppendorf y molidas con bolas de acero en nitrógeno líquido. Para el efecto se utilizó un homogenizador de bolas (Reich), moliendo en tandas de 30s, remitiendo los tubos en nitrógeno líquido. Se le agregó 800 µl de Trizol, mezclando con vortex. Se obtuvo una emulsión homogénea al agregar 160 µl de Cloroformo mezclando por 15s en vortex. Se centrifugó a 16200 rpm por 15m a 4°C y extrajo el sobrenadante (sin tocar la fase intermedia). El sobrenadante se incorporó a tubos Eppendorf con 400 µl de isopropanol, mezclando por turnos de 8 a 10 veces, luego se centrifugó por 15 m a 16200rpm a 4°C. Se lavó cada muestra con 1ml de etanol al 70%, 2 veces, se centrifugó 30s a 16200rpm a 4°C, eliminó el etanol de las muestras y se secó al vacío por al menos 20min, para luego diluir las muestras en 80 µl de agua miliq (Preston Campbell et al., 2015).

Síntesis de cDNA y qPCR

Se seleccionaron las muestras de RNA que presentaban 2 bandas al verificar por electroforesis y que por absorbancia cumplieran las relaciones 260/230, 260/280 cercanas a 2. Ya seleccionadas las muestras, se utilizó el kit de Thermo Fisher para la síntesis de cDNA (Maxima H Minus Double-Stranded cDNA Synthesis kit) y se procedió a utilizar las muestras para qPCR, utilizando como normalizador AtPP2. Considerando en la placa al menos tres réplicas técnicas y biológicas y partidores específicos de la zona UTR de cada gen candidato

RESULTADOS

Secuencia y análisis filogenético de *PrMADS10*

La secuencia de cADN de longitud completa de *PrMADS10* se obtuvo usando una secuencia EST parcial como molde de la biblioteca SSH seguida de 5'- y 3'-RACE-PCR. La secuencia de 943 pb de longitud contiene 111 y 250 pb de 5'- y 3'-UTR, respectivamente. *PrMADS10* tiene un CDS de 582 pb, que codifica una proteína deducida de 193 aminoácidos y 22 kDa (Fig. 1.1A). La proteína PrMADS10 predicha tiene las características estructurales conservadas típicas de los FT MADS-box y posee una estructura de proteína de tipo MIK^C (Fig. 1.1A). Se realizó un análisis filogenético con secuencias de aminoácidos del tipo MADS-box, incluidas proteínas de álamo, pino y abeto en Mouradov et al. (1999c). PrMADS10 se clasifica en el grupo II (MIK^C) según la subclasificación MADS, y muy cerca de genes huérfanos como AtSVP y

StMADS16, genes que se expresan en tejido vegetativo (Fig. 1.1B).

Por análisis de secuencias, comparando con secuencias similares (Fig 1.1 A) y utilizando técnicas de agrupamiento por filogenia, es posible categorizar junto a genes que se expresan en tejido vegetativo, MADS-BOX asociados a desarrollo y diferenciación celular, denominados genes huérfanos como *StMADS16*, *SVP* ((Fig 1) en Cruz, Méndez et al., 2019).

Está reportado que la sobreexpresión de estos genes en tabaco provoca un acortamiento del espacio entre nodos. Por lo tanto, parte de lo que se reporta en el artículo (Cruz, Méndez et al., 2019) es la identificación y clasificación de la secuencia que codifica a un posible FT y que al sobreexpresarlo en un sistema heterólogo se indagó en como afecta de forma general la expresión de otros genes, enfocándose principalmente en la vía de fenilpropanoides y la producción de lignina, por otro lado, y en paralelo se exploró que sucede con otros genes, considerando principalmente una posible alteración por efecto de la sobreexpresión, relacionado a pared, pudiendo haber alguna relación a la respuesta del tallo al gravitropismo.

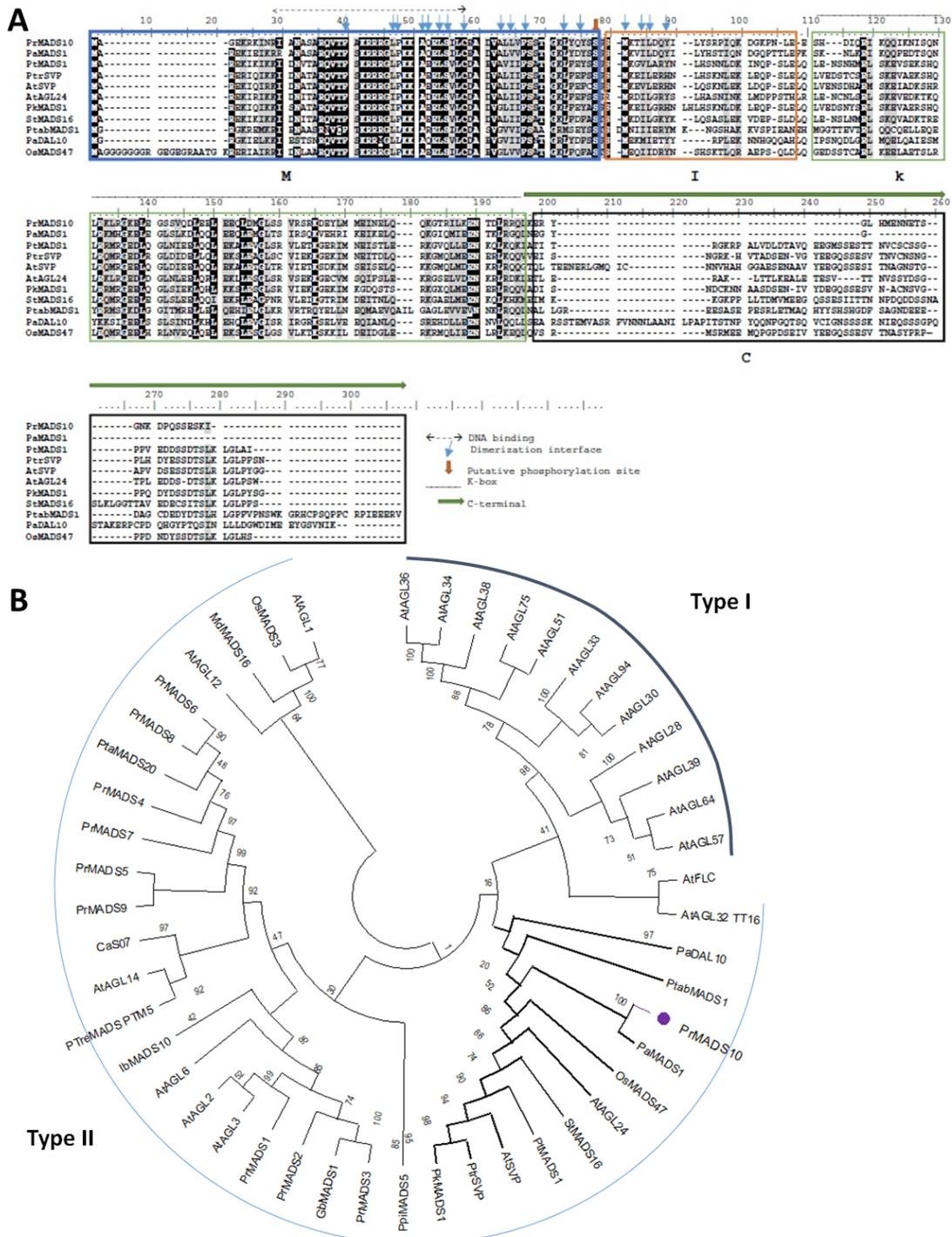


Figura 1.1 Análisis de secuencia de la proteína PrMADS10 deducida de pino radiata con otras proteínas MADS-box (Cruz, Méndez et al., 2019). (A) Alineamiento múltiple de la secuencia PrMADS10 deducida con *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Paulownia kawakamii*, *Picea abies*, *Pinus tabulaeformis*, *Populus trichocarpa* y *Solanum tuberosum* FT MADS-box se realizó utilizando el software Clustal W y BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0. Los espacios se indican con guiones, las letras con fondo negro son aminoácidos idénticos y las letras con fondo gris son aminoácidos similares. El cuadro indica los dominios M, I, K y C compartidos entre las proteínas MADS, la flecha doble y las box líneas son unión al ADN, la flecha delgada es la interfaz de dimerización; la flecha llena

es un sitio de fosforilación putativo. **(B)** El análisis filogenético se realizó utilizando el software MEGA X, con Neighbor-joining, árbol de consenso bootstrap inferido de 10000 réplicas. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de corrección de Poisson y están en las unidades del número de sustituciones de aminoácidos por sitio. Este análisis involucró 48 secuencias de aminoácidos: *Arabidopsis thaliana* AtAGL1 (AAA32730), AtAGL2 (BAC43207), AtAGL3 (NP_849930), AtAGL6 (NP_182089), AtAGL12 (AEE35216), AtAGL14 (AEE83062), AtAGL24 (AEE84922), AtAGL28 (AEE27300), AtAGL30 (AEC05661), AtAGL32 (NP_974823), AtAGL33 (AEC07824), AtAGL34 (AED93593), AtAGL36 (AED93581), AtAGL38 (AEE34356), AtAGL39 (AED93653), AtAGL51 (AEE82144), AtAGL57 (AEE74037), AtAGL64 (AEE31158), AtAGL75 (AED94653), AtAGL94 (AEE34947), AtSVP (NP_179840), AtFLC (NP_196576), *Cofea arabica* CaS07 (ADU56825), *Ginkgo biloba* GbMADS1 (AIC79629), *Ipomoea batatas* IbMADS10 (ABD66305), *Malus domestica* MdMADS16 (BAG48168), *Oryza sativa* OsMADS3 (Q40704), OsMADS47 (Q5K4R0), *Paulownia kawakamii* PkMADS1 (AAF22455), *Picea abies* PaDAL10 (AAQ13443), *Pinus pinaster* PpiMADS5 (est_pipn_28509135_001R), *Pinus radiata* PrMADS1 (AAD09206), PrMADS2 (AAD09207), PrMADS3 (AAB58907), PrMADS4 (AAB80807), PrMADS5 (AAB80808), PrMADS6 (AAB80809), PrMADS7 (AAB80810), PrMADS8 (AAC27353), PrMADS9 (AAC80806), PrMADS10 (AKC96434), *Pinus tabuliformis* PtabMADS1 (AJP06319), *Pinus taeda* PtaMADS20 (est_pita_11126880, est_pita_11604453, est_pita_9457518), *Prunus avium* PaMADS1 (ABW82563), *Populus tomentosa* PtMADS10 (AAR92206), *Populus tremuloides* PtreMADS (AAP46287), *Populus trichocarpa* PtrSVP (XP_002310310), *Solanum tuberosum* StMADS16 (AAV65504).

Modulación genética en *Arabidopsis* que sobreexpresa *PrMADS10*

PrMADS10 se expresa diferencialmente en tallos de pino inclinados (Ramos et al., 2012b) y podría modular la expresión de una serie de genes. El análisis de microarreglo se utilizó para determinar los cambios globales en la expresión génica resultantes de la sobreexpresión constitutiva de *PrMADS10*. Para el análisis se utilizó el chip AraGene-1_0-ST 90k, con 28.501 genes anotados. Los datos brutos se normalizaron y la expresión génica diferencial se determinó utilizando procedimientos estadísticos estándar (ver Materiales y métodos). Se identificaron 1.219 genes expresados diferencialmente al comparar plantas transgénicas y de tipo silvestre . La sobreexpresión de *PrMADS10* induce 690 y reprime 529 genes. Todos los 1.219 genes expresados diferencialmente se analizaron mediante agrupamiento jerárquico (Fig. 1.2).

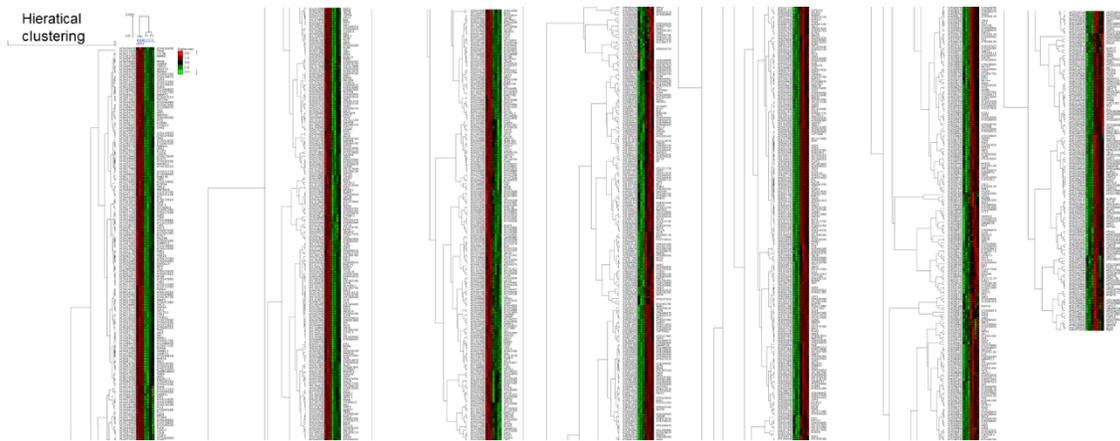


Figura 1.2. Agrupación jerárquica. Utilizando el software Expander incorporamos los 1219 genes expresados diferencialmente e hicimos agrupaciones no supervisadas con agrupación jerárquica.

En la Figura 1.3. se observa una alta consistencia tanto dentro de cada grupo de plantas (ya sea control o transgénico), como dentro de las ramas generadas. La agrupación no supervisada elige la agrupación por k-medias, resolviéndose tres agrupaciones con los primeros 339 genes, el segundo 383 y el tercero 498 genes.

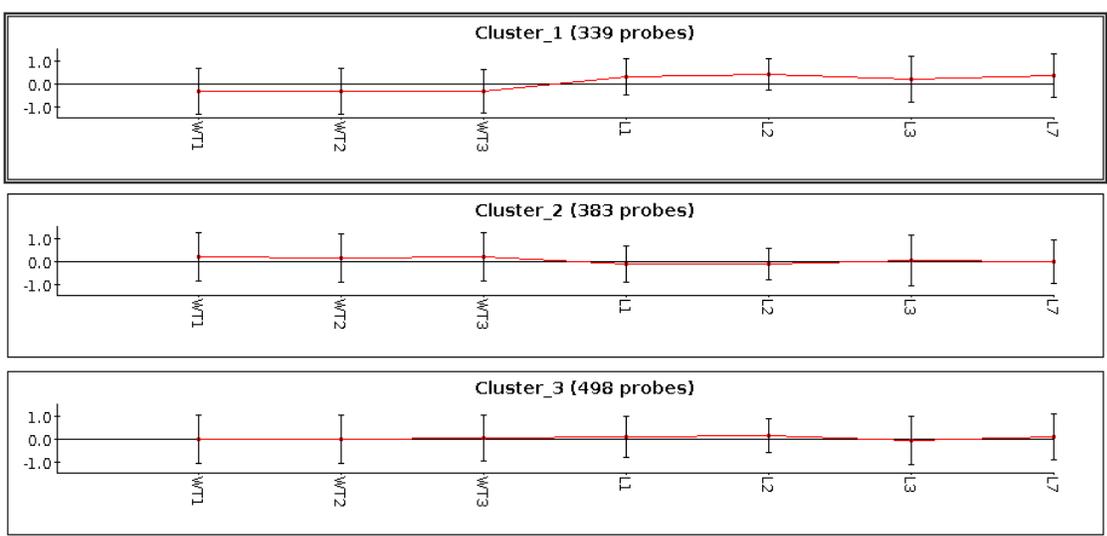


Figura 1.3. Agrupación de K-medias. Con Expander se generaron 3 clusters, obteniendo una homogeneidad promedio general de 0.143 y una separación promedio general de -0.339. Es posible observar la separación de los grupos WT vs líneas transgénicas cuando estas están arriba o abajo.

El primer grupo tiene 235 genes regulados positivamente en comparación con las plantas de control, 219 de los cuales podrían clasificarse utilizando la base de datos Panther. Ochenta y cuatro genes tienen una anotación en la ontología de genes de función molecular, encontrándose las siguientes categorías: actividad catalítica (53% de los genes), actividad transportadora (23%), unión (14%), actividad reguladora de la transcripción (9%), estructura actividad de la molécula (4%) y tanto la actividad del transductor molecular, como la función molecular como regulador un 1%. Un total de 104 genes estaban regulados negativamente, 52 de los cuales tenían anotaciones de ontología genética en categorías similares para los genes regulados positivamente, excepto por la ausencia de la categoría de actividad del transductor molecular (Fig. 1.4A). Además, se utilizó GOrilla (Eden et al., 2009) con todos los datos del microarreglo y se determinó que la función molecular era la categoría más significativa para este grupo .

El segundo grupo contiene 167 genes regulados positivamente, 52 de los cuales se anotaron de la siguiente manera: 57% se clasificó como actividad catalítica, 30% como unión, 9% como actividad transportadora y 4% como actividad molecular estructural (Fig. 1.4B). Doscientos siete genes fueron regulados negativamente, con 110 anotados en diferentes categorías de ontología génica: actividad catalítica (43%), unión (32%), regulador de función molecular (8%), actividad transportadora (5%), actividad reguladora de la transcripción (5%), actividad del transductor molecular (5%) y actividad de la molécula estructural (2%) (Fig. 1.4B). Cuando se utilizó GOrilla en este grupo, el grupo más significativo fue la categoría de proceso biológico.

El tercer grupo agrupó 255 genes regulados positivamente, donde 99 tenían anotaciones de ontología genética: 47% clasificados como actividad catalítica, 25% como unión, 19% como actividad transportadora, 3% como actividad reguladora de la transcripción, 2% como actividad molecular estructural, 2 % a la actividad del transductor molecular y 2% al regulador de la

función molecular. Finalmente, este grupo contiene 213 genes regulados negativamente y 116 mostraron anotaciones en la ontología de la función molecular: la mayoría de ellos estaban relacionados con actividad catalítica (50%) y unión (30%), seguidos de actividad del transductor molecular (9%), actividad transportadora (3%), actividad reguladora de la transcripción (3%), regulador de función molecular (3%) y actividad estructural de la molécula (2%) (Fig. 1.4C). Cuando se utilizó GOrilla en este grupo, el grupo más significativo fue la categoría de proceso biológico. Curiosamente, en este grupo, varias subcategorías asociadas al estrés y al metabolismo secundario son las más representativas.

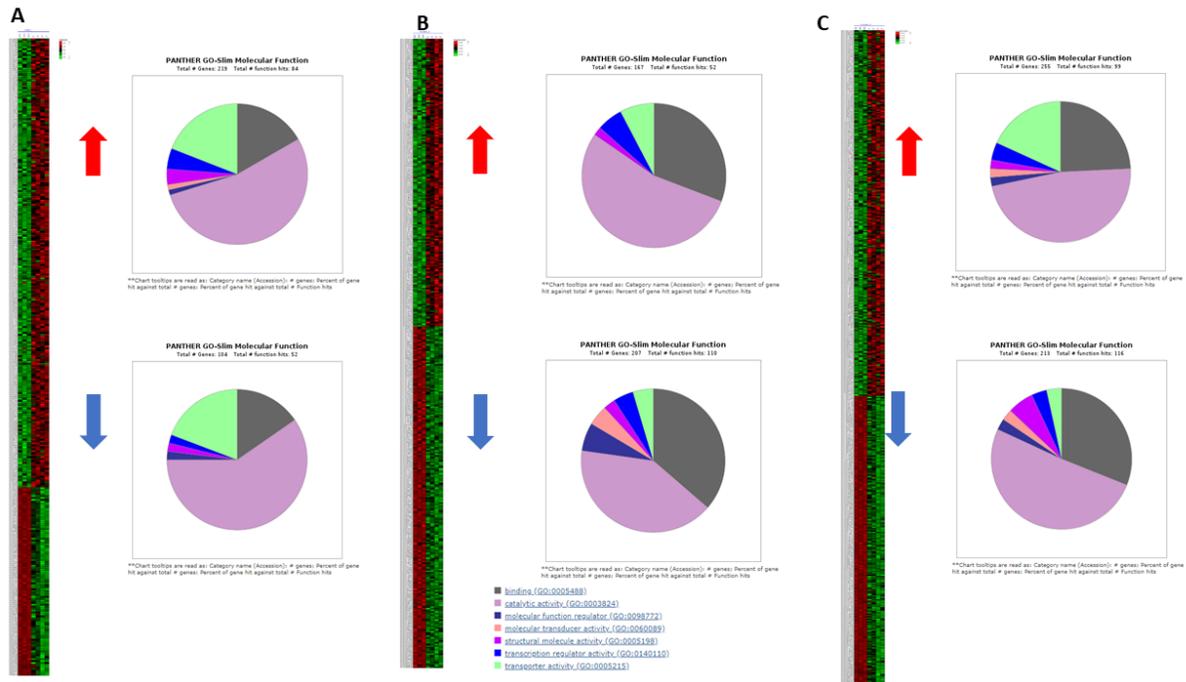


Figura 1.4. Agrupación no supervisada con k-medias y GO para la función molecular de genes expresados diferencialmente. (A) El grupo uno tiene 339 genes en total con una homogeneidad de 0.313, con 235 genes arriba y 104 regulados a la baja en comparación con el control, y clasificación de ontología genética para la función molecular. (B) El grupo dos tiene 383 genes en total con una homogeneidad de 0,122, con 167 genes arriba y 207 regulados a la baja en comparación con el control, y clasificación de ontología genética para la función molecular. (C). El grupo tres tiene 498 genes en total con una homogeneidad de 0.040, con 280 genes arriba y 218 regulados negativamente en comparación con el control, y clasificación de ontología genética para la función molecular. Subgrupos considerando el análisis de los 1219 genes expresados diferencialmente (expresión absoluta), donde el rojo es 0 ~ 2 y el verde 0 ~ -2, se utilizó K-Means de Expander.

Los cincuenta genes regulados más arriba se enumeraron en la Tabla 1.1 (aquellos con cambios > 2,6 veces). Deficiencia de fosfato (AT3G09922) mostró la expresión diferencial más alta (5 veces) y otros genes relacionados con el metabolismo o transporte de fosfato son más altos y están dentro de los genes con mayor expresión a las muestras control.

Tabla 1.1. Lista de los 50 genes con mayor inducción basados en análisis de microarreglo.

Código AGI	Tasa de cambio	Descripción
AT3G09922	5,23696545	induced by phosphate starvation1
AT4G24890	5,10692851	purple acid phosphatase 24
AT1G17710	4,60930916	Pyridoxal phosphate phosphatase-related protein
AT5G20790	4,1601886	
AT3G61410	4,0969037	
AT1G23110	3,99661961	
AT5G17220	3,87940608	glutathione S-transferase phi 12
AT2G11810	3,87917730	monogalactosyldiacylglycerol synthase type C
AT3G44510	3,82254153	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT5G62162	3,82235150	MIR399C; miRNA
AT1G08310	3,74773720	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT3G14790	3,62762908	rhamnose biosynthesis 3
AT2G34202	3,59081789	MIR399D; miRNA
AT5G08030	3,57670037	PLC-like phosphodiesterases superfamily protein
AT1G73220	3,51495534	organic cation/carnitine transporter1
AT2G04038	3,47517088	basic leucine-zipper 48
AT2G45135	3,47252909	RING/U-box superfamily protein
AT2G45130	3,42804195	SPX domain gene 3
AT3G25240	3,40914347	Protein of unknown function (DUF506)
AT4G40060	3,37243837	homeobox protein 16
AT3G05630	3,34403628	phospholipase D P2
AT3G04530	3,30622661	phosphoenolpyruvate carboxylase kinase 2
AT2G34210	3,27618462	Transcription elongation factor Spt5
AT1G67600	3,26345447	Acid phosphatase/vanadium-dependent haloperoxidase-related protein
AT3G59884	3,25781202	MIR827a; miRNA
AT4G36350	3,24586808	purple acid phosphatase 25
AT3G02040	3,22628817	senescence-related gene 3
AT5G03545	3,13379963	
AT4G12090	3,0958863	Cornichon family protein
AT1G19200	3,077976	Protein of unknown function (DUF581)
AT3G03530	3,05167821	non-specific phospholipase C4

AT4G01380	3,03631080	plastocyanin-like domain-containing protein
AT5G44562	3,01864284	other RNA
AT3G25233	3,01420100	
AT4G36850		PQ-loop repeat family protein / transmembrane
	3,00753100	family protein
AT4G17220	2,98231777	microtubule-associated proteins 70-5
AT3G09285	2,93889592	
AT3G02550	2,92777377	LOB domain-containing protein 41
AT5G53048	2,91261741	other RNA
AT5G20150	2,90394826	SPX domain gene 1
AT2G38940	2,82340442	phosphate transporter 1;4
AT1G22150	2,79856827	sulfate transporter 1;3
AT5G42610	2,78472634	Protein of unknown function (DUF607)
AT5G01220	2,76522054	sulfoquinovosyldiacylglycerol 2
AT3G47420	2,75033897	phosphate starvation-induced gene 3
AT4G01390	2,70440706	TRAF-like family protein
AT5G02200	2,65206758	far-red-elongated hypocotyl1-like
AT3G43190	2,64894057	sucrose synthase 4
AT5G20410	2,64108297	monogalactosyldiacylglycerol synthase 2
AT3G12500	2,63995642	basic chitinase

Curiosamente, otros genes y FT también están regulados por la sobreexpresión de *PrMADS10* en Arabidopsis. Predominan los FT como leucina básica 48, proteína homeobox 16, así como MIR399C, MIR399D y MIR827a. Otras proteínas como la superfamilia Ring U/Box, glutatión-S-transferasa, alfa/beta hidrolasas, biosíntesis de ramnosa, fosfolipasa D y fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa son todas más abundantes cuando *PrMADS10* está sobreexpresado. Por otro lado, ciclasa terpenoide, O-aciltransferasa y reductasa de ácidos grasos son los genes más regulados a la baja. Curiosamente, varios FT como WRKY, MYB y zink finger proteins B-box también están reprimidos, al igual que otros genes como expansinas, pectina liasa, Small Auxin RNA (SAUR),), S-adenosyl-L-methionine (SAM) methyltransferase-dependent y 2-oxoglutarate-dependent oxygenase (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Lista de los 50 genes más reprimidos de acuerdo al análisis de microarreglo.

Código AGI	Tasa de cambio	Descripción
AT1G78950	-3,17585833	Terpenoid cyclases family protein
AT5G22490	-3,12811101	O-acyltransferase (WSD1-like) family protein
AT3G57460	-3,06807631	catalytics;metal ion binding
AT3G56700	-3,02195084	fatty acid reductase 6
AT2G40080	-2,91153175	Protein of unknown function (DUF1313)
AT5G22570	-2,83725624	WRKY DNA-binding protein 38
AT2G24850	-2,73364223	tyrosine aminotransferase 3
AT5G42900	-2,68993391	cold regulated gene 27
AT1G57750	-2,64345555	cytochrome P450, family 96, subfamily A, polypeptide 15
AT5G13330	-2,55532203	related to AP2 6l
AT4G33790	-2,55080583	Jojoba acyl CoA reductase-related male sterility protein
AT1G57560	-2,54740631	myb domain protein 50
AT1G02450	-2,52957	NIM1-interacting 1
AT5G28080	-2,52074914	Protein kinase superfamily protein
AT2G21140	-2,51622147	proline-rich protein 2
AT1G07050	-2,50056738	CCT motif family protein
AT1G17665	-2,4822141	
AT5G38000	-2,4812641	Zinc-binding dehydrogenase family protein
AT1G30040	-2,46936243	gibberellin 2-oxidase
AT5G26220	-2,4570374	ChaC-like family protein
AT2G23910	-2,35285574	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
AT3G44860	-2,32809614	farnesoic acid carboxyl-O-methyltransferase
AT3G28220	-2,2990281	TRAF-like family protein
AT4G33980	-2,27551385	
AT2G21660	-2,27062027	cold, circadian rhythm, and rna binding 2
AT3G07650	-2,25791823	CONSTANS-like 9
AT5G44568	-2,25422492	
AT5G20630	-2,20610044	germin 3
AT1G66380	-2,18326968	myb domain protein 114
AT4G38825	-2,17395606	SAUR-like auxin-responsive protein family
AT1G68050	-2,16923159	flavin-binding, kelch repeat, f box 1
AT5G45960	-2,14315543	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
AT3G46490	-2,13703213	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
AT3G05770	-2,10837755	
AT4G25860	-2,09657392	OSBP(oxysterol binding protein)-related protein 4A
AT3G20810	-2,09540743	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
AT5G37970	-2,07332991	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
AT5G37940	-2,06964719	Zinc-binding dehydrogenase family protein

AT3G60160	-2,06807466	multidrug resistance-associated protein 9
AT2G40610	-2,06369602	expansin A8
AT1G55525	-2,06322194	other RNA
AT5G48250	-2,05096419	B-box type zinc finger protein with CCT domain
AT4G17470	-2,03205328	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT1G28050	-2,01597975	B-box type zinc finger protein with CCT domain
AT1G14250	-1,99178015	GDA1/CD39 nucleoside phosphatase family protein
AT5G01900	-1,96491154	WRKY DNA-binding protein 62
AT3G59270	-1,96375134	FBD-like domain family protein
AT5G25460	-1,94860754	Protein of unknown function, DUF642
AT5G63180	-1,90209874	Pectin lyase-like superfamily protein
AT1G75780	-1,88247972	tubulin beta-1 chain

Análisis de interacción de redes en Arabidopsis que sobreexpresa *PrMADS10*.

MapMan se utilizó para visualizar genes modulados por *35S::PrMADS10* en Arabidopsis (Thimm et al., 2004; Usadel et al., 2005). En el tipo de categorización que utiliza MapMan (BINs) de los 1211 genes diferencialmente expresados, es posible visualizar 166 genes expresados diferencialmente. Los resultados obtenidos muestran una visión general de las diferentes categorías funcionales, que están siendo afectadas por *35S::PrMADS10*, como carbohidratos principales y menores, aminoácidos, nucleótidos, fermentación, lípidos, metabolitos secundarios y pared celular (Fig. 1.5).

Los genes relacionados con el metabolismo se dividen en, 56 genes para pared celular, 30 para lípidos, 29 para metabolitos secundarios, 12 para aminoácidos, 5 para los luz, 9 para carbohidratos principales, 7 para carbohidratos menores y unos pocos para glucólisis, fermentación, tricarboxylic acid cycle (TCA), S-assimilation, metabolismo de nucleótidos,

síntesis de tetrapirrol o transporte de electrones mitocondrial. Cuando se analizó la vía fenilpropanoide, varios genes fueron regulados inducidos o reprimidos (Fig. 1.5).

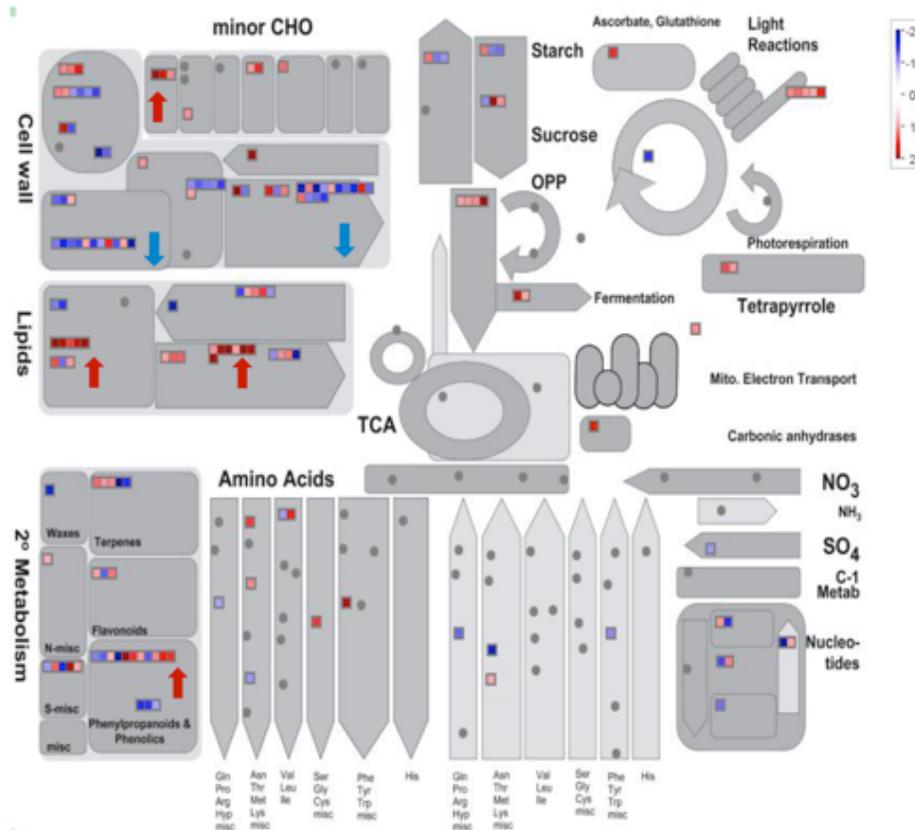


Figura 1.5. Visión general metabólica con MapMan. Los 1219 genes expresados diferencialmente se utilizaron para visualizar los cambios en las vías metabólicas. Un gen puede tener más de una clasificación. Los pasos regulados hacia arriba se representan en rojo y los pasos regulados hacia abajo en azul.

Los factores de transcripción y los genes fenilpropanoide se analizaron utilizando STRING (Szkarczyk et al., 2019). Curiosamente, varios FT del tipo MYB y NAC mostraron una interacción con los genes de la vía fenilpropanoide. Juntos, estos resultados implican a *PrMADS10* como un inductor de la respuesta a la inclinación, lo que desencadena la coexpresión de varios otros factores de transcripción y genes involucrados en la síntesis de lignina. Junto con genes que codifican a proteínas estructurales que en su conjunto con lignina y otros carbohidratos arman esta red y le dan funcionalidad a la pared celular. Dentro de las proteínas

de pared hay un conjunto de genes de la familia de arabinogalactanos que pertenecen a la superfamilia de hidroxiprolinas (HGRPs) y otras asociadas a pared como extensinas, expansinas parecieran estar siendo modulados por la sobreexpresión de este FT de pino en *Arabidopsis thaliana*, algunas proteínas directamente relacionadas a remodelación de pared o de interacción como mecanismo de comunicación para la reorganización de las células.

Los FT expresados diferencialmente y los genes de la vía fenilpropanoide se seleccionaron del ensayo de microarreglos para realizar una clasificación MapMan. La lista de TF y genes de la vía fenilpropanoide se introdujo en STRING para determinar las interacciones de la red (Fig. 1.6). Los genes sin interacciones fueron eliminados de la imagen. Las interacciones observadas pueden ser de diferentes tipos, dependiendo del color de la línea que une las esferas y se reconocen como coexpresión, co-localización y minería de texto, por lo que no puede tomarse estrictamente como una interacción directa proteína-proteína. Se puede observar que los genes se agruparon en diferentes grupos. Los FT como MYB y NAC se incluyen en un grupo (*MYB50*, *MYB52*, *MYB42*, *NAC010*, *NAC073*, *MYB43*, *MYB83*, *HB16*, *MYB85*, *MYB32*, *NAC012* y *NST2*), por otro lado, PAL, ligasa de 4-coumarate-CoA (4CL) y cafeoil-CoA O-metiltransferasa (CCoAOMT) están en una diferente. Curiosamente, siete genes de la vía fenilpropanoide están agrupados e interconectados. MapMan mostró que estos genes (*PAL4*, *4CL8*, *4CL2*, *CCOAMT*, *4CL5*, *CCR2*; *AT4G26220*; UDP glucosil transferasa 72E1) se expresan diferencialmente. Se ha informado que el gen *AT4G26220* es un probable *CCoAOMT7* (vista ampliada de la figura 1.6). En una pequeña interacción de red, MYC4 y MYB76 se agrupan en otros TF. Al mismo tiempo, LHY está relacionado con AGL24, TOC1 y CCA, e indirectamente con DOF, PRR5 o PRR9. Finalmente, una proteína transportadora de zinc se correlaciona con WRKY70, que tiene interacciones directas con WRKY38, WRKY51 y WRKY54.

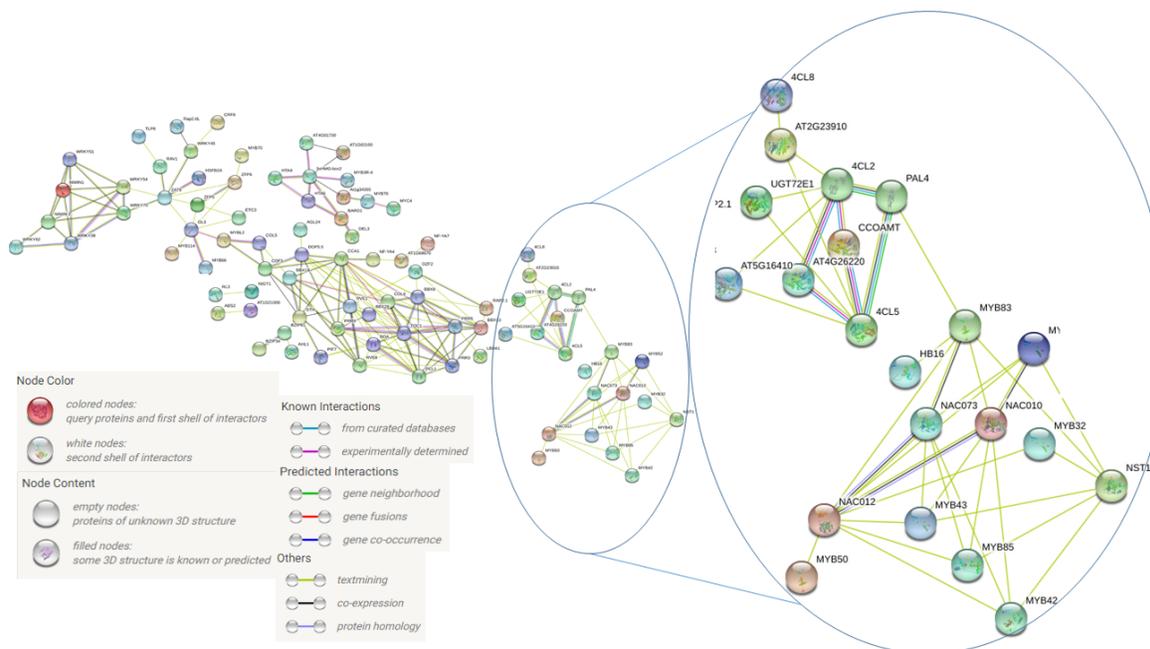


Figura 1.6. Red de interacciones de genes entre genes expresados diferencialmente usando STRING. Los genes utilizados en el análisis se clasificaron previamente dentro de la vía metabólica fenilpropanoide y una serie de FT expresados diferencialmente. Cada nodo representa la interacción, descrita en la literatura, entre las proteínas expresadas diferencialmente en *Arabidopsis* que sobreexpresan PrMADS10.

Análisis de microarreglo, visión global mediante redes

Para el cumplimiento del primer objetivo de la presente tesis (analizar de microarreglo a partir de líneas sobrepresoras de *PrMADS10* en *arabidopsis thaliana*). Se trabajó con el total los datos de los genes de inducidos y reprimidos (1211) y con una de las herramientas de bar.toronto, pasando de código AGI a aquellos que tuviesen código proteico en Uniprot, descartando los que no presentaban código, trabajando con un total de 1164 genes, los que al ingresarlos a STRING, no todos tuvieron match con las bases de datos que utiliza este consorcio de bases de datos, por lo tanto se redujo a 1075, de los cuales no todos tienen algún tipo de interacción conocido, por lo cual al eliminar las que no interactúan quedaron 1031.

Ya incorporados los datos y eliminados los que no tienen interacción conocida, se realizó un clustering o agrupamiento de tipo MCL, con un parámetro de inflación de 3. Se observan al menos 3 hubs (Fig. 1.7) y 135 subclusters.

Los HUBs se analizaron desde el que tiene más conexiones (Hub1 encerrado por circunferencia naranja (Fig. 1.7)) al que presenta menos (circunferencia verde seguida de la morada en Fig 1.7).

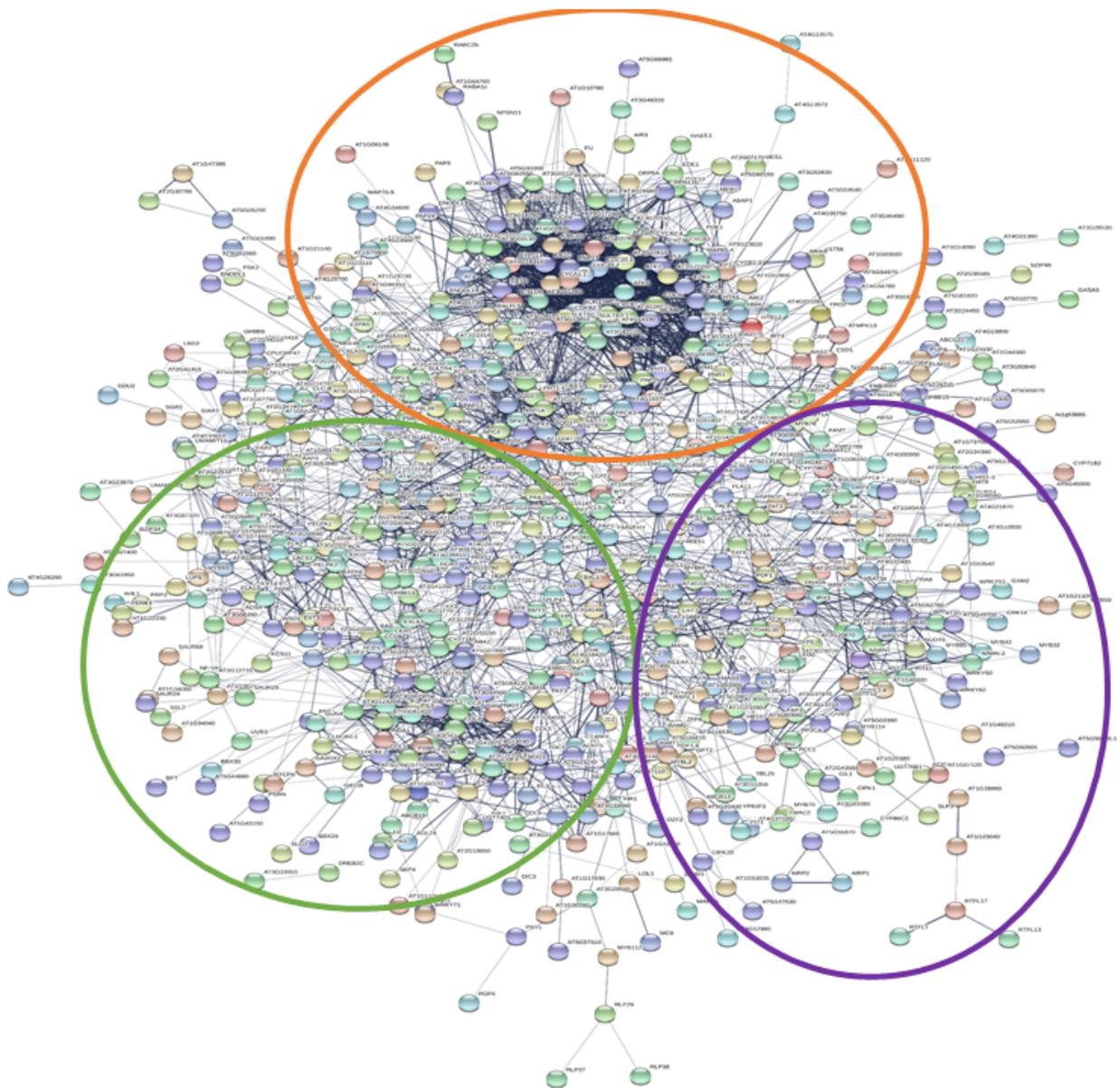


Figura 1.7. Red de interacción de 1031 genes, conformando 3 HUBS, en naranja el hub que tiene más interacciones, seguido por el verde y finalmente el encerrado en morado con menos interacciones.

