



Universidad
de Alcalá

Departamento de Biología Celular y Genética
Programa de doctorado: Biomedicina

Tesis Doctoral

**Caracterización de genes *GRAS*
en *Pinus radiata* D. Don
y su expresión durante el
enraizamiento adventicio**

Alicia Solé Medina

2012

Tesis Doctoral dirigida por: María del Carmen Díaz-Sala Galeano

**GUILLERMO BODEGA MAGRO, CATEDRÁTICO DE BIOLOGÍA CELULAR
Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y
GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ,**

CERTIFICA:

Que **Dña. Alicia Solé Medina**, Licenciada en Biología por la Universidad de Alcalá, ha realizado la Tesis Doctoral titulada: "**Caracterización de genes GRAS en *Pinus radiata* D. Don y su expresión durante el enraizamiento adventicio**)" y reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Y para que así conste, firma en Alcalá de Henares, a trece de abril de dos mil doce.



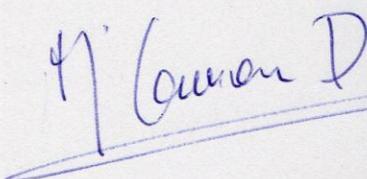
Guillermo Bodega Magro

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL

**MARIA DEL CARMEN DIAZ-SALA GALEANO,
PROFESORA TITULAR DE UNIVERSIDAD DEL
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL DE LA
UNIVERSIDAD DE ALCALA**

CERTIFICA: Que la Memoria titulada “**Caracterización de genes *GRAS* en *Pinus radiata* D. Don y su expresión durante el enraizamiento adventicio**”, que para optar al Grado de Doctora en Biología presenta la Licenciada **Dña. Alicia Solé Medina**, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Biología Vegetal (Área de Fisiología Vegetal) de la Universidad de Alcalá. Que considera que representa un trabajo de Tesis Doctoral y autoriza su presentación en la Facultad de Biología de la Universidad de Alcalá.

Y para que conste, expide el presente certificado en Alcalá de Henares a 10 de Abril de 2012




A Paloma y Fernando, por enseñarme a buscar respuestas.

A Fer y Aida, por apoyarme.

A Pablo, por darme aliento.

ÍNDICE

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	vii
INTRODUCCIÓN	1
1. Propagación vegetativa en especies forestales	3
1.1. Importancia de la propagación vegetativa en el sector forestal.	3
Métodos de propagación	3
1.2. Cambio de fase	5
2. Enraizamiento adventicio	9
2.1. Aspectos anatómicos del enraizamiento adventicio	9
2.2. Factores que influyen en el enraizamiento adventicio	13
2.2.1. Genotipo, madurez y posición de la estaquilla en la planta. Estado de la planta madre	13
2.2.2. Reguladores de desarrollo	14
2.2.3. Luz y temperatura	16
2.2.4. Carbohidratos y nutrición mineral	16
2.2.5. Micorrización	17
2.2.6. Otros compuestos	18
2.3. Sistemas experimentales para el estudio de la pérdida de capacidad de enraizamiento adventicio asociada a la edad	18
2.4. Papel de la auxina en el enraizamiento adventicio	20
2.4.1. Transporte polar auxínico	20
2.4.2. Señalización de auxina	22
2.5. Aspectos bioquímicos y moleculares del enraizamiento adventicio	24
3. Familia de proteínas GRAS	27
3.1. Generalidades	27
3.2. <i>SCARECROW</i> y <i>SHORT-ROOT</i>	29
OBJETIVOS	33
MATERIAL Y MÉTODOS	37
1. Material vegetal	39
1.1. Siembra y crecimiento de <i>Pinus radiata</i>	39
1.2. Inducción de raíces adventicias	39

1.3. Material vegetal utilizado en los distintos ensayos	40
2. Enraizamiento	41
3. Histología	41
4. Aislamiento de ADN	43
4.1. Extracción de ADN	43
4.2. Tratamiento con RNAsa	44
5. Aislamiento de ARN	44
5.1. Extracción de ARN	44
5.2. Tratamiento con DNAsa	45
6. Síntesis de cDNA	46
7. Electroforesis en geles de agarosa	46
8. Purificación de fragmentos de ADN	47
9. Clonación	47
10. Secuenciación	48
11. RACE	48
11.1. 3'RACE	48
11.2. 5'RACE	49
12. Árbol filogenético	50
13. Southern blot	51
13.1. Síntesis de sondas marcadas con digoxigenina	51
13.2. Transferencia de ADN genómico de <i>Pinus radiata</i> a membranas de nylon	52
13.3. Hibridación del ADN con las sondas marcadas con digoxigenina	53
13.4. Revelado quimioluminiscente	54
14. RT-PCR a tiempo real	54
14.1. Cebadores para RT-PCR a tiempo real	54
14.2. Secuencias para RT-PCR a tiempo real	55
14.3. Validación de cebadores	55
14.4. Análisis de expresión por RT-PCR a tiempo real	56
14.5. Análisis estadístico	56
15. Hibridación <i>in situ</i>	57
15.1. Síntesis de las sondas	57
15.2. Cortes histológicos	58
15.3. Hibridación	58
15.4. Revelado	60

RESULTADOS	61
1. Caracterización de la respuesta de enraizamiento en estaquillas de plántulas de <i>Pinus radiata</i> de distintas edades	63
1.1. Caracterización de la respuesta de enraizamiento en hipocótilos	63
1.1.1. Plántulas de 20 días	63
1.1.2. Plántulas de 60 y 90 días	65
1.2. Caracterización de la respuesta de enraizamiento en epicótilos	65
2. Análisis histológico de la respuesta de enraizamiento en estaquillas de plántulas de distintas edades	66
2.1. Análisis histológico de la respuesta de enraizamiento en hipocótilos	66
2.1.1. Plántulas de 20 días	66
2.1.2. Plántulas de 60 días	68
2.2. Análisis histológico de la respuesta de enraizamiento en epicótilos	68
3. Aislamiento y caracterización de genes de la familia <i>GRAS</i> en <i>Pinus radiata</i>	69
3.1 Caracterización de genes tipo <i>SCARECROW</i>	70
3.2. Caracterización de genes tipo <i>SHORT-ROOT</i>	75
4. Patrón de expresión de genes de la familia <i>GRAS</i> en pino	77
4.1. Expresión de <i>PrSCL1</i> y <i>PrSHR</i> en órganos	78
4.2. Expresión de <i>PrSCL1</i> y <i>PrSHR</i> en estaquillas de pino en presencia de auxina exógena	79
4.3. Dinámica espacio-temporal de expresión de <i>PrSCL1</i> durante el enraizamiento adventicio en estaquillas de plántulas de distintas edades	80
4.3.1. Hipocótilos de plántulas de 20 días	81
4.3.2. Hipocótilos de plántulas de 60 y 90 días	82
4.3.3. Epicótilos de plántulas de 60 y 90 días	84
4.4. Dinámica espacio-temporal de expresión de <i>PrSHR</i> durante el enraizamiento adventicio en estaquillas de plántulas de distintas edades	86
4.4.1. Hipocótilos de plántulas de 20 días	87
4.4.2. Hipocótilos de plántulas de 60 y 90 días	88
4.4.3. Epicótilos de plántulas de 60 y 90 días	90
DISCUSIÓN	93
1. Cambio de fase y enraizamiento adventicio en <i>Pinus radiata</i>	95
2. Caracterización de la respuesta de enraizamiento en hipocótilos y epicótilos de plántulas de <i>Pinus radiata</i> de distintas edades	97
3. Aislamiento y caracterización de genes de la familia <i>GRAS</i> en <i>Pinus radiata</i>	100

4. Patrón de expresión de genes de la familia GRAS en pino	103
4.1. Expresión de <i>PrSCL1</i> y <i>PrSHR</i> en órganos	103
4.2. Expresión de <i>PrSCL1</i> y <i>PrSHR</i> en estaquillas de pino en presencia de auxina exógena	104
4.3. Dinámica espacio-temporal de expresión de <i>PrSCL1</i> durante el enraizamiento adventicio en estaquillas de plántulas de distintas edades	106
4.3.1. Hipocótilos de plántulas de 20 días	106
4.3.2. Hipocótilos de plántulas de 60 y 90 días	107
4.3.3. Epicótilos de plántulas de 60 y 90 días	109
4.4. Dinámica espacio-temporal de expresión de <i>PrSHR</i> durante el enraizamiento adventicio en estaquillas de plántulas de distintas edades	109
4.4.1. Hipocótilos de plántulas de 20 días	109
4.4.2. Hipocótilos de plántulas de 60 y 90 días	110
4.4.3. Epicótilos de plántulas de 60 y 90 días	111
CONCLUSIONES	113
SUMMARY	117
1. Introduction	119
2. Results and Discussion	122
2.1. Adventitious rooting in <i>Pinus radiata</i>	122
2.2. Identification of <i>PrSCL1</i> and <i>PrSHR</i> genes	123
2.3. <i>PrSCL1</i> and <i>PrSHR</i> expression in organs and in cuttings in the presence of exogenous auxin	123
2.4. Spatio-temporal expression profile of <i>PrSCL1</i> and <i>PrSHR</i> during adventitious root formation in cuttings from <i>Pinus radiata</i> seedlings of different ages	124
3. Conclusions	126
BIBLIOGRAFÍA	127

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

A260	Absorbancia a 260 nm
A280	Absorbancia a 280 nm
ADN	ácido desoxirribonucleico
AIB	ácido indol-3-butírico
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
BSA	albúmina de suero bovino (del inglés Bovine Serum Albumin)
cDNA	ADN complementario (del inglés complementary DNA)
GMPc	guanosín monofosfato cíclico
C_T	ciclo de referencia en la amplificación de RT-PCR a tiempo real
CTAB	bromuro de cetiltrimetilamonio
dATP	desoxiadenosina trifosfato
dCTP	desoxicitosina trifosfato
DEPC	dietil pirocarbonato
dGTP	desoxiguanina trifosfato
Dig-dUTP	dUTP con digoxigenina
dNTPS	desoxirribonucleótidos trifosfato
DTT	ditiotreitól
dTTP	desoxitimidina trifosfato
dUTP	desoxiuridina trifosfato
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EST	marcador o etiqueta de secuencia expresada (del inglés expressed sequence tag)
GDP	guanosín difosfato
GTP	guanosín trifosfato
IAA	ácido indolacético
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
kb	kilobases
LB	medio Luria-Bertoni
MAPK	proteín quinasas activadas por mitógenos (del inglés mitogen-activated protein kinases)
NAA	ácido 1-naftalenacético (del inglés 1-naftalen-acetic acid)
NPA	ácido N-1- naftilftalámico
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa

PVP	polivinilpirrolidona
RACE	amplificación de los extremos de un cDNA (del inglés Rapid Amplification of cDNA Ends)
RT-PCR	reacción de la cadena de polimerasa en transcripción reversa (del inglés reverse transcription polymerase chain reaction)
SDS	dodecilsulfato sódico
SSC	citrate sódico salino
ssDNA	ADN de esperma de salmón
t.a.	temperatura ambiente
TAE	tris-acetato-EDTA
tblastn	programa de alineamiento que compara una secuencia proteica con una base de datos de nucleótidos (BLAST del inglés Basic Local Alignment Search Tool)
TCs	secuencia consenso probable (del inglés Tentative Consensus)
TE	tris-EDTA (10 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA)
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Propagación vegetativa en especies forestales.

1.1. Importancia de la propagación vegetativa en el sector forestal.

Métodos de propagación.

Los árboles son componentes esenciales del medio natural y juegan un papel crucial en el equilibrio global de los ecosistemas. Los árboles proporcionan además materias primas a industrias transformadoras que mueven miles de millones de euros. A pesar de su importancia tanto desde el punto de vista medioambiental como económico y social, se conoce poco de los mecanismos básicos que regulan la productividad forestal. La optimización de la productividad forestal depende, entre otros factores, de programas de mejora genética eficaces que permitan disponer de árboles élite en producción, en adecuación o en arquitectura, para dinamizar o readecuar la oferta actual.

Las masas forestales ocupan una superficie de casi 4.000 millones de hectáreas, lo que equivale a un 30% de la superficie emergida del planeta (FAO, 2002; FAO, 2005). Los bosques sustentan una gran diversidad de especies y proporcionan beneficios medioambientales como protección del suelo, conservación del agua o protección frente al viento. Además suponen uno de los sumideros de anhídrido carbónico (CO₂) más importantes del planeta. La alta demanda de productos forestales provoca una gran presión sobre las masas forestales naturales cuya extensión se estima que se reduce anualmente en 7,3 millones de hectáreas (FAO, 2005).

Una alternativa para reducir la presión sobre los bosques naturales es la obtención de productos derivados a partir de plantaciones forestales. Sin embargo, el consumo de productos forestales procedentes de plantaciones forestales es aún escasa a pesar de que las plantaciones forestales con fines productivos han aumentado considerablemente en los últimos años (FAO, 2011). Estimaciones recientes llegan a situar a las plantaciones forestales como fuente del 80% de la demanda de madera en rollo en 2030 (Carle y Holmgren, 2008). Para evitar que la demanda de productos forestales ejerza una presión sobre las masas forestales con el consiguiente efecto medioambiental, es necesario el establecimiento de plantaciones forestales con individuos mejorados en calidad de madera u otros productos derivados y en su capacidad de adaptación a cambios medioambientales. La consecución de este objetivo pasa no sólo por la adquisición de un conocimiento más profundo de los caracteres de interés y los factores que controlan su expresión, sino por el desarrollo de estrategias para la producción de planta a gran escala que permita el establecimiento de plantaciones.

Tradicionalmente la propagación de especies forestales se ha basado en la propagación sexual a partir de semilla mejorada (Ritchie, 1991; Ritchie, 1994a) en combinación con la mejora genética clásica basada en la selección de individuos mediante sus características fenotípicas, que, en su mayoría, se manifiestan en etapas adultas del desarrollo. Sin embargo en la propagación sexual es

necesario esperar varios años para la obtención de semillas mejoradas o para llevar a cabo cruzamientos controlados debido a los largos ciclos de vida de la mayoría de las especies forestales; además, en la reproducción sexual no siempre se conservan o se adquiere ganancia de los caracteres de interés.

Un modo alternativo a la reproducción sexual para capturar ganancia genética es la propagación vegetativa de los árboles con las mejores características fenotípicas, denominados árboles élite, sobresalientes o plus. La propagación vegetativa ofrece la oportunidad de seleccionar y mantener los efectos génicos no aditivos, resultantes de interacciones génicas, que normalmente no se transmiten por reproducción sexual, pero que pueden dar lugar a individuos excepcionales dentro de progenies también superiores, y pueden ser mantenidos a través de la propagación vegetativa, la cual ofrece, por tanto, una alternativa para aumentar la productividad forestal. En horticultura la propagación vegetativa en masa de fenotipos seleccionados ha sido utilizada durante siglos (Hartman *et al.*, 2010). Sin embargo, las especies leñosas presentan características específicas que hacen que la propagación en masa no se lleve a cabo de un modo generalizado en el ámbito forestal, a pesar de la necesidad de propagar progenies de determinadas especies por estos métodos (Greenwood, 1995). La edad del árbol es un factor limitante, ya que en la fase adulta del desarrollo se produce un descenso generalizado de la capacidad regenerativa de los tejidos, siendo en la práctica los tejidos juveniles los utilizados en los programas de propagación (Díaz-Sala *et al.*, 1990 a, b; Díaz-Sala, 1991). La propagación de material juvenil, aunque útil en ciertos casos, tiene la desventaja de que es difícil predecir el comportamiento de un árbol en etapa adulta, ya que en muchas especies agroforestales los caracteres de importancia económica se expresan adecuadamente a nivel fenotípico cuando el árbol ha alcanzado una edad crítica en su desarrollo (Bonga y Von Aderkas, 1993). Como consecuencia de esto, individuos con una edad que permita una evaluación adecuada de sus características para su selección son difíciles de propagar, y en muchas ocasiones los individuos son seleccionados a una edad temprana para su evaluación, lo que puede resultar en selecciones inapropiadas. Aunque se han hecho intentos para revitalizar o rejuvenecer el material adulto (Rogler y Hackett, 1975; Ballester *et al.*, 1989; Huang *et al.*, 1992; Díaz-Sala *et al.*, 1994, Díaz-Sala *et al.*, 1995; Revilla *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 1997), no se ha logrado evitar, en muchos casos, las barreras para la propagación clonal de árboles seleccionados. Una de las mayores barreras para el éxito de la propagación clonal de individuos adultos seleccionados es la pérdida de potencial de enraizamiento adventicio (Díaz-Sala *et al.*, 1996; Golfbarb *et al.*, 1998). El enraizamiento adventicio es la base en los programas de propagación clásica mediante estaquillado, y constituye una etapa crucial en todos los programas de regeneración mediante técnicas de organogénesis *in vitro*. Su pérdida limita el éxito de la propagación en masa mediante estas técnicas. La tasa y grado de pérdida de potencial de enraizamiento depende de la especie. En especies del género *Larix* la frecuencia de estaquillas con capacidad de enraizamiento desciende en un 50% durante los primeros veinte años (Greenwood *et*

al., 1989); sin embargo, especies como *Pinus taeda* pierden su capacidad de enraizamiento en etapas tempranas del desarrollo (Díaz-Sala *et al.*, 1996). En otras especies forestales también se ha comprobado la pérdida de la capacidad de enraizamiento *in vitro* de material adulto con relación al material del mismo genotipo que retiene características juveniles (Sánchez y Vieitez, 1991; Sánchez *et al.*, 1996). Además existen variaciones intraespecíficas e intraclonales. Por todo ello, se considera a muchas especies leñosas como especies recalcitrantes en general, y de difícil enraizamiento en particular.

Una mejora de la capacidad de enraizamiento de árboles para su introducción en los programas de propagación, en el establecimiento de bancos, programas de cultivo *in vitro*, o en la introducción de especies y procedencias significará un ahorro no sólo económico sino en el tiempo en que éstos y otros programas pueden ser productivos. Debido a que en muchos casos los intentos para aumentar la capacidad de enraizamiento mediante tratamientos exógenos han sido ineficaces (Hausman *et al.*, 1994; Ricci *et al.*, 2001, Takahashi *et al.*, 2003; Ricci *et al.*, 2003), y a que la pérdida de potencial de enraizamiento no está asociada a un descenso en el contenido o en la sensibilidad de la respuesta a señales inductoras (Díaz-Sala *et al.*, 1996; Ballester *et al.*, 1999), la mejora de este carácter pasa por determinar genes funcionalmente involucrados en la pérdida de capacidad de enraizamiento.

Los genes funcionalmente involucrados en la pérdida de capacidad de enraizamiento pueden ser utilizados a medio plazo, una vez realizados los estudios genéticos oportunos, para seleccionar genotipos sobresalientes que puedan ser adaptados a los sistemas de propagación. Sin embargo para rentabilizar esta mejora es necesario identificar y comprender la función de los genes que controlan los aspectos del desarrollo involucrados en la expresión de la capacidad de enraizamiento, determinar cómo estos genes se expresan y, sobre todo, cuál es su regulación. Su conocimiento ofrece la posibilidad de mejorar eficazmente la propagación de árboles adultos seleccionados, y así disponer de importantes herramientas para la propagación y, como consecuencia, la mejora de la productividad forestal (Day *et al.*, 2002).

1.2. Cambio de fase.

Los términos de madurez y cambio de fase han evolucionado sustancialmente desde el concepto inicial de considerar la floración como carácter exclusivo de madurez e indicador del cambio de fase (Zimmerman, 1973; Schwabe, 1976; Wareing y Frydman, 1976), a incorporar, además de la floración, la pérdida de vigor como carácter de madurez independiente y paralelo a la floración (Zimmerman *et al.*, 1985) y, actualmente, a englobar una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares independientes y específicos de cada especie que están asociados al avance en el ciclo vital de las plantas (Hackett y Murray, 1993).

A pesar de que ya se había definido la pérdida de vigor cómo una forma de envejecimiento en especies forestales (Wareing, 1959; Fortanier y Jonkers, 1976), en los años 70 todavía se consideraba que un individuo comienza la etapa adulta o madura de su desarrollo en el momento de

la floración (Zimmerman, 1973; Schwabe, 1976; Wareing y Frydman, 1976). El cambio de fase se asociaba únicamente a la adquisición de competencia reproductiva de forma que la fase juvenil comprendía desde el fin de la fase embrionaria hasta el momento de la floración y se consideraba fase madura a partir del momento en que el individuo florece.

Los estudios sobre la regulación del cambio de fase en especies forestales supusieron un gran avance dado que pusieron de manifiesto la independencia entre al menos dos procesos asociados a la madurez. Por un lado la competencia reproductiva, definida como la capacidad de producción de flores, y por otro lado la pérdida de vigor asociada al desarrollo del individuo (Zimmerman *et al.*, 1985). Se pudo comprobar que la floración y la pérdida de vigor se manifiestan de forma independiente a lo largo de la vida de los árboles. Wareing (1959) había utilizado el término madurez para definir la fase que se inicia con la adquisición de competencia reproductiva y el término envejecimiento para mostrar la pérdida de vigor asociada al aumento de complejidad en la planta, mientras que Fortanier y Jonkers (1976) se referían a la pérdida de vigor como envejecimiento fisiológico, que comienza antes, en contraste con el envejecimiento ontogenético o madurez que se asocia a la competencia reproductiva. Por otro lado, el avance en el conocimiento sobre floración permitió inducir formación de flores en etapas muy tempranas del ciclo vital de algunas especies (Pharis y Morf, 1967; Pharis, 1976; Pharis, 1977) lo que llevó a Longman (1976) a establecer dos condiciones necesarias para que tuviese lugar el cambio de fase asociado a la adquisición de competencia reproductiva, la planta ha de ser capaz de producir flores independientemente de las circunstancias en que se produzca la floración y además ha de continuar floreciendo sin la aplicación de un estímulo exógeno.

Posteriormente, se han observado otros cambios asociados al avance del ciclo vital en muchas especies vegetales que afectan de forma independiente a caracteres concretos en procesos morfológicos, anatómicos y/o fisiológicos (Hackett y Murray, 1993). Se han descrito diferencias entre individuos juveniles y adultos en caracteres como la morfología y la fisiología foliar, (Franich *et al.*, 1977; Bauer y Bauer, 1980; Cordero *et al.*, 1985; Ritchie *et al.*, 1994b; Day *et al.*, 2001; Greenwood *et al.*, 2008), el patrón y el número de ramas (Greenwood, 1984; Ritchie *et al.*, 1994b); la orientación, el tamaño y las características del tallo (Greenwood, 1984; Ritchie *et al.*, 1994b), la resistencia o tolerancia a factores bióticos y abióticos (Larcher, 1969; Zagory y Libby, 1985; Kearsley y Whitham, 1989; Karban y Thaler, 1999; Andergassen y Bauer, 2002), la capacidad para formar raíces adventicias (Bonga, 1982; Díaz-Sala *et al.*, 1996) o la embriogénesis somática (Bonga y Von Aderkas, 1993; Greenwood, 1995; Von Aderkas y Bonga, 2000). Por ejemplo en pino caracteres como la tasa de crecimiento o la capacidad organogénica disminuyen con la edad, en *P. radiata* se ha descrito disminución significativa de la tasa de crecimiento y de la capacidad de propagación (Sweet, 1973) y en *P. taeda*, pérdida de capacidad de enraizamiento adventicio (Greenwood y Weir, 1994). En otras especies forestales como *Larix* el avance del ciclo vital supone variaciones en la morfología foliar, disminución en la frecuencia de ramas y aumento del

contenido en clorofila (Greenwood *et al.*, 1989) y en *Pseudotsuga* disminuyen el diámetro internodal del tallo, el número, longitud y diámetro de ramas y la concentración en clorofila de las hojas (Ritchie *et al.*, 1994b).

Es importante tener en cuenta que los cambios observados a lo largo del ciclo vital de las plantas ocurren de forma independiente y con un patrón específico característico de cada especie por lo que es necesario el estudio de cada uno de ellos independientemente. Por ejemplo, en *P. taeda* la pérdida de potencial de enraizamiento adventicio comienza en fases tempranas del desarrollo (Díaz-Sala *et al.*, 1996), mientras que la competencia reproductiva no se adquiere hasta pasados al menos los primeros 15 años de vida (Greenwood, 1987); también en *Arabidopsis* la pérdida de potencial de enraizamiento adventicio es independiente de la floración (Díaz-Sala *et al.*, 2002). En *Larix* también se ha demostrado la independencia de cambios asociados a la edad en caracteres específicos, la morfología foliar presenta variaciones a lo largo de la vida del individuo, pero estas variaciones son independientes de los cambios observados en el contenido de clorofilas y en la tasa de fotosíntesis también asociados a la edad (Greenwood *et al.*, 1989).

El estudio de las causas de la madurez y del envejecimiento en las especies forestales ha dado lugar a la formulación de distintas hipótesis para explicar el proceso de maduración en árboles (revisado por Muneé-Bosch, 2007 y Basheer-Salimia, 2007). El análisis se ha llevado a cabo desde distintas perspectivas considerando las causas fisiológicas y anatómicas asociadas al aumento de tamaño (Wareing, 1959; Hackett, 1985; Greenwood, 1987), las causas celulares relacionadas con las divisiones meristemáticas (Robinson y Wareing, 1969; Mencuccini *et al.*, 2005; Muneé-Bosch, 2007), o las causas genéticas (Bonga, 1982; Fraga *et al.*, 2002; Valledor *et al.*, 2007; Monteuiis y Doulbeau, 2008).

El aumento de tamaño del individuo, especialmente en especies forestales, es una consecuencia inevitable de la edad. Inicialmente se estableció la teoría del tamaño según la cual alcanzar un tamaño mínimo sería el factor primario en la determinación de la transición a la condición adulta (Wareing, 1959). El aumento de tamaño tiene como consecuencia cambios en el estado nutricional, el balance hídrico, el intercambio de gases, tasas de fotosíntesis, distribución de hormonas, etc. que se han estudiado en relación con el proceso de madurez en especies forestales (Wareing y Frydman, 1976; Hackett, 1985; Greenwood, 1987; Haffner *et al.*, 1991; Basheer-Salimia, 2007). Sin embargo, los resultados no han sido definitivos ni válidos en todas las especies y no ha sido posible establecer de manera definitiva qué caracteres varían como consecuencia únicamente del aumento de tamaño y cuáles como consecuencia de factores intrínsecos (Mencuccini *et al.*, 2005; Muneé-Bosch, 2007). Por ejemplo, se han descrito resultados contradictorios respecto a los cambios en las tasas de fotosíntesis en especies forestales; Day *et al.* (2001) observa cambios en la tasa de fotosíntesis en hojas de *Picea* procedentes de ramas árboles de diferentes edades injertadas sobre el mismo portainjertos y, por tanto, del mismo tamaño final de lo que deducen que son cambios intrínsecos en los meristemas los responsables de la reducción de las tasas fotosintéticas. Mientras

que Vanderklein *et al.* (2007) no detecta variaciones en la tasa de fotosíntesis de injertos de *Pinus sylvestris* de diferentes edades pero del mismo tamaño, sugiriendo que es el aumento de tamaño y no de la edad del árbol el responsable de estas variaciones.

En individuos adultos se han encontrado diferencias en el grado de madurez de distintas zonas de la planta. Poethig (1990; 2003) esquematiza la forma en que los caracteres juveniles, adultos y reproductivos se expresan durante el crecimiento postembrionario de un tallo de una planta de maíz. La zona inferior del tallo y la inicial de cada rama contiene los caracteres juveniles y se establece un gradiente en la expresión de caracteres asociados al estado maduro desde la parte inferior a la parte superior y desde el interior al exterior hasta expresarse caracteres reproductores en las zonas más externas (Poethig, 1990; Poethig, 2003). En árboles se ha relacionado este hecho con cambios en el comportamiento de los meristemas apicales en función de su posición en el árbol (Hackett, 1985) de forma que cuanto menor es la distancia de localización del meristemo apical del tallo respecto a la base del tronco en general más juvenil es la zona (Bonga y Von Aderkas, 1993).

El estudio de la influencia del meristemo apical en el cambio de fase y su evolución a lo largo del desarrollo vegetal ha puesto de manifiesto que los cambios en la actividad meristemática debidos a la edad son consecuencia de gran cantidad de factores y no resulta sencillo separar el efecto del tamaño de los cambios específicos en las áreas meristemáticas (Mencuccini *et al.*, 2005; Muneé-Bosch, 2007). Los meristemas apicales responden a cambios tanto ambientales externos como fisiológicos internos que podrían ser la causa de los cambios asociados a la edad (Day *et al.*, 2002). Se ha sugerido que factores como la acumulación de mutaciones como consecuencia de las divisiones a lo largo del tiempo o los cambios en la distribución de hormonas como consecuencia del aumento de tamaño podrían estar involucrados en cambios en los meristemas responsables de los efectos de la madurez (Muneé-Bosch, 2007). Day *et al.* (2002) establecen cuatro posibles modelos para el control de los cambios en la morfología y la fisiología de los meristemas del tallo y sus derivados asociados con la edad según la procedencia de los factores de control. En el modelo estímulo-respuesta y el modelo extrínseco los factores de control del envejecimiento son externos al meristemo ya sea dentro de la misma planta o ambientales; el modelo intrínseco propone una madurez propia del meristemo programada genéticamente y el modelo extrínseco-intrínseco se basa en cambios en la expresión génica del meristemo mediados por factores externos al mismo (Day *et al.*, 2002).

En los últimos años, el análisis a nivel molecular de las posibles causas de las diferencias encontradas entre las fases vegetativas juvenil y adulta del desarrollo vegetal sugiere que la expresión diferencial de genes podría ser la causa de estos cambios. Dado que al menos algunos de los cambios asociados a la madurez son estables pero reversibles (Bonga, 1982; Greenwood, 1987; Bonga y Von Aderkas, 1993; Greenwood y Weir, 1994) es muy probable que la expresión diferencial de genes que conduce al cambio de fase sea debida a procesos epigenéticos ya sea por metilación del ADN, cambios en la organización del ADN o cambios conformacionales en las

histonas (Bonga, 1982). Los estudios de las variaciones en el grado de metilación del ADN en relación con el cambio de fase no han aportado resultados definitivos; hay datos que sugieren que la diferenciación implica un aumento de los niveles de metilación del ADN (Valledor *et al.*, 2007) mientras que otros resultados muestran niveles de metilación del ADN mayores en material juvenil que en maduro (Monteuuis y Doulebeau, 2008) o incluso niveles equivalentes de metilación entre material juvenil y maduro (Fraga *et al.*, 2002). Dado que los estudios se realizan sobre la cantidad total de ADN, es muy probable que el avance en el conocimiento de los cambios de metilación de genes concretos involucrados en distintos procesos del desarrollo vegetal revele su importancia en el control epigenético de la expresión génica asociada al cambio de fase.

2. Enraizamiento adventicio.

El enraizamiento adventicio es el proceso por el cual una planta es capaz de inducir la formación de raíces funcionales a partir de células que, durante el desarrollo, no están determinadas para tal función. La mayor parte de las plantas pueden regenerar su sistema radical mediante la formación de raíces adventicias, sin embargo existe una gran variedad fenotípica en cuanto a la capacidad de enraizamiento y la secuencia de acontecimientos que tiene lugar. Gran parte de esta variación se debe a diferencias genotípicas, sin embargo, otros factores como factores ambientales (temperatura, luz, nutrición mineral, etc.) y fisiológicos (estado hormonal de la planta madre, etc.), además del estado de desarrollo, afectan significativamente a la capacidad de enraizamiento en especies forestales. Una revisión detallada de todos estos factores y su efecto sobre el enraizamiento en coníferas ha sido descrita por Abarca y Díaz-Sala (2009).

A pesar de la variabilidad de la respuesta de enraizamiento, se pueden identificar ciertas características comunes. Quizá la más obvia sea el absoluto requerimiento de auxina para la formación de raíces adventicias, pero también la edad y madurez de las estaquillas es crucial para el éxito del enraizamiento en los programas de mejora de especies forestales.

2.1. Aspectos anatómicos del enraizamiento adventicio.

La formación de raíces adventicias puede ser inducida en plantas intactas en algunas especies, o en estaquillas, hojas o raíces aisladas, mediante un proceso de proliferación y diferenciación en raíces de las células formadas. El órgano más utilizado para la inducción de raíces adventicias son las estaquillas. Se admite que los primordios radiculares se originan de células iniciales de raíz pre-existentes en especies de fácil enraizamiento como las pertenecientes a los géneros *Salix* o *Populus*. Sin embargo, las estaquillas de especies de difícil enraizamiento podrían requerir una reprogramación de células específicas que no están determinadas para originar raíces (Díaz-Sala *et al.*, 1996). Los cambios celulares que llevan a la formación de una raíz adventicia han sido descritos en numerosas especies de coníferas (Smith y Thorpe, 1975a; Flygh *et al.*, 1993; Grönroos

et al., 1993; Díaz-Sala *et al.*, 1996; Goldfarb *et al.*, 1998) y especies forestales angiospermas (Geneve *et al.*, 1988; De Klerk *et al.*, 1995; Ballester *et al.*, 1999). En las especies de difícil enraizamiento, la formación de meristemos *de novo* supone un proceso postembrionario de organogénesis a partir de células no determinadas para generar raíces. El origen de las raíces adventicias es menos claro que el de las raíces laterales (Casson y Lindsey, 2003) y pueden formarse tanto de forma directa, a partir de grupos celulares de tejidos preexistentes en el órgano de origen (Grönroos y Von Arnold, 1987; Díaz-Sala *et al.*, 1996; Jasik y DeKlerk, 1997; Goldfarb *et al.*, 1998) como de forma indirecta tras un periodo de inducción de callo (Flygh *et al.*, 1993; Hamann, 1998; Ermel *et al.*, 2000). Por ejemplo, en pino se ha descrito formación de raíces adventicias tanto de forma directa como indirecta. En estaquillas de hipocótilo en fase de crecimiento primario tiene lugar la formación directa de raíces adventicias a partir de pequeñas regiones del parénquima cortical inmediatamente centrífugas a los canales resiníferos que marcan los polos de xilema primario en el hipocótilo (Grönroos y Von Arnold, 1987; Díaz-Sala *et al.*, 1996; Goldfarb *et al.*, 1998). Sin embargo, en epicótilos de pino, el enraizamiento, cuando ocurre, es mayoritariamente indirecto y requiere una fase previa de inducción de callo en la zona de herida a partir de la que se forman nuevas raíces (Flygh *et al.*, 1993; Goldfarb *et al.*, 1998), aunque se ha observado un pequeño porcentaje de formación directa de raíces adventicias en epicótilos de *P. sylvestris* a partir de tejido vascular tanto del tallo como de las acículas e incluso a partir de la médula (Flygh *et al.*, 1993).

Tanto la formación de raíces adventicias como la formación de raíces laterales supone la inducción de meristemos *de novo*, pero mientras que en la formación de raíces laterales éstos se inducen a partir de células determinadas para originar raíces, en la formación de raíces adventicias, al menos en especies de difícil enraizamiento, la inducción de meristemos *de novo* ocurre a partir de células no determinadas para originar raíces. A pesar de las diferencias, se admite que la formación de raíces laterales y adventicias podría seguir un patrón de desarrollo similar (Laskowski *et al.*, 1995; Goldfarb *et al.*, 1998). Las raíces laterales se forman a partir del periciclo como consecuencia de la activación del ciclo celular en grupos específicos de células seguido de una serie de divisiones organizadas que dan lugar al nuevo meristemo (Casimiro *et al.*, 2001). Ambos procesos constarían de dos fases consecutivas, en la primera fase, se produciría la desdiferenciación y proliferación de las células del periciclo que van a dar lugar al primordio. En una segunda fase se produciría la rediferenciación de las células de la zona de proliferación para dar el meristemo radicular. Para que la formación del primordio sea efectiva es necesario que exista competencia celular, seguida de determinación celular y, por último, diferenciación (Laskowski *et al.*, 1995; Goldfarb *et al.*, 1998). Sin embargo, las etapas iniciales que originan los meristemos radiculares tanto laterales como adventicios aun no están claras ya que algunos estudios apuntan a que las células del periciclo que darán lugar al nuevo primordio de raíz lateral en *Arabidopsis* conservan competencia para

dividirse; sugiriendo que tal vez no tenga lugar un proceso inicial de desdiferenciación (Dubrovsky *et al.*, 2000; Beeckman *et al.*, 2001).

En hipocótilos de pino, el proceso de formación de raíces adventicias puede dividirse en varias etapas: reorganización y desdiferenciación celular, primeras divisiones celulares; formación del primordio de raíz y desarrollo de la raíz (Díaz-Sala *et al.*, 1996). Las etapas iniciales consisten en una reorganización celular en la región del parénquima cortical en respuesta a la señalización auxínica, seguida de la activación de la división celular en la región que dará lugar a la organización de un nuevo meristemo y la formación de primordios radiculares adventicios (Díaz-Sala *et al.*, 1996; Goldfarb *et al.*, 1998; Greenwood *et al.*, 2001).

La estructura de los hipocótilos jóvenes de pino consisten fundamentalmente en tejidos primarios, entre los que se encuentra la epidermis en la región más externa, el parénquima cortical conteniendo los canales resiníferos, entre 3 y 5 polos de xilema y floema primarios marcados por un canal resinífero y la médula en la región central (Díaz-Sala *et al.*, 1996). El cambium no se ha diferenciado o está en una fase inicial de su diferenciación y no es activo. En hipocótilos de *Pinus radiata*, el primer cambio observado es la expansión de la célula localizada centrífugamente al canal resinífero con el consecuente hinchamiento del núcleo y migración del citoplasma de las células periféricas hacia la célula expandida, seguido de divisiones asimétricas y organización del primordio (Smith y Thorpe, 1975 a y b). Aunque el proceso se completa en 10 días, los cambios iniciales se observan durante los primeros cinco días de tratamiento. Ningún otro estudio (incluido el trabajo que se describe en esta memoria) ha descrito la iniciación de una raíz a partir de la expansión de una única célula; sin embargo, los cambios celulares asociados al proceso son similares en las distintas especies (Grönroos y Von Arnold, 1987; Díaz-Sala *et al.*, 1996; Goldfarb *et al.*, 1998). Durante los primeros dos días sólo se observa expansión celular y reorganización celular en presencia de auxina exógena; las primeras divisiones en las áreas donde se organizarán los primordios se observan entre 2 y 6 días y divisiones celulares rápidas se detectan entre 6 y 8 días dependiendo de la especie. La organización del meristemo no ocurre antes de los 10-12 días. En algunas especies, como *Pinus strobus* o *Pinus contorta*, estaquillas de hipocótilo no tratadas pueden formar raíces adventicias a tasas muy bajas y de forma más tardía. Sin embargo, el origen y los cambios celulares que darán lugar a la formación de raíces adventicias son similares (Grönroos y Von Arnold, 1987; Goldfarb *et al.*, 1998).

En especies forestales angiospermas como manzano, hiedra, castaño o roble, los primordios de raíz se originan a partir de derivados cambiales (Geneve *et al.*, 1988; De Klerk *et al.*, 1995; Ballester *et al.*, 1999). Los primeros indicios de reactivación del cambium tienen lugar entre las 12 y las 24 h tras el tratamiento de auxina. Células de la zona cambial, parénquima radial y células vecinas presentan núcleos y nucleolos más prominentes. Las primeras divisiones aparecen a partir de las 48 h y los primordios se manifiestan como estructuras polares entre los 4 y 6 días después del tratamiento. La unión vascular con el tallo se realiza sobre los ocho días y las raíces emergen unos

diez días después del tratamiento, de tal manera que las raíces son visibles dos semanas después el tratamiento. En las estaquillas no tratadas con auxina, no se observa actividad cambial hasta después de los cinco días. Como consecuencia de esta actividad se origina una masa parenquimatosa tipo callo (San-José *et al.*, 1992).

En el caso de peciolos adultos de hiedra, epicótilos de algunas especies de pino, determinados mutantes tabaco sin capacidad rizogénica adventicia, y estaquillas de copa de manzano, peral, castaño o roble, todos ellos no competentes a enraizar, se produce una activación de la división en las áreas cambiales durante los primeros cinco días tras el tratamiento, de forma similar a la que ocurre en tejidos competentes a enraizar, sin embargo, estas células continúan dividiéndose para formar capas de células sin originar primordios de raíz (Baraldi *et al.*, 1995; Díaz-Sala *et al.*, 1996; Lund *et al.*, 1996; Ballester *et al.*, 1999).

En el caso de epicótilos de plántulas o árboles jóvenes de pino, y en términos de respuesta a auxina, la capacidad de enraizamiento es muy baja o nula si se compara con hipocótilos (Grönroos y Von Arnold, 1987; Flygh *et al.*, 1993; Díaz-Sala *et al.*, 1996; Goldfarb *et al.*, 1998; Hamann, 1998). En especies como *P. sylvestris* cuando existe formación de raíces, éstas se originan a partir del callo que se forma en la base de la estaquilla como consecuencia del efecto de corte (Flygh *et al.*, 1993). Algunos de estos estudios describen la formación de nidos de traqueidas asociados a pequeñas áreas de células meristemáticas como primeros signos visibles de diferenciación dentro del callo. Las células iniciales de raíces se forman en, o cerca de, estas masas meristemáticas originando el primordio de raíz (Flygh *et al.*, 1993; Hamann, 1998). En epicótilos de plántulas de 11 semanas de *P. strobus*, las raíces se inducen a partir del callo en estaquillas no tratadas con auxina y en las estaquillas tratadas, emergen directamente de los tejidos vasculares con un patrón similar al mostrado en hipocótilos, aunque con una frecuencia mucho más baja y retrasada en el tiempo (Goldfarb *et al.*, 1998).

La base de una estaquilla de epicótilos de una plántula joven (50-90 días) de pino presenta una estructura primaria, pero con el cambium diferenciado, solo interrumpido en la inserción con acículas y yemas axilares, y un anillo completo de xilema secundario diferenciado. Las células cambiales responden a la presencia de auxina exógena dividiéndose, pero la reorientación de los planos de división necesaria para la organización directa de un meristemo de raíz no ocurre u ocurre de forma infrecuente (Grönroos y Von Arnold, 1987; Flygh *et al.*, 1993; Díaz-Sala *et al.*, 1996; Goldfarb *et al.*, 1998; Hamann, 1998). Estos resultados indican que las células de epicótilos y estaquillas de plántulas o árboles jóvenes con capacidad de enraizamiento baja o nula responden a la presencia del estímulo de enraizamiento, pero sólo células específicas durante estadíos del desarrollo específicos forman un meristemo radicular adventicio (Díaz-Sala *et al.*, 1996).

2.2. Factores que influyen en el enraizamiento adventicio.

Se han descrito gran cantidad de factores que influyen en el enraizamiento adventicio. Recientemente se han publicado trabajos que revisan en detalle el efecto en el proceso de formación de raíces adventicias de factores como la madurez y posición de la estaquilla en la planta, los reguladores de desarrollo, los parámetros de luz y temperatura, diferentes elementos de la nutrición mineral, la micorrización por hongos y otros compuestos como los flavonoides o las poliaminas (Abarca y Díaz-Sala, 2009; Geiss *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009).

2.2.1. Genotipo, madurez y posición de la estaquilla en la planta. Estado de la planta madre.

Los estudios sobre el control genético de la capacidad de enraizamiento ponen de manifiesto que este proceso no es únicamente dependiente del genotipo (Greenwood y Weir, 1994; Díaz-Sala *et al.*, 1996; Baltunis *et al.*, 2005; Baltunis *et al.*, 2007). Los resultados sugieren que distintos mecanismos podrían estar controlando la capacidad de las estaquillas para formar raíces adventicias y que los distintos procesos parecen estar regulados de manera independiente. Greenwood y Weir (1994) han sugerido que la variación genética relacionada con la capacidad de enraizamiento podría ser dependiente de variaciones en la respuesta a auxina de cada familia. Además del efecto del genotipo, la madurez del árbol, proceso de desarrollo que también afecta a la morfología y tasa de crecimiento (Greenwood y Hutchison, 1993; Day *et al.*, 2002), es un factor muy importante que limita el uso del estaquillado en los programas de propagación y mejora, ya que, en la mayoría de especies forestales, existe un descenso en la capacidad para formar raíces adventicias asociado a este proceso de desarrollo (Hackett, 1985; Hackett, 1988; Díaz-Sala *et al.*, 1990b; Sánchez y Vieitez, 1991; Greenwood y Weir, 1994; Díaz-Sala *et al.*, 1995). La pérdida de potencial de enraizamiento asociada a la madurez del árbol fue descrita en 1929 (Gardner, 1929). Este autor describió el descenso de capacidad de enraizamiento asociada a la edad en veintiuna especies de árboles. Desde entonces, se ha descrito el efecto de la madurez sobre la capacidad de enraizamiento en numerosas especies de coníferas (Smith y Thorpe, 1975 a y b; Flygh *et al.*, 1993; Grönroos *et al.*, 1993; Díaz-Sala *et al.*, 1996; Goldfarb *et al.*, 1998) y especies forestales angiospermas (Geneve *et al.*, 1988; De Klerk *et al.*, 1995; Ballester *et al.*, 1999).

El descenso en la capacidad de enraizamiento se expresa como un porcentaje más bajo de estaquillas con capacidad de enraizamiento, un menor número de raíces y un aumento en el tiempo de emergencia de las raíces (Díaz-Sala *et al.*, 1996; Goldfarb *et al.*, 1998). La edad a la que ocurre este descenso y la tasa de pérdida de capacidad de enraizamiento varía entre especies, individuos e incluso clones. En especies del género *Larix* la frecuencia de estaquillas con capacidad de enraizamiento desciende a la mitad durante los primeros veinte años (Greenwood *et al.*, 1989); sin embargo, especies como *P.taeda* pierden irreversiblemente su capacidad de enraizamiento durante el primer año de vida (Díaz-Sala *et al.*, 1996). El género *Eucalyptus*, que cuenta con varias especies de alto interés para la industria forestal, presenta grandes diferencias entre especies en la pérdida de

capacidad de enraizamiento adventicio asociada a la edad, en especies como *E. viminalis* y *E. pauciflora* la pérdida de potencial de enraizamiento ocurre de manera muy temprana, mientras que en especies como *E. camaldulensis* y *E. deglupta* la pérdida de potencial de enraizamiento es muy lenta y poco significativa (Paton, 1984). En castaño y roble, también se ha comprobado la pérdida de la capacidad de enraizamiento *in vitro* de material adulto con relación al material del mismo genotipo que retiene características juveniles (Greenwood, 1987; Sánchez y Vieitez, 1991; Bonga y Von Aderkas, 1993; Sánchez *et al.*, 1996). En general, la evidencia demuestra que la facilidad de enraizamiento de tejidos juveniles es más función de la facilidad de formar iniciales de raíz que de una restricción física para la emergencia radicular. Se han ensayado numerosos métodos, propagación seriada, poda intensiva, injertos sobre portainjertos juveniles, para mantener a los tejidos en un estado juvenil garantizando así una propagación efectiva de los mismos. Sin embargo, no se ha logrado evitar, en muchos casos, las barreras para la propagación clonal de árboles seleccionados (Day *et al.*, 2002).

En muchas especies, estaquillas procedentes de las porciones basales del tallo mantienen estados juveniles y permiten relacionar el efecto de la posición con la capacidad de enraizamiento (Bonga y Von Aderkas, 1993; Peer y Greenwood, 2001). Este efecto puede reflejar el proceso de madurez fisiológica relacionada con el número de divisiones que han tenido lugar en el meristemo apical (descrito en el apartado I.2.). Por tanto, estaquillas recogidas de la parte basal del tallo tienen, en general, una mayor capacidad de enraizamiento.

Para la mayoría de las especies forestales de interés comercial la pérdida de capacidad de enraizamiento adventicio en la etapa adulta del desarrollo en la que se expresan los caracteres de interés (Hackett, 1985; Hackett, 1988; Greenwood, 1995) ha supuesto una gran barrera para su mejora dada la recalcitrancia para ser propagadas vegetativamente (Díaz-Sala *et al.*, 1990a; Sánchez y Vieitez, 1991; Díaz-Sala *et al.*, 1995). Un profundo conocimiento de los procesos biológicos implicados en el enraizamiento adventicio y de las causas de la pérdida de potencial de enraizamiento asociada a la edad permitiría mejorar la propagación vegetativa de individuos sobresalientes de especies de alto interés.

2.2.2. Reguladores de desarrollo.

Las hormonas vegetales regulan procesos del desarrollo vegetal, entre ellos la formación de raíces adventicias. De las fitohormonas, la **auxina** es el agente inductor del enraizamiento por excelencia, aunque otras hormonas como citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico ejercen efectos sobre el proceso. En muchas especies vegetales, especialmente en especies forestales, se hace necesaria la aplicación exógena de auxina para que tenga lugar la formación de raíces adventicias (Grönroos y Von Arnold, 1985; Grönroos y Von Arnold, 1987; Selby *et al.*, 1992; Díaz-Sala *et al.*, 1996; Goldfarb *et al.*, 1998; Ballester *et al.*, 1999). En gran cantidad de coníferas la aplicación de auxina a las estaquillas es el método más eficaz para inducir enraizamiento adventicio (Abarca y

Díaz-Sala, 2009). La efectividad de la auxina depende de la especie y de otros factores que afectan al enraizamiento, pero, en general, el ácido indolbutírico (AIB) y el ácido 1-naftilacético (NAA), aplicados de forma individual o combinada, son auxinas más eficaces en la inducción de raíces adventicias que el ácido indolacético (IAA) y a nivel comercial el AIB es el inductor de enraizamiento más utilizado (Geiss *et al.*, 2009). Además existen otros compuestos indólicos con actividad auxínica, como el ácido 4-cloroindol-3-acético, presente en muchas fabáceas y gimnospermas, que afectan a la capacidad de enraizamiento (Engvind, 1986; Ernstsén y Sandberg, 1986). El modo de aplicación, tal como pulsos a concentraciones altas o aplicaciones de forma continua, también afecta al enraizamiento dependiendo de la especie y del tipo de auxina (Grönroos y Von Arnold, 1985; Grönroos y Von Arnold, 1987; Grönroos y Von Arnold, 1988; Díaz-Sala *et al.*, 1996; Goldfarb *et al.*, 1998; Stojicic *et al.*, 1999). El papel de la auxina en el enraizamiento se detalla en el apartado II.3.

La acción de la fitohormona **etileno** en el enraizamiento adventicio ha sido estudiada en distintas especies vegetales con resultados contradictorios. Se ha descrito que puede tanto promover como inhibir el enraizamiento (Geiss *et al.*, 2009). En tomate el etileno parece tener un papel activador del enraizamiento adventicio relacionado con su interacción con el transporte polar auxínico (Negi *et al.*, 2010), también en plantas transgénicas de tabaco insensibles a etileno se ha descrito una reducción del número de raíces adventicias que sugiere que el etileno promueve el enraizamiento (McDonald y Visser, 2003); mientras que en especies como *Prunus* la aplicación de precursores de etileno provocan una reducción del porcentaje de enraizamiento (Biondi *et al.*, 1990). Estudios recientes revelan la compleja interacción del etileno con la auxina y otras fitohormonas lo que pone de manifiesto la necesidad de conocer en detalle los procesos y mecanismos de interacción de las fitohormonas para determinar su papel en el proceso de formación de raíces adventicias (Steffens *et al.*, 2006; Fukao y Bailey-Serres, 2008; Li *et al.*, 2009).