El que presenta mayor conexiones se denominará HUB1 y se encuentra en la zona basal de la imagen, encontrándose factores de transcripción de la familia NAC, los cuales, desempeñan funciones importantes en el desarrollo y respuesta ambiental de plantas, principalmente en maduración y ablandamiento de frutos, entre otras funciones (Carrasco-Orellana et al., 2018), a su vez de la familia WRKY pueden ser reguladores positivos como negativos en casos de defensa vegetal, estrés abiótico, como a su vez, estar involucrados en crecimiento y desarrollo vegetal (Agarwal et al., 2011). Por otro lado, de la familia de factores de transcripción MYB en plantas, son factores claves en redes regulatorias, tanto en desarrollo, metabolismo y respuesta a estrés (Dubos et al., 2010).

Algunos de los que destacan en este HUB1 son, NAC004 (AT1G02230, \log_2 -1,85), WRKY54(AT2G40750, \log_2 -1.46), junto a WRKY46 (que no tiene expresión diferencial) y WRKY 70 (AT3G56400, \log_2 -1.09), ambos están involucrados en la regulación de brasinoesteroides en la regulación del crecimiento y respuesta a sequía, MYB114 (AT1G66380, \log_2 -2.183) implicado en la biosíntesis de fenilpropanoides (Mondal and Roy, 2018), MYB32 (AT4G34990, \log_2 0.914) se expresa en presencia de hormonas como ABA, etileno, JA, elicitor como SA y estrés por CdCl₂ y NaCl (Yanhui et al., 2006). Mientras que otros factores de transcripción como NIMIN1 (AT1G02450, \log_2 -2,52957) que es un regulador positivo de ácido salicílico y modula la expresión del gen PR (AT1G02450, \log_2 -2.53) (Weigel et al., 2005), todas estas interacciones y más son posibles de observar en el HUB1 (Figura 1.8).

MCM6 (AT5G44635, \log_2 -1.187) se involucra en proliferación celular en brote apical (Shultz et al., 2009), ORC3 (AT5G16690, \log_2 -1.16) se expresa mayormente en hoja caulinar y flor,

sin embargo, en los datos es uno de los genes con expresión disminuida, ocurriendo algo similar con ORC6 (AT1G26840, \log_2 -1.19) quien tiene una mayor expresión en hoja madura y flor, siendo dos genes asociados a diferenciación celular (Diaz-Trivino et al., 2005). Dentro del mismo HUB se observan CYCB3 (AT1G16330, \log_2 -1.23) , CYCB2;3 (AT1G20610, \log_2 -1.57), CYCB1;4 (AT2G26760, \log_2 -1.26), CYCA1;1 (AT1G44110, \log_2 -1.05), CYCB2;4 (AT1G76310, \log_2 -1.01), CYCB2;2 (AT4G35620, \log_2 -1.44), los que se expresan en tejidos vegetativos y en distinta localización, las del tipo A se asocian a segregación cromosómica y del tipo B se expresan en meiosis masculina, a la vez previenen la formación de pared celular ectópica, en este caso como están con expresión disminuida podría estar activa la formación de pared celular ectópica (Bulankova et al., 2013).

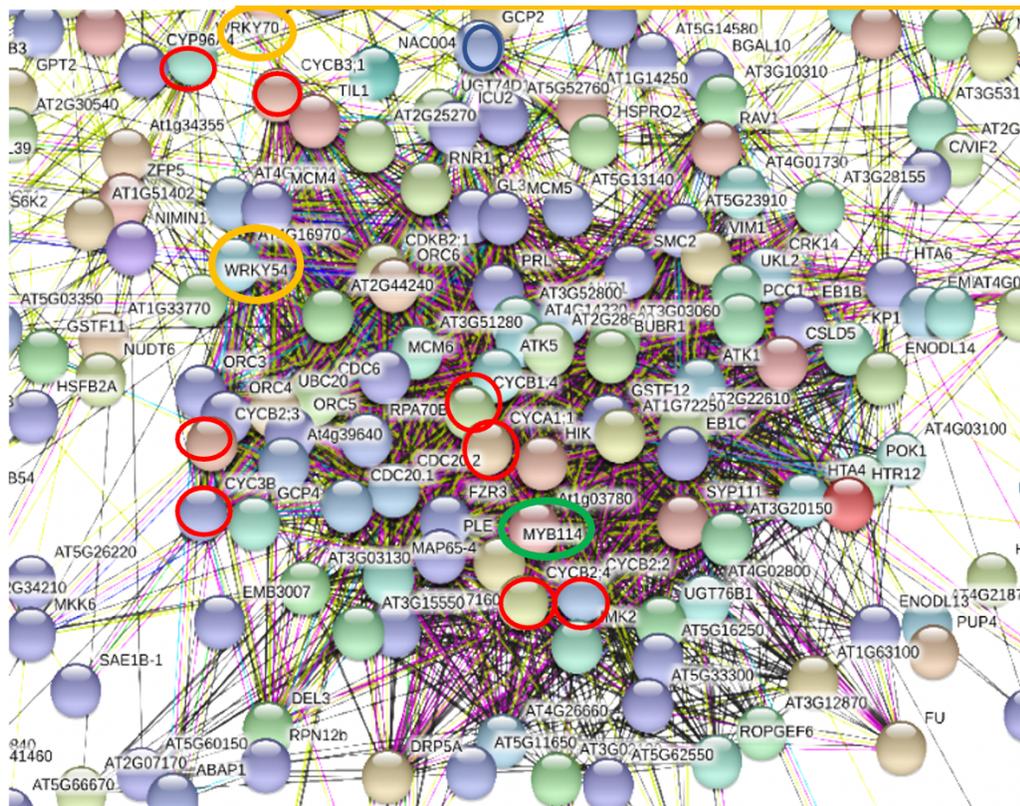


Figura 1.8. Hub con mayor cantidad de conexiones, denominado HUB, de las interacciones conocidas son las de color turquesa correspondiente a datos de bases de datos curados, el color fucsia es determinado experimentalmente, dentro de las interacciones predictivas están en verde genes que son vecinos cercanos, en rojo

fusión de genes, en azul co-ocurrencia de genes y las otras conexiones en verde claro textmining, en negro co-expresión y en celeste por homología de proteínas.

Hub2, es posible destacar los siguientes grupos de genes: los genes PAP son fosfatasas ácidas púrpuras, hay 28 descritas en arabis (Fig. 1.9), son metalofosfoesterasas con núcleo bimetal (Zhu et al., 2005), PAP7 (Grübler et al., 2017) (AT2G01880, \log_2 2.23) asociado a formación de cloroplastos, PAP8 (AT2G01890, \log_2 2.0) tiene una mayor expresión como respuesta a estrés por calor (Danilova et al., 2018), PAP12 (AT2G27190, \log_2 0.918), PAP17 (AT3G17790, \log_2 2.48), PAP23 (AT4G13700, \log_2 2.62) y PAP25 (AT4G36350, \log_2 3.24) se expresan predominantemente en flor y tienen una mayor expresión cuando la planta se ve privada de fósforo (Zhu et al., 2005). SPX1 (AT5G20150, \log_2 2.90) es un regulador positivo de algunos genes inducibles por deficiencia de fósforo (Jost et al., 2015), expresándose principalmente en raíces donde actúa junto a SPX2 (AT2G26660, \log_2 1.37) cuando hay altas concentraciones de fósforo en el medio (Briat et al., 2015), SPX3 (AT2G45130, \log_2 3.42). SULTR1;2 (AT1G78000, \log_2 -1.77), SULTR1;3, SULTR4;1 (AT5G13550, \log_2 -0.96), SULTR4;2 (AT3G12520, \log_2 -1). PDF 1.2, PDF1.2B, PDF1.4, PHT1;7, PHT1;5, MGDC (AT2G11810, \log_2 3.87), MGD2 (AT5G20410, \log_2 2.64), 4CL2, 4CL8 y factores de transcripción como WRKY45 y MYB93. Principalmente genes de señalización y respuesta a deficiencia de fósforo, respuesta a estrés, hipoxia entre otros, en su mayor parte interacción de textmining (líneas verde claro).

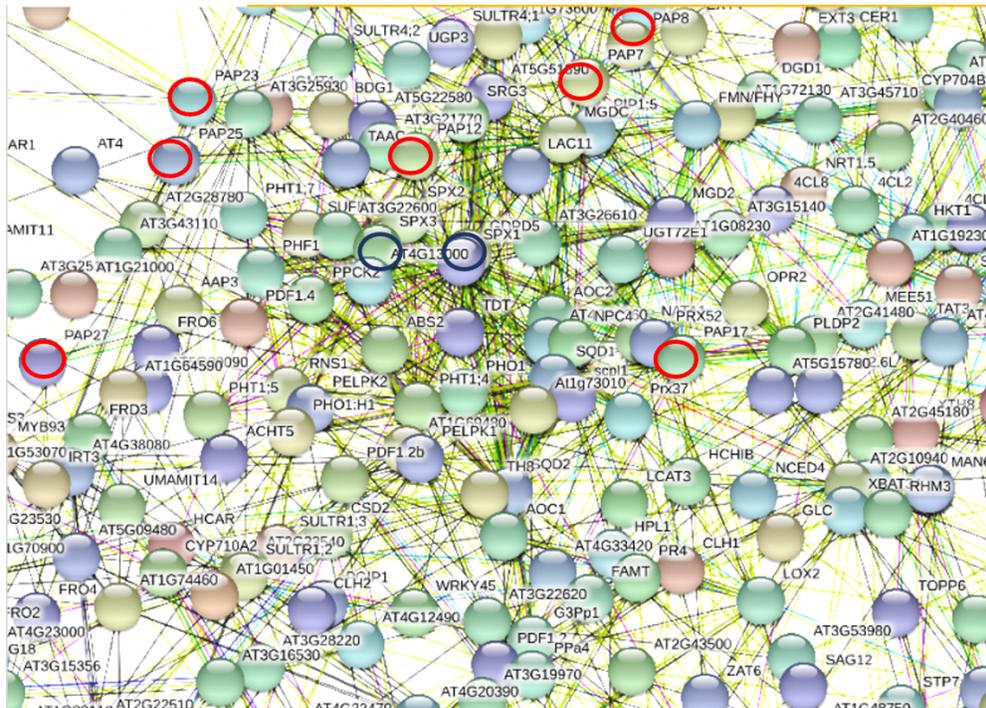


Figura 1.9. Hub2 segundo con mayor cantidad de conexiones, las interacciones conocidas son las de color turquesa correspondiente a datos de bases de datos curados, el color fucsia es determinado experimentalmente, dentro de las interacciones predictivas están en verde genes que son vecinos cercanos, en rojo fusión de genes, en azul co-ocurrencia de genes y las otras conexiones en verde claro textmining, en negro co-expresión y en celeste por homología de proteínas.

Finalmente, el tercer hub se asocia a señalización y genes asociadas a proteínas transmembrana, pared celular pudiendo observar la interacción entre algunas glicoproteínas, con otros genes de pared, como xiloglucano endotransglicosilasa/hidrolasa (Fig. 1.10). Detallando esto se observan factores de transcripción como MYB83 (AT3G08500, \log_2 1,02558004), que suele actuar como switch entre NAC012/SND1, mediando la red transcripcional de biosíntesis de pared secundaria, funciona de forma redundante con MYB46, se relaciona con la isoforma de fenilalanina amonio liasa 4, quien presenta una expresión aumentada en presencia de *PrMADS10*. Una de las conexiones por text-mining es el caso de la sobreexpresión de *PsnSHN2* el cual es predominante en tejido xilemático en *Populus*, en este caso en particular, a mayor expresión de MYB 83 y 43, se observa una menor expresión de los genes involucrados en la vía

de fenilpropanoides, aumentando considerablemente la producción de celulosa y hemicelulosa (Liu et al., 2017). En cuanto a glicoproteínas que pudiesen estar jugando algún rol dentro del retorno de crecimiento horizontal del tronco nos encontramos en esta red de genes a FLA11. Es el principal gen candidato por su mayor expresión en tallo y silicuas, lo cual se podría extrapolar en tallo de pino, pertenece a la super familia de HGRPS, catalogada como quimera en la subfamilia de proteínas de arabinogalactanos, es un gen asociado a adhesión celular, a formación de pared celular secundaria, diferenciación del xilema y formación de madera al menos en otros leños como es *Pinus taeda* (Ca et al., 2000; Yang et al., 2005; Zhang et al., 2003).

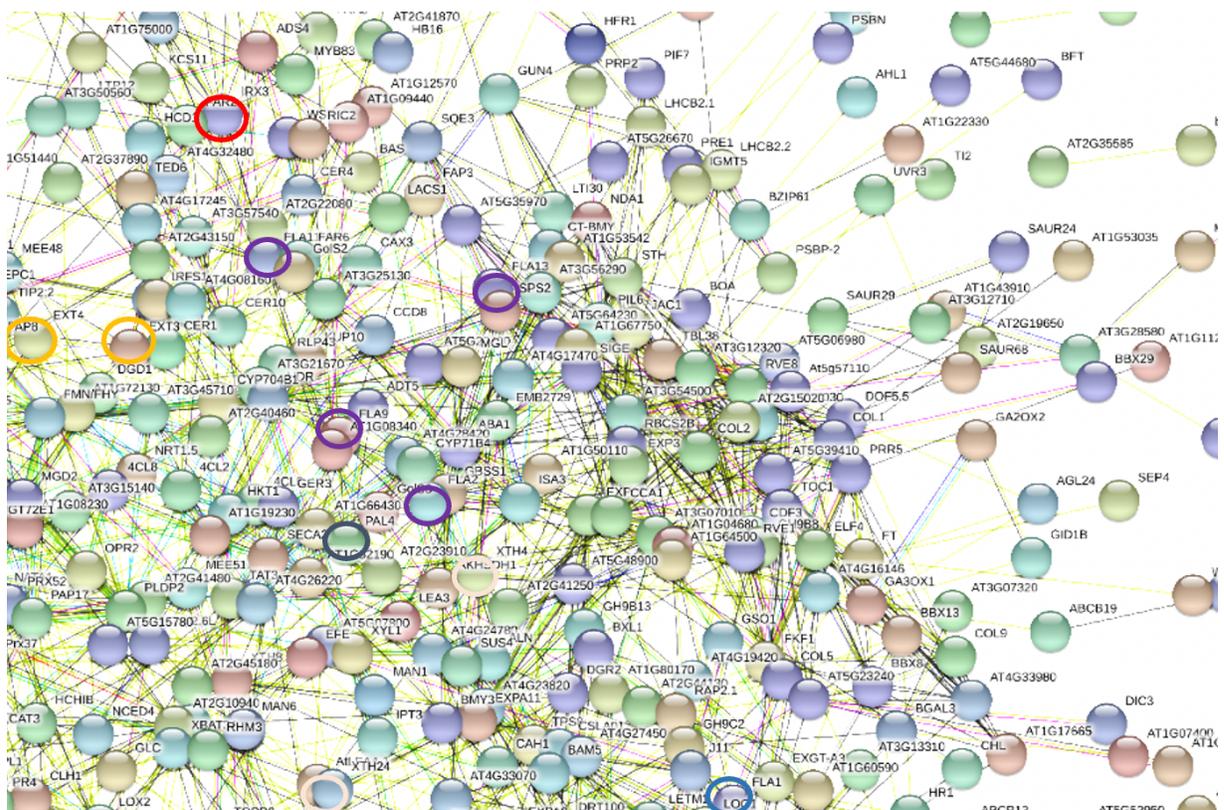


Figura 1.10. Hub3 tercer HUB, menos denso y con menos conexiones, se demarcaron algunos genes de interés, las interacciones conocidas son las de color turquesa correspondiente a datos de bases de datos curados, el color fucsia es determinado experimentalmente, dentro de las interacciones predictivas están en verde genes que son vecinos cercanos, en rojo fusión de genes, en azul co-ocurrencia de genes y las otras conexiones en verde claro textmining, en negro co-expresión y en celeste por homología de proteínas.

Se evaluó la expresión relativa de algunos genes, todos pertenecientes a glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, de modo tal de cumplir con el segundo objetivo de “evaluar los niveles de expresión de genes candidatos (*AtEXT3*, *AtEXT4*, *AtFLA2*, *AtFLA9*, *AtFLA11*)”.

Se extrajo ARN de muestras de tallo de plantas wt y líneas transgénicas (L1-L2-L3-L7), alrededor de 5 plantas por réplica, luego se realizó la eliminación de ADN genómico y síntesis de cDNA, se chequearon los partidores con curva de calibración y se utilizaron 2 normalizadores PP2 y UBOX. Se presentan dos extensinas con expresión diferencial en el microarreglo, los cuales son clasificados como glucoproteínas estructurales ubicadas en la pared naciente como en paredes celulares maduras, formando estructuras dendríticas como una red (Wu et al., 2017). En la figura 1.11 A, se observa la expresión relativa de EXT3, donde la expresión de este gen en las líneas en que se sobreescribió *PrMADSI0*, es similar en L7-L3-L2, asemejándose al nivel de expresión en WT, con valores cercanos a 1, pero con un nivel de expresión menor en L1. Sin embargo, en EXT4 (Fig 1.11B), el nivel de expresión es de 1,25 en control, donde L2 es la línea que presenta una mayor expresión de 1.3, mientras que las demás líneas, presentan leves diferencias.

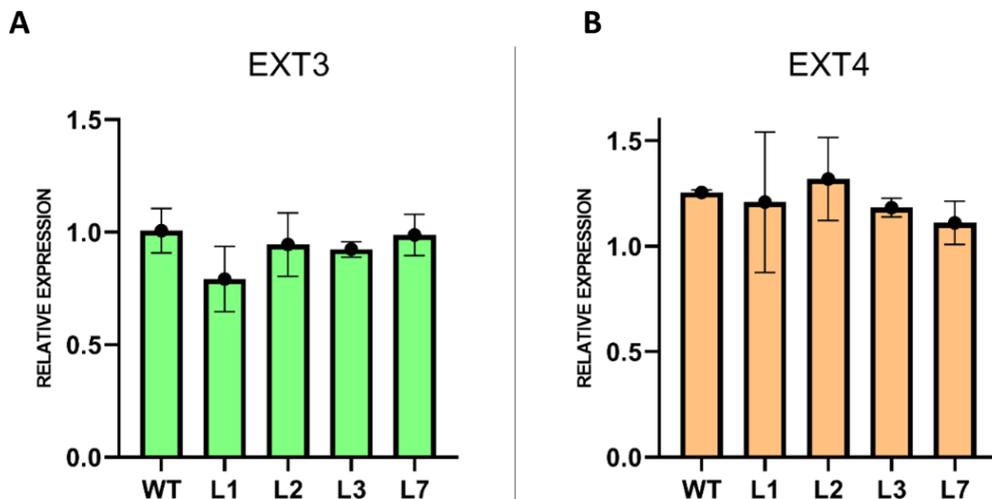


Figura 1.11. Expresión relativa de extensina 3 (AT1G21310) y de extensina 4 (AT1G76930).

Se presentan cuatro fasciclin-like con expresión diferencial, de las cuales a tres se les pudo realizar cuantificación de transcritos, donde FLA2 es una de las FLAs más abundantes expresándose principalmente en flores y hojas. A su vez, se presume que podría estar regulado por una vía dependiente de ABA de forma negativa (Johnson et al., 2003). Al observar el gráfico de expresión relativa (Fig 1.12A), las líneas transgénicas presentan una mayor acumulación de transcritos que WT, pero sin diferencias estadísticamente significativa. Con respecto a AtFLA9, por filogenia se agrupa en el grupo A de la clasificación de fascilin-like (Johnson et al., 2003), junto a AtFLA11, sin embargo, no tienen una función definida, en la figura 1.12 B, podemos observar que la expresión relativa en las líneas transgénicas, muestran una tendencia a presentar una mayor acumulación de transcritos que WT.

Por otro lado fasciclin-like 11(FLA11), interactúa entre membrana plasmática y pared celular, es el principal gen candidato por su mayor expresión en tallo y silicuas, pertenece a la super familia de HGRPS, catalogada como quimera en la subfamilia de proteínas de arabinogalactanos, es un gen asociado a adhesión celular, formación de pared celular secundaria, diferenciación del xilema y formación de madera al menos en otros leños como es *Pinus taeda* (Loopstra et al., 2000; Yang et al., 2005; Zhang et al., 2003). Al medir la concentración de transcritos (Fig 1.12 C), en las muestras de tallo, los valores son menores a 1, pero la tendencia de la expresión relativa de las líneas transgénicas es superior a WT, en todas las líneas. Mas detalle de esta familia de genes se describe en el Capítulo III.

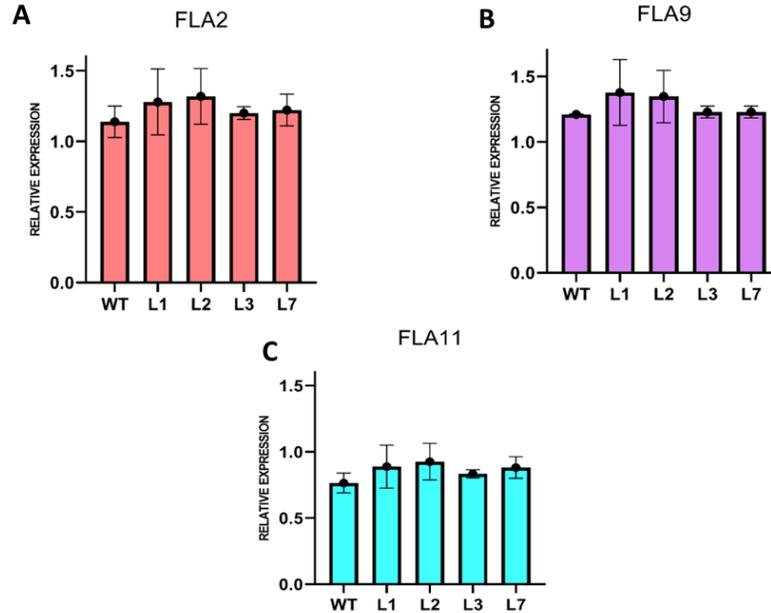


Figura 1.12. Expresión relativa de fascicline-like 2 (AT4G12730), fascicline-like 9 (AT1G03870) y fascicline-like 11 (AT5G03170).

Elementos en CIS de unión a MADS-box.

Todas las secuencias de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina y que presentaban una expresión diferencial en el microarreglo fueron consideradas. De un total de 21 genes, hay un AGP, cinco fasciclin-like (fla), nueve del grupo de extensinas (EXT-PERK-pollen allergen protein), dos glicoproteínas ricas en hidroxiprolina y cuatro proteínas ricas en prolina (PRP). Al comparar las secuencias entre ellas, se observa que son muy variables y similares entre sí, se realizó una filogenia con la secuencia de estos genes (Fig. 1.13) y a su costado se pueden observar los elementos en *cis*, asociados a unión de MADS-box, en naranja de AGAMOUS y AGAMOUS-like (AG/AGL) y en verde de APETALLA (AP).

Podemos destacar que del grupo de fasciclin-like hay 2 zonas promotoras en que solo hay elementos en *cis* para AG/AGL y no para AP (FLA9-FLA1), en extensinas hay 4 zonas con las mismas características (PERK4-Pollen allergen2-Pollen allergen 3-PERK1), el resto de las zonas promotoras presentan sitios de unión tanto para AG/AGL como para AP, sobrelapandose muchas veces.

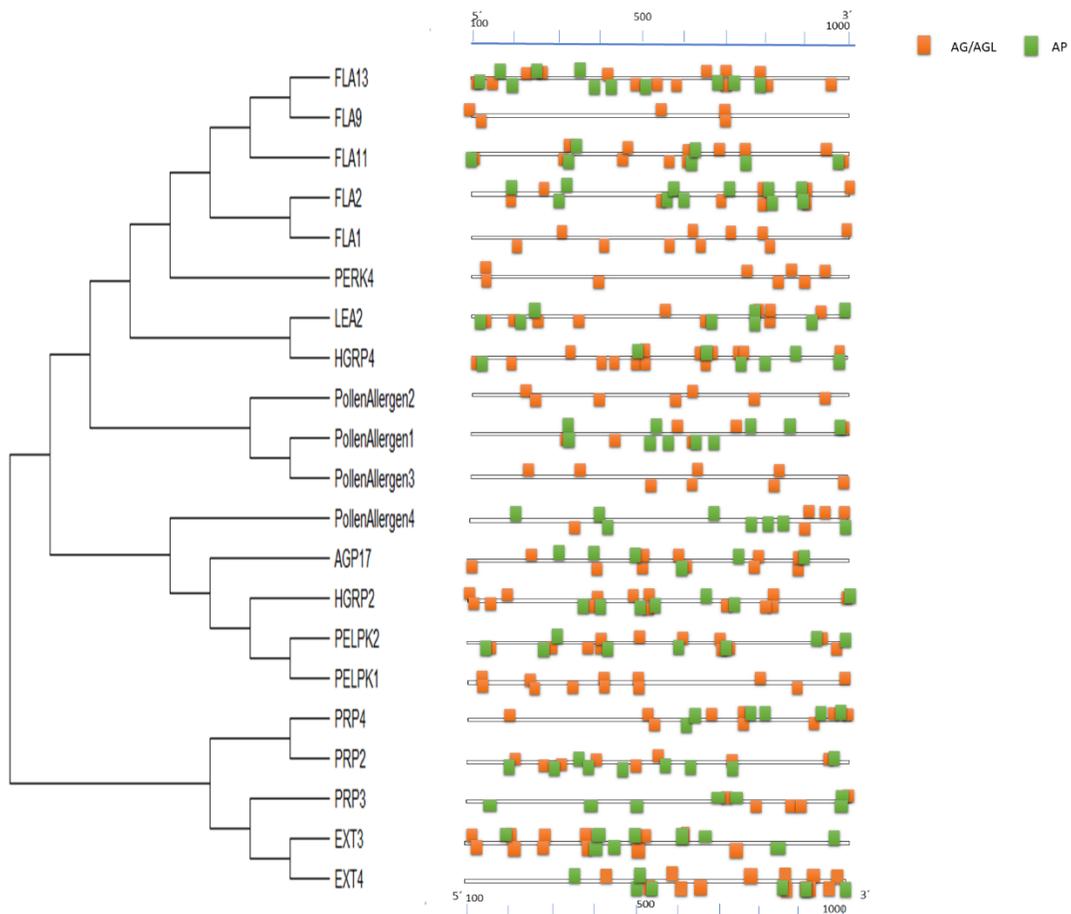


Figura 1.13. Filogenia con maxima parsimonia y sus elementos en CIS en zona promotora, en naranjo corresponde a AG/AGL y verde AP.

DISCUSION

La síntesis de los principales componentes de la pared secundaria, como celulosa, hemicelulosas y ligninas, esta regulada por FT expresados en xilema diferenciado de *Eucalyptus grandis* (Legay et al., 2010). Se han descrito al menos dos FT de la familia MYB que regulan todo el desarrollo de la pared celular secundaria (SCW), actuando por lo tanto como un segundo nivel de "interruptor maestro" asociados a síntesis de componentes de la pared secundaria, EgMYB1 actúa como represor (Legay et al., 2010), en tanto EgMYB2 como activador (Goicoechea et al., 2005) en este proceso. Ambos debido al hecho de que el FT NAC como SND1 (proteína de dominio NAC asociada a la pared secundaria) esta en el nivel superior de la red jerárquica (Zhong et al., 2006). Aparentemente, AtMYB46, el ortólogo de EgMYB2 es un blanco directo de SND1 (Zhong et al., 2007). De manera similar, la expresión de dos FT, MYB de *Populus trichocarpa* también es activada por PtrWND2, que es un ortólogo de SND1 en *Populus trichocarpa* (McCarthy et al., 2010). Las PtrWND se expresan en la estructura del tallo de *P. trichocarpa* (Zhong et al., 2010) que podría ser una expresión específica de fibra o del vaso. Ohtani et al. (2011) describió 12 genes PtrWND que modulan de forma redundante la diferenciación de vasos y células de fibra durante la formación del xilema. Estos FT modulan la expresión de genes implicados en la formación de SCW y la muerte celular programada, así como también, otros FT (Ohtani et al., 2011; Zhong et al., 2010).

También se han identificado otros NAC y MYB que participan en la regulación de SCW dinámica tanto en *Arabidopsis* como en árboles. Estos incluyen *PtrMYB28* (Zhong y Ye, 2009) y *PtrMYB1* (Bomal et al., 2008) potenciales ortólogos de activadores MYB específicos de lignina (Zhou et al., 2009), así como *PtrNAC118*, *122*, *128* y *129* de *P. trichocarpa* (Grant et al., 2010) que son potenciales ortólogos del Xylem NAC Domain 1 (XND1), un represor

transcripcional que regula la expresión de genes involucrados en la muerte celular programada y la formación de SCW (Zhao et al., 2008). Curiosamente, la sobreexpresión de SND2 está asociada a fenotipos particulares en tallos leñosos y herbáceos (Hussey et al., 2011).

Otras familias de (Ramos et al., 2012; Ramos et al., 2012b) FT, además de NAC y MYB, han participado en la regulación de la biosíntesis de SCW. Por ejemplo, la Proteína 7 del Homeodominio similar a KNOTTED1 reguló directamente SND1 (Zhong et al., 2008). Esta proteína regula negativamente la biosíntesis de la pared secundaria en álamo y *Arabidopsis*, funcionando como un circuito de retroalimentación negativa que reprime metabólicamente la formación de SCW y mantiene la homeostasis (Li et al., 2012). Otro TF, NtLIM1, regula la ruta de biosíntesis de lignina en tabaco y transformantes de *E. camaldulensis* (Kawaoka et al., 2006; Kawaoka y Ebinuma, 2001). A su vez, en plántulas de pino radiata expuestas a inclinación, se identificó una secuencia parcial correspondiente a un TF MADS-box en una biblioteca de hibridación suprimida sustractiva (Ramos et al., 2012b).

La importancia por el rol que juega en el desarrollo de las flores, fue el interés inicial de estudiar los genes MADS-box en plantas (Aswath y Kim, 2005b). Sin embargo, se aisló un gen MADS-box (PdPI) de *Populus deltoides*, que se expresa durante el desarrollo de la flor y en diferentes órganos vegetativos. La evidencia sugiere que el PdPI juega múltiples funciones en el desarrollo de esta especie (Zhang et al., 2008b). Asimismo, *StMADS11* y *StMADS16* se expresan mayormente en tejido vegetativo (Silva et al., 2016a). En pino radiata, estos FT se expresan en estróbilos masculinos y femeninos, por ejemplo, *PrMADS3* (similar a AGL6) se transcribe en tejido vegetativo, principalmente durante el brote de la semilla (Mouradov et al., 1998b). Aunque la evidencia define roles para MADS-box como FTs en la floración y otros procesos reproductivos, su expresión en raíces, hojas y tallos (Aswath y Kim, 2005b), como en el caso

de *PrMADS10*, sugiere otro tipo de función en estos otros órganos, quizás expresado en respuesta al estrés. En un primer esfuerzo por comprender el papel que desempeña este gen de MADS-box en el pino radiata, RACE obtuvo la longitud completa de *PrMADS10*. La secuencia de aminoácidos deducida se alineó con proteínas de MADS-box de diferentes especies disponibles en la base de datos de Genbank. *PrMADS10* contiene los dominios típicos conservados de caja MADS: caja MADS, intermitente, caja K y terminal C (Kaufmann et al., 2005). Según Shore y Sharrocks (1995), una secuencia conservada de 56 aminoácidos es característica en este dominio, de los cuales 16 son idénticos en todos los miembros de la familia. Las características estructurales también se pueden observar en el dominio de caja MADS (Cseke et al., 2003b) y la región del ADN responsable de las interacciones de proteínas y la dimerización (Shore y Sharrocks, 1995). El análisis filogenético de *PrMADS10* mostró una distribución de secuencias agrupadas en dos clados principales, con las secuencias de interés agrupadas en el clado II. En este clado, todas las proteínas tienen una estructura similar a MIKC (Gramzow et al., 2010; Smaczniak et al., 2012).

En pino radiata, se ha estudiado y reportado hasta la fecha 11 MADS-box, donde *PrMADS1-PrMADS2-PrMADS3*, se expresan en estadios tempranos de la iniciación y diferenciación de los brotes de conos (femeninos y masculinos o de brotes vegetativos) y yemas de brotes enanos. Siendo *PrMADS3* una especie de homólogos en el grupo de las gimnospermas a *AGL2/4-AGL6-AGL9* en angiospermas, pero por filogénia *PrMADS2-3* son agrupados a *AGL6* y *PrMADS1* se agrupa junto a *AGL2* (Mouradov et al., 1999b). Los demás *PrMADS-box* desde el *PrMADS4* al 9, son ortólogos de *TM3*, ya que tienen diferencias entre ellos y *TM3* en el dominio K, de acuerdo a similitud de secuencias, ubicándose todos en un mismo clado (Cruz, Méndez et al., 2019), según la expresión relativa de *PrMADS4-PrMADS5-PrMADS7-*

PrMADS8 y PrMADS9 se detecta su expresión en raíces y tejido floral. PrMADS6 si bien no se detectó expresión en material radicular tiene una mayor similitud a DAL3 y se expresa en tejido floral (Walden et al., 1998).

En el árbol filogenético, PrMADS10 está estrechamente relacionado con PaMADS1 de *P. abies* (Fig. 1.1B). PaMADS1 se expresa principalmente en piñas de pino, controlando el desarrollo de estos tejidos (Tandre et al., 1998). Además, las secuencias de proteínas de interés también están asociadas con un subclado clasificado como similar a SVP, AGL y MADS. En este sentido, se correlaciona con los genes como PtSVP (*P. trichocarpa*) y AtSVP (*A. thaliana*); AtAGL24 (*A. thaliana*), StMADS16 (*S. tuberosum*) y PtMADS1 (*P. tomentosa*). PtSVP es una proteína de la familia SVP (short vegetative phase) y está muy relacionada con AtSVP, que es un regulador floral negativo (Silva et al., 2016b). Esta secuencia se conserva tanto en angiospermas como en gimnospermas. Del mismo modo, AtAGL24 promueve la identidad de la inflorescencia en *Arabidopsis* cuya expresión se produce en el ápice de las yemas en el momento de la transición floral (Liu et al., 2008). La mayoría de los genes cercanos a PrMADS10 se denominan genes huérfanos, porque StMADS11, StMADS16, AtAGL24 y AtSVP se expresan en tejidos vegetativos, como la región del cambium vascular (Kim et al., 2002) y tienen el mismo patrón de expresión que PrMADS10. Por lo tanto, la evidencia filogenética sugiere que PrMADS10 podría estar involucrado en el desarrollo floral, pero no observable en plántulas de un año. Sin embargo, esta secuencia se aisló del lado inferior de los tallos de los pinos, poco después de la inclinación (Ramos et al., 2012b). Esto implica que su papel en pino está relacionado con la pérdida de verticalidad, modulando la expresión génica en los tejidos vegetativos más que en el desarrollo floral.

PrMADS10 se expresó diferencialmente 2,5 horas después de la inclinación y la acumulación de transcritos se observó preferentemente en la parte inferior de los tallos de plántulas de pino inclinados (Ramos et al., 2012b). El resultado sugiere que la expresión de *PrMADS10* está regulada temporal y espacialmente en las secciones del tallo. El cambio en los niveles de expresión de este factor de transcripción en los tallos de pino puede ser importante para el control de las vías metabólicas que modifican la estructura de la pared celular y las propiedades que impactan en la anatomía de la madera. Se han informado diferentes eventos moleculares relacionados con las modificaciones de la pared celular en respuesta a la pérdida de verticalidad, incluidos cambios en un gran número de FT (Allona et al., 1998a; Ramos et al., 2012b). Los trabajos de Allona et al. (1998a) y Ramos et al. (2012b) fueron complementarios, ya que ambos reportan nuevos genes que responden a la inclinación, aunque no se menciona la expresión diferencial de MADS-box FT en el estudio anterior. Se han descrito varios MADS-box diferentes en pino radiata; Se detectaron *PrMADS4* a *9* en brotes vegetativos, órganos florales y raíces, con mayor expresión en tejido floral joven en comparación con tejido adulto (Walden et al., 1998). *PrMADS1* a *3* podría estar involucrado en la regulación de las estructuras reproductivas femeninas (Mouradov et al., 1999c, 1998b) y el desarrollo de los conos (Mouradov et al., 1999a). La expresión de genes de caja MADS durante el desarrollo de las flores y los órganos vegetativos también se ha informado en *P. deltoides* (Zhang et al., 2008b). Por el contrario, (Cseke et al., 2003b) informó de *PTM5* que es específico del tejido vascular, expresándose en xilema y floema primario-secundario diferenciado. Por tanto, aunque los genes MADS-box están asociados con la floración, otros tejidos como el tallo pueden ser el tejido donde se puede expresar este factor de transcripción, que parece ser el caso de *PrMADS10*, y más probablemente involucrado en los tallos que modulan la respuesta a la inclinación.

El microarreglo AraGene muestra que *35S::PrMADS10* regula diferencialmente la expresión de 1219 genes cuando se expresan heterológicamente en *Arabidopsis*. *PrMADS10* induce la expresión de 690 genes diferentes y regula a la baja la de 529. (Aswath y Kim, 2005b) afirman que la expresión constitutiva de genes MADS-box en plantas de tabaco o *Arabidopsis* ha demostrado ser una herramienta útil para analizar funciones génicas, como lo demuestra la caracterización de SAG1, un homólogo de AGAMOUS, en la conífera picea negra (*Picea mariana*) (Rutledge et al., 1998). La sobreexpresión de SAG1 produce conversión floral homeótica en *Arabidopsis* transgénica (de sépalo a carpelo y de pétalo a estambre). Por otro lado, la sobreexpresión de MADS-box de *P. tomentosa* (PtAP3) en plantas de tabaco provoca un fenotipo de crecimiento rápido y floración temprana (An et al., 2011). Las líneas transgénicas *35S::PrMADS10* de *Arabidopsis* no mostraron ningún cambio fenotípico discernible, incluido el tiempo de floración, aunque el transgén se sobreexpresó al menos 20.000 veces en las 4 líneas obtenidas. Los primeros 50 genes más sobreexpresados fueron los implicados en la privación de fosfato, así como los FT y la sacarosa sintasa 4 (SUS4) (tabla 1.1). Inesperadamente, los genes de deficiencia por fósforo fueron los que se expresaron de manera más diferencial. Pi no fue un factor limitante en nuestros ensayos, sin embargo, algunos informes indican que la inanición de Pi está bajo el control de los FT necesarios para mantener la homeostasis del fósforo, que a su vez se ve afectada por el estrés ambiental (Baroja-Fernández et al., 2012; Dai et al., 2016).

Dos genes, una isoforma AtSUS multigénica (SUS1-6) que sintetizan monosacáridos para la biosíntesis de celulosa y almidón (Baroja-Fernández et al., 2012), y la biosíntesis de ramnosa 3 (RHM3), que proporciona ramnosa para la síntesis de la pared celular (Madduri et al., 2001),

también están regulados positivamente por *PrMADS10*. La quitinasa básica también está regulada al alza, que es una proteína que inhibe el crecimiento de las plántulas (Chen y Bleecker, 1995). Además, la proteína 70-5 del gen asociada a microtúbulos está regulada positivamente por *PrMADS10*. Este gen es esencial para definir los polímeros de SCW y se expresa en la corteza celular de las células formadoras de madera, lo que influye en el patrón de engrosamiento de SCW en los elementos traqueales (Pesquet et al., 2010). Estos resultados sugieren que *PrMADS10* regula positivamente varios genes implicados en la formación de la madera, como el metabolismo secundario, la síntesis de azúcares o la remodelación de los componentes de la pared celular, como se muestra en el análisis de MapMan (Fig. 1.5).

Más recientemente, la biosíntesis de celulosa / xilano / lignina es provocada por MYB46 / 83 y MYB85 (Tang et al., 2015). Ambos genes MYB (MYB83 y MYB85) están regulados positivamente en nuestro experimento, lo que indica que *PrMADS10* puede inducir la expresión de ambos TF, mejorando así la acumulación de lignina. Una red completa de relaciones proteína-proteína informada por STRING indica que estos TF también están asociados con NAC. Además, la red correlaciona la interacción entre MYB y NAC con genes fenilpropanoides, como *CCoAOMT*, *4CL2*, *4CL5*, *PAL4* y *4CL8*. La coexpresión de estos grupos de genes se informó cuando se realizó un análisis transcriptómico en el tallo de *Arabidopsis* durante el desarrollo (Minic et al., 2009).

Además, en plantas leñosas como eucalipto y álamo, la sobreexpresión de MYB216 aumenta la acumulación de transcripciones de *4CL5* y *PAL4* (Salazar et al., 2013; Tian et al., 2013). La eliminación de *PtMYB156* en álamo mostró un incremento en la acumulación de transcripciones de *4CL5* que indica una regulación selectiva de genes fenilpropanoides (Yang et al., 2017). FT como NAC y MYB se coexpresan preferentemente en xilema en *Picea glauca* (Lamara et al.,

2016) y *Pinus pinaster* (Pascual et al., 2018), lo que sugiere que ambos integran una red que participa en el desarrollo de maderas complejas. rasgos, y como regulador de la síntesis de fenilalanina. En nuestro ensayo, NAC10, NAC073 y MYB52, MYB42, MYB85 FT se expresaron diferencialmente y también mostraron relaciones con otros NAC y MYB en la red STRING. Coincidentemente, varios FT de MYB se caracterizaron a partir de plántulas de pino radiata y se expresan diferencialmente en ambos lados de un tallo inclinado, pero preferentemente en el lado superior (Gomez et al., 2018). Si NAC está modulando la expresión de los genes MYB y NAC, o si PrMADS10 podría desempeñar un papel central en esta interacción en respuesta a la flexión en el pino, es una cuestión abierta que requiere un análisis más detallado. Los genes más regulados en el lado de compresión de los troncos adultos de pino radiata son aquellos como: división celular, biosíntesis de celulosa, deposición de lignina y microtúbulos (Li et al., 2013). Genes como beta tubulina, sacarosa sintasa, proteína rica en prolina y pectina liasa se expresaron diferencialmente en las plantas de Arabidopsis 35S::PrMADS10, así como en pinos adultos (Li et al., 2013). Además, la cadena alfa de la tubulina, la familia de genes de la celulosa sintasa, sacarosa sintasa y expansina se expresaron preferentemente en el xilema diferenciado de Pinus taeda (Yang et al., 2004). Estos genes están activos de alguna manera durante el proceso de remodelación de la pared celular y también se expresan diferencialmente en la Arabidopsis transgénica 35S::PrMADS10.

Los genes de la vía fenilpropanoide también están regulados diferencialmente en plantas 35S::PrMADS10. El aumento de los niveles de transcripción de COMT fue similar al observado para PAL. Si los niveles de COMT aumentan, se deben modificar las cantidades de alcohol sinapílico, que es el último paso para la síntesis de lignina (siringilo). De manera similar, si aumentan los niveles de transcripción de COMT y CAD, podrían modificar las cantidades de

alcoholes sinapílico y p-cumarílico, el paso final para la síntesis de lignina (siringilo y p-hidroxifenilo, respectivamente). Esto es corroborado por estudios previos, que sugieren que el nivel de transcripciones de C3H podría ser determinante en el flujo de metabolitos hacia la producción de lignina, y las transcripciones de *CCoAOMT*, *CCR* y *CAD* se modulan según la demanda metabólica (Anterola y Lewis, 2002). Se informaron hallazgos similares en tallos inclinados de pino radiata (Ramos et al., 2012b). El resultado neto de aumentar el nivel de transcripciones de estos genes es un incremento en el flujo a través de la porción de monolignol para la ruta de biosíntesis de lignina (Patzlaff et al., 2003). Patzlaff et al. (2003a) reportó que *PtMYB4* reconoce elementos AC del promotor *PAL* y los genes que codifican las enzimas de biosíntesis de lignina se alteran después de sobreexpresar el gen *PtMYB4* en plantas de tabaco transgénicas. Además, la deposición de lignina aumenta y se propaga a otros tipos de células que normalmente no lignifican, lo que demuestra que *PtMYB4* fue suficiente para inducir la lignificación en un sistema heterólogo. Por el contrario, la sobreexpresión de *PtrMYB3* de populus en *Arabidopsis* condujo a un aumento en la deposición de los tres polímeros principales de la pared celular (Zhang et al., 2011). Se observó un incremento del 30% en la lignina en las líneas *35S::PrMADS10*, lo que sugiere una estimulación hacia la vía de biosíntesis de la lignina. Además, cuando se inclinaron plántulas de pino de un año, se observó acumulación de lignina y engrosamiento de la pared a los 15 días (Ramos y Herrera, 2013a). Esto sugiere que la remodelación de la pared celular podría regularse inicialmente por *PrMADS10* después de la inclinación.