El efecto de otras hormonas vegetales como las **citoquininas**, las **giberelinas** y el **ácido abscísico** en el proceso de formación de raíces adventicias también ha sido estudiado. Las citoquininas parecen ser el inhibidor más activo de enraizamiento adventicio y se ha sugerido que participan en la regulación de la distribución auxínica intracelular (Pernisova *et al.*, 2008) afectando a la capacidad de inducción de organogénesis de la auxina. Se ha descrito inhibición del enraizamiento adventicio mediado por citoquininas tanto en especies modelo (Werner *et al.*, 2003) como en especies hortícolas (Werner *et al.*, 2001; Kuroha *et al.*, 2002, Kuroha y Satoh 2007;) y forestales (Selby *et al.*, 1992; Ramírez-Carvajal *et al.*, 2009). El efecto inhibidor de enraizamiento de las giberelinas y el ácido abscísico parece ser menos potente que el de las citoquininas (Selby *et al.*, 1992; Abarca y Díaz-Sala, 2009; Li *et al.*, 2009). En especies como arroz y *Picea* el ácido abscísico reduce la formación de raíces adventicias (Selby *et al.*, 1992; Steffens *et al.*, 2006), también la aplicación de la giberelina GA₃ en *Picea* durante el enraizamiento adventicio produce una

reducción significativa del enraizamiento pero menor que la producida por las citoquininas (Selby *et al.*, 1992).

Para comprender el efecto de las fitohormonas sobre el enraizamiento sería necesario conocer tanto los mecanismos concretos de acción como las complejas interacciones entre las distintas fitohormonas en este proceso organogénico. En arroz se ha sugerido que en la regulación de los procesos de emergencia y crecimiento de raíces adventicias participan complejas interacciones entre las rutas de señalización del etileno, las giberelinas y el ácido abscísico (Steffens *et al.*, 2006). Tanto la emergencia como el crecimiento radicular estarían inducidos por la señalización del etileno que es potenciada de forma sinérgica por las giberelinas e inhibida por el ácido abscísico, además, el efecto inhibitor del ácido abscísico sobre la emergencia radicular parece actuar principalmente sobre la señalización de las giberelinas mientras que, en la inhibición del crecimiento radicular parece interferir con la ruta de señalización del etileno, quizá sumado a la inhibición de la señalización por giberelinas (Steffens *et al.*, 2006)

2.2.3. Luz y temperatura.

Una de las claves para el éxito del enraizamiento adventicio es el establecimiento de niveles adecuados de luz y temperatura para cada especie (Abarca y Díaz-Sala, 2009; Geiss *et al.*, 2009). En la especie forestal *Pinus banksiana* la aplicación de alta irradiancia durante la inducción de raíces adventicias proporciona mayores tasas de enraizamiento (Haissig, 1990), esta mejora en la producción de raíces adventicias en alta irradiancia se ha relacionado con la acumulación de azúcares (Haissig, 1990). En *Arabidopsis* la luz influye sobre las tasas de enraizamiento adventicio e incluso se ha sugerido una posible interacción luz - auxinas en la regulación de este proceso (Sorin *et al.*, 2005). También la temperatura afecta al éxito del enraizamiento (Geiss *et al.*, 2009), e incluso se han descrito diferencias en el efecto de la temperatura sobre el enraizamiento entre especies del mismo género (Correa y Fett-Neto, 2004).

2.2.4. Carbohidratos y nutrición mineral.

Para el éxito del enraizamiento y la supervivencia de los explantos enraizados es necesario establecer niveles adecuados de nutrientes (Li *et al.*, 2009).

La relación N/C es clave en el enraizamiento. Bajos niveles de nitrógeno aumentan la eficiencia del enraizamiento y la aplicación de fertilizantes con alto nivel de nitrógeno reduce la frecuencia de enraizamiento de las estaquillas por su influencia en la relación N/C (Haissig, 1986). La concentración, la relación y el tipo de carbohidratos y fuentes de nitrógeno influyen en el enraizamiento adventicio, sin embargo su papel específico en este proceso de desarrollo aún no está claro (Druege, 2009; Abarca y Díaz-Sala, 2009; Geiss *et al.*, 2009). Por ejemplo, en *Arabidopsis*, carbohidratos como la sacarosa, la glucosa y la fructosa estimulan la inducción de raíces adventicias mientras que otros como la manosa y el sorbitol no parecen tener efecto sobre el

enraizamiento (Takahashi *et al.*, 2003). La interacción de los carbohidratos con la señalización de las hormonas vegetales y su influencia en la modulación de la expresión génica (Li *et al.*, 2009; Geiss *et al.*, 2009) podrían determinar su papel en el proceso del enraizamiento adventicio a través de rutas de señalización aún no dilucidadas.

También el calcio, el zinc, el fósforo, el hierro, el manganeso o el ácido bórico se han relacionado con el éxito de enraizamiento (Geiss *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009). En eucalipto, la nutrición mineral parece afectar en mayor medida al número y longitud de las raíces que al porcentaje y al tiempo de enraizamiento, el número de raíces adventicias que se forman está influido por nutrientes como el calcio, la fuente de nitrógeno y el zinc, mientras que la longitud de las mismas está influenciada por las concentraciones de fosforo, manganeso y por la fuente de nitrógeno (Schwambach *et al.*, 2005).

2.2.5. Micorrización.

La inoculación con hongos micorrízicos específicos parece aumentar la formación de raíces adventicias. En diversas especies forestales se ha descrito un aumento de la capacidad de enraizamiento mediada por la interacción con hongos micorrízicos; en varias especies de pino se ha descrito la influencia de la micorrización por diversas especies fúngicas en el éxito del enraizamiento adventicio, por ejemplo en *Pinus pinaster* y *P. sylvestris* la presencia del hongo *Hebeloma cylindroporum* promueve el enraizamiento adventicio y mejora la aclimatación (Gray, 1990; Normand *et al.*, 1996); también la inoculación de *P. sylvestris* con los hongos *Pisolithus tinctorius* o *Paxillus involutus* mejora las tasas de enraizamiento (Niemi *et al.*, 2002b). En otra especie forestal, *Picea abies*, la aplicación del hongo *Laccaria bicolor* S238 N y/o la bacteria *Pseudomonas fluorescens* BBc6 también promueven el enraizamiento (Karabaghli *et al.*, 1998).

El estudio del efecto inductor de los hongos micorrízicos del enraizamiento en especies forestales ha puesto de manifiesto que la inducción no sólo es debida a su capacidad de producir auxina (Karabaghli *et al.*, 1998; Niemi *et al.*, 2002b) ya que se ha comprobado en *P. sylvestris* la importancia de factores como las poliaminas, la fuente de luz y el lignosulfanato en el efecto potenciador del enraizamiento de los hongos micorrízicos *Pisolithus tinctorius* y *Paxillus involutus* (Niemi *et al.*, 2002a; Niemi *et al.*, 2005)

2.2.6. Otros compuestos

Se ha descrito la influencia de otros compuestos sobre el enraizamiento adventicio en distintas especies (revisados por Li *et al.*, 2009; Geiss *et al.*, 2009; Abarca y Díaz-Sala, 2009). A pesar de que no hay muchos estudios que detallen el efecto de la aplicación de compuestos fenólicos sobre la capacidad de enraizamiento, se ha comprobado que algunos de estos compuestos promueven el enraizamiento en especies leñosas. En manzano compuestos fenólicos como el ácido ferulico y el floroglucinol promueve la formación de raíces adventicias (James y Thurbon, 1981; De Klerk *et al.*, 1999) y tratamientos con flavonoides tales como la rutina en sequoia (Berthon *et al.*, 1987) o la

quercetina en *Ilex paraguariensis* (Tarrago *et al.*, 2005) mejoran las tasas de enraizamiento. También se han relacionado altas concentraciones de flavonoides endógenos con fenotipos de fácil enraizamiento de *Eucalyptus gunni* (Curir *et al.*, 1990). Sin embargo en líneas transformadas de nogal afectadas en el enzima chalcona sintasa, el bajo contenido en flavonoides se ha asociado con un aumento en la formación de raíces adventicias (El Euch *et al.*, 1998).

También las poliaminas afectan a la capacidad de enraizamiento con distintos efectos dependiendo del tipo de poliamina y la especie vegetal. En tallos de chopo la poliamina putrescina promueve el enraizamiento mientras que la espermidina y la espermita no influyen sobre la capacidad de enraizamiento (Hausman *et al.*, 1994), mientras que en manzano tanto la putrescina como la espermidina promueven el enraizamiento incluso en ausencia de auxina (Naija *et al.*, 2009). En general, los estudios de los efectos de distintos tipos de inhibidores de la biosíntesis de poliaminas sobre el enraizamiento sugieren un efecto inductor de estos compuestos sobre el enraizamiento adventicio (Biondi *et al.*, 1990; Hausman *et al.*, 1994; Naija *et al.*, 2009).

Otros compuestos bioactivos que afectan al enraizamiento adventicio son el jasmonato, que promueve el enraizamiento en tabaco (Fattorinni *et al.*, 2009); los derivados de difenilurea, que promueven el enraizamiento en manzano y en *Vinga radiata* (Ricci *et al.*, 2001) y que actúan como potenciadores del enraizamiento en presencia de auxina en pino (Ricci *et al.*, 2008) y el carbono activo que promueve el enraizamiento en explantos maduros de pino (Dumas y Monteui, 1995).

2.3. Sistemas experimentales para el estudio de la pérdida de capacidad de enraizamiento adventicio asociada a la edad.

Se han desarrollado sistemas experimentales para el estudio de los cambios celulares, fisiológicos y moleculares responsables de la pérdida de capacidad de enraizamiento adventicio asociada a la edad observada en muchas especies vegetales. En distintas especies de pino tales como *P. taeda* o *P. strobus* se han desarrollado sistemas experimentales simples en los que se observa que la capacidad enraizamiento adventicio en respuesta a auxina desciende e incluso desaparece en los primeros meses de vida de las plántulas, y, en algunos casos permiten realizar estudios comparativos de la pérdida de capacidad de enraizamiento adventicio entre tejidos competentes y no competentes a enraizar (Díaz-Sala *et al.*, 1996; Goldfarb *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2007). En todos ellos para la formación de raíces adventicias es necesaria una inducción por la aplicación de auxina exógena. En el caso de *P. taeda* las muestras con alta capacidad de enraizamiento adventicio son hipocótilos de plántulas de unas 3 semanas, mientras que el material con baja capacidad de enraizamiento son hipocótilos de plántulas de 50 días; como muestras de tejidos no competentes a enraizar utilizan epicótilos de plántulas de 50 días (Díaz-Sala *et al.*, 1996). En *P. strobus*, Goldfarb *et al.* (1998) realizan estudios de epicótilos juveniles y maduros mantenidos por cultivo in vitro en presencia de auxina.

Los sistemas experimentales para el estudio de la pérdida de capacidad de enraizamiento adventicio asociada a la edad en especies como castaño y roble también utilizan el cultivo *in vitro* para el mantenimiento de las estaquillas, como material juvenil con altas tasas de enraizamiento utilizan tallos provenientes de renuevos basales de árboles maduros y como material adulto, estaquillas provenientes de ramas de esos mismos árboles (Sánchez y Vieitez, 1991). En hiedra (*Hedera helix*), planta con dimorfismo foliar asociado a la edad y enraizamiento adventicio espontáneo en tallos juveniles, se observan diferencias en la capacidad de formación de raíces adventicias entre los pecíolos de hojas jóvenes y de hojas maduras, que ha sido utilizado para el estudio de la pérdida de potencial de enraizamiento adventicio (Geneve, 1991; Woo *et al.*, 1994).

También se ha descrito un sistema experimental para el estudio de la pérdida de potencial de enraizamiento asociada a la edad en la planta modelo *Arabidopsis*, planta herbácea con gran capacidad de enraizamiento (Day *et al.*, 2002; Díaz-Sala *et al.*, 2002). La inducción de formación de raíces adventicias en *Arabidopsis* se lleva a cabo a partir de plantas de distintas edades a las que se les ha eliminado el sistema radicular. A pesar de que en este sistema experimental no es necesaria la aplicación de auxina exógena para el enraizamiento, se ha comprobado la implicación de esta hormona en el proceso de enraizamiento mediante la aplicación de inhibidores del transporte polar auxínico y la independencia de la pérdida de potencial de enraizamiento con la disponibilidad de auxina ya que la aplicación exógena de la misma no mejora las tasas de enraizamiento (Díaz-Sala *et al.*, 2002). La drástica disminución de la tasa de enraizamiento asociada a la edad en *Arabidopsis* es muy similar a la descrita en especies forestales (Díaz-Sala *et al.*, 1996; Goldfarb *et al.*, 1998; Díaz-Sala *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2007) por lo que este sistema experimental permite el estudio de la pérdida de potencial de enraizamiento asociado a la edad en una especie de fácil manejo y transformación y de la que hay disponible gran cantidad de mutantes e información genética.

Todos estos sistemas experimentales junto con aquellos que se han desarrollado para el estudio de los mecanismos de formación de raíces adventicias e incluso los estudios de formación de raíces laterales y raíz principal podrían aportar una gran cantidad de información para ahondar en el conocimiento de los procesos involucrados en la formación de raíces adventicias, su regulación y las causas de la pérdida de capacidad de enraizamiento asociada a la edad en especies forestales.

2.4. Papel de la auxina en el enraizamiento adventicio.

2.4.1. Transporte polar auxínico.

La auxina juega un papel crucial en la formación, el desarrollo y el crecimiento de raíces en plantas (Blilou *et al.*, 2005; Teale *et al.*, 2005). También es necesaria durante las primeras etapas de formación de primordios de raíces laterales (Reed *et al.*, 1998; Casimiro *et al.*, 2001; Dubrovsky *et al.*, 2001; Casimiro *et al.*, 2003) y adventicias (Díaz-Sala *et al.*, 1996; Greenwood *et al.*, 2001). De hecho, en la formación de raíces adventicias juega un papel fundamental en la inducción del enraizamiento y en muchas especies forestales es necesaria la aplicación de auxina exógena para la formación de raíces adventicias (Grönroos y Von Arnold, 1985; Grönroos y Von Arnold, 1987; Selby *et al.*, 1992; Díaz-Sala *et al.*, 1996; Goldfarb *et al.*, 1998; Ballester *et al.*, 1999). Esta hormona es sintetizada en las regiones jóvenes y se transporta por la combinación de dos procesos, el transporte a través del floema y el transporte direccional denominado transporte polar auxínico que es el responsable de generar gradientes fisiológicamente significativos en la planta (Friml *et al.*, 2003; Kerr y Bennett, 2007). El transporte direccional, fundamental para la formación de raíces, consiste en el movimiento de la auxina de célula a célula por la acción de transportadores específicos de entrada y salida (Kerr y Bennett, 2007).

Como se ha mencionado anteriormente, la presencia de auxina es uno de los requerimientos más obvios para la formación de raíces adventicias en especies forestales. La mayoría de estudios sobre la función de la auxina en el enraizamiento adventicio se han planteado como estudios de dosis-respuesta. Sin embargo, las numerosas inconsistencias en la respuesta a auxina entre especies podría deberse, además de las variaciones experimentales, a diferencias en el contenido endógeno de hormona, la tasa de metabolismo, efectos estacionales o el estado nutricional. Además, diferencias en la respuesta a auxina podrían estar relacionadas con la competencia intrínseca celular para iniciar meristemas de raíz en respuesta a la presencia de hormona.

Grönroos y Von Arnold (1988) y Díaz-Sala *et al.* (1996) demostraron que las diferencias en la capacidad de enraizamiento entre estaquillas de *P. sylvestris* y entre hipocótilos y epicótilos de diferentes progenies de *P. taeda*, no estaban relacionadas con diferencias en la absorción, acumulación, o metabolismo de auxina exógena; por tanto, la concentración absoluta de auxina o la sensibilidad a la misma, no parecen estar relacionados con la variación genética o de desarrollo en la capacidad de enraizamiento. Sin embargo, el efecto de la aplicación de inhibidores del transporte polar auxínico, como el ácido 1-N-Naftiltalámico (NPA) indica que el transporte polar auxínico juega un papel muy importante en este proceso (Greenwood y Weir, 1994; Díaz-Sala *et al.*, 1996). Respuestas similares fueron descritas en embriones de *Pinus lambertiana* por Greenwood y GoldSmith (1970). El requerimiento de transporte polar auxínico ocurre sólo durante los dos primeros días de inducción del proceso. La aplicación de NPA tres o seis días después del tratamiento auxínico no tiene efectos inhibitorios (Díaz-Sala *et al.*, 1996). Según Hutchison *et al.* (1999), quizá durante los 2-3 primeros días las células se determinen para formar raíces adventicias

volviéndose insensibles al tratamiento con NPA. Análisis de la absorción y metabolismo de auxina en presencia de NPA muestran que el efecto inhibitorio no es debido a un descenso en la concentración de auxina en la base de la estacilla; por tanto, la inhibición del enraizamiento por medio de NPA indica que la auxina exógena podría ser absorbida vía transpiración y cargada en el transporte basipétalo de auxina (Díaz-Sala *et al.*, 1996).

Aunque el transporte polar auxínico es importante para la inducción de raíces adventicias, el descenso en la capacidad de enraizamiento de epicótilos de plántulas de *P. taeda* no está correlacionada con un descenso en la tasa de transporte auxínico (Díaz-Sala *et al.*, 1996). Además, aunque los epicótilos no enraízan bien, la presencia de acículas en los mismos aumenta el enraizamiento de los hipocótilos. Estos resultados sugieren que posibles factores inhibitorios presentes en los epicótilos no parecen estar relacionados con la falta de capacidad para formar raíces adventicias (Díaz-Sala *et al.*, 1996). Por tanto, en términos de respuesta a auxina, la falta de capacidad de enraizamiento es resultado de una pérdida de capacidad celular para responder a auxina e inducir raíces adventicias. Se desconoce si esto es debido a la pérdida de tipos celulares específicos, la incapacidad de células específicas para percibir la señal auxínica específica para la formación de un meristemo de raíz, o a la supresión de rutas de expresión génica necesaria para que las células entren en la ruta de formación de raíces (Díaz-Sala *et al.*, 1996; Hutchison *et al.*, 1999).

Greenwood *et al.* (2001), utilizando discos de 1 mm de hipocótilos y epicótilos de *P. taeda*, determinó la secuencia de acontecimientos llave inducidos por auxina asociados con la desdiferenciación celular y división celular durante la inducción de callo. Estos trabajos añadieron datos al cuerpo de evidencias que apoyan la hipótesis de que la pérdida de capacidad de enraizamiento en respuesta a auxina no es debido a una falta inicial de respuesta a auxina. La secuencia y el tiempo necesario para la reorganización celular, el inicio de divisiones celulares y la tasa de frecuencia mitótica fueron similares en discos de hipocótilos y epicótilos. Por tanto, la hipótesis generalizada de que los epicótilos responden más lentamente que los hipocótilos en términos de reorganización y división celular fue rechazada. Aunque otros factores extrínsecos, luz, azúcar, u otras hormonas, podrían promover enraizamiento, la falta de ellos no explica la pérdida de potencial de enraizamiento de epicótilos (Díaz-Sala *et al.*, 1996; Greenwood *et al.*, 2001). Por tanto, la auxina parece ser un disparador inespecífico de reacciones celulares específicas, y la pérdida de capacidad de enraizamiento es el resultado de la pérdida de una capacidad intrínseca celular para organizar meristemas de raíz en respuesta a auxina, quizá debido a la supresión de rutas de expresión génica necesarias para que las células entren en la ruta de formación de raíces (Díaz-Sala *et al.*, 1996; Hutchison *et al.*, 1999). Según Greenwood *et al.* (2001), la competencia de enraizamiento es la consecuencia última de una expresión diferencial de genes involucrados en todas las fases de la formación de meristemas de raíz. Puesto que no se han caracterizado rutas específicas de transducción de señal de auxina en términos de enraizamiento, la caracterización de

los programas de expresión génica asociados a la respuesta de enraizamiento podría ser un camino de estudio fructífero.

2.4.2. Señalización de auxina.

A pesar de que las rutas de señalización de auxina involucradas en la formación y desarrollo de raíces en plantas aún no han sido dilucidadas, se han caracterizado varias familias de proteínas implicadas en esta señalización y genes relacionados con su mecanismo de acción que podrían estar relacionados con la inducción y desarrollo radicular.

Se han descrito varias proteínas y familias proteicas involucradas en la señalización auxínica en plantas. La familia de proteínas PIN, descritas como transportadores del flujo auxínico (Friml *et al.*, 2003; Blilou *et al.*, 2005) y diversas proteínas relacionadas con su regulación (Steinmann *et al.*, 1999; Bennett *et al.*, 1995; Blilou *et al.*, 2005); las proteínas de unión a auxina (Chen *et al.*, 2001); las familias de proteínas de respuesta temprana a la señalización auxínica, como las familias AUX o ARF (Hagen y Guilfoyle, 2002; Liscum y Reed, 2002; Kerr y Bennett, 2007) y las proteínas relacionadas con su regulación (Gray *et al.*, 2001; Blilou *et al.*, 2002).

La familia de proteínas PIN determinan el correcto transporte polar de la auxina por su localización asimétrica en la membrana celular y han sido descritas como facilitadores del flujo auxínico desde las células (“efflux carriers”) (Friml *et al.*, 2003; Blilou *et al.*, 2005). En *Arabidopsis* mutantes de distintos miembros de esta familia presentan fenotipos con alteraciones mínimas, sin embargo cuando los mutantes son dobles, triples y cuádruples de distintos miembros de la familia PIN, especialmente cuando el gen *PIN2* aparece alterado, presentan fenotipos con graves alteraciones en la raíz (Friml *et al.*, 2003). Estas proteínas parecen regular la zona de elongación, el tamaño del meristemo radicular y el tamaño celular final, probablemente regulando los cambios en la distribución auxínica que dan lugar a respuestas transcripcionales y traduccionales específicas (Blilou *et al.*, 2005). La correcta distribución de las proteínas PIN en la membrana plasmática es fundamental para el desarrollo radicular, alteraciones de la expresión de genes responsables de la localización de estas proteínas dan lugar a severas alteraciones en el desarrollo. Mutaciones en el gen *GNOM*, que codifica para una proteína de intercambio de GDP/GTP que promueve el transporte asimétrico de proteínas PIN (Steinmann *et al.*, 1999), provocan alteraciones en el mantenimiento del meristemo de la raíz principal y en la iniciación y organización de primordios de raíces laterales (Geldner, 2004). Mientras que la sobreexpresión de *PINOID* en *Arabidopsis* da lugar a fenotipos con severas alteraciones en el desarrollo radicular (Benjamins *et al.*, 2001); este gen codifica para una serin-treonin quinasa que determina la distribución asimétrica de, al menos, un miembro de la familia PIN (Bennett *et al.*, 1995). Los genes *PLETHORA*, directamente implicados en el mantenimiento del meristemo radicular, parecen regular la expresión de genes *PIN* (Blilou *et al.*, 2005). Recientemente, Xu *et al.* (2006) proponen un modelo según el cual la acumulación localizada de auxina como consecuencia de ablación por láser del centro quiescente

de la raíz de *Arabidopsis* genera una señalización en la que están implicados los genes *PLETHORA*, *SHORT-ROOT (AtSHR)* y *SCARECROW (AtSCR)* y gracias a la cual se induce la expresión de proteínas PIN y se determina su correcta localización para reconstituir el flujo polar auxínico.

Se han descrito proteínas de unión a auxina (ABP) de las que la mejor caracterizada es la proteína ABP1 (auxin binding protein), las mutaciones *abp1* son letales debido a la ausencia de elongación celular durante la embriogénesis (Chen *et al.*, 2001) y no se han descrito efectos en la expresión de genes asociados con esta proteína.

También se han identificado una serie de genes involucrados en las primeras etapas de respuesta celular ante la señalización auxínica. Pertenecen a dos familias de factores de transcripción, las proteínas ARF (“auxin response factors”) y las proteínas Aux/IAA (“Auxin/Indol Acetic Acid”) que juegan un papel fundamental en la regulación de la señalización auxínica mediando la expresión de genes de respuesta a auxina, en el caso de las ARFs por unión a elementos de respuesta a auxina presentes en los promotores de algunos genes. La regulación de los genes que codifican para estas dos familias proteicas está sometida a un fino control. En *Arabidopsis* se han descrito tres genes denominados *LAX1*, *LAX2* y *LAX3* (“like AUX”) relacionados por similitud con la proteína AUX1 que se expresan predominantemente en raíz y tejido vascular aéreo (Swarup *et al.*, 2001) y que ha llevado denominar como AUX/LAX (“Auxin permease/like AUX”) la posible familia de importadores de auxina (Kerr y Bennett, 2007).

De acuerdo con el modelo actual, las proteínas Aux/IAA reprimen la expresión de las ARFs, impidiendo su acción sobre genes de respuesta a auxina (Hagen y Guilfoyle, 2002; Liscum y Reed, 2002). Uno de los efectos de la auxina sobre las proteínas Aux/IAA es el de potenciar su degradación por la acción del complejo ubiquitin-ligasa SCF^{TIR1}, eliminando la represión sobre las ARFs y permitiendo la inducción o represión de genes involucrados en la respuesta a auxina (Gray *et al.*, 2001). Esta respuesta se produce por interacción directa de la auxina con la subunidad TIR1 del complejo SCF^{TIR1} (Kepinski y Leyser, 2005). Sin embargo se desconocen las propiedades particulares de los diferentes tejidos que provocan las distintas respuestas ante la señalización auxínica. Mutaciones en los genes que codifican para miembros las familias ARF y Aux/IAA provocan fenotipos con alteraciones en el desarrollo radicular. Se han descrito mutantes incapaces de desarrollar la raíz embrionaria tales como *bdl* (bodenlos) y *mp* (monopteros) (Berleth y Jurgens, 1993; Hamann *et al.*, 1999) en los que los genes responsables de las alteraciones codifican para miembros las familias ARF y Aux/IAA, el gen *BDL* codifica para la proteína IAA12 y el gen *MP* para ARF5 (Hamann *et al.*, 2002). También se han descrito fenotipos en la formación y desarrollo de raíces adventicias por alteración de genes que codifican para miembros de la familia Aux/IAA; *axr3* (*AXR3* codifica para IAA17) muestra raíces cortas y gran cantidad de raíces adventicias (Leyser *et al.*, 1996), mientras que *shy2* (*SHY2* codifica para IAA3) presenta largas raíces y pocas raíces adventicias (Tian y Reed, 1999). Debido a la alta capacidad de las proteínas Aux/IAA para

formar homodímeros, dimerizar entre ellas y formar dímeros con las ARFs, Knox *et al.* (2003) sugiere un control de la diferenciación radicular dependiente de los balances de las distintas formas de dimerización. Alteraciones en genes de distintos elementos de la ruta de degradación de las Aux/IAA también provocan fenotipos con alteraciones en el desarrollo radicular, mutaciones en el gen *AXR6* (“auxin resistant”), que codifica para una subunidad del complejo SCF de degradación de proteínas Aux/IAA, provocan fenotipos similares a los observados en *bdl* y *mp* con severas alteraciones en la formación de la raíz embrionaria (Hobbie *et al.*, 2000), mientras que mutantes del gen *AXR1*, que codifica para una proteína necesaria en la activación del complejo SCF, presentan reducción de la cantidad de raíces laterales y de la respuesta gravitrópica (Gray *et al.*, 1999; del Pozo y Estelle, 1999; Gray *et al.*, 2001). Es posible que otras rutas de degradación de las proteínas Aux/IAA dependientes de auxina operen en plantas, ya que mutaciones en el gen *HOBBIT (HBT)*, que codifica para una subunidad de un complejo ubiquitin-ligasa distinto de SCF^{TIR1} (Blilou *et al.*, 2002) afectan, entre otros, a la diferenciación del centro quiescente y a la división celular durante la formación de primordios radiculares postembrionarios, además se ha observado acumulación de proteínas Aux/IAA en el mutante *hbt*, lo que podría determinar la falta de respuesta a la señal auxínica (Willemsen *et al.*, 1998; Blilou *et al.*, 2002).

2.5. Aspectos bioquímicos y moleculares del enraizamiento adventicio.

Debido a que los intentos de aumentar la capacidad de enraizamiento mediante tratamientos exógenos no han sido definitivos a la hora de mejorar este carácter, se ha hecho necesario el estudio de las rutas bioquímicas y moleculares funcionalmente involucradas en la pérdida de capacidad de enraizamiento que puedan ser utilizados para predecir la capacidad de enraizamiento adventicio de los individuos adultos y, a medio plazo, incluso para tratar de modificar dicha capacidad optimizando los procesos de selección y propagación de individuos sobresalientes.

Actualmente no se conocen las rutas de señalización ni los genes involucrados en las distintas etapas de la formación de raíces adventicias, sin embargo, se han descrito genes y proteínas relacionados con este proceso, algunos de los cuales están directamente implicados en la señalización auxínica necesaria para la formación de meristemos postembrionarios que den lugar a raíces adventicias.

Entre las rutas bioquímicas relacionadas con el proceso de enraizamiento destacan las mediadas por peroxidasas que parecen jugar un papel fundamental en el proceso de enraizamiento adventicio y han sido estudiadas como marcadores bioquímicos de las diferentes fases del proceso de enraizamiento según los cambios en los patrones de isoformas de peroxidasas y de la actividad de estas enzimas (Tonon *et al.*, 2001; Martínez-Pastur *et al.*, 2001; Metaxas *et al.*, 2004; Syros *et al.*, 2004). En algunas especies como *Arbutus unedo*, *Taxus baccata*, *Ebenus cretica* o *Sequoiadendron giganteum* se ha podido establecer una relación positiva entre la actividad peroxidasa y el

enraizamiento, de forma que la formación de raíces comenzaría una vez que las estaquillas alcanzasen un pico de máxima actividad peroxidasa (Berthon *et al.*, 1987; Syros *et al.*, 2004; Metaxas *et al.*, 2004). En *Notofagus* se ha encontrado un patrón de isoformas de peroxidasas consistente en relación con las diferentes fases del proceso de enraizamiento (Martínez-Pastur *et al.*, 2001). Factores como el óxido nítrico (NO), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), la guanosina monofosfato cíclica (CMPc) o las MAPKs (mitogen-activated protein kinase) han sido estudiados en relación con el enraizamiento adventicio (revisado por Geiss *et al.*, 2009). Estudios en especies como *Vinga radiata* o *Cucumis sativus* han puesto de manifiesto su importancia como componentes de las rutas de señalización de enraizamiento, tanto en rutas de señalización auxínica como en rutas independientes de la señalización auxínica (Lanteri *et al.*, 2006; Li y Xue, 2010). Estos estudios suponen un avance hacia el conocimiento de las diferentes rutas de señalización de enraizamiento y el conocimiento de los diferentes elementos de las mismas.

A nivel molecular, en pino se han identificado diversos genes relacionados con el proceso de enraizamiento adventicio. En *P. contorta* se ha descrito un gen que codifica para una S-adenosilmetionin sintasa que se expresa durante las primeras etapas de formación de los primordios radiculares adventicios y en la región meristemática de las raíces adventicias (Lindroth *et al.*, 2001) y en *P. taeda* se ha descrito un gen homólogo a las α -expansinas inducido en tejidos competentes a enraizar tras 24 horas de tratamiento auxínico (Hutchison *et al.*, 1999). También se han identificado en *P. taeda* genes que presentan expresión diferencial durante el enraizamiento adventicio, los genes *PtIAA* genes ortólogos a los genes *Aux/IAA* de *Arabidopsis* (Goldfarb *et al.*, 2003) y el gen *5NG4*, que codifica para una proteína transmembrana y presenta expresión diferencial relacionada con la pérdida de potencial de enraizamiento asociada a la edad (Busov *et al.*, 2004).

En otras especies forestales también se han descrito genes implicados en el enraizamiento y la pérdida de potencial de enraizamiento asociado a la edad, en *H. helix* (Woo *et al.*, 1994; Murray *et al.*, 1994; Sánchez *et al.*, 1995) y en roble (Sánchez *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 2000) se han descrito sendas proteínas de pared celular asociadas a la capacidad de enraizamiento. En manzano, especie leñosa hortícola, se ha identificado el gen que codifica para una dioxigenasa dependiente de 2-oxoácido que se expresa de forma diferencial durante el enraizamiento adventicio (Butler y Gallagher, 1999).

A pesar de la caracterización de genes involucrados en distintas etapas de la formación de raíces adventicias en especies forestales aún no se han podido establecer rutas de señalización ni determinar la implicación concreta de estos genes en los cambios celulares que permiten el desarrollo de primordios radiculares y raíces adventicias y que están implicados en la pérdida de potencial de enraizamiento en la fase madura del desarrollo.

Además de los estudios realizados en especies forestales, se han descrito algunos genes relacionados con la formación de raíces adventicias en otras especies vegetales. En la mayoría de los casos se ha detectado expresión de estos genes relacionada también con el proceso de

formación de raíces laterales. En *Arabidopsis*, el gen *AGO1*, miembro de una familia de genes involucrados en la regulación del silenciamiento de genes post-transcripcional parece estar involucrado en la formación de raíces adventicias mediante la regulación de la expresión de *ARF17*, miembro de la familia ARF, factores de transcripción que regulan la expresión de genes de respuesta a auxina (Sorin *et al.*, 2005). Otros estudios, mediante análisis de histolocalización de la β -glucuronidasa, han permitido la identificación de genes que se expresan en las primeras etapas de formación de primordios de raíces adventicias tales como el gen *LRPI* en *Arabidopsis* (Smith y Fedoroff, 1995) o el gen *HRGPnt3* en tabaco (Vera *et al.*, 1994). En arroz se ha identificado un gen de respuesta a auxina necesario para la formación de primordios radiculares adventicios denominado *ARL1* que codifica para una proteína de localización nuclear con un dominio LOB (Lateral Organ Boundaries) que parece actuar como factor de transcripción (Liu *et al.*, 2005).

Por otro lado, se han identificado mutantes que presentan fenotipos con alteraciones en la formación de raíces adventicias. El mutante *rac* de tabaco no tiene capacidad para el desarrollo de raíces adventicias (Muller *et al.*, 1985; Lund *et al.*, 1996), estudios comparativos de este mutante con el fenotipo silvestre sugieren que el gen alterado podría estar modificando de forma específica la ruta de transducción de señal dependiente de auxina necesaria para la formación de raíces adventicias (Lund *et al.*, 1997). En *Arabidopsis* se han obtenido nueve mutantes con alteraciones en diferentes fases de la formación de raíces adventicias, una de estas mutaciones ha sido identificada en el gen *MORI/GEM1* que codifica para una proteína asociada a microtúbulos (Konishi y Sugiyama, 2003). También en arroz se han aislado cuatro mutantes con defectos en la formación de raíces adventicias (Liu *et al.*, 2009); uno de ellos presenta mutado el gen *OsGNOM1*, gen que interviene en la formación de raíces adventicias por regulación del transporte polar auxínico (Liu *et al.*, 2009).

Además de todos estos estudios concretos de uno o pocos genes o mutantes, en los últimos años se han desarrollado estudios de expresión génica a gran escala y análisis proteómico que aportan gran cantidad de información preliminar gracias a la identificación de nuevos genes implicados en el proceso de formación de raíces adventicias. En pino se han llevado a cabo dos estudios de expresión génica a gran escala para la identificación de genes asociados al enraizamiento adventicio, Brinker *et al.* (2004) analizan la expresión génica mediante microarrays durante la formación de raíces adventicias en hipocótilos de *P. contorta* tratados con auxina en cinco fases correlativas del desarrollo de las raíces adventicias, relacionando la expresión de factores de transcripción como *PINHEAD/ZWILLE* con las primeras etapas de inducción de raíces adventicias dependiente de auxina exógena. Díaz-Sala *et al.* (comunicación personal) compara, mediante hibridación sustractiva, la expresión de genes durante las primeras etapas de inducción del enraizamiento en *P. radiata* en presencia y ausencia de inducción auxínica para la formación de raíces adventicias. También en la especie leñosa modelo *Populus* se han identificado seis QTLs relacionados con la capacidad de enraizamiento adventicio por comparación de dos especies, una

con alta capacidad de enraizamiento y la otra con baja capacidad de enraizamiento (Zhang *et al.*, 2009). En *Arabidopsis* se ha realizado un análisis proteómico por comparación de mutantes de diferentes etapas de formación de raíces adventicias (Konishi y Sugiyama, 2003) con plantas silvestres con el fin de identificar proteínas específicas del proceso de formación de raíces adventicias.

Además de los estudios específicos de formación de raíces adventicias, los estudios de genes involucrados en los procesos de formación de raíz principal y especialmente en formación de raíces laterales aportan gran cantidad de información que es conveniente tener en consideración a la hora de abordar estudios posibles genes involucrados en el enraizamiento adventicio. En *Arabidopsis* se ha descrito el gen *NAC1*, factor de transcripción implicado en la activación de genes de respuesta a auxina y cuya represión supone un detrimento en el número de raíces laterales (Xie *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2002) y en tomate se ha detectado expresión del gen *RSI-1* durante las primeras etapas de formación de primordios de raíces laterales (Taylor y Scheuring, 1994). También en este caso se han realizado estudios de expresión génica a gran escala, Birnbaum *et al.* (2003) realizan un mapa espacial y temporal de la expresión de genes en la raíz de *Arabidopsis*, en el que relaciona grupos de genes involucrados en la misma ruta de señalización hormonal con su expresión en zonas concretas de la raíz. Czechowski *et al.* (2004) identifica factores de transcripción específicos de raíz o de tallo en *Arabidopsis* mediante RT-PCR a tiempo real; en este estudio encuentran 35 factores de transcripción exclusivos de raíz, la mayoría de los cuales no habían sido identificados como órgano-específicos. Himanen *et al.* (2004) analizan la expresión diferencial en *Arabidopsis* de unos 4600 genes en el proceso de formación de raíces laterales inducida por auxina encontrando expresión diferencial de genes entre las distintas etapas de la formación de raíces laterales.

A pesar de que aun no se conocen las rutas de señalización ni los genes involucrados en las distintas etapas de la formación de raíces adventicias, hay disponible gran cantidad de información que es necesario analizar y caracterizar en profundidad para llegar a identificar genes que puedan ser utilizados como marcadores de la capacidad de enraizamiento adventicio o permitan modificar este carácter de forma que no se altere como consecuencia de la madurez.

3. Familia de proteínas GRAS.

3.1. Generalidades.

En 1999 Pysh *et al.* (1999) dan nombre a la familia de proteínas GRAS a partir de las siglas de los tres primeros miembros descritos (GAI, RGA y SCR; Di Laurenzio *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 1997; Silverstone *et al.*, 1998). En esta familia se agrupan una serie de genes relacionados con distintos procesos del desarrollo vegetal que comenzaron a identificarse en diversas especies vegetales a finales de los años 90 (Pysh *et al.*, 1999).

La familia *GRAS* es una familia de genes de plantas con motivos característicos que codifican para posibles factores de transcripción. Actualmente se han descrito gran cantidad de miembros de esta familia, en *Arabidopsis* se han identificado más de 30 genes *GRAS* y alrededor de 50 en arroz y maíz (Bolle, 2004; Tian *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2005), también se han descrito genes *GRAS* en otras especies como *Medicago*, *Lupinus*, pino, castaño, petunia o guisante (Sassa *et al.*, 2001; Kamiya *et al.*, 2003; Imin *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2007; Laajanen *et al.*, 2007; Solé *et al.*, 2008; Sbabou *et al.*, 2010; Vielba *et al.*, 2011). Están implicados en procesos de crecimiento y desarrollo vegetal muy diversos, tales como transducción de la señal de giberelinas (Peng *et al.*, 1997; Silverstone *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 1999; Ikeda *et al.*, 2001), iniciación de meristemas axilares (Schumacher *et al.*, 1999; Greb *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003), mantenimiento del meristemo apical (Stuurman *et al.*, 2002), mantenimiento del centro quiescente y organización radial de la raíz (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Helariutta *et al.*, 2000), transducción de la señal del fitocromo A (Bolle *et al.*, 2000) o gametogénesis masculina (Morohashi *et al.*, 2003).

En relación con la formación y el mantenimiento de la raíz, los miembros más estudiados de esta familia han sido *SCARECROW (SCR)* y *SHORT-ROOT (SHR)*. Aunque también se ha encontrado expresión mayoritaria en raíz de otros miembros de la familia *GRAS* como *AtSCL9*, *AtSCL11*, *AtSCL14* o *BnSCL1* (Pysh *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2004).

A pesar de que la región amino terminal de las proteínas *GRAS* difiere considerablemente entre los distintos miembros de la familia, en la región carboxi terminal se encuentran los motivos altamente conservados LHRI, VHII, LHRII, PFYRE y SAW (Pysh *et al.*, 1999). Aunque no están claras las funciones concretas de todos los motivos descritos, se han propuesto papeles funcionales para algunos de ellos. Los motivos ricos en leucina (LHRI y LHRII) podrían estar implicados en interacciones proteína-proteína (Bolle, 2004) y la sucesión de motivos LHRI, VHII y LHR II podría actuar como motivo de interacción proteína-ADN y oligomerización (Pysh *et al.*, 1999) de forma análoga a lo descrito en las interacciones de ADN y proteínas bZIP (Ellenberger *et al.*, 1992).

Dado que esta familia multigénica está implicada en la regulación de una gran diversidad de procesos del desarrollo vegetal, el estudio de las formas de regulación de la expresión y de las funciones concretas de los distintos miembros de esta familia permitirá ahondar en el conocimiento del desarrollo vegetal. En relación con el enraizamiento algunos de los miembros de esta familia, en especial *SCR* y *SHR*, son genes candidato para intervenir en el proceso de formación de raíces adventicias como reguladores de la expresión génica y por tanto su caracterización y el estudio de sus papeles funcionales concretos podrían proporcionar nuevos datos sobre la regulación del proceso de enraizamiento.

3.2. SCARECROW y SHORT-ROOT.

En *Arabidopsis*, *SCARECROW* (*AtSCR*) y *SHORT-ROOT* (*AtSHR*) son genes fundamentales para la formación de raíces y el mantenimiento del centro quiescente y el meristemo radicular.

AtSHR y *AtSCR* son miembros de la familia *GRAS* necesarios para la identidad del meristemo radicular y están implicados en establecimiento del patrón radial de la raíz. Mutaciones de estos genes, dan lugar a severas alteraciones en el desarrollo radicular (Benfey *et al.*, 1993; Scheres *et al.*, 1995).

En los mutantes *shr* se observa una desorganización progresiva del centro quiescente junto a la pérdida de actividad de las células madre de raíz y la detención del crecimiento radicular. Además, mutaciones en el gen *AtSHR* afectan el establecimiento del patrón radial de la raíz, ya que en estos mutantes, la célula hija de la célula inicial para cortex/endodermis no se divide y da lugar a una sola fila celular con atributos de células corticales (Benfey *et al.*, 1993; Helariutta *et al.*, 2000). Por tanto, *AtSHR* está implicado en el mantenimiento del meristemo radicular, en la división asimétrica de la célula inicial para cortex/endodermis y en la especificación de las células del cortex. Además de su papel principal en el desarrollo y mantenimiento del sistema radicular *AtSHR* interviene en el desarrollo vascular en *Arabidopsis* (Levesque *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2010; Carlsbecker *et al.*, 2010) y regula la activación espacio-temporal de genes involucrados en la división celular (Sozzani *et al.*, 2010).

La expresión del gen *AtSHR* se encuentra limitada a la zona de la estela, sin embargo la proteína para la que codifica es capaz de transportarse a tejidos adyacentes, encontrándose en endodermis, en células iniciales de cortex/endodermis y en el centro quiescente, además de hallarse en los tejidos vasculares donde se transcribe (Nakajima *et al.*, 2001). Para que *AtSHR* lleve a cabo su función en el desarrollo radicular es necesario que tenga lugar el transporte a tejidos adyacentes (Gallagher y Benfey, 2009). En las células vasculares, *AtSHR* se encuentra en citoplasma y núcleo, mientras que, en la endodermis, la proteína *AtSHR* parece encontrarse exclusivamente en el núcleo; Gallagher *et al.* (2004) sugieren un modelo de movimiento de la proteína en la que estarían implicados distintos transportadores. En arroz se han identificado los genes *OsSHR1* y *OsSHR2*. El gen *OsSHR1* presenta el mismo patrón de expresión tisular a nivel radicular que *AtSHR* (Cui *et al.*, 2007) y, *OsSHR2* (nomenclatura según Cui *et al.*, 2007), se expresa predominantemente en raíz (Kamiya *et al.*, 2003). En *Medicago trunculata* el gen *MtSHR1* se expresa principalmente en la región apical de la raíz durante la formación de raíces *in vitro* (Imin *et al.*, 2007).

En *Arabidopsis*, el mutante *scr* presenta un fenotipo muy similar al descrito en mutaciones del gen *AtSHR* (Di Laurenzio *et al.*, 1996). Helariutta *et al.* (2000) demuestran que *AtSHR* es necesario para la activación transcripcional de *AtSCR*, actuando aguas arriba del mismo. Además, las zonas de localización de proteína *AtSHR* coinciden con las de transcripción de *AtSCR* (endodermis, células iniciales de cortex/endodermis y centro quiescente). Levesque *et al.* (2006) ha demostrado que *AtSCR* es una diana directa de *AtSHR*. Tanto *AtSHR* como *AtSCR* controlan la división

periclinal de la célula inicial de cortex-endodermis, sin embargo, tan solo AtSHR parece implicado en la determinación celular ya que en mutantes *scr* la línea de células resultante de la falta de división asimétrica de la célula hija de la célula inicial de cortex/endodermis presenta características propias de ambos tejidos (Di Laurenzio *et al.*, 1996), mientras que estas células en los mutantes *shr* presentan identidad de endodermis, infiriéndose el papel de AtSHR en la identidad de las células corticales.

Además de su papel en la división asimétrica de la célula inicial de cortex-endodermis, AtSCR juega, al igual que AtSHR, un papel importante en el mantenimiento del meristemo. Mutaciones en *AtSCR* provocan la terminación temprana del meristemo. Sabatini *et al.* (2003) diferencian el papel de AtSCR en el patrón radial de su papel en el mantenimiento del centro quiescente otorgándole dos funciones independientes en el desarrollo de la raíz, por un lado la división asimétrica de las células iniciales para cortex-endodermis, y por otro el mantenimiento del centro quiescente. Estos resultados sugieren que AtSCR tiene dianas distintas en el centro quiescente y en la endodermis. Una posible explicación para programas transcripcionales tan distintos debidos a AtSCR en centro quiescente y en endodermis podría hallarse en la combinación de la expresión de este gen y las diferencias existentes entre los dos tipos celulares debidas a los flujos de auxina. Es posible que la combinación entre el dominio de auxina y la expresión de AtSCR especifique la localización del centro quiescente, otorgando un posible mecanismo por el que una única combinación de factores puede ser la responsable de las diferentes dianas de SCR en el centro quiescente y la endodermis (Birnbaum y Benfey, 2004).

Durante la formación de raíces laterales en *Arabidopsis* se ha detectado expresión del gen testigo para la β -glucuronidasa (GUS) en una línea de trampas de potenciadores de la transcripción (END 199) (Malamy y Benfey, 1997) asociada con AtSCR. La expresión de GUS se detecta en la zona del periciclo durante las primeras divisiones necesarias para la formación de primordios radiculares, lo que sugiere la implicación de AtSCR en las primeras etapas de formación de primordio de raíz lateral. Esta línea transgénica también ha sido estudiada durante el enraizamiento adventicio inducido por auxina (Konishi y Sugiyama, 2006) y se ha detectado expresión del gen testigo en células del periciclo de estaquillas de hipocótilos durante el proceso de formación de raíces adventicias.

En *Arabidopsis*, la expresión de *AtSCR* parece depender directamente de la expresión de *AtSHR* (Helariutta *et al.*, 2000; Nakajima *et al.*, 2001; Gallagher *et al.*, 2004; Sena *et al.*, 2004), y se ha demostrado que *AtSCR* es una de las dianas directas de AtSHR lo que apoya la idea de que AtSHR y AtSCR se encuentran en la misma ruta de señalización, al menos para desarrollar algunas de sus funciones (Levesque *et al.*, 2006). Además se han encontrado evidencias de interacción directa entre estas proteínas que sugieren que AtSCR es el responsable de la localización nuclear de AtSHR y, por tanto, necesario para su función como activador transcripcional (Cui *et al.*, 2007). Además de su papel fundamental en el desarrollo radicular, estudios recientes sugieren otras

posibles funciones de AtSCR ya que se ha descrito una relación indirecta de la expresión de *AtSCR* con el desarrollo del tejido vascular (Carlsbecker *et al.*, 2010) y con la activación de genes del ciclo celular (Sozzani *et al.*, 2010).

Se han descrito genes homólogos a *AtSCR* en maíz (*ZmSCR*), guisante (*PsSCR*), arroz (*OsSCR1*), *P. sylvestris* (*PsySCR*), *M. trunculata* (*MtSCR*) y *Lupinus* (*LaSCR*) (Lim *et al.*, 2000; Sassa *et al.*, 2001; Kamiya *et al.*, 2003; Laajanen *et al.*, 2007; Imin *et al.*, 2007; Sbabou *et al.*, 2010). Además de la similitud de secuencia, presentan patrones de expresión que sugieren papeles funcionales equivalentes. Sin embargo, las diferencias existentes tanto a nivel de organización celular entre las distintas especies como de determinados patrones de expresión hacen necesarios estudios más profundos. La expresión de *ZmSCR* se ha asociado con la regeneración del centro quiescente después de escisiones parciales (Lim *et al.*, 2000) y, al igual que *AtSCR*, juega un papel fundamental en la regeneración del centro quiescente tras ablación por laser (Xu *et al.*, 2006). El gen *PsySCR* de pino presenta un patrón de expresión tisular en raíces es similar al encontrado en *AtSCR* (Laajanen *et al.*, 2007) y en *M. trunculata* *MtSCR* se induce durante el enraizamiento adventicio (Imin *et al.*, 2007). En arroz se han descrito interacciones directas entre *OsSHR1* y *OsSCR1* como las detectadas entre *AtSHR* y *AtSCR* en *Arabidopsis*, lo que apunta a que la relación funcional entre proteínas SHR y SCR se conserva evolutivamente en plantas (Cui *et al.*, 2007).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

La propagación a gran escala de muchas especies forestales está limitada por factores dependientes de la edad, como la baja capacidad de enraizamiento, que dificultan la producción comercial de las selecciones. La falta de datos sobre los mecanismos básicos que regulan la respuesta de materiales adultos a las condiciones de propagación impide un mayor éxito en los programas de mejora. Ha sido demostrado que la pérdida de potencial de enraizamiento en pino no está relacionada con la absorción, transporte o metabolismo de auxina y podría estar asociada al grado de estabilidad de estados diferenciados que fija los destinos celulares y que lleva a una pérdida de plasticidad durante el desarrollo (Díaz-Sala et al., 1996). Por tanto, la pérdida de potencial de enraizamiento sería consecuencia de un proceso epigenético que conlleva una expresión génica diferencial. El conocimiento de los genes que se inactivan en células adultas y que se reactivarían durante la formación de un meristemo radicular adventicio podría ayudar a dilucidar los mecanismos que controlan la capacidad de enraizamiento, y proporcionaría herramientas para su utilización en los programas de mejora. Estos genes podrían ser genes involucrados en el establecimiento y mantenimiento de la identidad y de los destinos celulares del meristemo de raíz durante el desarrollo embrionario, como los genes de la familia *GRAS* de potenciales factores de transcripción *SCARECROW* y *SHORT-ROOT*.

El objetivo general de este trabajo es la identificación y caracterización de genes *GRAS* en pino y el estudio de su expresión durante el enraizamiento adventicio de estaquillas de plántulas de distintas edades.

Los objetivos parciales y el planteamiento de trabajo para el logro del objetivo de esta Tesis Doctoral han sido:

Objetivo 1: Establecimiento de un sistema experimental simple y sincrónico que permita el estudio de la pérdida de potencial de enraizamiento adventicio en respuesta a auxina asociada a la edad en *P. radiata*.

- Caracterización de la respuesta de enraizamiento en estaquillas de plántulas de *P. radiata* de distintas edades
- Análisis histológico de la respuesta de enraizamiento en estaquillas de plántulas de *P. radiata* de distintas edades.

Objetivo 2: Identificación de genes de la familia *GRAS* en *P. radiata*.

- Aislamiento y caracterización de la secuencia completa de cDNA de los genes homólogos de los genes de *Arabidopsis* *SCARECROW* y *SHORT-ROOT*
- Análisis del número de copias de los genes identificados en el genoma de pino

Objetivo 3: Caracterización de la expresión de los genes identificados en *P. radiata*

- Análisis de los niveles de expresión en diferentes órganos.
- Análisis del efecto de la aplicación de distintas concentraciones de auxina sobre la expresión de los genes identificados

Objetivo 4: Caracterización de la dinámica espacio-temporal de expresión de los genes identificados en el proceso de enraizamiento adventicio en estaquillas de plántulas de distintas edades y con distinta capacidad de enraizamiento

- Análisis de la dinámica de expresión temporal mediante RT-PCR a tiempo real.
- Localización celular de la expresión mediante hibridaciones *in situ*.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material vegetal.

1.1. Siembra y crecimiento de *Pinus radiata*.

El material vegetal utilizado consistió en plántulas de *P. radiata* D. Don obtenidas de semillas de 2003 y 2005 procedentes de árboles de rodal semillero y suministradas por Oihanberri (Vitoria, España). La siembra fue realizada en bandejas de siembra de 25 cm × 35 cm × 6 cm. El sustrato utilizado fue vermiculita que se saturó de agua antes de proceder a la siembra. Las semillas fueron embebidas en agua corriente con intercambio constante de agua durante 14 -16 horas. Se sembraron entre 63 y 100 semillas por bandeja. Las bandejas de siembra fueron depositadas en bandejas de riego comunes a las que se les añadió agua corriente hasta 1 cm desde la base. Se mantuvieron en cámara de cultivo bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad con temperaturas de 25 y 20 °C respectivamente.

El riego se efectuó con una frecuencia de 5-6 días a la semana añadiendo agua a la bandeja de riego hasta un nivel de 2-3 cm desde la base.

La luz fotosintéticamente activa en la cámara de cultivo fue de 125 $\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Las plántulas fueron fertilizadas una vez por semana a partir de la tercera semana de crecimiento con fertilizante específico para coníferas (20 % nitrógeno, 7 % ácido fosfórico y 19 % óxido de potasio, Peters Professional, Scotts, OH, USA).

1.2. Inducción de raíces adventicias.

La inducción de raíces adventicias se llevó a cabo en estaquillas de plántulas de *P. radiata* de 20, 60 y 90 días siguiendo el método descrito por Díaz-Sala *et al.* (1996). La inducción de raíces adventicias en plántulas de 20 días se llevó a cabo en estaquillas de hipocótilos de 2,5 cm medidos desde la base de los cotiledones, que incluían los cotiledones y el ápice caulinar con las primeras acículas. En las plántulas de 60 y 90 días la inducción de raíces adventicias fue realizada sobre dos tipos de estaquillas, hipocótilos de 2,5 cm medidos desde la base de los cotiledones que incluyen los cotiledones; y epicótilos, a los que se les han eliminado las acículas pero que incluyen el penacho apical. El tamaño de los epicótilos fue de 2,5 cm medidos desde el ápice caulinar.

Para el enraizamiento entre 25 y 30 estaquillas fueron tratadas en grupos de cinco con ácido indolbutírico (AIB) a una concentración de 10 μM de forma continuada. Como control se utilizaron hipocótilos introducidos en agua destilada en las mismas condiciones que los tratados. Para los estudios del efecto de las distintas dosis de auxina, hipocótilos de plántulas de 20 días como los descritos anteriormente fueron sometidos a tratamientos de 1, 10 y 20 μM AIB durante 24 horas; como control se utilizaron hipocótilos introducidos en agua destilada durante 24 horas y como muestra de referencia hipocótilos de plántulas de 20 días no tratados (tiempo cero). El AIB se

obtuvo de Sigma-Aldrich (Poole, Dorset, Reino Unido) en forma de sal potásica (AIB-K) y fue disuelto en agua destilada.

Los tratamientos de inducción de raíces adventicias fueron llevados a cabo en viales de vidrio de 25 × 95 mm (Kimble, NJ, EEUU). Se realizaron en cámara de cultivo bajo condiciones de luz de entre 100 y 150 $\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad con temperaturas de 25 °C y 20 °C respectivamente.

1.3. Material vegetal utilizado en los distintos ensayos.

Para la extracción de ADN y para la extracción de ARN y posterior síntesis de cDNA utilizado en clonación de fragmentos y validación de cebadores para RT-PCR a tiempo real se recolectaron plántulas de 35 días, edad a la que las plántulas presentan órganos vegetativos desarrollados y en crecimiento, que fueron congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -80 °C (Tabla 1).

Para la extracción de ARN y posterior síntesis de cDNA destinado al análisis de expresión de genes en órganos se recolectaron cotiledones, ápices caulinares, hipocótilos y raíces de plántulas de 35 días, se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C (Tabla 1).

El análisis de enraizamiento se realizó en hipocótilos de plántulas de 20 días y en hipocótilos y epicótilos de plántulas de 60 y 90 días de *P. radiata* sometidos a tratamiento de inducción de raíces adventicias por aplicación de auxina exógena durante dos meses (Tabla 1).

Para los estudios de histología se utilizaron fragmentos basales de 1 cm de hipocótilo de plántulas de 20 días y epicótilos e hipocótilos de plántulas de 60 días sometidos a tratamiento de inducción de raíces adventicias durante 0, 24 horas, 5 días y 15 días conservados en fijador (Tabla 1).

El análisis de expresión temporal de genes mediante RT-PCR a tiempo real fue llevada a cabo partir de ARN de fragmentos basales de 1 cm de hipocótilos de plántulas de 20 días y epicótilos e hipocótilos de plántulas de 60 días y de plántulas de 90 días sometidos a tratamiento de inducción de raíces adventicias durante 0, 8 horas, 24 horas, 48 horas, 5 días y 15 días. Los fragmentos basales de 1 cm de las estaquillas fueron congelados en nitrógeno líquido y conservados a -80 °C (Tabla 1).

Para los estudios de expresión espacial mediante hibridación *in situ* se utilizaron fragmentos basales de 1 cm de hipocótilos de plántulas de 20 días y epicótilos e hipocótilos de plántulas de 60 días y de 90 días sometidos a tratamiento de inducción de raíces adventicias durante 0, 24 horas, y 15 días conservados en “freezing medium” (Tabla 1).

Ensayo	Edad de las plántulas (en días)	Material vegetal	Tratamiento	Tiempo de tratamiento
Southern	35	Plántula	NO	–
Clonación	35	Plántula	NO	–
Validación	35	Plántula	NO	–
Expresión en órganos	35	Acículas Epicótilos Cotiledones Hipocótilos Raíces	NO	–
Dosis de auxina	20	Hipocótilos	Agua 1, 10 y 20 μ M AIB	24 h
Enraizamiento	20, 60 y 90	Hipocótilos Epicótilos	Agua 10 μ M AIB	30 d 60 d
Histología	20 y 60	Hipocótilos Epicótilos	Agua 10 μ M AIB	0, 24 h, 5 d, 15 d
Expresión mediante RT-PCR a tiempo real	20, 60 y 90	Hipocótilos Epicótilos	Agua 10 μ M AIB	0, 8 h, 24 h, 48 h, 5 d, 15 d
Hibridación <i>in situ</i>	20, 60 y 90	Hipocótilos Epicótilos	Agua 10 μ M AIB	0, 24 h, 15 d

Tabla 1. Material vegetal utilizado para los distintos experimentos. AIB: Ácido indolbutírico. h: horas. d: días.

2. Enraizamiento.

El análisis de **enraizamiento** se realizó en hipocótilos de plántulas de 20 días y en hipocótilos y epicótilos de plántulas de 60 y de 90 días de *P. radiata* sometidos a tratamiento de inducción de raíces adventicias por aplicación de auxina exógena durante dos meses. Como control se utilizaron estaquillas mantenidas en agua destilada. Los primordios radiculares y las raíces emergentes de cada estaquilla fueron contados a los 30 días y a los 60 días de tratamiento.

Los porcentajes de enraizamiento y el número de primordios y raíces por estaquilla enraizada fueron analizados a partir de, al menos, dos réplicas de 25 plántulas por tratamiento cada una.

3. Histología.

Para analizar a nivel tisular el proceso de enraizamiento adventicio en el sistema experimental establecido se procedió a realizar cortes histológicos de estaquillas en distintos puntos del proceso de enraizamiento. Las muestras seleccionadas para tal fin fueron hipocótilos de plántulas de 20 y de

60 días y epicótilos de plántulas de 60 días sometidos a tratamiento de inducción de raíces adventicias durante 0, 24 horas, 5 días y 15 días.

Las muestras fueron conservadas a 4 °C en un fijador de tejidos durante al menos una semana.

Fijador:

- 90 % etanol 70 % (Merck, Darmstadt, Alemania)
- 5 % ácido acético (Merck, Darmstadt, Alemania)
- 5 % formaldehído (Merck, Darmstadt, Alemania)

Antes de proceder a la deshidratación las muestras fueron mantenidas 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente lavadas en agua para eliminar el exceso de fijador. Seguidamente se llevaron a cabo series sucesivas de deshidratación de dos horas de duración cada una.

SERIE	H ₂ O	ETANOL (95 %)	BUTANOL
1 ^a	50 %	40 %	10 %
2 ^a	30 %	50 %	20 %
3 ^a	15 %	50 %	35 %
4 ^a	0 %	45 %	55 %
5 ^a	0 %	45 %	75 %
6 ^a	0 %	0 %	100 %

Posteriormente se realizaron tres transferencias sucesivas en 100 % butanol (Merck, Darmstadt, Alemania) de 12 horas cada una. La sustitución de butanol por parafina se llevó a cabo por inmersión de las muestras en parafina (Panreac, Barcelona, España) a 60 °C durante 24 horas, la parafina se renovó cada cuatro horas durante las primeras 12 horas. Finalmente las muestras fueron incluidas en bloques de parafina.

Para el estudio de las secciones se realizaron cortes transversales de 10 µm de grosor mediante un microtomo Biocut 2030 (Reichert-Jung, Heidelberg, Alemania) que fueron dispuestos sobre portamuestras (Menzel-Glaser, Braunschweig, Alemania) impregnados de albúmina de huevo (Sigma-Aldrich, Poole, Dorset, Reino Unido). Las muestras se secaron a 37 °C durante 16 horas y conservadas a temperatura ambiente.

El proceso de eliminación de la parafina se llevó a cabo por tres inmersiones consecutivas de 15 min cada una en xileno. Las tinciones con safranina-verde rápido (Jensen, 1962) se llevaron a cabo tal y como se detalla en el siguiente esquema.

Paso	Tiempo	Tratamiento
1	15 min	etanol 100 %
2	5 min	etanol 95 %
3	5 min	etanol 70 %
4	15 min	safranina al 1 % p/v en etanol 70 % (Sigma-Aldrich)
5	1 min	etanol 100 %
6	1 min	etanol 100 %
7	15 s	verde rápido al 0,05 % p/v en etanol absoluto (Sigma-Aldrich)
8	30 s	xileno

Los cubre-objetos fueron dispuestos sobre las muestras tras añadir una gota de entellan (Merck, Darmstadt, Alemania) para su conservación. Las muestras se observaron con un microscopio Nikon de campo claro y las fotografías fueron tomadas con una cámara digital DS-5M (Nikon, Tokio, Japón).

4. Aislamiento de ADN.

4.1. Extracción de ADN.

Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo de Doyle y Doyle (1990) con algunas modificaciones. Durante el proceso de aislamiento de ADN se utilizaron tubos de polipropileno de 50 ml (Nalgene, NJ, EEUU) y las centrifugaciones fueron llevadas a cabo en una centrífuga Sorvall RC-5B (DuPont, DE, EEUU) con rotor SS-34.

Plántulas de 35 días de *P. radiata* conservadas a -80 °C fueron homogeneizadas con nitrógeno líquido en mortero. Por cada gramo de muestra homogeneizada se añadieron 10 ml de tampón de extracción de ADN (2 % cTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8 y 1 % PVP) y 20 µl de β-mercaptoetanol (Merck, Darmstadt, Alemania). El homogeneizado fue resuspendido mediante vortex y filtrado a través de gasas estériles de algodón hidrófilo comunes. Asumiendo una recuperación del 100 % del volumen se añadió proteinasa K (Boehringer, Mannheim, Alemania) predigerida a 37 °C durante una hora a una concentración final de 0,5 mg·ml⁻¹. Tras mezclar mediante vortex se incubaron las muestras 30 min a 60 °C. Posteriormente se añadió un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) (Merck, Darmstadt, Alemania) y se emulsionó mediante inversiones sucesivas seguida de vortex durante 15-30 s. La separación de las fases se realizó mediante centrifugación a temperatura ambiente y 5000 rpm durante 10 min. La fase acuosa fue transferida un nuevo tubo midiendo el volumen recuperado. Se llevó a cabo una segunda purificación añadiendo dos volúmenes de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), emulsionando y centrifugando de igual manera. La fase acuosa fue transferida un nuevo tubo midiendo el volumen recuperado.

La precipitación de los ácidos nucleicos se llevó a cabo por adición de 0,75 volúmenes de isopropanol (Merck, Darmstadt, Alemania), mezcla por inversión e incubación de las muestras a -20 °C unas 16 horas. El precipitado fue recuperado mediante centrifugación a temperatura ambiente y 10000 rpm durante 30 min. Seguidamente, se procedió al lavado del ADN precipitado con 500 µl de etanol frío al 70 % (Merck, Darmstadt, Alemania); centrifugando posteriormente a 4 °C durante 10 min, secando y finalmente resuspendiendo en 500 µl de tampón TE (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA).

4.2. Tratamiento con RNAsa.

Para la eliminación del ARN presente en las muestras de ADN extraído se añadió RNasa A (Invitrogen, CA, EEUU) para una concentración final de 100 µg·ml⁻¹ y se incubó durante 30 min a 37 °C. Los ADNs aislados fueron conservados a -20 °C.

La cantidad de ADN extraído fue calculada a partir de la medida de absorbancia a 260 nm (A260) determinada mediante espectrofotómetro GeneQuant pro RNA/DNA Calculator (Amersham Biosciences, NJ, EEUU) según la fórmula: [ARN] = A260 × 50 × factor de dilución.

La calidad del ADN extraído se determinó a partir de las medidas de A260 y absorbancia a 280 nm (A280) determinadas mediante espectrofotómetro según la fórmula: A260 /A280. Para confirmar la cantidad y determinar la integridad de los ADNs extraídos se llevaron a cabo electroforesis en geles de agarosa al 0,8 % (p/v).

5. Aislamiento de ARN.

5.1. Extracción de ARN.

El ARN total de cada muestra fue extraído mediante el método PureLink™ Plant RNA Reagent (Invitrogen, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del proveedor para extracción de ARN a gran escala ya que las muestras tenían un peso fresco de entre 0,4 y 2 g. Durante el proceso se utilizaron tubos de vidrio Kimble HS (NJ, EEUU) de 15 ó 30 ml o tubos de polipropileno de 50 ml (Nalgene, NJ, EEUU) dependiendo del volumen necesario en cada caso. Las centrifugaciones fueron llevadas a cabo en una centrífuga Sorvall RC-5B con rotor SS-34 (DuPont, DE, EEUU).

Los tejidos vegetales conservados a -80 °C fueron homogeneizados en morteros con nitrógeno líquido. En el caso de las muestras de hipocótilos de plántulas de 90 días fue necesario un paso previo de homogeneización inicial en un molinillo Super Junior S (Moulinex, Bagnolet, Francia) debido a la lignificación y dureza de los mismos; posteriormente se procedió a la homogeneización final en mortero.

Por cada gramo de tejido se añadieron 5ml de PureLink™ Plant RNA Reagent (Invitrogen, CA, EEUU) frío. El homogeneizado fue resuspendido mediante vortex durante 15-30 s, incubado durante 10-40 min a temperatura ambiente y centrifugado a 4 °C y 10000 rpm durante 10 min.

El sobrenadante resultante de la centrifugación fue filtrado a través de gasas estériles de algodón hidrófilo comunes. Posteriormente por cada 5 ml de volumen inicial se añadieron 1 ml de 5 M NaCl (Merck, Darmstadt, Alemania) y 3 ml de cloroformo (Merck, Darmstadt, Alemania) y se emulsionó por agitación durante 30 s seguido de vortex durante 15-30 s.

Para la separación de las fases las muestras fueron centrifugadas durante 30 min a 4 °C y 10000 rpm. La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo midiendo el volumen recuperado. La precipitación de los ácidos nucleicos se llevó a cabo añadiendo 0,9 volúmenes de isopropanol (Merck, Darmstadt, Alemania), mezclando por agitación e incubando a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente se centrifugaron las muestras durante 30 min a 4 °C y 10000 rpm. El precipitado fue lavado con 1-3 ml de etanol (Merck, Darmstadt, Alemania) frío al 75 %, centrifugado a 4 °C durante 10 min, secado y resuspendido en 150-600 µl de agua tratada con DEPC (agua-DEPC). Los ARNs fueron conservados a -20 °C.

La cantidad de ARN extraído fue calculada a partir de la medida A260 determinada mediante espectrofotómetro GeneQuant pro RNA/DNA Calculador (Amersham Biosciences, NJ, EEUU) según la fórmula: $[ARN] = A260 \times 40 \times \text{factor de dilución}$.

La calidad del ARN extraído se determinó a partir de las medidas de absorbancia a 260 nm y 280 nm determinadas mediante espectrofotómetro según la fórmula A260/A280. Para confirmar la cantidad y determinar la integridad de los ARNs se llevaron a cabo electroforesis en geles de agarosa al 1 % (p/v).

5.2. Tratamiento con DNAsa.

Para la eliminación de restos de ADN presentes en las muestras de ARN se llevaron a cabo tratamientos con DNAsa. De cada muestra de ARN 4,4 µg fueron digeridos con RQ1 RNase-free DNaseI (Promega, WI, EEUU). Para ello se realizaron dos reacciones de 50 µl por cada muestra que contenían 1× tampón para la DNasa, 2,2 µg ARN y 2 unidades del enzima DNasa. La reacción de digestión se llevó a cabo a 37 °C durante 1,5 horas. Seguidamente se procedió a la purificación del ARN mediante columnas Microcon YM-100 (Millipore Corporation, MA, EEUU). Para ello se unieron en la columna cada una de las dos digestiones con DNasa de cada muestra y se añadieron 90 µl de agua-DEPC y se centrifugaron durante 14 min a 2000 rpm (centrífuga eppendorf 5415R, Hamburgo, Alemania) a 23 °C. Posteriormente se añadieron otros 90 µl de agua-DEPC a cada columna y se centrifugaron en la misma centrífuga durante 8 min a 2200 rpm. Por último se dispuso la columna de forma invertida en un nuevo tubo recolector y se centrifugó durante 3 min a 4000 rpm para recoger el ARN libre de ADN.

La concentración e integridad de los ARNs tratados con DNAsa fueron analizados según lo descrito en el apartado de extracción de ARN a partir de los datos espectrofotométricos obtenidos en un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop, DE, EEUU) y mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % (p/v). Las muestras de ARN tratado con DNasa fueron conservadas a -20 °C.

6. Síntesis de cDNA.

La síntesis de cDNA se llevó a cabo con hexámeros aleatorios (“Random Primers”, Promega, WI, EEUU) a partir de 1 µg de ARN tratado con DNasa. Para asegurar la correcta temperatura de las muestras todos los tratamientos de temperatura fueron realizados en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, CA, EEUU). Mezclas consistentes en 1 µg de ARN y 300 ng de hexámeros aleatorios en un volumen final de 27 µl de agua-DEPC fueron sometidas a temperaturas de 70 °C durante 10 min en el termociclador y posteriormente enfriadas en hielo durante 2 min.

Posteriormente, a cada reacción se le añadieron 12 µl de una solución que contenía tampón de PCR, MgCl₂, dNTPs y DTT (todos ellos de Invitrogen, CA, EEUU) para una concentración en el volumen final de reacción (40 µl) de 1× tampón de PCR, 2,5 mM MgCl₂, 1 mM dNTPs y 10 mM DTT. Para favorecer el anillamiento de los hexámeros y el ARN las muestras fueron sometidas durante 10 min a 25 °C y posteriormente 2 min a 42 °C, temperatura óptima para la retrotranscriptasa utilizada. A cada muestra se le añadieron 200 unidades de retrotranscriptasa SuperScript II (Invitrogen, CA, EEUU) a excepción de las muestras de control de retrotranscripción a las que se les añadió 1 µl de agua-DEPC. La síntesis de cDNA se llevó a cabo a 42 °C durante 50 min. Posteriormente las muestras fueron sometidas a temperaturas de 70 °C durante 15 min para finalizar la reacción. Los cDNAs fueron conservados a -20 °C.

7. Electroforesis en geles de agarosa.

Para la separación de fragmentos de ADN y visualización de los ARN se utilizaron técnicas electroforéticas en geles de agarosa. Para ello se utilizó agarosa SeaKem LE (FMC BioProducts, ME, EEUU) disuelta en tampón TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) en concentraciones entre 0,8 % y 2 % (p/v) en función del tipo de muestra. Las cunas y cubetas utilizadas fueron TermoEc Classic y la fuente de electroforesis el modelo EC250-90 (EC Apparatus Corporation, FL, USA). El voltaje utilizado para las electroforesis fue de 80 voltios y de 22 voltios para las electroforesis de ADN genómico utilizado en los experimentos de Southern. Las muestras fueron mezcladas con tampón de carga (0,4 % azul de bromofenol, 0,4 % xilencianol y 25 % ficol) antes de ser cargadas en el gel.

En las electroforesis para fragmentos de ADN se utilizó TrackIt 1Kb DNA ladder (Invitrogen, CA, EEUU) como marcador de tamaño y ADN del fago lambda digerido con Hind III (Statagene, CA, EEUU) como marcador de peso molecular. En el caso de las electroforesis para la visualización de ARN se utilizó ARN de hígado de ratón (Ambion, TX, EEUU) de concentración conocida como marcador.

Para visualizar las muestras, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (Promega, WI, EEUU) en tampón TAE (0,25 mg de bromuro por litro de TAE) y expuestos a luz ultravioleta en un transiluminador TF-20M (Vilber Lourmat, Merne-La-Vallee, France).

8. Purificación de fragmentos de ADN.

La recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa se realizó mediante el kit de extracción de banda QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Hilden, Alemania).

Las secciones del gel en las que se detecta señal bajo la luz ultravioleta por presencia de ADN unido a bromuro de etidio fueron cortadas con cuchillas del nº 22 (Braun, Tuttlingen, Germany) y pesadas.

Para separar los fragmentos de ADN del polímero de agarosa se añadieron 300 µl de tampón PB por cada 100 mg de gel, y se mantuvo durante 15 min a 50 °C. Posteriormente se añadieron 10 µl de acetato sódico 3 M a pH 5 para disminuir el pH de la solución. La precipitación del ADN extraído del gel se llevó a cabo por adición de un volumen de isopropanol en las columnas QIAquick e incubación durante 2 min, seguidamente se centrifugó 1 min en una centrífuga 5410 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a 13000 rpm.

El ADN de la columna fue lavado con 750 µl de tampón PE durante 2 min y centrifugado 1 min. La eliminación de restos de etanol del tampón PE se llevó a cabo mediante una centrifugación adicional de 1 min de la columna.

El ADN fue recuperado añadiendo 50 µl de tampón EB (10 mM Tris-Cl pH 8,5), incubando 5 min a temperatura ambiente y recogiendo el eluido por centrifugación de la columna durante 1 min a 13000 rpm.

9. Clonación.

Los fragmentos de ADN purificados fueron clonados utilizando el kit de clonación TA de Invitrogen (CA, EEUU).

Las ligaciones, basadas en el método T/A, se llevaron a cabo en volúmenes finales de 10 µl que contenían 1× tampón de ligasa T4, 50 ng de vector pCR®II , 4 unidades de ligasa T4 y la cantidad necesaria de ADN (inserto) para una relación 3:1 inserto-vector determinada según la fórmula:

$$\text{ng de inserto} = \frac{\text{ng de vector} \times \text{kb del inserto}}{\text{kb del vector}} \times \text{ratio deseado}$$

donde kb es el tamaño en kilobases. Las reacciones de ligación se llevaron a cabo a 14 °C durante 16-18 horas.

Una vez introducidos los fragmentos de ADN en vectores plasmídicos, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* INVαF' (Invitrogen, CA, EEUU) siguiendo el protocolo del kit de

clonación TA de Invitrogen (CA, EEUU). 2 μ l de cada ligación fueron añadidos a 50 μ l de células competentes, la mezcla se incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente se realizó un choque térmico de 30 segundos a 42 °C y se depositaron en hielo durante 2 min. Se añadieron 250 μ l de medio SOC (Invitrogen, CA, EEUU) y se incubó a 37 °C durante 1 hora a 225 rpm.

Finalmente se distribuyeron 50, 75 y 100 μ l en placas de LB con ampicilina y X-Gal, que fueron incubadas toda la noche a 37 °C para el crecimiento de las bacterias.

Placas LB con ampicilina y X-Gal:

- Triptona 10 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Difco, MI, EEUU)
- Extracto de levadura 5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemania)
- NaCl 10 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
- Bacto-agar 15 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Difco, MI, EEUU)
- Ampicilina 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- X-Gal 4 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Promega, WI, EEUU)

10. Secuenciación.

Las secuenciaciones fueron realizadas por la Unidad de Biología Molecular de la Universidad de Alcalá de Henares mediante un analizador genético ABI 3130 (Applied Biosystems, CA, EEUU) basado en el método de Sanger *et al.* (1977) utilizando la química BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, EEUU)

11. RACE.

Para determinar la secuencia completa del cDNA de los genes *PrSHR* y *PrSCL1* se utilizaron los kits de Invitrogen (CA, EEUU) 3' y 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends.

11.1. 3'RACE.

Para identificar la secuencia de la región 3' de los genes *PrSHR* y *PrSCL1* se utilizó el kit de Invitrogen (CA, EEUU) 3'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends. La síntesis de la primera cadena de cDNA se llevó a cabo siguiendo el protocolo del kit en una reacción de 20 μ l que contenía 1 μ g ARN, 1 \times tampón de PCR (Invitrogen, CA, EEUU), 1,5 mM MgCl_2 (Invitrogen, CA, EEUU), 10 mM DTT (Invitrogen, CA, EEUU), 500 nM cebador AP (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'; Invitrogen, CA, EEUU) y 500 μ M dNTPs (Invitrogen, CA, EEUU). La mezcla se atemperó a 42 °C en el termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, CA, EEUU) durante 5 min y posteriormente se añadieron 200 unidades de retrotranscriptasa de SuperScript II (Invitrogen, CA, EEUU) y se incubó a 42 °C durante 50 min en el mismo termociclador. Posteriormente las muestras fueron sometidas a temperaturas de 70 °C durante 15 min para la finalización de la reacción.

La eliminación del ARN presente en las muestras se llevó a cabo mediante la adición de 2 unidades de RNasa H (Invitrogen, CA, EEUU) e incubación a 37 °C durante 30 min.

La reacción para la amplificación de la secuencia del gen de interés se llevó a cabo en un volumen de 50 µl con 2,5 µl del 3´cDNA sintetizado, 1× PCR buffer (Invitrogen, CA, EEUU), 1,5 mM MgCl₂ (Invitrogen, CA, EEUU), 200 µM dNTPs (Invitrogen, CA, EEUU), 400 nM de cebador AUAP (5´-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3´; Invitrogen, CA, EEUU) y 400 nM del cebador específico para el gen *PrSCL1* (*PrSCL1For* 5´-TCTGGCAAATCGTCCTGGTGGT-3´) o para el gen *PrSHR* (*PrSHRFor* 5´-CACGTTCTACAGCATGAACCC-3´) y 5 unidades de Platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen, CA, EEUU).

Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo inicial de desnaturalización y activación del enzima de 5 min a 94 °C seguido de 35 ciclos de desnaturalización-anillamiento-extensión de 30 s de desnaturalización a 94 °C, 30 s de anillamiento a 60 °C y 2 min de extensión a 72 °C; y por último un ciclo de extensión final de 10 min a 72 °C.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, extraídos de banda, clonados y secuenciados según se ha descrito en los apartados 7, 8, 9 y 10.

11.2. 5´RACE.

Para identificar la secuencia de la región 5´ de los genes *PrSHR* y *PrSCL1* se utilizó el kit de Invitrogen (CA, EEUU) 5´RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends. Para la síntesis de la primera cadena de cDNA específico de cada gen se utilizaron cebadores específicos de los mismos en la reacción de retrotranscripción. Mezclas que contenían 500 ng ARN, 1µM de cebador específico para el gen *PrSCL1* (*PrSCL1Rev* 5´-CGAGGATTCATGCTCCGAATCTT-3´) o para el gen *PrSHR* (*PrSHRRev* 5´-CATGAAACCAGATAGTCGATCGC-3´), 1× tampón de la Thermoscript (Invitrogen, CA, EEUU), 1 mM dNTPs (Invitrogen, CA, EEUU), 5 mM DTT (Invitrogen, CA, EEUU), 40 unidades de inhibidor de RNasa (Invitrogen, CA, EEUU) y 15 unidades de la retrotranscriptasa Termoscript (Invitrogen, CA, EEUU) en volúmenes finales de 20 µl fueron incubadas durante 60 min a 60 °C. Seguidamente, las muestras fueron tratadas con 2 unidades de RNasa H (Invitrogen, CA, EEUU) a 37 °C durante 30 min para la eliminación del ARN.

Los cDNAs sintetizados fueron purificados en columnas Microcon YM-100 (Millipore, MA, EEUU). El volumen final de cada reacción se llevó a 200 µl mediante la adición de agua destilada y estéril y fueron dispuestas en las columnas de purificación que se centrifugaron durante 14 min a 2,000 rpm (centrifuga eppendorf 5415R, Hamburgo, Alemania) a 23 °C. Posteriormente se añadieron otros 90 µl de agua destilada a cada columna y se centrifugaron en la misma centrífuga durante 8 min a 2200 rpm. Por último se dispuso la columna de forma invertida en un nuevo tubo recolector y se centrifugó durante 3 min a 4000 rpm para recuperar el cDNA.

En el extremo 3' del cDNA se incorporó una cola de poli-citosina como molde para posteriores amplificaciones. En primer lugar se llevó a cabo la desnaturalización del cDNA durante 3 min a 94 °C en una reacción de volumen final 24 µl que contenía, 1× tampón del enzima transferasa terminal (Invitrogen, CA, EEUU), el cDNA sintetizado y 200 µM dCTP (Invitrogen, CA, EEUU). Tras enfriar durante 1 min en hielo, se añadió 1µl del enzima transferasa de desoxinucleótidos terminal (TdT) (Invitrogen, CA, EEUU) y se incubó a 37 °C durante 10 min. La reacción se finalizó sometiendo las muestras a 65 °C durante 10 min.

La reacción para la amplificación de la secuencia del gen de interés se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl con 6 µl del 5'cDNA sintetizado, 1× PCR buffer (Invitrogen, CA, EEUU), 1,5 mM MgCl₂ (Invitrogen, CA, EEUU), 200 µM dNTPs (Invitrogen, CA, EEUU), 400 nM de cebador AAP (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3'; donde "I" hace referencia al nucleótido sintético deoxiiosina; Invitrogen, CA, EEUU), 400nM del cebador específico interno para el gen *PrSCL1* (*PrSCL1intRev* 5'-CTCCCTCTGCTACATTAAGAACCG-3') o para el gen *PrSHR* (*PrSHRintRev* 5'-AAATCCTGCCTCCTTGAGCCT-3') y 5 unidades de Platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen, CA, EEUU). Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo inicial de desnaturalización y activación del enzima de 5 min a 94 °C seguido de 35 ciclos de desnaturalización-anillamiento-extensión de 30 s de desnaturalización a 94 °C, 30 s de anillamiento a 60 °C y 2 min de extensión a 72 °C; y por último un ciclo de extensión final de 10 min a 72 °C.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, extraídos de banda, clonados y secuenciados según se ha descrito en los apartados 7, 8, 9 y 10.

12. Árbol filogenético.

La relación evolutiva de los genes *PrSHR* y *PrSCL1* con otros miembros de la familia GRAS fue establecida mediante un análisis filogenético de la región carboxi-terminal de PrSHR, PrSCL1 y miembros de la familia GRAS de otras especies (Bolle, 2004; Lim *et al.*, 2005).

El alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la región carboxi-terminal de las proteínas analizadas (Tabla 2) se realizó mediante el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). Los análisis posteriores para la realización del árbol filogenético se realizaron utilizando diversos programas del paquete PHYLIP (Phylogeny Interference Package, versión 3.6a3, Department of Genetics, University of Washington, EEUU).

Los análisis del bootstrap se llevaron a cabo con el programa SEQBOOT con 1000 réplicas que fueron utilizadas para generar matrices a partir del algoritmo Dayhoff PAMmatrix en el programa PROTDIST. A partir de estas matrices se obtuvieron los árboles no enraizados con el programa NEIGHBOR. El árbol definitivo se realizó mediante el programa CONSENSE utilizando como outgroup la secuencia de una posible proteína codificada por un EST de *Physcomitrella patens*

(Nishiyama *et al.*, 2003). La graficación del árbol filogenético fue llevada a cabo mediante el programa PhyloDendron (D.G. Gilbert, University of Indiana, versión 0.8d)

Nombre	Número de acceso	Nombre	Número de acceso	Nombre	Número de acceso
AtSCL1	AF210731	AtSCR	U62798	PtaSHR	no publicado
AtGAI	Y15193	PhHAM	AF481952	OsSHR1	XM_468819
AtSCL3	NM_103925	AtSHR	AF233752	OsSHR2	NP_911918
AtSCL4	NM_126075	AtSCL21	AF210732	OsGAI	NM_001057567
AtSCL5	NM_103942	AtSCL22	NM_115927	OsCIGR1	AY062209
AtSCL6	NM_116232	AtSCL23	NM_123557	OsCIGR2	AY062210
AtSCL7	NM_114925	AtPAT1	AF153443	CsSCL1	DQ683579
AtSCL8	NM_1246	AtRGL3	AL391150	LlSCL	AB106274
AtSCL9	NM_129321	AtSCL26	NM_116894	PrSCL1	DQ683567
AtRGA	Y15194	AtSCL27	NM_130079	BnSCL1	AY664405
AtSCL11	NM_125336	AtSCL28	NM_104988	OsSCR	AB180961
AtSCL13	AF419570	AtSCL29	NM_112237	ZmSCR	AF263457
AtSCL14	NM_100627	AtSCL30	NM_114527	CusSCR	AJ870306
AtSCL15	NM_119825	AtSCL31	NM_100626	PsSCR	AB048713
AtRGL1	AY048749	AtSCL32	NM_114855	LeLS	AF098674
AtSCL18	NM_104434	AtSCL33	NM_128463	OsMOCI	AY242058
AtSCL19	AC009895	PrSHR	EU044786	PpSCL	BJ967948

Tabla 2. Listado de proteínas GRAS. Se ha seguido la nomenclatura utilizada por Pysh *et al.* (1999). Para cada entrada se ha especificado el número de acceso. At: *Arabidopsis thaliana*. Ph: *Petunia x hybrida*. Pr: *Pinus radiata*. Pta: *Populus tremula x alba*. Os: *Oryza sativa*. Cs: *Castanea sativa*. Ll: *Lilium longiflorum*. Bn: *Brassica napus*. Zm: *Zea mays*. Cus: *Cucumis sativus*. Ps: *Pisum sativum*. Le: *Lycopersicon esculentum*. Pp: *Physcomitrella patens*.

13. Southern blot.

Con el fin de determinar el número de copias de los genes *PrSCL1* y *PrSHR* en el genoma de *P. radiata* se realizaron Southern blots con ADN genómico, sondas marcadas con digoxigenina y revelado quimioluminiscente de la señal. Para ello se siguieron las instrucciones del kit de Roche (IN, EEUU) “DIG Nonradioactive Nucleic Acid Labeling and Detection System”.

13.1. Síntesis de sondas marcadas con digoxigenina.

En primer lugar se realizó una amplificación por PCR a partir de fragmentos de los genes de interés clonados en vectores pCR®2.1 (Invitrogen, CA, EEUU). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador 9700 (Applied Biosystems, CA, EEUU) en un volumen final de 100 µl que

contenían 1× tampón de PCR (Invitrogen, CA, EEUU), 1,5 mM MgCl₂ (Invitrogen, CA, EEUU), 5 ng de ADN plasmídico, 200 μM dATP (Invitrogen, CA, EEUU), 200 μM dCTP (Invitrogen, CA, EEUU), 200 μM dGTP (Invitrogen, CA, EEUU), 150 μM dTTP (Invitrogen, CA, EEUU), 50 μM dUTP unido a digoxigenina (Dig-dUTP; Digoxigenin-11-uridine-5'-triphosphate; Roche, IN, EEUU), 800 nM de cada cebador y 5 unidades de Platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen, CA, EEUU). Los cebadores utilizados en la amplificación de la sonda de *PrSCL1* fueron: PrSCL1sthFor 5'-ATGGGGATCAGTGCGGAGAATGG-3' y PrSCL1sthRev 5'-CTCCCTCTGCTACATTAAGAACCG-3', mientras que para la amplificación de la sonda de *PrSHR* se utilizaron los cebadores: *PrSHRsthFor* 5'-TTGGTCATGTTGCTGCCAAT-3' y *PrSHRsthRev* 5'-AAATCCTGCCTCCTTGAGCCT-3'.

Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo inicial de desnaturalización y activación del enzima de 5 min a 94 °C seguido de 35 ciclos de 30 s de desnaturalización a 94 °C, 30 s de anillamiento a 65 °C para *PrSCL1* o a 60 °C para *PrSHR* y 1min de extensión a 72 °C, y por último un ciclo de extensión final de 5 min a 72 °C. El producto de PCR fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) y extraído de banda.

13.2. Transferencia de ADN genómico de *Pinus radiata* a membranas de nylon.

El ADN de *P. radiata* fue digerido con los enzimas de restricción EcoR1, Hind III y EcoRV (todos ellos de New England Biolabs “NEB”, MA, EEUU). Se utilizaron 40 μg de ADN para cada una de las digestiones, tanto simples, como dobles.

Las digestiones se llevaron a cabo en volúmenes finales de 400 μl que contenían 40 μg de ADN genómico, 1× tampón del enzima correspondiente (NEB), 100 μg·ml⁻¹ BSA (NEB) y 100 unidades del/los enzimas correspondientes (NEB). En la siguiente tabla se detallan las digestiones y los tampones utilizados para cada una de ellas, todo de New England Biolabs (MA, EEUU).

Digestiones simples	Tampón	Digestiones dobles	Tampón
Eco R1	Eco R1	Eco R1 / Hind III	Eco R1
Hind III	2	Eco R1 / Pst1	Eco R1
Pst1	2	Hind III / Pst1	2

Las reacciones de digestión se llevaron a cabo a 37 °C durante 3 horas, posteriormente se añadieron otras 100 unidades del/los enzimas correspondientes (New England Biolabs, MA, EEUU) y se continuó la digestión a 37 °C toda la noche.

Para detener la reacción las digestiones se calentaron a 80 °C durante 20 min. Posteriormente fueron precipitadas durante toda la noche a -20 °C mediante la adición de 1/10 del volumen de acetato sódico 3M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío.

Los fragmentos de ADN resultantes de cada una de las digestiones realizadas fueron separados electroforéticamente a 22 voltios en un gel de agarosa SeaKem LE (FMC BioProducts, ME, EEUU) al 0,8 % (p/v) durante unas 18 horas. El gel fue teñido con bromuro de etidio durante una hora y visualizado con luz ultravioleta en un transiluminador TF-20M (Vilbert Lourmat, Marne-laVallée, Francia).

Para provocar fragmentación de los fragmentos de ADN el gel fue sometido durante 4 min a luz ultravioleta en el transiluminador TF-20M (Vilbert Lourmat, Marne-laVallée, Francia) y a un tratamiento de 5 min con HCl 0,25 N. El gel se lavó en agua destilada y posteriormente se procedió a la desnaturalización del ADN, para ello el gel se sumergió durante 30 min con agitación suave en solución desnaturalizante (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH). Posteriormente fue neutralizado con dos tratamientos sucesivos de 15 min cada uno con suave agitación en solución neutralizante (1 M acetato amónico). Para la transferencia de los fragmentos de ADN desde el gel de agarosa a una membrana de nylon Nytran (Schleicher & Schuell, Alemania) se utilizó el mismo tampón utilizado para la neutralización del gel.

El sistema de transferencia se realizó por capilaridad durante 17 h en 1 M acetato amónico, siguiendo el método de Sambrook *et al.* (1989). Posteriormente la membrana fue sometida a luz ultravioleta en un espectrolinker (Stratagene, Cedar Creek, EEUU) para fijar el ADN transferido y lavada durante 2-3 segundos en $2 \times \text{SSC}$.

13.3. Hibridación del ADN con las sondas marcadas con digoxigenina.

Previamente a la hibridación con la sonda, la membrana fue prehibridada con el fin de bloquear los sitios de posible unión inespecífica de la sonda. Tanto la prehibridación como la hibridación se llevaron a cabo en tubos (Stuart Scientific, Watford, Inglaterra), en un horno de hibridación a 65 °C (Stuart Scientific, Watford, Inglaterra).

Composición de la solución de prehibridación y de la solución de hibridación:

0,25 M Na_2HPO_4 pH 7,2

7 % SDS

100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ssDNA (desnaturalizado 10 min a 99 °C)

La prehibridación se llevó a cabo incubando las membranas en solución de prehibridación durante 8 horas. Posteriormente, la solución de prehibridación fue descartada y sustituida por solución de hibridación con 10-15 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ de la sonda marcada con digoxigenina previamente desnaturalizada a 99 °C durante 10 min. La membrana se incubó en solución de hibridación durante 16 horas.

Tras la hibridación se procedió a los lavados de la membrana para eliminar la sonda unida inespecíficamente. Para ello se utilizó una solución con $0,15 \times \text{SSC}$ y 0,1 % SDS. En primer lugar se realizaron dos lavados a temperatura ambiente de 5 min cada uno y posteriormente otros dos lavados a 65 °C de 15 min cada uno.

13.4. Revelado quimioluminiscente.

Composición de los tampones utilizados:

- Tampón 1 (pH 7,5): 0,1 M ácido maleico y 0,15 M ClNa.
- Solución de bloqueo: tampón 1 con un 1 % de blocking reagent (Roche, IN, EEUU).
- Solución del anticuerpo: anticuerpo Anti-digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche, IN, EEUU) diluido en una relación 1:25000 en solución de bloqueo.
- Tampón de lavado: Tampón 1 con un 0,3 % de Tween 20.
- Tampón 3: 0,1 M ClNa y 0,1M Tris-HCl pH 9,5.
- Solución del sustrato: CDP-Start (Roche, IN, EEUU) diluido en una relación 1:200 en tampón 3.

La membrana procedente de la hibridación fue sumergida en tampón 1 durante un minuto con el fin de equilibrarla. Para bloquear los sitios inespecíficos de unión al anticuerpo se incubó en solución de bloqueo durante una hora con agitación suave. Posteriormente la membrana fue incubada durante 30 min con agitación suave en solución del anticuerpo. La eliminación del anticuerpo no unido a la sonda se realizó mediante tres lavados en tampón de lavado durante 10 min. Finalmente la membrana fue sumergida en tampón 3 durante 5 min e incubada durante 5 min en oscuridad con la solución del sustrato. La membrana fue introducida entre dos acetatos y situada en un casete con una película fotosensible (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, NJ, EEUU). Transcurridas de 6-24 horas, la película es extraída del casete y revelada con inmersiones de un minuto en revelador (Eukobrom, Tetenal, Alemania) y fijador (Kodak, NY, EEUU).

Para la reutilización de la membrana se realizó un lavado de 30 min a 37° C en una solución NaOH 0,2 M y SDS 0,1 % y posteriormente se enjuagó en 2 × SSC.

14. RT-PCR a tiempo real.

14.1. Cebadores para RT-PCR a tiempo real.

Los cebadores utilizados para cuantificación de la expresión de los genes *PrSCL1* y *PrSHR* por RT-PCR a tiempo real fueron diseñados mediante el programa Primer Express versión 2.0.0 (Applied Biosystems, CA, EEUU). Como control endógeno se utilizó el gen que codifica para el ARN ribosomal 18S, los cebadores para la amplificación de este gen fueron diseñados sobre la secuencia del ARNr 18S de *Pinus wallichiana* (gi: 403026) y sus secuencias son: *Pw18StrFor* 5'-GCGAAAGCATTTGCCAAGG-3' y *Pw18StrRev* 5'-ATTCCTGGTCGGCATCGTTTA-3'. Los cebadores para los genes *PrSCL1* y *PrSHR* fueron diseñados a partir de las secuencias obtenidas para estos genes en *P. radiata*. Para el gen *PrSCL1* se diseñaron los cebadores *PrSCL1trFor* 5'-TCAATGTCTGGCAAATCGTCC-3' y *PrSCL1trRev* 5'-GCGCCCAGTCTCTTCAATTCT-3' y para el gen *PrSHR* se diseñaron los cebadores

PrSHRtrFor 5'-GAACCAGTGCAAGGAGCATTG-3' y *PrSHRtrRev*
5'-AAATCCTGCCTCCTTGAGCCT-3'.

14.2. Secuencias para RT-PCR a tiempo real.

La concordancia de secuencia entre los genes analizados (*Pw18S*, *PrSCL1* y *PrSHR*) y los fragmentos amplificados por los cebadores diseñados para RT-PCR cuantitativa a tiempo real fue confirmada por clonación y secuenciación de estos últimos. En primer lugar se llevaron a cabo reacciones de PCR en volúmenes finales de 100 µL que contenían 40 ng de cDNA de plántula de 35 días, 1× tampón de PCR (Invitrogen, CA, EEUU), 1,5 mM MgCl₂ (Invitrogen, CA, EEUU), 200 µM de dNTPs (Invitrogen, CA, EEUU), 500 nM de cada cebador y 5 unidades de enzima ADN polimerasa (Platinum Taq polymerase, Invitrogen, CA, EEUU). Las amplificaciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, CA, EEUU) según el siguiente programa: 1 ciclo de activación del enzima y desnaturalización de 10 min a 94 °C, 40 ciclos de desnaturalización-anillamiento-extensión de 94 °C 30s, 60 °C 30s y 70 °C 1 min y un último ciclo de extensión a 70 °C de 5 min. Los productos resultantes de la amplificación fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 2 % (p/v), extraídos de banda, clonados y secuenciados según se ha descrito en los apartados 7, 8, 9 y 10.

14.3. Validación de cebadores.

Para los estudios de expresión de genes mediante RT-PCR a tiempo real utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ de cuantificación relativa se requiere una validación previa de los cebadores. Es necesario que tanto los cebadores para los genes de interés como los cebadores del gen control tengan eficiencias similares y próximas al 100 %.

La validación de los cebadores utilizados se llevó a cabo a partir de cDNA de plántulas de 35 días de *P. radiata*. Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen final de 20 µl en placas de 96 pocillos (Applied Biosystems, CA, EEUU) conteniendo 1× SYBR[®] Green PCR Master Mix reagent (Applied Biosystems, CA, EEUU), cebadores de cada gen: 250 nM (de los cebadores para el gen *Pw18S*) ó 500 nM (de los cebadores para los genes *PrSCL1* o *PrSHR*) y 50; 25; 12,5; 6,25 ó 3,125 ng de cDNA. Las amplificaciones se llevaron a cabo en el sistema ABI-PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, CA, EEUU), utilizando el programa estandar del termociclador; 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min y 40 ciclos con 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min. Se realizaron tres réplicas técnicas para cada una de las diluciones de cDNA.

Para analizar la especificidad de las amplificaciones se determinaron los niveles de fluorescencia emitida en temperaturas crecientes de 60 °C a 90 °C tras finalizar la amplificación. La especificidad de cada pareja de cebadores fue determinada mediante la comprobación de amplificación única e

idéntica en cada una de las reacciones de PCR entre las distintas réplicas y diluciones amplificadas con cada pareja de cebadores.

Mediante la creación de curvas estándar en Excel de los datos de C_T (“threshold cycle for target amplification”) respecto al logaritmo de la concentración de cDNA de la muestra se analizó la eficiencia de cada pareja de cebadores, que viene determinada por la ecuación $E = 10^{(-1/a)} - 1$ (Pfaffl, 2001), donde “E” es la eficiencia y “a” es la pendiente de la recta.

14.4. Expresión por RT-PCR a tiempo real.

La expresión relativa de los genes *PrSCLI* y *PrSHR* se llevó a cabo a partir de cDNA de explantos de *P. radiata*. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos (Applied Biosystems, CA, EEUU). Se prepararon mezclas en volúmenes finales de 20 μ l que contenían $1 \times$ SYBR[®] Green PCR Master Mix reagent (Applied Biosystems, CA, EEUU), cebadores de cada gen: 250 nM (de los cebadores para el gen *Pw18S*) ó 500 nM (de los cebadores para los genes *PrSCLI* o *PrSHR*) y 12,5 ng de cDNA en el sistema ABI-PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, CA, EEUU), utilizando el programa estándar de amplificación; 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min y 40 ciclos con 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min. Se realizaron tres réplicas técnicas para cada una de muestras de cDNA y tres repeticiones biológicas de cada órgano, tiempo y/o tratamiento.

Los datos de ciclo de amplificación exponencial determinado por el “treshold” (C_T) determinados por el sistema ABI-PRISM 7000 fue utilizado para la obtención de los valores de expresión relativa de las diferentes muestras. Los valores medios de los C_T de las tres réplicas técnicas de los genes *PrSCL* y *PrSHR* fueron normalizados respecto a los valores medios de C_T de las tres réplicas técnicas del gen control *Pw18S* según la ecuación: $\Delta C_T = C_{T\ 18S} - C_{T\ gen}$

Los ratios obtenidos fueron entonces referidos a las muestras de referencia (cotiledones en los experimentos de órganos y tiempos cero en el caso de estudios en el tiempo) substrayendo el ΔC_T obtenido para cada órgano, tiempo y/o tratamiento al obtenido en la muestra de referencia, dando lugar al $\Delta \Delta C_T$. Por último y para determinar la expresión relativa en cada muestra respecto a su muestra de referencia se utilizó la fórmula $2^{-\Delta \Delta C_T}$ (Pfaffl, 2001). Los errores acumulados durante el tratamiento matemático de los datos fueron propagados siguiendo la teoría de errores. Los promedios de las réplicas biológicas se obtuvieron hallando la media ponderada por el error entre todas ellas.