Capítulo 2

“Genotipado de líneas de inserción SALK, selección de aquellas con gen silenciado y corte histológico con tinción de tallo e hipocótilo”

INTRODUCCION

Plantas de *Arabidopsis* fueron transformadas con el gen *PrMADS10* de pino bajo el control del promotor 35S. Las plantas sobreexpresoras del gen fueron analizadas por microarreglo, de las que se seleccionaron genes candidatos asociados a HGRPs, a pared celular y algunos factores de transcripción, que presentaron distintos niveles de expresión.

Por lo tanto, este capítulo intenta abordar el cuarto objetivo, correspondiente a “Genotipar grupo de genes de pared, deficiencia de fosfato y factores de transcripción, junto con determinar acumulación de lignina en líneas mutantes”.

Se seleccionaron plantas mutantes para 21 genes de los cuales siete son factores de transcripción, nueve genes que codifican a proteínas de pared celular, y cinco que se asocian directamente a deficiencia de fosfato. De los genes seleccionados, algunos presentaban inserciones génicas mayormente en exón e intrón y para al menos cuatro de ellos la inserción resultaba ser letal. El disponer de información del genoma de *A. thaliana*, ha permitido la generación de diversas colecciones de líneas de *A. thaliana* que contienen inserciones independientes de ADN de transferencia de *Agrobacterium tumefaciens* (T-DNA). Con ello, se establece por T-DNA (secuencia de ADN conocida) en el genoma de la planta, con tamaño que van de 5 a 25 kb de longitud, induciendo el plásmido Ti en el genoma de la planta infectada, generando diversas mutaciones, desde Knock-out donde el T-DNA se incorpora en la región codificante o

promotora generando un resultado nulo, Knock-down donde la inserción del T-DNA se encuentra en el promotor o 3'UTR obteniendo una expresión reducida del gen. Por otro lado, Knock-on se refiere a si el T-DNA se encuentra en la región promotora aumentaría la expresión, en el caso de Knock-about es cuando el T-DNA está ubicado en la región codificante generando un gen no nulo. Knock-knock se encuentra en región codificante o promotora produciendo múltiples KOs en una planta. Knock-worst ubicándose el T-DNA en región codificante o promotora, generando reordenamiento cromosomal (Krysan et al., 1999).

Descripción de líneas SALK

Se utilizaron los siguientes partidores para evaluar cada gen y así seleccionar las plantas que presentan la inserción de T-DNA, teniendo estos partidores para líneas SALK, SIG-LB1: 5'-CGGAACCACCATCAAACAG-3'- LBb1-3 SALK: 5'-ATTTTGCCGATTTTCGGAAC-3', partidores proporcionados por el grupo FeROS de INRA, Montpellier. Con ellas, se analizaron 37.536 plantas candidatos, de las 134.601 líneas en la colección SALK (Kawakatsu et al., 2016; O'Malley et al., 2015). Del grupo, se solicitaron las siguientes líneas:

Una de las líneas, contiene el gen short vegetative phase (SVP). Este gen es de la familia MADS-box, es un represor floral, sin embargo, se expresa en tejido vegetativo, específicamente en hojas, siendo catalogado como gen huérfano (Sh et al., 2002; Trevaskis et al., 2007). El gen consta de 9 exones 8 intrones (Fig. 2.1) y tiene una longitud de 4255 bp. Se observa que los transcritos varían en la región 5'UTR, pero conservan el mismo número de exones e intrones.

Es además, uno de los genes con mayor similitud de secuencia con *PrMADS10*, presentando un 48% de similitud y 98% de cobertura de secuencia.

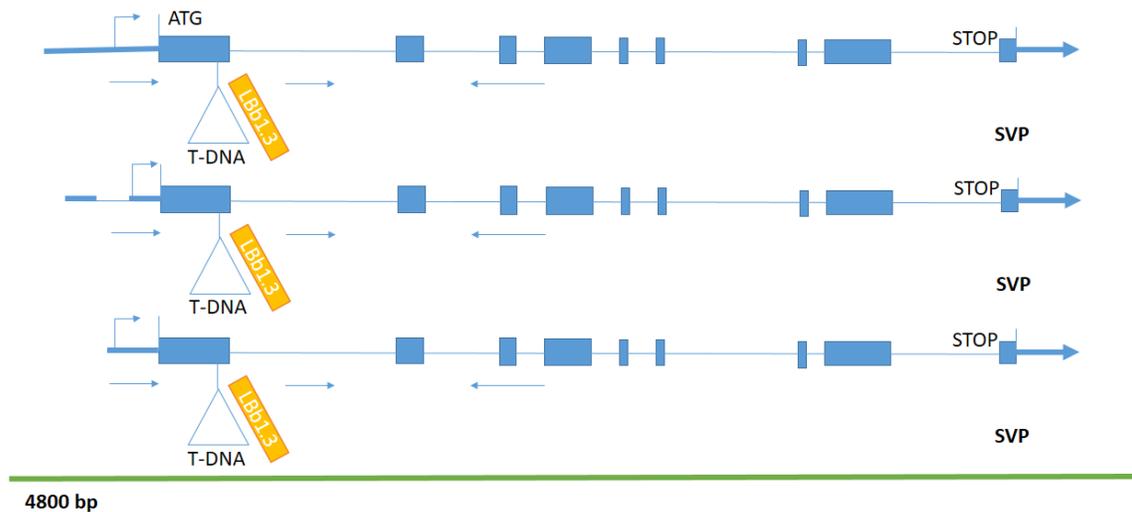


Figura 2.1. Esquema del gen SVP y posible exón donde se incorpora el T-DNA.

Otra línea contiene el gen expansina 8 (EXPA8), que corresponde a genes de pared celular. Este tiene un transcrito que está constituido por 3 exones y 2 intrones con una longitud de 1914 bp donde la inserción del T-DNA es en un intrón (Fig. 2.2A). Se ha reportado que estaría implicado en la expansión celular (Ud-Din et al., 2016). La sobreexpresión de *PrMADS10* en transgénicos de *A. thaliana* presenta una expresión disminuida (reprimido), convirtiéndolo en un buen candidato.

Dentro de la gran variedad de proteínas que interactúan entre membrana plasmática y pared celular encontramos a fasciclin-like 11 (FLA11), gen junto con EXPA8 se encontraron en el HUB3 descrito en el capítulo anterior. *AtFLA11* presenta un transcrito, compuesto por 1 exón, donde el T-DNA está inserto en él, consta de una longitud de 907 bp, todos en hebra positiva (Fig. 2.2B). Es el principal gen candidato por su mayor expresión en tallo y silicuas, pertenece a la super familia de HGRPS, catalogada como quimera en la subfamilia de proteínas de arabinogalactanos. Es un gen asociado a adhesión celular, formación de pared celular

secundaria, diferenciación del xilema y formación de madera, al menos en conífera como *Pinus taeda* (Ca et al., 2000; Yang et al., 2005; Zhang et al., 2003).

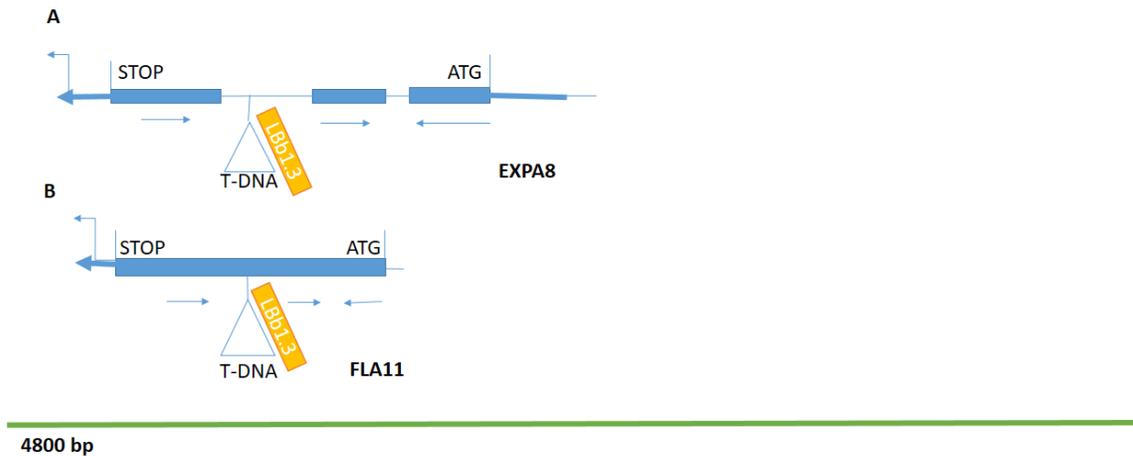


Figura 2.2. Esquema del gen A EXPA8 transcrito en hebra negativa, consta de 3 exones con ubicación posible de T-DNA en uno de los intrones. B FLA11 en hebra negativa consta de un exón con posible ubicación de T-DNA en exón.

A su vez, las líneas de Arabidopsis en que se sobreexpresó *PrMADS10* (L1-L2-L3-L7) se encontró que el gen arabinogalactano de la proteína denominada Arabinogalactan protein 17 (AGP17) se expresa diferencialmente. Este gen tiene un tamaño de 1251 bp, y presenta 2 transcritos (Fig. 2.3A). Tiene una mayor expresión en hojas y tallo, pero una débil expresión en raíces y flores (Yang et al., 2007). Junto a AGP18 están implicados en la unión de agrobacterium en raíces y gametogénesis femenina. Dentro de ésta misma superfamilia de HGRPs, encontramos las extensinas. En este caso hay dos que están presentando una posible modulación, uno de ellos es extensina 3 (EXT3) o extensin 3 (Wu et al., 2017). Esta es una glucoproteína estructural ubicada en la pared naciente como en paredes celulares maduras, formando estructuras dendríticas como una red, que está compuesto por 1 exón, que tiene una longitud de

1764 bp (Fig. 2.3B), y un dominio hidrofílico. Su mutación homocigota es letal, el mutante se denomina root- shoot –hypocotyl- defective (rsh).

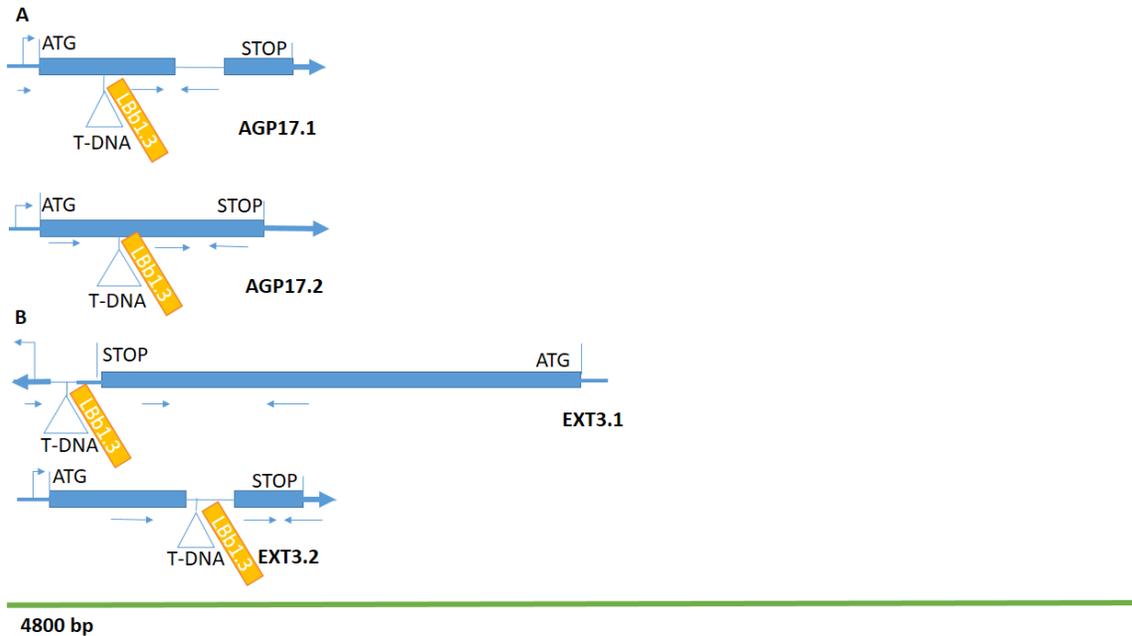


Figura 2.3. Esquema del gen **A** AGP17.1 transcrito 1 conformado por 2 exones, mientras que el transcrito AGP17.2 tiene 1 exón, teniendo ubicación del T-DNA en exón. **B** EXT3.1 con sus posibles ubicaciones donde se incorpora el T-DNA.

Otra proteína de membrana plasmática es NON-SPECIFIC PHOSPHOLIPASE C4 (NCP4), la cual es una enzima hidrolizante de fosfolípidos, que es inducida por deficiencia de fósforo. Este, al ser mutado muestra pelos radiculares más cortos en comparación a plantas control en condiciones limitadas a fósforo (Peters et al., 2010). Este gen presenta una expresión positiva al sobre expresar *PrMADS10*. Además, tiene un transcrito conformado por 5 exones 4 intrones y una longitud de 2597 bp (Fig. 2.4A).

De interés también resultaron aquellas relacionadas a los haces vasculares, entre ellas, se encuentra MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEINS (MAP70.5), la cual presenta una regulación positiva y específica para la diferenciación de elementos traqueales del xilema,

consecuente a lo observado en el microarreglo (Cruz, Méndez et al., 2019). Cuando el gen es silenciado mediante ARNi se observan plantas atrofiadas con ases vasculares desorganizados (Pesquet et al., 2010). MAP70.5 co-regula con celulosa sintasa A4 y A7 específicas para la formación de pared celular secundaria, asimismo, con nucleasas RNS3 y BFN1, las que están asociadas a muerte celular programada (Farage-Barhom et al., 2008). Está conformado por un transcrito con 9 exones y tiene una longitud de 2925bp (Fig.2.4B).

Muchos genes relacionados a deficiencia de fósforo fueron inducidos por la sobreexpresión de *PrMADS10*, uno de ellos es PHOSPHATE TRANSPORTER 1;4 (PHT1;4). Este gen se expresa principalmente en raíces, es un transportador de fósforo de alta afinidad, el cual se induce en respuesta a deficiencia de fósforo. Sin embargo, en un trabajo donde eliminan la región promotora del gen que contiene el primer motivo del sitio de unión a PHR1, permitió observar que seguía habiendo expresión en las partes aéreas, pero no en raíces (Karthikeyan et al., 2009). Tiene una expresión positiva, compuesto por un transcrito en hebra positiva, con 3 exones y 2 intrones, presentando una longitud de 3097bp (Fig. 2.4C).

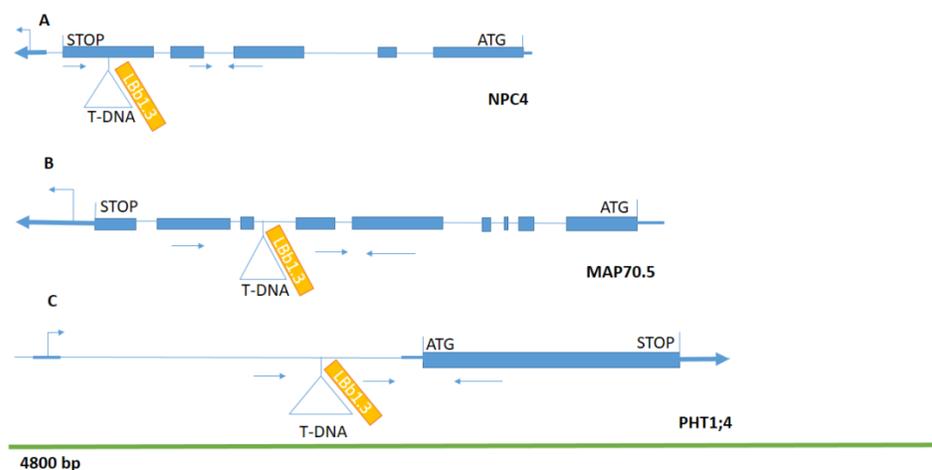


Figura 2.4. Esquema del gen **A** NPC4 transcrito en hebra negativa con 3 exones y T-DNA incorporado en uno de sus exones. **B** MAP70.5 tiene un transcrito en hebra negativa con 9 exones donde T-DNA está incorporado en uno

de sus intrones. C PHT1;4 transcrito de hebra positiva, contiene 1 exón donde el T-DNA está inserto en la zona promotora.

Varios de los genes candidatos elegidos se expresan bajo condiciones de estrés, WRKY DNA-BINDING PROTEIN 71(WRKY71) no es la excepción. Este corresponde a un factor de transcripción que muestra unión específica a cajas W. Pueden ser reguladores positivos o negativos en casos de defensa vegetal, estrés abiótico, así como también, estar involucrados en crecimiento y desarrollo de plantas (Guo et al., 2015). Se ha observado en datos de microarreglo de raíz de *Arabidopsis* la expresión diferencial de WRKY bajo estrés por salinidad (Agarwal et al., 2011). Así, se reportó que AtWRKY71 tiene un homólogo funcional que es AtWRKY54, los cuales son reguladores negativos de la biosíntesis de ácido salicílico. En el mutante, presenta un transcrito, compuesto por 3 exones y 1 intrón, y una longitud de 1442 bp (Fig. 2.5A).

Fasciclin-like 2 (FLA2), quimera de la subfamilia de proteínas arabinogalactano. En *Arabidopsis* es una de las FLAs más abundantes, expresándose principalmente en flores y hojas (Johnson et al., 2003). A su vez, se propone que su expresión, podría estar regulado negativamente por una vía dependiente de ABA (Johnson et al., 2003). De la misma forma, en nuestro caso presenta una expresión disminuida cuando *PrMADS10* se sobre expresa (Cruz, Méndez et al., 2019). Se compone por 1 exón y tiene una longitud de 1853 bp (Fig. 2.5B).

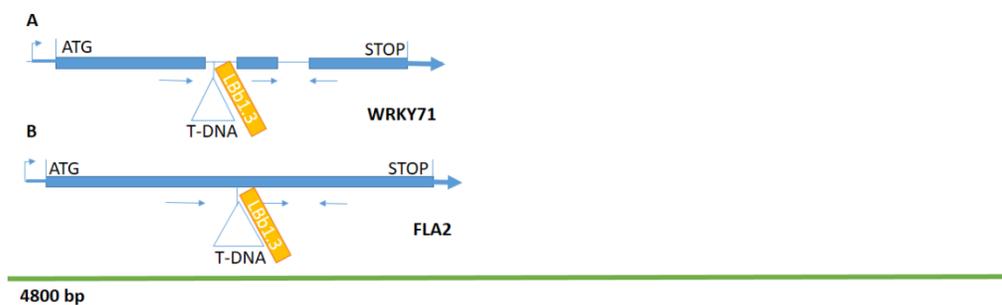


Figura 2.5. Esquema del gen **A** WRKY71 transcrito único en hebra positiva, constituido por 3 exones, donde T-DNA se ubica en uno de los intrones. **B** FLA2 transcrito único en hebra positiva, constituido por 1 exón, donde T-DNA se ubica el exón.

Líneas SAIL

SAIL es una colección de inserción que se generó a partir de aproximadamente 100,000 plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia, mutagenizadas con T-DNA. Se adoptó un enfoque modificado para la reacción en cadena de la polimerasa entrelazada asimétrica térmica (TAIL-PCR) para identificar las secuencias de flanqueo del borde izquierdo para estas plantas. El número promedio de inserciones de T-DNA por línea es de 1.5 a 2.0. La secuencia límite típica de PCR de TAIL de cada planta tiene más de 300 nucleótidos de longitud y a menudo contiene secuencia de dos productos TAIL separados. El partidor que fue proporcionado por el grupo FeROS para las líneas SAIL es el siguiente LB1: 5'-GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC-3'.

En este grupo se observan dos genes, uno es EARLY FLOWERING-like protein (ELF4), que se encuentra en el cromosoma 2 de *A. thaliana*. Este se le asocia un componente de un bucle de retroalimentación negativa, que implica la transcripción relacionada a factores de transcripción del tipo MYB, CCA1 y LHY, actuando río abajo del componente *zeitnehmer* (Kikis et al., 2005). Este gen tiene un exón y una longitud de 660bp (Fig. 2.6A). Por otro lado, MYB114 está involucrado en el complejo MBW, conformado por los factores de transcripción TTG1 y R2R3-MYB, que participan en la biosíntesis de antocianinas (Li et al., 2013). En el caso del transgénico *PrMADS10*, MYB114 (AT1G66380, log₂ -2,18) presenta una expresión disminuida, sin embargo, los genes que involucran al complejo que se reportan en (Li et al., 2013) no presentan expresión diferenciada, tiene tres transcritos, 7 exones y 4 intrones (Fig. 2.6B).

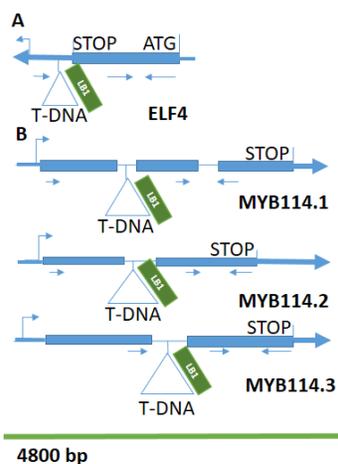


Figura 2.6. Esquema del gen **A** ELF4 transcrito único en hebra negativa, constituido por 1 exón, donde T-DNA se ubica en 3'UTR. **B** MYB114 consta con 3 transcritos, todos en hebra positiva, el primero tiene 3 exones, el siguiente 2 y el tercero 2, T-DNA ubicado en intrón.

Líneas WISC

Por otro lado, la colección de líneas WISC se compone por 10,459 líneas de T-DNA, generadas usando el ecotipo Columbia. La etiqueta de secuencia de flanqueo para cada inserción de T-DNA, está depositada en bases de datos públicas, donde las semillas de cada línea están actualmente disponibles en el Centro de Recursos Biológicos *Arabidopsis*. Se utilizó el vector pDsLox para crear esta nueva población que contiene un transposón Ds y sitios de recombinación *Cre/Lox*.

El partidor que fue proporcionado por el grupo FeROS para las líneas WISC es WiscO745: 5'-AACGTCCGCAATGTGTTAT-3'. En este grupo se encuentran dos genes TRANSCRIPTION ELONGATION FACTOR (SPT5_1) y WRKY DNA-BINDING PROTEIN 38 (WRKY38). SPT5_1, conocido también como F13P17_5, se encuentra en el cromosoma 2, su proteína tiene un peso de ~110.3 kDa, consta de 2 transcritos, 38 exones y 36 intrones, con una longitud de 4585 bp (Fig.2.7A). Se expresa en pistilo y estamen en *Arabidopsis* (Maul et al., 2014).

WRKY38, tiene un solo transcrito (Fig. 2.7B), es un factor de transcripción de tipo III, regulador negativo de la defensa de la planta, ya que, al expresarse, disminuye la expresión de PR1 (Kim et al., 2008). Este gen es inducido, tanto por la infección por patógenos, como por el tratamiento de SA (Wang et al., 2006). Se propone que funcionarían uniendo sus elementos en *cis* TTGACC / T W-box afines en las regiones promotoras de genes diana y activando o reprimiendo su expresión (Wang et al., 2006). Consta de 1 transcrito, 3 exones, 2 intrones, y presenta una longitud de 1536bp.

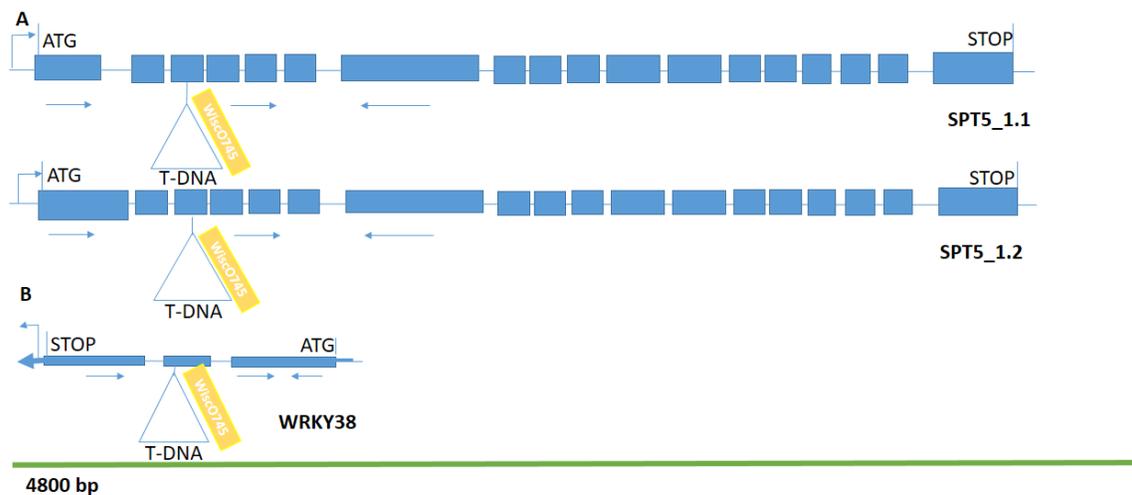


Figura 2.7. Esquema del gen **A** SPT5_1, tiene 2 transcritos en hebra positiva, constituido por 18 exones, donde T-DNA se ubica en uno de los exones. **B** WRKY38 consta con 1 transcrito en hebra negativa, con 3 exones y 2 intrones, T-DNA ubicado en un exón.

Líneas GABI-Kat

GABI-Kat es el segundo T-DNA indexado por FST (flanking sequence tag) más grande en líneas de inserción en la colección de *A. thaliana*, es una herramienta valiosa para la genética inversa desde que fue puesto a disposición del público en 2002 (Kleinboelting et al., 2015). El partidador que fue proporcionado por el grupo FeROS para las líneas GABI-Kat es SY150941914-078: 5'-ATATTGACCATCATACTCATTGC-3'.

De las líneas GABI-Kat se solicitaron purple acid phosphatases 25 (PAP25), el cual se sintetiza exclusivamente en condiciones de deficiencia de fosfato y se expresa en tejido vascular (Vecchio et al., 2014). Presenta 7 exones 6 intrones, con una longitud de 2120 bp. Para germinar las semillas, fue necesario esterilizarlas y crecer en un medio con antibiótico (sulfato diacina). Además, presenta el gen extensin 4 (EXT4) tiene 2 transcritos, 7 exones y 5 intrones, además de una longitud de 1820 bp. Este gen, también se conoce como EXT1, consta de bloques repetitivos de serina-prolina, junto a motivos Tyr-X-Tyr-Lys y Val-Tyr-Lys, confiriéndole una alta capacidad de formar enlaces intra e intermoleculares. Se expresa principalmente en raíz, mientras que en hoja se encuentra silenciada. Sin embargo, la expresión de éste gen en hoja se activa en defensa por heridas (Merkouropoulos et al., 1999).

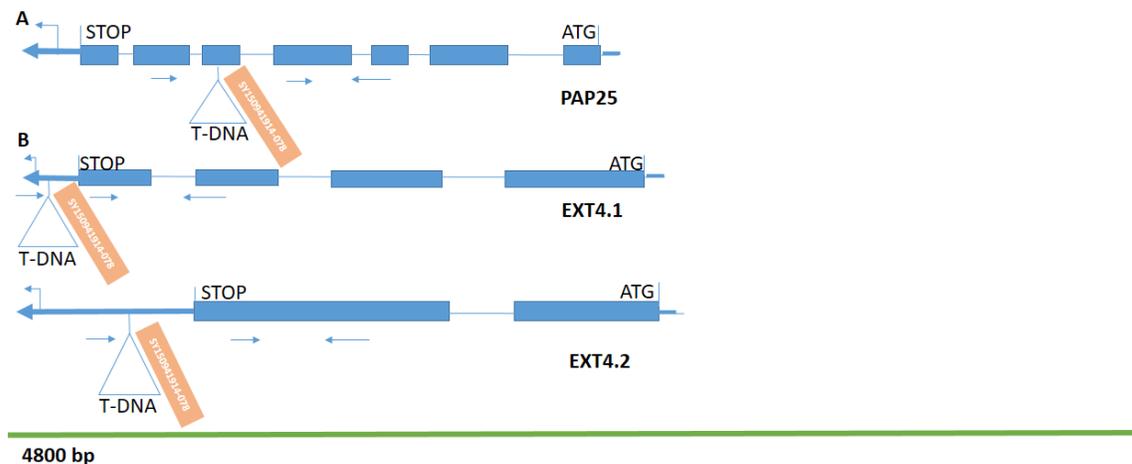


Figura 2.8. Esquema del gen **A** PAP25, consta con 1 transcrito en hebra negativa, con 7 exones y 6 intrones, donde T-DNA se ubica en uno de los exones. **B** EXT4 tiene 2 transcritos en hebra negativa, el primero tiene 4 exones y 3 intrones, mientras que el denominado EXT4.2 tiene 2 exones y 1 intrón, en ambos el T-DNA está inserto en la región 5' UTR.

Las semillas fueron solicitadas por el grupo FeROS y puestas a germinar en sustrato y otras en medio con antibióticos. Las inserciones no son 100% fiables por lo cual fue necesario chequear si el T-DNA estaba inserto en el gen de interés, o en la zona que permita anular la expresión del

mismo, en algunos casos, había líneas con alelo 1 y alelo 2. Por esta razón, por cada línea se dispersan semillas en 10 macetas y en cada maceta se dejan 4 plantas de las cuales a cada una se hace por extracción de ADN y PCR.

Si, el T-DNA queda inserto es posible generar una mutación estable, atrofiando la función del gen de interés, pudiendo observar parcialmente qué cambios puede provocar la represión de este gen. Se realizaron cortes histológicos de algunas de las plantas germinadas en INRA Montpellier en Francia, con tinción con floroglucinol -HCl y tinción de Mañle en cortes de tallo e hipocotilo. Sin embargo, para el análisis de las plantas 35S:PrMADS10, solo fue posible realizar tinción con floroglucinol -HCl a las plantas WT- L1-L2-L7, procesando las imágenes para realizar la medición del área de tinción y diámetro de los cortes.

Además, se observó tiempo de germinación, largo del tallo, conteo de hojas de roseta entre otras características fenotípicas.

MATERIALES Y METODOS

Material Vegetal

Semillas del banco de semillas de distinto tipo, correspondientes a genes que por análisis del microarreglo presenten expresión diferenciada. Teniendo para genotipar de esta lista de genes (21), 4 no tienen líneas KO, 11 son de tipo SALK, 2 SAIL, 2 WISC y 2 GABI-Kat.

Tabla 2.1. Listado de líneas solicitadas.

<i>Identificación del gen</i>	<i>Nombre corto</i>	<i>Nombre extenso</i>	<i>Línea</i>	<i>ID línea</i>	<i>Localización</i>
At2g22540	SVP	SHORT VEGETATIVE PHASE	SALK_026551C	N660785	Exon
At5g03170	FLA11	FASCICLINE LIKE 11	SALK_046976	N546976	Exon
At4g12730	FLA2	FASCICLINE LIKE 2	SALK_001056C	N685014	Exon
At2g23130	AGP17	ARABINOGALACTAN PROTEIN 17	SALK_016294	N516294	Exon
At1g21310	EXT3	EXTENSIN 3	SALK_081871	N581871	5'-UTR
At1g76930	EXT4	EXTENSIN 4	GK-522C03	N450043	Pro/Exon
At4g24890	PAP24	PURPLE ACID PHOSPHATASE 24	No KO lines		
At2g45130	SPX3	SPX DOMAIN GENE 3	No KO lines		
At2g34210	SPT5_1	Cc	WiscDsLox241B03	N849469	Exon
At4g36350	PAP25	PURPLE ACID PHOSPHATASE 25	GK-004D10-014797	N400334	Exon
At3g03530	NPC4	NON-SPECIFIC PHOSPHOLIPASE C4	SALK_046713C	N662345	Exon
At4g17220	MAP70.5	MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEINS	SALK_106968C	N68603	Intron
At2g38940	PHT1-4	PHOSPHATE TRANSPORTER 1;4	SALK_138643C	N664933	Intron
At1g22150	SULTR1;3	SULFATE TRANSPORTER 1;3			
At5g01220	SQD2	SULFOQUINOVOSYLDIACYLGLYCEROL 2	SALK_070595C	N672667	Exon
At2g40080	ELF4	EARLY FLOWERING 4	SAIL_424_B07	N874046	Exon
At5g22570	WRKY38	WRKY DNA-BINDING PROTEIN 38	WiscDsLox489-492C21	N864818	Exon
At1g57560	MYB50	MYB DNA-BINDING PROTEIN 50	No KO lines		
At1g66380	MYB114	MYB DNA-BINDING PROTEIN 114	SAIL_546_E05.V1	N823114	Intron
At2g40610	EXPA8	EXPANSIN A8	SALK_032390	N532390	Intron
AT1G29860	WRKY71	WRKY DNA-BINDING PROTEIN 71	SALK_050011	N550011	Intron

Diseño experimental

Las semillas de las líneas anteriormente nombradas, fueron dispuestas en invernadero por 15 días. Para ello, semillas de las líneas se esterilizaron y germinaron en un medio de selección para posteriormente pasar a sustrato. Sin embargo, para el resto de las líneas se prepararon las macetas con el sustrato, dejando 10 macetas por línea por tandas de germinación de al menos 5 líneas, dentro de las cuales se dispersan un total de 10 semillas aproximadamente. Se dejaron 4 plantas por maceta para poder comenzar con la selección. El esquema de trabajo para la selección de plantas se muestra en la figura 2.9. Se toman hojas cuando están en roseta para realizar extracción de ADN con el método Edwards. Se realiza PCR con partidores de los bordes derecho e izquierdo de cada gen para seleccionar por visualización de gel en electroforesis aquellos que no presentan amplificación. Una vez seleccionadas las plantas, se realiza una reacción de PCR utilizando el primer o partidor del borde izquierdo con el partidor correspondiente a la línea sea SALK, SAIL, WISC o GABI-Kat y otro PCR utilizando partidor

de borde derecho con el de la línea correspondiente, para verificar amplificación en las muestras de las líneas seleccionadas y no en el control.

Las plantas en maceta fueron cubiertas con plástico para evitar migración de polen y contaminación por moscas blancas. Aparecida la inflorescencia fue posible tomar muestra de tallo e hipocótilo. Las muestras se dejaron almacenadas en etanol para luego realizar las tinciones, que en este caso reflejan cualitativamente donde se acumula mayormente la lignina, considerando el hecho de que cuando el nivel de expresión de *PrMADS10* en pino es a la hora de inclinación (Nicolas Cruz, 2018) y desde ese momento, en adelante las traqueidas se redondean y se observa en pino acumulación de lignina alrededor de las traqueidas (Ramos & Herrera, 2013) lo que se observó con floroglucinol-HCl, y si *PrMADS10* al ser sobreexpresado y inhibe e induce ciertos genes que se plantean en este capítulo, parece ser interesante ver que pasa con la acumulación de lignina en ellos ya sea con tinción con floroglucinol-HCl o con tinción de Mañle, en las líneas que se pudieron trabajar en Francia. Al momento de teñir las muestras estas se deben observar inmediatamente bajo la lupa.



Figura 2.9. Selección de plantas que tengan el inserto de T-DNA correspondiente a cada línea solicitada.

En cuanto a las líneas 35S que sobre expresan *PrMADS10*, correspondiente a L1, L2 y L7, se germinaron semillas en tierra o sustrato para invernadero con perla y vermiculita, utilizando aproximadamente 10 plantas por línea, con el fin de realizar cortes histológicos y observar si había cambios en la acumulación de lignina en tallo e hipocótilo con tinción de floroglucinol-HCl. A las líneas sobrepresoras y plantas control, se les midió otros, parámetros mientras se observaba su crecimiento, como por ejemplo, número de hojas de roseta, tiempo de germinación, tamaño de hoja. La calidad de las fotos obtenidas en los laboratorios de Montpellier y Talca difirió por la calidad y sensibilidad de los equipos utilizados.

Condición de crecimiento plantas en INRA, Montpellier

Preparación Medio Murashge & Skoog (MS) para 1L

Se mezcló 4,3 g de sales de MS + vitaminas, 30 g de sacarosa (sacarosa), 0.1 g de mioinositol, 0,5 g de MES, luego se incorporó agua hasta llegar a 1 l con agua, se ajustó el pH a 5,7 con KOH, luego se distribuyó en 2 botellas que contenían 4,5 g de agar cada una, para finalmente autoclavar. Se dejó enfriar aproximadamente a 50 ° C, para luego agregar la solución sulfadiazina (0.5 ml por 0.5 l).

Para la línea PAP25 fue necesario utilizar el antibiótico sulfadiazina <https://www.gabikat.de/methods/sul-selection-scheme.html>

Desinfección de semillas

Las semillas se incubaron en una solución de esterilización, comenzando por hidratación en agua estéril (~10 vol) por ~7 min agitando suavemente. Se dejó decantar las semillas, para luego aspirar y eliminar el líquido. Después se adicionó cloro al 10% ~10 vol + 0.02 Triton X-100, agitando durante 5 min. Se dejó decantar las semillas, para luego aspirar y eliminar el líquido. Luego, se les incorporó en 70% etanol ~10 vol, y se agitó por 5 min, Se eliminó el etanol y lavó las semillas, repitiendo el lavado con agua estéril repitiendo por 5 veces. Se dejó decantar las semillas, para luego aspirar y eliminar el líquido. Se dejó secar las semillas por 30min en cámara de flujo laminar.

Dispersión de semillas

Las semillas desinfectadas se dispersaron en placas petri con medio MS y antibiótico. Las placas se estratificaron entre 3-4 días a 4 a 8 C (Kalve et al., 2014). Luego se transfirieron a una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 8h día/16 h noche a 22°C e intensidad de luz de 125 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (MacMillan et al., 2010; Naranjo et al., 2016).

Se determinó la tasa de germinación pasados 4 a 5 días, así como, se determinó diferencia entre plantas resistentes y sensibles (todas las plántulas amarillas que no formaron primeras hojas reales se consideran sensibles), después de 14 días, las plantas se traspasaron a sustrato.

Genotipado

Tampón Edwards

Este tampón es un método simple y rápido para el análisis de ADN. Se utilizó una solución 200mM TrisHCl a pH 7,5, 250mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS. Para la preparación de 50ml se mezcló: 8 ml de Tris (1M), 2ml de NaCl (5M), 2ml EDTA (0,5M) pH8, 1ml de SDS (20%) y 27ml de agua miliq (Edwards et al., 1991).

Extracción de ADN

Se extrajo el material genético con el método Edwards (Edwards et al., 1991). Este consiste en cortar la mitad de la hoja de cada planta, poniéndose en un tubo individual y trasladando al hielo. Se molió la muestra con un cono o p1000, luego se le agregó 250 μl de tampón Edwards a cada tubo, mezclando con vortex por 5s, centrifugando a 13000rpm por 5 m. Se recuperaron 300 μl

de sobrenadante y se transfirieron a un tubo con 300µl isopropanol, mezclando por inmersión. Se centrifugó nuevamente a 13200 rpm por 5 m, eliminando el sobrenadante en esta etapa y se dejó secar. Finalmente, se resuspendió el pellet en 30µl de agua miliq, para utilizar 1µl por reacción de PCR, almacenando a -20 °C.

Genotipado y amplificación mediante PCR

Se utilizó GoTaq Green Master Mix de Promega, con un total de 20µl por reacción (Tabla 2.2) y el perfil térmico (Tabla 2.3), realizando al menos 120 reacciones de PCR por gen.

Tabla 2.2. Mix para una reacción de PCR

	1X
H ₂ O	13,5 µl
Buffer	4 µl
dNTPs	0,4µl
Partidor forward	0,5 µl
Partidor reverse	0,5µl
Taq	0,1 µl
ADN	1µl

Tabla 2.3. Perfil térmico utilizado

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95	5m
<hr/>		
40	94	30s
	55	30s
	72	1m // varía dependiendo del largo a amplificar
<hr/>		
1	72	7m
	4	5m

Condición de crecimiento plantas en Universidad de Talca

El sustrato fue autoclavado y humedecido, antes de repartir en las macetas. Se dispersaron las semillas al menos 3 por maceta. Con un total de 10 macetas por línea (L1-L2-L7) más los 10 controles. Las macetas se cubrieron con plástico y papel para asegurar que se encuentren en oscuridad, luego se estratificaron entre 3-4 días a 4 a 8°C (cámara fría o refrigerador) (Kalve et al., 2014). Se transfirió a cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 8h día/16 h noche a 22°C e intensidad de luz de 125 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (MacMillan et al., 2010; Naranjo et al., 2016).

Luego de 4 a 5 días, se determinó la tasa de germinación, dejando crecer hasta presentar inflorescencia y flores para poder tomar muestras para los cortes histológicos.

Extracción de ARN y qPCR

Método Trizol

Muestras de hoja de al menos 3 plántulas (100mg) fueron incorporadas en tubos Eppendorf y molidas con bolas de acero en nitrógeno líquido. Para el efecto se utilizó un homogenizador de bolas (Reich), moliendo en tandas de 30s, remitiendo los tubos en nitrógeno líquido. Se le agregó 800 μl de Trizol, mezclando con vortex. Se obtuvo una emulsión homogénea al agregar 160 μl de cloroformo mezclando por 15s en vortex. Se centrifugó a 16200 rpm por 15m a 4°C y extrajo el sobrenadante (sin tocar la fase intermedia). El sobrenadante se incorporó a tubos Eppendorf con 400 μl de isopropanol, mezclando por turnos de 8 a 10 veces, luego se centrifugó por 15 m a 16200rpm a 4°C. Se lavó cada muestra con 1ml de etanol al 70%, 2 veces, se centrifugó 30s a 16200rpm a 4°C, eliminó el etanol de las muestras y se secó al vacío por al menos 20min, para luego diluir las muestras en 80 μl de agua miliq (Preston Campbell et al., 2015).

Síntesis de cDNA y qPCR

Se seleccionaron las muestras de ARN que presentaban 2 bandas al verificar por electroforesis y que por absorbancia cumplieran las relaciones 260/230, 260/280 cercanas a 2. Ya seleccionadas las muestras, se utilizó el kit de Thermo Fisher para la síntesis de cDNA (Maxima H Minus Double-Stranded cDNA Synthesis kit) y se procedió a utilizar las muestras para qPCR, utilizando como normalizador PP2. Considerando en la placa al menos tres réplicas técnicas y biológicas y partidores específicos de la zona UTR de cada gen candidato (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Listado de partidores utilizados en qPCR

<i>Gen</i>	<i>Forward 5'-3'</i>	<i>Reverse 3'-5'</i>	<i>Procedencia</i>
<i>PP2</i>	GAATGCCTGCGAAAAGTATGG	TCCTAATGTTGTCAAGGGTCTC	(T. Li et al., 2017)
<i>EXPA8</i>	CCATGGGACCTCTAGTTACAATTTT	TAATGCAACCATAACGATACGATCT	(W. Guo et al., 2011)
<i>FLA11</i>	GTTCAAGTCCATGTCTTACCTACACT	AAACCCGAATCCAGTCCTCTCTGC	(ITO et al., 2005)
<i>FLA2</i>	AGTCGTTACAAATGCTTAGATCAGGT	TTCGAGTAATCATCGCTGATACGGC	(ITO et al., 2005)
<i>ELF4</i>	CGACAATCACCAATCGAGAATG	AATGTTTCCGTGAGTTCTGAATC	(McWatters et al., 2007)
<i>PAP25</i>	CTGCTTACCAAACCTTCATCTATGC	TCTGTTACCTTCTTCAACTCTTG	(Vecchio et al., 2014)
<i>NPC4</i>	TGCACAATTAAGCGAATTTCAA	TTCTTCGTTTTTGTAGTCTCCTTTT	(Kocourková et al., 2011)
<i>WRKY38</i>	CGCCATGCGGTTGAAGAG	TAACCTGAAAGCGGTCCACCAT	(K.-C. Kim et al., 2008)

Tasa de germinación, medición de plantas y conteo de hojas

Las semillas que se germinaron en medio MS, se desinfectaron con cloro y agua destilada antes de incorporar las semillas al medio. Las placas se sellaron y se dejaron en estratificación por 4 días (Kalve et al., 2014). Se realizó el conteo de semillas germinadas.