14.5. Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el SPSS (versión 14.0.1). Las comparaciones entre dos grupos se analizaron mediante el test de la t de Student. Las comparaciones entre grupos múltiples se evaluaron mediante ANOVA con post-hoc de Bonferroni. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con valores de $p \leq 0,05$.

15. Hibridación *in situ*.

Las hibridaciones *in situ* para analizar la expresión de los genes *PrSCL1* y *PrSHR* en el sistema de inducción de raíces adventicias se llevaron a cabo según el protocolo descrito por Sánchez *et al.* (1995) con algunas modificaciones. Las sondas fueron marcadas con digoxigenina y el revelado de la señal fue realizado por detección de color siguiendo las instrucciones del kit “DIG Nucleic Acid Detection kit” (Roche, IN, EEUU).

15.1. Síntesis de las sondas.

En primer lugar se realizó una amplificación por PCR a partir de fragmentos de los genes de interés clonados en vectores pCR®II (Invitrogen, CA, EEUU). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, CA, EEUU) en un volumen final de 50 µl que contenían 1× tampón de PCR (Qiagen, Hilden, Alemania), 10 ng de ADN plasmídico, 200 µM dNTPs (Invitrogen, CA, EEUU), 400 nM de cebador SP6 (5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3'), 400 nM de cebador específico para el gen *PrSCL1* (5'-AGAATTGAAGAGACTGGGCGC-3') o para el gen *PrSHR* (diseñado sobre el plásmido, 5'-GCCAGTGTGATGGATATCTG-3'), y 2,5 unidades de Taq DNA polimerasa (Qiagen, Hilden, Alemania). Las condiciones de amplificación fueron 30 ciclos de desnaturalización, anillamiento y extensión (30 s a 94 °C, 40 s a 44 °C y 1 min a 72 °C) seguidos de un ciclo de extensión final de 5 min a 72 °C.

El producto de PCR fue limpiado por fenolización mediante la adición de 1 volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (en relación 25:24:1 respectivamente; todos ellos de Merck, Darmstadt, Alemania), extracción de la fase acuosa, adición de 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (en relación 23:2 respectivamente) y extracción de la fase acuosa. El producto de PCR tratado con fenol fue precipitado durante toda la noche a -20 °C mediante la adición de 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío.

La síntesis de las sondas marcadas con digoxigenina se realizó mediante reacciones de transcripción en volúmenes finales de 50 µl con 300 ng de ADN molde procedente del producto de PCR, 1× tampón de transcripción (Roche, IN, EEUU), 1× RNA labelling mix (Roche, IN, EEUU), 40 unidades de inhibidor de RNAsas (Roche, IN, EEUU) y 50 unidades de SP6 ARN polimerasa (Roche, IN, EEUU). La reacción se llevó a cabo a 37 °C durante 2,5 horas y se detuvo mediante la adición de EDTA para una concentración final de 20 mM.

Las sondas marcadas fueron precipitadas durante toda la noche a -20 °C mediante la adición de CILi para una concentración final de 150 mM y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Posteriormente las sondas fueron parcialmente hidrolizadas para la obtención de fragmentos de 150

pares de bases con 0,4 M NaHCO₃ / 0,6 M Na₂CO₃ (pH 10,2) a 60 °C durante el tiempo determinado según la fórmula de hidrólisis:

$$\text{Minutos de hidrólisis} = \frac{l_o - l_f}{0,11 \times l_o \times l_f}$$

Donde l_o es la longitud inicial de la sonda en pares de bases; l_f es la longitud final deseada de la sonda en pares de bases (150 pb) y 0,11 es la constante de hidrólisis.

La reacción de hidrólisis se detuvo mediante la adición de acetato sódico a pH 4,7 para una concentración final de 100 mM y se precipitó durante toda la noche a -20 °C mediante la adición de 200 µg de glicógeno, CILi para una concentración final de 100 mM y 3 volúmenes de etanol absoluto frío.

15.2. Cortes histológicos.

Para analizar la localización de la expresión de *PrSCL1* y *PrSHR* durante el enraizamiento adventicio en el sistema experimental establecido se realizaron cortes histológicos de estaquillas en distintos puntos del proceso de enraizamiento. Las muestras seleccionadas para tal fin fueron hipocótilos de plántulas de 20, 60 y 90 días y epicótilos de plántulas de 60 y 90 días sometidos a tratamiento de inducción de raíces adventicias durante 0, 24 horas y 15 días.

Las muestras fueron conservadas a 4 °C en “tissue freezing medium” (Jung; Leica Microsystems Nussloch GMBH, Heilderberg, Alemania) durante seis horas. La inclusión se realizó a -20 °C, generando bloques que contenían las muestras en “tissue freezing medium” congelado. Los bloques fueron conservados a -80 °C.

Se prepararon secciones de 10 µm a -20 °C en un criostato CM-1850 (Leica Microsystems Nussloch GMBH, Heilderberg, Alemania) sobre portamuestras SuperFrost Plus (VWM Internacional, Leuven, Bélgica). Las secciones fueron secadas a 42 °C durante 2 horas y posteriormente fijadas a -20 °C durante 10 min en etanol: ácido acético glacial (en una relación 3:1 v/v) seguido de 5 min en etanol al 70 %. Las secciones fueron conservadas a -80 °C.

15.3. Hibridación.

Como paso previo a la prehibridación e hibridación de las secciones, las muestras fueron sometidas a distintos tratamientos y lavados tal como se especifica en el siguiente esquema (composición del tampón PBS a pH 7,4: 130 mM NaCl; 3 mM NaH₂PO₄ y 7 mM Na₂PO₄ y composición del tampón TE a pH 8: 100 mM Tris-HCl y 50 mM EDTA):

Paso	Tiempo (min)	Temperatura	Agitación	Tratamiento
1°	5	t.a.	no	PBS
2°	5	t.a.	no	PBS
3°	5	t.a.	no	PBS + 100 mM glicina (Sigma-Aldrich)
4°	5	t.a.	no	PBS + 100 mM glicina (Sigma-Aldrich)
5°	15	t.a.	no	PBS + 0,3 % Tritón X-100 (Serva)
6°	5	t.a.	no	PBS
7°	5	t.a.	no	PBS
8°	30	37 °C	no	TE + Proteinasa K (1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; Boehringer)
9°	5	4 °C	no	PBS + 4 % Paraformaldehido
10°	5	t.a.	no	PBS
11°	5	t.a.	no	PBS
12°	5	t.a.	100 rpm	0,1 M Tetranolamina + 0,25 % Anhídrido acético (Sigma-Aldrich)
13°	5	t.a.	100 rpm	0,1 M Tetranolamina + 0,25 % Anhídrido acético (Sigma-Aldrich)

Las secciones fueron prehibridadas con solución de hibridación a 37 °C durante 10 min y posteriormente hibridadas con solución de hibridación conteniendo 2,5 ng de sonda desnaturalizada, fueron cubiertas con cubreobjetos e incubadas a 42 °C durante toda la noche.

Composición de la solución de hibridación: 50 % (v/v) Formamida desionizada; 0,2 M NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA; 10 % Dextranulfato; 5× Solución Denhardt (composición: 0,1 % Ficoll; 0,1 % PVP y 0,1 % BSA); 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de ARN poli-A y 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de ssDNA (desnaturalizado 10 min a 99 °C)

Tras la hibridación las muestras fueron tratadas con $2 \times \text{SSC}$ durante 5 min para retirar los cubreobjetos. Las muestras fueron lavadas a 37 °C y tratadas con RNasa también a 37 °C según el siguiente esquema (composición del tampón NTE: 500 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl y 1 mM EDTA)

Paso	Tiempo (min)	Agitación	Tratamiento
1°	15	100 rpm	$2 \times \text{SSC}$
2°	15	100 rpm	$2 \times \text{SSC}$
3°	15	100 rpm	$1 \times \text{SSC}$
4°	15	100 rpm	$1 \times \text{SSC}$
5°	30	no	NTE pH 8 + 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ RNasa A (Invitrogen)
6°	30	100 rpm	$0,1 \times \text{SSC}$
7°	30	100 rpm	$0,1 \times \text{SSC}$

15.4. Revelado.

Para proceder al revelado por color se siguió el protocolo del kit de Roche (IN, EEUU) “DIG Nucleic Acid Detection” utilizando las soluciones cuya composición se detalla a continuación.

Tampón 1: 100 mM Tris-HCl pH 7,5 y 150 mM NaCl.

Tampón 2: 100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl y 50 mM MgCl₂

Tampón 3: 100 mM Tris-HCl pH 8,1 y 1 mM EDTA.

La preparación de las muestras para la detección de color fue llevada a cabo a temperatura ambiente por tratamientos sucesivos según el siguiente esquema.

Paso	Tiempo (min)	Agitación	Tratamiento
1°	10	100 rpm	Tampón 1
2°	10	100 rpm	Tampón 1
3°	30	no	Solución de bloqueo
4°	120	no	Solución del anticuerpo
5°	10	100 rpm	Tampón 1
6°	10	100 rpm	Tampón 1
7°	10	no	Tampón 2

La reacción de color fue llevada a cabo a temperatura ambiente durante toda la noche en oscuridad cubriendo las muestras con 1× NBT/BCIP (Roche, IN, EEUU) en tampón 2. La reacción fue detenida tratando las muestras con tampón 3 durante 5 min. Posteriormente las muestras fueron deshidratadas en series de etanol 100 %, 90 % y 70 % durante 15 s cada una, lavadas en xileno y montadas. Las muestras se observaron con un microscopio Nikon (Tokio, Japón) de campo claro y las fotografías fueron tomadas con una cámara digital DS-5M (Nikon, Tokio, Japón).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Caracterización de la respuesta de enraizamiento en estaquillas de plántulas de *Pinus radiata* de distintas edades.

Con el objetivo de establecer un sistema experimental simple en *P. radiata* que reproduzca la pérdida de potencial de enraizamiento adventicio asociado a la edad, se estudió la respuesta de enraizamiento de hipocótilos y epicótilos de plántulas de 20, 60 y 90 días obtenidas a partir de germinación de semillas bajo condiciones controladas (descritas en Material y Métodos). El establecimiento del sistema experimental se ha basado en el descrito por Díaz-Sala *et al.* (1996) para *P. taeda* que es un sistema simple y sincrónico que, en períodos cortos de tiempo, manifiesta la pérdida de competencia para enraizar en respuesta a auxina característica de estados adultos.

Para caracterizar la respuesta de enraizamiento las estaquillas se trataron, tal y como describieron Díaz-Sala *et al.* (1996) para *P. taeda*, con ácido indol butírico (AIB) de forma continua a una concentración de 10 μM . Como control se utilizaron estaquillas mantenidas en agua en las mismas condiciones. La capacidad de enraizamiento se analizó como porcentaje de estaquillas con raíces adventicias y número medio de raíces por estaquilla enraizada.

1.1. Caracterización de la respuesta de enraizamiento en hipocótilos.

1.1.1. Caracterización de la respuesta de enraizamiento en hipocótilos de plántulas de 20 días.

Los resultados de enraizamiento en hipocótilos de plántulas de 20 días tras un mes de tratamiento auxínico mostraron un porcentaje de enraizamiento del 100% de los hipocótilos, en los que se indujeron una media de $11,3 \pm 1$ raíces adventicias por estaquilla (Tabla 1, Fig. 1). En los hipocótilos control el porcentaje de enraizamiento fue del 12 % con una media de $1,5 \pm 0,2$ raíces adventicias.

El tratamiento con auxina exógena producía un engrosamiento progresivo de la zona basal del hipocótilo (alrededor de un centímetro desde la zona de corte) que se hacía evidente tras cinco días de tratamiento. A partir de las dos semanas de tratamiento se observaron primordios radiculares adventicios y, tras un mes, los hipocótilos tratados con auxina presentaban raíces adventicias (Fig. 1D). En las estaquillas control no se detectó engrosamiento del hipocótilo a simple vista a pesar de que algunas de las estaquillas (12%) mantenidas en agua durante dos semanas formaron primordios radiculares adventicios en la zona basal del hipocótilo que dieron lugar a raíces adventicias con las mismas características que las observadas en los hipocótilos tratados con auxina (Fig. 1A).

Edad plántula (días)	Tiempo tratamiento (meses)	HIPOCÓTILOS				EPICÓTILOS			
		Control		10 μ M AIB		Control		10 μ M AIB	
		Raíces por estaquilla	Porcentaje enraizamiento						
20	1	1,5 \pm 0,2	12 %	11,3 \pm 1,0	100 %	—	—	—	—
60	1	1,3 \pm 0,3	8 %	2,5 \pm 0,4	52 %	0	0	0	0
60	2	1,4 \pm 0,1	16 %	3,6 \pm 0,5	84 %	0	0	0	0
90	1	0	0	0	0	0	0	0	0
90	2	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 1. Enraizamiento adventicio en hipocótilos y epicótilos de plántulas de 20, 60 y 90 días de *P. radiata*. Los resultados se expresan como promedio del número de raíces por estaquilla que enraíza \pm error estándar y porcentaje de enraizamiento. En las plántulas de 20 días aún no ha comenzado el desarrollo de los epicótilos por lo que no se presentan datos de enraizamiento en epicótilos de plántulas de 20 días.

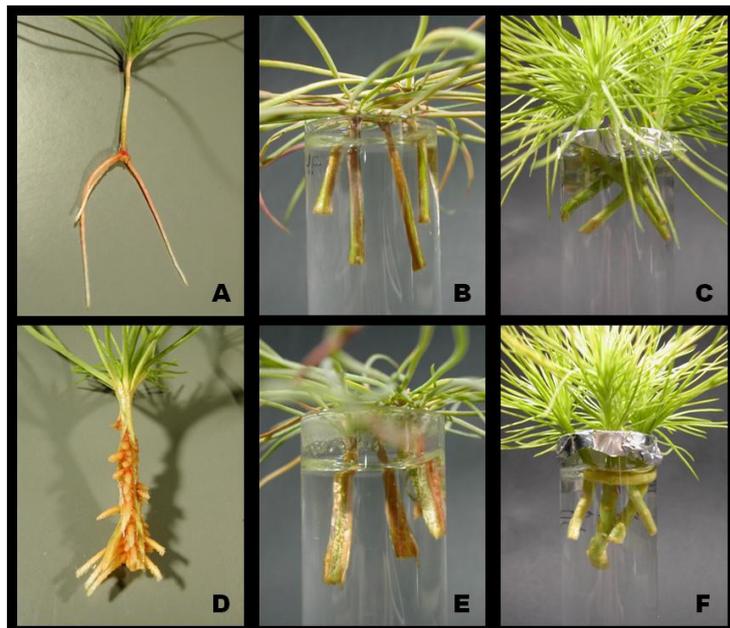


Figura 1. Enraizamiento de estaquillas de *P. radiata* tras 28 días de tratamiento. A y D: hipocótilos de plántulas de 20 días; A) control, D) tratados con 10 μ M AIB. B y E: hipocótilos de plántulas de 60 días; B) control, E) tratados con 10 μ M AIB. C y F: epicótilos de plántulas de 60 días; C) control, F) tratados con 10 μ M AIB.

1.1.2. Caracterización de la respuesta de enraizamiento en hipocótilos de plántulas de 60 y 90 días.

En los hipocótilos de plántulas de 60 días el porcentaje de enraizamiento en las estaquillas tratadas con auxina durante un mes fue de un 52%, cifra que aumentaba hasta un 84% tras dos meses de tratamiento. Las estaquillas que formaron raíces en el primer mes de tratamiento produjeron una media de $2,5 \pm 0,4$ raíces adventicias, llegando a una media de $3,6 \pm 0,5$ raíces adventicias por estaquilla enraizada tras dos meses de tratamiento (Tabla 1).

En los hipocótilos control los porcentajes de enraizamiento fueron del 8% y del 16% tras uno y dos meses respectivamente, obteniéndose medias de $1,3 \pm 0,3$ raíces adventicias tras un mes y $1,4 \pm 0,1$ raíces por estaquilla enraizada tras dos meses (Tabla 1).

Los hipocótilos de plántulas de 60 días presentaron un retraso en la manifestación de la respuesta al tratamiento con auxina respecto a lo observado en los hipocótilos de plántulas de 20 días. El tratamiento auxínico en hipocótilos de las plántulas de 60 días produjo los mismos cambios morfológicos que en hipocótilos de 20 días tratados con auxina, pero estos cambios fueron observables después de un período más largo de tratamiento (Fig. 1E). El engrosamiento de la zona basal del hipocótilo no era evidente hasta los 15 días y los primordios adventicios no comenzaban a ser visibles hasta los 25-30 días de tratamiento. En las muestras control no se apreciaron a simple vista cambios morfológicos a lo largo del tiempo (Fig. 1B).

En los hipocótilos de plántulas de 90 días el tratamiento por aplicación de auxina exógena no produjo formación de primordios radicales ni de raíces adventicias. Tampoco en las muestras control se observó formación de primordios. Tanto las estaquillas tratadas con AIB como las estaquillas control mantuvieron su aspecto inicial y no se observaron cambios morfológicos a lo largo del tiempo.

1.2. Caracterización de la respuesta de enraizamiento en epicótilos.

En las condiciones de crecimiento establecidas en el laboratorio la emergencia del epicótilo en la plántula en crecimiento comenzó a partir de la tercera semana de siembra. Después de 60 días, las plántulas que presentaban epicótilos con una longitud de unos tres centímetros se seleccionaron y los epicótilos fueron tratados según se describe en Material y Métodos. Los epicótilos de plántulas de 60 días no formaron primordios radicales ni raíces adventicias a lo largo del tiempo ni en las estaquillas tratadas con auxina ni en las estaquillas control (Tabla 1), sin embargo se observaron cambios morfológicos en los epicótilos tratados con auxina.

En las muestras tratadas con auxina se observó un engrosamiento progresivo del epicótilo que era evidente a simple vista tras una semana de tratamiento (Fig. 1C). Además, se produjo crecimiento en longitud de estos órganos que llegaban a medir hasta 4 centímetros tras dos meses de tratamiento. En los epicótilos control no observaron variaciones morfológicas a lo largo del tiempo (Fig. 1F).

Tampoco los epicótilos de plántulas de 90 días formaron primordios radiculares ni raíces adventicias a lo largo del tiempo. En respuesta al tratamiento auxínico los epicótilos de plántulas de 90 días, al igual que se había observado en epicótilos de plántulas de 60 días, presentaban un engrosamiento progresivo de la zona basal que era apreciable a simple vista tras una semana de tratamiento. También se observó crecimiento en longitud de los epicótilos de plántulas de 90 días que llegaban a medir 4 centímetros tras dos meses de tratamiento. En los epicótilos control no se formaron primordios radiculares adventicios ni se apreciaron cambios morfológicos a lo largo del tiempo.

2. Análisis histológico de la respuesta de enraizamiento en estaquillas de plántulas de distintas edades.

Con el objetivo de estudiar la respuesta de enraizamiento a nivel celular en estaquillas de plántulas de distintas edades en *P. radiata* se llevó a cabo un estudio histológico en el tiempo en hipocótilos y epicótilos de plántulas de distintas edades. Se realizaron secciones transversales de hipocótilos de plántulas de 20 y 60 días y de epicótilos de plántulas de 60 días tratados con 10 μ M AIB de forma continua. Como control se utilizaron secciones transversales de las estaquillas mencionadas anteriormente mantenidas en agua en las mismas condiciones. El análisis histológico se realizó tras 24 horas, 5 días y 15 días de tratamiento, antes del inicio de las divisiones celulares, en una fase de división celular activa y durante la emergencia del primordio (Díaz-Sala *et al.*, 1996). Como muestras de referencia se utilizaron cortes transversales de estaquillas intactas (tiempo cero).

2.1. Análisis histológico de la respuesta de enraizamiento en hipocótilos.

2.1.1. Análisis histológico de la respuesta de enraizamiento en hipocótilos de plántulas de 20 días.

Los hipocótilos de plántulas de 20 días presentaban una estructura primaria en la que se distinguían: la epidermis en la región más externa, el parénquima cortical que contenía los canales resiníferos, los haces vasculares de xilema y floema primarios situados en los polos marcados por los canales resiníferos y la médula en la región central (Fig. 2A). El cambium aún no se había diferenciado o estaba en una fase inicial de su diferenciación y no era activo.

Tras 24 horas de tratamiento auxínico los hipocótilos conservaban la misma estructura que las muestras de referencia, se observó condensación de núcleos en la región cambial, aunque en ningún caso se detectaron divisiones celulares (Fig. 2B). Tras 5 días de tratamiento se identificaron divisiones celulares y condensación de núcleos en la región del parénquima cortical centrífuga a los canales resiníferos que producían un aumento de grosor de esta región (Figs. 2D y 2E). En la figura 2E se muestra un detalle de la región parenquimática centrífuga a los canales resiníferos en la que se pueden apreciar células en anafase. En los cortes de hipocótilos tratados con AIB durante 15 días

la estructura inicial se vio alterada por la presencia de primordios radiculares adventicios y raíces adventicias en elongación que atravesaban la región de parénquima cortical y la epidermis y que se localizaba de forma centrífuga a los canales resiníferos (Figs. 2G-I).

En las muestras control no se observaron cambios significativos en la estructura transversal del hipocótilo durante los primeros cinco días de tratamiento (Fig. 2C). En los cortes de hipocótilos mantenidos en agua durante 15 días se observaron divisiones celulares no organizadas en las regiones cambial y parénquima cortical que no formaban estructuras identificables (Fig. 2F).

Las raíces adventicias se formaron de manera directa a partir de divisiones organizadas en las regiones del parénquima cortical inmediatamente centrífugas a los canales resiníferos que marcan los polos de xilema primario. Los meristemas radiculares adventicios organizados eran evidentes tras 15 días de tratamiento (Fig. 2G-I).

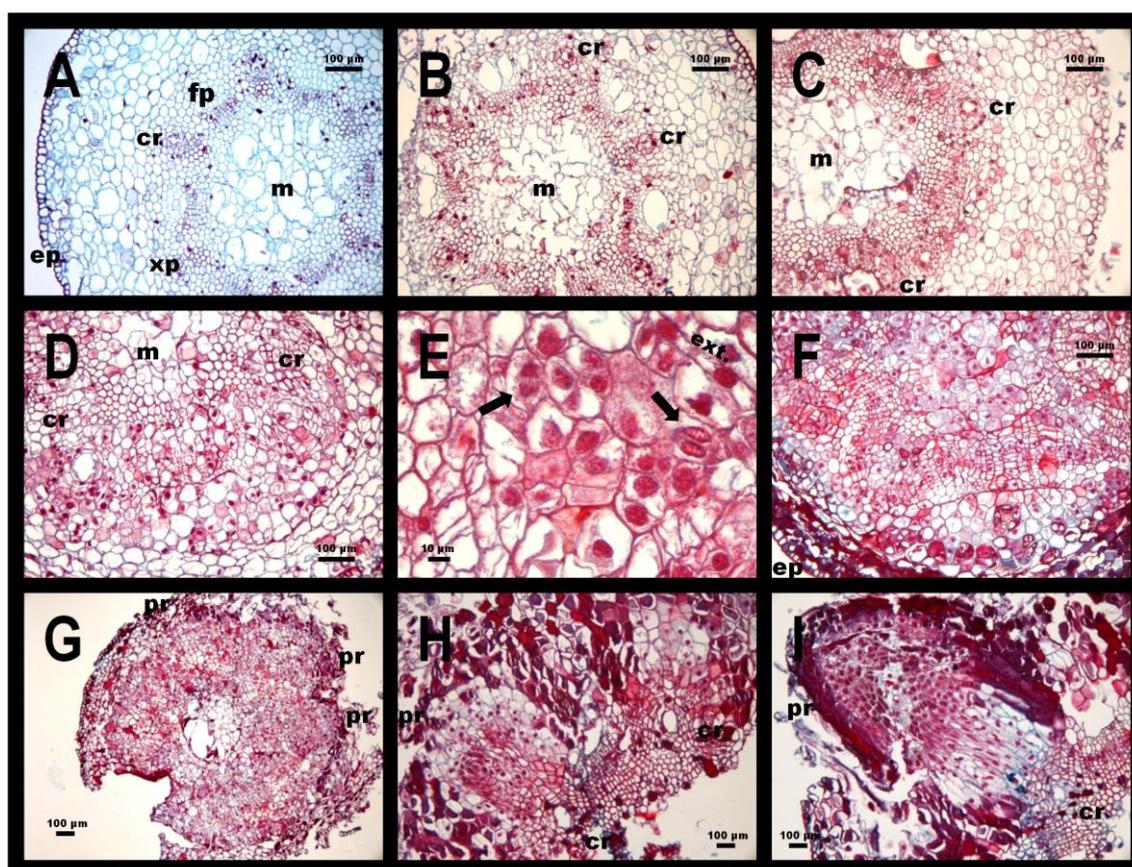


Figura 2. Cortes transversales de la base de hipocótilos de plántulas de 20 días de *P. radiata* durante el enraizamiento. A) hipocótilo no tratado, muestra de referencia, tiempo 0. B) hipocótilo tras 24 horas enraizando tratado con 10 μ M AIB. C-E) hipocótilos tras 5 días enraizando; C) control, D y E) tratados con 10 μ M AIB. F-I) hipocótilos tras 15 días enraizando; F) control, G, H e I) tratados con 10 μ M AIB. m: médula; fp: floema primario; xp: xilema primario; cr: canal resinífero; ep: epidermis; pr: primordio radicular adventicio; ext.: zona externa del corte; las flechas indican células en división.

2.1.2. Análisis histológico de la respuesta de enraizamiento en hipocótilos de plántulas de 60 días.

Los hipocótilos de plántulas de 60 días presentaban crecimiento secundario. Rodeado por la epidermis se apreciaban el cortex y el cilindro vascular continuo que incluía floema secundario, cambium vascular y xilema secundario, en la zona central del hipocótilo se localizaba la médula. El xilema secundario ocupaba la mayor parte del volumen radial del tallo y en él se localizaban los canales resiníferos (Fig. 3A). El cambium vascular estaba completamente diferenciado y activo.

Tras 24 horas de tratamiento auxínico no se observaron cambios en los hipocótilos de plántulas de 60 días y la estructura radial era la misma que en los cortes de hipocótilos intactos. A los 5 días de tratamiento se observó condensación de núcleos en la región cambial, aunque no se detectaron divisiones celulares (Fig. 3C) y tras 15 días de tratamiento con AIB el aumento de espesor de las regiones cambial y parénquima cortical como consecuencia de divisiones celulares se hizo más evidente a pesar de no distinguirse indicios estructurales de organización en meristemos (Fig. 3E). Los hipocótilos control respondieron de manera similar a los hipocótilos tratados con auxina, durante los primeros cinco días no se observaron cambios estructurales y tras 15 días mantenidas en agua, las estaquillas presentaban divisiones celulares no organizadas en la región cambial y parénquima cortical (Figs. 3B y 3D). En ninguna de las muestras tratadas con auxina ni en las muestras control se observó formación de callo.

Estas observaciones apoyan los resultados obtenidos en el análisis de enraizamiento que sugerían un retraso en la manifestación de la respuesta al tratamiento con auxina de los hipocótilos de plántulas de 60 días respecto a los hipocótilos de plántulas de 20 días.

2.2. Análisis histológico de la respuesta de enraizamiento en epicótilos.

Los epicótilos de plántulas de 60 días presentaban una estructura formada por tejidos primarios en la que se distinguían la epidermis en la región más externa, el parénquima cortical que contenía los canales resiníferos, el anillo vascular con interrupciones en las yemas axilares y la médula en la región central. El cambium estaba diferenciado y activo.

En las secciones transversales de epicótilos de plántulas de 60 días tratados con AIB no se observaron diferencias estructurales del tallo en los primeros 5 días de tratamiento (Fig. 3F). Tras 15 días de tratamiento auxínico se observó condensación de núcleos y aumento de espesor de las regiones del cambium vascular y del parénquima cortical como consecuencia de divisiones celulares, sin embargo, no se encontraron estructuras identificables o indicios de formación de primordios radiculares (Figs. 3H-I). En la figura 3I se puede apreciar el detalle de una célula cambial en división.

En las muestras control la estructura del epicótilo se mantuvo sin alteraciones a lo largo del tiempo y no se observaron diferencias morfológicas respecto a las muestras de referencia (Fig. 3G).

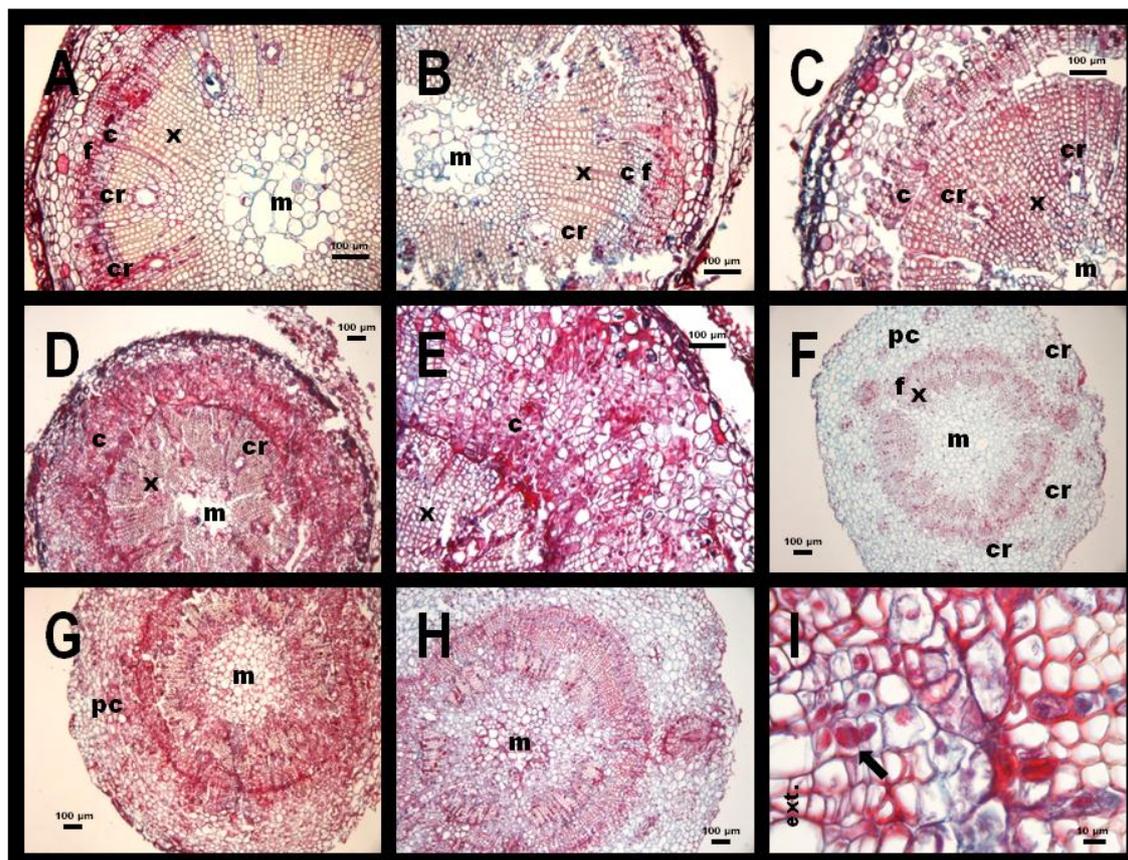


Figura 3: Cortes transversales de la base de hipocótilos y epicótilos de plántulas de 60 días de *P. radiata* durante el enraizamiento. A) hipocótilo de referencia, no tratado, tiempo 0. B) hipocótilo control tras 24 horas enraizando. C) hipocótilo tratado con 10 μ M AIB tras 5 días enraizando. D) hipocótilo control tras 15 días enraizando. E) hipocótilo tratado con 10 μ M AIB tras 15 días enraizando. F) epicótilo control tras 24 horas enraizando. G) epicótilo control tras 15 días enraizando. H e I) epicótilo tratado con 10 μ M AIB tras 15 días enraizando. m: médula; x: xilema; f: floema; c: cambium vascular; cr: canal resinífero; pc: parénquima cortical; ext: zona de la imagen hacia el exterior del corte; las flechas indican células en división

Dado que tanto hipocótilos como epicótilos responden a la aplicación de auxina exógena y que no se han encontrado cambios en el metabolismo, transporte o distribución de la auxina que puedan explicar las diferencias en la capacidad de enraizamiento adventicio entre hipocótilos y epicótilos (Díaz-Sala *et al.*, 1996), la competencia a enraizar puede ser debida a una expresión diferencial de genes lo que hace necesaria la caracterización de los programas de expresión génica asociados a la respuesta de enraizamiento.

3. Aislamiento y caracterización de genes de la familia *GRAS* en *Pinus radiata*.

Con el objetivo de identificar genes candidato funcionalmente involucrados en el proceso de formación de raíces adventicias y en la pérdida de capacidad de enraizamiento se seleccionaron los genes de la familia *GRAS*: *SCARECROW* (*SCR*) y *SHORT-ROOT* (*SHR*). La familia *GRAS* está compuesta por proteínas con función reguladora de la expresión génica, algunos miembros de esta

familia, tales como *SCR* y *SHR* podrían ser genes que participen activamente en la formación y desarrollo de raíces adventicias ya que se ha descrito su relevancia en los procesos de formación y mantenimiento radicular (Sabatini *et al.*, 2003). Además, hay evidencias preliminares en nuestro grupo de trabajo por estudios con mutantes para los genes *SCR* y *SHR* de *Arabidopsis* que sugieren su participación en el proceso de enraizamiento adventicio (Abarca y Díaz-Sala, comunicación personal).

Dado que al comienzo de este estudio no se encontraron datos publicados de la existencia de genes *SCR* ni *SHR* en coníferas ni en otras especies forestales era necesario comprobar si estos genes están conservados. Para ello se identificaron, aislaron y caracterizaron genes tipo *SCR* y genes tipo *SHR* en *P. radiata* a partir de las secuencias de los genes *SCR* y *SHR* de *Arabidopsis* (*AtSCR* y *AtSHR*).

3.1. Caracterización de genes tipo *SCARECROW*.

Para aislar genes de tipo *SCARECROW* en *P. radiata* se realizó un tblastn a partir de la secuencia aminoacídica *AtSCR* sobre los ESTs y los TCs de *P. taeda* de la base de datos “Plant Gene Database” (<http://www.plantgdb.org>). Los resultados obtenidos mostraron un fragmento de transcrito único, denominado TC60068, que presentaba la mayor homología con *AtSCR*. A partir de la secuencia de este transcrito y mediante técnicas de 3' y 5' RACE se obtuvo en *P. radiata* una secuencia de cDNA de 3.1 kb que codifica para una proteína predicha de 810 aminoácidos y que se ha denominado PrSCL1 (*Pinus radiata* SCARECROW-LIKE protein1; Fig. 4).

```

CATTTGATTTTTGTGAAATTGCAAGTACACATCGATAGCAAAGATGTCTTCAGAGATAGGGTCAACATTGTTTCCTCTGTAGAGGATGAAAAACCTTAGG
GGTTGTTTCAGCACAAATATCGAGGTGTGAGCTATCTAGTAAGTGAATAACGATTAGATAAAACCCAGAATTGCTACTTAGGGTTCCGATCTGTGGAT
CAAATTGTGTGTGTCAGAGTTTCGTTAATTAGGATTCAGTCACCATGGCAAATGAGAAAAATGGTACTTTTGATGGTAGTAAGTCTAATGGACATAGT
M A N E K N G T F D G S K S N G H S
AATAAGATTGGGTTGCAAAGGTCATGGTTGCGGCGGGAACAGCCATACCTGCTGCTCAGTTTCAGGGTCTTTATCCTCTCAGAAAAACGAATGGGCTT
N K I G L Q W S W L Q H E A A M P A A Q L Q D S L S S Q K T N G L
AGTAATAATATTGGCTTGCAGTGGTCATGGTTGCAGCATGAAGCAGCCATGCCCTGCTGCTCAGTTGCAGGATCTTTATCCTCTGAGAAGATGAATGGG
S N N I G L Q W S W L Q H E A A M P A A Q L Q D S L S S E K M N G
CTTAGTGATAACATAGGGTTCGAGAGGTCATGGTTCGAGCAGGAAGAAGCCGTTCTGCTGCTCAGTTCTTCTGCTGCTCAGTATCAGGGTCTTTTA
L S D N I G S Q R S W S Q Q E E A V P A A Q L L P A A Q Y Q G S L
TCCTCTGAGCAGACGATCACCACAACAGATGGTGATTCGGATGACAAAGACGTATTCTGACATAGTTTTGAAGTATATAAGCGATATGCTTATGGAT
S S E Q T I T T T D G D S D D K E T Y S D I V L K Y I S D M L M D
GAAAATATGGAGGATAAGAAGTGTATGTATCAGGAGTGCAGTGTCTGCAAGCTACAGTTAAGCCTTTTATGATATTTTAGCGGAGAATTACCCCTCCT
E N M E D K K C M Y Q E C S A L Q A T V K P F Y D I L G E N Y P P
CAAGGCATGTGTAGTAAGATAAGTAAATAGGACAGAATCAAATCAGTTGTTGAATTACACGAAGGATGATGTTCCGTATAAGATTGAGGACAGTAGCTGG
Q G M C S K S K I G Q N Q N Q L L N Y T K D D V P Y K I E D S S W
ATTGGGGAATTTTTAATTCTCAGATGCCACGGGCTTCGAGTCACTCTGCGGAATCTTTCTGCTGGCTACTCTTCTCAGTATTCGTTTACTTCT
I G E F F N S Q M P T G F E S P L S A N L S A G Y S S Q Y S F S S
TCGGGTAGCAGTACAGTATTGATGGCTGCCTGATCCCCCAATTATGAGATTAACTCTCTGAATATTTTCTGAAAACAAGCAGGACTCGGGGCTT
S G S S T V I D G L P D S P I Y E I N L S E Y F S E N K Q D S G L
GGAGATTTGAGGAGGCTAGCCAAGTTGTACCTAAGCTTAATATGGGGATCAGTCCGAGAAATGGGCGGTTATGCGAGCTCCAAGAAGGAAACTGAC
G E F E E A S Q V V P K L N M G I S A E N G R V M R A P K K E T D
CTTGAGTTGAAGGTGGGGAAGGGAAGATGCAATTGGTGTCTTTTTCAGATGAATGCGACACATAGCGATGATGAGAACGGACCTAAGCGGCAAAAG
L E L K V G K R E D A I G V P F Q M N A T H S D D E N G P K R Q K

```

GATCCGCACCCGGGAGGATCTGGACTTGGAAAGACAGACAGAGCAACAAGCATTGAGCAGTTTATTTCAGACAATGTTATTTCGACTGAGAGTTTGGATGAG
D P H R E D L D L E D R Q S N K H S A V Y S D N V I R T E S F D E
 GTGTGCTCTGTGGTGGGAGGAATGGTAAAAATTTGCGGACATGCAAGTGAAGTGTGCAAAAATGGAGTGCAGAAAAGTGTCAAATGGGTCCCGT
 V L L C G G R N G K N F A **D M Q V Q V L Q N G V Q K S V Q N G S V**
 AAAGGGTCGCAAGGTCCGAAGACTGTTGGGAAGAAGCAAGGAAAAAGGAAGTCGTGGATTTGAGTGCCTGCTTCTTATTTGTGCACAGTCTGTGGCA
 K G S Q G **E K T V G K K Q G K** K E V V D L R S L L L I C A Q S V A
 GCAGATGATACTCGAGGGCCAATGAGACTTTAAAGCAGATCAGGCAACATGCGTCCGCTTATGGAGATGGGTGCGCAACGCCTGGCTAATATTTTGC
 A D D T R G A N E T L K Q I R Q H A S A Y G D G S Q R L A N Y F A
 GATGGTATTGCAGCAGGATTTGAGGAAAGCGGTGGCAGATTTTACAAATGATTTCAAGTGGCGCTCTTCTTCTGAGCAGAGATTTTGAAGGCATAT
 D G I A A R L S G S G G R L F T M I S S G A L S S A A E I L K A Y
 CAGTGCCTTGGTGTACTCCTTTCAAGAAAATATCTCATTTTATGACTTATCAACCGTCTTAATGTAGCAGAGGAGAAAACGAGGTTCACATT
 Q L L L V A T P F K K I S H F M T Y Q T V L N V A E G E T R L H I
 GTTGATTTGCAAGTCTGTATGGTTTCCAATGGCCTTCTGATTCATGCTGGCAATCGTCCGTTGGTGGTCCCTCCATGCTTCGCATAACTGGAATC
 V D F G I L Y G F Q W P S L I Q C L A N R P G G P P M L R I T G I
 GAGTTCCCAACCTGGATTTAGACAGCAGAGAGAATTGAAGAGACTGGGCGCAGACTGGAAGACTATGCAAAAATCTTTCGGTGTGCCCTTTGAATAC
 E F P Q P G F R P A E R I E E T G R R L E D Y A K S F G V P F E Y
 CAGGCTATTGCAACAAAGTGGGAGAACCTAGATGTGGAAGAAGTGGCCTCAGGAGTACGAGGTTGGTGGTAAACTGCCTGGCAGGTTCGCGAAT
 Q A I A T K W E N L D V E E L G L R S D E V L V V N C L G R L R N
 TTGCTGGATGAGACTGTGGTTCAGGATAGCCCCAGAAAATTTGTGCTGAACAAGATTTCGGAGCATGAATCCTCAGTTTTTTATACAAGGTGTGGTAAAC
 L L D E T V V Q D S P R N I V L N K I R S M N P R V F I Q G V V N
 GGAGCATAACAATGCTTCTTCTTTATAACAAGTTCCGAGAGGCCTTTTCCATTATTTGCTCTGTTTGTATGATGGAACCCTGTTCTTCGAGAC
 G A Y N A S F F I T R F R E A L F H Y S A L F D A L E T T V P R D
 AATCAGCAGAGGTTTTTGTATAGAGAAAATTTTGGCCGAGAGATCTTGAATGTTGTCATGTGAGGGATCAGAAAAGATTGGAAGGCCAGAAAAT
 N Q Q R F L I E K E I F G R E I L N V V A C E G S E R L E R P E T
 TACAACAGTGGCAGGGACGGACTCAGCGTGTGGATTTGTACAGCTTCTCTGGATCGTAGTATTCTCTCTAAATCCAGGGATAAGGTAAAAACATTC
 Y K Q W Q G R T Q R A G F V Q L P L D R S I **L S K S R D K V** K T F
 TATCATAAGGATTTTGGAGTGGACGAAGATGGTAATGGATGCTATTGGGCTGGAAGGAAGAAGTATTCATGCTCTGTCTACGTGGAGACCTTCGACA
 Y H K D F G V D E D G N W M L L G W K G R T I H A L S T W R P S T
 TGATTTGGCGATGGAGAATTTTCTCTCTGCAAGAGTAAGGCATGATGCATATTTGTGATTCTGCCAAGGAAGCATCCGACTTTCAAGTTCAGGAAC
 *
 TGCTTAGGGTATTGATAGAACATTATGGAAGGTATTCTTAGAAGAATTTTGTCTTACCTTCGAATCACAGTATTTAGATAATTTTCATTGCAACATAG
 ATCAGTGTAGATGTGATTTAGCTCACAGATATTACTTTTCAGCTTCACTCAAATTTTCAGACATGAAGGATATATGTTTGCAGTAGTGGGATCTCACCA
 AGGATACAAAATGGATTTTTTGCAGTGGGACAGAATTAATCGACATCGACCTTGTGGGAGTCTTGATACCTGTATTACATATGTGCATTATAT
 GTAATATAAAGGCTTCAGGTATAATAATATATGTTCTTTGTAACATTTATGCACCTCGAAAAAAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 4. Secuencia de nucleótidos y secuencia aminoacídica predicha del cDNA *PrSCL1*. Se señalan mediante recuadros las regiones de aminoácido básicos; resaltados en negrita los aminoácidos ácidos; y con doble subrayado los tramos de serina. El codón de terminación se indica mediante un asterisco.

PrSCL1 presentaba motivos característicos y altamente conservados de la familia de proteínas GRAS (Fig. 5). En la región carboxi terminal se identificaron los motivos VHIID, PFYRE y SAW, y las dos repeticiones de leucina (LHRI y LHRII) características de la familia GRAS. También presentaba el motivo LXXL y varios residuos aminoacídicos conservados, los motivos RVER y LRITG. En el motivo SAW de PrSCL1 se pudieron localizar los pares de residuos conservados RX₄E, WX₇G y WX₁₀W.

A pesar de no hallar en esta secuencia el motivo de localización nuclear NLS presente en algunas de las proteínas de la familia GRAS, PrSCL1 presentaba dos regiones básicas (denominadas BRI y BRII; Fig. 5) muy similares a las regiones BRI y BRII encontradas en LISCL (*Lilium longiflorum* SCARECROW-LIKE) y que podrían servir como señalización para la localización nuclear

(Morohashi *et al.*, 2003). También se hallaron en el dominio amino terminal regiones ricas en residuos ácidos similares a las encontradas en LISCL (Fig. 4).

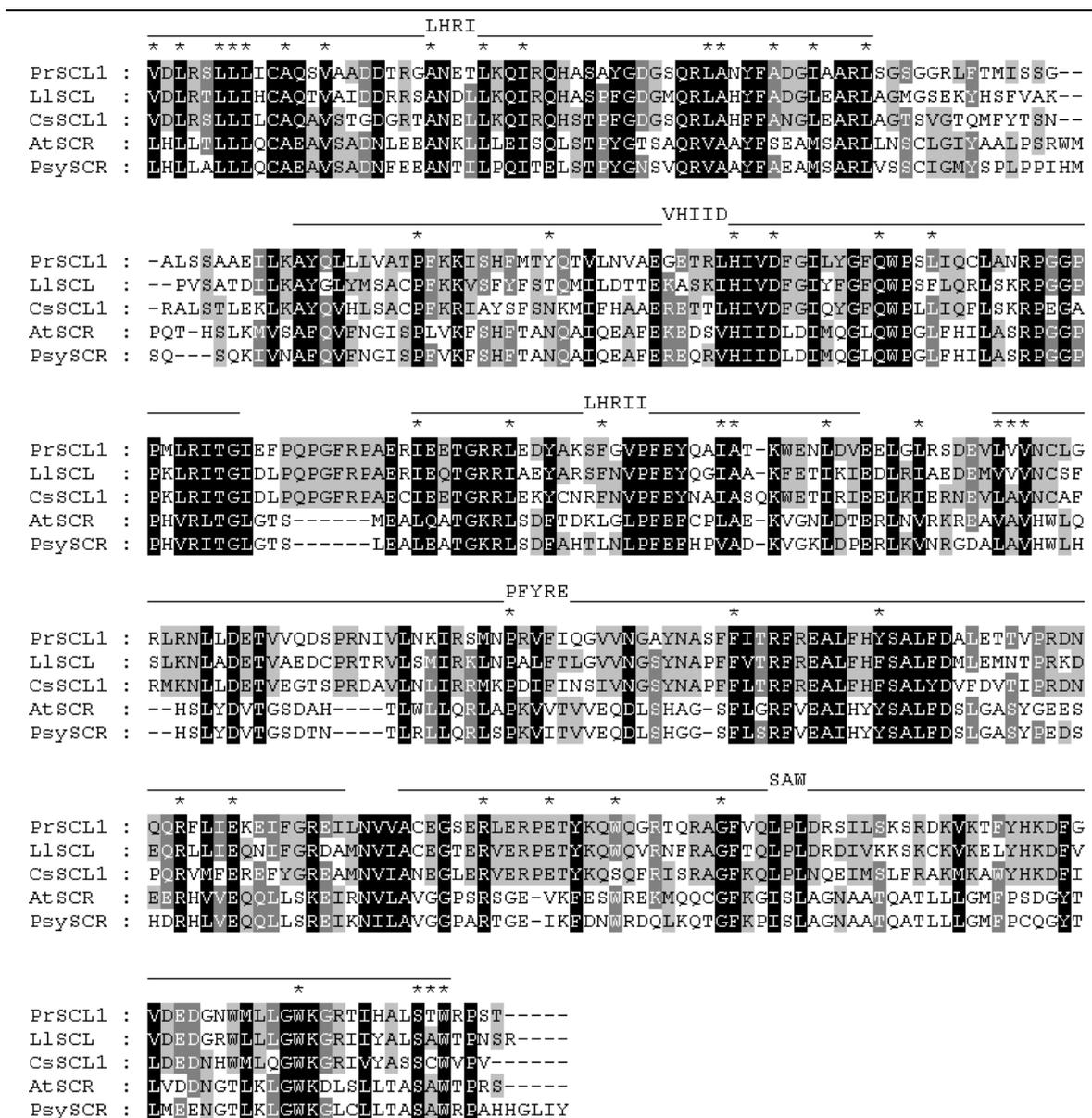


Figura 5. Comparación de la región carboxi terminal de las secuencias aminoácidas predichas de PrSCL1, LISCL, CsSCL1, AtSCR y PsySCR. Los aminoácidos idénticos se indican con letras blancas sobre fondo negro, los aminoácidos similares con letras blancas sobre fondo gris, los aminoácidos con baja similitud con letras negras sobre fondo gris y los aminoácidos distintos con letras negras sobre fondo blanco. Los motivos conservados se indican sobre las secuencias y los aminoácidos característicos se indican mediante un asterisco.

Con el fin de confirmar la pertenencia de PrSCL1 a la familia GRAS y de determinar su relación evolutiva con otros miembros de esta familia se llevó a cabo un análisis filogenético (Fig. 6) comparando la secuencia aminoácida obtenida con las secuencias proteicas de miembros de la familia GRAS descritos en distintas especies vegetales (Pysh *et al.*, 1999; Sassa *et al.*, 2001; Bolle, 2004; Tian *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2007).