La germinación en medio MS, se utiliza para realizar selección de plantas ya sea por medio con antibiótico y facilita el conteo de las semillas que germinan. De forma alternativa, si no se

requiere seleccionar plantas por uso de antibiótico, se las dispersan sobre sustrato y se estratifican. Dejando al menos una planta por maceta, en este caso como se dispersan varias semillas hay que estar atento para realizar raleo y dependiendo del tamaño de la maceta, poder dejar una o más plantas con cierta distancia para no alterar el crecimiento de la planta.

Se midió las hojas de la roseta antes de que se observe inflorescencia y el conteo de éstas después de la aparición de la inflorescencia. La medición de las hojas es posible de hacer a mano o con el procesador de imágenes Imagej.

Cortes y tinción

Plantas de 5-6 semanas después de la germinación fueron cortadas en el tallo basal (entre roseta y primer entrenudo) e hipocótilo de acuerdo a lo reportado por (Rogers et al., 2005). Para ello se utilizó: WT, línea 1 (L1), línea 2 (L2), línea 7 (L7), las líneas sobreexpresan *PrMADS10* (pBI121: 35S: *PrMADS10*). Los cortes se hicieron con cuchillas de corte de doble filo (Pradhan Mitra y Loqué, 2014). Las muestras fueron depositadas en portaobjetos y cubiertas en etanol al 70% hasta que se realizaron las tinciones. Los portaobjetos se prepararon con cinta adhesiva, para poder ubicar muestras de tallo en un lado y en el mismo portaobjetos ubicar el hipocótilo. Se generaron al menos 10 cortes de tallo y 10 de hipocótilo por planta (2 plantas mínimo por línea).

Floroglucinol (Ph-HCl)

Se disolvió 0.3 g de floroglucinol en 10 ml de etanol absoluto (solución al 3%), mezclando 1 volumen concentrado de HCl al 37% en 2 volúmenes al 3% de Ph-HCl (Pradhan Mitra and Loqué, 2014). La preparación se realizó y el mismo día de tinción, se realizó observación de las muestras. Posteriormente, se eliminó el etanol 70% donde se almacenaron las muestras y agregó

1 ml de Ph-HCl para cubrir inmediatamente (altamente corrosivo). Se agitaron suavemente los tubos hasta que las muestras se tornaron rosadas. Se eliminó el Ph-HCl e incorporó una punta p1000 cortada, tomando 1 ml de glicerol al 50%, con la misma punta. Las muestras se colocaron en el portaobjetos y cubrió con la cubierta del objeto. Para ser observado a la brevedad con la lupa Olympus a 3.5 graduación. Se utilizó el software Imagej 1.48v para analizar las imágenes y la medición del área desde la zona teñida, además del área total con los datos de diámetro (Schneider et al., 2012).

Tinción de Maüle

Se pesó 0,2g de permanganato de potasio en 40ml de agua destilada para llegar a una concentración de 0,5%. Se diluyó 1ml de HCl en 9ml de agua destilada. Posteriormente, se tomó 1ml de permanganato de potasio en los cortes y se mezcló suavemente. Se dejó decantar y se eliminó 700 µl de la solución. Se lavó 5 veces con agua destilada o hasta que se vea claro. Se eliminó el agua y se agregó 1ml de HCl dejando las muestras 3~5m, realizando 2 lavados de 5m cada uno para eliminar el HCl, finalmente se añadió 1ml de hidróxido de amonio concentrado y con una punta cortada se tomaron las muestras. Se posaron en el portaobjetos para analizar inmediatamente (Rogers et al., 2005).

RESULTADOS

Genotipado mutantes

Se genotipificaron todas las mutantes, sin embargo, en este capítulo se mostrará la imagen de la electroforesis a modo de ejemplo, de lo realizado con uno de los genes SVP (Short Vegetative

Phase). Este gen de *Arabidopsis* presenta la mayor similitud a PrMADS10, y por ello, se encontró interesante observar que sucede cuando este gen se encuentra interrumpido. Como se expuso en la metodología, se destinaron 10 macetas por línea mutante, donde se dispersaron semillas y se releo hasta dejar solo 4 plantas por maceta, teniendo un total de 40 plantas por línea a los 10-12 días de germinar, de los cuales se extrajo el ADN con el método Edwads, a partir de una hoja caulinar, considerando las 10 hojas de la línea versus 1 hoja de planta control que se considera como positivo y el negativo que solo tiene agua como templado. A partir de las muestras de ADN, se realizó una reacción de PCR con los partidores diseñados para identificar los mutantes y diferenciarlos de las plantas control. Así, los partidores SVP_LP y SVP_RP generaron producto de amplificación del tamaño esperado en las muestras control (WT), el cual no se observa en los mutantes (Fig 2.10 A). Las plantas mutantes tienen los insertos de T-DNA en esta región, siendo mucho mayor el espacio entre oligonucleótidos.

Para diferenciar los individuos mutantes *svp* se utilizó un partidor específico. En el caso del genotipado de líneas SALK fue el partidor LBb1.3, el cual se alinea con L/B del T-DNA insertado en la secuencia de SVP de los individuos mutantes. La primera reacción de PCR corresponde amplificar con los partidores LBb1.3-SVP_LP y LBb1.3-SVP_RP en que solo debería amplificar la muestra positiva, en este caso de la planta WT, que es lo que se observa en la fotografía del gel de electroforesis (Fig 2.10 A). La reacción de PCR con el partidor SVP_LP-LBb1.3 amplifica solo las muestras que contienen el T-DNA incorporado, en el caso ejemplo, hay amplificación en las cuatro plantas de la maceta 4, en la dos tres y cuatro de la maceta 6 y en la dos y tres de la maceta 7 (Fig 2.10 B), sin embargo, no hay amplificación en la muestra WT. De la misma manera, se realiza otra reacción de PCR con el par LBb1.3-SVP_RP, observando amplificación en muestras que presentan inserto el T-DNA, en este caso uno, dos y

cuatro de la maceta 4, dos de la maceta 6 y dos y tres de la maceta 7 (Fig 2.10 C). Por lo tanto, las muestras que no generan producto de amplificación (Fig 2.10 A)(con excepción del positivo o control), pero que si amplifican con el par de primers LP-LBb1.3 y RP-LBb1.3, son las que tienen el inserto y son mutantes svp, considerando eso, de la maceta 4, las plantas uno y dos contienen el inserto, de la maceta 6, solo la planta dos y de la maceta 7 las plantas dos y tres (Fig 2.10 B-C). El procedimiento se realizó con las 40 plantas.

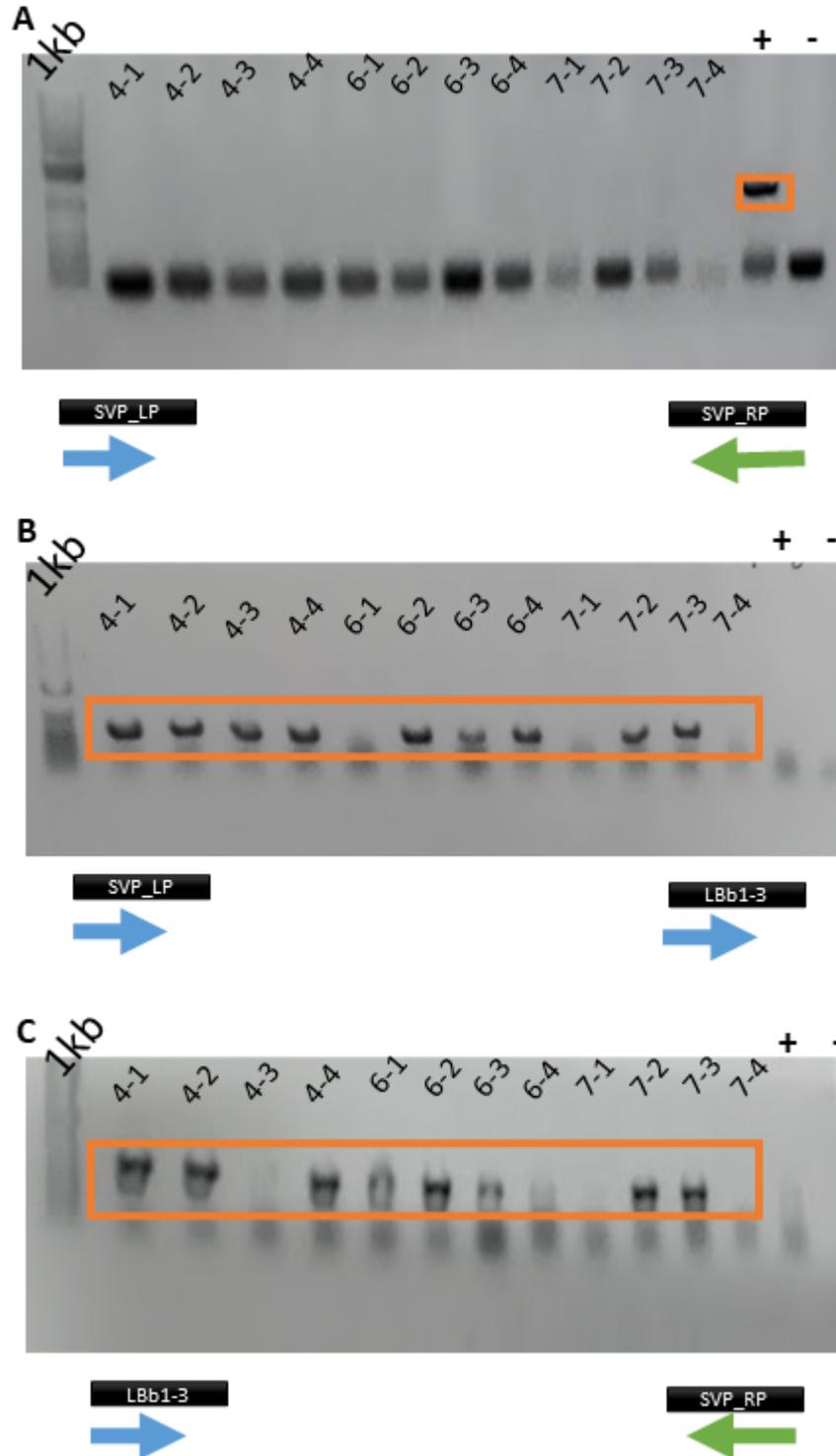


Figura 2.10. Ejemplo de electroforesis en gel del genotipado de línea SALK correspondiente al gen SVP, considerando en el primer carril el marcador de peso molecular de 1KB, seguido de los siguientes cuatro carriles corresponden a plantas 1-2-3 y 4 de la maceta 4, seguidos por muestra de las plantas 1-2-3 y 4 de la maceta 6 y

plantas 1-2-3-4 de la maceta 7, seguido de ADN de planta WT y negativo que como templado lleva agua. **A** Electroforesis con los partidores bordes; **B** Electroforesis del borde izquierdo con partidor LBb1.3; **C** Electroforesis del borde derecho con partidor LBb1.3.

El procedimiento de genotipificación se realizó con 17 líneas de potenciales mutantes (Tabla 2.1), una de las cuales hubo que chequear en su segundo alelo, por lo tanto, se chequearon 18 líneas x 40 plantas = 720 plantas de líneas mutantes a las que se les extrajo ADN más las plantas WT en el primer chequeo ya que luego al seleccionar las plantas que amplificaron en conjunto con los partidores LP y RP emparejados con el partidor del tipo de línea, se chequea nuevamente extrayendo DNA para corroborar por PCR antes de realizar extracción de ARN. De estas 13 líneas mutantes pasaron los 2 chequeos de genotipado (Tabla 2.5) pasando SVP, FLA11, FLA2, EXT4, SPT5_1, PAP25, NPC4, MAP70.5, PHT1-4, ELF4, WRKY38, EXPA8 y AGL17. Se realizó extracción de ARN de todas las líneas, considerando al menos una planta que tuviese el inserto, sin embargo, no todas las extracciones llegaron a síntesis de cDNA y qPCR(Fig.2.11).

De las muestras analizadas, 10 líneas se ocuparon para corte y tinción. Las restantes, fueron sacrificadas antes de poder montar el experimento (tabla 2.1). Las plantas finalmente analizadas y las actividades desarrolladas se resumen en la tabla 2.5.

Tabla 2.5. Cuadro resumen de las actividades, conformado por código, nombre abreviado del gen, tipo de línea, plantas seleccionadas en la primera y en la segunda genotificación, planta a la que se le extrajo RNA, si se realizó tinción con Ph-HCl, tinción con Maüle y qPCR.

AGIcode	Nombre	Línea	Primera selección	Segunda selección	Extracción de ARN	Ph-HCl tinción	Maüle tinción	qPCR
At2g22540	SVP	SALK_026551C	3(4-6-7)	2(4-6)	Plant6			
At5g03170	FLA11	SALK_046976	4(2-3-5-10)	2(2-3)	Plant3			ok
At4g12730	FLA2	SALK_001056C	4(1-4-5-7)	1(4)	Plant4			ok
At2g23130	AGL17	SALK_081871	0		-			
At1g76930	EXT4	GK-522C03	4(3-4-7-10)	2(3-4)	-			
At2g34210	SPT5_1	WiscDsLox241B03	11(1-1'-1''-1'''-5-5'-4-4''-4'''-9''-9''')	4(1-4-5-9)	Plant9	ok	ok	
+At4g36350	PAP25	GK-004D10-014797	5(2-2'-3-3'-4)	3(2-3-4)	Plant2	ok	ok	
At3g03530	NPC4	SALK-046713C	4(3-4-5-7)	4(3-4-5-7)	Plant5	ok	ok	
At4g17220	MAP70.5	SALK_106968C	6(1-3-5-37-8)	3(3-6-8)	Plant6	-	-	
At2g38940	PHT1-4	SALK_138643C	2(7-8)	2(7-8)	Plant8	-	-	
At5g01220	SQD2	SALK_070595C	0	0	-	-	-	
At1g40080	ELF4	SAIL_424_B07	4(1-6-7-8)	1(6)	Plant6	ok	ok	
At5g22570	WRKY38	WiscDsLox489-492C21	6(1-2-4-5-6-10)	3(1-2-6)	Plant 5	ok	ok	ok
At1g66380	MYB114	SAIL_546_E05.v1	0	0	-	-	-	
At2g40610	EXPA8	SALK_032390	2(1-2)	1(2)	Plant2	ok	ok	ok
At1g29860	WRKY71	SALK_050011	0	0	-	-	-	
*At2g23130	AGL17	SALK_081871	2(2-4)	'1(4)	Plant4	ok	ok	

*Segundo alelo analizado, el primero no funcionó

+ Selección en placa

PCR cuantitativa

Se utilizó como gen constitutivo PP2, y mediante la técnica de PCR cuantitativa, de la tabla 2.5, se obtuvieron datos de FLA11, FLA2, WRKY38 Y EXPA8.. Estas, presentan una expresión relativa menor al que se observa en las muestras WT con partidores específicos de cada uno de los genes (Tabla 2.5). EXPA8 presenta la mayor expresión en plantas WT, de hasta 4,5 veces la expresión relativa (Fig. 2.11 A). A su vez, la planta mutada para FLA11 presenta una acumulación de transcritos sobre 50 veces en el WT, siendo casi imperceptible la acumulación de transcritos en la planta con el gen mutado (Fig. 2.11 B). FLA2 presenta un valor 24 veces menor respecto del control (Fig. 2.11 C). ELF4 presenta una acumulación de transcritos 3 veces superior en WT, respecto de la línea mutante (Fig. 2.11 D).

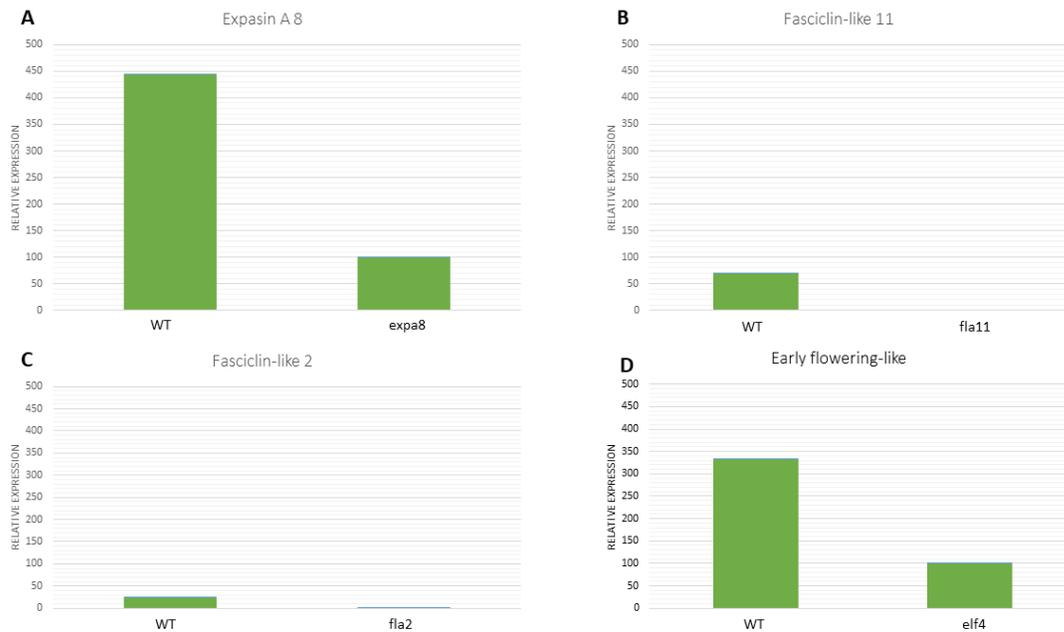


Figura 2.11. Expresión relativa de las plantas que tienen mutación en el gen candidato. **A** Expansin A, expresión del gen en muestra WT versus muestra de plantas seleccionada por genotipado. **B** Fasciclin-like 11, expresión del gen en muestra WT versus muestra de plantas seleccionada por genotipado. **C** Fasciclin-like 2, expresión del gen en muestra WT versus muestra de plantas seleccionada por genotipado. **D** Early flowering-like expresión del gen en muestra WT versus muestra de plantas seleccionada por genotipado.

Por el contrario, hubo líneas que presentaron una acumulación de transcritos superior al control y que no son KO. De ellas, *pap25* muestra una expresión relativa 100 veces superior al WT (Fig 2.12A). Caso similar es observado para *npc4* (Fig 2.12B) y *wrky38* que presenta una expresión relativa de 30 veces versus 100 veces el que tiene inserto T-DNA (Fig 2.12C).

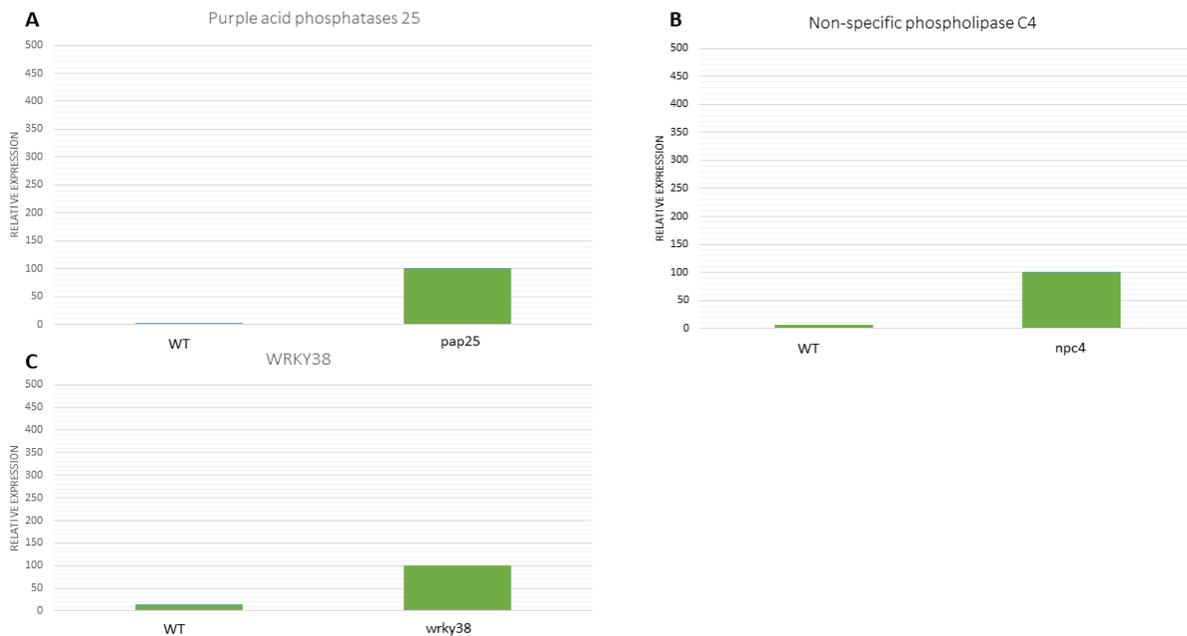


Figura 2.12. Expresión relativa de las plantas que tienen mutación en el gen candidato pero que presentan una mayor expresión que las plantas WT. **A** Purple acid phosphatases 25 (pap25), expresión del gen en muestra WT versus muestra de plantas seleccionada por genotipado. **B** Non specific phospholipase C4 (NPC4), expresión del gen en muestra WT versus muestra de plantas seleccionada por genotipado. **C** wrky38, expresión del gen en muestra WT versus muestra de plantas seleccionada por genotipado.

Tinción

Se realizó la tinción de la parte superior del sistema radicular, meristema apical de la raíz (RAM) (Fig 2.13A), donde los haces vasculares se representan de color rojo (xilema) y el anillo exterior amarillo representa al floema en la pared de la figura en que va de la A a la F, donde el corte del hipocótilo se representa en la D (Fig 2.13 A), la distribución de los haces es similar a las gimnospermas, por lo cual nos sirve de modelo. A su vez, en los cortes de hipocótilo basal, se puede observar el centro de la matriz, luego el xilema, zona cambial y hacia el exterior floema (Fig 2.13B).

Al usar Ph-HCl, donde hay una mayor concentración de lignina, se observa de un rosa magenta (Fig 2.13C), observándose en los cortes de tallo, una distribución similar a lo representado en

imagen C de la figura 2.13 A, donde xilema y fibra interfascicular tornan en esta coloración. A su vez, el reactivo de Mäule, proporciona una evaluación cualitativa de la composición de la subunidad de lignina (siringilo) vs guayacilo), teñido de rojo. La abundancia del monolignol siringilo en el polímero de lignina, se encuentran típicamente en las fibras interfasciculares, en contraste con la lignina que se deposita en las paredes celulares de los vasos de xilema, que carece de subunidades de siringilo y es rico en unidades guayacilo (Rogers et al., 2005) y se observan distintas coloraciones, acentuando en café los haces xilemáticos y en rosa la fibra interfascicular (Fig. 2.14).

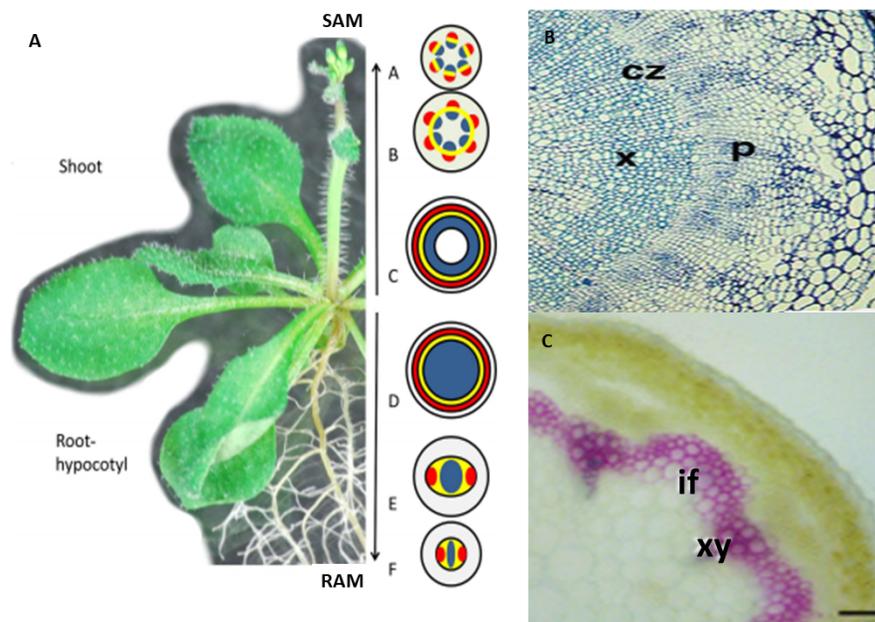


Figura 2.13. Partes de la planta y cortes de arabisopsis desde SAM a RAM. (modificado de Nieminen y cols 2015) junto al corte de hipocótilo y tallo. **A** Representación de la organización vascular de la inflorescencia de arabisopsis (A-C) y de la raíz (D-F), donde D corresponde al hipocótilo. **B** Corresponde al corte del hipocótilo donde **CZ** es la zona cambial, **X** es el xilema y **P** floema, (modificado de Nieminen y cols 2015) y **C** es un corte de tallo teñido con PH-HCl de planta WT, indicando **XY** correspondiente a xilema, **if** a fibra interfascicular.

Se realizaron 10 cortes por línea y por tinción, ordenándose de la siguiente forma: corte de hipocótilo teñido con PHCl seguido de corte de hipocótilo con tinción de Mäule, corte de tallo basal con tinción de PHCl y corte de tallo con tinción Mäule (Fig 2.14). En la muestra control

(WT) de hipocótilo teñida con PHCl se observa una clara tinción en xilema y raíz lateral. Hipocótilo teñido con Maüle se observa en coloración roja o anaranjada la pared celular de los haces vasculares xilemáticos. En el caso, del corte tallo basal es posible observar una mayor intensidad de la tinción, presumiendo que haya acumulación de lignina en el xilema, sin embargo, en esta misma ubicación con Maüle se observa una coloración café pálido en esta área, evidenciando posiblemente que haya más concentración de guayacil (Fig 2.14). Las muestras de pap25, que según qPCR no está completamente knockout (Fig 2.12A), se observa un corte hipocotilo y raíces ramificadas casi desde la base, por lo tanto, los cortes de hipocótilo muestran una tinción difusa y amplia, en una gran área de ases xilemáticos. En tallo se observa una mayor intensidad de coloración en la zona del xilema y una mayor coloración café en el xilema, epidermis y corteza. En AGL17 se observa tinción intensa en el corte de hipocótilo y algunas secciones correspondientes a floema. En la zona del xilema se concentra una mayor concentración de lignina y así como también se observa pronunciadamente los haces de XY (Fig 2.13). Se observa un patrón similar en NCP4-SPT5-EXPA8 y ELF4. La tinción en WRKY38 es más clara para ambas tinciones del hipocótilo, pero más demarcada la presencia de lignina en los cortes de tallo.

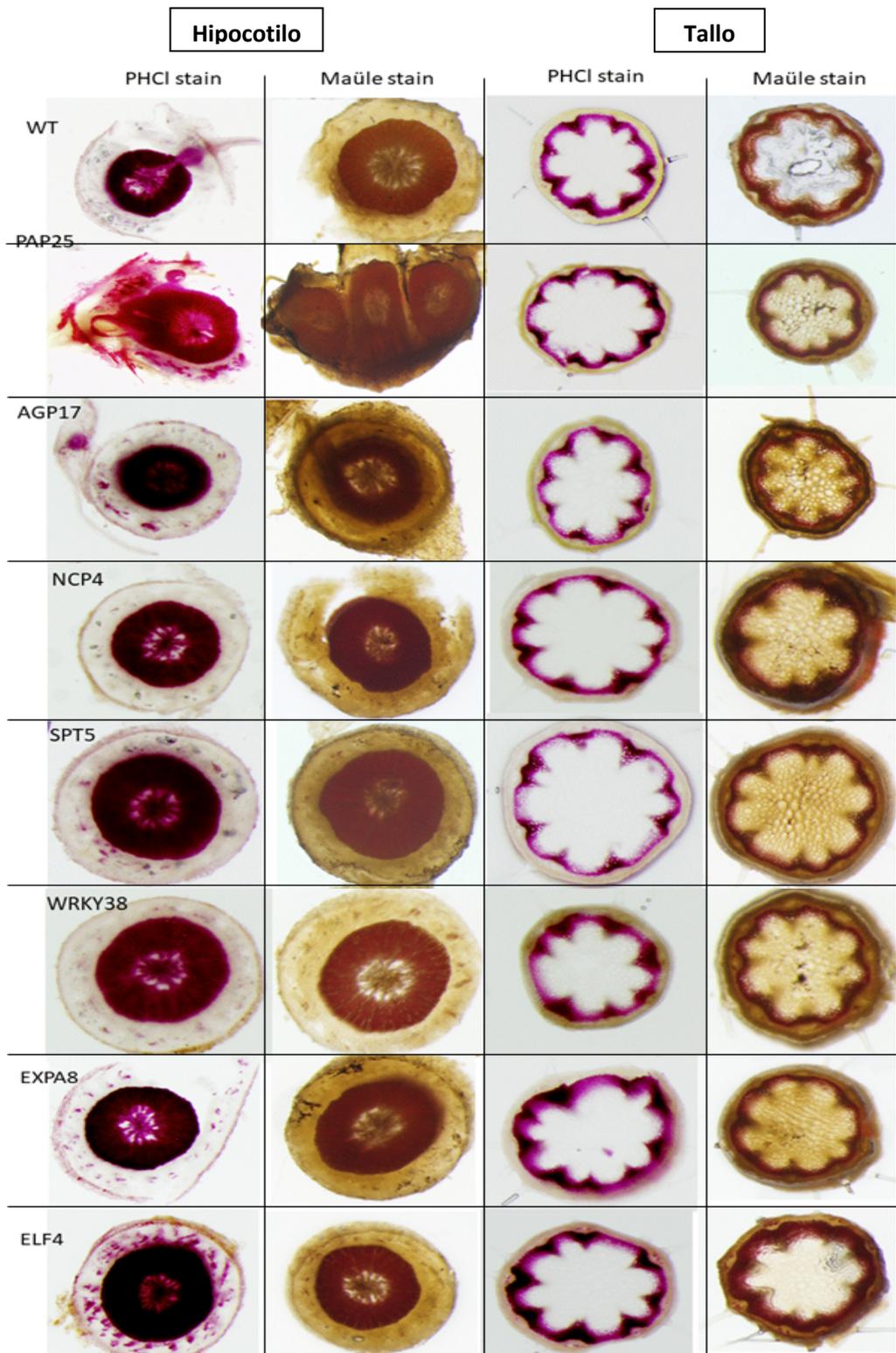


Figura 2.14. Corte de hipocótilo teñido con PHCl seguido tinción de Maüle, corte de tallo basal con tinción de pHCl y corte de tallo con tinción Maüle, de plantas WT, PAP25, AGP17, NCP4, SPT5, WRKY38, EXPA8, ELF4.

Se midió el área de tinción y diámetro total de las muestras de tallo e hipocótilo, considerando un n=9 por línea, para la tinción de PHCl, en los mutantes de pap25, agp17, spt5, ncp4, elf4, wrky38 y expa8 versus WT. Al comparar el área teñida del hipocótilo, elf4 (0.3 Unidades de medida) es la que presenta significativamente la menor área de tinción, seguida por pap25(2U), wrky38(4U), spt5(5U) siendo diferencias significativamente menores al control (Fig 2.15A). Al comparar el área de tinción del tallo, las muestras que presentan diferencias significativas, con una menor área son agp17, elf4 y wrky38 (Fig 2.15B). En tanto del diámetro de los cortes de hipocótilo se separa en dos grupos, elf4 significativamente con el mayor diámetro (Fig 2.15C), sin embargo, el diámetro del tallo de spt5, ncp4 y wrky38 presentan un diámetro significativamente menor al WT, solo elf4 tiene valores significativamente menores que WT y las demás líneas transgénicas (Fig 2.15D).

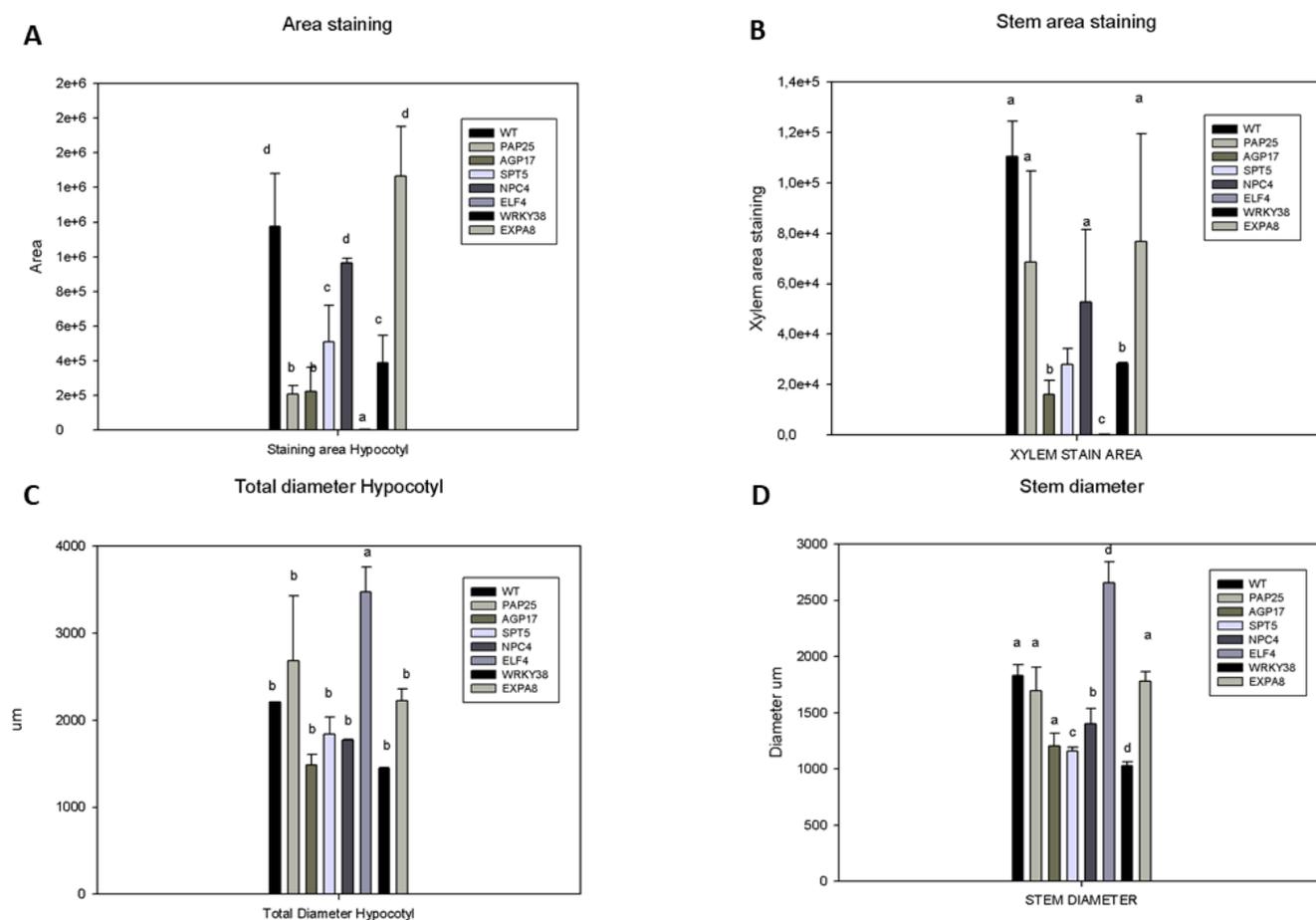


Figura 2.15. Área de tinción y diámetro total de cortes de hipocótilo y tallo. **A** Área de tinción de hipocótilo. **B** Área de tinción de tallo. **C** Diámetro total de hipocótilo. **D** diámetro total del tallo.

Mediciones fenotípicas de plantas 35S::PrMADS10

Por otro lado, con las líneas 35S::PrMADS10, se realizaron mediciones fenotípicas, desde el conteo de hojas de roseta por cada 10 plantas x línea (L1-L2-L3-L7) y WT. Se observa un mayor número de hojas pero que no son significativas en comparación a las plantas WT, fluctuando de 12 a 16 hojas en la roseta (Fig 2.16A). A su vez, se midió el largo de las hojas, considerando 3 hojas por planta y se observó que en las líneas sobre expresas de *PrMADS10* el largo de las hojas de roseta es menor a las plantas WT (Fig 2.16B). También se pesó las semillas, no observándose diferencias significativas (Fig 2.16C).

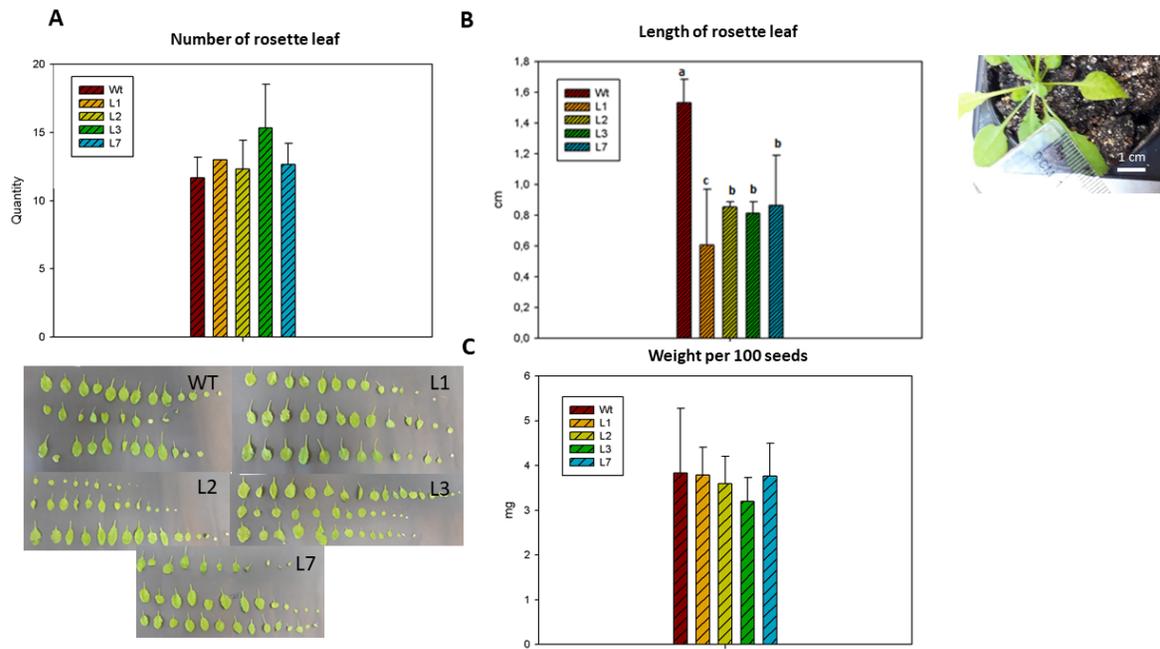


Figura 2.16. Gráficos de conteo (suplementaria 2(Cruz, Méndez et al., 2019)). A Número de hojas de roseta. B Largo hojas de roseta. C Pesaje de semillas.

Tinción con Floroglucinol líneas 35S

Se utilizaron 3 plantas por línea, realizando aproximadamente 10 cortes de cada planta, y seleccionando 5 imágenes por planta para realizar la medición, desde el área de tinción (Fig 2.17 A-B) y el área total (Fig 2.17 C-D). Se usó el diagrama de Sigma para el gráfico, utilizando t-student para el análisis.

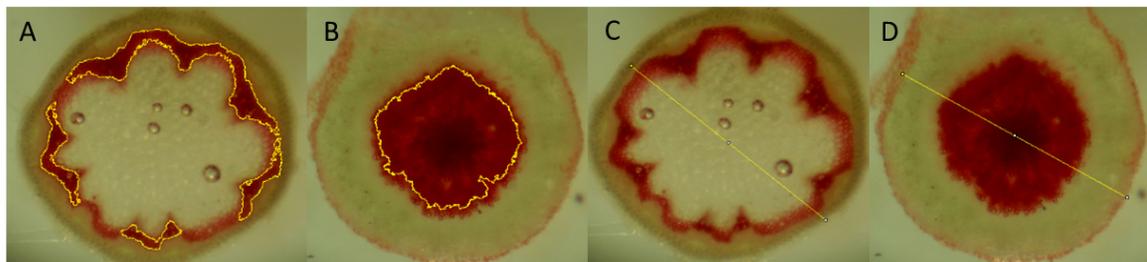


Figura 2.17. Utilizamos el software Imagej 1.48v (Schneider et al., 2012) para analizar las imágenes e hicimos el área de medición desde la zona de tinción (A-B) y el área total con los datos de diámetro (C-D).

Por cada línea transgénica, se tomaron al menos 3 cortes por cada réplica, midiendo el diámetro y el área de tinción. Cada corte se comparó contra muestras WT, tanto para cortes de hipocótilo como de tallo basal. Se eligió la foto más representativa con una escala de 100 μm , comparando cortes de hipocótilo de plantas control versus L1 observándose de forma cualitativa un diámetro menor y mayor concentración de la tinción en la médula (Fig 2.18A). En el caso de L2, se observa un diámetro 3 veces más pequeño, pero L7 presenta un tamaño similar a control. A la derecha en la misma imagen es posible observar la comparación de los cortes de tallo de las muestras control versus las líneas sobre expresas, destacando visualmente a L2 y L7 con una mayor intensidad y grosor de los haces vasculares. En la figura 2.18B, se comparan las medidas de área de tinción de tallo e hipocótilo y del área total. El área de hipocótilo teñido, donde L1 y L2 tienen áreas significativamente menores a WT, observándose lo mismo en el área total del hipocótilo.

En cuanto al área de tinción de tallo, no hay diferencias significativas y en el área total L2 es significativamente menor a las demás muestras (Fig 2.18 B).

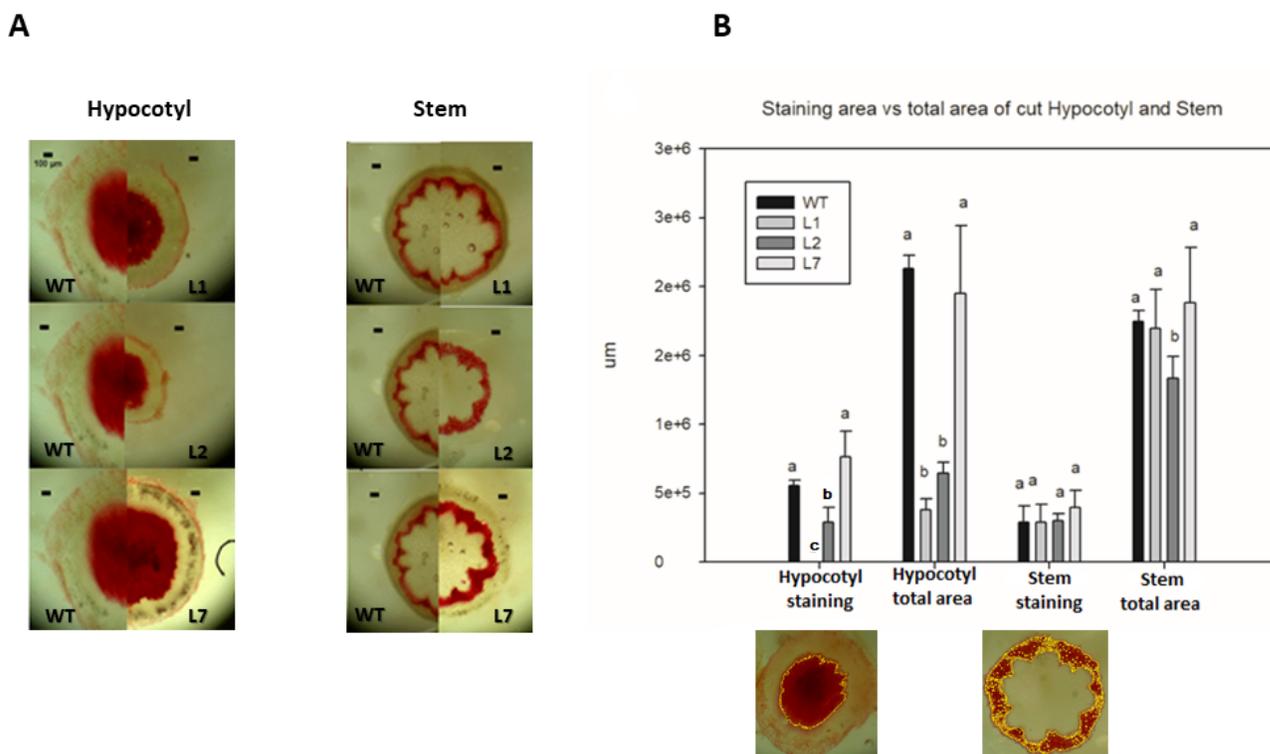


Figura 2.18. Medición de área de tinción y área total de cortes de hipocotilo y tallo (suplementaria 3 (Cruz, Méndez, et al.2019)). A comparación entre WT y cortes de L1-L2-L7. B medición cuantitativa de las áreas tenidas como del corte total.

DISCUSION

En el genoma de Arabidopsis el gen *SVP* presenta el mayor grado de similitud a *PrMADS10*. Sin embargo, cuando *PrMADS10* se sobreexpresa constitutivamente en Arabidopsis, no se observa una variación de la expresión de *SVP* mediante microarreglo (Cruz, Méndez et al., 2019). Se han reportado homólogos en otras plantas leñosas como *Eriobotrya japonica* Lindl. (EjSVP1-2) en que al sobreexpresar EjSVP1 en Arabidopsis no hay variación en el número de hojas de roseta, mientras que al sobreexpresar *PrMADS10* hay variación, pero no significativa y cuando sobreexpresan EjSVP2 hay variación en tejidos florales (Jiang et al., 2019).

Al indagar genes que se relacionan a la pared celular, como Expasina 8, ésta presenta expresión negativa cuando se sobreexpresa *PrMADS10*, de las plantas obtenidas con el gen knock-out (Fig 2.11A). A su vez al realizar los cortes en hipocotilo y tallo, no fue posible ver una mayor tinción en la zona de médula en comparación a las plantas WT y en tallo en xilema principalmente en las tinciones con PHCl, indicando una gran concentración de lignina en estos tejidos. En otros trabajos, las raíces de plantas que se exponen a déficit de boro y EXPA8 disminuye su expresión en presencia de estrés (İşkil et al., 2018). A su vez, se ha utilizado micro-RNA para disminuir la expresión de EXPA8, lo cual mostró que tienen un comportamiento más sensible de las plantas frente a un pH bajo y altas concentraciones de sal, alterando el crecimiento de las plantas, esta expresión disminuida se observa principalmente en hipocótilos etiolados (Ud-Din et al., 2016). Otro de los genes alterados al sobreexpresar *PrMADS10* es FLA11, el que presenta una expresión aumentada de 1,2 log₂. Es el principal gen candidato por su mayor expresión en tallo, ya que en muestras de tallo inclinado de Pino se observa una expresión diferencial de *PrMADS10*. Se lograron obtener líneas con el inserto de T-DNA, junto con la expresión relativa que se mostró disminuida comparada al control (Fig 2.11B). No se observaron cambios fenotípicos a simple vista en las plantas, lamentablemente no fue posible obtener los cortes y tinciones histológicas. Los homólogos de este gen se expresan en madera de tensión, tanto en álamo, como eucaliptus (MacMillan et al., 2015, 2010; Zhang et al., 2003). También se ha observado en madera de compresión en *Pino taeda* (Ca et al., 2000). Este gen se ha asociado a alterar la mecánica de las microfibrillas de celulosa en algodón y podría estar involucrado en la modificación de las paredes del xilema y/o en la capacidad del tallo o tronco de revertir la pérdida de verticalidad.

AGP17 es un gen que se expresa mayormente en hojas y tallo pero con una débil expresión en raíces y flores (Zhang et al., 2011). Al realizar la tinción de los cortes de tallo con tinción de Mañle se ve una alta concentración de lignina rica en siringilo en el xilema (Rogers et al., 2005). A su vez, los cortes de hipocótilo se observan con una mayor intensidad de tinción para ambas estrategias utilizadas (Fig 2.14). En los datos del microarreglo, este gen disminuye su expresión en $-2 \log_2$ comparado a WT, pero en las mediciones de tinción en tallo e hipocótilo y en los diámetros todas las medidas de AGP17 son menores a WT (Fig 2.15). Cabe destacar que se ha sugerido que algunos AGP descritos en plantas leñosas juegan un rol estructural en la estructura de lignina, como en la iniciación de la pared, intercalando fenoles (Jain & Minocha, 2013). Dentro de la misma superfamilia de HGRPs está extensina 3, se encuentra tanto en pared naciente, como en paredes celulares maduras, formando estructuras dendríticas a la forma de una red (Wu et al., 2017). Se ha observado que tiene una expresión positiva ($1 \log_2$), principalmente en raíces, pero como su mutación homocigota es letal no hay líneas viables.

Fasciclin-like 2 (FLA2) quimera de la subfamilia de proteínas de arabinogalactano, en *Arabidopsis* es una de las FLAs más abundantes, se expresa principalmente en flores y hojas, se presume su regulación por vía dependiente de ABA de forma negativa (Johnson et al., 2003). Cuando se sobreexpresa *PrMADS10* en *Arabidopsis* tiene una expresión disminuida de $-1 \log_2$ y de la cual fue posible obtener plantas con el inserto de T-DNA (Fig 2.11C). En *Populus (alba x tremula)* se identificaron dos proteínas fasciclin-like altamente expresados en madera de tensión y nombradas AGP1 y AGP2. Estas proteínas fueron detectadas por análisis total de péptidos y específicamente ubicados en la capa-G pero sin actividad y función clara. A su vez en madera de tensión las proteínas de arabinogalactano de tipo fasciclina, en particular, mostraron un aumento constante en la expresión con respecto a la madera normal (Kaku et al., 2009). En

Cannabis sativa se describe que hay una expresión diferencial de FLA2 y FLA6, expresándose en tejido central del tallo con respecto a la corteza, pero principalmente en tejido liber o floema (Behr et al., 2016).

Dentro de las líneas SALK y genes que codifican a proteínas que se relacionan a haces vasculares, la línea MAP70.5 presenta una regulación positiva ($0.9 \log_2$). Se obtuvieron las líneas con el inserto T-DNA (Tabla 2.2), pero lamentablemente no se pudo determinar sus niveles de expresión relativa por qPCR.

Por otro lado, en genes relacionados a deficiencia de fosfato fueron inducidos por la sobreexpresión de *PrMADS10* está PHT1;4, tiene una expresión positiva ($1.05 \log_2$) es un transportador de fosfato de alta afinidad (Karthikeyan et al., 2009).

En el grupo SAIL, hay dos genes (ELF4-MYB114), ELF4 está involucrado en el ciclo circadiano, se realizó la indagación de otros genes que estuvieran implicados en floración y ciclo circadiano, encontrándose homólogos en plantas leñosas como *Hibiscus syriacus* (Kim et al., 2017), pero no se encontró otros que tuviesen alterada su expresión. Llamó la atención la alteración en los niveles de expresión de este gen en las plantas transgénicas *35S::PrMADS10*, pero no se hicieron mayores análisis pues no era el foco del presente trabajo de investigación.

Por otro lado, MYB114 está involucrado en el complejo MBW el cual relacionado a la regulación de genes claves que participan en la biosíntesis de antocianinas (Li et al., 2013). Este complejo proteico, implica la participación de otros genes MYB como TTG1 y R2R3-MYB, además de WD40 y bHLH. En las plantas transgénicas sobreexpresoras de *PrMADS10*, MYB114 presenta una disminuida acumulación de transcritos. Cómo participa en la biosíntesis de antocianinas, éstas pertenecen a la clasificación de flavonoides y pigmentos hidrosolubles,

otorgando una coloración entre los tonos rojo, azul, púrpura, además la biosíntesis de antocianinas, inicia con la metabolización de fenilalanina en la ruta fenilpropanoides. Se ha reportado que en plántulas de pino donde se expresa diferencialmente *PrMADS10* hay una mayor expresión y concentración de lignina en desmedro de lo que podría ser la producción de flavonoides (Cruz, Méndez et al., 2019). De manera similar, al sobreexpresar este factor de transcripción en *Arabidopsis* se observa una mayor acumulación de lignina. En otras plantas leñosas como es *Eucalyptus grandis* y *Populus trichocarpa*, se ha observado un patrón similar en la acumulación de antocianinas y flavonoides (Soler et al., 2015).

Para la colección WISC, se contó con SPT5_1, que es un factor de transcripción de elongación y se expresa en estamen de *Arabidopsis*. La fosforilación de este FT es vital para una floración normal (Lu et al., 2017; Maul et al., 2014). Este gen presenta una alta expresión en *Arabidopsis* en presencia de *PrMADS10* (3.11 log₂), lo que explicaría el que no haya, de cierto modo, diferencias en los tiempos de floración. En plantas leñosas, no hay evidencia de que podría estar provocando este FT. Interesantemente, se ha encontrado en humanos, que un ortólogo de este gen, presentaría unión con otros genes, colaborando como integrador con un alta ocupancia en RNAPII, lo cual regula pausas transcripcionales como la protección de ARNm al estimular la actividad de guanililtranscriptasa (Beckedorff et al., 2020; Wen y Shatkin, 1999). La extensión C-terminal de AtSPT5-like interactúa directamente con AGO4 en *Arabidopsis*, es más se propone como un gen de expresión ubicua, sin embargo, su expresión es alterada cuando *PrMADS10* se sobre expresa (Bies-Etheve et al., 2009).

WRKY38 es otro factor de transcripción, en este caso de tipo III (Kim et al., 2008). Este es inducido tanto por infección por patógenos como por el tratamiento de ácido salicílico (Wang

et al., 2006). En cebada su expresión ha sido asociada en respuesta a estrés por sequía y frío (Marè et al., 2004). De acuerdo a lo realizado en este trabajo por la técnica de genotipado, se obtuvieron plantas con el inserto de T-DNA, sin embargo, al realizar la validación por qPCR, este presenta una mayor expresión que la planta WT. En cuanto a los cortes histológicos y tinciones de muestras de tallo e hipocotilo, se observan pocas diferencias comparado con WT, pero al realizar las mediciones de área de tinción y diámetro promedio de las muestras, en todas las mediciones resulta ser menor a WT (Fig 2.14-15). Sin embargo, su mayor expresión en *Arabidopsis* es en hojas caulinares y cotiledones, lo que explicaría la nula información en plantas leñosas (Mergner et al., 2020).

Finalmente, de los dos genes que están en las líneas GABI-Kat, se trabajó con PAP25, que se sintetiza exclusivamente en condiciones de deficiencia de fosfato y se expresa en tejido vascular (Vecchio et al., 2014). Esto lo hace interesante, pues cuando se sobreexpresa PrMADS10 un gran número de genes que modulan sus niveles de expresión, corresponden a esta categoría teniendo una expresión de $3.01 \log_2$ e identificados por microarreglo, (Cruz, Méndez et al., 2019). Por otro lado, EXT3/1 se expresa principalmente en raíz mientras que en hoja se encuentra silenciado en *Arabidopsis*, activándose en hoja como defensa cuando se producen heridas (Merkouropoulos et al., 1999). En nuestro caso, tiene una expresión de $1.18 \log_2$ en base a los datos de microarreglo, pero hasta la fecha, las inserciones que se han realizado de T-DNA resultan ser letales y, por tanto, no se ha podido obtener plantas.

Dentro de los genes candidatos que se obtuvieron al sobreexpresar PrMADS10 en *Arabidopsis*, se seleccionaron principalmente genes relacionados a remodelación de pared. Con el fin de poder realizar un enlace entre este FT que se expresa diferencialmente en tallo al ser expuesto a

inclinación y donde se observan cambios estructurales cuando se fuerza el crecimiento en inclinación (Herrera et al., 2010; Cruz, Méndez et al., 2019; Ramos y Herrera, 2013a) Si bien PrMADS10 es similar a SVP, no observamos diferencias en flores y tiempo de floración (no significativos), aunque sí, en el conteo de hojas de roseta que se ha reportado en SVP, ante eso se decidió observar un grupo de genes que estuvieran relacionados a pared y otros a inanición u otro tipo de estrés.

Los factores de transcripción son proteínas que actúan de interruptor y modulan la expresión de algunos genes en distintos tiempos y condiciones. La técnica de genotipado nos permite mediante la inserción de T-DNA, observar si hay expresión a grandes trazas del gen de interés el cual se espera pueda ser anulada en su expresión, para así, de forma fenotípica y genotípica presenciar alteraciones ya sea, en la forma de las hojas, cantidad, malformación en tejidos, alteración en el tiempo de floración, largo de tallo y/o raíz. De las plantas que se obtuvieron que pudieran tener alterados los genes candidatos presentados en este capítulo, mediante la tinción con PHCL y tinción de Maüle, se pudo observar que hay alteraciones en la acumulación de lignina y en el diámetro de tallos e hipocótilo.

Observar el efecto sobre el crecimiento de las plantas o de la floración y posterior generación de silicuas en *Arabidopsis* es una proyección natural del presente trabajo. *PrMADS10* genera alteración en genes involucrados en distintas vías, donde muchos de ellos se activan o repliegan en presencia de algún estrés y PrMADS10 se activa o expresa diferencialmente cuando el tallo de pino se inclina y responde al gravitropismo.

Capítulo 3

“El posible rol de AGPs en formación de madera”

INTRODUCCION

Las glicoproteínas ricas en hidroxiprolinas (HRGP) son proteínas que constituyen una superfamilia diversa, la cual solo se encuentra en el reino vegetal y algas verdes (Palacio-López et al., 2019a). Son proteínas de pared celular primaria y secundaria (Johnson et al., 2017; Liu y Free, 2016). Estas proteínas cumplen un rol fundamental y diverso, como en: expansión celular, crecimiento y desarrollo radicular, diferenciación del xilema, embriogénesis somática, inicio de la gametogénesis femenina, autoincompatibilidad, señalización, tolerancia al estrés salino, respuesta a patógenos (Fowler et al., 1999; Lamport et al., 2014; Xue et al., 2017).

Los HRGP se caracterizan por tener hidroxilación de prolina, pasando de prolina (Pro) a hidroxiprolina (Hyp) y un subsiguiente enlace O-ligado a glucanos unidos a residuos Hyp. La glicosilación de Hyp es un fenómeno exclusivo y común de las plantas (Johnson et al., 2003; Showalter et al., 2016).

Los HRGP se dividen en tres familias multigénicas (Fig 3.1), desde el rango del grupo menos glicosilado hasta el más glicosilado. Las proteínas ricas en prolina (PRPs) están mínimamente glicosiladas, las extensinas (EXT) están moderadamente y las proteínas arabinogalactanos (AGP) que están altamente glicosiladas, pero entre estos, también existen muchos híbridos (Nothnagel, 1997; Showalter, 1993).

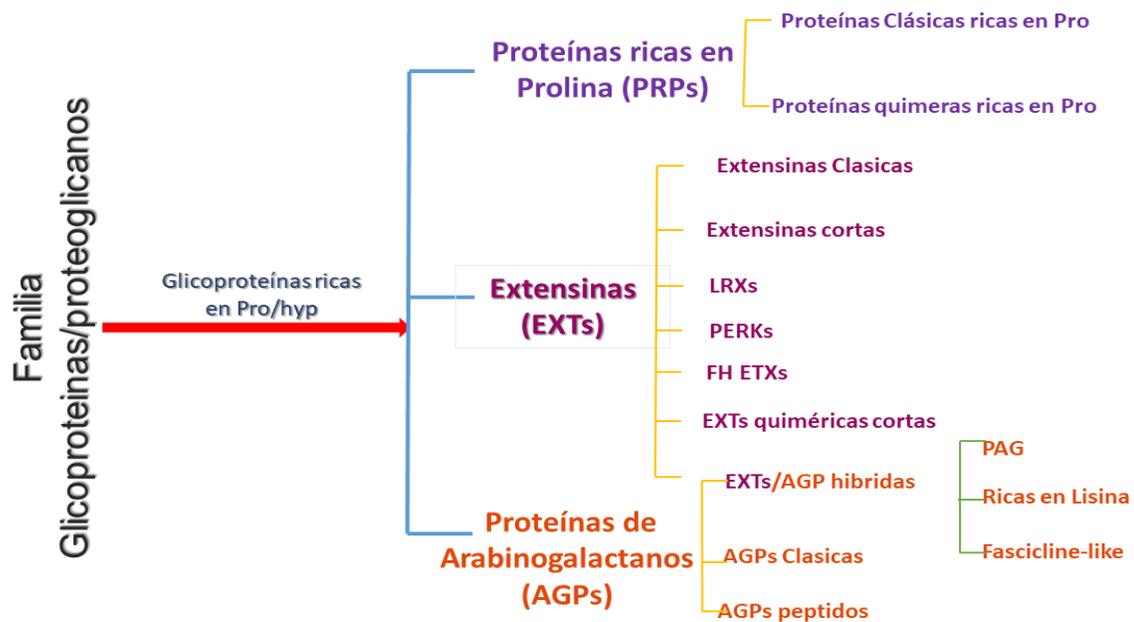


Figura 3.1. Clasificación de glicoproteínas ricas en hidroxiprolinas. Dividiéndose en 3 grupos principales PRPs, EXTs y AGPs.

PRPs se acumula principalmente en respuesta a diversos tipos de estrés ambiental como salinidad, altas y bajas temperaturas, falta de agua, deficiencia de nutrientes, infección por patógenos, toxicidad por metales pesados, anaerobiosis, contaminación atmosférica e irradiación UV (Fowler et al., 1999; Li et al., 2019). Estas proteínas ricas en prolina cumplen un rol en el ajuste osmótico, estabilizando las estructuras subcelulares, eliminando radicales libres, e intervienen en la insuflación de la energía química necesaria para la recuperación del estrés (Johnson et al., 2017).

Los PRPs muestran un rango de tamaño de 400 aminoácidos y son la clase más compleja de HRGPs (Johnson et al., 2017), debido a que son de secuencia corta, muy variable y ricas en prolina (Fig 3.2). Es posible encontrar dos distintas subclases de PRPs en Arabidopsis, clasificándose en clásicas y quiméricas (Fig 3.2) (Fowler et al., 1999). También hay aquellos

PRP ricos en prolina en la zona N-terminal y en aminoácidos P,T,Y,K en el dominio C-terminal como en AtPRP1, AtPRP3, que se expresan específicamente en raíces, por otro lado AtPRP2, AtPRP4 y otras proteínas ricas en aminoácidos P,V,K,C con motivo consenso PPVX(K/T)) que muestra una alta expresión en órganos aéreos (Fowler et al., 1999; Johnson et al., 2017; Showalter et al., 2016, 2010).

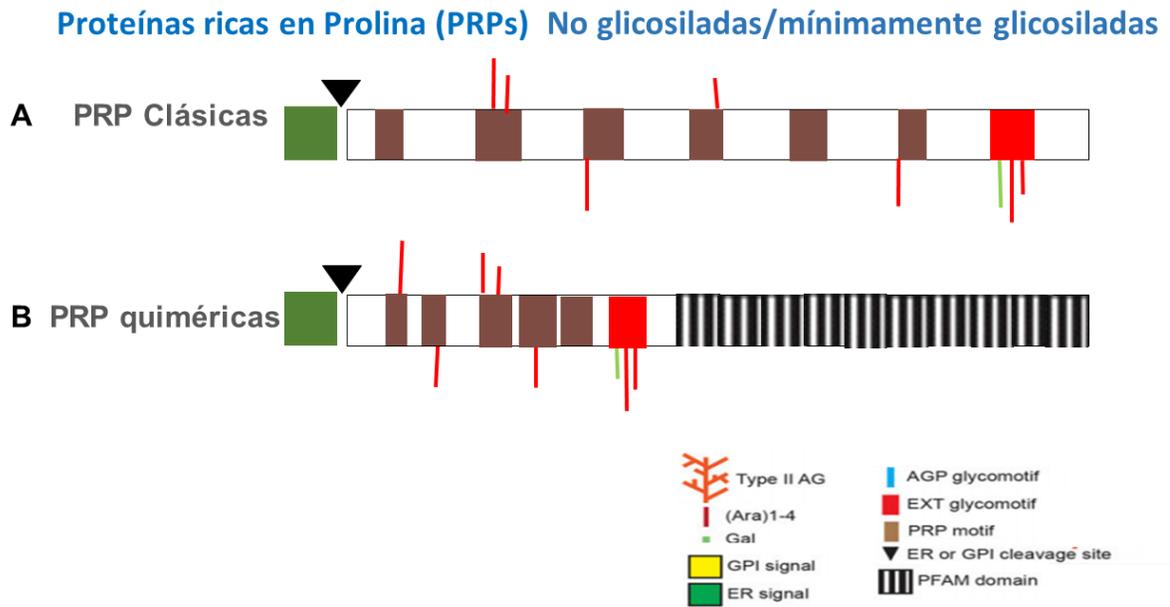


Figura 3.2. Proteínas ricas en prolina, mínimamente glicosiladas o sin glicosilación. **A** Las PRP clásicas contienen péptido señal que se observan en verde, motivos PRP en café, con ramificaciones de arabinosa y galactosa representadas por líneas rojas y verdes y en rojo motivo extensiva. **B** PRP quiméricas aparte de contener lo mismo que las clásicas, tienen dominios PFAM.

En plantas leñosas, se aisló *PdPRP* de *Populus deltoides*, el cual se expresa fuertemente en floema inmaduro, promueve el crecimiento secundario y decrece el ángulo de microfibrillas (MFA) en invernadero (Li et al., 2019).

Por otro lado, las extensinas (EXTs) son proteínas con moderada glicosilación, se caracterizan por tener repeticiones de serina (Ser) en serie, seguidos de Pro, constituyendo dominios (SP_n)

ya que se repiten n veces, sin embargo, algunas moléculas en EXT tienen motivos Tyr-X-Tyr (donde X puede ser cualquier aminoácido), con un punto isoeléctrico básico como K-rich (Liu and Free, 2016). De acuerdo con estas tres subclases de EXT, todas dependen del tipo de combinación y repetición de SP n . Clasificándose principalmente en clásicas, LRXs y PERKs, en que principalmente las clásicas, son principalmente conformadas por péptido señal, un dominio Extensin con glicomotivos AGP intercalados, ramificaciones tipo II AG y Ara 1-4 (Fig 3.3 A). Por otro lado, extensina rica en leucina (LRX), tiene péptido señal en el N-terminal seguido de dominios LRR con repeticiones de SP n módulos cerca del C-terminal (Fig 3.3 B). Estas proteínas han sido implicadas en la morfogénesis de pelos radiculares (Showalter et al., 2016). Y las quinasas receptoras de tipo extensina ricas en prolina (PERK), se encuentran en la membrana plasmática (Fig 3.3 C), pueden afectar la expansión celular en la formación de órganos florales y se expresan en respuesta a estímulos de patógenos (Liu y Free, 2016).

Dentro de otras extensinas más variadas están las homología de forminas EXTs (FH EXTs), son homólogos a las proteínas forminas, donde la presencia de motivos SP se repiten de 3 a 5 veces; junto a los EXT quiméricos o híbridos que tienen repeticiones de motivos más largos de 2000 aminoácidos compartiendo más características con AGPs (Johnson et al., 2017; Liu and Free, 2016).

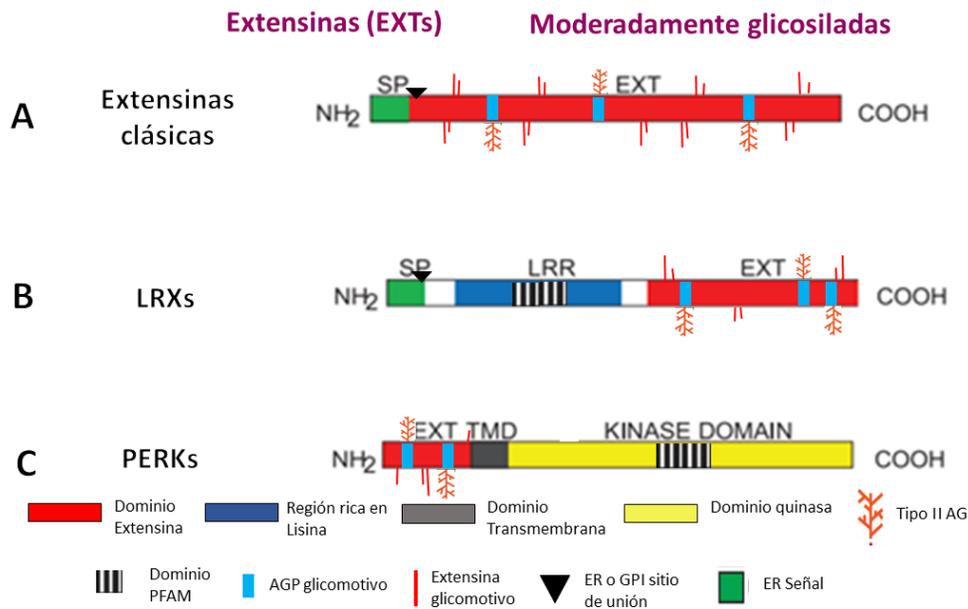


Figura 3.3. Extensinas moderadamente glicosiladas (Modificado de Nguema-Ona et al, 2013 y Johnson et al, 2017). Es posible clasificarlas en 3 grupos, **A** Clásicas que contienen péptido señal en verde, con sitio de unión a GPI (triángulo negro), seguido por varios dominios extensina (rectángulo rojo) a las que se les adhieren motivos extensinas (líneas rojas), estos dominios se van intercalando por glicomotivos AGP representados en cajas celestes a las que se asocian AG tipo II (rama anaranjada). **B** LRXs contienen en el extremo amino péptido señal en verde, sitio de unión ER-GPI (triángulo negro), seguido de región rica en Leucina (rectángulo azul) con dominio PFAM (rectángulo achurado), seguido de dominio extensina con AGP glicomotivos (rectángulo celeste), extensina glicomotivos (líneas rojas) y ramificaciones tipo II AG. **C** PERKs contienen dominio extensina (rectángulo rojo) en el extremo amino con glicomotivos AGP intercalados a los que se unen AG tipo II y extensina glicomotivos (líneas rojas) seguido de un dominio transmembrana (rectángulo gris) y un dominio quinasa (rectángulo amarillo) junto a Dominio PFAM (rectángulo achurado).

Las proteínas de arabinogalactano (AGPs) son una superfamilia compleja y altamente glicosilada, presente en paredes celulares y superficie de membrana plasmática, además de secreciones extracelulares (Knoch et al., 2014). Estas proteínas están compuestas por un núcleo proteico unido a uno o más aminoácidos O-glicosilados por cadenas β 1-3 o β 1-6-galactanos a otros azúcares, principalmente arabinosa e incluyendo ácido glucurónico (Orbović et al., 2013; Palacio-López et al., 2019b). En la membrana plasmática se han encontrado AGP ligados al glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Zhou et al., 2009). La estructura de la proteína es rica en

hidroxiprolina / prolina, serina, treonina y alanina (Fig 3.4); los AGP clásicos suelen tener péptido señal N-terminal. Además, un dominio central llamado PAST rico en Pro, Ala, Ser y Thr. Este dominio generalmente se separa si hay más de una región rica en Lys y tiene una señal de anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) en el C- terminal (He et al., 2019; Showalter, 2001). Se pueden reconocer seis proteínas diferentes basadas en la estructura de la proteína, que incluyen el tipo clásico, rico en lisina, péptidos AG, tipo fasciclin-like (FLA), no clásico y quimeras (Johnson et al., 2003; Tan et al., 2012; Zang et al., 2015).

Las AGP clásicas presentan dominios ricos en hidroxiprolina, alanina, serina, treonina y glicina, mientras que los dominios no clásicos tienen dominios pobres en hidroxiprolina ricos en asparagina o cisteína . El enlace GPI en el dominio C-terminal está presente en los AGP clásicos y ausente en los AGP no clásicos. Desde el punto de vista estructural, la función del GPI permite la unión de los AGP a la membrana plasmática (Tan et al., 2012). Sin embargo, los péptidos AG contienen cadenas principales cortas (Johnson et al., 2003). Los AGP no clásicos (híbridos y péptidos) tienen dominios pobres en hidroxiprolina y son ricos en cisteína o asparagina y no tienen un dominio GPI en el C-terminal, por lo que desde un punto de vista estructural (Fig 3.4 B-C), dado que carecen de GPI se encuentran como moléculas solubles en la superficie de la pared celular (Hernández Sánchez et al., 2009). Los AGP de tipo quimérico contienen polisacáridos largos arabinogalactanos de AGP de tipo II e hidroxiprolina-oligoarabinósidos cortos de extensinas (Pérez-Almeida, 2006).

Proteínas similares a fasciclin-like presentan uno o dos dominios de fasciclin I (FAS1), que tienen un papel importante en la adhesión celular (Fig 3.4 B-1-2-3-4). Las dos regiones están muy conservadas y tienen nueve aminoácidos cada una. La región H1 está compuesta por Leu-Thr-Ile / Leu-Phe-Ala / Val y Pro. La región H2 está compuesta por Val / Leu-Ile / Val-Ile-Tyr-

Gln / Glu-Val-Asp / Asn-Lys. También se encuentra un motivo YH que es menos conservado, pero central que incluye los aminoácidos Leu-Leu / Ile / Cys / Val-Leu / Cys-Phe-Tyr-His-Ala / Ile-Leu y Pro (He et al., 2019; Seifert, 2018). Además, estas proteínas se pueden subclasificar en cuatro grupos diferentes (A, B, C y D), dependiendo del número de dominios FAS presentes en la proteína, un sitio de anclaje puede estar presente o no en una sección GPI en el sector C-terminal (MacMillan et al., 2010). Se ha sugerido que esta subclase de AGP está implicada en el crecimiento, desarrollo y respuesta de las plantas al estrés abiótico (Zang et al., 2015).

Proteínas de Arbinogalactano (AGPs) Altamente glicosiladas

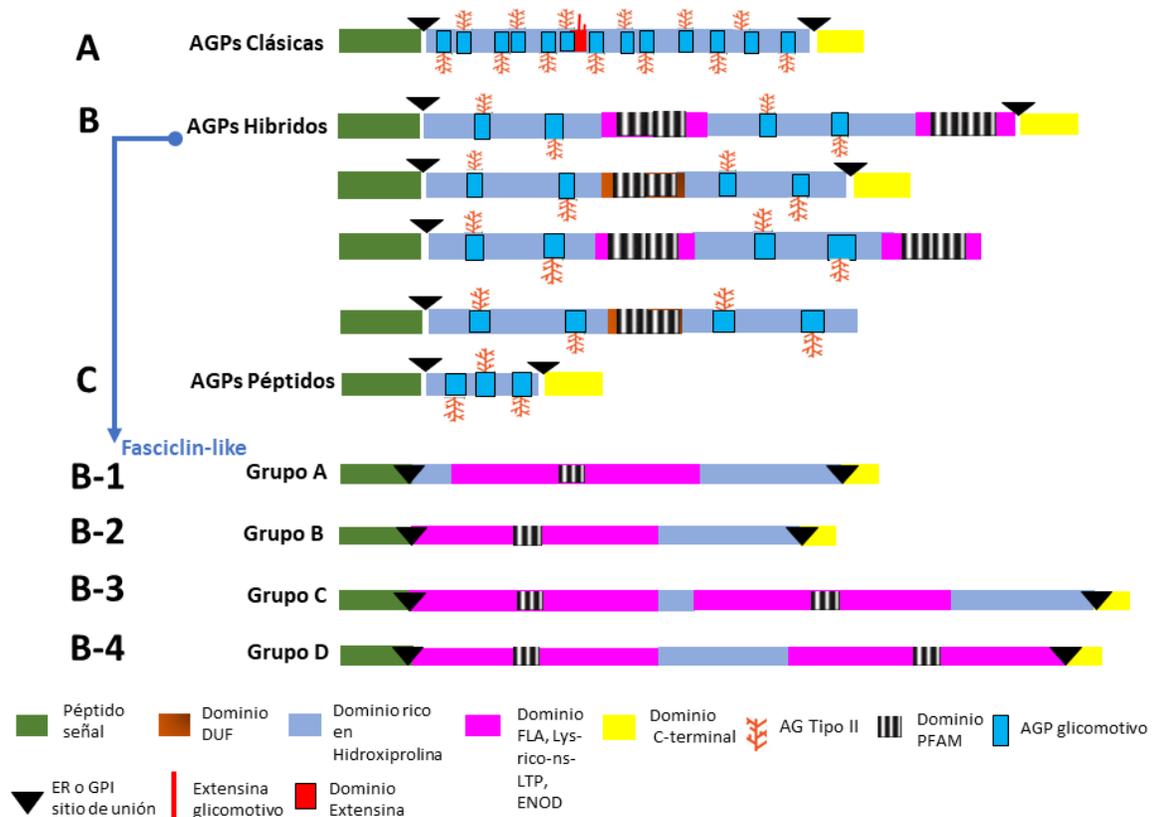


Figura 3.4. Clasificación de AGPs en Clásicas, híbridos y péptidos (Modificado de Ma and Zhao, 2010, Johnson et al, 2017). **A** AGPs Clásicas contienen péptido señal (rectángulo verde), sitio de unión a GPI (triángulo negro), dominio rico en hidroxiprolina (rectángulo celeste) en el cual se intercalan AGP glicomotivos (rectángulo celeste intenso) con AG tipo II (rama anaranjada) y dominios Extensina (rectángulo rojo) con Extensina glicomotivos (líneas rojas) y dominio C-terminal (rectángulo amarillo). **B** AGPs híbridos contienen desde extremo amino péptido señal uno o más dominios ricos en hidroxiprolina con AGP glicomotivos intercalados, dominios DUF (rectángulo café) con dominios PFAM (rectángulo achurado), o uno o más dominios que pueden ser FLA, ricos en lisina, en

leucina, en serina, ENOD (rectángulo rosa), no teniendo todos dominio C-terminal. C AGPs péptidos contienen en su estructura desde péptido señal (rectángulo verde), dominio rico en hidroxiprolina con AGP glicomotivos intercalados y dominio C-terminal, siendo los de menor longitud. Dentro de los AGPs híbridos se clasifica Fascicline-like, el cual se subdivide en grupo A-B-C-D. **B-1** Grupo A, en el extremo amino contiene péptido señal, dos dominios ricos en hidroxiprolina, un dominio FLA con un dominio PFAM intercalado, dominio C-terminal y sitios de unión GPI. **B-2** Grupo B, péptido señal, junto a un dominio FLA, seguido de un dominio rico en hidroxiprolina, y dominio C-terminal. **B-3** Grupo C péptido señal, dos dominios FLA, dos dominios ricos en hidroxiprolina y dominio C-terminal. **B-4** Grupo D contiene en su estructura péptido señal, dos dominios FLA y uno rico en hidroxiprolina.

Se ha atribuido a los AGP un papel en el crecimiento y desarrollo de las plantas, tanto estructural como regulatorio, desde el alargamiento de la raíz, embriogénesis somática, respuesta a hormonas, diferenciación del xilema (Bossy et al., 2009; Motose et al., 2004), crecimiento y dirección del tubo polínico (Seifert, 2018), muerte celular programada, expansión celular, tolerancia al estrés salino, entre otros, interacción huésped-patógeno (respuesta al estrés abiótico) y señalización celular (Tan et al., 2012). Estas proteínas están presentes desde la membrana plasmática hasta la matriz extracelular de las plantas (Yang et al., 2007) y son parte integral de muchos mecanismos basados en la adhesión (Mohammadinejad et al., 2020).

La estructura química característica de los AGP se ha descrito en las coníferas (Makarova et al., 2015) y su rol funcional reportado en *Pinus taeda* (Ca et al., 2000). Al menos dos AGP de pino (PtX3H6 y PtX14A9) se han reportado que se expresan diferencialmente en xilema. El gen PtX14A9 se expresa principalmente en la expansión radial del hipocótilo de las plántulas, lo que sugiere un papel durante el desarrollo de las plántulas. Las diferencias en la expresión de ambos genes se deben a señales hormonales, donde PtX14A9 es un ortólogo probable de FLA11. Además, se encontraron PtaAGP3 y PtaAGP6 expresados diferencialmente en el tejido del xilema, asociados a la formación de la pared celular secundaria, diferenciación del xilema y formación de madera (Ca et al., 2000). Al mismo tiempo, PtaAGP6 está altamente expresado en xilema inmaduro en madera vertical o normal, así como en madera comprimida (Ca et al.,

2000). Sumado a estos, PtaAGP4 se expresa principalmente en xilema de madera de compresión, en el lado inferior del tallo (Yang et al., 2005).

La madera de compresión (CW) se forma en gimnospermas cuando el tronco pierde verticalidad, induciendo un crecimiento excéntrico del tallo, lo cual se refleja en una mayor proporción de lignina, traqueidas redondeadas, ausencia de pared S3, mayor ángulo fibrilar en pared S2, presencia de espacios intercelulares y una reducción de la proporción de lignina en la lámina media (Diaz-vaz et al., 2007; Groover, 2016). La deformación del tronco disminuye la calidad de la madera, afectando la producción de pulpa y papel (Lomagno y Rozas, 2001). Este tipo de madera se forma en el lado inferior del tronco de los árboles en las coníferas y en las ramas en respuesta a una orientación no vertical asociada con la tensión gravitrópica inicial (Ramos et al., 2012a).

Por otro lado, las especies de angiospermas reaccionan a la pérdida de verticalidad del tronco induciendo tensión en la madera (TW). Por ejemplo, un doble mutante de *Arabidopsis thaliana* (atfla11 / atfla12) afecta las propiedades mecánicas de sus tallos secundarios ricos en paredes celulares, composición química y estructura de la pared celular, mostraron una reducción de galactosa, arabinosa y celulosa y un aumento concomitante en el contenido de lignina (MacMillan et al., 2010). Estos autores especulan que las proteínas FLA a través de sus dominios FAS1 podrían formar una red heterométrica de orden superior que fortalezca la interacción entre las microfibrillas de celulosa. En *Populus tormentosa*, PtFLA6 se expresa abundantemente en TW y se localiza en fibras G diferenciadoras. Cuando este gen fue silenciado con ARN antisentido, se observó una reducción en la expresión de PtFLA6, así como en otros genes FLA (Wang et al., 2017, 2015).

La biomecánica del tallo se alteró en el árbol transgénico y debido a que se observó una reducción en la composición de lignina y celulosa, podemos asumir un papel de estas proteínas FLA para la recuperación de la verticalidad del tronco.

En este trabajo, llevamos a cabo una búsqueda y comparación de genes HGRP obtenidos desde biblioteca de cDNA de árboles inclinados de *P. radiata* y en bibliotecas de RNA-seq de plántulas de pino radiata inclinadas a distintos tiempos de inclinación. Se informa sobre la subfamilia fasciclin-like, a partir de la cual se realizó una comparación filogenética. Se utilizaron cortes histológicos de tallo para realizar una caracterización fenotípica utilizando anticuerpos monoclonales que identifican AGPs en general, homogalacturonanos, pectina.

METODOLOGIA

Análisis de secuencias

Las putativas secuencias FLA de pino radiata se identificaron utilizando bases de datos de librerías de cDNA y genomas de plantas, "similares a fasciclina" disponibles en NCBI como secuencias de referencia de la alineación en datos transcriptómicos y, además, el algoritmo de búsqueda "Finding-AGP" (Ma et al., 2017).

Con AUGUSTUS (Stanke et al., 2004) se realizó una predicción de ORF, utilizando sólo CDS completo, se realizó una comparación utilizando la base de datos Pfam (El-Gebali et al., 2019) y PROSITE (de Castro et al., 2006) para identificar dominios y motivos críticos descritos anteriormente, respectivamente. Además, se realizó una predicción de péptidos señal utilizando el servidor SignalP 5.0 (Almagro Armenteros et al., 2019; Petersen et al., 2011) y una predicción de hélices transmembrana utilizando el servidor TMHMM 2.0 (Krogh et al., 2001). Para identificar la señal anclada a GPI, se utilizó el servidor de predicción del sitio de modificación

de GPI BIG-PI (Eisenhaber et al., 2000). Finalmente, para la visualización de la alineación se utilizó ESPrIt 3.0 (Robert y Gouet, 2014).

Alineamiento Múltiple de Secuencias , análisis filogenético y predicción de Motivos

Basado en (He et al., 2019) se seleccionaron cinco especies de plantas (*Amborella trichopoda* , *Eucaliptus grandis*, *Populus trichocarpa*, *Picea abies*, *A. thaliana*) para ser utilizadas como referencia. Estas secuencias se obtuvieron de la base de datos Phytozome (Goodstein et al., 2012) y se utilizaron para identificar sus ortólogos en el transcriptoma de pino radiata. Se consideraron doce secuencias de longitud completa del transcriptoma además de las de referencia, para realizar un alineamiento de secuencias múltiple utilizando ClustalX 1.83. Un árbol filogenético enraizado fue generado por MEGA X 10.1.8 constructo de máxima verosimilitud y modelo basado en matriz JTT con 5000 No de replicaciones de Bootstrap.

Se utilizó el servidor web MEME (disponible en línea: <http://meme-suite.org/tools/meme>) para identificar los motivos conservados (regiones H1 y H2, motivo YH).

Las cantidades relativas de AGP en estas muestras fueron estimados por electroforesis de cohetes, en geles de agarose que contienen 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de reactivo de β -glicosil Yariv, observándose un gel de rojo intenso, el cual se une específicamente a AGP, a parte se utiliza como estándar goma arábica, con varias cantidades para la calibración de las cuales solo se muestran 4 (Figura 3.3).

Criosección

Se utilizaron tallos de pino control (sin inclinación), y con inclinación de 45 ° a las 2.5h, 10h y 24h marcando la zona inferior de la superior. Por lo tanto, los cortes del tallo (de 2 cm de

longitud cada uno) se sumergieron en un compuesto de temperatura de corte óptima (OCT) (cat # 62550-01; Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA), el cual se solidifica a bajas temperaturas, pudiendo trabajar con la muestra inmersa en el a -18°C en un criostato CM1510S (Leica, Buffalo Grove, IL, USA). Se recortó el bloque congelado seccionando hasta ver completas las muestras. Se cortaron secciones ($50\ \mu\text{m}$) que contenían el material vegetal intacto y se colocaron sobre el lado adhesivo de una cinta adhesiva transparente criocompatible (n° de cat. 62800-72S; Electron Microscopy Sciences. Los portaobjetos se almacenaron en la oscuridad a 4°C hasta que se obtuvieron imágenes. Se mantuvieron congeladas las secciones de tallo incluidas en OCT a -80°C .

Extracción de AGP

Para extraer las proteínas AGP, se molieron 3 g de muestras de tallo congelado (corte hacia arriba y hacia abajo, y tiempos) en 3 ml de tampón de extracción que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), EDTA 10 mM, Na_2SO_5 2 mM y 1% (v / v) Triton X 100 (Cassab, 1986; Chabannes et al., 2001; Ding y Zhu, 1997; Lafarguette et al., 2004). Se homogeniza mediante agitación en vórtex durante 10 min, luego se incubó a 4°C durante 2,5 h y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se mezcló con tres volúmenes de etanol y la mezcla se incubó durante la noche a 4°C . El precipitado se recogió por centrifugación a 13.000 rpm durante 10 min y luego se resuspendió en NaCl 0,15 M, azida de sodio al 0,02% y sonicación para y sonicar por 2m Tris-HCl 50 mM (pH 8,0). Las proteínas se cuantificaron según el método de Bradford (Bradford, 1976), se dividieron en alícuotas y se almacenaron a 20°C antes de su uso. La etapa de precipitación con etanol se repitió una vez antes de que la muestra fuera analizada por electroforesis de cohete. La electroforesis en gel de cohete se realizó con agarosa al 1% que

contenía 15 μM de reactivo (b-D-Glc) 3 Yariv (Cassab, 1986; Lafarguette et al., 2004). El gel y el tampón de funcionamiento consistían en Tris 25 mM y glicina 200 mM, pH 8,4. Una vez completada la electroforesis, los geles se lavaron durante la noche con NaCl al 2% (p / v) y se secaron sobre papel de filtro.