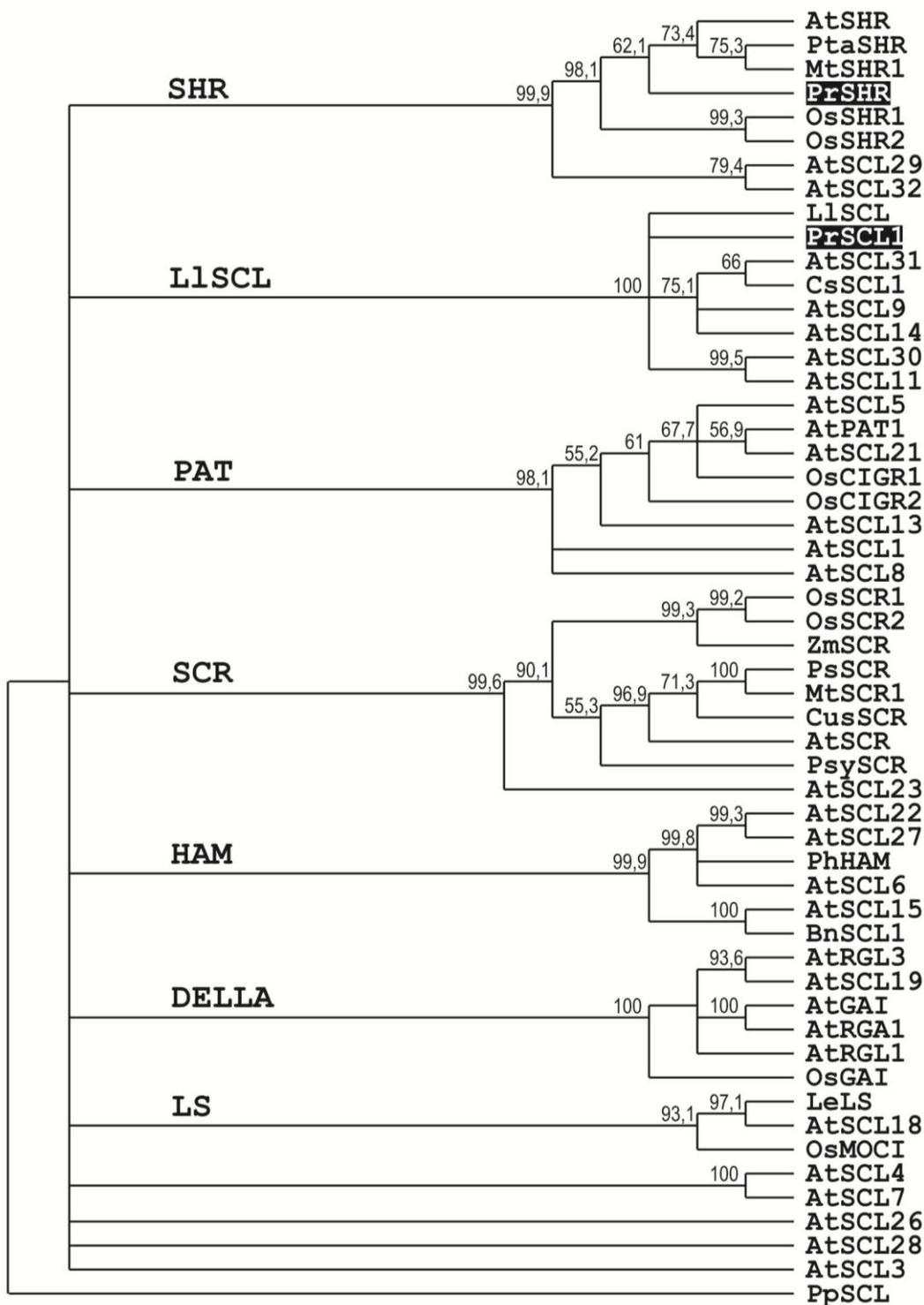


Figura 6. Árbol filogenético de la familia de proteínas GRAS de distintas especies. Las relaciones evolutivas se han determinado mediante el programa PHYLIP. Se han utilizado 1000 análisis para determinar los valores de confianza que aparecen indicados en las ramas. Las dos o tres primeras letras de cada secuencia corresponden a la especie de la que procede, At: *Arabidopsis thaliana*, Pr: *Pinus radiata*, Psy: *Pinus sylvestris*, Mt: *Medicago trunculata*, Ph: *Petunia hybrida*, Zm: *Zea mays*, Os: *Oryza sativa*, Ps: *Pisum sativum*, Bn: *Brassica napus*, Ll: *Lilium longiflorum*, Pta: *Populus tremula x alba*, Cs: *Castanea sativa*, Cus: *Cucumis sativus*, Le: *Lycopersicon esculentum*. Los números de acceso de cada secuencia se encuentran especificados en la sección 12 de Material y Métodos.

Los clados encontrados en el análisis filogenético representaban las subfamilias de las proteínas GRAS nombradas según su representante principal DELLA, LISCL, PAT1, SCL4/7, SHR, HAM, SCR, LsLS (Bolle, 2004; Tian *et al.*, 2004). La secuencia utilizada como “outgroup”, PpSCL, es una posible proteína GRAS codificada por un EST del briófito *Physcomitrella patens* (Nishiyama *et al.*, 2003). En el árbol filogenético resultante de la comparación evolutiva de estas secuencias se pudo comprobar que PrSCL1 aparecía incluido en la rama principal que engloba a todos los miembros de la familia GRAS, formando parte de la subfamilia LISCL. Las comparaciones de las secuencias aminoacídicas de la región conservada de PrSCL1 con LISCL, representante principal de esta subfamilia, mostraron datos de identidad del 62% y de similitud del 77% entre PrSCL1 y LISCL.

El número de copias de *PrSCL1* en el genoma de *P. radiata* se determinó mediante Southern blots sobre digestiones simples y dobles de ADN genómico de esta especie (Fig. 7). En los resultados se observó un patrón de bandas propio de un gen de copia única acompañado de bandas más tenues en cada una de las digestiones realizadas lo que sugiere la presencia de varias copias del gen, o, al menos, de secuencias muy similares a la de la sonda diseñada.

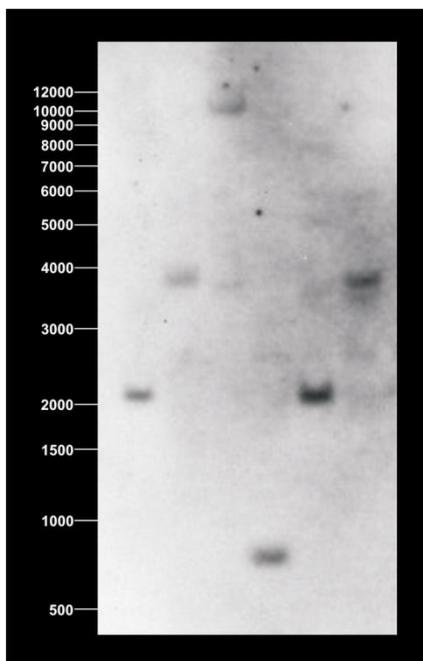


Figura 7: Southern blot de ADN genómico de *P. radiata* hibridado con una sonda de *PrSCL1*. 40 µg de ADN genómico de *P. radiata* digerido con los enzimas siguientes, columnas 1: EcoRI, 2: HindII, 3: EcoRV, 4: EcoRI y HindII, 5: EcoRI y EcoRV y 6: HindII y EcoRV. El marcador de tamaño (en pares de bases) se muestra a la izquierda la imagen.

3.2. Caracterización de genes tipo *SHORT-ROOT*.

La búsqueda de genes tipo *SHORT-ROOT* en *P. radiata* se realizó a partir de la secuencia aminoacídica AtSHR. El tbastn sobre los ESTs y los TCs de *P. taeda* de la base de datos “Plant Gene Database” (<http://www.plantgdb.org>) proporcionó una secuencia de transcrito único denominada TC60455. El cDNA de *P. radiata* obtenido a partir de esta secuencia presentaba una longitud de 2 Kb y contenía una secuencia proteica predicha de 502 aminoácidos que se ha denominado PrSHR (*Pinus radiata* *SHORT-ROOT*; Fig. 8)

```

TTATAAGTGTGGATATCCTGTAATCAATCCCCATCCCCAGTTTCTTTGTTGGAGACCTGTTAGTTTTCCATTCTCAAAGAAAATCTGGGTAAAGTCA
TGCTTTTCGACAGATTTGGTCATCAATGGTCTGAGACTTTGCTATCTTCTCATCAATCCCCAGACAGAGCTGGATGACAATGAGCTTTCAAATGGATTCT
GGAATATGGGATCAAGGGCTAGACTTGAGTTGTATATAATAACAGCTGGGGATCAATAACAGTACCATTGAGAAATTTCTGTGAGGTTACAGTACTCGA
CGAAGTAAAAGCTATCAGACAGCATTGCCAGAGAAAGAAGAGTTTATAGGTTTCACAGCCTGAAACTCCTCCACAGATGATAGCTATTGCTTCTCTCAA
TAGAGAATCGTCGATGATATGGATAGATTGTTACCTCCAGATTAGCAGATTATCAATCCGAAACACCCTCTGTCATGTTCAATTCTAACAAAAATTTG
      M D R L F T S R L A D Y Q S E H P L S C F N S N K N C
GAAGATGCAGACACCCCTAGACACATAGACAGCTACAACAACCATCTCAGCCAGTTTGTCTCCATCCAGAAGGGATAAATCAAGGCAATGCAATTCT
E D A D T P R H I D S Y N N H L S Q F V L P S R R D K S R Q C N S
TTCATGGAGGACGAAGACTTCTCATTCAAGCAATTCCTTCTTTCAAAGAAATGTTCAACAGCAATCAGACCGAAAGGGTACCACGGGACCTAACCAA
F M E D E D F S F K Q F L P F K E M F N S N Q T G K G T T G P N Q
TTTAGCGGCACTAGGGCTACTTCCAGCAGATCAAGTGAAGTACCAGACCCAGCTGTTTTCTGAACTGAACCCCTAGTTTTCCAGAGGATTTGGACCA
F S G T R A T S S R S S E V P D P S L F S E L N P S F P E E F G P
GCAGGATCACGTCGATGGGCTTCAATCTTCTGTAGAATGTGCCAGAGCAATAGCAGAGAATGAAAAAGCCGAACCCACATCTGCTATGGATGCTA
A G S R R W A S N L L L E C A R A I A E N E K S R T Q H L L W M L
AATGAATCATCTCCCTATGGGGATTTGTGAGCAGAAATGGCCTCGTACTTCTGTCAGGCTTTTTTTGCAAATAACAGATACTGGTCTCGTTGC
N E L S S P Y G D C E Q K L A S Y F L Q A F F C K I T D T G P R C
TACACCACACTTTGTTTCAGCTGCTGAAAAACATACTCATTGATTCCACAAGAAAAATGATCTTGAAATTCAGGAATCAAGCCCATGGACAACCTTT
Y T T L C S A A E K T Y S F D S T R K M I L K F Q E S S P W T T F
GGTCATGTTGCTGCCAATGGAGCAATCTGGAGTCTTTGAGGGAGAAATGAAGTGCACATAGTTGACCTGAGTAACACTTTTTGCACACAGTGGCCT
G H V A A N G A I L E S F E G E M K L H I V D L S N T F C T Q W P
ACTTTGTTAGAGGCTTGGCCACCAGAAGTATGACACCCCTCATCTTAGTTGACTACTGTGGTCACCAACAAGGAAGCCACAGCCATGAAGGTCATG
T L L E A L A T R S D D T P H L R L T T V V T N K E A T A M K V M
AAGGAAATAGGGCAAAGAATGGAGAAATTTGCACGGCTCATGGGGTTCCATTGAATTCAGTGTATTTCATCAACACCATCTCCACAAGCTCAACGTT
K E I G Q R M E K F A R L M G V P F E F S V I H Q H H L H K L N V
GGTCCCTTAAAATCAGACCAGATGAAGCTCTGGCCATCAACTGCATCCACAGCTGCAACGTGTTACCAAGAATGGAAGGGATTCATATGTCCACG
G A L K I R P D E A L A I N C I H S L Q R V T K N G R D S I L S T
TTCTACAGCATGAACCCCAAGATAGTTACTGTTGTAGAGGACGAAGTAGACCTGACTCATGAAGATTTGGTGATTGTTTTAGTGAATGCCTTCGTTTT
F Y S M N P K I V T V V E D E V D L T H E D F G D C F S E C L R F
TTTTCTGTTTTTTGATTCTCTAGAGGAGGCTTCTCCAGAACCAGCAACGAGAGATTAATGCTTGAAGAACCAGTGAAGGAGCATTGTGAACATA
F S L F F D S L E E S F S R T S N E R L M L E R T S A R S I V N I
TTGGCTGTGAGGATTCTGAAGTTTATGAGCGCAGGAAAAGGGTGCACAGTGGGCTTGGAGGCTCAAGGAGGCAGGATTTCATACATGTGCATTGAGT
L A C E D S E V Y E R R E K G A Q W A W R L K E A G F I H A A F S
GATGATGTTGTTGATGATGTTAGGGCTTCTCAAGAGATACAAGGAGGTTGGGGTCACTGTAGCAATTCAGATGGGCTTTTCTGACCTGGAAGGAG
D D V V D D V R A L L K R Y K E G W G H C S N S D G L F L T W K E
CAGTGCGCCATTTGGGCTTCTGCCTGGAAGCCATGCTTGTAACAAAAACAAAAATCATGTAAGCTGCGATGACTATCTGGTTTCATGTGAATA
Q C A I W A S A W K P C L *
TCATCGATCATATAATTTTTTCCCAATCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 8. Secuencia de nucleótidos y secuencia aminoacídica predicha del cDNA de *PrSHR*. Se señalan mediante doble subrayado los tramos de serina. El codón de terminación se indica mediante un asterisco.

PrSHR presentaba los motivos característicos y altamente conservados de la familia de proteínas GRAS (Fig. 9). En la región carboxi terminal se encontraron los motivos VHIID, PFYRE y SAW, y las dos repeticiones de leucina (LHRI y LHRII). Sin embargo, no se encontró el motivo LXXL y el motivo LRITG aparecía ligeramente modificado. Además, y tal y como ocurre en AtSHR, el motivo SAW no presentaba la R característica en RX_4E , pero si los residuos conservados WX_7G y $WX_{10}W$. Tampoco aparecían los motivos de localización nuclear (NLS) ni los motivos de fosforilación de tirosina presentes en algunos de los miembros de la familia GRAS.

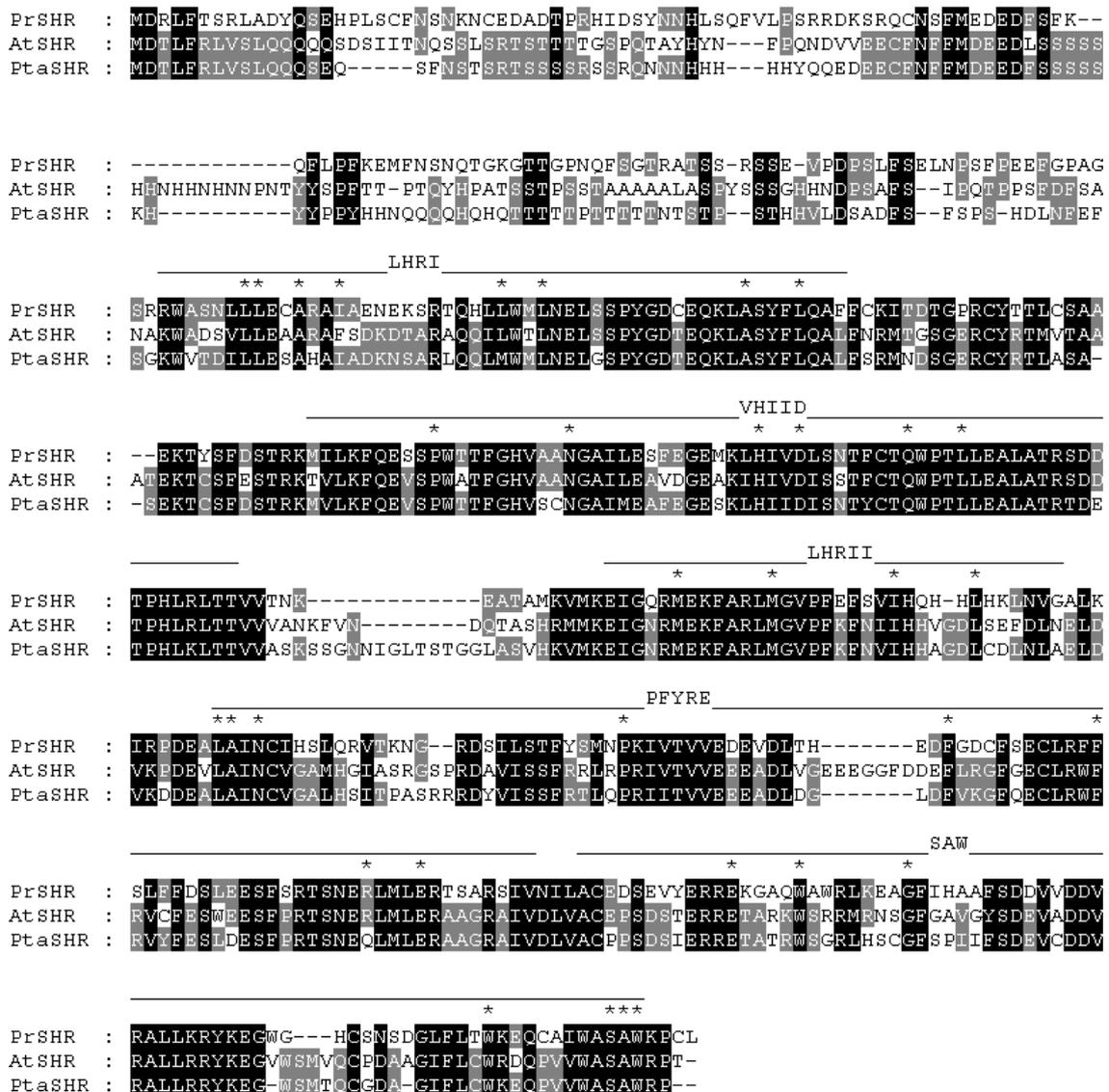


Figura 9. Comparación de las secuencias aminoácidas predichas de PrSHR, AtSHR y PtASHR. Los aminoácidos idénticos se indican con letras blancas sobre fondo negro, los aminoácidos similares con letras blancas sobre fondo gris, los aminoácidos con baja similitud con letras negras sobre fondo gris y los aminoácidos distintos con letras negras sobre fondo blanco. Los motivos conservados se indican sobre las secuencias y los aminoácidos característicos se indican mediante un asterisco.

El análisis de las relaciones evolutivas de PrSHR con otros miembros de la familia GRAS confirmó su pertenencia a la familia GRAS (Fig. 6). Se llevó a cabo un análisis filogenético comparando la secuencia PrSHR con las secuencias de otros miembros de la familia GRAS (Pysh *et al.*, 1999; Sassa *et al.*, 2001; Bolle, 2004; Tian *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2007) en el que PrSHR aparecía incluido en la rama principal que engloba a todos los miembros de la familia GRAS formando parte de la subfamilia SHR. Las comparaciones de las secuencias aminoacídicas de las regiones conservadas de PrSHR y AtSHR mostraron datos de identidad y similitud de 58% y 75% respectivamente.

El patrón de bandas obtenido mediante Southern blot sobre digestiones simples y dobles de ADN genómico de *P. radiata* sugería que se trata de un gen de copia única (Fig. 10).

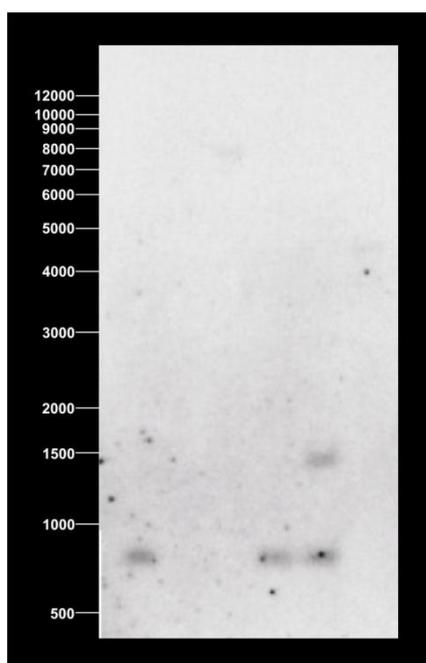


Figura 10: Southern blot de ADN genómico de *P. radiata* hibridado con una sonda de ADN de *PrSHR*. 40 μ g de ADN genómico de *P. radiata* digerido con los enzimas siguientes, columnas 1: EcoRI, 2: HindII, 3: EcoRV, 4: EcoRI y HindII, 5: EcoRI y EcoRV y 6: HindII y EcoRV. El marcador de tamaño se muestra a la izquierda de la imagen.

4. Patrón de expresión de genes de la familia GRAS en pino.

Una vez caracterizados los genes *PrSCLI* y *PrSHR* el objetivo fue caracterizar su patrón de expresión en órganos, en hipocótilos tratados con diferentes dosis de auxina exógena, y en hipocótilos y epicótilos de plántulas de diferentes edades sometidos a tratamientos de inducción auxínica para la formación de raíces adventicias.

4.1. Expresión de *PrSCL1* y *PrSHR* en órganos.

En primer lugar se estudió la expresión de *PrSCL1* y *PrSHR* en diferentes órganos con el fin de determinar en cual o cuáles la expresión de cada uno de los genes era predominante, permitiendo acotar los órganos más probables en los que estos genes ejercen su papel. Para ello, se analizaron los niveles de transcrito de los genes *PrSCL1* y *PrSHR* en raíces, hipocótilos, cotiledones y ápices caulinares (que incluían el meristemo apical, el epicótilo incipiente y las primeras acículas) mediante RT-PCR a tiempo real a partir de ARN de plántulas de 35 días (Fig. 11).

Los resultados de expresión de *PrSCL1* en diferentes órganos de *P. radiata* mostraron que este gen se expresa predominantemente en raíces (Fig. 11). Como muestra de referencia se utilizaron los cotiledones dado que son los órganos en los que se detectó el menor nivel de ARNm de *PrSCL1*. De hecho, los niveles de expresión de este gen en cotiledones eran significativamente inferiores ($p < 0,05$) a la expresión en el resto de órganos (raíces, hipocótilos y ápices caulinares).

Los niveles de transcrito de *PrSCL1* eran máximos en raíces y consistentemente superiores a los encontrados en ápices caulinares e hipocótilos en las diferentes repeticiones, a pesar de no encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de expresión en raíz, ápices caulinares e hipocótilos.

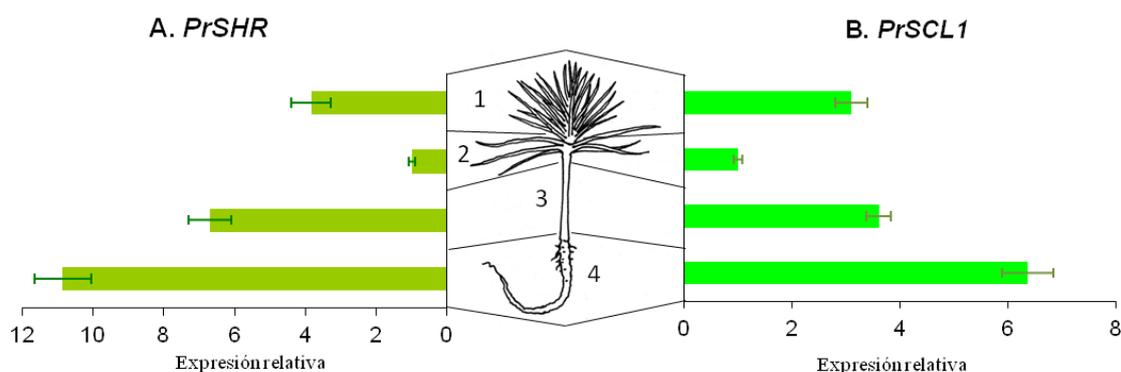


Figura 11. Expresión de los genes *PrSHR* (A) y *PrSCL1* (B) en diferentes órganos de plántulas de 35 días de *P. radiata*. En el centro se muestra un esquema de la plántula, 1: ápice caulinar, 2: cotiledones, 3: hipocótilo, 4: raíz. Los resultados se expresan como expresión relativa respecto a cotiledones determinada mediante RT-PCR a tiempo real a partir de 12,5 ng de ARN de cada uno de los órganos \pm error estándar.

Los resultados de los niveles de transcrito de *PrSHR* en los diferentes órganos de *P. radiata* revelaron que los niveles de expresión de este gen son máximos en raíces al igual que ocurre con *PrSCL1* (Fig. 11). También en este caso los cotiledones fueron utilizados como muestra de referencia dado que presentaban el nivel de expresión más bajo. Los niveles de ARNm de *PrSHR* en estos órganos mostraba diferencias significativas respecto a los niveles de expresión de este gen en el resto de órganos ($p < 0,05$).

Los niveles de transcrito de *PrSHR* en hipocótilos y raíces eran significativamente superiores a los del ápice caulinar ($p < 0,05$). Además, y a pesar de no encontrarse diferencias significativas entre los niveles de expresión de *PrSHR* en hipocótilos y raíces, la expresión de este gen en raíces era superior a la encontrada en ápices caulinares en las diferentes repeticiones.

4.2. Expresión de *PrSCL1* y *PrSHR* en estaquillas de pino en presencia de auxina exógena.

Para caracterizar el efecto de la presencia de auxina exógena sobre los niveles de transcrito de *PrSCL1* y *PrSHR* se llevaron a cabo estudios de expresión de estos genes en muestras tratadas con diferentes concentraciones de auxina. Para ello se realizaron RT-PCRs a tiempo real a partir de ARN de hipocótilos de plántulas de *P. radiata* de 20 días tratados durante 24 horas con concentraciones de AIB de 1, 10 y 20 μM . Como control se utilizaron muestras mantenidas en agua en las mismas condiciones durante 24 horas, y como muestras de referencia se utilizaron hipocótilos intactos de plántulas de 20 días (tiempo cero).

El efecto de la presencia de auxina exógena sobre los niveles de ARNm de *PrSCL1* se puede observar en la figura 12. Las estaquillas tratadas con dosis de 10 y 20 μM de AIB presentaron niveles de expresión significativamente superiores ($p < 0,05$) a los de estaquillas tratadas con 1 μM AIB y a los de las estaquillas control, lo que sugiere que los niveles de ARNm aumentan en presencia de auxina exógena a concentraciones óptimas para enraizamiento. También se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) de los niveles de transcrito de las muestras control y de las muestras tratadas respecto a las muestras de referencia (tiempo cero) (Fig 12).

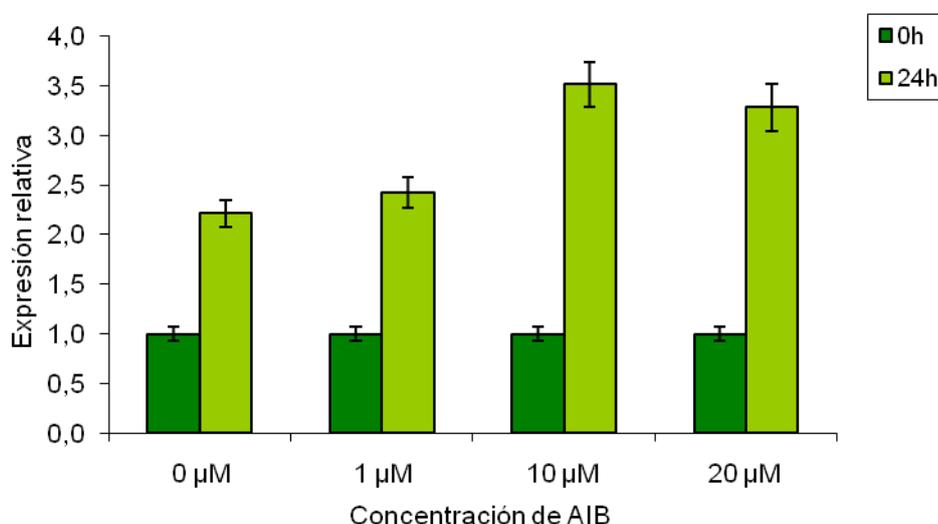


Figura 12. Expresión de *PrSCL1* en presencia de distintas concentraciones de auxina durante 24 horas. Los resultados se expresan como expresión relativa respecto a tiempo cero determinada mediante RT-PCR a tiempo real a partir de 12,5 ng de ARN de la base de los hipocótilos tratados \pm error estándar.

En el caso de *PrSHR*, tanto en los hipocótilos sometidos a tratamiento auxínico como en las muestras control los niveles de transcrito de este gen aumentaban significativamente respecto a las muestras de referencia ($p < 0,05$) (Fig 13). Lo que sugiere que los niveles de expresión de *PrSHR* no se ven afectados por la presencia de auxina exógena, al menos, en las condiciones establecidas en estos experimentos.

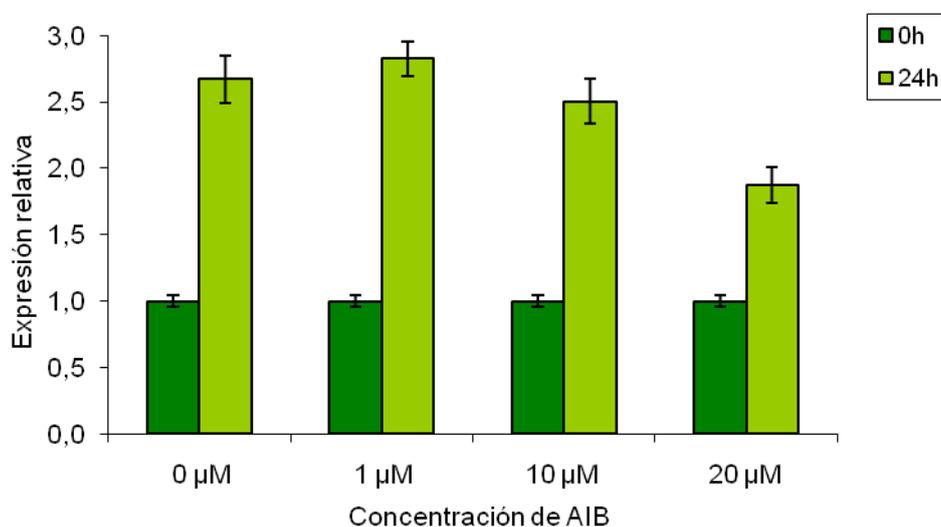


Figura 13. Expresión de *PrSHR* en presencia de distintas concentraciones de auxina durante 24 horas. Los resultados se expresan como expresión relativa respecto a tiempo cero determinada mediante RT-PCR a tiempo real a partir de 12,5 ng de ARN de la base de los hipocótilos tratados \pm error estándar.

4.3. Dinámica espacio-temporal de expresión de *PrSCL1* durante el enraizamiento adventicio en estaquillas de plántulas de distintas edades.

La posible participación de *PrSCL1* en el enraizamiento adventicio en *P. radiata* se analizó estudiando sus perfiles de expresión espacio-temporales durante los primeros 15 días del proceso de formación de raíces adventicias en *P. radiata*. También se estudiaron las dinámicas de expresión de *PrSCL1* en hipocótilos y epicótilos de distintas edades con el objetivo de determinar si en las transiciones de desarrollo se producen cambios en la expresión de este gen que puedan asociarse a las diferencias en la capacidad para enraizar entre los distintos estadios de desarrollo.

Se llevaron a cabo dos aproximaciones experimentales, RT-PCR a tiempo real para establecer la dinámica temporal de expresión de *PrSCL1* e hibridaciones *in situ* para comprobar la localización espacial de los ARNm de este gen. Mediante RT-PCR a tiempo real se analizaron los niveles de ARNm de *PrSCL1* a partir de ARN extraído de hipocótilos y epicótilos de plántulas de 20, 60 y 90 días sometidos a tratamientos de inducción de enraizamiento por aplicación continua de auxina exógena (10 μ M AIB) durante 8 horas, 24 horas, 48 horas y 5 días y durante 15 días en estaquillas de plántulas de 20 y de 60 días. Las hibridaciones *in situ* se llevaron a cabo en cortes transversales

de hipocótilos de plántulas de 20, 60 y 90 días mantenidos en solución de inducción de raíces adventicias (10 μ M AIB) durante 24 horas y 15 días. Como muestras control se utilizaron hipocótilos y epicótilos de las diferentes edades mantenidos en agua durante los mismos tiempos y en las mismas condiciones. Y como muestras de referencia se utilizaron estaquillas de plántulas de 20, 60 ó 90 días intactas (tiempo cero). Los resultados de los análisis de expresión mediante RT-PCR a tiempo real se expresaron como expresión relativa respecto al tiempo cero.

4.3.1. Dinámica espacio-temporal de expresión de *PrSCL1* durante el enraizamiento adventicio en hipocótilos de plántulas de 20 días.

Los niveles de expresión de *PrSCL1* mostraron variaciones significativas durante el enraizamiento adventicio en *P. radiata* (Fig. 14). El tratamiento auxínico provocó un aumento significativo ($p < 0,01$) de los niveles de ARNm de *PrSCL1* durante las primeras 24 horas de tratamiento, este aumento de expresión se observó desde las primeras 8 horas y se mantuvo durante las primeras 24 horas, sin embargo, tras 48 horas de tratamiento los niveles de transcrito eran menores y tras 5 y 15 días la expresión de *PrSCL1* se situó en niveles similares a los de referencia y significativamente inferiores a los observados tras 24 horas de tratamiento ($p < 0,01$). En las muestras control no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de *PrSCL1* a lo largo del tiempo. Estos resultados sugieren que *PrSCL1* podría presentar un patrón de respuesta temprana y transitoria frente al tratamiento con auxina para la inducción de raíces adventicias en *P. radiata*.

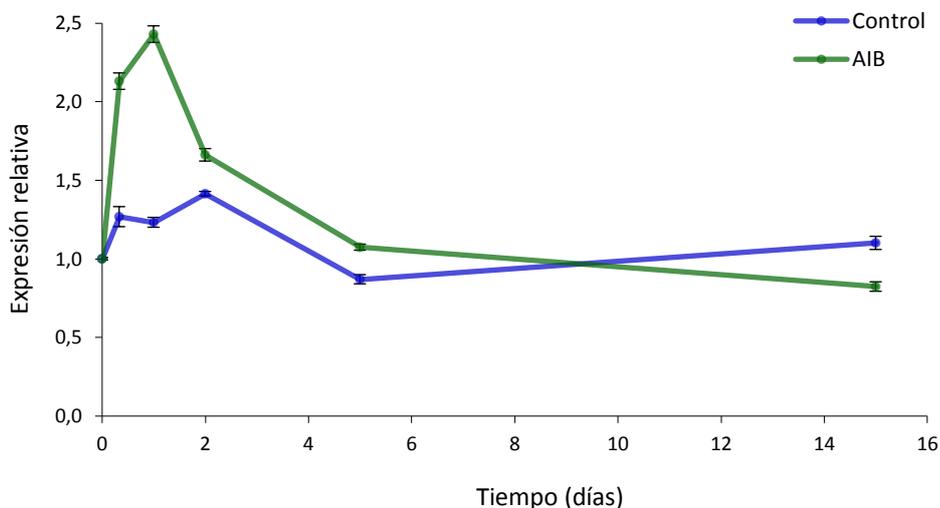


Figura 14. Expresión de *PrSCL1* durante la formación de raíces adventicias en hipocótilos de plántulas de 20 días de *P. radiata* en presencia de 10 μ M AIB. Los resultados se expresan como expresión relativa respecto a tiempo cero determinada mediante RT-PCR a tiempo real a partir de 12,5 ng de ARN de la base de los hipocótilos tratados \pm error estándar. Control: estaquillas mantenidas en agua.

La expresión de *PrSCL1* en cortes de hipocótilos de plántulas de 20 días sometidos a tratamiento auxínico durante 24 horas se localizó en la región cambial entre las regiones de los polos xilemáticos y en las zonas inmediatamente centrífugas a los canales resiníferos (Fig. 15B). Tras 15 días de tratamiento con auxina se observaron primordios radiculares adventicios en los que se detectó expresión de *PrSCL1* en todo el primordio (Fig. 15C). Los cortes procedentes de muestras control (Fig. 15A) y de muestras de referencia (tiempo cero) no mostraron señal de la sonda del gen *PrSCL1*.

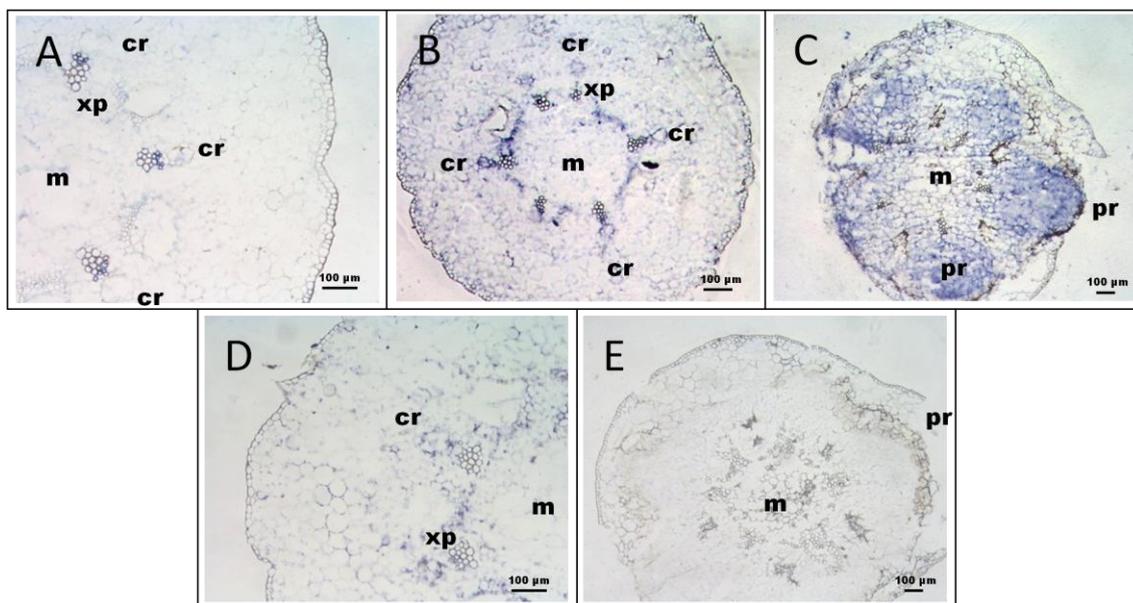


Figura 15. Localización de la expresión de *PrSCL1* en secciones transversales de hipocótilos de plántulas de 20 días de *P. radiata* durante la formación de raíces adventicias. A, B y C: Hibridación *in situ* con sonda antisentido de *PrSCL1*; A) hipocótilo control tras 24 horas, B) hipocótilo tras 24 horas enraizando tratado con 10 μ M AIB, C) hipocótilo tras 15 días enraizando tratado con 10 μ M AIB. D y E: Hibridación *in situ* con sonda sentido de *PrSCL1* (control de hibridación); D) hipocótilo control tras 24 horas, E) hipocótilo tras 15 días enraizando tratado con 10 μ M AIB. m: médula; xp: xilema primario; cr: canal resinífero; pr: primordio radicular.

4.3.2. Dinámica espacio-temporal de expresión de *PrSCL1* durante el enraizamiento adventicio en hipocótilos de plántulas de 60 y 90 días.

Dado que *PrSCL1* presentó expresión mayoritaria en raíces, que su expresión aumentaba durante las primeras etapas de formación de raíces adventicias, y que ésta se localizaba específicamente en los primordios radiculares adventicios, se trató de determinar la posible relación de cambios de expresión de este gen con la pérdida de potencial de enraizamiento adventicio asociado a la edad en hipocótilos de *P. radiata*.

Los niveles de expresión de *PrSCL1* en hipocótilos de plántulas de 60 días tratados con auxina y en hipocótilos control no sufrían variaciones significativas a lo largo del tiempo durante los primeros 5 días (Fig. 16). Tras 15 días se observaba un aumento de los niveles de ARNm de *PrSCL1* que tan solo presentaba diferencias significativas ($p < 0,05$) en las muestras control. Este patrón de expresión

contrasta con el encontrado en hipocótilos de 20 días, en los que la inducción de estos genes se producía en las primeras 24 horas y únicamente en presencia de auxina exógena (Fig 14).

En hipocótilos de plántulas de 90 días, muestras en las que las que no se producen raíces adventicias, no se detectaron variaciones significativas en los niveles de expresión de *PrSCL1* a lo largo del tiempo ni en las muestras tratadas con auxina ni en las muestras control (Fig. 17).

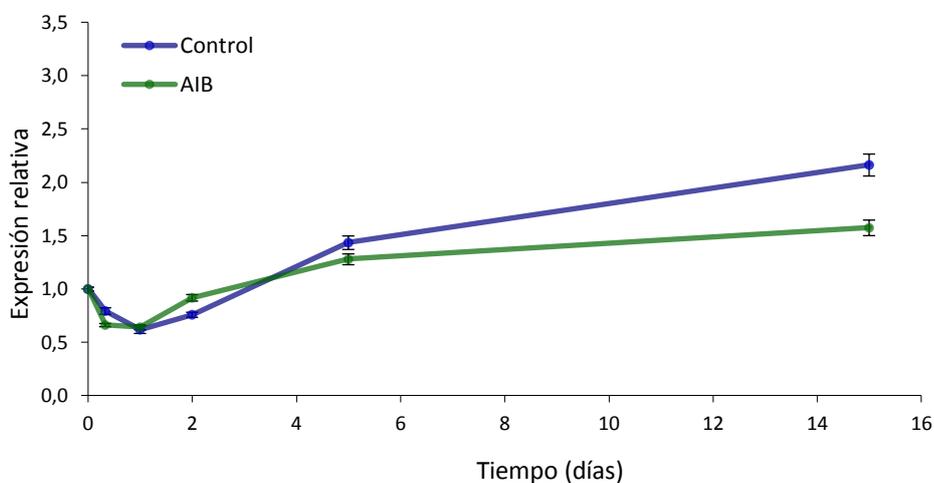


Figura 16. Expresión de *PrSCL1* durante los primeros 15 días de tratamiento para la inducción de raíces adventicias en hipocótilos de plántulas de 60 días de *P. radiata* en presencia de 10 μ M AIB. Los resultados se expresan como expresión relativa respecto a tiempo cero determinada mediante RT-PCR a tiempo real a partir de 12,5 ng de ARN de la base de los hipocótilos tratados \pm error estándar. Control: estaquillas mantenidas en agua.

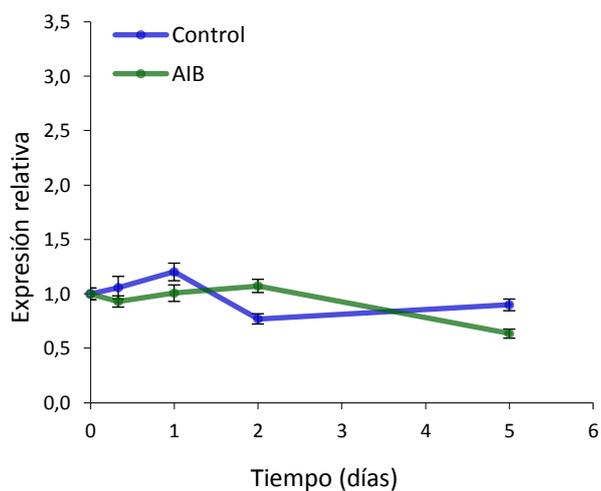


Figura 17: Expresión de *PrSCL1* durante los primeros 5 días de tratamiento para la inducción de raíces adventicias en hipocótilos de plántulas de 90 días de *P. radiata* en presencia de 10 μ M AIB. Los resultados se expresan como expresión relativa respecto a tiempo cero determinada mediante RT-PCR a tiempo real a partir de 12,5 ng de ARN de la base de los hipocótilos tratados \pm error estándar. Control: estaquillas mantenidas en agua.

El estudio de expresión espacial del gen *PrSCLI* en hipocótilos de plántulas de 60 y 90 días se observó señal en todas las muestras analizadas (excepto las muestras hibridadas con sonda sentido), sin embargo se trataba de expresión no localizada en ninguna zona concreta de los cortes (Fig. 18). En resumen, la expresión espacio- temporal del gen *PrSCLI* en las primeras etapas de inducción de enraizamiento no sufría variaciones significativas ni se concentraba en ninguna zona específica de los hipocótilos de plántulas de 60 y 90 días analizados.

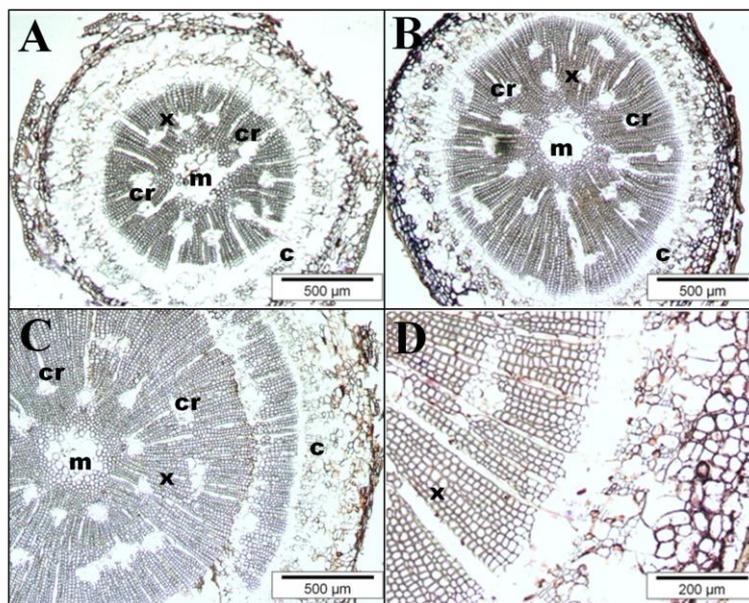


Figura 18. Localización de la expresión de *PrSCLI* en secciones transversales de hipocótilos de plántulas de 90 días de *P. radiata*. A, B y C: Hibridación *in situ* con sonda antisentido de *PrSCLI*; A) hipocótilo control tras 24 horas, B) hipocótilo tras 24 horas enraizando tratado con 10 μ M AIB, C) hipocótilo tras 15 días enraizando tratado con 10 μ M AIB. D: Hibridación *in situ* con sonda sentido de *PrSCLI* (control de hibridación), hipocótilo tras 24 horas enraizando tratado con 10 μ M AIB.

m: médula; x: xilema; c: cambium vascular; cr: canal resinífero.

4.3.3. Dinámica espacio-temporal de expresión de *PrSCLI* durante el enraizamiento adventicio en epicótilos de plántulas de 60 y 90 días.

El estudio de las dinámicas de expresión de *PrSCLI* en epicótilos de plántulas de distintas edades mostró importantes diferencias entre los patrones de expresión de este gen en epicótilos de plántulas de 60 y en epicótilos de plántulas de 90 días, y entre éstos y los patrones de expresión en hipocótilos.

En las muestras de epicótilos de plántulas de 60 días tanto tratadas con auxina como control no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de *PrSCLI* a lo largo del tiempo (Fig. 19). De hecho, su expresión parecía disminuir a lo largo del tiempo a pesar de no encontrarse diferencias significativas. Mientras que el patrón de expresión de este gen en epicótilos de plántulas de 90 días (Fig. 20) presentaba un aumento significativo ($p < 0,05$) en los niveles de transcrito de este gen tras 24 horas tanto en las muestras tratadas como en las muestras control.

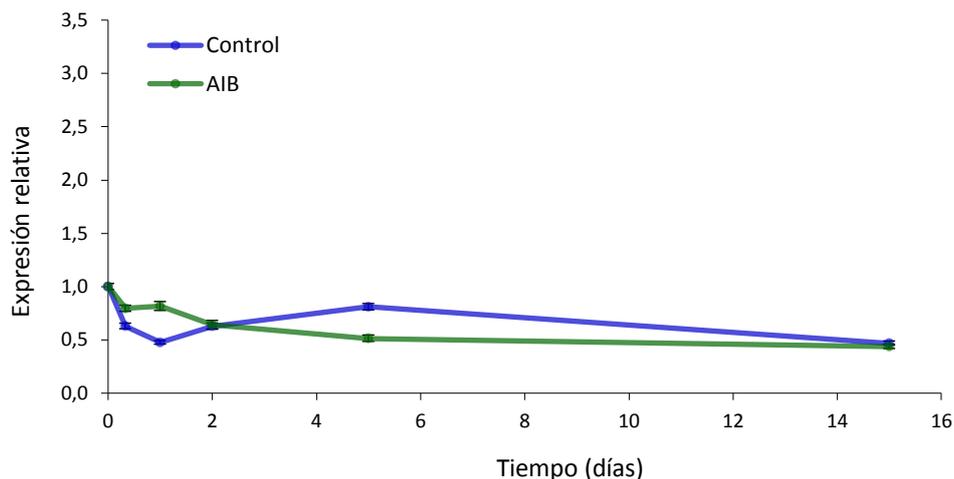


Figura 19. Expresión de *PrSCL1* durante los primeros 15 días de tratamiento para la inducción de raíces adventicias en epicótilos de plántulas de 60 días de *P. radiata* en presencia de 10 μ M AIB. Los resultados se expresan como expresión relativa respecto a tiempo cero determinada mediante RT-PCR a tiempo real a partir de 12,5 ng de ARN de la base de los epicótilos tratados \pm error estándar. Control: estaquillas mantenidas en agua.

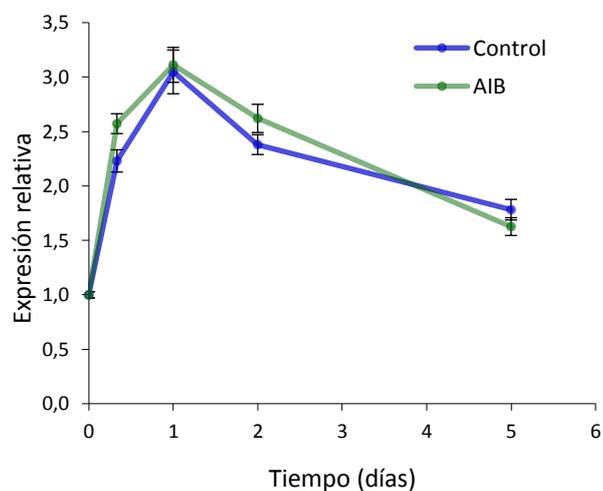


Figura 20. Expresión de *PrSCL1* durante los primeros 5 días de tratamiento para la inducción de raíces adventicias en epicótilos de plántulas de 90 días de *P. radiata* en presencia de 10 μ M AIB. Los resultados se expresan como expresión relativa respecto a tiempo cero determinada mediante RT-PCR a tiempo real a partir de 12,5 ng de ARN de la base de los epicótilos tratados \pm error estándar. Control: estaquillas mantenidas en agua.

Al igual que lo observado en hipocótilos, el estudio espacial de expresión en epicótilos procedentes de plántulas de 60 y 90 días presentaban expresión de *PrSCL1* inespecífica que no se localizaba en ninguna zona concreta de los cortes (Fig. 21).

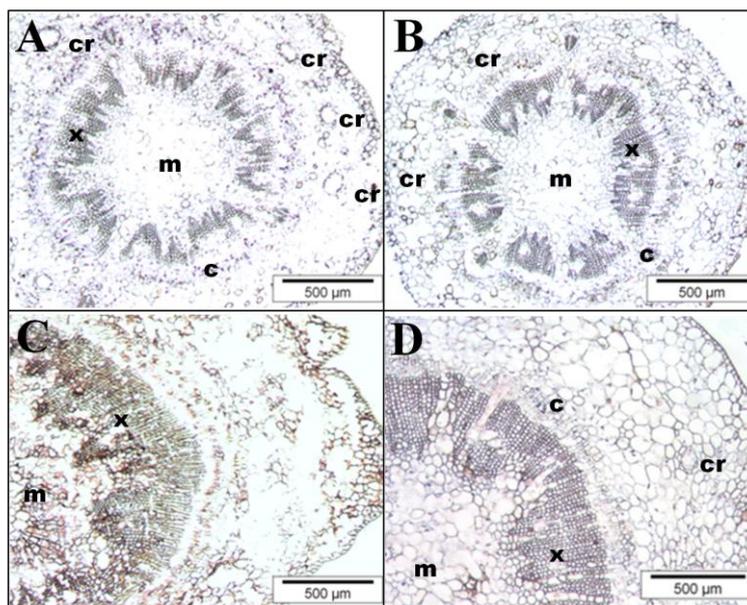


Figura 21. Localización de la expresión de *PrSCL1* en secciones transversales de epicótilos de plántulas de 90 días de *P. radiata*. A, B y C: Hibridación *in situ* con sonda antisentido de *PrSCL1*; A) muestra de referencia, epicótilo a tiempo cero, B) epicótilo 24 horas enraizando tratado con 10 μ M AIB, C) epicótilo tras 15 días enraizando tratado con 10 μ M AIB. D: Hibridación *in situ* con sonda sentido de *PrSCL1* (control de hibridación), epicótilo tras 15 días enraizando tratado con 10 μ M AIB.
m: médula; x: xilema; c: cambium vascular; cr: canal resinífero.

4.4. Dinámica espacio-temporal de expresión de *PrSHR* durante el enraizamiento adventicio en estaquillas de plántulas de distintas edades.

Para el estudio de la posible participación de *PrSHR* en el enraizamiento adventicio en *P. radiata* y de las dinámicas de expresión de este gen en hipocótilos y epicótilos de distintas edades se llevaron a cabo las mismas aproximaciones experimentales descritas para *PrSCL1*.

Mediante RT-PCR a tiempo real se analizaron los niveles de expresión de *PrSHR* a partir de ARN extraído de hipocótilos y epicótilos de plántulas de 20, 60 y 90 días sometidos a tratamientos de inducción de enraizamiento por aplicación continua 10 μ M AIB durante 8 horas, 24 horas, 48 horas y 5 días y durante 15 días en estaquillas de plántulas de 20 y de 60 días. Mediante hibridaciones *in situ* en cortes transversales de hipocótilos de plántulas de 20, 60 y 90 días tratados 10 μ M AIB durante 24 horas y 15 días se estudió la localización espacial de su expresión. Como muestras control se utilizaron hipocótilos y epicótilos de las diferentes edades mantenidos en agua durante los mismos tiempos y en las mismas condiciones. Como muestras de referencia se utilizaron estaquillas de plántulas de 20, 60 y 90 días intactas (tiempo cero). Los resultados de los análisis de expresión mediante RT-PCR a tiempo real se expresaron como expresión relativa respecto al tiempo cero.

4.4.1. Dinámica espacio-temporal de expresión de *PrSHR* durante el enraizamiento adventicio en hipocótilos de plántulas de 20 días.

Los patrones de expresión encontrados mediante RT-PCR a tiempo real en hipocótilos de 20 días revelaron que los niveles de transcrito de *PrSHR* sufrían variaciones significativas ($p < 0,05$) durante el proceso de inducción de formación de raíces adventicias, especialmente en las primeras horas de tratamiento (Fig. 22). La expresión de *PrSHR* (Fig. 22) aumentaba significativamente desde las primeras horas de inducción, encontrando los picos máximos tras 8 y 24 horas tanto en las muestras tratadas como en las control ($p < 0,01$). A partir de las 48 horas de tratamiento se observó una ligera disminución de los niveles de expresión a pesar de que se mantenían por encima de los valores de referencia.

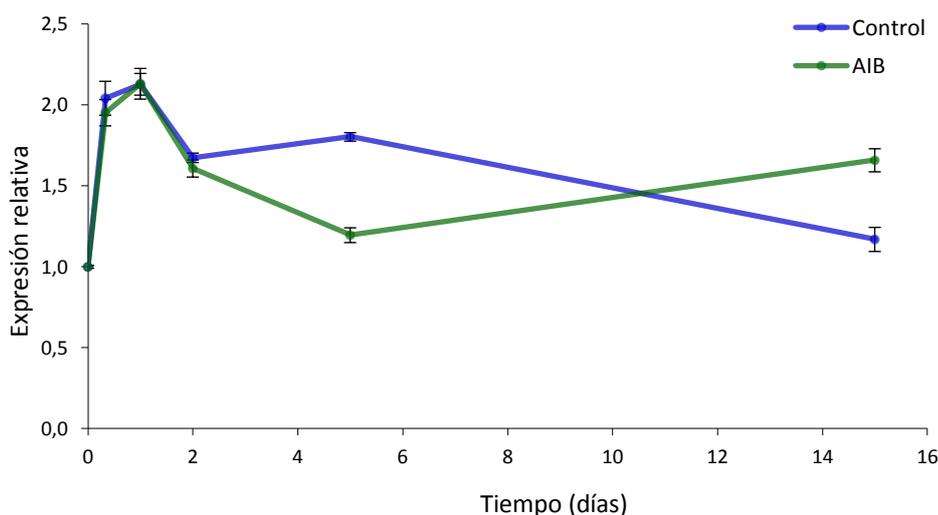


Figura 22. Expresión de *PrSHR* durante la formación de raíces adventicias en hipocótilos de plántulas de 20 días de *P. radiata* en presencia de 10 μ M AIB. Los resultados se expresan como expresión relativa respecto a tiempo cero determinada mediante RT-PCR a tiempo real a partir de 12,5 ng de ARN de la base de los hipocótilos tratados \pm error estándar. Control: estaquillas mantenidas en agua.

Las hibridaciones *in situ* con sondas específicas para *PrSHR* (Fig. 23) revelaron que tras 24 horas los transcritos de este gen se localizaban, tanto en las muestras tratadas como en las muestras control, en la región cambial en las zonas localizadas entre los haces vasculares y en las zonas circundantes a los canales resiníferos (Fig 23B). En las muestras sometidas a tratamiento durante 15 días se detectó expresión de *PrSHR* en la región más apical de los primordios radiculares adventicios (Fig. 23C).

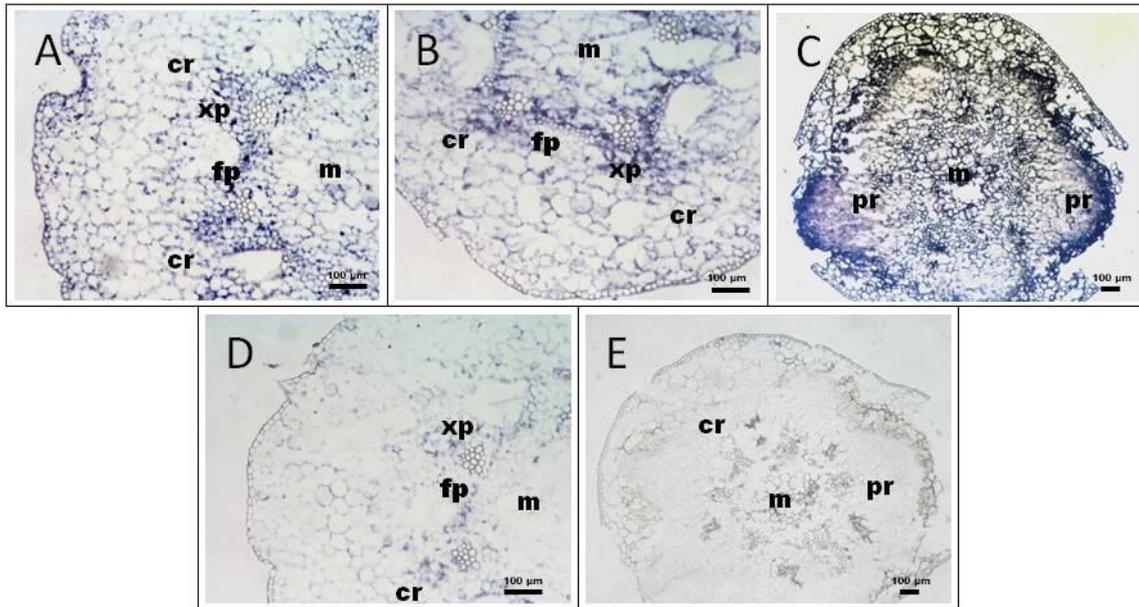


Figura 23. Localización de la expresión de *PrSHR* en secciones transversales de hipocótilos de plántulas de 20 días de *P. radiata* durante la formación de raíces adventicias. A, B y C: Hibridación *in situ* con sonda antisentido de *PrSHR*; A) hipocótilo control tras 24 horas, B) hipocótilo tras 24 horas enraizando tratado con 10 μ M AIB, C) hipocótilo tras 15 días enraizando tratado con 10 μ M AIB. D y E: Hibridación *in situ* con sonda sentido de *PrSHR* (control de hibridación); D) hipocótilo control tras 24 horas, E) hipocótilo tras 15 días enraizando tratado con 10 μ M AIB. m: médula; xp: xilema primario; fp: floema primario; cr: canal resinífero; pr: primordio radicular.

4.4.2. Dinámica espacio-temporal de expresión de *PrSHR* durante el enraizamiento adventicio en hipocótilos de plántulas de 60 y 90 días.

Para determinar la posible relación de cambios de expresión de *PrSHR* con la pérdida de potencial de enraizamiento adventicio asociado a la edad en hipocótilos de *P. radiata* se llevaron a cabo estudios de expresión de este gen en hipocótilos de plántulas de 60 y 90 días.

En los hipocótilos de plántulas de 60 días los niveles de transcrito de *PrSHR* apenas sufrían variaciones durante los primeros 5 días de tratamiento, mientras que en las muestras tratadas durante 15 días se observaba un aumento significativo de expresión ($p < 0,05$) (Fig. 24). Este patrón de expresión contrastaba con el encontrado en hipocótilos de plántulas de 20 días, en los que la inducción de *PrSHR* se producía en las primeras 24 horas (Fig 22). Las muestras control seguían el mismo patrón de expresión que las muestras tratadas con auxina con un aumento significativo de los niveles de transcrito de *PrSHR* tras 15 días (Fig. 24).

En hipocótilos de plántulas de 90 días, que no desarrollan raíces adventicias, no se detectaron variaciones significativas en los niveles de expresión de *PrSCLI* a lo largo del tiempo ni en las muestras tratadas con auxina ni en las muestras control (Fig. 25). Se pudo observar que las dinámicas de expresión de *PrSHR* en hipocótilos de plántulas de 60 y 90 días (Figs. 24 y 25) eran muy similares a los patrones de expresión de *PrSCLI* (Figs. 16 y 17) en estas mismas muestras.

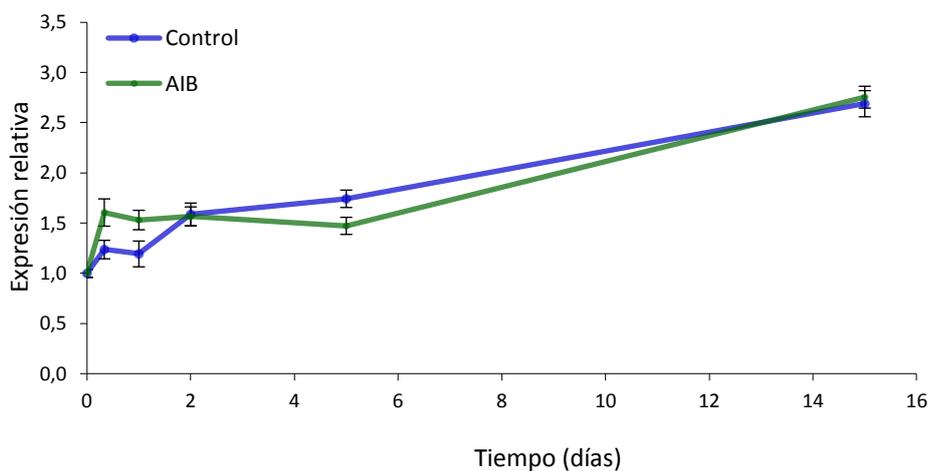


Figura 24. Expresión de *PrSHR* durante los primeros 15 días de tratamiento para la inducción de raíces adventicias en hipocótilos de plántulas de 60 días de *P. radiata* en presencia de 10 μM AIB. Los resultados se expresan como expresión relativa respecto a tiempo cero determinada mediante RT-PCR a tiempo real a partir de 12,5 ng de ARN de la base de los hipocótilos tratados \pm error estándar. Control: estaquillas mantenidas en agua.

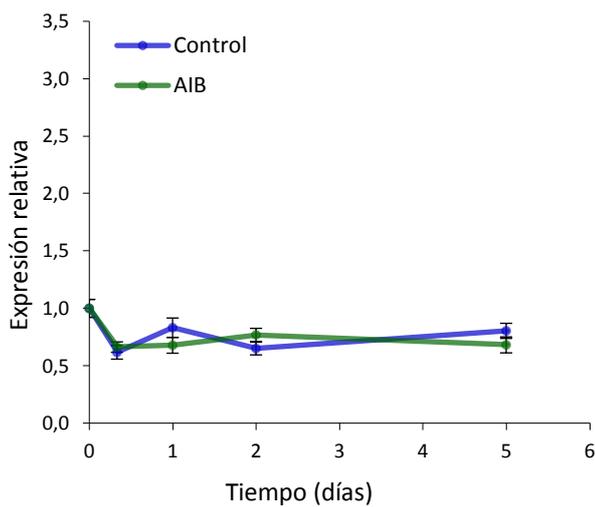


Figura 25. Expresión de *PrSHR* durante los primeros 5 días de tratamiento para la inducción de raíces adventicias en hipocótilos de plántulas de 90 días de *P. radiata* en presencia de 10 μM AIB. Los resultados se expresan como expresión relativa respecto a tiempo cero determinada mediante RT-PCR a tiempo real a partir de 12,5 ng de ARN de la base de los hipocótilos tratados \pm error estándar. Control: estaquillas mantenidas en agua.

Para el estudio de la dinámica espacial de expresión de *PrSHR* en hipocótilos de plántulas de 60 y 90 días, se llevaron a cabo hibridaciones *in situ* con sondas específicas. Los resultados obtenidos mostraron que la señal de la sonda no presentaba localización específica (Fig. 26).

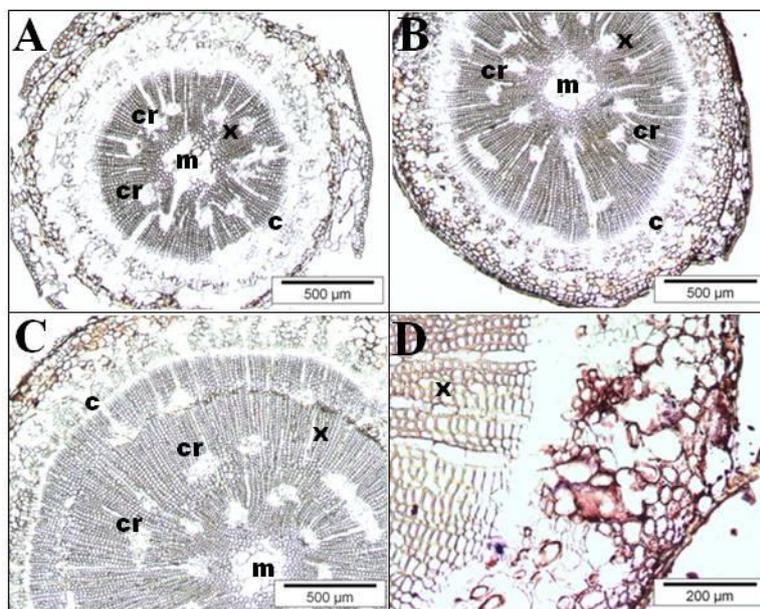


Figura 26. Localización de la expresión de *PrSHR* en secciones transversales de hipocótilos de plántulas de 90 días de *P. radiata*. A, B y C: Hibridación *in situ* con sonda antisentido de *PrSHR*; A) hipocótilo control tras 24 horas, B) hipocótilo tras 24 horas enraizando tratado con 10 μ M AIB, C) hipocótilo tras 15 días enraizando tratado con 10 μ M AIB. D: Hibridación *in situ* con sonda sentido de *PrSCL1* (control de hibridación), hipocótilo intacto, muestra de referencia.

m: médula; x: xilema; c: cambium vascular; cr: canal resinífero.

4.4.3. Dinámica espacio-temporal de expresión de *PrSHR* durante el enraizamiento adventicio en epicótilos de plántulas de 60 y 90 días.

En los epicótilos de plántulas de 60 días, los niveles de transcrito de *PrSHR* no presentaban diferencias significativas durante las primeras 24 horas, mientras que tras 48 horas se observó un aumento significativo de expresión ($p < 0,05$) tanto en las muestras tratadas con auxina exógena como en las muestras control (Fig. 27). Este aumento de expresión no se mantenía y tras 5 días de tratamiento los niveles de expresión no eran significativamente diferentes a los de las primeras 24 horas (Fig. 27).

El patrón de expresión de *PrSHR* a lo largo del tiempo en epicótilos de plántulas de 60 días es similar al que se obtuvo en epicótilos de plántulas de 90 días, en el que se observaba un único punto de aumento significativo ($p < 0,05$) de los niveles de ARNm de *PrSHR* tras 48 horas tanto en las muestras tratadas como en las muestras control (Fig 28).

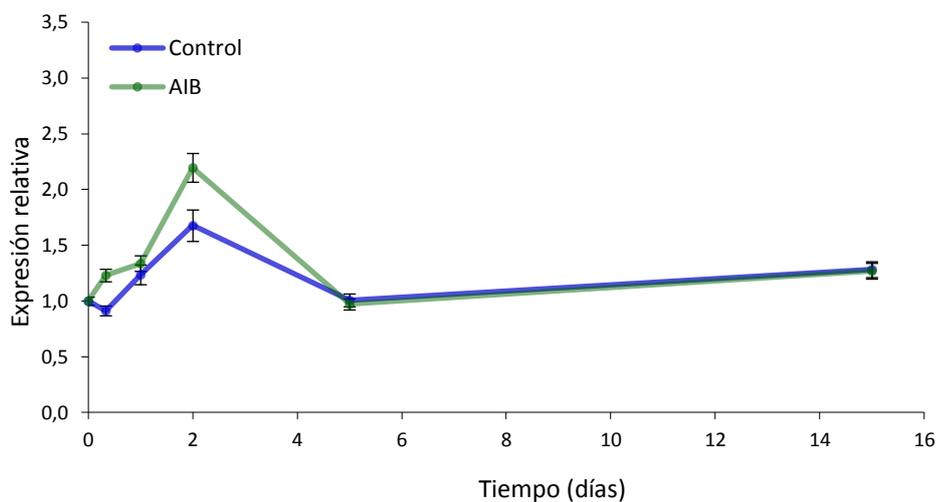


Figura 27. Expresión de *PrSHR* durante los primeros 15 días de tratamiento para la inducción de raíces adventicias en epicótilos de plántulas de 60 días de *P. radiata* en presencia de 10 μ M AIB. Los resultados se expresan como expresión relativa respecto a tiempo cero determinada mediante RT-PCR a tiempo real a partir de 12,5 ng de ARN de la base de los epicótilos tratados \pm error estándar. Control: estaquillas mantenidas en agua.

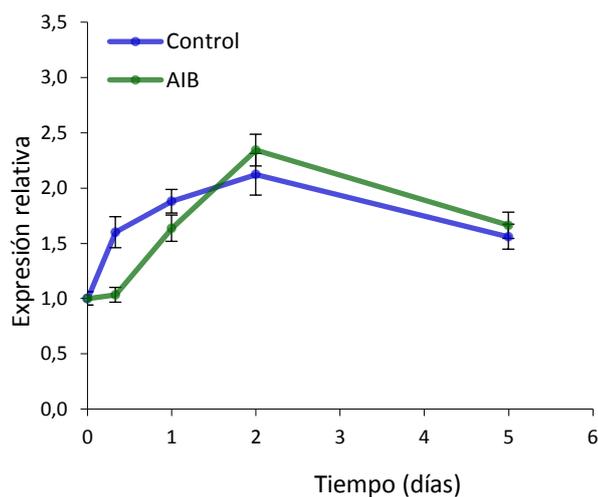


Figura 28. Expresión de *PrSHR* durante los primeros 5 días de tratamiento para la inducción de raíces adventicias en epicótilos de plántulas de 90 días de *P. radiata* en presencia de 10 μ M AIB. Los resultados se expresan como expresión relativa respecto a tiempo cero determinada mediante RT-PCR a tiempo real a partir de 12,5 ng de ARN de la base de los epicótilos tratados \pm error estándar. Control: estaquillas mantenidas en agua.

Tampoco en este caso los resultados de expresión espacial permitieron definir una localización específica de la expresión de *PrSHR* ya que la señal de la sonda para el gen *PrSHR* se localizaba a lo largo de todo el corte (Fig. 29)

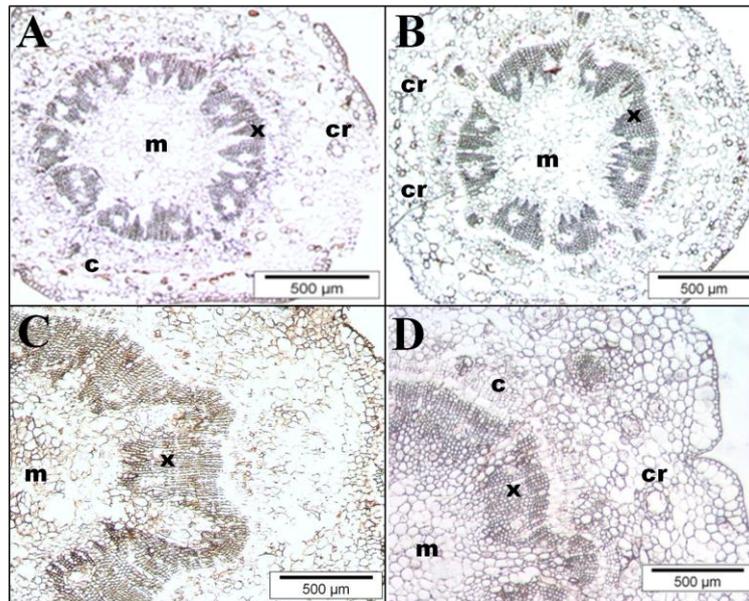


Figura 29. Localización de la expresión de *PrSHR* en secciones transversales de epicótilos de plántulas de 90 días de *P. radiata*. A, B y C: Hibridación *in situ* con sonda antisentido de *PrSHR*; A) epicótilo control tras 24 horas, B) epicótilo 24 horas enraizando tratado con 10 μM AIB, C) epicótilo tras 15 días enraizando tratado con 10 μM AIB. D: Hibridación *in situ* con sonda sentido de *PrSHR* (control de hibridación), epicótilo tras 15 días enraizando tratado con 10 μM AIB.
m: médula; x: xilema; cr: canal resinífero.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. Cambio de fase y enraizamiento adventicio en *Pinus radiata*.

Una de las limitaciones para mejorar eficazmente la propagación de árboles adultos seleccionados, y así disponer de importantes herramientas para la propagación y, como consecuencia, la mejora de la productividad forestal es la recalcitrancia de los tejidos adultos para ser regenerados, lo que impide la propagación en masa de los individuos seleccionados. La pérdida de capacidad de enraizamiento adventicio asociada a la edad del árbol limita el éxito de los programas de propagación clásica mediante estaquillado y de los programas de propagación mediante técnicas *in vitro* (Díaz-Sala *et al.*, 1991; Greenwood y Weir, 1994; Díaz-Sala *et al.*, 1996, Golfbarb *et al.*, 1998). El cambio de fase es un proceso complejo que afecta a numerosos caracteres que parecen estar regulados independientemente y que varían en el tiempo de forma muy distinta en las distintas especies leñosas (Greenwood *et al.*, 1989; Poethig, 1990; Hackett y Murray, 1993; Poethig, 2003). Este es un hecho que debe tenerse en cuenta a la hora de plantear estudios relacionados con caracteres asociados al cambio de fase y de valorar un resultado concreto en un genotipo o especie determinados. Además, las especies seleccionadas como modelos, además de su interés forestal, deberían cumplir unos requisitos básicos, como amplia distribución geográfica, cambios asociados a la maduración fácilmente observables y la suficiente plasticidad como para responder a tratamientos que pudieran revertir, al menos parcialmente, el efecto de la madurez. También es necesario mencionar que la diversidad de los sistemas experimentales utilizados y el enfoque en el planteamiento de la investigación limitan la interpretación de resultados (Hackett, 1985; Bonga, 1982; Greenwood, 1987; Mencuccini *et al.*, 2005; Muneé- Bosch, 2007; Basheer-Salimia, 2007).

En coníferas, la pérdida de capacidad de enraizamiento adventicio asociada a la edad ha sido estudiada utilizando sistemas experimentales basados en la utilización de clones adultos en campo o en injertos de árboles adultos sobre pies juveniles para minimizar el efecto del tamaño (Foster *et al.*, 1984; Greenwood *et al.*, 1989; Steele *et al.*, 1989; Monteouis, 1991). Todos estos estudios indicaron que era necesario disponer de sistemas experimentales simples de respuesta sincrónica que, en periodos cortos de tiempo, respondieran al estímulo de enraizamiento manifestando la respuesta típica asociada al cambio de fase, ya que los mecanismos que controlan la formación de raíces adventicias son difíciles de estudiar en estaquillas en campo debido a la baja frecuencia e impredecibilidad del enraizamiento y, sobre todo, a la falta de sincronía en la inducción de raíces entre estaquillas. Un sistema experimental que cumple estas características es el descrito por Díaz-Sala *et al.* (1996) basado en la distinta capacidad de enraizamiento en respuesta a auxina de estaquillas de hipocótilo y epicótilo de plántulas de *P. taeda*. Las muestras con alta capacidad de enraizamiento adventicio en respuesta a auxina son hipocótilos de plántulas de 20 días, mientras que el material con baja capacidad de enraizamiento son hipocótilos de plántulas de 50 días; como muestras de tejidos no competentes a enraizar utilizan epicótilos de plántulas de 50 días (Díaz-Sala

et al., 1996). El desarrollo de este sistema experimental se basa en la utilización de dos transiciones de desarrollo que afectan a la respuesta a auxina en términos de enraizamiento. Una es la transición de un crecimiento primario a un crecimiento secundario que afecta a los hipocótilos de plántulas de 20 y 50 días, la segunda es la transición a un desarrollo postembrionario y refleja las diferencias de respuesta entre órganos de la misma planta con un origen embrionario (hipocótilos) y postembrionario (epicótilos). La diferencia en la capacidad de enraizamiento entre los distintos tipos de estaquillas está determinada por las transiciones de desarrollo y no por el efecto genético debido a la variabilidad genética de las plántulas utilizadas (Díaz-Sala *et al.*, 1996).

En especies leñosas angiospermas, los sistemas experimentales para el estudio del efecto de la edad en la capacidad de enraizamiento adventicio desarrollados en hiedra (Geneve, 1991; Woo *et al.*, 1994), castaño o roble (Sánchez y Vieitez, 1991) tienen la indiscutible ventaja de que el material juvenil y el maduro comparten el mismo genotipo ya que proceden de la misma planta, sin embargo, se limitan a un solo individuo y, dado que, en algunas de ellas, el mantenimiento se realiza por cultivo *in vitro*, el efecto de rejuvenecimiento debido a la micropropagación puede presentar alteraciones como consecuencia del mantenimiento del material mediante cultivos seriados (Bonga y Von Aderkas, 1993; Von Aderkas y Bonga, 2000; De Klerk, 2002). Este no parece ser el caso del sistema descrito en castaño por Sánchez y Vieitez (1991) en el que después de veinte años de su establecimiento aún se manifiesta la diferencia de capacidad de enraizamiento entre los explantos procedentes de renuevos basales y de copa (Sánchez *et al.*, 2007, Vielba *et al.*, 2011). La falta de plasticidad de los renuevos de copa hace que sea necesaria la utilización de transformación genética para la reversión del carácter o la utilización de genotipos menos recalcitrantes, lo que se incluiría el factor genético en el análisis de resultados.

En *Arabidopsis*, especie de fácil manejo y transformación y de la que hay disponible gran cantidad de mutantes e información genética, también se ha descrito un sistema experimental para el estudio de la pérdida de potencial de enraizamiento asociada a la edad (Day *et al.*, 2002; Díaz-Sala *et al.*, 2002) que muestra una disminución de la tasa de enraizamiento asociada a la edad muy similar a la descrita en especies forestales (Díaz-Sala *et al.*, 1996; Díaz-Sala *et al.*, 2002; Goldfarb *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2007). Sin embargo, para el uso de *Arabidopsis* como especie modelo es necesario tener en cuenta las diferencias entre esta especie y las especies forestales de interés y la conveniencia de extrapolar los resultados a sistemas forestales para la interpretación de los mismos. Por tanto, no existe un sistema experimental que cumpla todas las características deseables para estudiar el efecto de la madurez sobre la capacidad de enraizamiento. En cuanto a la utilización del sistema de hipocótilos-epicótilos de plántulas de *P. taeda*, aunque esta es una especie de gran interés forestal por su madera y presenta cambios asociados a la madurez fácilmente apreciables, entre ellos la capacidad de enraizamiento, su distribución geográfica se limita a Estados Unidos. Además no es lo suficientemente plástica como para responder a tratamientos, *in vivo* o *in vitro*, que permitan una reversión de los caracteres de madurez que facilitaría la confirmación de

resultados. Por otra parte, hasta la fecha no se ha logrado su transformación genética, por lo que no es posible confirmar funcionalmente cualquier resultado molecular. Estos inconvenientes podrían solventarse utilizando como modelo la especie *P. radiata*.

P. radiata es una especie de pino con más de cuatro millones de hectáreas plantadas en el mundo (Rogers, 2002), con gran importancia en el sector forestal en países como Chile, Nueva Zelanda, Australia, Sudáfrica o España (Rogers, 2002). En España, esta especie de pino ocupa más de 200000 hectáreas (Rogers, 2002; Espinel *et al.*, 1995). Su interés forestal radica en que es una especie de pino de crecimiento rápido con un alto rango de ecosistemas en los que crece óptimamente, con buenas propiedades madereras y que responde bien tanto a la mejora genética como al manejo silvícola; además, la tecnología de las plantaciones forestales de *P. radiata* es una de las más avanzada en el sector forestal (Sutton, 1999). Desde el punto de vista del enraizamiento, aunque manifiesta los cambios propios asociados a la edad, no es estrictamente recalcitrante (Cameron, 1968), por lo que bajo determinadas condiciones su capacidad de enraizamiento podría manifestarse (Libby y Conkle, 1966; Cameron, 1968; Thulin y Faulds, 1968). Por otra parte es una especie transformable, existiendo protocolos de transformación confirmados (Walter *et al.*, 1998), lo que permite realizar estudios más precisos sobre la implicación de genes candidato en distintos procesos del desarrollo y proyectar la posibilidad del uso de su capacidad de transformación con fines comerciales de producción a gran escala.

Tomando como base el sistema experimental descrito por Díaz-Sala *et al.* (1996) se ha caracterizado la respuesta de enraizamiento en hipocótilos y epicótilos de plántulas de distintas edades de *P. radiata* para establecer un sistema experimental equivalente, simple y sincrónico, que permita el estudio de la implicación de genes candidato en el proceso de enraizamiento.

2. Caracterización de la respuesta de enraizamiento en hipocótilos y epicótilos de plántulas de *Pinus radiata* de distintas edades.

Al igual que en muchas otras especies forestales (Grönroos y Von Arnold, 1987; Selby *et al.*, 1992; Díaz-Sala *et al.*, 1996; Goldfarb *et al.*, 1998; Ballester *et al.*, 1999), la formación de raíces adventicias en *P. radiata* es un proceso dependiente de la aplicación exógena de auxina, ya que en ausencia de este inductor la formación de raíces adventicias es esporádica y muy reducida (Tabla 1). Las raíces adventicias en *P. radiata* se forman de manera directa a partir de pequeñas regiones del parénquima cortical inmediatamente centrífugas a los canales resiníferos que marcan los polos de xilema primario en el hipocótilo (Fig. 2), y que representarían un estadio de desarrollo en el que el cambium no está completamente diferenciado o está en una fase inicial de su diferenciación y no es activo. La respuesta de enraizamiento sigue la secuencia de acontecimientos descrita para esta misma especie por Smith y Thorpe (1975). Tras 5 días de tratamiento auxínico se observan pequeños nódulos formados mediante división celular en las regiones adyacentes a los canales

resiníferos (Fig. 2E), que, siguiendo la misma terminología propuesta por Smith y Thorpe (1975), podrían considerarse meristemoides. Los primordios radiculares adventicios están plenamente formados tras 10-13 días de tratamiento y a los 15 días se pueden observar raíces adventicias incipientes (Fig. 2G, H, I). Patrones similares de formación de raíces adventicias han sido descritos en otras especies de pino como *P. contorta* (Grönroos y Von Arnold, 1987), *P. taeda* (Díaz-Sala *et al.*, 1996) o *P. strobus* (Goldfarb *et al.*, 1998) y demostrarían la plasticidad de los hipocótilos de plántulas de 20 días para responder de forma directa, sin una fase previa de callo, a auxina en términos de enraizamiento.

Durante el enraizamiento de hipocótilos se pueden distinguir dos etapas (Goldfarb *et al.*, 1998): la reorganización y proliferación de las células del parénquima cortical que ocurre durante los primeros cinco días (Fig. 2E) y la rediferenciación de las células para originar el nuevo meristemo radicular (Figs. 2G-I). Durante la primera fase, aunque la condensación de núcleos se observa a las 24 horas no es hasta los cinco días cuando se observan las divisiones celulares, a diferencia de lo observado en *P. taeda* en el que las divisiones celulares en la región del parénquima cortical centrífugas al canal resinífero comienzan a observarse en las primeras 48-72 horas de tratamiento (Díaz-Sala *et al.*, 1996; Greenwood *et al.*, 2001). También en hipocótilos y epicótilos procedentes de plántulas de 60 días se observa proliferación celular, más tardía, en la región cambial como consecuencia de la aplicación de auxina exógena, sin embargo, la respuesta de enraizamiento es más baja en hipocótilos y nula en epicótilos (Fig. 3). Este resultado sugiere que el proceso de organización de meristemo radicular podría tratarse de un proceso independiente de la reorganización y proliferación celular. Resultados similares fueron descritos por Díaz-Sala *et al.* (1996) y Greenwood *et al.* (2001) en *P. taeda*.

En ausencia de auxina, tanto en *P. radiata* como en otras especies de pino (Grönroos y Von Arnold, 1987; Díaz-Sala *et al.*, 1996; Goldfarb *et al.*, 1998; Tabla 1) la formación de raíces adventicias ocurre con una frecuencia muy baja y de forma esporádica. Esto sugiere que la acumulación y redistribución de auxina endógena en la zona basal del hipocótilo como consecuencia del transporte basipétalo y de la manipulación de las estaquillas no es suficiente para la inducción de raíces adventicias y es necesaria la aplicación de auxina exógena para el enraizamiento en pino.

En el estudio del efecto de las transiciones de desarrollo sobre la capacidad de enraizamiento adventicio se ha podido comprobar que, en *P. radiata*, tal y como se ha descrito en *P. taeda* (Díaz-Sala *et al.*, 1996), la aplicación exógena de auxina no evita la pérdida de potencial de enraizamiento adventicio asociada a la edad ni induce enraizamiento en epicótilos, órganos no competentes a enraizar (Tabla 1). En general la pérdida de potencial de enraizamiento adventicio ocurre de forma temprana en la mayoría de las especies de pino (Lindroth, 2000). Tanto los tejidos competentes a enraizar como los tejidos no competentes a enraizar responden a la aplicación de auxina exógena iniciando la división celular; sin embargo, mientras en tejidos competentes la

aplicación de auxina provoca una respuesta de enraizamiento, en los no competentes no tiene lugar la formación de primordios radiculares adventicios. La respuesta inicial a auxina es similar en ambos tipos de estaquillas, las cuales muestran reorganización y división celular que, en el caso de las estaquillas no competentes, se extiende hacia el cortex manteniendo la orientación de división típica de las células cambiales. Sin embargo, las divisiones celulares rápidas y la reorientación de los planos de división que preceden a la formación de un meristemo radicular sólo se observan en cortos períodos de tiempo en las células competentes a enraizar de los hipocótilos de plántulas de 20 días. La respecificación celular está asociada a la entrada de las células en el ciclo celular. Sin embargo, de los datos obtenidos parece deducirse que la capacidad para entrar en división celular por sí sola no es suficiente para la respecificación de células no competentes, y que las células localizadas centrifugamente a los canales resiníferos en hipocótilos de plántulas de 20 días retienen una competencia intrínseca para formar raíces adventicias en respuesta a auxina y expresan esta competencia antes o durante los ciclos iniciales de división celular.

Quizá los tejidos no competentes necesiten más ciclos de división celular o cambios en la duración del ciclo para entrar en rutas de división celular formativa típica de tejidos competentes, y esto podría ocurrir antes de alcanzar una determinada edad. Es probable que la competencia celular para la formación de raíces adventicias dependa de un patrón concreto de expresión génica (Díaz-Sala *et al.*, 1996; Hutchison *et al.*, 1999; Greenwood *et al.*, 2001) y que las diferencias en la capacidad de enraizamiento adventicio entre los distintos estadios de desarrollo sean debidos a cambios epigenéticos en genes claves para este proceso, a factores físicos asociados al aumento de complejidad que supone el comienzo del crecimiento secundario o a otro tipo de factores implicados en la sensibilidad celular a la auxina.

En resumen este estudio confirma que el sistema experimental desarrollado en *P. taeda* (Díaz-Sala *et al.*, 1996) es extrapolable a *P. radiata* con ligeras modificaciones. Por tanto, se ha establecido un sistema experimental simple y sincrónico en *P. radiata*, especie de alto interés forestal con uso industrial en España, que permite el estudio de la pérdida de capacidad de enraizamiento asociada a la edad en respuesta a auxina y que manifiesta la respuesta típica asociada al cambio de fase. La transición de desarrollo de un crecimiento primario a un crecimiento secundario en órganos de origen embrionario, la transición a un desarrollo postembrionario y el desarrollo de un cambium activo limita la capacidad de enraizamiento en respuesta a auxina y demuestra que tipos celulares similares en diferentes estadios de desarrollo manifiestan una respuesta diferencial a la presencia de auxina en términos de enraizamiento. Esta característica facilita la utilización del sistema de hipocótilos-epicótilos para estudiar los mecanismos de respecificación directa de células diferenciadas, especialmente en relación a la edad de tejidos y órganos.

Sobre este sistema experimental y bajo la hipótesis de que en la pérdida de capacidad de enraizamiento como consecuencia de la edad está involucrada la expresión de genes concretos, se ha llevado a cabo la identificación y caracterización de dos genes seleccionados como candidatos

para el estudio de su posible implicación en las primeras etapas de señalización en la formación de raíces adventicias, los genes *PrSCL1* y *PrSHR*.

3. Aislamiento y caracterización de genes de la familia GRAS en *Pinus radiata*.

En la búsqueda de genes que actúen durante las primeras etapas de formación del primordio radicular adventicio se seleccionaron dos genes de *Arabidopsis* implicados en el mantenimiento del meristemo de la raíz principal, *AtSCR* y *AtSHR* (Helariutta *et al.*, 2000; Sabatini *et al.*, 2003). La búsqueda de genes homólogos a *AtSCR* y *AtSHR* en *P. radiata* ha dado lugar a la identificación de *PrSCL1* y *PrSHR* (Figs. 4 y 8). Las secuencias aminoacídicas predichas para PrSCL1 y PrSHR presentan, en su región carboxi-terminal, motivos característicos de la familia de proteínas GRAS que apuntan a su papel como activadores transcripcionales (Pysh *et al.*, 1999; Bolle, 2004). Los motivos más característicos de esta familia de proteínas, VHIID, PFYRE, SAW LHRI y LHRII, están presentes tanto en PrSCL1 como en PrSHR (Figs. 5 y 9).

Además de estos dominios se han descrito otra serie de motivos característicos de la familia GRAS que, a pesar de no están presentes en todos los miembros de esta familia, parecen necesarios para la correcta localización y función de muchas de estas proteínas (Pysh *et al.*, 1999) y algunos de los cuales se encuentran en las secuencias de PrSCL1 y/o PrSHR.

En diferentes miembros de la familia GRAS se han encontrado motivos distintos relacionados con la localización nuclear, lo que sugiere que la señalización para la entrada en núcleo de las proteínas GRAS no está conservada, por lo que pueden presentar distintas secuencias y encontrarse en distintas regiones de las mismas. En las secuencias aminoacídicas de PrSCL1 y de PrSHR (Figs. 5 y 9) no se encuentran ni la región de localización nuclear (NLS) característica de la proteína RGA y otros miembros de la familia GRAS (Silverstone *et al.*, 1998) ni la región constituida por dos zonas básicas separadas por 10 aminoácidos que se ha descrito como región de localización nuclear en la proteína PsySCR de *P. sylvestris* (Laajanen *et al.*, 2007). Sin embargo, se han encontrado indicios que sugieren que PrSCL1 y PrSHR podrían presentar localización nuclear. PrSCL1 presenta dos regiones básicas similares a las regiones BRI y BRII descritas en LISCL y que han sido propuestas como señales de localización nuclear (Morohashi *et al.*, 2003), la primera región básica de PrSCL1 es muy similar a la región básica BRI encontrada en LISCL (Morohashi *et al.*, 2003) y a la región básica de AtSCR (Pysh *et al.*, 1999); sin embargo, la segunda región básica hallada en PrSCL1 no se encuentra en AtSCR y presenta menor similitud con la región BRII de LISCL (Fig. 5). Dado que existen grandes diferencias entre los motivos de localización nuclear en esta familia proteica, la presencia de las regiones BRI y BRII en PrSCL1 podría sugerir su localización nuclear.

Por su parte, PrSHR carece de regiones BR y del motivo NLS (Fig. 5). Sin embargo en *Arabidopsis*, AtSHR a pesar de carecer de motivos de señalización nuclear o de regiones básicas características que pudieran favorecer su entrada en núcleo, presenta localización nuclear en las capas de células adyacentes a las células en las que se sintetiza (Helariutta *et al.*, 2000). La localización nuclear de AtSHR parece ser consecuencia de la interacción directa de esta proteína con otros factores en la que está implicada la tirosina situada en la posición 289 de su secuencia aminoacídica (T289) (Gallagher *et al.*, 2004). En la posición 277 de la secuencia proteica de PrSHR encontramos una tirosina que alinea con la T289 de AtSHR, además, la secuencia aminoacídica en esa región es idéntica en la encontrada en AtSHR (Fig. 9). Estos resultados sugieren que en PrSHR podrían estar operando los mismos mecanismos de importación nuclear descritos en *Arabidopsis*. Recientemente, Cui *et al.* (2007) han demostrado la interacción directa de las proteínas AtSHR y AtSCR mediante técnicas *in vitro* sugiriendo que AtSCR podría ser el responsable de la entrada en núcleo de AtSHR. También en este trabajo se evidencia la interacción directa de las proteínas OsSHR1 y OsSCR1 de arroz, lo que apunta a que la relación funcional entre proteínas SHR y SCR se conserva evolutivamente en plantas. Es posible que un sistema similar opere en pino y que para favorecer la entrada en núcleo de PrSHR y permitir su función como activador transcripcional a nivel nuclear sea necesaria la presencia de algún otro miembro de la familia GRAS que interactúe con PrSHR. PrSCL1 y PsySCR podrían ser candidatos a participar en el mecanismo de entrada en núcleo de PrSHR.