Inmunomarcaje y tinción

Se utilizaron tres anticuerpos monoclonales (mAb): JIM7 identifica homogalacturonanos (Bowling y Vaughn, 2008; Hall et al., 2013; Macquet et al., 2007), LM2 identifica (1 \rightarrow 6)- β -D-Galp con terminal β -D-GlcAp (Palacio-López et al., 2019b; Yang et al., 2005; Yates et al., 1996) y LM6 identifica cadena lateral (1 \rightarrow 5)- α -arabinano (Happ y Classen, 2019; Willats et al., 1998). Las secciones se separaron en el bloque con un lápiz especial para clasificar el control versus las muestras con inclinación. Usamos 3 bloques por anticuerpo con una o más muestras de tinción, lo mismo para los tres anticuerpos. la mayoría de los cuales se han descrito previamente en la literatura. Las soluciones de bloqueo se intercambiaron con diluciones de 15 μl 1:36 de las soluciones de anticuerpos suministradas, luego las secciones se incubaron a 4 ° C durante 16 h. Las secciones se lavaron dos veces en 100 μl 1 \times TBST, ya sea 15 μl de 2 μg μl^{-1} IgG anti - rata de burro Alexa Fluor TM 488 (H + L) (Invitrogen, (www.invitrogen.com) o 15 μl de 2 μg μl^{-1} Alexa Fluor TM 488 IgG anti-ratón de cabra (H + L) (www.invitrogen.com).

Microscopia confocal

Las muestras obtenidas mediante microscopía confocal se adquirieron mediante un Zeiss LSM 710 unido a un Axio Examiner (Carl Zeiss) utilizando una lente de objetivo de inmersión en

agua C-Apochromat 40 × NA 1.2. Los láseres de diodo de 405 nm y 488 nm se utilizaron con un divisor de haz principal de 405/488/561 nm.

Se utilizaron tres réplicas biológicas y para cada una de estas al menos diez técnicas, de las cuales al menos las tres mejores fotografías confocales se procesaron mediante tinción de anticuerpos.

RESULTADOS

Basandos en las bibliotecas de xilema de cDNA reportadas por el grupo de Li (Li et al., 2013), se encontró un total de 89 ESTs relacionados con AGP, que incluyó proteínas de pared celular existentes en la base de datos Maize wall (Guillaumie et al., 2007). Un total de 73 ESTs emparejadas con AGP, 2 con extensinas, 11 con HGRP y 16 con PRP. Los datos de RNA-seq se compararon con los datos de la biblioteca del grupo de Li, para obtener secuencias completas y que tuvieran al menos un dominio FAS (Li et al., 2013, 2009a). Se obtuvieron 12 secuencias del RNAseq de plántulas de pino, que al consultar con BLAST presentan dominios conservados. A pesar de que se encontró y reportó un gran número de secuencias con dominio fasciclin, solo aquellas con dominio FAS y/o PAST se consideraron entre las 12 finalmente analizadas.

Se construyó una filogenia usando estas doce secuencias de *pino radiata* y secuencias AGP de *Amborella trichopoda* (12 secuencias), *Eucaliptus grandis* (19 secuencias), *Populus trichocarpa* (49 secuencias) y *Arabidopsis thaliana* (22 secuencias), *Picea abies* (24 secuencias). En el análisis filogenético se generaron cinco grupos de conglomerados, siendo 53 genes clasificados en el grupo A que figura en rosado, donde principalmente se han destacado los genes AtFLA11 y AtFLA12 que se expresan en tallo así como algunos homólogos en plantas

leñosas (Fig. 3.5). PrFLA1 está junto a PabFLA12, PrFLA2 junto a PabFLA13, PrFLA3 junto a PabFLA10 y PrFLA4 en el mismo clado junto a PabFLA14 y PabFLA10.

En el caso del grupo B, todas las secuencias son similares a AtFLA17 40 con un mínimo de 60% de identidad. El grupo contiene dieciocho secuencias, donde PrFLA5 se agrupa junto con PabFLA9, PrFLA6 a PabFLA22, PrFLA7 a PabFLA17 y PrFLA8 a AtrFLA10. Además, otras tres secuencias (PrFLA6-PrFLA7-PrFLA8) están incluidas en este grupo B (Fig. 3.5).

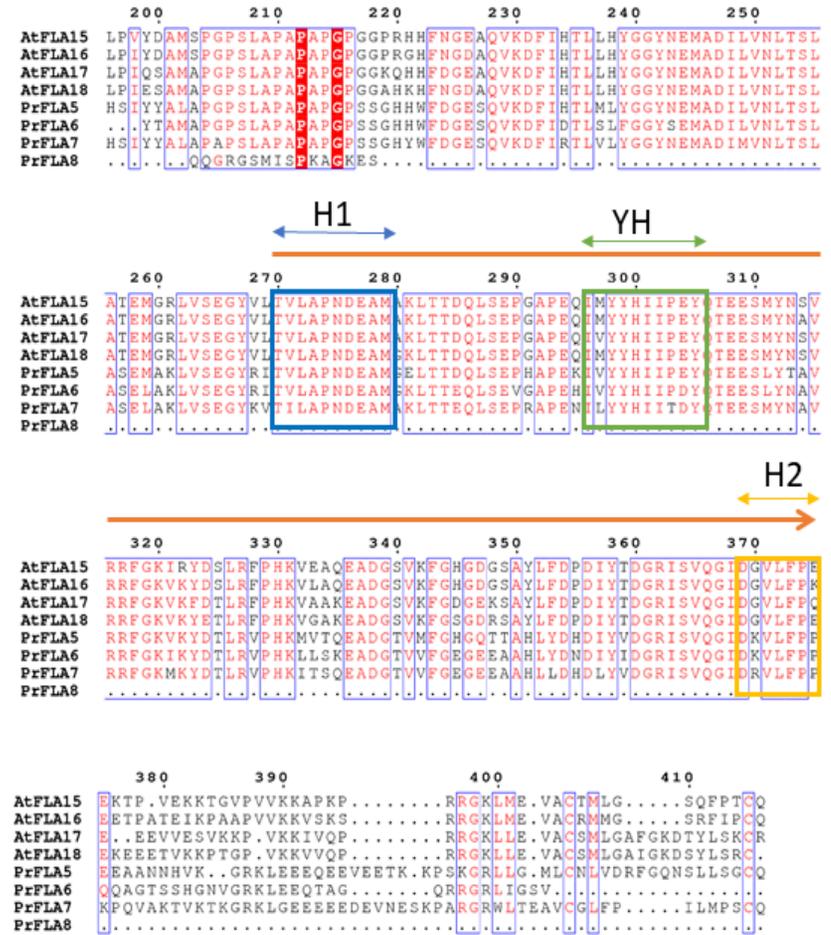
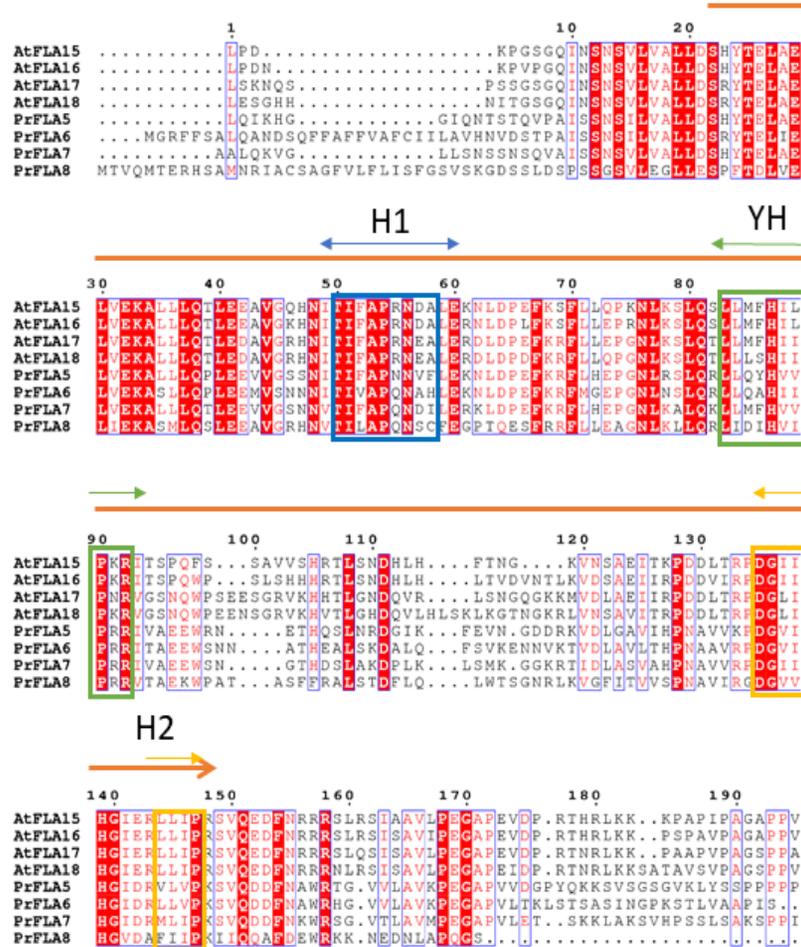
PrFLA9 y PrFLA10 se clasifican en el grupo C, PrFLA9 se agrupa cerca de PabFLA21 y PrFLA10 se encuentra en el mismo clado junto a PabFLA8. Las secuencias mostraron similitud con AtFLA8 (Tabla 3.1). Este grupo contenía veintisiete secuencias.

Finalmente, se encontraron dos grupos D, denominados D1-D2 (Fig. 3.5). En D1 (Turqueza) no se agruparon secuencias de PrFLA, pero en el grupo D2 (azul) se encontraron dos secuencias de PrFLA11 y 12. PrFLA11 está junto a PabFLA5 y PrFLA12 con PabFLA20 en un grupo de once secuencias.

Se usaron doce secuencias de PrFLA para encontrar las regiones conservadas de consenso de los dominios H1, YH y H2 usando MEME. Los cuatro contigs de *Pino radiata* (PrFLA1 a PrFLA4) fueron clasificados en el grupo A mostrando una identidad entre 52 y 46% con AtFLA6 (Tabla 3.1), y conteniendo un dominio de fasciclin (Fig. 3.5). El motivo H2 está más conservado dentro del dominio FAS, cuando las secuencias de pino se comparan con *Arabidopsis* (Fig. 3.6). Cuando se analizaron las cuatro secuencias con HmScan, dos secuencias (PrFLA1 y PrFLA2) mostraron péptido señal, pero solo PrFLA2 se pudo identificar utilizando SignalP. Además, cuando se utilizó big-PI Plant Predictor I (Eisenhaber et al., 2000), tres contigs de Pino presentaron GPI (Fig. 3.5).

El grupo B se define principalmente según la nomenclatura de *Arabidopsis* para la presencia de dos dominios FAS separados por un motivo PAST, pero no tiene GPI. Tres de las cuatro secuencias de pino presentan todos los dominios descritos (regiones H1, H2 y motivo YH; Fig.3.6), pero PrFLA8 no tiene los dos dominios FAS (Fig. 3.6). Las tres secuencias de pino (PrFLA5, PrFLA6 y PrFLA7) mostraron una similitud con AtFLA17 (Tabla 3.1).

Group B



Group C

	1	10	20	30	40	50	60	
AtFLA1	HNVTRLLANHP	PSFSF	SHFT	QTHLADE	INRRR	TITVCAVDNA	AAMSALTSKGYTLSTLKN	
AtFLA2	HNVTRILAKD	PDFST	FNNHLSA	THLADE	INRRQ	TITVLAVDNS	AMSSILNSNGSLYQIRN	
AtFLA3	VNHTRVLEKY	PEFST	MTELLAK	TELTP	INRRQ	TITVLAALNDA	IGSISGRPE..EEVKR	
AtFLA5	NNITLAFQKYS	KFSF	MRDLFI	KTLIAA	IDKYY	TITVLAVSND	AISSITNRSE..VELRN	
AtFLA8	HNVTRILADS	PDYSS	FNSYLSQ	TKLADE	INSR	TITVVLVNL	NGAMSSALAGKHP.LSVIK	
AtFLA10	HNVTRILSDT	PEYSS	FNNYLSQ	TKLADE	INSR	TITVVLVNL	NGAMSSLAGKHP.LSVVKN	
AtFLA14	FNVTRNINL	NEHDF	SNFNQL	SETQL	ASTINKR	QTTITV	VVSNALSSLSGQP..TSVIKK	
PrFLA9	FNVTRNILL	AKFPE	YSKFN	HDLSTR	TKLADE	INSR	QTTITVLAALSNM	DALSGLD..LASLKR
PrFLA10	FNVTRNILL	AKFPE	YSKFN	HDLSTR	TKLADE	INSR	QTTITVLAALSNM	DALSGLD..LAAIKR

	70	80	90	100	110	120							
AtFLA1	ILSLHVL	LDYFG	TKKHL	HQIR	DGSALA	LAATLFC	ATGAAP	GTS	GFVN	ITDL	RGKVG	FG	PDGG
AtFLA2	ILSLHVL	LDYFG	TKKHL	HQIT	DGST	STAMF	OSTG	SATG	TSQY	INIT	DKGK	VAF	VQDD
AtFLA3	ILMNHV	LDYFD	ELKHL	KALKE	STLL	TLYC	STGL	QQNG	FNCT	KSNG	CKIY	FG	SGVK
AtFLA5	ILMTHV	LDYFD	ELKHL	QGMRE	KSM	LTLY	CTGL	GEQNG	FNVSK	SK	CRVY	FG	SEVK
AtFLA8	ALSLHVL	LDYD	PQKHL	HKISK	GTTLS	TLYC	TTGN	APGNL	GFVN	ITDL	KGKVG	FG	SAAS
AtFLA10	ALSLHVL	LDYD	PLKHL	QLSKG	TTL	TLYC	TTGH	ALGNL	GFVN	ITDL	KGKVG	FG	SAAP
AtFLA14	ILSLHVL	LDYD	QKHL	KNLSK	KTVLL	TLYC	SSGL	ARGQ	GFVN	ITVM	KNCV	FG	SAVP
PrFLA9	VLSLHV	LDYD	PKKHL	HEITN	GTTLS	TLLC	TTGT	APGN	TFVN	ITDL	KAGK	VG	LAAH
PrFLA10	ALSLHVL	LDYD	PEKHL	HQVING	TTL	TLYC	TTGAA	AGNG	GFVN	ITDL	KGKVG	FG	LAGH

	130	140	150	160	170										
AtFLA1	D..LSS	FVKS	EEV	PYNI	SIHQ	SRVLP	SE.TAA	APT	APAE	MNLT	GIMS	AHG	KVFA		
AtFLA2	DSKLT	AHYV	KSV	FEK	PYNI	SVLH	ISQV	LTS	P.EAE	APT	SPSD	LIT	LILE	KQGC	KAFS
AtFLA3	GAPQ	TAEY	ITTV	FRN	PYNI	SVVQ	ISMP	IVAP	GLG	SP			
AtFLA5	NSP	LNAE	VSTV	YHN	PYNI	SIHQ	ITMP	IVAP	GLS	LA			
AtFLA8	GSKL	DSSY	TKSV	KQIP	PYNI	SVLEI	DAP	IAP	GVLT	APAP	SASL	SNIT	GLLE	KAG	CTFA
AtFLA10	GSKL	DSSY	TKSV	KQIP	PYNI	SVLEI	NAP	IAP	GILT	APAP	SSAG	VSNIT	GLLE	KAG	CTFA
AtFLA14	GSSL	DAQ	QDTV	AAAL	PFNI	SVLH	ISSA	IMID	VKG	DNA	PTA		
PrFLA9	GAKL	DATV	VKSV	KQEG	YNI	SVLEV	SKPI	ITN	VAA	APT	APSD	VNIT	AVMI	KG	CKIFA
PrFLA10	GAKL	DSTV	VKSV	KQDQ	YNI	SVLEV	SQPI	TTS	VAE	APT	SPSN	MNIT	SVLI	KG	CKIFA

	180	190	200	210	220	230										
AtFLA1	ETLLT	NP	GASKTY	QESL	EGG	TVFC	PGDD	PMKGF	.LPKY	KNLT	APKKEA	F	FLD	FLAV	P	TY
AtFLA2	DILKS	.TGAD	KTFQ	DIVD	GGH	TVFC	PSDS	AVGKF	.MPKF	KSLS	PANKTA	L	VL	YH	G	MPVY
AtFLA3	VKV	PPPP	PMSS	PPAP	SPK	KG	ATP	APAP
AtFLA5	IF	PPPP	YVHV	VP	PT	PM	DA	VVP	AP	GP	AA
AtFLA8	NLLVS	.SGVL	KTYE	SAV	EKG	TVFC	PSDE	AFK	AE	GV	PD	LTKL	TO	AE	V	VS
AtFLA10	NLLVS	.SGVI	KTFE	STV	EKG	TVFC	PSDE	AFK	AE	GV	PD	LTKL	TO	AE	V	VS
AtFLA14	SPL	SP	VSS	PP	RP	AP	SP	DD	CG	DF	DB	PP	SS
PrFLA9	TM	IST	.TGVA	KTFE	DAV	GGH	TVFC	TDPA	FTG	AT	NK	LLK	LP	SD	DQ	VS
PrFLA10	DL	ITT	.TGVL	KSYE	DSI	GGH	TVFC	TRDT	FTG	VT	NK	MLT	KL	SS	ED	KVA

	240	250	260	270	280	290											
AtFLA1	SM	AML	KS	NN	GM	MNT	LAT	DG	ANK	FEL	TV	QND	GE	KV	TL	KTR	
AtFLA2	SL	QML	RS	GG	NA	VNT	LAT	EG	NN	KDF	TV	QND	GE	DV	LT	ETD	
AtFLA3	EGY	AD	APP	GL	AP	ET	AP	AS	AP	SE	SD	SP	AP	AP	D	
AtFLA5	DD	NS	PD	SA	VK	TP	AP	AT	DT	PE	AD	SP	AP	AP	S	
AtFLA8	PK	GS	LK	TN	KNN	IS	LAT	NG	AG	KFD	TV	T	ST	S	DE	VIL	
AtFLA10	PK	GS	LK	TN	KDA	IS	LAT	NG	AG	KYD	TV	T	ST	S	DE	VIL	
AtFLA14	SAP	GAA	DE	PE	SEN	AG	SAN	G	VSR	N	D	SQ	
PrFLA9	PL	GT	LK	T	NG	P	IST	I	ASP	SP	RK	YV	L	V	SS	SD	T
PrFLA10	PL	GT	LK	T	NG	P	IAT	M	AS	TG	AG	KYV	L	V	SS	SD	T

	300	310	320	330	340	350										
AtFLA1	DKV	L	L	P	KE	EF	KAS	AVE	AP	AP	AP	AP	ED	GD	VAD	SP
AtFLA2	DKV	L	L	P	REI	YK	AV	T	S	AP	PK	SS	SK	KPK	NAE
AtFLA3	TGL	S	F	G	AVL	VL	GF	V	AS	VF	VG
AtFLA5	AG	W	S	F	I	LL	L	A	F	L	A	S	P	A	G
AtFLA8	DNV	L	L	P	AEI	FG	K	S	P	P	AP	AP	EP	V	T
AtFLA10	DNV	L	L	P	AEI	FG	K	S	P	P	AP	AP	EP	V	T
AtFLA14	L	L	M	S	F	I	M	F	M	A	R	L	R
PrFLA9	NK	L	L	P	KEI	F	AA	A	P	T	P	A	P	VE	AP	AP
PrFLA10	DKV	L	L	P	KEI	F	V	A	A	P	AP	AP	AP	T	P

	360	370	380	390	400											
AtFLA1	SPA	EG	PD	GE	ADD	AT	ADD	AG	AV	R	I	GG	AK	AG	L	V
AtFLA2	AD	AP	SD	DD	VE	VA	DD	K	NA	G	AV	S	A	M	I
AtFLA3	AD	AP	SD	DD	VE	VA	DD	K	NA	G	AV	S	A	M	I
AtFLA5	AD	AP	SD	DD	VE	VA	DD	K	NA	G	AV	S	A	M	I
AtFLA8	S	.PE	S	AP	S	D	S	P	T	G	S	A	N	S	K	S
AtFLA10	S	.PE	S	AP	S	D	S	P	T	G	S	A	N	S	K	S
AtFLA14	SS	PE	GA	PD	S	P	T	S	S	EN	SA	KN	AA	F	H	
PrFLA9	NA	K	G	P	S	A	S	D	S	S	T	S	S	A	P	A
PrFLA10	EAS	K	S	T	S	T	S	F	A	P	A	T	A	K	

Figura 3.6. Alineamiento de secuencias de pino radiata versus *arabidopsis thaliana*, separadas por grupos de acuerdo a filogenia, destacando si hay presencia de 1 o 2 dominios FAS (línea de color mostaza) y si los elementos de este dominio contienen de forma conservada sus regiones y motivos característicos, H1 (cuadrado azul), YH (cuadrado verde) y H2 (cuadrado amarillo).

Tabla 3.1. Tabla comparativa. Nombre de la secuencia o gen de pino, grupo de clasificación según filogenia, largo de la secuencia, total PAST%, part PAST%, largo de región AGP, número de dominios FAS o fasciclin, si hay predicción o no de péptido señal con SignalP V5.0, predicción de GPI anclor con big-PI Plant Predictor, hit con BLASTp con arabis thaliana y predicción con HMM y Pfam de dominios conservados.

Gen	Grupo ¹	Largo (aa) ²	AP/PA/SP/TP/GP/VP Región AGP ⁴	repetitiva	Total PAST% ⁵	Parte PAST% ⁶	Largo parte PAST(aa) ⁷	Dominio Fasciclin ⁸	Predicción peptide señal ⁹	Predicción GPI ¹⁰	A. thaliana FLA BLASTP Hits ¹¹	Intraespecies BLASTP Hits ¹²	FLA	hmmscan
PrFLA2	A	264	3-4-1-2-0-0		0,41	0,09	16 and 8	1	Yes	Yes	AtFLA6	p14A9 (Pinus taeda)/arabinogalactan-like protein (Pinus armandii)		SP-FAS-Dis-TM
PrFLA1	A	273	6-5-2-1-0-1		0,38	0,08	19 and 8	1	Yes	No	AtFLA11	FLA1(Pinus taeda)		SP-FAS-Dis-TM
PrFLA3	A	127	2-2-3-0-0-0		0,48	0,086	11	1	None	Yes	AtFLA6	FLA7(Pinus taeda)		Dis-Dis-TM
PrFLA4	A	164	4-4-1-0-0-1		0,45	0,08	15	1	None	Yes	AtFLA6	FLA7-11(Pinus taeda)-FLA7 (Cinnamomum micranthum f. kanehirae)-AGP-like (Pinus densata)		FAS-Dis
PrFLA8	B	221	0-0-0-0-0-0		0,27	0	0	1	None	None	AtFLA17	FLA7-11(Pinus taeda)-FLA7 (Cinnamomum micranthum f. kanehirae)-AGP-like (Pinus densata)		SP-FAS-Dis
PrFLA7	B	411	9-7-3-2-1-0		0,38	0,09	8 and 42	2	Yes	Yes	AtFLA17	FLA8(Pinus taeda)-FLA10(Hevea brasiliensis)-FLA10(Citrus clementina)		SP-FAS-FAS
PrFLA5	B	461	4-2-0-0-2-0		0,24	0,04	26	2	Yes	None	AtFLA17	FLA16(Amborella trichopoda)-FLA17(Elaeis guineensis)-FLA17(Elaeis		SP-FAS-Dis-Dis-FAS-Dis

PrFLA6	B	434	4-2-0-0-2-0	0,28	0,25	14	2	None	None	AtFLA17	guineensis)- FLA17(Populus trichocarpa) FLA16(Amborella trichopoda)-FLA16- 17(Dendrobium catenatum)- FLA17(Carica papaya)	SP-FAS-Dis- Dis-FAS-Dis
PrFLA9	C	845	13-9-3-2-3-0	0,33	0,06	8, 41 and 14	3	None	None	AtFLA8	FLA8(Pinus taeda)- FLA16(Amborella trichopoda)- FLA16(Dendrobium catenatum)	SP-FAS-Dis- TM
PrFLA10	C	390	5-6-1-2-0-1	0,36	0,09	44	2	Yes	None	AtFLA8	FLA8(Pinus taeda)- FLA10(Populus alba)- FLA10(Populus trichocarpa)- FLA8(Prunus avium)	SP-FAS-Dis- TM
PrFLA12	D2	415	3-4-5-1-0-0	0,36	0,05	7 and 14	2	None	None	AtFLA4	FLA4 isoform X1(Amborella trichopoda)- FLA4(Nymphaea colorata)-FLA4(Elaeis guineensis)	FAS-FAS-Dis
PrFLA11	D2	464	4-2-1-0-0-1	0,34	0,03	4, 5 and 8	2	Yes	None	AtFLA4	FLA4 isoform X1(Amborella trichopoda)- FLA4(Nymphaea colorata)- FLA4(Glycine soja)	SP-FAS-FAS- Dis-Dis-TM

PrFLA9 y PrFLA10 se clasifican en el grupo C, PrFLA9 se agrupa cerca de PabFLA21 y PrFLA10 se encuentra en el mismo clado junto a PabFLA8. Las secuencias mostraron similitud con AtFLA8 (Tabla 3.1). El segundo dominio FAS está mucho más conservado que el primer dominio cuando estas proteínas de pino PrFLA 8-9-10 están alineadas con la arábido *AtFLA8* (Fig. 3.6).

Finalmente, *AtFLA4* pertenece al grupo D2 que presenta dos dominios FAS, también presentes en las secuencias de pino pertenecientes a este grupo (Fig 3.7). La región en el segundo dominio está más conservada (Fig. 3.6).

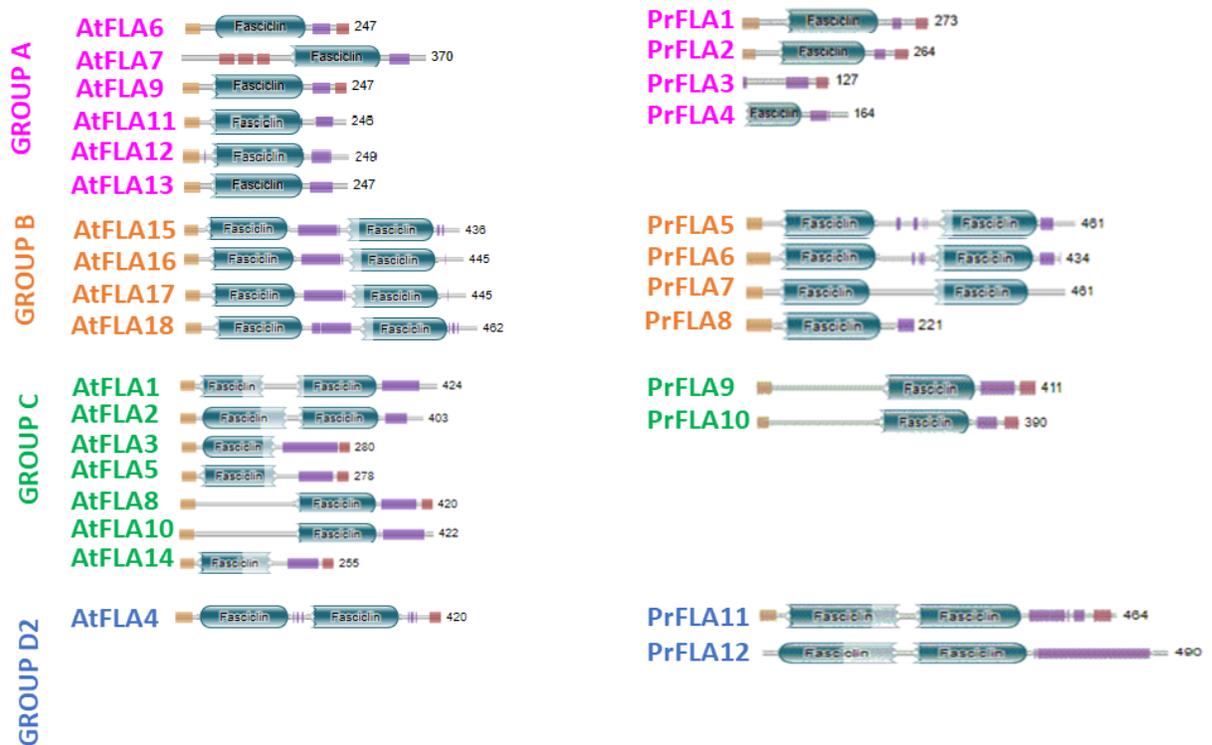


Figura 3.7. Agrupación con sus respectivos dominios y motivos conservados según Pfam, indicando en amarillo si tienen un péptido señal, las cápsulas corresponden a los dominios de Fasciclin-like, en rojo (TM & péptido señal) unión a transmembrana, en lila es Trastorno o los motivos PA de AGP y distribuidos en grupos AD (D2).

Determinación de AGPs total e identificación de epítopes

La presencia del dominio AGP se evaluó mediante dos estrategias. El primero basado en la reacción entre AGP y reactivo de Yariv, y el segundo, utilizando los anticuerpos monoclonales JIM7, LM2 y LM6. La abundancia relativa de AGP se determinó mediante electroforesis en cohetes (Fig. 3.8). Las muestras de tallo de pino radiata de 10 h. de inclinación sector de abajo, 2,5 h de inclinación arriba y abajo mostraron las mayores intensidades en el cohete, así como el control. Se utilizó goma arábica como estándar y las muestras más intensas mostraron una concentración de 1 μg .

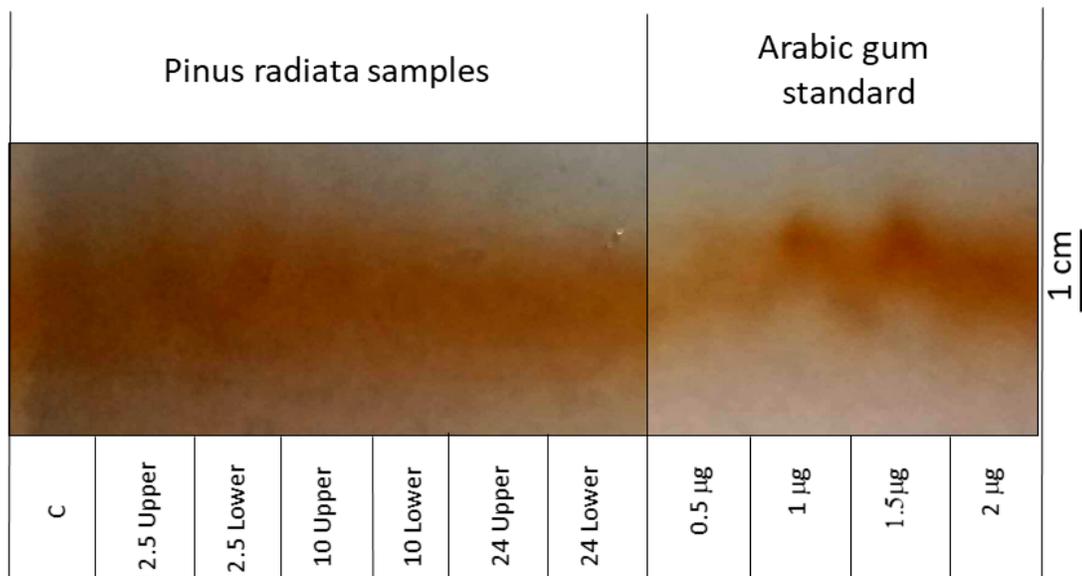


Figura 3.8. Electroforesis de cohetes, de las muestras de cortes de plántulas de un año expuestas a distintos tiempos a inclinación. Se observan de izquierda a derecha las como C de control o tiempo 0h, seguida de 2.5h superior, 2.5h inferior, 10h superior e inferior, 24h superior e inferior. En la zona de la derecha se encuentra el estándar de goma arábica, de los 0.5 μg , 1 μg , 1.5 μg y 2 μg .

Se observó un patrón de tinción particular cuando se utilizó JIM7 (Fig. 3.9). Se observa una fase de separación clara en xilema de las muestras control (Fig. 3.9 A). Además, una luminiscencia homogénea en el tallo cortado, a las 2,5 h (Fig. 3.9 B). Sin embargo, se observa una mayor

intensidad para xilema emergente en el lado inferior del tallo después de 2,5 h de inclinación (Fig. 3.9 C). La intensidad de la señal crece cubriendo las nuevas células del xilema (traqueidas) y las células del floema después de 10 h de inclinación (Fig. 3.9 D-E). Pero, a las 10 h del vástago superior del xilema en el lado se observa una fluorescencia menos intensa para los homogalacturonanos (Fig.3.9 D). Por el contrario, JIM7 mostró una mayor afinidad por las células del xilema en el lado superior del tallo después de 24 h de inclinación, mientras que es menos intensa en el lado inferior del tallo (Fig.3.9 F-G). Las muestras de 2,5 hacia arriba mostraron un área de tinción mayor y significativa en comparación con los tallos de 2,5 hacia abajo, cuando el área de tinción se comparó con Imagej (Fig. 3.12 A).

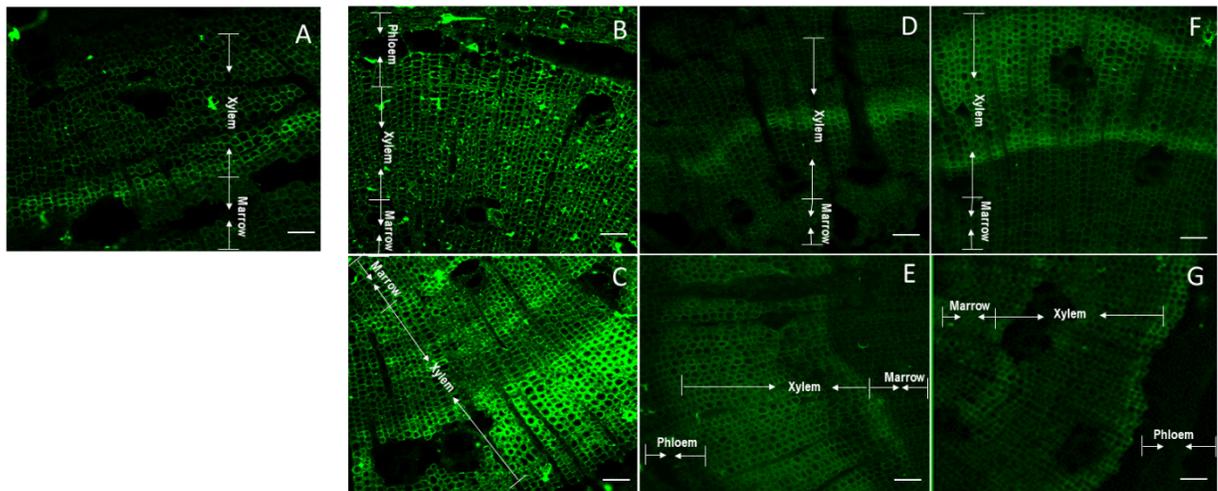


Figura 3.9. Cortes delgados de plántulas de un año de pino radiata, tratadas con anticuerpo JIM7 y Alexa Fluor, observados con microscopía confocal. **A** Corte de tallo control o a las 0h de inclinación. **B** Corte de la zona superior del tallo que ha sido inclinado 2.5h, **C** Corte de la zona inferior del tallo que ha sido inclinado 2.5h, **D** Corte de la zona superior del tallo que ha sido inclinado 10h, **E** Corte de la zona inferior del tallo que ha sido inclinado 10h, **F** Corte de la zona superior del tallo que ha sido inclinado 24h y **G** Corte de la zona inferior del tallo que ha sido inclinado 24h. Las flechas indican la sección dentro del corte indicando si se está en las células de la médula, xilema y floema. Escala de 100µm.

Las proteínas de arabinogalactano se marcan cuando se usa el anticuerpo LM2. Se observa una ligera separación entre la médula, xilema y floema en los tallos no inclinados (Fig. 3.10 A). Se observa una luminiscencia levemente importante de arabinogalactano en el lado inferior del tallo después de 2,5 h de inclinación (Fig. 3.10 C), que contrasta sin cambios en el lado superior del tallo de 2,5 h (Fig. 3.10 B). Por el contrario, se puede observar arabinogalactano en el lado superior de los tallos con una inclinación de 10 y 24 h (Fig. 3.10 D y 3.10 F). Las muestras de tallo tomadas después de una inclinación hacia arriba y hacia abajo de 2.5 mostrará un área de tinción mayor pero sin significación estadística, mientras que las otras muestras mostraron un área tinción más pequeña que el control (Supl. 3.12 B).

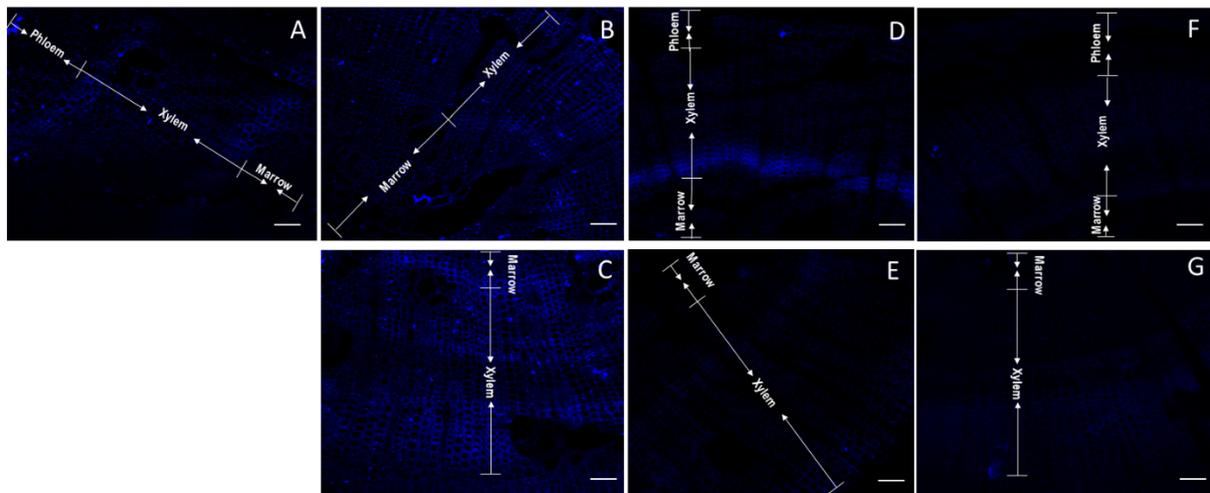


Figura 3.10. Cortes delgados de plántulas de un año de pino radiata, tratadas con anticuerpo LM2 y Alexa Fluor, observados con microscopía confocal. **A** Corte de tallo control o a las 0h de inclinación. **B** Corte de la zona superior del tallo que ha sido inclinado 2.5h, **C** Corte de la zona inferior del tallo que ha sido inclinado 2.5h, **D** Corte de la zona superior del tallo que ha sido inclinado 10h, **E** Corte de la zona inferior del tallo que ha sido inclinado 10h, **F** Corte de la zona superior del tallo que ha sido inclinado 24h y **G** Corte de la zona inferior del tallo que ha sido inclinado 24h. Las flechas indican la sección dentro del corte indicando si se está en las células de la médula, xilema y floema. Escala de 100µm.

Finalmente, la detección de cadenas de azucaradas arabino ((1-5) - α -L-arabinosilo) se observaron usando LM6. Se pudo observar una clara separación de la médula y xilema después de una inclinación de 2,5 h (Fig. 3.11 B-C), en contraste con el control (Fig. 3.11A). La intensa y homogénea adhesión observada a las 2,5 h de inclinación en el lado inferior del tallo, se ralentiza a las 10 h (Fig. 3.11 D-E). Sin embargo, es posible observar una intensa acumulación de residuos de arabino en las células del xilema para ambos lados del tallo. Se observa una señal menos intensa después de 24 horas de inclinación (Fig. 3.11 F-G). Todas las muestras mostraron un área de tinción mayor que el control, especialmente a las 2,5 h (Fig. 3.12 C).

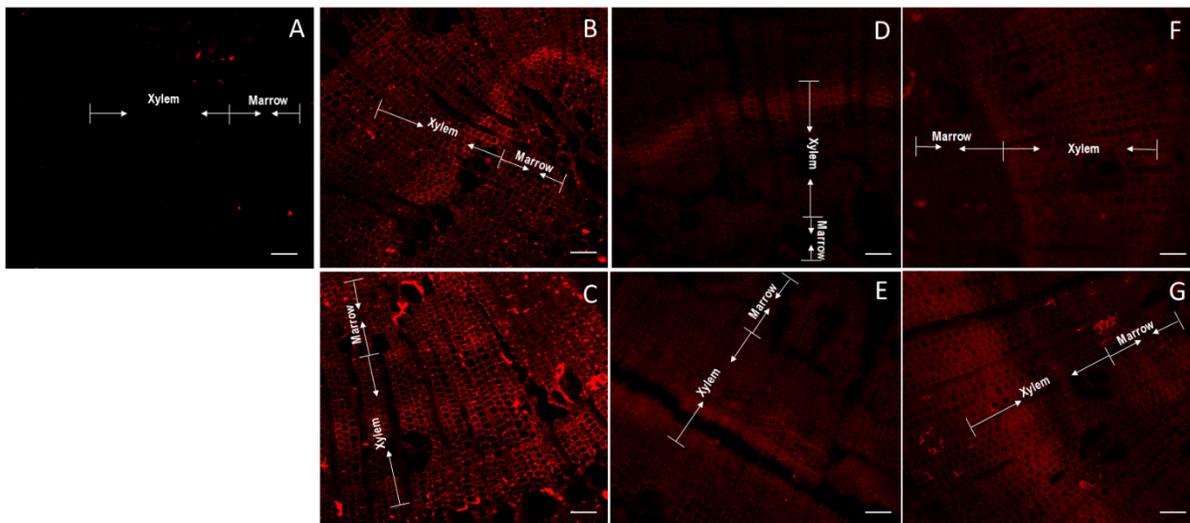


Figura 3.11. Cortes delgados de plántulas de un año de pino radiata, tratadas con anticuerpo LM6 y Alexa Fluor, observados con microscopía confocal. **A** Corte de tallo control o a las 0h de inclinación. **B** Corte de la zona superior del tallo que ha sido inclinado 2.5h, **C** Corte de la zona inferior del tallo que ha sido inclinado 2.5h, **D** Corte de la zona superior del tallo que ha sido inclinado 10h, **E** Corte de la zona inferior del tallo que ha sido inclinado 10h, **F** Corte de la zona superior del tallo que ha sido inclinado 24h y **G** Corte de la zona inferior del tallo que ha sido inclinado 24h. Las flechas indican la sección dentro del corte indicando si se está en las células de la médula, xilema y floema. Escala de 100 μ m

Adicionalmente, se realizó la cuantificación de proteínas totales utilizando Bradford. La mayoría de las muestras mostraron una mayor cantidad de AGP total, excepto en control y tallo inclinado a las 10 h (Supl. Fig. 3.1).