Además de los diferentes motivos relacionados con la localización nuclear, se han descrito otros motivos característicos en miembros de la familia GRAS.

El motivo denominado LXXLL es una región de reconocimiento de proteínas que, a pesar de que su función en plantas aun no ha sido determinada, en sistemas animales ha sido descrito como un motivo de reconocimiento de proteínas implicado en la regulación transcripcional (Pelvin *et al.*, 2005). Este motivo está presente en PrSCL1, así como en PsySCR, LISCL y AtSCR entre otros miembros de la familia GRAS, pero no aparece representado en PrSHR ni en AtSHR (Helariutta *et al.*, 2000).

Muchos miembros de la familia GRAS presentan tramos característicos de determinados aminoácidos cuyas funciones se desconocen. Tanto PrSCL1 (Fig. 4) como PrSHR (Fig. 8) presentan tramos de serina en su región amino terminal similares a los descritos en LISCL, AtSCR, ZmSCR o PsSCR y en proteínas GRAS de especies forestales como CsSCL1 y PsySCR. Sin embargo, no presenta los tramos de glutamina, prolina, histidina, glicina, alanina o asparagina descritos en otros miembros de la familia GRAS tales como AtSCR, ZmSCR, PsSCR, AtSHR u OsSHR.

Las regiones amino terminales de PrSCL1 y PrSHR, a pesar de ser muy diferentes entre si, ya que es la zona más divergente entre los distintos miembros de esta familia, son ricas en residuos acídicos. Estas regiones, especialmente la de PrSCL1, comparten homología con la región amino

terminal de LISCL (Morohashi *et al.*, 2003) que ha sido descrita como una región con alta actividad para la regulación transcripcional y con la región amino terminal de CsSCL1, miembro de la familia GRAS relacionado con el enraizamiento adventicio en castaño (Sánchez *et al.*, 2007). La similitud en la región amino terminal podría indicar mecanismos de activación transcripcional similares determinados por las zonas ricas en residuos acídicos de la región amino-terminal.

Gracias a los motivos característicos de la región carboxi-terminal de los diferentes miembros de la familia GRAS, y a pesar de la gran divergencia en la región amino terminal entre los distintos miembros de esta familia proteica, se ha podido establecer una relación filogenética entre todos ellos y se ha determinado la existencia de varias subfamilias (Bolle, 2004). La comparación de las secuencias aminoacídicas de PrSCL1 y PrSHR con secuencias de otros miembros de la familia GRAS (Fig. 6) ha permitido determinar que ambas quedan enmarcadas dentro de esta familia proteica, que incluye proteínas tanto de monocotiledóneas como de dicotiledóneas. La familia GRAS parece tratarse de una familia proteica altamente conservada a lo largo de la evolución ya que se ha descrito la existencia de ESTs con secuencias similares a las proteínas GRAS en briófitos (Nishiyama *et al.*, 2003).

El análisis de las relaciones evolutivas de PrSCL1 y PrSHR (Fig. 6) con otros miembros de la familia GRAS de distintas especies vegetales (Sassa *et al.*, 2001; Bolle, 2004; Tian *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2005; Laajanen *et al.*, 2007; Imin *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2007) confirma que ambos son miembros de la familia de proteínas GRAS.

PrSCL1 pertenece a la subfamilia LISCL cuyo representante principal es la proteína de *Lillium longiflorum* LISCL (Morohashi *et al.*, 2003). A esta subfamilia también pertenecen la proteína CsSCL1 de castaño, cuya expresión se ha asociado con el enraizamiento adventicio y que está relacionada en secuencia y patrón de expresión con *PrSCL1* (Sánchez *et al.*, 2007), y varias proteínas AtSCLs de *Arabidopsis* de función desconocida (Fig. 6), de las que AtSCL9, AtSCL11 y AtSCL14 se expresan en raíz (Pysh *et al.*, 1999). A pesar de que esta subfamilia no tiene relación con las subfamilias de proteínas involucradas en la formación del patrón radicular SCR y SHR, y que, el principal representante de esta subfamilia, LISCL interviene en las primeras etapas de la microesporogénesis de *Lillium longiflorum* con escasa o nula expresión en órganos vegetativos, no puede descartarse una posible funcionalidad de PrSCL1 en el desarrollo radicular por diversas razones: 1. En esta subfamilia se encuentra la proteína CsSCL1 de castaño, cuya expresión se ha asociado con el enraizamiento adventicio y que está relacionada en secuencia y patrón de expresión con *PrSCL1* (Sánchez *et al.*, 2007), 2. Varias de las proteínas AtSCL de función desconocida de esta subfamilia, tales como AtSCL9, AtSCL11 y AtSCL14 se expresan en raíz (Pysh *et al.*, 1999), y 3. En otras subfamilias de proteínas GRAS también se han descrito ejemplos de funcionalidades diversas en miembros de una misma subfamilia. Por ejemplo, en la subfamilia PAT1, su representante principal AtPAT1 interviene en la señalización del fitocromo (Bolle *et al.*, 2000), mientras que OsCIGR1 y OsCIGR2, parecen actuar como reguladores transcripcionales en

respuestas de defensa (Day *et al.*, 2003). Lo mismo ocurre con BnSCL1, que es regulado por auxina y funcionalmente está relacionado con el desarrollo radicular (Gao *et al.*, 2004), a pesar de que pertenece a la subfamilia HAM, cuyo representante principal, PhHAM, es necesario para el mantenimiento del meristemo apical del tallo (Stuurman *et al.*, 2002). También encontramos ejemplos de miembros de diferentes subfamilias con papeles funcionales similares, LeLS y AtSCL18, ambos pertenecientes a la subfamilia LAS parecen tener una función similar a la de PhHAM (Schumacher *et al.*, 1999; Greb *et al.*, 2003). Por tanto la pertenencia de PrSCL1 a la subfamilia LISCL no descarta un posible papel de PrSCL1 en el desarrollo radicular. Sin embargo, hay evidencias que confirman que *PrSCL1* no es el gen ortólogo del gen *AtSCR* de *Arabidopsis*; por un lado la identificación en *P. sylvestris* de un gen ortólogo a *SCR*, el gen *PsySCR* (Laajanen *et al.*, 2007), y, por otro lado, investigaciones de nuestro laboratorio posteriores a este trabajo que han dado lugar a la identificación y clonación del gen ortólogo a *AtSCR* en *P. radiata* (*PrSCR*; Abarca y Díaz-Sala, comunicación personal).

Por su parte, *PrSHR* queda enmarcado dentro de la subfamilia SHR (Fig. 6), junto con SHRs identificados en distintas especies vegetales; en *Arabidopsis*, *AtSHR* (Benfey *et al.*, 1993); en arroz, *OsSHR1* y *OsSHR2* (Kamiya *et al.*, 2003; Cui *et al.*, 2007); en chopo (no publicado); en *M. trunculata*, *MtSHR1* (Imin *et al.*, 2007); y junto a dos proteínas de *Arabidopsis* de función desconocida, *AtSCL29* y *AtSCL32* (Bolle, 2004). Las relaciones evolutivas de *PrSHR* con SHRs de otras especies vegetales y las evidencias de relación funcional entre algunas de ellas (Kamiya *et al.*, 2003; Imin *et al.*, 2007; Cui *et al.*, 2007), apoyan la hipótesis de que *PrSHR* es el ortólogo en *P. radiata* al gen *AtSHR* de *Arabidopsis* y podría presentar papeles funcionales similares.

En resumen, *PrSCL1* y *PrSHR* pertenecen a la familia GRAS de potenciales factores de transcripción, estos genes se conservan en coníferas y, por tanto, podrían desempeñar funciones en la formación y mantenimiento del meristemo radicular y en el desarrollo de la raíz.

4. Patrón de expresión de genes de la familia GRAS en pino.

4.1. Expresión de *PrSCL1* y *PrSHR* en órganos.

Varios miembros de la familia GRAS de distintas especies vegetales presentan expresión mayoritaria en raíces. Algunos de ellos con función desconocida (Pysh *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2004) y otros, como los genes *SCR* y *SHR* de varias especies vegetales, con funciones descritas en relación al desarrollo radicular (Benfey *et al.*, 1993; Kamiya *et al.*, 2003; Imin *et al.*, 2007; Cui *et al.*, 2007). En *P. radiata*, los genes *PrSCL1* y *PrSHR* de la familia GRAS también presentan expresión mayoritaria en raíces lo que sugiere papeles funcionales en estos órganos (Fig. 11).

El gen *PrSCL1* presenta niveles de expresión máximos en raíces y, a pesar de no ser el gen ortólogo del gen *AtSCR* de *Arabidopsis*, presenta, tal y como se ha descrito para *AtSCR*, niveles de transcrito relativamente elevados en órganos aéreos (Fig. 11). En *Arabidopsis*, el gen *AtSCR* además de su papel principal en identidad celular y patrón radial de la raíz se expresa en otros

órganos como hipocótilo, meristemo caulinar y primordios foliares (Wysocka-Diller *et al.*, 2000), apoyando la hipótesis de que este gen podría tener un papel en la división celular en tejidos con alta capacidad de división tanto en órganos radiculares como en órganos aéreos. También en maíz (Lim *et al.*, 2005), arroz (Kamiya *et al.*, 2003) y guisante (Sassa *et al.*, 2001) se ha descrito expresión del gen *SCR* en órganos aéreos. Las similitudes del patrón de expresión de *PrSCL1* con genes *SCR* descritos en otras especies vegetales sugieren que *PrSCL1* podría estar involucrado en funciones similares a las descritas para *SCR*, a pesar de no ser su ortólogo (Laajanen *et al.*, 2007). Por otro lado, el hecho de que *PsySCR*, ortólogo a *AtSCR* en *P. sylvestris*, no se exprese en órganos aéreos, a pesar de presentar un patrón de expresión en raíces similar al descrito para *AtSCR* (Laajanen *et al.*, 2007), podría indicar que las funciones que desempeña *AtSCR* en *Arabidopsis* dependan en pino de mecanismos más complejos en los que tanto *PrSCL1* como *PsySCR* podrían estar involucrados. Según los patrones de expresión encontrados, *PrSCL1* y *PsySCR* podrían compartir nichos de acción similares en la raíz y *PrSCL1* actuaría además en órganos aéreos.

En el caso de *PrSHR*, su expresión es significativamente mayor en raíces e hipocótilos que en el resto de órganos (Fig. 11). Al igual que los resultados encontrados para el gen *PrSHR* de *P. radiata*, los genes tipo *SHR* en distintas especies vegetales presentan expresión mayoritaria en raíces (Benfey *et al.*, 1993; Kamiya *et al.*, 2003; Imin *et al.*, 2007; Cui *et al.*, 2007) sugiriendo que el papel principal de este gen tiene lugar en los órganos radiculares. En *Arabidopsis* los mutantes del gen *AtSHR* presentan fenotipos con severas alteraciones en la estructura radicular pero con los órganos aéreos intactos (Benfey *et al.*, 1993), en *P. radiata* los niveles de expresión de *PrSHR* en órganos aéreos son significativamente inferiores a los niveles de expresión en raíces, estos datos ponen de manifiesto la importancia de los genes tipo *SHR* en procesos radiculares. En arroz se han descrito dos genes *SHR*, *OsSHR1*, que presenta el mismo patrón de expresión tisular a nivel radicular que *AtSHR* (Cui *et al.*, 2007) y, *OsSHR2* (nomenclatura según Cui *et al.*, 2007), que se expresa predominantemente en raíz a pesar de haberse detectado expresión en hoja donde podría estar implicado en el desarrollo de los estomas (Kamiya *et al.*, 2003). Y en *M. trunculata* el gen *MtSHR1* se expresa principalmente en la región apical de la raíz durante la formación de raíces *in vitro* (Imin *et al.*, 2007). Por tanto, la predominancia de expresión de *PrSHR* en raíz y la similitud de los patrones de expresión con otros genes *SHR* de distintas especies vegetales parece indicar que *PrSHR* tiene una función fundamental en órganos radiculares.

4.2. Expresión de *PrSCL1* y *PrSHR* en estaquillas de pino en presencia de auxina exógena.

La formación de raíces adventicias en pino es dependiente de la aplicación exógena de la hormona auxina. El efecto de la aplicación de esta hormona en la inducción de formación de raíces adventicias en pino y en otras especies forestales es dependiente del tipo de auxina y de la dosis empleada (Grönroos y Von Arnold, 1987; Selby *et al.*, 1992; Díaz-Sala *et al.*, 1996; Goldfarb *et al.*,

1998; Ballester *et al.*, 1999). Es esperable que al menos algunas de las rutas de señalización que participan en el proceso de formación de raíces adventicias sean dependientes de auxina y en ellas intervengan genes inducibles en presencia de esta hormona.

El efecto de la aplicación de auxina exógena para el enraizamiento adventicio es clave en las primeras horas del proceso ya que es en estas etapas iniciales en las que la auxina ejerce su papel inductor (Díaz-Sala *et al.*, 1996). Por tanto, el estudio del efecto de distintas dosis de auxina sobre la expresión de *PrSCL1* y *PrSHR* ha sido estudiado tras 24 horas de tratamiento (Figs. 12 y 13).

Los niveles de expresión de *PrSCL1* aumentan significativamente en tratamientos con dosis de auxina por encima de 1 μ M AIB (Fig. 12) mientras que la expresión de *PrSHR* se mantiene en niveles similares cualquiera sea la dosis de auxina exógena aplicada y en las muestras control (Fig. 13). Estos datos indican que los niveles de ARNm de *PrSCL1* aumentan por aplicación de auxina exógena en concentraciones adecuadas para la inducción de raíces adventicias mientras que *PrSHR* no es inducible por aplicación de auxina exógena. De manera similar, en *M. trunculata* Imin *et al.* (2007) determinan que la aplicación de auxina exógena en dosis adecuadas para la inducción de enraizamiento adventicio induce la expresión de genes *GRAS* como *MtSCR*, mientras que no parece afectar a los niveles de expresión de *MtSHR*.

Por otro lado, tanto los niveles de expresión de *PrSCL1* como los de *PrSHR* aumentan en respuesta a la manipulación de la estaquilla y posterior mantenimiento en agua o en solución auxínica indicando que tiene lugar una respuesta independiente del efecto de la aplicación de auxina exógena (Figs. 12 y 13). En *Arabidopsis*, durante la regeneración del centro quiescente de raíz tras su ablación se produce una redistribución de auxina que provoca cambios de identidad celular dependientes de la actividad y de nuevos dominios de expresión de genes entre los que se encuentran *AtSHR* y *AtSCR* (Xu *et al.*, 2006). Un mecanismo similar podría estar actuando en pino de manera que la acumulación y la redistribución de auxina en la zona basal del hipocótilo, como consecuencia del transporte polar endógeno y de la manipulación de la estaquilla, serían las responsables del aumento de los niveles de expresión de *PrSCL1* en las muestras control. *PrSHR* podría responder a niveles umbrales de auxina más bajos por lo que la aplicación de auxina exógena no afectaría significativamente a su expresión o ésta podría depender de otros factores específicos del tejido y del estadio de desarrollo.

En *Arabidopsis*, tanto *AtSCR* como *AtSHR* se asocian con la distribución auxínica que afecta a la especificidad del meristemo apical de la raíz (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Sabatini *et al.*, 2003). La ruta de señalización de *AtSHR* parece influir en la señalización, el transporte y la biosíntesis de auxina durante el desarrollo de la raíz (Levesque *et al.*, 2006), mientras que *AtSCR* se expresa durante la formación de raíces adventicias inducidas por auxina en hipocótilos de plántulas jóvenes de *Arabidopsis* (Konishi y Sugiyama, 2006), y durante la formación de raíces laterales (Malamy y Benfey, 1997).

4.3. Dinámica espacio-temporal de expresión de *PrSCL1* durante el enraizamiento adventicio en estaquillas de plántulas de distintas edades.

4.3.1. Dinámica espacio-temporal de expresión de *PrSCL1* durante el enraizamiento adventicio en hipocótilos de plántulas de 20 días.

La capacidad de enraizamiento de *P. radiata* es máxima en hipocótilos jóvenes (procedentes de plántulas de 20 días) y se ve reducida conforme aumenta la edad de la plántula (Tabla 1). Tal y como se ha demostrado, el proceso de enraizamiento adventicio en *P. radiata* es dependiente de la aplicación de auxina exógena y el efecto inductor del transporte polar de esta hormona vegetal ocurre durante los primeros dos días del proceso de inducción para la formación de raíces adventicias. Díaz-Sala *et al.* (1996) comprobaron que tras este periodo la aplicación de inhibidores del transporte polar auxínico tales como el NPA no tienen efecto sobre la formación de raíces adventicias en pino. Por tanto las primeras horas de inducción parecen determinantes en el proceso de enraizamiento, y es en estas etapas iniciales del enraizamiento en *P. radiata* en las que se ha observado un aumento significativo de los niveles de expresión de *PrSCL1*. Además, el aumento los niveles de expresión de *PrSCL1* no sólo es dependiente de la aplicación de auxina exógena sino que son necesarias concentraciones de auxina por encima de un determinado umbral (Fig. 12). Las dinámicas de expresión espacio-temporales de *PrSCL1* durante el enraizamiento adventicio (Fig. 14) sugieren que este gen podría presentar un patrón de respuesta temprana y transitoria frente al tratamiento con auxina para la inducción de raíces adventicias antes del comienzo de las divisiones celulares que originan el meristemo radicular en *P. radiata*.

En otras especies vegetales se han descrito genes de la familia *GRAS* cuya inducción, al igual que la de *PrSCL1*, se ha relacionado el proceso de formación de raíces adventicias y son dependientes de la aplicación de auxina exógena. En castaño, el gen *CsSCL1* se induce en respuesta a la aplicación de auxina exógena en las primeras 24 horas del proceso de inducción de enraizamiento y su mRNA se localiza específicamente en los primordios radiculares adventicios en formación, siguiendo un patrón espacial similar al de *PrSCL1* (Sánchez *et al.*, 2007; Vielba *et al.*, 2011), en *M. trunculata* la expresión de *MtSCR* es inducida tras una semana de tratamiento auxínico en la formación de raíces adventicias *in vitro* a partir de explantos de hoja (Imin *et al.*, 2007), y en *Arabidopsis*, *AtSCR* se expresa durante la formación de raíces adventicias inducida por auxina en hipocótilos de plántulas jóvenes (Konishi y Sugiyama, 2006), y durante la formación de raíces laterales (Malamy y Benfey, 1997).

En pino se han descrito otros genes relacionados con las primeras etapas de inducción de raíces adventicias dependiente de auxina exógena, tales como los genes que codifican para proteínas tipo expansinas (Hutchison *et al.*, 1999), o para factores de transcripción como *PINHEAD/ZWILLE* (Brinker *et al.*, 2004). Estos y otros genes, incluyendo *PrSCL1*, podrían participar en una o varias rutas de señalización auxínica de las etapas iniciales de inducción del enraizamiento que implican

reorganización celular y división que origina el nuevo meristemo (Díaz-Sala *et al.* 1996; Goldfarb *et al.*, 1998; Greenwood *et al.*, 2001).

Por tanto, el hecho de que *PrSCL1* se induzca durante las primeras etapas de formación de raíces adventicias en presencia de niveles óptimos de auxina para el enraizamiento en estaquillas competentes a enraizar de *P. radiata* junto con las evidencias histológicas de expresión localizada de este gen en el primordio radicular adventicio, en la región cambial entre los polos xilemáticos y en las células que dan lugar a la formación de primordios radiculares adventicios en las zonas adyacentes a los canales resiníferos tras 24 horas de tratamiento auxínico (Fig. 15), sugieren un papel de este gen en la señalización auxínica temprana para la formación de raíces adventicias en *P. radiata* antes del inicio de las divisiones celulares.

4.3.2. Dinámica espacio-temporal de expresión de *PrSCL1* durante el enraizamiento adventicio en hipocótilos de plántulas de 60 y 90 días.

La capacidad de enraizamiento se reduce drásticamente con la edad en *P. radiata* (Tabla 1). En hipocótilos de plántulas de 60 días ya se detecta pérdida de capacidad de enraizamiento adventicio en respuesta a auxina, y en plántulas de 90 días las estaquillas de hipocótilos no forman raíces adventicias. Las diferencias en las dinámicas de expresión de *PrSCL1* durante el enraizamiento adventicio en hipocótilos de plántulas de distintas edades (Figs. 14, 16 y 17) sugieren que la expresión de este gen podría estar asociada a la pérdida de capacidad de enraizamiento.

Los resultados obtenidos sugieren que a medida que aumenta la edad de la plántula se manifiestan factores que afectan a la/s ruta/s de señalización temprana en respuesta a auxina para la formación de raíces adventicias. En los hipocótilos de plántulas de 60 y de 90 días no se observan diferencias en los niveles de expresión de *PrSCL1* durante las primeras horas de tratamiento (Figs. 16 y 17), etapa determinante en el proceso de enraizamiento (Díaz-Sala *et al.*, 1996), ni una localización celular específica. Además, y a diferencia del patrón de expresión de *PrSCL1* en hipocótilos de plántulas de 20 días (Fig. 14), en los hipocótilos de plántulas de 60 y 90 días no se observa un aumento en los niveles de expresión en las muestras control (Figs 16 y 17). Teniendo en cuenta que estos tejidos responden a la presencia de auxina y que se induce la expresión de otros genes (Abarca y Díaz-Sala, comunicación personal), estos resultados sugieren que en hipocótilos de plántulas de 60 y 90 días factores dependientes del desarrollo impiden que este gen responda ante posibles variaciones en los niveles de auxina. Dado que los hipocótilos de plántulas de 60 días alcanzan porcentajes de enraizamiento que superan el 80 % (Tabla 1) es probable que las vías de señalización para responder a auxina e inducir raíces adventicias sean reversibles en el tiempo antes de alcanzar una determinada edad.

El aumento en los niveles de expresión de *PrSCL1* en los hipocótilos de plántulas de 60 días tras 15 días tanto en las muestras tratadas con auxina exógena como en las muestras control (Fig. 16) podría ser indicativo de cambios en la señalización celular, independiente de auxina, que se

producen como consecuencia de las divisiones celulares y que podrían estar relacionados con el proceso inductivo de enraizamiento en estas estaquillas o podría ser una respuesta inespecífica (Figs. 2 y 3).

La expresión de otros genes *GRAS*, como *AtSCR*, en procesos de desarrollo asociados a madurez ha descrito en relación con la formación del cortex intermedio en *Arabidopsis*. En esta especie se ha comprobado la implicación de *AtSCR* en la formación de una nueva capa de células con carácter de córtex, denominada córtex intermedio, que da lugar a un tejido que se origina con la maduración de la raíz (Paquette y Benfey, 2005). En este proceso, *AtSCR* regula el tiempo de formación de la nueva columna de células del cortex intermedio impidiendo su formación temprana en el desarrollo de la raíz (Paquette y Benfey, 2005).

Por tanto, es probable que *PrSCLI* esté implicado en la regulación de procesos relacionados con la madurez en *P. radiata* tales como la pérdida de potencial de enraizamiento adventicio. Serán necesarios estudios en profundidad para determinar si las causas de las diferencias en las dinámicas de expresión de *PrSCLI* observadas son consecuencia de factores epigenéticos, factores físicos asociados al aumento de complejidad que supone el comienzo del crecimiento secundario, factores implicados en la sensibilidad celular a la auxina u otro tipo de factores.

4.3.3. Dinámica espacio-temporal de expresión de *PrSCLI* durante el enraizamiento adventicio en epicótilos de plántulas de 60 y 90 días.

Los patrones de expresión de *PrSCLI* en epicótilos de plántulas de 60 y 90 días (Figs 19, 20 y 21), junto con sus niveles de expresión en el ápice caulinar (Fig. 11) apuntan a la implicación de este gen en diversos procesos de desarrollo en pino.

En los epicótilos de plántulas de 60 días no se observan diferencias en los niveles de expresión de *PrSCLI* ni se observa acumulación de transcritos en ninguna zona específica durante el tratamiento para la inducción del enraizamiento (Figs 19 y 21), mientras que en epicótilos de plántulas de 90 días se observa un aumento de los niveles de expresión *PrSCLI* tanto en muestras tratadas como en muestras control (Fig. 20), que no se asocia a las zonas potenciales de formación de primordios radiculares adventicios (Fig. 21). Un patrón similar presenta el gen *CsSCLI* de castaño, cuya expresión tampoco se expresa de forma localizada en tejidos no competentes a enraizar procedentes de copa (Vielba et al., 2011). Estos resultados sugieren que *PrSCLI* podría estar involucrado, al igual que sucede con *CsSCLI* en castaño (Vielba et al., 2011), en procesos de órganos aéreos, tales como la formación y/o actividad de yemas caulinares.

Las plántulas de 60 días de *P. radiata* presentan yemas caulinares incipientes, mientras que en las plántulas de 90 días las yemas caulinares son activas y se desarrollan tallos axilares. En castaño, *CsSCLI*, relacionado con *PrSCLI* filogenéticamente y en patrones de expresión, se expresa, además de en las células del periciclo en las que se inicia la formación de primordios radiculares laterales, en yemas caulinares de tallo, especialmente en aquellas que presentan primordios axilares

(Vielba *et al.*, 2011). Otros miembros de la familia GRAS pertenecientes a distintas subfamilias han sido relacionados con el desarrollo de las yemas caulinares en distintas especies (PhHAM, LeLS, AtLAS; Schumacher *et al.*, 1999; Stuurman *et al.*, 2002; Greb *et al.*, 2003), por lo que es posible que *PrSCLI* esté involucrado tanto en la formación de raíces adventicias como en desarrollo de yemas caulinares, quizá como consecuencia de funciones relacionadas con la formación de meristemas. También en *Arabidopsis* el gen *AtSCR* además de su papel principal en identidad celular y patrón radial de la raíz parece presentar funciones en órganos aéreos en relación con las divisiones celulares asimétricas (Wysocka-Diller *et al.*, 2000). Estos resultados apoyan la posible función de *PrSCLI* en relación con la formación y/o actividad de meristemas en la planta.

4.4. Dinámica espacio-temporal de expresión de *PrSHR* durante el enraizamiento adventicio en estaquillas de plántulas de distintas edades.

4.4.1. Dinámica espacio-temporal de expresión de *PrSHR* durante el enraizamiento adventicio en hipocótilos de plántulas de 20 días.

El patrón de expresión espacio-temporal de *PrSHR* durante el enraizamiento en hipocótilos de plántulas de 20 días de *P. radiata* muestra un aumento significativo de los niveles de expresión en las primeras etapas del proceso (Fig. 22), en las que se produce la reorganización celular y previa a las divisiones celulares que originan el nuevo meristemo. También en *Arabidopsis*, *AtSHR* se expresa en etapas previas a la formación del meristemo radicular (Helariutta *et al.*, 2000).

El aumento de transcrito del gen *PrSHR* se observa tanto en las muestras tratadas con auxina como en las muestras control (Fig. 22). La localización de la expresión de *PrSHR* en las primeras etapas de inducción de raíces adventicias en hipocótilos de plántulas de 20 días en la región cambial entre los polos xilemáticos (Fig. 23B), y en las células que dan lugar a la formación de primordios radiculares adventicios en las zonas adyacentes a los canales resiníferos, y la localización específica de la expresión de este gen en el ápice del primordio radicular adventicio (Fig. 23C) sugieren que está involucrado en el proceso de formación del nuevo meristemo radicular adventicio y en su mantenimiento mediante rutas independientes de la aplicación de auxina exógena, y descarta que el aumento de expresión observado sea debido a un aumento de expresión generalizada en todos los tejidos del hipocótilo. Tampoco la inducción de *PrSHR* parece ser debida a una respuesta inespecífica como consecuencia del efecto herida generado por la manipulación de las estaquillas ya que tan solo los hipocótilos juveniles responden de esta manera (Figs. 22, 24 y 27) y la respuesta a herida entre hipocótilos y epicótilos es similar (Díaz-Sala *et al.*, 1996). Además, en hipocótilos de plántulas de 60 y 90 días no se ha detectado un aumento temprano en los niveles de transcrito de *PrSHR* (Figs. 24 y 25). Por tanto es posible que el aumento en los niveles de expresión de *PrSHR* en las etapas iniciales sea debido a factores específicos del tejido y estadio de desarrollo.

Sin embargo, no puede descartarse que PrSHR presente papeles funcionales alternativos ya que en *Arabidopsis* la expresión de *AtSHR* además de su papel principal en el mantenimiento del meristemo radicular, se ha relacionado con la regulación de la expresión de genes involucrados en desarrollo del haz vascular (Levesque *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2010, Carlsbecker *et al.*, 2010) y con la regulación de la activación espacio-temporal de genes involucrados en la división celular (Sozzani *et al.*, 2010). En chopo, se ha encontrado expresión de los genes *PttSHR1* y *PttSHR2* en la zona del cambium, especialmente a lo largo del floema (Schrader 2004). Un mecanismo similar podría estar actuando en *P. radiata* de manera que la función principal de PrSHR estaría relacionada con procesos de organización y mantenimiento del meristemo radicular adventicio y, también actuaría en procesos como el desarrollo del anillo vascular o el control del ciclo celular.

Poco se conoce sobre la relación de otros genes *SHR* en el proceso de enraizamiento adventicio. En *M. trunculata*, Imin *et al.* (2007) estudian la expresión de *MtSHR* en la formación de raíces adventicias *in vitro* a partir de explantos de hojas tratados con auxina exógena, y tal y como ocurre con *PrSHR* en pino, los niveles de expresión de *MtSHR* no se ven afectados por la aplicación de auxina.

La predominancia de la expresión de *PrSHR* en raíz (Fig. 11), su localización durante la formación de raíces adventicias (Fig. 23) y las dinámicas de expresión (Fig. 22) apuntan a un posible papel de este gen asociado con las primeras etapas de señalización de enraizamiento adventicio en tejidos competentes a enraizar que originan el nuevo meristemo radicular adventicio, no dependiente de la aplicación de auxina exógena.

4.4.2. Dinámica espacio-temporal de expresión de *PrSHR* durante el enraizamiento adventicio en hipocótilos de plántulas de 60 y 90 días.

Las transiciones de desarrollo debidas al efecto de la edad en hipocótilos de *P. radiata* provocan cambios significativos en las dinámicas de expresión de *PrSHR*. A diferencia de lo observado en hipocótilos de plántulas de 20 días (Fig. 22), en los hipocótilos de plántulas de 60 y 90 días los niveles de transcrito de *PrSHR* no varían durante los primeros días de tratamiento ni se observa una localización celular específica (Figs. 24, 25, 26), sólo tras 15 días los niveles de ARNm aumentan significativamente en los hipocótilos de plántulas de 60 días (Fig. 24). Este resultado, como se ha comentado anteriormente para *PrSCL1*, podría ser indicativo de cambios en la señalización celular que se producen como consecuencia de las divisiones celulares y que podrían estar relacionados con el proceso inductivo de enraizamiento en estas estaquillas o podría ser una respuesta inespecífica.

Teniendo en cuenta los resultados de porcentaje de enraizamiento (Tabla 1) y la secuencia de acontecimientos en el proceso de formación de raíces adventicias en hipocótilos de plántulas de 20, 60 y 90 días, las diferencias en los patrones de expresión de *PrSHR* entre hipocótilos de plántulas de distintas edades podría deberse a factores dependientes de desarrollo que provocarían un retraso

inicial la manifestación de la respuesta a la inducción de enraizamiento en hipocótilos e incluso llegarían a impedirla. Estos procesos, tal y como sugieren Díaz-Sala *et al.* (1996), podrían deberse a cambios epigenéticos que den lugar a expresión diferencial de genes. Asumiendo un papel fundamental de *PrSHR* en las primeras etapas de señalización para la formación de raíces adventicias, cambios epigenéticos en este gen o en genes necesarios para su expresión podrían explicar las diferencias observadas en las dinámicas de expresión de *PrSHR* entre hipocótilos de plántulas de distintas edades. Tampoco pueden descartarse factores físicos asociados al aumento de complejidad que supone el comienzo del crecimiento secundario, factores implicados en la sensibilidad celular a la auxina u otro tipo de factores propios de la transición de desarrollo de edad que determinen una expresión diferencial de genes como *PrSHR* y la pérdida de capacidad de enraizamiento asociada a la edad.

Se han descrito pocos genes relacionados con la pérdida de potencial de enraizamiento adventicio asociado a la edad, en *P. taeda*, los genes *PtIAA* (Goldfarb *et al.*, 2003) y el gen *5NG4* (Busov *et al.*, 2004) y en hiedra y roble genes que codifican para proteínas de pared celular (Woo *et al.*, 1994; Murray *et al.*, 1994; Sánchez *et al.*, 1995 ; Sánchez *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 2000) presentan expresión diferencial relacionada con la pérdida de potencial de enraizamiento asociada a la edad.

En *Arabidopsis* se ha comprobado la implicación de *AtSHR* y *AtSCR* en la formación del cortex intermedio, que se crea en raíces maduras. *AtSCR* regula el tiempo de formación de la nueva columna de células del cortex intermedio impidiendo su formación temprana en el desarrollo de la raíz mientras que *AtSHR* es necesario para que tenga lugar esta transición de desarrollo (Paquette y Benfey, 2005).

4.4.3. Dinámica espacio-temporal de expresión de *PrSHR* durante el enraizamiento adventicio en epicótilos de plántulas de 60 y 90 días.

Las dinámicas de expresión de *PrSHR* en epicótilos durante el enraizamiento son muy similares entre plántulas de 60 y de 90 días (Figs. 27 y 28). En ambos casos se observa un aumento de los niveles de expresión de *PrSHR* tras 48 horas tanto en muestras tratadas como en muestras control, teniendo en cuenta que en el estudio de la dinámica espacial de expresión de *PrSHR* no se detecta localización específica de la expresión de este gen en zonas potenciales de formación de primordios radiculares adventicios (Fig. 29), no se puede descartar la posibilidad de que el aumento en los niveles de mRNA, al igual que *PrSCLI*, esté asociado a la formación y/o actividad de yemas caulinares.

En conjunto, el aumento asimétrico y transitorio de los niveles de mRNA de *PrSCL1* y de *PrSHR* localizado en las regiones cambiales entre polos xilemáticos y en la región inmediatamente centrífuga a los canales resiníferos sólo se observa en las estaquillas competentes a enraizar durante las etapas iniciales de la formación de raíces adventicias antes del inicio de las divisiones celulares que originarán un nuevo primordio. En estaquillas no competentes a enraizar la expresión de *PrSCL1* y *PrSHR* se extiende en el cortex y en las células en división. Además existe un solapamiento espacio-temporal del dominio de expresión de estos genes que podría indicar que desempeñan funciones similares de acuerdo con la cascada de genes *GRAS* involucrados en el establecimiento y mantenimiento del meristemo radicular descrito en especies modelo (Xu *et al.*, 2006). Este resultado sugiere que rutas que involucran proteínas GRAS, las cuales pueden interactuar o desempeñar funciones independientes, sólo se inducen asimétricamente en tejidos competentes a enraizar. Además, la respuesta de ambos genes en presencia de auxina exógena sugiere que rutas dependientes e independientes de auxina podrían estar involucradas en el enraizamiento adventicio. La diferencia en la competencia para aumentar de forma asimétrica los niveles de mRNA de estos genes durante las etapas iniciales de la formación de un meristemo radicular adventicio, antes del comienzo de la división celular, en tipos celulares similares en diferentes estados de desarrollo sugiere que rutas de señalización o factores específicos, quizá distribuidos de una manera localizada dependiente del desarrollo, en los tejidos involucrados en el enraizamiento podrían ser cruciales para la expresión de la capacidad de enraizamiento. Factores como gradientes hormonales, organización de la cromatina y otros mecanismos epigenéticos que resultan en una arquitectura nuclear específica podrían estar involucrados en la plasticidad celular dependiente de la edad.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La respuesta de enraizamiento en respuesta a auxina de hipocótilos y epicótilos de plántulas de *P. radiata* de distintas edades es similar a la de otras especies de pino y ha permitido el establecimiento de un sistema experimental simple y sincrónico para el estudio de la pérdida de capacidad de enraizamiento asociada a la edad en esta especie.
2. La identificación y caracterización de los genes *PrSCLI* y *PrSHR*, pertenecientes a la familia *GRAS* de potenciales factores de transcripción, indica que esta familia de genes se conserva en especies coníferas.
3. La expresión mayoritaria de *PrSCLI* y *PrSHR* en raíces indica que desempeñarían su función principal en estos órganos, aunque no se descarta su función en órganos aéreos donde su expresión también es significativa.
4. La expresión de *PrSCLI* en presencia de auxina exógena y su dinámica de expresión espacio-temporal en estaquillas competentes y no competentes a enraizar indica que este gen podría estar involucrado en la respuesta de enraizamiento a través de la vía de señalización auxínica dependiente del tejido y del estadio de desarrollo.
5. La expresión de *PrSHR* en presencia de auxina exógena y su dinámica de expresión espacio-temporal en estaquillas competentes y no competentes a enraizar indica que este gen podría estar involucrado en la respuesta de enraizamiento a través de vías de señalización dependientes del tejido y del estadio de desarrollo.

SUMMARY

SUMMARY

1. Introduction

Forest trees are valued for their environmental, economic and ecological roles, but a deeper knowledge about its productivity is needed. Effective plant breeding programs are required and it depends on developing large-scale plant production systems using elite trees exhibiting important productive or adaptive traits.

Vegetative propagation gives the opportunity to maintain elite trees selected from breeding programs or natural populations. But in most woody species, proper assessment is difficult, when trees are old enough to express their desirable characteristics they usually loss tissue regeneration potential and individuals are often selected for vegetative propagation when they are still too young for proper assessment (Bonga and Aderkas, 1993; Greenwood, 1995). The age-related loss of regenerative potential makes explants difficult to root. Adventitious rooting is a key step in vegetative propagation and one of the most important barriers for the success of clonal propagation of adult selected trees (Díaz-Sala *et al.*, 1996; Goldfarb *et al.*, 1998). This occurs because the decline on adventitious rooting ability is one of the more dramatic effects of phase change or maturation. Phase change or maturation can be observed in woody species; and, although it was originally only related with the attainment of flowering (Zimmerman, 1973; Schwabe, 1976; Wareing & Frydman, 1976), it has been proved that includes changes in morphological, anatomical and physiological traits that vary during trees life span in an independent way (Hackett & Murray, 1993). The independence of the maturation-dependent traits points out the importance of study each one in a particular way.

Adventitious rooting, at least in difficult-to-root species, is a postembryonic process to develop *de novo* meristems from cells no determined to become a root (Díaz-Sala *et al.*, 1996). Despite the differences between adventitious and lateral root formation, both processes share similar development mechanisms (Laskowski *et al.*, 1995; Goldfarb *et al.*, 1998) that could help to compare research results from one process to another. Adventitious and lateral roots formation depends on a two-steps developmental process: cell dedifferentiation and proliferation, and local cell redifferentiation (Laskowski *et al.*, 1995; Goldfarb *et al.*, 1998). In pine hypocotyls adventitious rooting occurs only under auxin induction and begins with cell differentiation and first cell divisions (after 2 to 6 days after induction), followed by root primordial formation (after 10-12 days) and root development (Díaz-Sala *et al.*, 1996). Adventitious roots arise directly from cells of the cambial and cortical parenchyma regions immediately adjacent to the resin canals that are located centripetal to the primary xylem poles (Grönroos & Von Arnold, 1987; Díaz-Sala *et al.*, 1996; Goldfarb *et al.*, 1998). Pine epicotyls, even when they come from young plants, have a very low rooting capacity under auxin induction (Grönroos & Von Arnold, 1987; Flygh *et al.*, 1993;

Díaz-Sala *et al.*, 1996; Goldfarb *et al.*, 1998; Hamann, 1998), and usually adventitious roots arise from callus formed on the cutting base (Flygh *et al.*, 1993; Goldfarb *et al.*, 1998). Anyway, epicotyls and difficult-to-root cuttings respond to auxin stimuli, and not only young hypocotyls, but only specific cells at specific developmental stages are able to develop adventitious root primordia (Díaz-Sala *et al.*, 1996).

Adventitious rooting capacity depends not only on the tree developmental stage (maturity) but also on factors such as genotype, cutting position effect, plant growth regulators, carbohydrate status and mineral nutrition, light, temperature, mycorrhizas, phenolic compounds, and other environmental and physiological factors (reviewed by Abarca and Díaz-Sala, 2009; Geiss *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009). Many factors have different effects depending on the specie and the specific conditions, mayor and general findings are that maturity affects adventitious rooting by decreasing rooting ability, and, that auxin is an adventitious rooting inductor. In fact, in most wood species, exogenous auxin is needed to induce adventitious rooting (Grönroos and Arnold, 1985; Grönroos and Arnold, 1987; Selby *et al.*, 1992; Díaz-Sala *et al.*, 1996; Goldfarb *et al.*, 1998; Ballester *et al.*, 1999).

In pine it has been demonstrated that differences in rooting capacity between individual cuttings or between hypocotyls and epicotyls are not related to the uptake, accumulation or distribution of exogenous auxin (Díaz-Sala *et al.*, 1996; Grönroos and Arnold, 1988). But, although cuttings' absolute auxin concentration or auxin-sensitivity does not seem to be related to the capacity to form adventitious roots (Díaz-Sala *et al.*, 1996), it has been proven that polar auxin transport plays an important role in the early steps of rooting induction process (Greenwood and Weir, 1995; Díaz-Sala *et al.*, 1996). Auxin seems to be a non-specific trigger of specific preset cell reaction patterns, and the lack of rooting ability is a result of an intrinsic capacity of cells to organize into a root meristem in response to auxin. According to Hutchison *et al.* (1999) and Greenwood *et al.* (2001) rooting competence is ultimately a function of differential expression of genes affecting all phases of meristem root formation.

Many genes has shown differential expression related to adventitious rooting ability, but none specific signaling pathways has been describe to date. In pine, genes coding for α -expansins, for auxin carriers (*PtIAA*), for a S-adenosylmethionine syntase and for a transmembrane protein (*5NG4* gene) have differential expression patterns related with adventitious root formation (Hutchison *et al.*, 1999; Lindroth *et al.*, 2001; Goldfarb *et al.* 2003; Busov *et al.*, 2004). In other wood species as *H. helix* or oak, cell wall proteins has been associated to adventitious rooting ability (Woo *et al.*, 1994; Murray *et al.*, 1994; Sanchez *et al.*, 1995; Sánchez *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 2000) and, in apple tree, a gene coding for a digoxigenin 2-oxoacid dependent is differentially expressed during rooting (Butler and Gallagher, 1999). In non-wood species, genes as *AGO1*, *LRP1*, *HRGPnt3* and *ARL1* (Vera *et al.*, 1994 Smith and Fedoroff, 1995; Sorin *et al.*, 2005) are also related to the rooting process, and some mutants shows alterations at the adventitious rooting in *Arabidopsis* (Konishi

and Sugiyama, 2003), rice (Liu *et al.*, 2009) and tomato (rac mutant; Muller *et al.*, 1985; Lund *et al.*, 1996; Lund *et al.*, 1997). In addition to those studies comprising only one or few genes, large-scale approaches has been used for the adventitious rooting process study (Konishi and Sugiyama, 2003; Brinker *et al.*, 2004; Díaz-Sala *et al.* personal communication; Zhang, 2009). Also studies related with genes involved in main or lateral root formation could help to understand adventitious rooting pathways (Taylor and Scheuring, 1994; Xie *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2002; Birnbaum *et al.*, 2003; Czechoswski *et al.* 2004; Himanen *et al.* 2004).

Genes as *SCARECROW* (*SCR*) and *SHORT-ROOT* (*SHR*), that have an important role in root formation and maintenance (Benfey *et al.*, 1993; Scheres *et al.*, 1995), can be used as candidate genes in the study of adventitious roots formation process. Both, *SCR* and *SHR* belongs to the GRAS proteins family, a multigenic family of putative transcription involved on a great variety of different developmental processes (Pysh *et al.*, 1999). In *Arabidopsis*, *AtSHR* is involved in the specification of root stem cell identity and in the radial patterning of roots (Benfey *et al.*, 1993; Scheres *et al.*, 1995; Helariutta *et al.*, 2000; Nakajima *et al.*, 2001; Sena *et al.*, 2004; Cui *et al.* 2007), *AtSHR* also plays roles in the vascular system development (Levesque *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2010; Carlsbecker *et al.*, 2010) and in the regulation of spatial and temporal activation of cell-division genes (Sozzani *et al.*, 2010). *AtSHR* mRNA is found in the stele and *AtSHR* protein moves from the stele to a layer of adjacent cells where it regulates root development by a transcriptional regulatory pathway that involves other GRAS genes, such as *SCR* and *SCLs* (Helariutta *et al.*, 2000; Nakajima *et al.*, 2001; Levesque *et al.*, 2006). In *M. trunculata* the *MtSHR1* gene is mainly expressed in the root apex during *in vitro* root formation (Imin *et al.*, 2007). In rice two *SHR* genes have been described (*OsSHR*; Kamiya *et al.*, 2003; Cui *et al.*, 2007), they are involved in root development in a similar manner that *AtSHR* in *Arabidopsis* (Cui *et al.*, 2007) and one *OsSHR* may also be involved in the formation of leaf stomata (Kamiya *et al.*, 2003).

The *SCARECROW* gene of *Arabidopsis* (*AtSCR*) is involved in radial patterning of roots and in the maintenance of the quiescent centre, it is expressed in cortical and endodermal initials and it is required for the asymmetric division that gives rise to the cortex and endodermis (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Wysocka-Diller *et al.* 2000). Its expression seems to be directly associated with *AtSHR* expression, being *AtSCR* one of the *AtSHR* direct targets (Gallagher *et al.*, 2004b; Helariutta *et al.*, 2000d; Nakajima *et al.*, 2001b; Sena *et al.*, 2004); and responsible for the *AtSHR* nuclear localization (Cui *et al.*, 2007). In addition, *AtSCR* plays a pivotal role in the regeneration of the root tip after laser ablation (Xu *et al.*, 2006) and seems to have other functions related to vascular tissue development (Carlsbecker *et al.*, 2010) and cell-cycle gene activation (Sozzani *et al.*, 2010). Orthologous genes to *AtSCR* have been described in maize (*ZmSCR*), pea (*PsSCR*), rice (*OsSCR1*), *P. sylvestris* (*PsySCR*), *M. trunculata* (*MtSCR*) and *Lupinus* (*LaSCR*) (Lim *et al.*, 2000; Kamiya *et al.*, 2003; Sassa *et al.*, 2001; Laajanen *et al.*, 2007; Imin *et al.*, 2007; Sbabou *et al.*, 2010). They are similar not only in sequence but in expression patterns, what suggest similar roles in development.

ZmSCR, as AtSCR, plays an important role in quiescent centre regeneration after partial excision or laser ablation (Lim *et al.* 2000; Xu *et al.*, 2006), *PsySCR* shows same tisular expression pattern than *AtSCR* (Laajanen *et al.*, 2007), and, in *M. trunculata*, *MtSCR* is induced during adventitious rooting (Imin *et al.*, 2007). In rice, direct interactions between OsSHR1 and OsSCR1 proteins, similar of those found between AtSHR and AtSCR have been demonstrated, which suggest that the functional relationship between SHR and SCR proteins is evolutionally conserved in plants (Cui *et al.*, 2007).

2. Results and discussion

2.1. Adventitious rooting in *Pinus radiata*.

P. radiata adventitious rooting ability was tested using hypocotyls and epicotyls cuttings form 20, 60 and 90 days-old plants obtained from seeds. In order to induce rooting, cuttings was continuously treated with 10 μ M indolbutiric acid (IBA) while control cuttings were maintained in water. All auxin-treated hypocotyls from 20 days-old plants rooted after one month treatment, developing on average 11.3 ± 1 roots per cutting. This percentage decreased by age, after one month of auxin treatment only the 52% of hypocotyls from 60 days-old plants and none hypocotyls from 90 days-old plants formed adventitious roots. No adventitious root formation was shown in epicotyls either from 60 or 90 days-old plants.

Hystologically, adventitious root formation in hypocotyls from 20 days-old plants of radiata pine was similar to what was previously described in this and other pine species (Smith & Thorpe, 1975 a and b, Grönroos and Von Arnold, 1987; Díaz-Sala *et al.*, 1996; Goldfarb *et al.*, 1998), adventitious roots arose directly from cells in the cambial and cortical parenchyma regions immediately adjacent to the resin canals that are located centripetal to the primary xylem poles. First organized cell divisions where observed after 5 days of treatment and root primordia were completely formed after 15 days of treatment. Similar events were observed in hypocotyls form 60 days-old plants but later on time. Meanwhile, in epicotyls, auxin treatment due to proliferation on the cambial region, but no defined structures or meristem-like structures were observed. Differences between hypocotyls' and epicotyls' rooting ability have been reported in other pine species (Díaz-Sala *et al.*, 1996; Goldfarb *et al.*, 1998).

A simple and synchronic experimental system for age-dependent adventitious rooting capacity decrease has been established in *P. radiata* based on the previously reported for *P. taeda* (Díaz-Sala *et al.*, 1996). It shows the typical response associated with phase change and allows the study of candidate genes roles in the rooting process. Both, hypocotyls and epicotyls respond to exogenous auxin treatment, but only young hypocotyls are able to form adventitious roots. No changes on auxin metabolism, transport or up-take has been found between competent and non-competent to root cuttings, and cannot explain the observed differences on adventitious rooting ability (Díaz-Sala *et al.* 1996). Observed differences may be due to physical changes related to

secondary growth or other factors related to cell auxin sensitivity. According to Hutchison *et al.* (1999) and Greenwood *et al.* (2001) rooting competence is ultimately a function of differential expression of genes affecting all phases of root meristem development, perhaps under epigenetic control dependent on age. As no specific auxin signal-transduction pathways have yet been characterized, elucidation of expression patterns of genes affecting rooting could be a fruitful approach.

2.2. Identification of *PrSCL1* and *PrSHR* genes.

To identify candidate genes related to the rooting process and to the lack of adventitious rooting ability due to age, we looked for the *AtSCR* and *AtSHR* orthologous genes from the *GRAS* family in *P. radiata*. From the Plant Gene Database (<http://www.plantgdb.org>) two EST similar to *SCR* and *SHR* were identified and by RACE technology, full length cDNAs were obtained in *P. radiata*. They were named *PrSCL1* (*Pinus radiata* SCARECROW-LIKE protein1) and *PrSHR* (*Pinus radiata* SHORT-ROOT).

Both, *PrSCL1* and *PrSHR* belong to the *GRAS* proteins family. Their deduced aminoacid sequences included the three most conserved domains of *GRAS* family: VHIID, PFYRE, SAW and other protein domains found in some *GRAS* family members that seem to be necessary for properly localization and function. No conserved nuclear localization domains have been found in *GRAS* family, but *PrSCL1* and *PrSHR* may have nuclear localization: *PrSCL1* nuclear localization may be explained by the presence of BR regions, and *PrSHR* nuclear localization could be dependent of its interaction with other proteins mediated by a specific tyrosine as it occurs in *AtSHR* (Gallagher *et al.*, 2004). Conserved characteristics of *GRAS* proteins with unknown function have been found in *PrSCL1* and *PrSHR* as the LXXL motive and specific aminoacid stretches.

Phylogenetically, *PrSCL1* belongs to the LISCL *GRAS* subfamily, suggesting that is not the *AtSCR* ortholog gene. This was confirmed when the *AtSCR* ortholog gene in *P. sylvestris* was described (Laajanen *et al.*, 2007) and the *P. radiata SCR* gene, *PrSCR*, was characterized (Díaz-Sala, personal communication). *PrSHR* is a member of the *SHR* subfamily of *GRAS* proteins and the ortholog gene of *AtSHR*.

2.3. *PrSCL1* and *PrSHR* expression in organs and in cuttings in the presence of exogenous auxin.

PrSCL1 and *PrSHR* expression in different *P. radiata* organs were tested by real-time RT-PCR. Both genes were mainly expressed in roots suggesting that its main role takes place in those organs; many other *GRAS* family members are also mainly express in roots including *SCR* and *SHR* genes of many plant species (Pysh *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2004; Benfey *et al.*, 1993; Kamiya *et al.*, 2003; Imin *et al.*, 2007; Cui *et al.*, 2007). Additionally, high expression levels of *PrSCL1* were found in

aerial organs. Similarly, *SCR* genes are expressed in aerial organs in *Arabidopsis* and some crop species (Wysocka-Diller *et al.*, 2000; Lim *et al.*, 2005; Kamiya *et al.*, 2003; Sassa *et al.*, 2001), but no expression of *PsySCR* is detected in aerial organs (Laajanen *et al.*, 2007). *PrSCL1* and *PsySCR* may have overlapping roles in roots, while *PrSCL1* is also playing a functional role in aerial organs, perhaps with similar functions found for other *SCR* genes on those organs.

PrSCL1 and *PrSHR* expression levels were also tested under different auxin doses by real-time RT-PCR. *P. radiata* hypocotyls from 20 days-old plants were continuously treated for 24 hours with IBA doses of 1, 10 or 20 μM , control samples were maintained in water for 24 hours and reference samples were directly frozen after cutting. Results showed that *PrSCL1* expression is induced when exogenous auxin is applied in doses for optimal rooting response, and that *PrSHR* expression did not change under different auxin doses, but its expression levels were significantly higher in treated and control samples than in reference samples suggesting that endogenous auxin changes after cutting may regulate its expression.