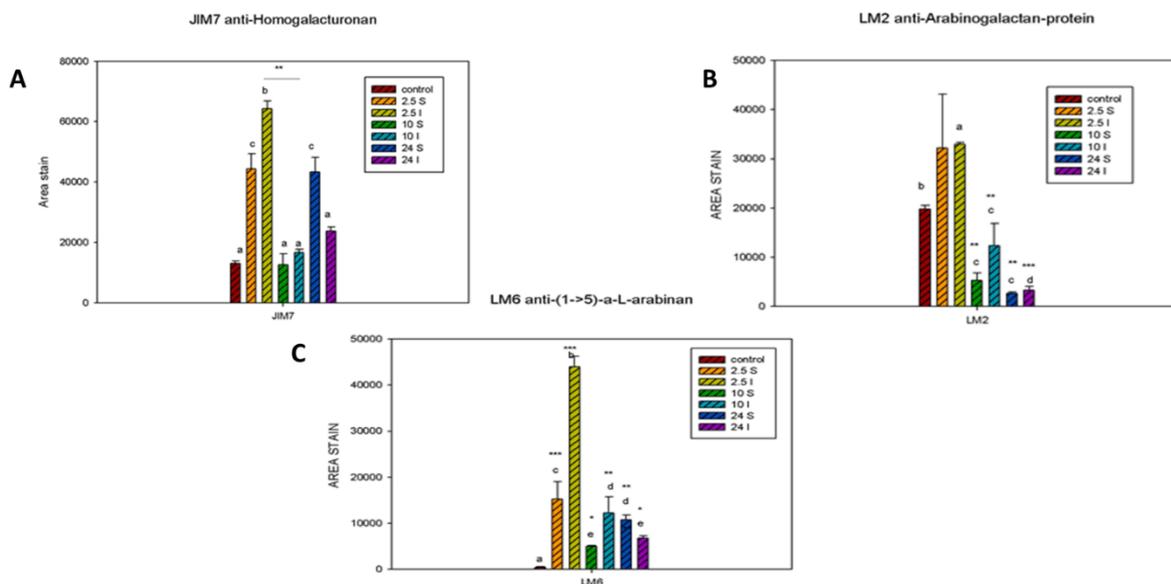


Figura 3.12. Medición del área de tinción. (A) Área de tinción en muestras tratadas con JIM7. (B) Área de tinción en muestras tratadas con LM2. (C) Área de tinción en muestras tratadas con LM6.

Las cantidades totales de proteínas fueron determinadas por Elisa. No se observaron diferencias significativas cuando se utilizó el anticuerpo JIM7 (Fig. 3.12 A). Se encontraron diferencias cuando se usó anticuerpo LM2 con control y muestras del lado del tallo inferior, las que muestran un valor similar (Fig. 3.12 B). Se determinó un pico de absorbancia en las muestras recogidas del lado inferior del tallo a las 2,5 y 10 horas, además, se observó una disminución adicional a las 24 h cuando se usó LM6 (Fig. 3.12 C).

DISCUSION

Las doce secuencias de pino radiata se agruparon en uno de los cuatro grupos principales descritos para la familia de proteínas fasciclin-like (grupos A-B-C-D). Estos grupos se definieron por la presencia de dominio FLA y anclaje GPI, y mostraron proteínas en Arabidopsis

(Johnson et al., 2003), eucalipto (MacMillan et al., 2015; Zang et al., 2015) y *Oryza sativa* (Ma y Zhao, 2010).

Se pueden observar dos grandes clados en el grupo A (Fig. 3.5) en los que se encuentran cuatro secuencias de pino radiata (PrFLA1-PrFLA2-PrFLA3-PrFLA4). Estas secuencias están en el mismo clado que las especies gimnosperma *Picea abies* (He et al., 2019) y dos secuencias de *Pinus taeda* (PtFLA18 y PtFLA12) que presentan un 40% de PAST y una expresión diferencial en el xilema (Showalter et al., 2016). Las cuatro secuencias de pino de este grupo mostraron la misma longitud y una similitud entre 38 y 48% para el dominio PAST (Tabla 3.1). Incluso si estas secuencias de pino son más similares a AtFLA7-6, se encuentra una gran similitud para las secuencias AtFLA11 y AtFLA12, porque estas dos secuencias de *Arabidopsis* se expresan en tallos y específicamente en células de esclerenquima (xilema) (Ito et al., 2005; MacMillan et al., 2010). Las secuencias pertenecientes a este grupo se han asociado a la regulación de la pared celular (MacMillan et al., 2010). Dentro de la misma clasificación en la filogenia presentada, EgrFLA1 participa en la modificación mecánica de los tallos, particularmente en el ángulo de las microfibras para la transición del agrandamiento de la celulosa y el engrosamiento de la pared celular vegetal (Guerriero et al., 2017).

El grupo A contiene genes como AtFLA9-13-6, mientras que AtFLA9 interactúa físicamente con un receptor quinasa-like (RLK) y en conjunto actúan sobre la celulosa sintasa, lo que sugiere que las proteínas FLA de este grupo pueden modular la biosíntesis de celulosa y la biosíntesis de la pared celular primaria (Seifert, 2018). Se ha demostrado que AtFLA11, AtFLA12 y PtFLA10 están altamente expresados en tallos y xilema diferenciado (Zang et al., 2015). Todas estas evidencias sugieren que estas proteínas son funcionalmente específicas en la formación de estructuras leñosas debido a que se expresan mayoritariamente en el xilema (Costa et al., 2019;

MacMillan et al., 2015, 2010; Seifert, 2018; Showalter et al., 2016). Por otro lado, PtFLA26 (43% PAST) y PtFLA21 (38% PAST) mostraron una expresión más alta en primavera que en invierno y en tejido de amento masculino (Showalter et al., 2016; Zang et al., 2015). Llama la atención que PtrFLA26 es un gen diferente pero utilizado con la misma nomenclatura en el trabajo de estos dos autores. Las secuencias informadas por Showalter et al. se utilizó en este trabajo (Showalter et al., 2016; Zang et al., 2015).

Las secuencias clasificadas en el grupo A contienen un dominio FAS, sin embargo, cuando se compara por HMM con la base de datos Pfam, PrFLA3 no presenta el dominio FAS (Fig. 3.7). Para esta secuencia, el análisis con ScanProsite muestra una zona rica en serina y prolina que continúa clasificándose como AGP, sin un motivo probable del tipo AGP (Tabla 3.1).

Las proteínas Fla del grupo B son más homogéneas, con pocos miembros y se caracterizan por tener al menos dos dominios FAS y la ausencia de GPI. Sin embargo, solo PrFLA8 presenta un dominio FAS de las otras tres secuencias de pino (PrFLA5-6-7). Los genes de *Arabidopsis* se expresan en semillas, tejido embrionario y cubierta de semillas (Costa et al., 2019).

Por otro lado, se pueden observar dos subclados en el grupo C, con uno o dos dominios FAS, incluidos EgrFLA10-11-12 y PtFLA22 (MacMillan et al., 2015; Showalter et al., 2016). El gen de *Pinus taeda* se expresa en la inflorescencia femenina y está presente en un 33% PAST. Curiosamente, PrFLA9 mostró secuencias PAST similares, así como PrFLA10 con 36% PAST, aunque estas dos secuencias pertenecen al segundo clado como *P. abies* PabFLA 6/8/21. Por otro lado, AtFLA3 fue esencial para la formación de microesporas (Li et al., 2010; Xue et al., 2017), se expresa en granos de polen y tubo polínico, posiblemente participando en la deposición de celulosa. En nuestro caso, no se observó que ocurre en órgano de flor o fenómeno de floración, porque trabajamos con plántula de un año en pino, los cuales no producen flores. Una

cuarta secuencia de PabFLA23 se clasificó en el grupo D1, probablemente debido al bajo porcentaje de secuencias PAST (Zhou et al., 2009). También se ha informado de EgrFLA13, pero no se observó expresión diferencial en hojas ni tallos (MacMillan et al., 2015). Otros genes como el At FLA3 / 5/8/10 están asociados con el desarrollo y maduración del polen (Costa et al., 2019; Li et al., 2010). No se han informado más evidencias funcionales para secuencias PAST en plantas.

El grupo D es el clado más diverso, que se divide en D1 y D2, sin embargo, solo dos secuencias de pino se clasifican en D2 (PrFLA11 y PrFLA12). FLA4 de Arabidopsis se encuentra en el mismo clado (Fig. 3.5) y está relacionado con la tolerancia al estrés salino y el desarrollo de las raíces (Costa et al., 2019; Li et al., 2010; Xue et al., 2017), así como con la expansión celular y la señalización del estrés (MacMillan et al., 2015).

El reactivo yariv se une específicamente a las proteínas arabinogalactano, y principalmente a aquellas ubicadas en la superficie celular (Göllner et al., 2013; Yariv et al., 1967). Los AGP totales de electroforesis de cohetes se han visualizado en Arabidopsis (Ding and Zhu, 1997) se aislaron AGP de *Pinus caribaea* de células embrionarias donde se observó una alta rotación de proteoglicanos, ello permitió que las células reaccionen rápidamente al medio ambiente (Domon et al., 2000).

En este sentido, ¿es posible que la expresión o sobreexpresión de las proteínas AGP pueda reorientar las células madre al crecimiento vertical? En álamo se observó una mayor cantidad de AGP en madera de tensión en comparación con madera opuesta (Lafarguette et al., 2004). El experimento se realizó inclinando álamos en un ángulo de 45° durante dos meses. Por otro lado, los pinos jóvenes se inclinaron con el mismo ángulo, pero se sometieron a la inclinación durante

un período de tiempo más corto, y se observó una mayor cantidad de AGP totales en los momentos más tempranos como 2.5 h (Fig. 3.8).

Otra forma de determinar AGP totales es mediante una electroforesis cruzada, el cual requiere reactivo Yariv (Cassab, 1986; Lafarguette et al., 2004). Se observó una acumulación diferencial de AGP en el lado inferior del tallo en el pino dentro del marco del transcurso del tiempo. Se reportó una importante acumulación de AGP en madera de tensión en alamo (Lafarguette et al., 2004). Se ha reportado que los genes implicados en la remodelación de la pared celular se expresan diferencialmente cuando las plántulas de pino radiata están inclinadas. La expresión diferencial para XTH (Valenzuela et al., 2014), EXP (Mateluna et al., 2017) y el metabolismo secundario (Cruz, Méndez et al., 2019) ocurren dependiendo del tiempo y del lado del tallo (lado superior o inferior).

Se han detectado AGP en plantas leñosas en árboles de *Pinus taeda* de 11 y 15 años utilizando anticuerpos monoclonales como JIM13, que son abundantes y específicos para las células del xilema diferenciadas, las que se vinculan al engrosamiento de la pared secundaria (Zhang et al., 2003). A su vez, se observó en los cortes histológicos de tallo, una franja demarcada correspondiente a células de xilema diferenciado, porque los anticuerpos JIM reconocen la reacción de los carbohidratos provenientes de epítomos de AGP. Se observaron claramente células de xilema diferenciadas con JIM7, especialmente en el lado inferior del tallo a las 2,5 h. El anticuerpo JIM7, se ha utilizado para identificar AGP en mucílago de semillas de *Arabidopsis* junto con LM6 que identifica (1-5)- α -L-arabinanos (Macquet et al., 2007). Estos autores compararon algunas plantas y en semillas con LM2 y LM6 utilizando reactivo de yariv para los 3 pasos y gel de electrodifusión donde se observan diferencias en la detección entre LM2 con mejor detección en *Marchantia polymorpha*, que al utilizar LM6 y al comparar el gel de

electrodifusión con *Echinacea purpurea* se observan en ambas muestras la presencia de AGPs (Happ y Classen, 2019). La mayoría de los trabajos que utilizan detección de AGPs en plantas son en muestras de raíz como en cebada (Marzec y Szarejko, 2014), pero son pocos los que utilizan esto en cortes de plantas leñosas. Aún ello, nuestros resultados muestran, diferencias en la zona inferior de los cortes de tallo de pino inclinado, principalmente a las 2,5 horas de inclinación, consistente al tiempo en que se encuentra la expresión diferencial de PrMADS10.

Conclusiones

Las secuencias identificadas y su posterior clasificación se basó en la presencia de los dominios y motivos característicos para este tipo de proteínas, así también la presencia del dominio de anclaje GPI. Aún ello, hubo secuencias que no presentaban estas características, pero fueron consideradas para análisis pues se seleccionaron por BLAST. La filogenia con genes de diferentes especies y de las cuales se contaba con evidencia, permitió determinar que cuatro secuencias identificadas en el RNA-seq de pino radiata corresponden al grupo A de fasciclin-like (PrFLA1-PrFLA2-PrFLA3-PrFLA4). En este grupo, se encuentran AtFLA11 y AtFLA12, fasciclin-like que se expresan principalmente en tallo y de los cuales las secuencias encontradas vendrían siendo ortólogas de pino, con sus respectivos dominios FAS y %PAST rondando el 40% del largo de la secuencia (Tabla 3.1).

Por otro lado, de acuerdo a lo observado en los cortes histológicos y inmunomarcaje, se evidencia una mayor presencia de AGPs en xilema y en zona inferior de los cortes, presumiendo una mayor cantidad de estas proteínas cuando las plántulas de pino son sometidas a inclinación.

Al cuantificar los AGPs totales por el método de Bradford y el uso de anticuerpos, se pudo observar diferencias con respecto al control. Esto indicaría que hay una alteración en la

producción de AGPs, pudiendo estar relacionado al tiempo de exposición a inclinación de 45°. Ello puede considerarse una respuesta de las células, principalmente del xilema frente al fenómeno de gravitropismo, y concentrándose la acumulación de estas proteínas en la zona inferior del árbol, como muestra el resultado al uso de anticuerpos. La electroforesis en cohete con reactivo de Yariv, es una medición semicuantitativa donde a partir de extracción de proteínas totales, en una coloreación rojiza se observan proteínas AGPs totales en tallo completo en forma de cohetes. Esta estrategia de aislar proteína del tallo influye en determinar una concentración levemente elevada en muestras control.

Se podría concluir que, en respuesta a la inclinación del tallo, las células del xilema concentran o acumulan AGPs en la pared, pudiendo generar un efecto de engrosamiento de ésta, participando en la reorientación del tallo o tronco junto a otros genes y factores de transcripción como es *PrMADS10*.

CONCLUSIONES GENERALES

1. Al sobreexpresar el gen *PrMADS10* en Arabidopsis, mediante análisis de Microarreglo se observa la alteración de 1219 genes en que 690 presentan expresión positiva y 529 expresión negativa al contrastar con muestras WT.
2. De los genes que tienen una expresión positiva, se clasifican por ontología en función molecular, principalmente en mayor actividad catalítica y actividad transportadora, funciones requeridas en la modificación y reestructuración de pared celular, para volver al crecimiento vertical del tronco.
3. De los genes que tienen una expresión negativa, se clasifican por ontología en procesos biológicos, principalmente en estrés y metabolitos secundarios, la represión de algunos genes activan la respuesta a estrés, en este caso a la inducción por gravitropismo y por ende a la producción de metabolitos secundarios.
4. En la búsqueda de elementos en *cis* en secuencias promotoras de genes con expresión diferenciada, cinco secuencias tienen una exclusiva presencia de elementos en *cis*, con sitios AG-AGL y quince presentan sitios de respuesta a AG-AGL y AP, además de las cinco secuencias tres son estrechas y pertenecientes a la subfamilia de extensinas, moderadamente glicosilados y con alta presencia de prolina en las secuencias.
5. La inclinación inducida, podría afectar la expresión de factores de transcripción que mantienen la homeostasis de fosforo, e indicadores observados como deficiencia de fosfato, en base los datos *in silico*.
6. Las observaciones fenotípicas no presentan diferencias significativas en el conteo y pesaje de semillas de líneas transgénicas, conteo de hojas de la roseta y algunas diferencias en el tamaño de éstas, siendo de menor tamaño que de las plantas WT.

7. Las secuencias de FLAs identificadas y su posterior clasificación se basó en la presencia de los dominios y motivos característicos para este tipo de proteínas, así también la presencia del dominio de anclaje GPI
8. De acuerdo a lo observado en los cortes histológicos y inmunomarcaje, se evidencia una mayor presencia de AGPs en xilema y en zona inferior de los cortes, presumiendo una mayor cantidad de estas proteínas cuando las plántulas de pino son sometidas a inclinación.
9. En respuesta a la inclinación del tallo, las células del xilema concentran o acumulan AGPs en la pared, pudiendo generar un efecto de engrosamiento de ésta, participando en la reorientación del tallo o tronco junto a otros genes y factores de transcripción como es *PrMADS10*.
10. El proceso de reorientación del tallo de las plántulas, requiere de una maquinaria de genes, en su mayoría relacionados a remodelación de pared, donde fasciclin-like es uno de los genes que ven alterada su expresión cuando *PrMADS10* se expresa diferencialmente en tallo.

Figuras suplementarias

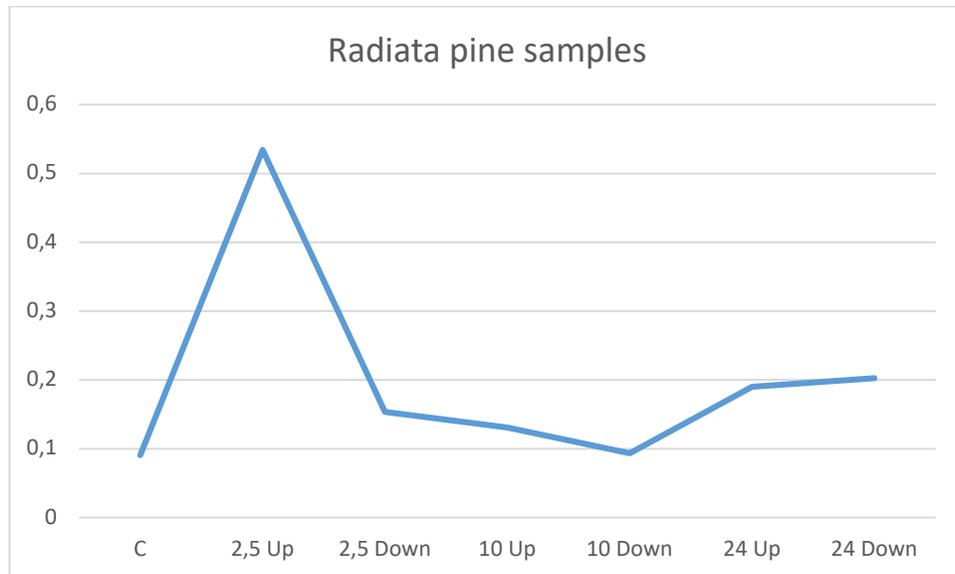


Figura 3.1. Cuantificación de proteínas totales con método Bradford

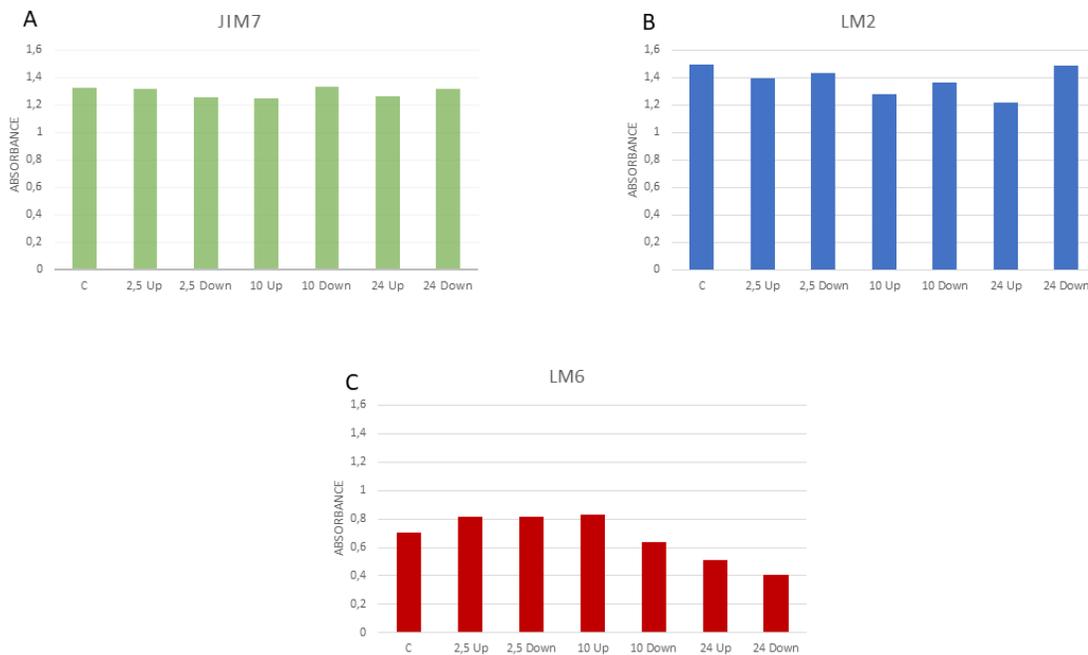


Figura 3.2. Ensayo de Elisa, las muestras de proteínas totales de pino en las distintas condiciones de observación, se midió la absorbancia a 280nm con el anticuerpo JIM7 (A), los valores son cercanos a 1,4 de absorbancia no se observa diferencia significativa entre las condiciones. Por otro lado, el anticuerpo LM2 (B) la muestra control es de 1,5 de absorbancia, mostrando disminución en las muestras up, mientras que las down se acercan al valor observado en el control. Para el tercer anticuerpo, LM6 (C) la absorbancia de la condición control es de 0,7, donde

las condiciones 2,5h y 10h down tienen una absorbancia de 0,8, pero los valores de 10h down y 24h van decreciendo llegando a 0,4 de absorbancia.

Presentacion a congresos Nacionales e Internacionales

DISCOVERY OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES IN TILT YOUNG SEEDLINGS OF *RADIATA* PINE BY RNA-SEQ ANALYSIS.

Universidad de Talca, Talca, 28 de noviembre, 2014.
Poster en Workshop "Integrative Plant Biology"

DISCOVERY OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES IN TILT YOUNG SEEDLINGS OF *RADIATA* PINE BY RNA-SEQ ANALYSIS.

Región de Coquimbo, 1 al 4 de Diciembre, 2014.
Poster en IX Reunión de Biología Vegetal

MICROARRAY ANALYSIS AND COMPARISON OF TRANSCRIPTIONAL REGULATION OVER-EXPRESSING A *PINUS RADIATA* D. DON MADS10 IN *ARABIDOPSIS*.

Hotel DREAMS Valdivia, 1 al 4 de diciembre, 2015.
Poster en X Reunión de Biología Vegetal

Transcriptional analysis in *Arabidopsis thaliana* over-expressing of 35S::PrMADS10
Cumbres Hotel in Puerto Varas, Región de Los Lagos, Chile. 23 al 26 de septiembre, 2017.

Poster, "Molecular Biosystems" Conference on Eukaryotic Gene Regulation and Functional Genomics.

IN SILICO ANALYSIS OF TRANSCRIPTIONAL REGULATION IN *ARABIDOPSIS THALIANA* OVER-EXPRESSING A *PINUS RADIATA* D. DON MADS10

Puerto Varas, 26 al 29 de Septiembre del 2017.
Poster XL Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular

ANALYSIS IN SILICO OF TRANSCRIPTIONAL AND FUNCTIONAL REGULATION IN *ARABIDOPSIS THALIANA* OVER-EXPRESSING A *PINUS RADIATA* D. DON MADS10

Universidad de Talca, Talca, 20 al 24 de noviembre 2017.
Poster, "Second International Conference in Bioinformatics, Simulations and Modeling (iCBSM) 2017"

TRANSCRIPTION FACTOR IDENTIFIED IN *PINUS RADIATA* D. DON OVER-EXPRESSED IN *ARABIDOPSIS THALIANA* AFFECTS THE EXPRESSION OF OTHER TRANSCRIPTION FACTORS RELATED TO STRESS.

Hotel Villarrica Park Lake, Región de la Araucanía, 4 al 7 de diciembre, 2017.

Poster y Flash talk. XII Reunión de Biología Vegetal.

ANALYSIS IN SILICO OF TRANSCRIPTIONAL REGULATION IN *ARABIDOPSIS THALIANA* OVER-EXPRESSING A *PINUS RADIATA* D. DON *MADS10*

Universidad de Talca, Talca, 23-24 de julio, 2018.

Poster, 22° Encuentro científico, “Biología vegetal y Biotecnología”.

MOLECULAR RESPONSE TO STEM INCLINATION IN *RADIATA* PINE SEEDLINGS: A FUNCIONAL CHARACTERIZATION OF THE DIFFERENTIALLY EXPRESSED *PRMADS10*

Town and Country Hotel, San Diego, California, Estados Unidos, 12 al 16 de enero 2019,
Presentación oral, Congreso internacional PAG XXVII: Plant and animal genome conference.

Artículo científico

Méndez, T., Cruz, N., Ramos, P., Urbina, D., Vega, A., Gutiérrez, R.A., Moya-León, M.A., Herrera, R.,(2019). Induction of *PrMADS10* on the lower side of bent pine tree stems: potential role in modifying plant cell wall properties and wood anatomy. *Sci. Rep.* 9, 18981. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55276-7>

REFERENCIAS

- Agarwal, P., Reddy, M.P., Chikara, J., 2011. WRKY: its structure, evolutionary relationship, DNA-binding selectivity, role in stress tolerance and development of plants. *Mol Biol Rep* 38, 3883–3896. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0504-5>
- Allona, I., Quinn, M., Shoop, E., Swope, K., Cyr, S.S., Carlis, J., Riedl, J., Retzel, E., Campbell, M.M., Sederoff, R., Whetten, R.W., 1998a. Analysis of xylem formation in pine by cDNA sequencing. *PNAS* 95, 9693–9698. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.16.9693>
- Allona, I., Quinn, M., Shoop, E., Swope, K., Cyr, S.St., Carlis, J., Riedl, J., Retzel, E., Campbell, M.M., Sederoff, R., Whetten, R.W., 1998b. Analysis of xylem formation in pine by cDNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9693–9698.
- Almagro Armenteros, J.J., Tsirigos, K.D., Sønderby, C.K., Petersen, T.N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., 2019. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology* 37, 420–423. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>
- Alvarez-Buylla, E.R., Pelaz, S., Liljegren, S.J., Gold, S.E., Burgeff, C., Ditta, G.S., Pouplana, L.R. de, Martínez-Castilla, L., Yanofsky, M.F., 2000. An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *PNAS* 97, 5328–5333. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.10.5328>
- An, X., Ye, M., Wang, D., Wang, Z., Cao, G., Zheng, H., Zhang, Z., 2011. Ectopic expression of a poplar APETALA3-like gene in tobacco causes early flowering and fast growth. *Biotechnol Lett* 33, 1239–1247. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0545-4>
- Anterola, A.M., Lewis, N.G., 2002. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry* 61, 221–294. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00211-x](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00211-x)
- Aswath, C.R., Kim, S.H., 2005a. Another Story of MADS-Box Genes – their Potential in Plant Biotechnology. *Plant Growth Regul* 46, 177–188. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-8482-7>
- Aswath, C.R., Kim, S.H., 2005b. Another Story of MADS-Box Genes – their Potential in Plant Biotechnology. *Plant Growth Regul* 46, 177–188. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-8482-7>
- Baroja-Fernández, E., Muñoz, F.J., Li, J., Bahaji, A., Almagro, G., Montero, M., Etxeberria, E., Hidalgo, M., Sesma, M.T., Pozueta-Romero, J., 2012. Sucrose synthase activity in the *sus1/sus2/sus3/sus4* Arabidopsis mutant is sufficient to support normal cellulose and starch production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 321–326. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117099109>
- Beckedorff, F., Blumenthal, E., daSilva, L.F., Aoi, Y., Cingaram, P.R., Yue, J., Zhang, A., Dokaneheifard, S., Valencia, M.G., Gaidosh, G., Shilatifard, A., Shiekhattar, R., 2020. The Human Integrator Complex Facilitates Transcriptional Elongation by Endonucleolytic Cleavage of Nascent Transcripts. *Cell Rep* 32, 107917. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107917>
- Behr, M., Legay, S., Žižková, E., Motyka, V., Dobrev, P.I., Hausman, J.-F., Lutts, S., Guerriero, G., 2016. Studying Secondary Growth and Bast Fiber Development: The Hemp Hypocotyl Peeks behind the Wall. *Front Plant Sci* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01733>

- Bies-Etheve, N., Pontier, D., Lahmy, S., Picart, C., Vega, D., Cooke, R., Lagrange, T., 2009. RNA-directed DNA methylation requires an AGO4-interacting member of the SPT5 elongation factor family. *EMBO Rep* 10, 649–654. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.31>
- Bomal, C., Bedon, F., Caron, S., Mansfield, S.D., Levasseur, C., Cooke, J.E.K., Blais, S., Tremblay, L., Morency, M.-J., Pavy, N., Grima-Pettenati, J., Séguin, A., Mackay, J., 2008. Involvement of *Pinus taeda* MYB1 and MYB8 in phenylpropanoid metabolism and secondary cell wall biogenesis: a comparative in planta analysis. *J Exp Bot* 59, 3925–3939. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern234>
- Bossy, A., Blaschek, W., Classen, B., 2009. Characterization and immunolocalization of arabinogalactan-proteins in roots of *Echinacea purpurea*. *Planta Med.* 75, 1526–1533. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1185801>
- Bowling, A.J., Vaughn, K.C., 2008. Immunocytochemical characterization of tension wood: Gelatinous fibers contain more than just cellulose. *Am. J. Bot.* 95, 655–663. <https://doi.org/10.3732/ajb.2007368>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Briat, J.-F., Rouached, H., Tissot, N., Gaymard, F., Dubos, C., 2015. Integration of P, S, Fe, and Zn nutrition signals in *Arabidopsis thaliana*: potential involvement of PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 (PHR1). *Front. Plant Sci.* 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00290>
- Bulankova, P., Akimcheva, S., Fellner, N., Riha, K., 2013. Identification of *Arabidopsis* Meiotic Cyclins Reveals Functional Diversification among Plant Cyclin Genes. *PLOS Genetics* 9, e1003508. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003508>
- Ca, L., Jd, P., Eg, N., 2000. Purification and cloning of an arabinogalactan-protein from xylem of loblolly pine. *Planta* 210, 686–689. <https://doi.org/10.1007/s004250050061>
- Campaign, A., Yang, Y.H., 2010. Comparison study of microarray meta-analysis methods. *BMC Bioinformatics* 11, 408. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-408>
- Carmona, M.J., Ortega, N., Garcia-Maroto, F., 1998. Isolation and molecular characterization of a new vegetative MADS-box gene from *Solanum tuberosum* L. *Planta* 207, 181–188. <https://doi.org/10.1007/s004250050471>
- Carrasco-Orellana, C., Stappung, Y., Mendez-Yañez, A., Allan, A.C., Espley, R.V., Plunkett, B.J., Moya-Leon, M.A., Herrera, R., 2018. Characterization of a ripening-related transcription factor FcNAC1 from *Fragaria chiloensis* fruit. *Scientific Reports* 8, 10524. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28226-y>
- Cassab, G.I., 1986. Arabinogalactan proteins during the development of soybean root nodules. *Planta* 168, 441–446. <https://doi.org/10.1007/BF00392262>
- Chabannes, M., Barakate, A., Lapierre, C., Marita, J.M., Ralph, J., Pean, M., Danoun, S., Halpin, C., Grima-Pettenati, J., Boudet, A.M., 2001. Strong decrease in lignin content without significant alteration of plant development is induced by simultaneous down-regulation of cinnamoyl CoA reductase (CCR) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) in tobacco plants. *The Plant Journal* 28,

257–270. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01140.x>

Chen, Q.G., Bleecker, A.B., 1995. Analysis of ethylene signal-transduction kinetics associated with seedling-growth response and chitinase induction in wild-type and mutant arabidopsis. *Plant Physiol* 108, 597–607. <https://doi.org/10.1104/pp.108.2.597>

Chow, C.-N., Zheng, H.-Q., Wu, N.-Y., Chien, C.-H., Huang, H.-D., Lee, T.-Y., Chiang-Hsieh, Y.-F., Hou, P.-F., Yang, T.-Y., Chang, W.-C., 2016. PlantPAN 2.0: an update of plant promoter analysis navigator for reconstructing transcriptional regulatory networks in plants. *Nucleic Acids Res* 44, D1154–D1160. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1035>

Costa, M., Pereira, A.M., Pinto, S.C., Silva, J., Pereira, L.G., Coimbra, S., 2019. In silico and expression analyses of fasciclin-like arabinogalactan proteins reveal functional conservation during embryo and seed development. *Plant Reprod* 32, 353–370. <https://doi.org/10.1007/s00497-019-00376-7>

Crevillén, P., Dean, C., 2011. Regulation of the floral repressor gene FLC: the complexity of transcription in a chromatin context. *Current Opinion in Plant Biology* 14, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.08.015>

Cruz, N., Méndez, T., Ramos, P., Urbina, D., Vega, A., Gutiérrez, R.A., Moya-León, M.A., Herrera, R., 2019. Induction of PrMADS10 on the lower side of bent pine tree stems: potential role in modifying plant cell wall properties and wood anatomy. *Sci Rep* 9, 18981. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55276-7>

Cseke, L.J., Cseke, S.B., Ravinder, N., Taylor, L.C., Shankar, A., Sen, B., Thakur, R., Karnosky, D.F., Podila, G.K., 2005. SEP-class genes in *Populus tremuloides* and their likely role in reproductive survival of poplar trees. *Gene* 358, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.05.035>

Cseke, L.J., Ravinder, N., Pandey, A.K., Podila, G.K., 2007. Identification of PTM5 protein interaction partners, a MADS-box gene involved in aspen tree vegetative development. *Gene* 391, 209–222. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.12.033>

Cseke, L.J., Zheng, J., Podila, G.K., 2003a. Characterization of PTM5 in aspen trees: a MADS-box gene expressed during woody vascular development. *Gene* 318, 55–67. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00765-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00765-0)

Cseke, L.J., Zheng, J., Podila, G.K., 2003b. Characterization of PTM5 in aspen trees: a MADS-box gene expressed during woody vascular development. *Gene* 318, 55–67. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00765-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00765-0)

Dai, X., Wang, Y., Zhang, W.-H., 2016. OsWRKY74, a WRKY transcription factor, modulates tolerance to phosphate starvation in rice. *J Exp Bot* 67, 947–960. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv515>

Danilova, M.N., Kudryakova, N.V., Andreeva, A.A., Doroshenko, A.S., Pojidaeva, E.S., Kusnetsov, V.V., 2018. Differential impact of heat stress on the expression of chloroplast-encoded genes. *Plant Physiology and Biochemistry* 129, 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.05.023>

De Bodt, S., Raes, J., Florquin, K., Rombauts, S., Rouzé, P., Theißen, G., Van de Peer, Y., 2003. Genomewide Structural Annotation and Evolutionary Analysis of the Type I MADS-Box Genes in Plants. *Journal of Molecular Evolution* 56, 573–586. <https://doi.org/10.1007/s00239-002-2426-x>

- de Castro, E., Sigrist, C.J.A., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P.S., Gasteiger, E., Bairoch, A., Hulo, N., 2006. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res.* 34, W362-365. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl124>
- Demura, T., Fukuda, H., 2007. Transcriptional regulation in wood formation. *Trends in Plant Science* 12, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.12.006>
- Devey, M.E., Bell, J.C., Smith, D.N., Neale, D.B., Moran, G.F., 1996. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD, and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 92, 673–679. <https://doi.org/10.1007/BF00226088>
- Dias, B.F. de O., Simões-Araújo, J.L., Russo, C.A.M., Margis, R., Alves-Ferreira, M., 2005. Unravelling MADS-box gene family in *Eucalyptus* spp.: a starting point to an understanding of their developmental role in trees. *Genetics and Molecular Biology* 28, 501–510. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572005000400004>
- Diaz-Trivino, S., del Mar Castellano, M., de la Paz Sanchez, M., Ramirez-Parra, E., Desvoyes, B., Gutierrez, C., 2005. The genes encoding Arabidopsis ORC subunits are E2F targets and the two ORC1 genes are differently expressed in proliferating and endoreplicating cells. *Nucleic Acids Research* 33, 5404–5414. <https://doi.org/10.1093/nar/gki854>
- Diaz-vaz, J.E, Fernandez, A., Valenzuela, L., Torres, M., 2007. MADERA DE COMPRESIÓN EN PINUS RADIATA D. DON: I, CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS. *Maderas. Ciencia y tecnología* 9, 29–43.
- Diaz-vaz, J. E., Fernandez, A., Valenzuela, L., Torres, M., 2007. MADERA DE COMPRESIÓN EN PINUS RADIATA D. DON: I, CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS. *Maderas. Ciencia y tecnología* 9, 29–43. <https://doi.org/10.4067/S0718-221X2007000100003>
- Ding, L., Zhu, J.-K., 1997. A role for arabinogalactan-proteins in root epidermal cell expansion. *Planta* 203, 289–294. <https://doi.org/10.1007/s004250050194>
- Domon, J.-M., Neutelings, G., Roger, D., David, A., David, H., 2000. A Basic Chitinase-like Protein Secreted by Embryogenic Tissues of *Pinus caribaea* acts on Arabinogalactan Proteins Extracted from the same Cell Lines. *Journal of Plant Physiology* 156, 33–39. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(00\)80269-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(00)80269-2)
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., Lepiniec, L., 2010. MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science* 15, 573–581. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.06.005>
- Eden, E., Navon, R., Steinfeld, I., Lipson, D., Yakhini, Z., 2009. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics* 10, 48. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-48>
- Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C., 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19, 1349.
- Egea-Cortines, M., Saedler, H., Sommer, H., 1999. Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral

- architecture in *Antirrhinum majus*. *EMBO J* 18, 5370–5379. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.19.5370>
- Eisenhaber, B., Bork, P., Yuan, Y., Löffler, G., Eisenhaber, F., 2000. Automated annotation of GPI anchor sites: case study *C. elegans*. *Trends Biochem. Sci.* 25, 340–341. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)01601-7](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)01601-7)
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S.R., Luciani, A., Potter, S.C., Qureshi, M., Richardson, L.J., Salazar, G.A., Smart, A., Sonnhammer, E.L.L., Hirsh, L., Paladin, L., Piovesan, D., Tosatto, S.C.E., Finn, R.D., 2019. The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res.* 47, D427–D432. <https://doi.org/10.1093/nar/gky995>
- Farage-Barhom, S., Burd, S., Sonogo, L., Perl-Treves, R., Lers, A., 2008. Expression analysis of the BFN1 nuclease gene promoter during senescence, abscission, and programmed cell death-related processes. *J Exp Bot* 59, 3247–3258. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern176>
- Fornes, O., Castro-Mondragon, J.A., Khan, A., van der Lee, R., Zhang, X., Richmond, P.A., Modi, B.P., Correard, S., Gheorghe, M., Baranašić, D., Santana-Garcia, W., Tan, G., Chèneby, J., Ballester, B., Parcy, F., Sandelin, A., Lenhard, B., Wasserman, W.W., Mathelier, A., 2020. JASPAR 2020: update of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res* 48, D87–D92. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1001>
- Fowler, T.J., Bernhardt, C., Tierney, M.L., 1999. Characterization and expression of four proline-rich cell wall protein genes in *Arabidopsis* encoding two distinct subsets of multiple domain proteins. *Plant Physiol.* 121, 1081–1092. <https://doi.org/10.1104/pp.121.4.1081>
- Fukaki, H., Tasaka, M., 1999. Gravity perception and gravitropic response of inflorescence stems in *Arabidopsis thaliana*. *Advances in Space Research, Life Sciences: Microgravity Research II* 24, 763–770. [https://doi.org/10.1016/S0273-1177\(99\)00410-X](https://doi.org/10.1016/S0273-1177(99)00410-X)
- Gautier, L., Cope, L., Bolstad, B.M., Irizarry, R.A., 2004. affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* 20, 307–315. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg405>
- Goicoechea, M., Lacombe, E., Legay, S., Mihaljevic, S., Rech, P., Jauneau, A., Lapierre, C., Pollet, B., Verhaegen, D., Chaubet-Gigot, N., Grima-Pettenati, J., 2005. EgMYB2, a new transcriptional activator from *Eucalyptus xylem*, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis. *The Plant Journal* 43, 553–567. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02480.x>
- Göllner, E.M., Gramann, J.C., Classen, B., 2013. Antibodies against Yariv's reagent for immunolocalization of arabinogalactan-proteins in aerial parts of *Echinacea purpurea*. *Planta Med.* 79, 175–180. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1328079>
- Gomez, R., Gonzalez, J., Herrera, R., Ramos, P., 2018. MYB Transcription Factors and a Putative Flavonoid Transporter ABCC-Like are Differentially Expressed in Radiata Pine Seedlings Exposed to Inclination. *J Plant Growth Regul* 37, 64–75. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9707-5>
- Goodstein, D.M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R.D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., Rokhsar, D.S., 2012. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res* 40, D1178–D1186. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr944>
- Gramzow, L., Ritz, M.S., Theissen, G., 2010. On the origin of MADS-domain transcription factors. *Trends Genet* 26, 149–153. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.01.004>

- Grant, E.H., Fujino, T., Beers, E.P., Brunner, A.M., 2010. Characterization of NAC domain transcription factors implicated in control of vascular cell differentiation in *Arabidopsis* and *Populus*. *Planta* 232, 337–352. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1181-2>
- Groover, A., 2016. Gravitropisms and reaction woods of forest trees – evolution, functions and mechanisms. *New Phytol* 211, 790–802. <https://doi.org/10.1111/nph.13968>
- Grübler, B., Merendino, L., Twardziok, S.O., Mininno, M., Alloreant, G., Chevalier, F., Liebers, M., Blanvillain, R., Mayer, K.F.X., Lerbs-Mache, S., Ravel, S., Pfannschmidt, T., 2017. Light and Plastid Signals Regulate Different Sets of Genes in the Albino Mutant Pap7-11[OPEN]. *Plant Physiol* 175, 1203–1219. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00982>
- Guerriero, G., Mangeot-Peter, L., Legay, S., Behr, M., Lutts, S., Siddiqui, K.S., Hausman, J.-F., 2017. Identification of fasciclin-like arabinogalactan proteins in textile hemp (*Cannabis sativa* L.): in silico analyses and gene expression patterns in different tissues. *BMC Genomics* 18. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3970-5>
- Guo, D., Zhang, J., Wang, X., Han, X., Wei, B., Wang, J., Li, B., Yu, H., Huang, Q., Gu, H., Qu, L.-J., Qin, G., 2015. The WRKY Transcription Factor WRKY71/EXB1 Controls Shoot Branching by Transcriptionally Regulating RAX Genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 27, 3112–3127. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00829>
- Hall, H.C., Cheung, J., Ellis, B.E., 2013. Immunoprofiling reveals unique cell-specific patterns of wall epitopes in the expanding *Arabidopsis* stem. *The Plant Journal* 74, 134–147. <https://doi.org/10.1111/tpj.12111>
- Happ, K., Classen, B., 2019. Arabinogalactan-Proteins from the Liverwort *Marchantia polymorpha* L., a Member of a Basal Land Plant Lineage, Are Structurally Different to Those of Angiosperms. *Plants (Basel)* 8. <https://doi.org/10.3390/plants8110460>
- He, J., Zhao, H., Cheng, Z., Ke, Y., Liu, J., Ma, H., 2019. Evolution Analysis of the Fasciclin-Like Arabinogalactan Proteins in Plants Shows Variable Fasciclin-AGP Domain Constitutions. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20081945>
- Henschel, K., Kofuji, R., Hasebe, M., Saedler, H., Münster, T., Theißen, G., 2002. Two Ancient Classes of MIKC-type MADS-box Genes are Present in the Moss *Physcomitrella patens*. *Molecular Biology and Evolution* 19, 801–814. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004137>
- Hernández Sánchez, A.M., Capataz Tafur, J., Rodríguez-Monroy, M., Sepúlveda-Jiménez, G., 2009. Arabinogalactan proteins in plant cell cultures. *Interciencia* 34, 170–176.
- Herrera, R., Krier, C., Lalanne, C., Ba, E.H.M., Stokes, A., Salin, F., Fourcaud, T., Claverol, S., Plomion, C., 2010. (Not) Keeping the stem straight: a proteomic analysis of maritime pine seedlings undergoing phototropism and gravitropism. *BMC Plant Biol* 10, 217–217. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-217>
- Hong, F., Breitling, R., McEntee, C.W., Wittner, B.S., Nemhauser, J.L., Chory, J., 2006. RankProd: a bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis. *Bioinformatics* 22, 2825–2827. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl476>
- Honma, T., Goto, K., 2001. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into

floral organs. *Nature* 409, 525–529. <https://doi.org/10.1038/35054083>

Hussey, S.G., Mizrachi, E., Spokevicius, A.V., Bossinger, G., Berger, D.K., Myburg, A.A., 2011. SND2, a NAC transcription factor gene, regulates genes involved in secondary cell wall development in *Arabidopsis* fibres and increases fibre cell area in *Eucalyptus*. *BMC Plant Biology* 11, 173. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-173>

Immink, R.G.H., Kaufmann, K., Angenent, G.C., 2010. The ‘ABC’ of MADS domain protein behaviour and interactions. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.10.004>

Instituto Forestal, 2018. Exportaciones Forestales. INFOR 1–44.

Izarray, R.A., Bolstad, B.M., Collin, F., Cope, L.M., Hobbs, B., Speed, T.P., 2003. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 31, e15.

İşkil, R., Surgun-Acar, Y., İşkil, R., Surgun-Acar, Y., 2018. Expression analysis of cell wall assembly and remodelling-related genes in *Arabidopsis* roots subjected to boron stress and brassinosteroid at different developmental stages. *Acta Botanica Brasilica* 32, 546–554. <https://doi.org/10.1590/0102-33062018abb0023>

ITO, S., SUZUKI, Y., MIYAMOTO, K., UEDA, J., YAMAGUCHI, I., 2005. AtFLA11, a Fasciclin-Like Arabinogalactan-Protein, Specifically Localized in Sclerenchyma Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 69, 1963–1969. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.1963>

Jaakola, L., Poole, M., Jones, M.O., Kämäräinen-Karppinen, T., Koskimäki, J.J., Hohtola, A., Häggman, H., Fraser, P.D., Manning, K., King, G.J., Thomson, H., Seymour, G.B., 2010. A SQUAMOSA MADS Box Gene Involved in the Regulation of Anthocyanin Accumulation in Bilberry Fruits. *Plant Physiology* 153, 1619–1629. <https://doi.org/10.1104/pp.110.158279>

Jiang, Y., Peng, J., Zhang, Z., Lin, Shoukai, Lin, Shunquan, Yang, X., 2019. The Role of EjSVPs in Flower Initiation in *Eriobotrya japonica*. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20235933>

Jiménez, S., Lawton-Rauh, A.L., Reighard, G.L., Abbott, A.G., Bielenberg, D.G., 2009. Phylogenetic analysis and molecular evolution of the dormancy associated MADS-box genes from peach. *BMC Plant Biol* 9, 81–81. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-81>

Johnson, K.L., Cassin, A.M., Lonsdale, A., Wong, G.K.-S., Soltis, D.E., Miles, N.W., Melkonian, M., Melkonian, B., Deyholos, M.K., Leebens-Mack, J., Rothfels, C.J., Stevenson, D.W., Graham, S.W., Wang, X., Wu, S., Pires, J.C., Edger, P.P., Carpenter, E.J., Bacic, A., Doblin, M.S., Schultz, C.J., 2017. Insights into the Evolution of Hydroxyproline-Rich Glycoproteins from 1000 Plant Transcriptomes1[OPEN]. *Plant Physiol* 174, 904–921. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00295>

Johnson, K.L., Jones, B.J., Bacic, A., Schultz, C.J., 2003. The Fasciclin-Like Arabinogalactan Proteins of *Arabidopsis*. A Multigene Family of Putative Cell Adhesion Molecules. *Plant Physiol* 133, 1911–1925. <https://doi.org/10.1104/pp.103.031237>

Jost, R., Pharmawati, M., Lapis-Gaza, H.R., Rossig, C., Berkowitz, O., Lambers, H., Finnegan, P.M., 2015. Differentiating phosphate-dependent and phosphate-independent systemic phosphate-starvation response networks in *Arabidopsis thaliana* through the application of phosphite. *Journal of Experimental Botany* 66, 2501–2514. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv025>

- Kaku, T., Serada, S., Baba, K., Tanaka, F., Hayashi, T., 2009. Proteomic analysis of the G-layer in poplar tension wood. *J Wood Sci* 55, 250–257. <https://doi.org/10.1007/s10086-009-1032-6>
- Kalve, S., De Vos, D., Beemster, G.T.S., 2014. Leaf development: a cellular perspective. *Front. Plant Sci.* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00362>
- Karthikeyan, A.S., Ballachanda, D.N., Raghothama, K.G., 2009. Promoter deletion analysis elucidates the role of cis elements and 5'UTR intron in spatiotemporal regulation of AtPht1;4 expression in Arabidopsis. *Physiologia Plantarum* 136, 10–18. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01207.x>
- Kaufmann, K., Melzer, R., Theißen, G., 2005. MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. *Gene, Structural Approaches to Sequence Evolution: Molecules, Networks, Populations – Part 2* 347, 183–198. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.12.014>
- Kawakatsu, T., Huang, S.C., Jupe, F., Sasaki, E., Schmitz, R.J., Urich, M.A., Castanon, R., Nery, J.R., Barragan, C., He, Y., Chen, H., Dubin, M., Lee, Cheng-Ruei, Wang, C., Bemm, F., Becker, C., O'Neil, R., O'Malley, R.C., Quarless, D.X., Alonso-Blanco, C., Andrade, J., Becker, C., Bemm, F., Bergelson, J., Borgwardt, K., Chae, E., Dezwaan, T., Ding, W., Ecker, J.R., Expósito-Alonso, M., Farlow, A., Fitz, J., Gan, X., Grimm, D.G., Hancock, A., Henz, S.R., Holm, S., Horton, M., Jarsulic, M., Kerstetter, R.A., Korte, A., Korte, P., Lanz, C., Lee, Chen-Ruei, Meng, D., Michael, T.P., Mott, R., Mulyati, N.W., Nägele, T., Nagler, M., Nizhynska, V., Nordborg, M., Novikova, P., Picó, F.X., Platzer, A., Rabanal, F.A., Rodriguez, A., Rowan, B.A., Salomé, P.A., Schmid, K., Schmitz, R.J., Seren, Ü., Sperone, F.G., Sudkamp, M., Svardal, H., Tanzer, M.M., Todd, D., Volchenboum, S.L., Wang, C., Wang, G., Wang, X., Weckwerth, W., Weigel, D., Zhou, X., Schork, N.J., Weigel, D., Nordborg, M., Ecker, J.R., 2016. Epigenomic Diversity in a Global Collection of Arabidopsis thaliana Accessions. *Cell* 166, 492–505. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.044>
- Kawaoka, A., Ebinuma, H., 2001. Transcriptional control of lignin biosynthesis by tobacco LIM protein. *Phytochemistry* 57, 1149–1157. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00054-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00054-1)
- Kawaoka, A., Nanto, K., Ishii, K., Ebinuma, H., 2006. Reduction of Lignin Content by Suppression of Expression of the LIM Domain Transcription Factor in Eucalyptus camaldulensis. *Silvae Genetica* 55, 269–277. <https://doi.org/10.1515/sg-2006-0035>
- Kikis, E.A., Khanna, R., Quail, P.H., 2005. ELF4 is a phytochrome-regulated component of a negative-feedback loop involving the central oscillator components CCA1 and LHY. *The Plant Journal* 44, 300–313. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02531.x>
- Kim, K.-C., Lai, Z., Fan, B., Chen, Z., 2008. Arabidopsis WRKY38 and WRKY62 Transcription Factors Interact with Histone Deacetylase 19 in Basal Defense. *Plant Cell* 20, 2357–2371. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.055566>
- Kim, S.-H., Hamada, T., Otani, M., Shimada, T., 2005. Isolation and characterization of MADS box genes possibly related to root development in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L. Lam.). *J. Plant Biol.* 48, 387–393. <https://doi.org/10.1007/BF03030580>
- Kim, S.H., Mizuno, K., Fujimura, T., 2002. Isolation of MADS-box genes from sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) expressed specifically in vegetative tissues. *Plant Cell Physiol* 43, 314–322. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf043>

- Kim, Y.-M., Kim, S., Koo, N., Shin, A.-Y., Yeom, S.-I., Seo, E., Park, S.-J., Kang, W.-H., Kim, Myung-Shin, Park, J., Jang, I., Kim, P.-G., Byeon, I., Kim, Min-Seo, Choi, J., Ko, G., Hwang, J., Yang, T.-J., Choi, S.-B., Lee, J.M., Lim, K.-B., Lee, J., Choi, I.-Y., Park, B.-S., Kwon, S.-Y., Choi, D., Kim, R.W., 2017. Genome analysis of *Hibiscus syriacus* provides insights of polyploidization and indeterminate flowering in woody plants. *DNA Res* 24, 71–80. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsw049>
- Kleinboelting, N., Huep, G., Appelhagen, I., Viehoveer, P., Li, Y., Weisshaar, B., 2015. The Structural Features of Thousands of T-DNA Insertion Sites Are Consistent with a Double-Strand Break Repair-Based Insertion Mechanism. *Molecular Plant* 8, 1651–1664. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.08.011>
- Knoch, E., Dilokpimol, A., Geshi, N., 2014. Arabinogalactan proteins: focus on carbohydrate active enzymes. *Front Plant Sci* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00198>
- Koziol, J.A., 2010. The rank product method with two samples. *FEBS Lett* 584, 4481–4484. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.10.012>
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305, 567–580. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>
- Krysan, P.J., Young, J.C., Sussman, M.R., 1999. T-DNA as an Insertional Mutagen in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 11, 2283–2290. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.12.2283>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lafarguette, F., Leplé, J.-C., Déjardin, A., Laurans, F., Costa, G., Lesage-Descauses, M.-C., Pilate, G., 2004. Poplar genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are highly expressed in tension wood. *New Phytologist* 164, 107–121. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01175.x>
- Lamara, M., Raherison, E., Lenz, P., Beaulieu, J., Bousquet, J., MacKay, J., 2016. Genetic architecture of wood properties based on association analysis and co-expression networks in white spruce. *New Phytologist* 210, 240–255. <https://doi.org/10.1111/nph.13762>
- Lamport, D.T.A., Varnai, P., Seal, C.E., 2014. Back to the future with the AGP–Ca²⁺ flux capacitor. *Ann Bot* 114, 1069–1085. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu161>
- Legay, S., Sivadon, P., Blervacq, A.-S., Pavy, N., Baghdady, A., Tremblay, L., Levasseur, C., Ladouce, N., Lapierre, C., Séguin, A., Hawkins, S., Mackay, J., Grima-Pettenati, J., 2010. EgMYB1, an R2R3 MYB transcription factor from eucalyptus negatively regulates secondary cell wall formation in *Arabidopsis* and poplar. *New Phytol* 188, 774–786. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03432.x>
- Li, E., Bhargava, A., Qiang, W., Friedmann, M.C., Forneris, N., Savidge, R.A., Johnson, L.A., Mansfield, S.D., Ellis, B.E., Douglas, C.J., 2012. The Class II KNOX gene KNAT7 negatively regulates secondary wall formation in *Arabidopsis* and is functionally conserved in *Populus*. *New Phytol* 194, 102–115. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.04016.x>
- Li, J., Yu, M., Geng, L.-L., Zhao, J., 2010. The fasciclin-like arabinogalactan protein gene, FLA3, is

involved in microspore development of Arabidopsis. *Plant J.* 64, 482–497.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04344.x>

Li, S., Zhang, Y., Ding, C., Gao, X., Wang, R., Mo, W., Lv, F., Wang, S., Liu, L., Tang, Z., Tian, H., Zhang, J., Zhang, B., Huang, Q., Lu, M., Wuyun, T.-N., Hu, Z., Xia, Y., Su, X., 2019. Proline-rich protein gene PdPRP regulates secondary wall formation in poplar. *J. Plant Physiol.* 233, 58–72.

<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.12.007>

Li, X., Wu, H.X., Dillon, S.K., Southerton, S.G., 2009a. Generation and analysis of expressed sequence tags from six developing xylem libraries in *Pinus radiata* D. Don. *BMC Genomics* 10, 41.

<https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-41>

Li, X., Wu, H.X., Dillon, S.K., Southerton, S.G., 2009b. Generation and analysis of expressed sequence tags from six developing xylem libraries in *Pinus radiata* D. Don. *BMC Genomics* 10, 41.

<https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-41>

Li, X., Wu, H.X., Dillon, S.K., Southerton, S.G., 2009c. Generation and analysis of expressed sequence tags from six developing xylem libraries in *Pinus radiata* D. Don. *BMC Genomics* 10, 41.

<https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-41>

Li, X., Wu, H.X., Southerton, S.G., 2012. Identification of putative candidate genes for juvenile wood density in *Pinus radiata*. *Tree Physiol* 32, 1046–1057. <https://doi.org/10.1093/treephys/tps060>

Li, X., Yang, X., Wu, H.X., 2013. Transcriptome profiling of radiata pine branches reveals new insights into reaction wood formation with implications in plant gravitropism. *BMC Genomics* 14.

<https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-768>

Liljegren, S.J., Ditta, G.S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J.L., Yanofsky, M.F., 2000. SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in Arabidopsis. *Nature* 404, 766–770.

<https://doi.org/10.1038/35008089>

Liu, C., Chen, H., Er, H.L., Soo, H.M., Kumar, P.P., Han, J., Liou, Y.C., Yu, H., 2008. Direct interaction of AGL24 and SOC1 integrates flowering signals in Arabidopsis, in: *Development*.

<https://doi.org/10.1242/dev.020255>

Liu, L., Free, S.J., 2016. Characterization of the *Sclerotinia sclerotiorum* cell wall proteome. *Mol Plant Pathol* 17, 985–995. <https://doi.org/10.1111/mpp.12352>

Liu, Y., Wei, M., Hou, C., Lu, T., Liu, L., Wei, H., Cheng, Y., Wei, Z., 2017. Functional Characterization of *Populus PsnSHN2* in Coordinated Regulation of Secondary Wall Components in Tobacco. *Scientific Reports* 7, 42. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00093-z>

Lomagno, J., Rozas, C., 2001. DETERMINACIÓN DE LA MADERA DE COMPRESIÓN EN *Pinus radiata* D.DON. *Maderas. Ciencia y tecnología* 3, 63–67. <https://doi.org/10.4067/S0718-221X2001000100007>

Loopstra, C.A., Puryear, J.D., No, E.-G., 2000. Purification and cloning of an arabinogalactan-protein from xylem of loblolly pine. *Planta* 210, 686–689. <https://doi.org/10.1007/s004250050061>

Ma, H., Zhao, J., 2010. Genome-wide identification, classification, and expression analysis of the arabinogalactan protein gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot* 61, 2647–2668.

<https://doi.org/10.1093/jxb/erq104>

- Ma, Y., Yan, C., Li, H., Wu, W., Liu, Y., Wang, Y., Chen, Q., Ma, H., 2017. Bioinformatics Prediction and Evolution Analysis of Arabinogalactan Proteins in the Plant Kingdom. *Front. Plant Sci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00066>
- MacMillan, C.P., Mansfield, S.D., Stachurski, Z.H., Evans, R., Southerton, S.G., 2010. Fasciclin-like arabinogalactan proteins: specialization for stem biomechanics and cell wall architecture in *Arabidopsis* and *Eucalyptus*. *Plant J.* 62, 689–703. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04181.x>
- MacMillan, C.P., Taylor, L., Bi, Y., Southerton, S.G., Evans, R., Spokevicius, A., 2015. The fasciclin-like arabinogalactan protein family of *Eucalyptus grandis* contains members that impact wood biology and biomechanics. *New Phytologist* 206, 1314–1327. <https://doi.org/10.1111/nph.13320>
- Macquet, A., Ralet, M.-C., Kronenberger, J., Marion-Poll, A., North, H.M., 2007. In situ, chemical and macromolecular study of the composition of *Arabidopsis thaliana* seed coat mucilage. *Plant Cell Physiol.* 48, 984–999. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm068>
- Madduri, K., Waldron, C., Merlo, D.J., 2001. Rhamnose biosynthesis pathway supplies precursors for primary and secondary metabolism in *Saccharopolyspora spinosa*. *J Bacteriol* 183, 5632–5638. <https://doi.org/10.1128/JB.183.19.5632-5638.2001>
- Makarova, E.N., Shakhmatov, E.G., Udoratina, E.V., Kutchin, A.V., 2015. Structural and chemical characteristics of pectins, arabinogalactans, and arabinogalactan proteins from conifers. *Russ Chem Bull* 64, 1302–1318. <https://doi.org/10.1007/s11172-015-1011-6>
- Manning, K., Tör, M., Poole, M., Hong, Y., Thompson, A.J., King, G.J., Giovannoni, J.J., Seymour, G.B., 2006. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nat Genet* 38, 948–952. <https://doi.org/10.1038/ng1841>
- Marè, C., Mazzucotelli, E., Crosatti, C., Francia, E., Stanca, A.M., Cattivelli, L., 2004. Hv-WRKY38: a new transcription factor involved in cold- and drought-response in barley. *Plant Mol. Biol.* 55, 399–416. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-0906-7>
- Marta Curto Prieto, 2003. FUNCIÓN DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL DE TIPOMADS-BOX, AGAMOUS-LIKE 67 (AGL67), EN LASEÑALIZACIÓN HORMONAL DURANTE LA GERMINACIÓN DESEMILLAS DE *Arabidopsis thaliana*. de Salamanca, España.
- Marzec, M., Szarejko, I., 2014. Arabinogalactan proteins are involved in root hair development in barley. *Journal of Experimental Botany* 66. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru475>
- Mateluna, P., Valenzuela-Riffo, F., Morales-Quintana, L., Herrera, R., 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. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.03.005>
- Maul, R.W., Cao, Z., Venkataraman, L., Giorgetti, C.A., Press, J.L., Denizot, Y., Du, H., Sen, R., Gearhart, P.J., 2014. Spt5 accumulation at variable genes distinguishes somatic hypermutation in germinal center B cells from ex vivo-activated cells. *J. Exp. Med.* 211, 2297–2306. <https://doi.org/10.1084/jem.20131512>
- McCarthy, R.L., Zhong, R., Fowler, S., Lyskowski, D., Piyasena, H., Carleton, K., Spicer, C., Ye, Z.-H., 2010. The poplar MYB transcription factors, PtrMYB3 and PtrMYB20, are involved in the

regulation of secondary wall biosynthesis. *Plant Cell Physiol* 51, 1084–1090.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcq064>

Mergner, J., Frejno, M., List, M., Papacek, M., Chen, X., Chaudhary, A., Samaras, P., Richter, S., Shikata, H., Messerer, M., Lang, D., Altmann, S., Cyprys, P., Zolg, D.P., Mathieson, T., Bantscheff, M., Hazarika, R.R., Schmidt, T., Dawid, C., Dunkel, A., Hofmann, T., Sprunck, S., Falter-Braun, P., Johannes, F., Mayer, K.F.X., Jürgens, G., Wilhelm, M., Baumbach, J., Grill, E., Schneitz, K., Schwechheimer, C., Kuster, B., 2020. Mass-spectrometry-based draft of the *Arabidopsis* proteome. *Nature* 579, 409–414. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2094-2>

Merkouropoulos, G., Barnett, D.C., Shirsat, A.H., 1999. The *Arabidopsis* extensin gene is developmentally regulated, is induced by wounding, methyl jasmonate, abscisic and salicylic acid, and codes for a protein with unusual motifs. *Planta* 208, 212–219. <https://doi.org/10.1007/s004250050552>

Messenguy, F., Dubois, E., 2003. Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. *Gene* 316, 1–21. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(03\)00747-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(03)00747-9)

Minic, Z., Jamet, E., San-Clemente, H., Pelletier, S., Renou, J.-P., Rihouey, C., Okinyo, D.P., Proux, C., Lerouge, P., Jouanin, L., 2009. Transcriptomic analysis of *Arabidopsis* developing stems: a close-up on cell wall genes. *BMC Plant Biology* 9, 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-6>

Mohammadinejad, R., Kumar, A., Ranjbar-Mohammadi, M., Ashrafizadeh, M., Han, S.S., Khang, G., Roveimiab, Z., 2020. Recent Advances in Natural Gum-Based Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine: A Review. *Polymers* 12, 176. <https://doi.org/10.3390/polym12010176>

Mondal, S.K., Roy, S., 2018. Genome-wide sequential, evolutionary, organizational and expression analyses of phenylpropanoid biosynthesis associated MYB domain transcription factors in *Arabidopsis*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 36, 1577–1601.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1329099>

Motose, H., Sugiyama, M., Fukuda, H., 2004. A proteoglycan mediates inductive interaction during plant vascular development. *Nature* 429, 873–878. <https://doi.org/10.1038/nature02613>

Mouradov, A., Glassick, T., Hamdorf, B., Teasdale, R.D., 1999a. Molecular control of early cone development in *Pinus radiata*. *Protoplasma* 208, 3–12. <https://doi.org/10.1007/BF01279069>

Mouradov, A., Glassick, T., Hamdorf, B., Teasdale, R.D., 1999b. Molecular control of early cone development in *Pinus radiata*. *Protoplasma* 208, 3–12. <https://doi.org/10.1007/BF01279069>

Mouradov, A., Glassick, T.V., Hamdorf, B.A., Murphy, L.C., Marla, S.S., Yang, Y., Teasdale, R.D., 1998a. Family of MADS-Box Genes Expressed Early in Male and Female Reproductive Structures of Monterey Pine. *Plant Physiol.* 117, 55. <https://doi.org/10.1104/pp.117.1.55>

Mouradov, A., Glassick, T.V., Hamdorf, B.A., Murphy, L.C., Marla, S.S., Yang, Y., Teasdale, R.D., 1998b. Family of MADS-Box Genes Expressed Early in Male and Female Reproductive Structures of Monterey Pine. *Plant Physiology* 117, 55–62. <https://doi.org/10.1104/pp.117.1.55>

Mouradov, A., Hamdorf, B., Teasdale, R.D., Kim, J.T., Winter, K.U., Theissen, G., 1999c. A DEF/GLO-like MADS-box gene from a gymnosperm: *Pinus radiata* contains an ortholog of angiosperm B class floral homeotic genes. *Dev Genet* 25, 245–252.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6408\(1999\)25:3<245::AID-DVG7>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6408(1999)25:3<245::AID-DVG7>3.0.CO;2-N)

Naranjo, B., Diaz-Espejo, A., Lindahl, M., Cejudo, F.J., 2016. Type-f thioredoxins have a role in the short-term activation of carbon metabolism and their loss affects growth under short-day conditions in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 67, 1951–1964. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw017>

Nesi, N., Jond, C., Debeaujon, I., Caboche, M., Lepiniec, L., 2001. The *Arabidopsis* TT2 Gene Encodes an R2R3 MYB Domain Protein That Acts as a Key Determinant for Proanthocyanidin Accumulation in Developing Seed. *The Plant Cell* 13, 2099–2114. <https://doi.org/10.1105/TPC.010098>

Niu, S.-H., Li, Z.-X., Yuan, H.-W., Chen, X.-Y., Li, Y., Li, W., 2013. Transcriptome characterisation of *Pinus tabulaeformis* and evolution of genes in the *Pinus* phylogeny. *BMC Genomics* 14, 263. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-263>

Nothnagel, E.A., 1997. Proteoglycans and related components in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* 174, 195–291. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)62118-x](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)62118-x)

Ohtani, M., Nishikubo, N., Xu, B., Yamaguchi, M., Mitsuda, N., Goué, N., Shi, F., Ohme-Takagi, M., Demura, T., 2011. A NAC domain protein family contributing to the regulation of wood formation in poplar. *Plant J* 67, 499–512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04614.x>

O'Malley, R.C., Barragan, C.C., Ecker, J.R., 2015. A User's Guide to the *Arabidopsis* T-DNA Insertion Mutant Collections, in: Alonso, J.M., Stepanova, A.N. (Eds.), *Plant Functional Genomics: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*. Springer, New York, NY, pp. 323–342. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2444-8_16

Orbović, V., Göllner, E.M., Soria, P., 2013. The effect of arabinogalactan proteins on regeneration potential of juvenile citrus explants used for genetic transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Physiol Plant* 35, 1409–1419. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1179-4>

Palacio-López, K., Tinaz, B., Holzinger, A., Domozych, D.S., 2019a. Arabinogalactan Proteins and the Extracellular Matrix of Charophytes: A Sticky Business. *Front Plant Sci* 10, 447. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00447>

Pascual, M.B., Llebrés, M.-T., Craven-Bartle, B., Cañas, R.A., Cánovas, F.M., Ávila, C., 2018. PpNAC1, a main regulator of phenylalanine biosynthesis and utilization in maritime pine. *Plant Biotechnol J* 16, 1094–1104. <https://doi.org/10.1111/pbi.12854>

Patzlaff, A., McInnis, S., Courtenay, A., Surman, C., Newman, L.J., Smith, C., Bevan, M.W., Mansfield, S., Whetten, R.W., Sederoff, R.R., Campbell, M.M., 2003. Characterisation of a pine MYB that regulates lignification. *The Plant Journal* 36, 743–754. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01916.x>

Pavy, N., Boyle, B., Nelson, C., Paule, C., Giguère, I., Caron, S., Parsons, L.S., Dallaire, N., Bedon, F., Bérubé, H., Cooke, J., Mackay, J., 2008. Identification of conserved core xylem gene sets: conifer cDNA microarray development, transcript profiling and computational analyses. *New Phytologist* 180, 766–786. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02615.x>

Pérez-Almeida, I., 2006. LAS β -GALACTOSIDASAS Y LA DINÁMICA DE LA PARED CELULAR 31, 10.

Pesquet, E., Korolev, A.V., Calder, G., Lloyd, C.W., 2010. The microtubule-associated protein

AtMAP70-5 regulates secondary wall patterning in Arabidopsis wood cells. *Curr. Biol.* 20, 744–749. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.02.057>

Peters, C., Li, M., Narasimhan, R., Roth, M., Welti, R., Wang, X., 2010. Nonspecific phospholipase C NPC4 promotes responses to abscisic acid and tolerance to hyperosmotic stress in Arabidopsis. *Plant Cell* 22, 2642–2659. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.071720>

Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8, 785–786. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1701>

Pradhan Mitra, P., Loqué, D., 2014. Histochemical staining of Arabidopsis thaliana secondary cell wall elements. *J Vis Exp.* <https://doi.org/10.3791/51381>

Preston Campbell, J., Mulcrone, P., Masood, S.K., Karolak, M., Merkel, A., Hebron, K., Zijlstra, A., Sterling, J., Eleftheriou, F., 2015. TRIZol and Alu qPCR-based quantification of metastatic seeding within the skeleton. *Sci Rep* 5. <https://doi.org/10.1038/srep12635>

Ramos, P., Herrera, R., 2013. Anatomical changes of xylem cells in stem of Pinus radiata seedlings exposed to inclination and ethylene. *Biol Plant* 57, 525–530. <https://doi.org/10.1007/s10535-013-0321-5>

Ramos, P., Le Provost, G., Gantz, C., Plomion, C., Herrera, R., 2012a. Transcriptional analysis of differentially expressed genes in response to stem inclination in young seedlings of pine. *Plant Biology* 14, 923–933. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00572.x>

Ramos, P., Provost, G.L., Gantz, C., Plomion, C., Herrera, R., 2012b. Transcriptional analysis of differentially expressed genes in response to stem inclination in young seedlings of pine. *Plant Biology* 14, 923–933. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00572.x>

Ramos, Patricio, Valenzuela, C., le Provost, G., Plomion, C., Gantz, C., Moya-León, M.A., Herrera, R., 2012. ACC Oxidase and ACC Synthase Expression Profiles after Leaning of Young Radiata (P. radiata D. Don) and Maritime Pine (P. pinaster Ait.) Seedlings. *J Plant Growth Regul* 31, 382–391. <https://doi.org/10.1007/s00344-011-9248-2>

Riechmann, J.L., Krizek, B.A., Meyerowitz, E.M., 1996. Dimerization specificity of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA, and AGAMOUS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4793–4798.

Robert, X., Gouet, P., 2014. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.* 42, W320–324. <https://doi.org/10.1093/nar/gku316>

Rogers, L.A., Dubos, C., Surman, C., Willment, J., Cullis, I.F., Mansfield, S.D., Campbell, M.M., 2005. Comparison of lignin deposition in three ectopic lignification mutants. *New Phytologist* 168, 123–140. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01496.x>

Rutledge, R., Regan, S., Nicolas, O., Fobert, P., Côté, C., Bosnich, W., Kauffeldt, C., Sunohara, G., Séguin, A., 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. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00250.x>

Salazar, M.M., Nascimento, L.C., Camargo, E.L.O., Gonçalves, D.C., Neto, J.L., Marques, W.L.,

- Teixeira, P.J.P.L., Mieczkowski, P., Mondego, J.M.C., Carazzolle, M.F., Deckmann, A.C., Pereira, G.A.G., 2013. Xylem transcription profiles indicate potential metabolic responses for economically relevant characteristics of Eucalyptus species. *BMC Genomics* 14, 201. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-201>
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9, 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Seifert, G.J., 2018. Fascinating Fasciclins: A Surprisingly Widespread Family of Proteins that Mediate Interactions between the Cell Exterior and the Cell Surface. *Int J Mol Sci* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19061628>
- Sh, K., K, M., T, F., 2002. Isolation of MADS-box genes from sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) expressed specifically in vegetative tissues. *Plant Cell Physiol* 43, 314–322. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf043>
- Shore, P., Sharrocks, A.D., 1995. The MADS-box family of transcription factors. *Eur J Biochem* 229, 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20430.x>
- Showalter, A.M., 2001. Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1399–1417. <https://doi.org/10.1007/PL00000784>
- Showalter, A.M., 1993. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5, 9–23. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.1.9>
- Showalter, A.M., Keppler, B., Lichtenberg, J., Gu, D., Welch, L.R., 2010. A bioinformatics approach to the identification, classification, and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins. *Plant Physiol.* 153, 485–513. <https://doi.org/10.1104/pp.110.156554>
- Showalter, A.M., Keppler, B.D., Liu, X., Lichtenberg, J., Welch, L.R., 2016. Bioinformatic Identification and Analysis of Hydroxyproline-Rich Glycoproteins in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biol.* 16, 229. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0912-3>
- Shultz, R.W., Lee, T.-J., Allen, G.C., Thompson, W.F., Hanley-Bowdoin, L., 2009. Dynamic localization of the DNA replication proteins MCM5 and MCM7 in plants. *Plant Physiol* 150, 658–669. <https://doi.org/10.1104/pp.109.136614>
- Silva, C.S., Puranik, S., Round, A., Brennich, M., Jourdain, A., Parcy, F., Hugouvieux, V., Zubieta, C., 2016a. 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. *Front Plant Sci* 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01193>
- Silva, C.S., Puranik, S., Round, A., Brennich, M., Jourdain, A., Parcy, F., Hugouvieux, V., Zubieta, C., 2016b. 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. *Front Plant Sci* 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01193>
- Smaczniak, C., Immink, R.G.H., Angenent, G.C., Kaufmann, K., 2012. Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development* 139, 3081–3098. <https://doi.org/10.1242/dev.074674>
- Soler, M., Camargo, E.L.O., Carocha, V., Cassan-Wang, H., Clemente, H.S., Savelli, B., Hefer, C.A.,

- Paiva, J.A.P., Myburg, A.A., Grima-Pettenati, J., 2015. The *Eucalyptus grandis* R2R3-MYB transcription factor family: evidence for woody growth-related evolution and function. *New Phytologist* 206, 1364–1377. <https://doi.org/10.1111/nph.13039>
- Stanke, M., Steinkamp, R., Waack, S., Morgenstern, B., 2004. AUGUSTUS: a web server for gene finding in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 32, W309–312. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh379>
- Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Roth, A., Santos, A., Tsafou, K.P., Kuhn, M., Bork, P., Jensen, L.J., von Mering, C., 2015. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* 43, D447–452. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1003>
- Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N.T., Morris, J.H., Bork, P., Jensen, L.J., Mering, C. von, 2019. STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res* 47, D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
- Tan, L., Showalter, A.M., Egelund, J., Hernandez-Sanchez, A., Doblin, M.S., Bacic, A.F., 2012. Arabinogalactan-proteins and the research challenges for these enigmatic plant cell surface proteoglycans. *Front. Plant Sci.* 3. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00140>
- Tandre, K., Svenson, M., Svensson, M.E., Engström, P., 1998. Conservation of gene structure and activity in the regulation of reproductive organ development of conifers and angiosperms. *Plant J* 15, 615–623. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00236.x>
- Tang, X., Zhuang, Y., Qi, G., Wang, D., Liu, H., Wang, K., Chai, G., Zhou, G., 2015. Poplar PdMYB221 is involved in the direct and indirect regulation of secondary wall biosynthesis during wood formation. *Scientific Reports* 5, 12240. <https://doi.org/10.1038/srep12240>
- Teixeira, P.J.P.L., Thomazella, D.P. de T., Reis, O., Prado, P.F.V. do, Rio, M.C.S. do, Fiorin, G.L., José, J., Costa, G.G.L., Negri, V.A., Mondego, J.M.C., Mieczkowski, P., Pereira, G.A.G., 2014. High-Resolution Transcript Profiling of the Atypical Biotrophic Interaction between *Theobroma cacao* and the Fungal Pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *The Plant Cell* 26, 4245–4269. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.130807>
- Theissen, G., Kim, J.T., Saedler, H., 1996. Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. *J. Mol. Evol.* 43, 484–516.
- Theissen, G., Saedler, H., 2001. Plant biology. Floral quartets. *Nature* 409, 469–471. <https://doi.org/10.1038/35054172>
- Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L.A., Rhee, S.Y., Stitt, M., 2004. MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J* 37, 914–939. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2004.02016.x>
- Tian, Q., Wang, X., Li, C., Lu, W., Yang, L., Jiang, Y., Luo, K., 2013. Functional Characterization of the Poplar R2R3-MYB Transcription Factor PtoMYB216 Involved in the Regulation of Lignin Biosynthesis during Wood Formation. *PLoS ONE* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076369>

Trevaskis, B., Tadege, M., Hemming, M.N., Peacock, W.J., Dennis, E.S., Sheldon, C., 2007. Short Vegetative Phase-Like MADS-Box Genes Inhibit Floral Meristem Identity in Barley. *Plant Physiology* 143, 225–235. <https://doi.org/10.1104/pp.106.090860>

Ud-Din, A., Rauf, M., Ghafoor, S., Khattak, M.N.K., Hameed, M.W., Shah, H., Jan, S., Muhammad, K., Rehman, A., I., I., 2016. Efficient use of artificial micro-RNA to downregulate the expression of genes at the post-transcriptional level in *Arabidopsis thaliana*. *Genet. Mol. Res.* 15. <https://doi.org/10.4238/gmr.15027439>

Usadel, B., Nagel, A., Thimm, O., Redestig, H., Blaesing, O.E., Palacios-Rojas, N., Selbig, J., Hannemann, J., Piques, M.C., Steinhauser, D., Scheible, W.-R., Gibon, Y., Morcuende, R., Weicht, D., Meyer, S., Stitt, M., 2005. Extension of the visualization tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, display of corresponding genes, and comparison with known responses. *Plant Physiol* 138, 1195–1204. <https://doi.org/10.1104/pp.105.060459>

Valenzuela, C., Ramos, P., Carrasco, C., Moya-Leon, M.A., 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. <https://doi.org/10.1007/s11295-014-0762-9>

Vecchio, H.A.D., Ying, S., Park, J., Knowles, V.L., Kanno, S., Tanoi, K., She, Y.-M., Plaxton, W.C., 2014. The cell wall-targeted purple acid phosphatase AtPAP25 is critical for acclimation of *Arabidopsis thaliana* to nutritional phosphorus deprivation. *The Plant Journal* 80, 569–581. <https://doi.org/10.1111/tpj.12663>

Vrebalov, J., Ruezinsky, D., Padmanabhan, V., White, R., Medrano, D., Drake, R., Schuch, W., Giovannoni, J., 2002. A MADS-Box Gene Necessary for Fruit Ripening at the Tomato Ripening-Inhibitor (Rin) Locus. *Science* 296, 343–346. <https://doi.org/10.1126/science.1068181>

Walden, A.R., Wang, D.Y., Walter, C., Gardner, R.C., 1998. A large family of TM3 MADS-box cDNAs in *Pinus radiata* includes two members with deletions of the conserved K domain. GenBank accession numbers: PrMADS4; U90345; PrMADS5; U90346; PrMADS6; U90347; PrMADS7; U90348; PrMADS8; U90349.1. *Plant Science* 138, 167–176. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00160-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00160-5)

Wang, D., Amornsiripanitch, N., Dong, X., 2006. A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathog.* 2, e123. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020123>

Wang, H., Jiang, C., Wang, C., Yang, Y., Yang, L., Gao, X., Zhang, H., 2015. Antisense expression of the fasciclin-like arabinogalactan protein FLA6 gene in *Populus* inhibits expression of its homologous genes and alters stem biomechanics and cell wall composition in transgenic trees. *J. Exp. Bot.* 66, 1291–1302. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru479>

Wang, H., Jin, Y., Wang, C., Li, B., Jiang, C., Sun, Z., Zhang, Z., Kong, F., Zhang, H., 2017. Fasciclin-like arabinogalactan proteins, PtFLAs, play important roles in GA-mediated tension wood formation in *Populus*. *Scientific Reports* 7, 6182. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06473-9>

Wang, H.-Z., Dixon, R.A., 2012. On-off switches for secondary cell wall biosynthesis. *Mol Plant* 5, 297–303. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr098>

- Weigel, R.R., Pfitzner, U.M., Gatz, C., 2005. Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates PR gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* 17, 1279–1291. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.027441>
- Wen, Y., Shatkin, A.J., 1999. Transcription elongation factor hSPT5 stimulates mRNA capping. *Genes Dev* 13, 1774–1779. <https://doi.org/10.1101/gad.13.14.1774>
- Willats, W.G.T., Marcus, S.E., Knox, J.P., 1998. Generation of a monoclonal antibody specific to (1→5)- α -l-arabinan. *Carbohydrate Research* 308, 149–152. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00070-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00070-6)
- Wu, Y., Fan, W., Li, X., Chen, H., Takáč, T., Šamajová, O., Fabrice, M.R., Xie, L., Ma, J., Šamaj, J., Xu, C., 2017. Expression and distribution of extensins and AGPs in susceptible and resistant banana cultivars in response to wounding and *Fusarium oxysporum*. *Scientific Reports* 7, 42400. <https://doi.org/10.1038/srep42400>
- Xue, H., Veit, C., Abas, L., Tryfona, T., Maresch, D., Ricardi, M.M., Estevez, J.M., Strasser, R., Seifert, G.J., 2017. Arabidopsis thaliana FLA4 functions as a glycan-stabilized soluble factor via its carboxy-proximal Fasciclin 1 domain. *Plant J* 91, 613–630. <https://doi.org/10.1111/tpj.13591>
- Yang, J., Sardar, H.S., McGovern, K.R., Zhang, Y., Showalter, A.M., 2007. A lysine-rich arabinogalactan protein in Arabidopsis is essential for plant growth and development, including cell division and expansion. *The Plant Journal* 49, 629–640. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02985.x>
- Yang, L., Zhao, X., Ran, L., Li, C., Fan, D., Luo, K., 2017. PtoMYB156 is involved in negative regulation of phenylpropanoid metabolism and secondary cell wall biosynthesis during wood formation in poplar. *Scientific Reports* 7. <https://doi.org/10.1038/srep41209>
- Yang, S.-H., Wang, H., Sathyan, P., Stasolla, C., Loopstra, C.A., 2005. Real-time RT-PCR analysis of loblolly pine (*Pinus taeda*) arabinogalactan-protein and arabinogalactan-protein-like genes. *Physiologia Plantarum* 124, 91–106. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00479.x>
- Yanhui, C., Xiaoyuan, Y., Kun, H., Meihua, L., Jigang, L., Zhaofeng, G., Zhiqiang, L., Yunfei, Z., Xiaoxiao, W., Xiaoming, Q., Yunping, S., Li, Z., Xiaohui, D., Jingchu, L., Xing-Wang, D., Zhangliang, C., Hongya, G., Li-Jia, Q., 2006. The MYB Transcription Factor Superfamily of Arabidopsis: Expression Analysis and Phylogenetic Comparison with the Rice MYB Family. *Plant Mol Biol* 60, 107–124. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-2910-y>
- Yariv, J., Lis, H., Katchalski, E., 1967. Precipitation of arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes. *Biochem J* 105, 1C-2C.
- Yates, E.A., Valdor, J.-F., Haslam, S.M., Morris, H.R., Dell, A., Mackie, W., Knox, J.P., 1996. Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiology* 6, 131–139. <https://doi.org/10.1093/glycob/6.2.131>
- Yoo, S.K., Lee, J.S., Ahn, J.H., 2006. Overexpression of AGAMOUS-LIKE 28 (AGL28) promotes flowering by upregulating expression of floral promoters within the autonomous pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 348, 929–936. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.07.121>
- Zang, L., Zheng, T., Chu, Y., Ding, C., Zhang, W., Huang, Q., Su, X., 2015. Genome-Wide Analysis of the Fasciclin-Like Arabinogalactan Protein Gene Family Reveals Differential Expression Patterns,

- Localization, and Salt Stress Response in *Populus*. *Front Plant Sci* 6, 1140. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01140>
- Zhang, B., Su, X., Zhou, X., 2008a. A MADS-box gene of *Populus deltoides* expressed during flower development and in vegetative organs. *Tree Physiol* 28, 929–934. <https://doi.org/10.1093/treephys/28.6.929>
- Zhang, B., Su, X., Zhou, X., 2008b. A MADS-box gene of *Populus deltoides* expressed during flower development and in vegetative organs. *Tree Physiol* 28, 929–934. <https://doi.org/10.1093/treephys/28.6.929>
- Zhang, J., Elo, A., Helariutta, Y., 2011. *Arabidopsis* as a model for wood formation. *Curr Opin Biotechnol* 22, 293–299. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.11.008>
- Zhang, Y., Brown, G., Whetten, R., Loopstra, C.A., Neale, D., Kieliszewski, M.J., Sederoff, R.R., 2003. An arabinogalactan protein associated with secondary cell wall formation in differentiating xylem of loblolly pine. *Plant Mol. Biol.* 52, 91–102. <https://doi.org/10.1023/a:1023978210001>
- Zhang, Y., Yang, J., Showalter, A.M., 2011. AtAGP18, a lysine-rich arabinogalactan protein in *Arabidopsis thaliana*, functions in plant growth and development as a putative co-receptor for signal transduction. *Plant Signal Behav* 6, 855–857. <https://doi.org/10.4161/psb.6.6.15204>
- Zhao, C., Avci, U., Grant, E.H., Haigler, C.H., Beers, E.P., 2008. XND1, a member of the NAC domain family in *Arabidopsis thaliana*, negatively regulates lignocellulose synthesis and programmed cell death in xylem. *Plant J* 53, 425–436. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03350.x>
- Zhong, R., Demura, T., Ye, Z.-H., 2006. SND1, a NAC Domain Transcription Factor, Is a Key Regulator of Secondary Wall Synthesis in Fibers of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 3158–3170. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047399>
- Zhong, R., Lee, C., Ye, Z.-H., 2010. Functional Characterization of Poplar Wood-Associated NAC Domain Transcription Factors. *Plant Physiology* 152, 1044–1055. <https://doi.org/10.1104/pp.109.148270>
- Zhong, R., Lee, C., Zhou, J., McCarthy, R.L., Ye, Z.-H., 2008. A Battery of Transcription Factors Involved in the Regulation of Secondary Cell Wall Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 2763–2782. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.061325>
- Zhong, R., Richardson, E.A., Ye, Z.-H., 2007. The MYB46 Transcription Factor Is a Direct Target of SND1 and Regulates Secondary Wall Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 2776–2792. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.053678>
- Zhong, R., Ye, Z.-H., 2009. Transcriptional regulation of lignin biosynthesis. *Plant Signal Behav* 4, 1028–1034.
- Zhou, J., Lee, C., Zhong, R., Ye, Z.-H., 2009. MYB58 and MYB63 Are Transcriptional Activators of the Lignin Biosynthetic Pathway during Secondary Cell Wall Formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21, 248–266. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.063321>
- Zhu, H., Qian, W., Lu, X., Li, D., Liu, X., Liu, K., Wang, D., 2005. Expression Patterns of Purple Acid Phosphatase Genes in *Arabidopsis* Organs and Functional Analysis of AtPAP23 Predominantly Transcribed in Flower. *Plant Mol Biol* 59, 581–594. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-0183-0>

Zobell, O., Faigl, W., Saedler, H., Münster, T., 2010. MIKC* MADS-Box Proteins: Conserved Regulators of the Gametophytic Generation of Land Plants. *Molecular Biology and Evolution* 27, 1201–1211. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq005>