2.4. Spatio-temporal expression profile of *PrSCL1* and *PrSHR* during adventitious root formation in cuttings from *Pinus radiata* seedlings of different ages.

In order to assess temporal and spatial dynamics of *PrSCL1* and *PrSHR* expression during adventitious root formation and related to the loss of rooting ability due to age, expression patterns of these genes have been analyzed by real-time RT-PCR and by *in situ* hybridization in hypocotyls and epicotyls cutting from 20, 60 and 90 days-old plants treated with 10 μM IBA for 0, 8, 24, 48 hours, 5 or 15 days; controls were maintained in water and reference samples were directly frozen after cutting.

In hypocotyls from 20 days-old plants, *PrSCL1* showed an expression pattern that seems to be an early and transitional response to auxin treatment. Expression levels increased during the first 24 hours of treatment in auxin-treated samples but not in controls. *PrSCL1* expression was specifically localized at the cambial and cortical parenchyma regions immediately adjacent to the resin canals that are located centripetal to the primary xylem poles after 24 hours of auxin treatment and at the adventitious root primordia once formed. In older hypocotyls, from 60 and 90 days-old plants, *PrSCL1* expression did not show differences during early root induction treatment, and no specific localization of its mRNA was detected. Those results suggest that *PrSCL1* is involved in the early steps of auxin-induced adventitious root formation in *P. radiata* only in hypocotyls young enough to develop adventitious roots. In epicotyls, organs unable to develop adventitious roots, *PrSCL1* is not induced by auxin treatment. Expression patterns were different in 60 and 90 days-old plants: in epicotyls from 60 days-old *PrSCL1* expression showed no differences during treatment; and in epicotyls from 90 days-old plants an induction peak after 48 of treatment (either in auxin-treated and control samples) was found, probably related with *PrSCL1* functions in aerial organs.

PrSHR expression levels also showed differences during adventitious root process in hypocotyls from 20 days-old plants. Its expression was induced in the first 24 hours of treatment, but, for this gene, the induction was found in both, auxin-treated and control samples. *PrSHR* expression was specifically localized at the cambial and cortical parenchyma regions immediately adjacent to the resin canals that are located centripetal to the primary xylem poles after 24 hours of auxin treatment and specifically at the apex of the adventitious root primordial once formed. *PrSHR* may be related with adventitious root induction pathway in early signaling even though alternative functions of *PrSHR* cannot be dismissed. In older hypocotyls, from 60 and 90 days-old plants, *PrSHR* expression did not show differences during early root induction treatment, and no specific localization of its mRNA was detected. Similarly of what was observed for *PrSCL1*, *PrSHR* expression patterns were different in epicotyls from 60 and 90 days-old plants, showing no differences in epicotyls from 60 days-old plants and an induction after 48 of treatment (either in auxin-treated and control samples) in epicotyls from 90 days-old plants. All those results suggest that *PrSHR* could be function in *P. radiata* in the early adventitious root induction pathway that ends with new cell identities in competent cells to develop adventitious roots. Anyway, it is also possible that alternative functions of *PrSHR* are responsible of the found expression patterns. Comparing those results with *SHR* functions described in other plant species (Levesque 2006, Yu 2010, Carlbecker 2010; Sozzani 2010; Schrader 2004), *PrSHR* main function could be related to organization and maintenance of adventitious root meristem and, it also may plays roles in other development processes related to vascular development or cell cycle control.

3. Conclusions

1. Rooting response under auxin induction of hypocotyl and epicotyl cuttings from *P. radiata* seedlings of different ages is similar to other pine species and has allowed the establishment of a simple and synchronic experimental system to study age-dependent adventitious rooting ability decrease in this pine specie.
2. Identification and isolation of *PrSCLI* and *PrSHR* genes, which belong to the *GRAS* family of putative transcription factors, indicates that this family is conserved in tree species.
3. *PrSCLI* and *PrSHR* genes are mainly expressed in roots suggesting that its main role takes place in those organs, although a functional role in aerial organs cannot be dismissed.
4. *PrSCLI* expression in the presence of exogenous auxin and its spatio-temporal expression profile in rooting competent and non-competent cuttings indicate that this gene could be involved in rooting response mediated by tissue and developmental stage-dependent auxin signaling pathways.
5. *PrSHR* expression in the presence of exogenous auxin and its spatio-temporal expression profile in rooting competent and non-competent cuttings indicate that this gene could be involved in rooting response mediated by tissue and developmental stage-dependent pathways.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- **Abarca, D., Díaz-Sala, C.** 2009. Adventitious root formation in conifers. En: Adventitious root formation of forest trees and horticultural plants: From genes to applications. Niemi, K., Scagel, C. Eds. Research Signpost, Kerala, India. 227-257.
- **Von Aderkas, P., Bonga, J.** 2000. Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. *Tree Physiology*. 20: 921-928.
- **Andergassen, S., Bauer, H.** 2002. Frost hardiness in the juvenile and adult life phase of ivy (*Hedera helix* L.). *Plant Ecology*. 161: 207-213.
- **Ballester, A., Sánchez, M.C., Vieitez, A.M.** 1989. Etiolation as a pretreatment for *in vitro* establishment and multiplication of mature chestnut. *Physiologia Plantarum*. 77: 395-400.
- **Ballester, A., San Jose, M.C., Vidal, N., Fernandez-Lorenzo, J.L., Vieitez, A. M.** 1999. Anatomical and biochemical events during *in vitro* rooting of microcuttings from juvenile and mature phases of chestnut. *Annals of Botany*. 83: 619-629.
- **Baltunis, B.S., Huber, D.A., White, T.L., Goldfarb, B., Stelzer, H.E.** 2005. Genetic effects of rooting loblolly pine stem cuttings from a partial diallel mating design. *Canadian Journal of Forest Research*. 35: 1098-1108.
- **Baltunis, B.S., Huber, D.A., White, T.L., Goldfarb, B., Stelzer, H.E.** 2007. Genetic gain from selection for rooting ability and early growth in vegetatively propagated clones of loblolly pine. *Tree Genetics & Genomes*. 3: 227-238.
- **Baraldi, R., Bertazza, G., Bregoli, A.M., Fasolo, F., Rotondi, A., Predieri, S., Serafini-Fracassini, D., Slovín, J.P., Cohen, J.D.** 1995. Auxins and polyamines in relation to differential *in vitro* root induction on microcuttings of two pear cultivars. *Journal of Plant Growth Regulation*. 14:49-59.
- **Basheer-Salimia, R.** 2007. Juvenility, maturity and rejuvenation in woody plants. *Hebron University Research Journal*. 3:17-43.
- **Bauer, H., Bauer, U.** 1980. Photosynthesis in leaves of the juvenile and adult phase of ivy (*Hedera helix*). *Physiologia Plantarum*. 49: 366-372.
- **Beeckman, T., Burssens, S., Inze, D.** 2001. The peri-cell-cycle in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*. 52: 403-411.
- **Benfey, P.N., Linstead, P.J., Roberts, K., Schiefelbein, J.W., Hauser, M.T., Aeschbacher, R.A.** 1993. Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development*. 119: 57-70.
- **Benjamins, R., Quint, A., Weijers, D., Hooykaas, P., Offringa, R.** 2001. The PINOID protein kinase regulates organ development in *Arabidopsis* by enhancing polar auxin transport. *Development*. 128: 4057-4067.
- **Bennett, S.R., Alvarez, J., Bossinger, G., Smyth, D.R.** 1995. Morphogenesis in pinoid mutants of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 8: 505-520.
- **Berleth, T., Jurgens, G.** 1993. The role of the *monopteros* gene in organising the basal body region of the *Arabidopsis* embryo. *Development*. 118: 575-587.
- **Berthon J.Y., Boyer N., Gaspar T.** 1987. Sequential rooting media and rooting capacity of *Sequoiadendron giganteum in vitro*. Peroxidase activity as a marker. *Plant Cell Reports*. 6: 341-344.
- **Biondi, S., Diaz, T., Iglesias, I., Gamberini, G., Bagni, N.** 1990. Polyamines and ethylene in relation to adventitious root formation in *Prunus avium* shoot cultures. *Physiologia Plantarum*. 78: 474-483.
- **Birnbaum, K., Shasha, D.E., Wang, J.Y., Jung, J.W., Lambert, G.M., Galbraith, D.W., Benfey, P.N.** 2003. A gene expression map of the *Arabidopsis* root. *Science*. 302: 1956-1960.
- **Birnbaum, K., Benfey, P. N.** 2004. Network building: transcriptional circuits in the root. *Current Opinion in Plant Biology*. 7: 582-588.
- **Blilou, I., Frugier, F., Folmer, S., Serralbo, O., Willemsen, V., Wolkenfelt, H., Eloy, N.B., Ferreira, P.C., Weisbeek, P., Scheres, B.** 2002. The *Arabidopsis* *HOBBIT* gene encodes a CDC27 homolog that links the plant cell cycle to progression of cell differentiation. *Genes and Development*. 16: 2566-2575.
- **Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., Scheres, B.** 2005. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature*. 433: 39-44.

- **Bolle, C., Koncz, C., Chua, N.H.** 2000. PAT1, a new member of the GRAS family, is involved in phytochrome A signal transduction. *Genes Development*. 14: 1269-1278.
- **Bolle, C.** 2004. The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta*. 218: 683-692.
- **Bonga, J.M., Von Aderkas, P.** 1993. Rejuvenation of tissues from mature conifers and its implication for propagation *in vitro*. En: *Clonal Forestry I, Genetics and Biotechnology*. Ahuja, M.R., Libby, W.J., Eds. Springer-Verlag, Berlin. 182-199.
- **Bonga, J.M.** 1982. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. En: *Tissue Culture in Forestry*. Bonga, J.M., Durzan, D.J., Eds. Martinus Nijhoff/ Dr. W. Junk Publishers. The Hague. 387-412 .
- **Brinker, M., Van Zyl, L., Liu, W., Craig, D., Sederoff, R., Clapham, D.H., Von Arnold, S.** 2004. Microarray analyses of gene expression during adventitious root development in *Pinus contorta*. *Plant Physiology*. 135: 1526-1539.
- **Busov, V., Johannes, E., Whetten, R., Sederoff, R., Spiker, S., Lanz-Garcia, C., Goldfarb, B.** 2004. An auxin-inducible gene from loblolly pine (*Pinus taeda* L.) is differentially expressed in mature and juvenile-phase shoots and encodes a putative transmembrane protein. *Planta*. 218: 916-927.
- **Butler, E., Gallagher, T.** 1999. Gene note. Isolation and characterization of a cDNA encoding a novel 2-oxoacid-dependent dioxygenase which is up-regulated during adventitious root formation in apple (*Malus domestica* 'Jork 9') stem discs. *Journal of Experimental Botany*. 50: 551-552.
- **Carle, J., Holmgren, P.** 2008. Wood from Planted Forests. A Global Outlook 2005–2030. *Forest Products Journal*. 58: 6–18.
- **Cameron, R. J.** 1968. The propagation of *Pinus radiata* by cuttings: Influences affecting the rooting of cuttings. *New Zealand Journal of Forestry*. 13: 78–89.
- **Carlsbecker, A., Lee, J., Roberts, C., Dettmer, J., Lehesranta, S., Zhou, J., Lindgren, O., Moreno-Risueno, M., Vatén, A., Thitamadee, S.** 2010. Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature*. 465: 316–321.
- **Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R.P., Zhang, H., Casero, P.J., Sandberg, G., Malcom, J.** 2003. Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends in Plant Science*. 8: 165-171.
- **Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R. P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inze, D., Sandberg, G., Casero, P.J., Bennett, M.** 2001. Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *The Plant Cell*. 13: 843-852.
- **Casson, S., Lindsey, K.** 2003. Genes and signalling in root development. *New Phytologist*. 158:11–38.
- **Chen, J.G., Ullah, H., Young, J.C., Sussman, M.R., Jones, A.M.** 2001. ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes and Development*. 15: 902-911.
- **Cordero, R., Murray, J., Hackett, W.** 1985. Plastochron indices for juvenile and mature forms of *Hedera helix* L. (Araliaceae). *American Journal of Botany*. 72: 324-327.
- **Correa, L., Fett-Neto, A.** 2004. Effects of temperature on adventitious root development in microcuttings of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. *Journal of Thermal Biology*. 29:315-324.
- **Cui, H., Levesque, M.P., Vernoux, T., Jung, J.W., Paquette, A.J., Gallagher, K.L., Wang, J.Y., Blilou, I., Scheres, B., Benfey, P.N.** 2007. An evolutionarily conserved mechanism delimiting *SHR* movement defines a single layer of endodermis in plants. *Science*. 316: 421-425.
- **Curir, P., Van Sumere, C.F., Termini, A., Barthe, P., Marchesini, A., Dolci, M.** 1990. Flavonoid accumulation is correlated with adventitious roots formation in *Eucalyptus gunnii* Hook micropropagated through axillary bud stimulation. *Plant Physiology*. 92: 1148-1153.
- **Czechowski, T., Bari, R.P., Stitt, M., Scheible, W.R., Udvardi, M.K.** 2004. Real-time RT-PCR profiling of over 1400 *Arabidopsis* transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *Plant Journal*. 38: 366-379.
- **Day, M., Greenwood, M., White, A.** 2001. Age-related changes in foliar morphology and physiology in red spruce and their influence on declining photosynthetic rates and productivity with tree age. *Tree Physiology*. 21:1195-1204.
- **Day, M., Greenwood, M., Díaz-Sala, C.** 2002. Age- and size-related trends in woody plant shoot development: regulatory pathways and evidence for genetic control. *Tree Physiology*. 22: 507-513.

- **Day, R.B., Shibuya, N., Minami, E.** 2003. Identification and characterization of two new members of the *GRAS* gene family in rice responsive to N-acetylchitooligosaccharide elicitor. *Biochimica et Biophysica Acta /Gene Structure and Expression*. 1625: 261-268.
- **De Klerk, G.J., Keppel, M., Brugge, J.T., Meekes, H.** 1995. Timing of the phases in adventitious root formation in apple microcuttings. *Journal of Experimental Botany*. 46: 965-972.
- **De Klerk, G.J., Van der Krieken, W., de Jong, J.** 1999. Review the formation of adventitious roots: New concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 35: 189-199.
- **De Klerk, G.J.** 2002. Rooting of microcuttings: Theory and practice. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 38: 415-422.
- **Del Pozo J.C., Estelle, M.** 1999. The *Arabidopsis* cullin AtCUL1 is modified by the ubiquitin-related protein RUB1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96: 15342-15347.
- **Di Laurenzio, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J.E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M.G., Feldmann, K.A., Benfey, P.N.** 1996. The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell*. 86: 423-433.
- **Díaz-Sala, C., Rey, M., Rodríguez, R.** 1990a. *In vitro* establishment of a cycloclonal chain from nodal segments and apical buds of adult hazel (*Corylus avellana* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 23: 151-157.
- **Díaz-Sala, C., Rey, M., Rodríguez, R.** 1990b. Recovery of transient juvenile capacities during micropropagation of adult filbert. En: *Plant Aging: basic and applied approaches*. Rodríguez, R., Tamés, S., Durzan R.D., Eds. Plenum Press. Nueva York. 27-37.
- **Díaz-Sala, C.** 1991. Cambios de fase en el desarrollo vegetal y su aplicación a la propagación de especies leñosas. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo.
- **Díaz-Sala, C., Rey, M., Rodríguez, R.** 1994. Temporary modification of adult filbert proliferation capacity by sequential subcultures: intensive pruning as a pre-treatment for *in vitro* reinvigoration. *Journal of Horticultural Science*. 69: 673-678.
- **Díaz-Sala, C., Rey, M., Boronat, A., Besford, R., Rodríguez, R.** 1995. Variations in the DNA methylation and polypeptide patterns of adult hazel (*Corylus avellana* L.) associated with sequential *in vitro* subcultures. *Plant Cell Reports*. 15: 218-221.
- **Díaz-Sala, C., Hutchison, K.W., Goldfarb, B., Greenwood, M.S.** 1996. Maturation-related loss in rooting competence by loblolly pine stem cuttings: The role of auxin transport, metabolism and tissue sensitivity. *Physiologia Plantarum*. 97: 481-490.
- **Díaz-Sala, C., Garrido, G., Sabater, B.** 2002. Age-related loss of rooting capability in *Arabidopsis thaliana* and its reversal by peptides containing the Arg-Gly-Asp (RGD) motif. *Physiologia Plantarum*. 114: 601-607.
- **Doyle, J., Doyle, J.** 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12: 13-15.
- **Druege, U.** 2009. Involvement of carbohydrates in survival and adventitious root formation of cuttings within the scope of global horticulture. En: *Adventitious root formation of forest trees and horticultural plants -From genes to applications*. Niemi, K., Scagel, C. Eds. 187-208.
- **Dubrovsky, J., Rost, T., Colon-Carmona, A., Doerner, P.** 2001. Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 214: 30-36.
- **Dubrovsky, J., Doerner, P., Colon-Carmona, A., Rost, T.L.** 2000. Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 124: 1648-1657.
- **Dumas, E., Monteui, O.** 1995. *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants: influence of activated charcoal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 40: 231-235.
- **El Euch, C., Jay-Allemand, C., Pastuglia, M., Doumas, P., Charpentier, J.P., Capelli, P., Jouanin, L.** 1998. Expression of antisense chalcone synthase RNA in transgenic hybrid walnut microcuttings. Effect on flavonoid content and rooting ability. *Plant Molecular Biology*. 38: 467-479.
- **Ellenberger, T.E., Brandl, C.J., Struhl, K., Harrison, S.C.** 1992. The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha helices: Crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell*. 71: 1223-1237.
- **Engvind, K.C.** 1986. Chlorine-containing natural compounds in higher plants. *Phytochemistry*. 25: 781-791

- **Ermel, F.F., Vizoso, S., Charpentier, J.P., Jay-Allemand, C., Catesson, A.M., Couée, I.** 2000. Mechanisms of primordium formation during adventitious root development from walnut cotyledon explants. *Planta*. 211: 563-574.
- **Ernstsen, A., Sandberg, G.** 1986. Identification of 4-chloroindole-3-acetic acid and indole-3-aldehyde in seeds of *Pinus sylvestris*. *Physiologia Plantarum*. 68: 511–518.
- **Espinel, S., Aragonés, A., Ritter, E.** 1995. Performance of different provenances and of the local population of the Monterey pine (*Pinus radiata* D Don) in northern Spain. *Annales des Sciences Forestières*. 52: 515-519.
- **FAO.** 2002. La agricultura en el mundo: hacia 2015/2030 Informe. FAO.
- **FAO.** 2005. Evaluación de los recursos forestales mundiales 2005. Hacia la ordenación forestal sostenible. FAO.
- **FAO.** 2011. Situación de los bosques en el mundo. FAO.
- **Fattorini, L., Falasca, G., Kevers, C., Rocca, L.M., Zadra, C., Altamura, M.M.** 2009. Adventitious rooting is enhanced by methyl jasmonate in tobacco thin cell layers. *Planta*. 231: 155- 168.
- **Flygh, G., Grönroos, R., Gulin, L., Von Arnold, S.** 1993. Early and late root formation in epicotyl cuttings of *Pinus sylvestris* after auxin treatment. *Tree Physiology*. 12: 81-92.
- **Fortanier, E.J., Jonkers, H.** 1976. Juvenility and maturity of plants as influenced by their ontogenetical and physiological ageing. *Acta Horticulturae*. 56: 37-44.
- **Foster, G.S., Campbell, R.K., Adams, W.A.** 1984. Heritability, gain, and C effects in rooting of western hemlock cuttings. *Canadian Journal of Forest Research*. 14: 628-638.
- **Fraga, M.F., Rodríguez, R., Cañal, M.J.** 2002. Genomic DNA methylation-demethylation during aging and reinvigoration of *Pinus radiata*. *Tree Physiology*. 22: 813-816.
- **Franich, R., Wells, L., Barnett, J.** 1977. Variation with tree age of needle cuticle topography and stomatal structure in *Pinus radiata* D. Don. *Annals of Botany*. 41: 621-626.
- **Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R., Jurgens, G.** 2003. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature*. 426: 147-153.
- **Fukao, T., Bailey-Serres, J.** 2008. Ethylene-A key regulator of submergence responses in rice. *Plant Science*. 175: 43-51.
- **Gallagher, K.L., Paquette, A.J., Nakajima, K., Benfey, P.N.** 2004. Mechanisms regulating *SHORT-ROOT* intercellular movement. *Current Biology*. 14: 1847-1851.
- **Gallagher, K. L., Benfey, P. N.** 2009. Both the conserved GRAS domain and nuclear localization are required for *SHORT-ROOT* movement. *The Plant Journal*. 57: 785–797.
- **Gao, M., Parkin, I., Lydiate, D., Hannoufa, A.** 2004. An auxin-responsive SCARECROW-like transcriptional activator interacts with histone deacetylase. *Plant Molecular Biology*. 55: 417-431.
- **Gardner, F. E.** 1929. The relationship between tree age and rooting of cuttings. *Proceedings of American Society for Horticultural Science*. 26:101-104.
- **Geiss, G., Gutierrez, L., Bellini, C.** 2009. Adventitious root formation: new insight and perspectives. *Annual Plant Reviews*. 37: 127-156.
- **Geldner N.** 2004. The plant endosomal system - its structure and role in signal transduction and plant development. *Planta*. 219: 547-560.
- **Geneve R.** 1991. Patterns of adventitious root formation in English ivy. *Journal of Plant Growth Regulation*. 10: 215-220.
- **Geneve, R.L., Hackett, W.P., Swanson, B.T.** 1988. Adventitious root initiation in de-bladed petioles from the juvenile and mature phases of *English ivy*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 113: 630-635.
- **Goldfarb, B., Hackett, W.P., Furnier, G.R., Mohn, C.A., Plietzsch, A.** 1998. Adventitious root initiation in hypocotyl and epicotyl cuttings of eastern white pine (*Pinus strobus*) seedlings. *Physiologia Plantarum*. 102: 513-522.
- **Goldfarb, B., Lanz-Garcia, C., Lian, Z., Whetten, R.** 2003. Aux/IAA gene family is conserved in the gymnosperm, loblolly pine (*Pinus taeda*).. *Tree Physiology*. 23: 1181-1192.

- **Gray, G.** 1990. Effect of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma hiemale* on adventitious root formation in derooted *Pinus halepensis* shoot hypocotyls Canadian Journal of Botany. 68: 1265–1270
- **Gray, W.M., del Pozo, J.C., Walker, L., Hobbie, L., Risseuw, E., Banks, T., Crosby, W.L., Yang, M., Ma, H., Estelle, M.** 1999. Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. Genes and Development. 13: 1678-1691.
- **Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., Estelle, M.** 2001. Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. Nature. 414: 271-276.
- **Greb, T., Clarenz, O., Schafer, E., Muller, D., Herrero, R., Schmitz, G., Theres, K.** 2003. Molecular analysis of the *LATERAL SUPPRESSOR* gene in *Arabidopsis* reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. Genes & Development. 17: 1175-1187.
- **Greenwood, M.S., GoldSmith, M.H.** 1970. Polar transport and accumulation of indole-3-acetic acid during root regeneration by *Pinus lambertiana* embryos. Planta. 95: 297-313.
- **Greenwood, M. S.** 1984. Phase change in loblolly pine: Shoot development as a function of age. Physiologia Plantarum. 61: 518–522.
- **Greenwood, M.S.** 1987. Rejuvenation of forest trees. Plant Growth Regulation. 6: 1-12.
- **Greenwood, M.S., Hopper, C.A., Hutchison, K.W.** 1989. Maturation in larch : I. effect of age on shoot growth, foliar characteristics, and DNA methylation. Plant Physiology. 90: 406-412.
- **Greenwood, M.S., Hutchison, K.W.** 1993. Maturation as a developmental process. En: Clonal forestry: Genetics, biotechnology and application. Ahuja, M.R., Libby, W.J. Eds. Springer-Verlag, Berlin. 14-33.
- **Greenwood, M.S., Weir, R.J.** 1994. Genetic variation in rooting ability of loblolly pine cuttings: effects of auxin and family on rooting by hypocotyl cuttings. Tree Physiology. 15: 41-45.
- **Greenwood, M.S.** 1995. Juvenility and maturation in conifers: current concepts. Tree Physiology. 15: 433-438.
- **Greenwood, M.S., Cui, X., Xu, F.** 2001. Response to auxin changes during maturation-related loss of adventitious rooting competence in loblolly pine (*Pinus taeda*) stem cuttings. Physiologia Plantarum. 111: 373-380.
- **Greenwood, M. S., Ward, M. H., Day, M. E., Adams, S.L., Bond, B.J.** 2008. Age-related trends in red spruce foliar plasticity in relation to declining productivity. Tree Physiology. 28: 225-232 .
- **Grönroos, R., Von Arnold, S.** 1985. Initiation and development of wound tissue and roots on hypocotyl cuttings of *Pinus sylvestris* *in vitro*. Physiologia Plantarum. 64: 393-401.
- **Grönroos, R., Von Arnold, S.** 1987. Initiation of roots on hypocotyl cuttings of *Pinus contorta* *in vitro*. Physiologia Plantarum. 69: 227-236.
- **Grönroos, R., Von Arnold, S.** 1988. Initiation of roots on hypocotyl cuttings of *Pinus sylvestris*, with emphasis on direct rooting, root elongation, and auxin uptake. Canadian Journal of Forest Research. 18: 1457-1462.
- **Grönroos, R., Flygh, G., Kähr, M., Von Arnold, S.** 1993. Growth analyses on *in vitro*, *ex vitro* and auxin-rooted hypocotyl cuttings of *Pinus contorta* Dougl. ex Loud. New Phytologist. 125 829-836.
- **Hackett, W.P., Murray, J.R.** 1993. Maturation and rejuvenation in woody species. En: Micropropagation of woody plants. Ahuja, M.R. Ed. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. 93-105.
- **Hackett, W.P.** 1985. Juvenility, Maturation, and rejuvenation in woody plants. Horticultural Reviews. 7: 109-155.
- **Hackett, W.P.** 1988. Donor plant maturation and adventitious root formation. En: Adventitious root formation in cuttings. Davis, T.D., Haissig, B.E., Sankhla, N. Eds. Dioscorides Press. Portland. 11-60.
- **Haffner, V., Enjalric, F., Lardet, L., Carron, M.P.** 1991. Maturation of woody plants: a review of metabolic and genomic aspects. Annals of Forest Science. 48:615–630.
- **Hagen, G., Guilfoyle, T.** 2002. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. Plant Molecular Biology. 49: 373-385.
- **Haissig, B.E.** 1986. Metabolic processes in adventitious rooting of cuttings. En: New Root Formation in Plants and Cuttings. Jackson, M.B., Nijhoff, M. Eds. Dordrecht. 141-189.
- **Haissig, B. E.** 1990. Reduced irradiance and applied auxin influence carbohydrate relations in *Pinus banksiana* cuttings during propagation. Physiologia Plantarum. 78: 455–461.

- **Hamann, T., Mayer, U., Jurgens, G.** 1999. The auxin-insensitive *bodenlos* mutation affects primary root formation and apical-basal patterning in the Arabidopsis embryo. *Development*. 126: 1387-1395.
- **Hamann, T., Benkova, E., Baurle, I., Kientz, M., Jurgens, G.** 2002. The Arabidopsis *BODENLOS* gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Genes and Development*. 16: 1610-1615.
- **Hamann, A.** 1998. Adventitious root formation in cuttings of loblolly pine (*Pinus taeda* L.): developmental sequence and effects of maturation. *Trees*. 12:175-180.
- **Hartman, H.T., Kester, D.E., Davies, F.T., Geneve, R.L.** 2010. Hartmann and Kester's plant propagation. Principles and practices. Prentice Hall. Pearson Education.
- **Hausman, J.F., Gevers, C. and Gaspar, T.** 1994. Involvement of putrescine in the inductive rooting phase of poplar shoots raised *in vitro*. *Physiologia Plantarum*. 92: 201–206.
- **Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M.T., Benfey, P.N.** 2000. The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the Arabidopsis root through radial signaling. *Cell*. 101: 555-567.
- **Himanen, K., Vuylsteke, M., Vanneste, S., Vercauteren, S., Boucheron, E., Alard, P., Chriqui, D., Van Montagu, M., Inze, D., Beeckman, T.** 2004. Transcript profiling of early lateral root initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101: 5146-5151.
- **Hobbie, L., McGovern, M., Hurwitz, L.R., Pierro, A., Liu, N.Y., Bandyopadhyay, A., Estelle, M.** 2000. The *axr6* mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene involved in auxin response and early development. *Development*. 127: 23-32.
- **Huang, L.C., Lius, S., Huang, B.L., Murashige, T., Mahdi, E.F., Van Gundy, R.** 1992. Rejuvenation of *Sequoia sempervirens* by repeated grafting of shoot tips onto juvenile rootstocks *in vitro*: model for phase reversal of trees. *Plant Physiology*.98:166-173.
- **Hutchison, K.W., Singer, P.B., McInnis, S., Díaz-Sala, C., Greenwood, M.S.** 1999. Expansins are conserved in conifers and expressed in hypocotyls in response to exogenous auxin. *Plant Physiology*. 120: 827-832.
- **Ikeda, A., Ueguchi-Tanaka, M., Sonoda, Y., Kitano, H., Koshioka, M., Futsuhara, Y., Matsuoka, M., Yamaguchi, J.** 2001. *slender rice*, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the *SLR1* gene, an ortholog of the height-regulating gene *GAI/RGA/RHT/D8*. *The Plant Cell*. 13: 999-1010.
- **Imin, N., Nizamidin, M., Wu, T., Rolfe, B.G.** 2007. Factors involved in root formation in *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany*. 58: 439-451.
- **James D., Thurbon I.** 1981. Shoot and root initiation *in vitro* in the apple rootstock m.9 and the promotive effects of phloroglucinol. *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 56: 15-20.
- **Jasik, J., DeKlerk, G.J.** 1997. Anatomical and ultrastructural examination of adventitious root formation in stem slices of apple. *Biologia Plantarum*. 39: 79–90.
- **Jensen, W.A.** 1962. Botanical histochemistry: principles and practice. San Francisco.
- **Kamiya, N., Itoh, J., Morikami, A., Nagato, Y., Matsuoka, M.** 2003. The *SCARECROW* gene's role in asymmetric cell divisions in rice plants. *Plant Journal*. 36: 45-54.
- **Karabaghli, C., Frey-Klett, P., Sotta, B., Bonnet, M., Le Tacon, F.** 1998. *In vitro* effects of *Laccaria bicolor* S238 N and *Pseudomonas fluorescens* strain BBc6 on rooting of de-rooted shoot hypocotyls of *Norway spruce*. *Tree Physiology*.18: 103-111.
- **Karban, R., Thaler, J.** 1999. Plant phase change and resistance to herbivory. *Ecology* 80:510–517.
- **Kearsley, M., Whitham, T.** 1989. Developmental changes in resistance to herbivory: implications for individuals and populations. *Ecology*. 70: 422-434.
- **Kepinski, S., Leyser, O.** 2005. The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*. 435: 446-451.
- **Kerr, I., Bennett, M.** 2007. New insight into the biochemical mechanisms regulating auxin transport in plants. *Biochemistry Journal*. 401: 613–622.
- **Knox, K., Grierson, C.S., Leyser, O.** 2003. AXR3 and SHY2 interact to regulate root hair development. *Development*. 130: 5769-5777.
- **Konishi, M., Sugiyama, M.** 2003. Genetic analysis of adventitious root formation with a novel series of temperature-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development*. 130: 5637-5647.

- **Konishi, M., Sugiyama, M.** 2006. A novel plant-specific family gene, *ROOT PRIMORDIUM DEFECTIVE 1*, is required for the maintenance of active cell proliferation. *Plant Physiology*. 140: 591-602.
- **Kuroha, T., Kato, H., Asami, T., Yoshida, S., Kamada, H., Satoh, S.** 2002. A trans-zeatin riboside in root xylem sap negatively regulates adventitious root formation on cucumber hypocotyls. *Journal of Experimental Botany*. 53: 2193-2200.
- **Kuroha, T., Satoh, S.** 2007. Involvement of cytokinins in adventitious and lateral root formation. *Plant Root*. 1: 27-33.
- **Laajanen, K., Vuorinen, I., Salo, V., Juuti, J., Raudaskoski, M.** 2007. Cloning of *Pinus sylvestris* *SCARECROW* gene and its expression pattern in the pine root system, mycorrhiza and NPA-treated short roots. *New Phytologist*. 175: 230-243.
- **Lanteri, M., Pagnussat, G., Lamattina, L.** 2006. Calcium and calcium-dependent protein kinases are involved in nitric oxide- and auxin-induced adventitious root formation in cucumber. *Journal of Experimental Botany*. 57: 1341-1351.
- **Larcher, W.** 1969. Increase in the ability to become frost-resistant during ageing in *Quercus ilex*. *Planta*. 88: 130-135.
- **Laskowski, M.J., Williams, M.E., Nusbaum, H.C., Sussex, I.M.** 1995. Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development*. 121: 3303-3310.
- **Levesque, M.P., Vernoux, T., Busch, W., Cui, H., Wang, J.Y., Blilou, I., Hassan, H., Nakajima, K., Matsumoto, N., Lohmann, J.U., Scheres, B., Benfey, P.N.** 2006. Whole-genome analysis of the *SHORT-ROOT* developmental pathway in Arabidopsis. *PLoS Biology*. 4: e143.
- **Leyser, O., Pickett, F.B., Dharmasiri, S., Estelle, M.** 1996. Mutations in the *AXR3* gene of Arabidopsis result in altered auxin response including ectopic expression from the SAUR-AC1 promoter. *The Plant Journal*. 10: 403-413.
- **Li, S., Xue, L., Xu, S., Feng, H., An, L.** 2009. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. *Botanical Reviews*. 75: 230-247.
- **Li, S., Xue, L.** 2010. The interaction between H₂O₂ and NO, Ca²⁺, cGMP, and MAPKs during adventitious rooting in mung bean seedlings. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 46:142–148.
- **Li, X., Qian, Q., Fu, Z., Wang, Y., Xiong, G., Zeng, D., Wang, X., Liu, X., Teng, S., Hiroshi, F., Yuan, M., Luo, D., Han, B., Li, J.** 2003. Control of tillering in rice. *Nature*. 422: 618-621.
- **Libby, W. J., Conkle, M. T.** 1966. Effects of auxin treatment, tree age, tree vigour, and cold storage on rooting young Monterey pine. *Forest Science*. 12: 484-502.
- **Lim, J., Helariutta, Y., Specht, C.D., Jung, J., Sims, L., Bruce, W.B., Diehn, S., Benfey, P.N.** 2000. Molecular analysis of the *SCARECROW* gene in maize reveals a common basis for radial patterning in diverse meristems. *The Plant Cell*. 12: 1307-1318.
- **Lim, J., Jung, J.W., Lim, C.E., Lee, M.H., Kim, B.J., Kim, M., Bruce, W.B., Benfey, P.N.** 2005. Conservation and diversification of *SCARECROW* in maize. *Plant Molecular Biology*. 59: 619-630.
- **Lindroth, A.M.** 2000. Gene expression during adventitious root development in *Pinus contorta*. Tesis doctoral. Uppsala, Suecia.
- **Lindroth, A.M., Saarikoski, P., Flygh, G., Clapham, D., Gronroos, R., Thelander, M., Ronne, H., Von Arnold, S.** 2001. Two S-adenosylmethionine synthetase-encoding genes differentially expressed during adventitious root development in *Pinus contorta*. *Plant Molecular Biology*. 46: 335-346.
- **Liscum, E., Reed, J.W.** 2002. Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Molecular Biology*. 49: 387-400.
- **Liu, H., Wang, S., Yu, X., Yu, J., He, X., Zhang, S., Shou, H., Wu, P.** 2005. ARL1, a LOB-domain protein required for adventitious root formation in rice. *The Plant Journal*. 43: 47–56.
- **Liu, S., Wang, J., Wang, L., Wang, X., Xue, Y., Ping, W., Shou, H.** 2009. Adventitious root formation in rice requires OsGNOM1 and is mediated by the OsPINs family. *Cell Research*. 19:1110–1119.
- **Longman, K.A.** 1976. Some experimental approaches to the problem of phase change in forest trees. *Acta Horticulturae*. 56: 81-90.
- **Lund, S.T., Smith, A.G., Hackett, W.P.** 1996. Cuttings of a tobacco mutant, *rac*, undergo cell divisions but do not initiate adventitious roots in response to exogenous auxin. *Physiologia Plantarum*. 97: 372-380.

- **Lund, S.T., Smith, A.G., Hackett, W.P.** 1997. Differential gene expression in response to auxin treatment in the wild type and *rac*, an adventitious rooting-incompetent mutant of tobacco. *Plant Physiology*. 114: 1197-1206.
- **Malamy, J.E., Benfey, P.N.** 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*. 124: 33-44.
- **Martinez-Pastur, G., Zappacosta, D., Arena, M., Curvetto, N.** 2001. Changes in isoperoxidase patterns during the in vitro rooting of *Nothofagus antarctica*. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*. 27: 43–53.
- **McDonald, M. P., Visser, E.J.W.** 2003. A study of the interaction between auxin and ethylene in wild type and transgenic ethylene-insensitive tobacco during adventitious root formation induced by stagnant root zone conditions. *Plant Biology*. 5: 550–556.
- **Mencuccini, M., Martínez-Vilalta, J., Vanderklein, D., Hamid, H. A., Korakaki, E., Lee, S., Michiels, B.** 2005 Size-mediated ageing reduces vigour in trees. *Ecology Letters*. 8: 1183–1190.
- **Metaxas, D.J., Syros, T.D., Yupsanis, T., Economou, A.S.** 2004. Peroxidases during adventitious rooting in cuttings of *Arbutus unedo* and *Taxus baccata* as affected by plant genotype and growth regulator treatment. *Plant Growth Regulation*. 44:257-266.
- **Monteuuis, O.** 1991. Rejuvenation of a 100-year-old *Sequoiadendron giganteum* through in vitro meristem culture. I. Organogenic and morphological arguments. *Physiologia Plantarum*. 81: 111-115.
- **Monteuuis, O., Doubeau, S.** 2008. DNA methylation in different origin clonal offspring from a mature *Sequoiadendron giganteum* genotype. *Trees - Structure and Function*. 22: 779-784
- **Morohashi, K., Minami, M., Takase, H., Hotta, Y., Hiratsuka, K.** 2003. Isolation and characterization of a novel GRAS gene that regulates meiosis-associated gene expression. *Journal of Biological Chemistry*. 278: 20865-20873.
- **Muller, J.F., Goujoud, J., Caboche, M.** 1985. Isolation in vitro of naphthaleneacetic acid-tolerant mutants of *Nicotiana tabacum*, which are impaired in root morphogenesis. *Molecular and General Genetics*. 199: 194-200.
- **Munee-Bosch, S.** 2007. Aging in perennials. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 26:123-138.
- **Murray, J.R., Smith, A.G., Hackett, W.P.** 1994. Differential dihydroflavonol reductase transcription and anthocyanin pigmentation in the juvenile and mature phases of ivy (*Hedera helix* L.). *Planta*. 194: 102-109.
- **Naija, E.N., Ammar S., Kevers C., Dommes J.** 2009. Involvement of polyamines in the adventitious rooting of micropropagated shoots of the apple rootstock MM106 S. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 45:83–91.
- **Nakajima, K., Sena, G., Nawy, T., Benfey, P.N.** 2001. Intercellular movement of the putative transcription factor *SHR* in root patterning. *Nature*. 413: 307-311.
- **Negi, S., Sukumar, P., Liu, X., Cohen, J. D. and Muday, G. K.** 2010. Genetic dissection of the role of ethylene in regulating auxin-dependent lateral and adventitious root formation in tomato. *The Plant Journal*. 61: 3–15.
- **Niemi, K., Häggman, H., Sarjala, T.** 2002a. Effects of exogenous diamines on the interaction between ectomycorrhizal fungi and adventitious root formation in Scots pine *in vitro*. *Tree Physiology*. 22: 373-381.
- **Niemi, K., Vuorinen, T., Ernsten, A.** 2002b. Ectomycorrhizal fungi and exogenous auxins influence root and mycorrhiza formation of Scots pine hypocotyl cuttings *in vitro*. *Tree Physiology*. 22: 1231-1239.
- **Niemi, K., Julkunen-Tiitto, R., Tegelberg, R., Häggman, H.** 2005. Light sources with different spectra affect root and mycorrhiza formation in Scots pine *in vitro*. *Tree Physiology*. 25: 123-128.
- **Nishiyama, T., Fujita, T., Shin, I., Seki, M., Nishide, H., Uchiyama, I., Kamiya, A., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Shinozaki, K., Kohara, Y., Hasebe, M.** 2003. Comparative genomics of *Physcomitrella patens* gametophytic transcriptome and *Arabidopsis thaliana*: Implication for land plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100: 8007-8012.
- **Normand, L., Bärtschi, H., Debaud, J.C., Gay, G.** 1996. Rooting and acclimatization of micropropagated cuttings of *Pinus pinaster* and *Pinus sylvestris* are enhanced by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Physiologia Plantarum*. 98: 759–766.
- **Paquette, A.J., Benfey, P.N.** 2005. Maturation of the ground tissue of the root is regulated by gibberellin and SCARECROW and requires SHORT-ROOT. *Plant Physiology*. 138: 636-640.

- **Paton, D.M.** 1984. Vegetative propagation of adult eucalyptus. En: Colloque International sur les Eucalyptus Résistants au Froid. CSIRO-AFOCEL. Bordeaux. 570-586.
- **Pelvin, M.J., Mills, M.M., Ikura, M.** 2005. The LxxLL motif: a multifunctional binding sequence in transcriptional regulation. Trends in Biochemical Sciences. 30: 66-69.
- **Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P., Harberd, N.P.** 1997. The Arabidopsis *GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. Genes & Development. 11: 3194-3205.
- **Peng, J., Richards, D.E., Hartley, N.M., Murphy, G.P., Devos, K.M., Flintham, J.E., Beales, J., Fish, L.J., Worland, A.J., Pelica, F., Sudhakar, D., Christou, P., Snape, J.W., Gale, M.D., Harberd, N.P.** 1999. 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. Nature. 400: 256-261.
- **Pernisova, M., Klímab, P., Horaka, J., Va lkova, M., Malbeckb, J., Soucekc, P., Reichmana, P., Hoyerova, K., Dubova, J., Frimla, J., Zazímalova, E., Hejatkoa, J.** 2008. Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. Proceedings of the National Academy of Sciences. 106: 3609–3614.
- **Pfaffl, M.W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research. 29: e45.
- **Pharis, R.P., Morf, W.** 1967. Experiments on the precocious flowering of western red cedar and four species of cupressus with gibberellins A3 and A4/A7 mixture. Canadian Journal of Botany. 45: 1519–1524.
- **Pharis, R.P.** 1976. Manipulation of flowering in conifers through the use of plant hormones. En: Modern methods in forest genetics. Miksche, J.P. Ed. Springer-Verlag. Berlin. 265-282.
- **Pharis, R.P.** 1977. Promotion of flowering in the pinaceae by hormones: a reality. En: Proceedings of the Thirteenth Lake States Forest Tree Improvement Conference. 1-10.
- **Poethig, R.S.** 1990. Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. Science 250: 923-930.
- **Poethig RS.** 2003. Phase change and the regulation of developmental timing in plants. Science. 301: 334-336.
- **Pysh, L.D., Wysocka-Diller, J.W., Camilleri, C., Bouchez, D., Benfey, P.N.** 1999. The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the *SCARECROW-LIKE* genes. Plant Journal. 18: 111-119.
- **Ramírez-Carvajal, G.A., Morse, A.M., Dervinis, C., Davis J.M.** 2009. The cytokinin type-b response regulator ptr13 is a negative regulator of adventitious root development in *Populus*. Plant Physiology. 150: 759-771.
- **Reed, R.C., Brady, S.R., Muday, G.K.** 1998. Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in Arabidopsis. Plant Physiology. 118: 1369-1378.
- **Revilla, M.A., Pacheco, J., Casares, A., Rodriguez, R.** 1996. In vitro reinvigoration of mature olive trees (*Olea europaea* L.) through micrografting. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. 32:257-261.
- **Ricci, A., Carra, A., Torelli, A., Maggiali, C., Morini, G., Branca, C.** 2001. Cytokinin-like activity of N,N'-diphenylureas. N,N'-bis-(2,3-methylenedioxyphenyl)urea and N,N'-bis-(3,4-methylenedioxyphenyl)urea enhance adventitious root formation in apple rootstock M26 (*Malus pumila* Mill.). Plant Science. 160: 1055-1065.
- **Ricci, A., Carra, A., Rolli, E., Bertoletti, C., Branca, C.** 2003. N,N'-bis-(2,3-methylenedioxyphenyl)urea and N,N'-bis-(3,4-methylenedioxyphenyl)urea interact with auxin in enhancing root formation of M26 apple (*Malus pumila* Mill.) stem slices. Plant Growth Regulation. 40: 207-212.
- **Ricci, A., Rolli, E., Dramas, L., Díaz-Sala, C.** 2008. N,N'-bis-(2,3-methylenedioxyphenyl)urea and N,N'-bis-(3,4-methylenedioxyphenyl)urea enhance adventitious rooting in *Pinus radiata* and affect expression of genes induced during adventitious rooting in the presence of exogenous auxin. Plant Science. 175: 356-363.
- **Ritchie, G.A.** 1991. The commercial use of conifer rooted cuttings in forestry: a world overview. New Forests. 5: 247-275.
- **Ritchie, G.A.** 1994a. Commercial application of adventitious rooting in forestry. En: Biology of adventitious root formation. Davis, T.D., Haissig, B.E. Eds. Plenum Press. New York. 37-52.

- **Ritchie, G.A., Duke, S.D., Timmis, R.** 1994b. Maturation in Douglas-fir: II. Maturation characteristics of genetically matched Douglas-fir seedlings, rooted cuttings and tissue culture plantlets during and after 5 years of field growth. *Tree Physiology*. 14:1261-1275.
- **Robinson, L.W., Wareing, P.F.** 1969. Experiments on the juvenile-adult phase in some woody species. *New Phytologist*. 68: 67-78.
- **Rogers, D. L.** 2002. *In situ* genetic conservation of Monterey Pine (*Pinus radiata* D. Don): Information and recommendations. Genetic Resource Conservation Program, report no. 26. University of California, Davis, CA.
- **Rogler, C.E., Hackett, W.P.** 1975. Phase change in *Hedera helix*: induction of the mature to juvenile phase change by gibberellin A3. *Physiol Plantarum*. 34:141-147.
- **Sabatini S, Heidstra R, Wildwater M, Scheres B.** 2003. SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem. *Genes & Development*. 17: 354-358.
- **Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York.
- **Sánchez, C., Vieitez, A.M.** 1991. *In vitro* morphogenetic competence of basal sprouts and crown branches of mature chestnut. *Tree Physiology*. 8: 59-70.
- **Sánchez, C., Smith, A.G., Hackett, W.P.** 1995. Localized expression of a proline-rich protein gene in juvenile and mature ivy petioles in relation to rooting competence. *Physiologia Plantarum*. 93: 207-216.
- **Sánchez, C., San-Jose, C., Ballester, A., Vieitez, A.** 1996. Requirements for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Q. rubra* shoots derived from mature trees. *Tree Physiology*. 16: 673-680.
- **Sánchez, C., Ballester, A., Vieitez, A.** 1997. Reinvigoration treatments for the micropropagation of mature chestnut trees. *Annals of Forest Science*. 54: 359-370.
- **Sánchez, C., Gil, B., Asoriza, E., Ballester, A.** 1999. Identification of phase change related mRNAs in chestnut and oak. En: *Application of Biotechnology to Forest Genetics*. Espinel, S., Ritter, E. Eds. 455-464.
- **Sánchez, C., Vieitez, A.M., Ballester, A.** 2000. Anatomical, biochemical and molecular markers of root differentiation in juvenile and adult chestnut and oak shoots cultured *in vitro*. En: *Abstracts of the Meeting of the COST Action 843; Developmental Biology of Regeneration*. Geisnheim. 40-41.
- **Sánchez, C., Vielba, J.M., Ferro, E., Covelo, G., Solé, A., Abarca, D., de Mier, B., Díaz-Sala, C.** 2007. Two *SCARECROW-LIKE* genes are induced in response to exogenous auxin in rooting-competent cuttings of distantly related forest species. *Tree Physiology*. 27: 1459-1470.
- **Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74: 5463-5467.
- **San-José, M.C., Vidal, N., Ballester, A.** 1992. Anatomical and biochemical changes during root formation in oak and apple shoots cultured *in vitro*. *Agronomie*. 12: 767-774.
- **Sassa, N., Matsushita, Y., Nakamura, T., Nyunoya, H.** 2001. The molecular characterization and *in situ* expression pattern of pea *SCARECROW* gene. *Plant Cell Physiology*. 42: 385-394.
- **Sbabou, L., Bucciarelli, B., Miller, S., Liu, J., Berhada, F., Filali-Maltouf, A., Allan, D., Vance, C.** 2010. Molecular analysis of *SCARECROW* genes expressed in white lupin cluster roots. *Journal of Experimental Botany*. 61: 1351-1363.
- **Scheres, B., Di Laurenzio, L., Willemsen, V., Hauser, M.T., Janmaat, K., Weisbeek, P., Benfey, P.N.** 1995. Mutations affecting the radial organisation of the Arabidopsis root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development*. 121: 53-62.
- **Schumacher, K., Schmitt, T., Rossberg, M., Schmitz, G., Theres, K.** 1999. The Lateral suppressor (Ls) gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96: 290-295.
- **Schwabe, W.W.** 1976. Applied aspects of juvenility and some theoretical considerations. *Acta Horticulturae*. 56: 45-56.
- **Schwambach, J., Fadanelli, C., Fett-Neto, A.** 2005. Mineral nutrition and adventitious rooting in microcuttings of *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiology*. 25: 487-494.
- **Selby, C., Kennedy, S.J., Harvey, B.M.R.** 1992. Adventitious root formation in hypocotyl cuttings of *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. - the influence of plant growth regulators. *New Phytologist*. 120: 453-457.

- Sena, G., Jung, J.W., Benfey, P.N. 2004. A broad competence to respond to SHORT ROOT revealed by tissue-specific ectopic expression. *Development*. 131: 2817-2826.
- Silverstone, A.L., Ciampaglio, C.N., Sun, T. 1998. The Arabidopsis *RGA* gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *The Plant Cell*. 10: 155-169.
- Smith, D.L., Fedoroff, N.V. 1995. *LRP1*, a gene expressed in lateral and adventitious root primordia of arabidopsis. *The Plant Cell*. 7: 735-745.
- Smith, D.R., Thorpe, T.A. 1975a. Root initiation in cuttings of *Pinus radiata* seedlings: I. Developmental sequence. *Journal of Experimental Botany*. 26: 184-192.
- Smith, D.R., Thorpe, T.A. 1975b. Root initiation in cuttings of *Pinus radiata* seedlings: II. Growth regulator interactions. *Journal of Experimental Botany*. 26: 193-202.
- Solé, A., Sánchez, C., Vielba, J., Valladares, S., Abarca, D., Díaz-Sala, C. 2008. Characterization and expression of a *Pinus radiata* putative ortholog to the Arabidopsis *SHORT-ROOT* gene. *Tree Physiology*. 28: 1629-1639.
- Sorin, C., Bussell, J.D., Camus, I., Ljung, K., Kowalczyk, M., Geiss, G., McKhann, H., Garcion, C., Vaucheret, H., Sandberg, G., Bellini, C. 2005. Auxin and light control of adventitious rooting in Arabidopsis require ARGONAUTE1. *The Plant Cell*. 17: 1343-1359.
- Sozzani, R., Cui, H., Moreno-Risueno, M. A., Busch, W., Van Norman, J. M., Vernoux, T., Brady, S. M., Dewitte, W., Murray, J. A. H., Benfey, P. N. 2010. Spatiotemporal regulation of cell-cycle genes by SHORTRoot links patterning and growth. *Nature*. 466: 128-132.
- Steele, M.J., Yeoman, M.M., Coutts, M.P. 1990. Developmental changes in Sitka spruce as indices of physiological age. *New Phytologist*. 114: 111-120.
- Steffens, B., Wang, J., Sauter, M. 2006. Interactions between ethylene, gibberellin and abscisic acid regulate emergence and growth rate of adventitious roots in deepwater rice. *Planta*. 223: 604 – 612.
- Steinmann, T., Geldner, N., Grebe, M., Mangold, S., Jackson, C.L., Paris, S., Iweiler, L., Palme, K., Jürgens, G. 1999. Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science*. 286: 316-318.
- Stojicic, D., Budimir, S., Culafic, L. 1999. Micropropagation of *Pinus heldreichii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 59: 147–150.
- Stuurman, J., Jaggi, F., Kuhlemeier, C. 2002. Shoot meristem maintenance is controlled by a GRAS-gene mediated signal from differentiating cells. *Genes & Development*. 16: 2213-2218.
- Sutton, W.R.J. 1999. The need for planted forests and the example of radiata pine. *New Forests*. 17: 95-110.
- Swarup, R., Friml, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme, K., Bennett, M. 2001. Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex. *Genes & Development*. 15, 2648–2653.
- Sweet, G.B. 1973. The effect of maturation on the growth and form of vegetative propagules of radiata pine. *New Zealand Journal of Forestry Science*. 3: 191-210.
- Syros, T., Yupsanis, T., Zafiriadis, H., Economou, A. 2004. Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. *Journal of Plant Physiology*. 161: 69-77.
- Takahashi, F., Sato-Nara, K., Kobayashi, K., Suzuki, M., Suzuki, H. 2003. Sugar-induced adventitious roots in Arabidopsis seedlings. *Journal of Plant Research*. 116: 83 – 91.
- Tarrago, J., Sansberro, P., Filip, R., Lopez, P., Gonzalez, A., Luna, C., Mroginski, L. 2005. Effect of leaf retention and flavonoids on rooting of *Ilex paraguariensis* cuttings. *Scientia Horticulturae*. 103: 479-488.
- Taylor, B.H., Scheuring, C.F. 1994. A molecular marker for lateral root initiation: the *RSI-1* gene of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) is activated in early lateral root primordia. *Molecular Genetics & Genomics*. 243: 148-157.
- Teale, W.D., Paponov, I.A., Ditengou, F., Palme, K. 2005. Auxin and the developing root of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*. 123: 130-138.
- Thulin, I.J., Faulds, T. 1968. The use of cuttings in the breeding and afforestation of *Pinus radiata*. *New Zealand Journal of Forestry*. 13: 66–77.

- **Tian, C., Wan, P., Sun, S., Li, J., Chen, M.** 2004. Genome-wide analysis of the GRAS gene family in rice and Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*. 54: 519-532.
- **Tian, Q., Reed, J.W.** 1999. Control of auxin-regulated root development by the *Arabidopsis thaliana* *SHY2/IAA3* gene. *Development*. 126: 711-721.
- **Tonon, G., Kevers, C., Gaspar, T.** 2001. Changes in polyamines, auxins and peroxidase activity during in vitro rooting of *Fraxinus angustifolia* shoots: an auxin-independent rooting model. *Tree Physiology*. 21: 655-663.
- **Valledor, L., Hasbún, R., Meijón, M., Rodríguez, J.L., Santamaría, E., Viejo, M., Berdasco, M., Feito, I., Fraga, M., Cañal, M.J., Rodríguez, R.** 2007. Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 91: 75-86
- **Vanderklein, D., Martínez-Vilalta, J., Lee, S., Mencuccini, M.** 2007. Plant size, not age, regulates growth and gas exchange in grafted Scots pine trees. *Tree Physiology*. 27: 71-79.
- **Vera, P., Lamb, C., Doerner, P.W.** 1994. Cell-cycle regulation of hydroxyproline-rich glycoprotein *HRGPnt3* gene expression during the initiation of lateral root meristems. *The Plant Journal*. 6: 717-727.
- **Vielba, J.M., Díaz-Sala, C., Ferro, E., Rico, S., Lamprecht, M., Abarca, D., Ballester, A., Sánchez, C.** 2011. *CsSCL1* is differentially regulated upon maturation in chestnut microshoots and is specifically expressed in rooting-competent cells. *Tree Physiology*. 31:1152-1160.
- **Walter, C., Grace, L. J., Wagner, A., White, D. W. R., Walden, A. R., Donaldson, S. S., Hinton, H., Gardner, R. C., Smith, D. R.** 1998. Stable transformation and regeneration of transgenic plants of *Pinus radiata* D. Don. *Plant Cell Reports*. 17:460-468.
- **Wareing, P.F., Frydman, W.M.** 1976. General aspects of phase change, with special reference to *Hedera helix* L. *Acta Horticulturae*. 56: 57-69.
- **Wareing, P.F.** 1959. Problems of juvenility and flowering in trees. *Journal of the proceedings of the Linnean Society of London. Botany*. 56: 282-289.
- **Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., Schmülling, T.** 2001. Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98: 10487-10492.
- **Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H., Schmülling, T.** 2003. Cytokinin-deficient transgenic arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell*. 15: 2532-2550
- **Willemsen, V., Wolkenfelt, H., de Vrieze, G., Weisbeek, P., Scheres, B.** 1998. The *HOBBIT* gene is required for formation of the root meristem in the Arabidopsis embryo. *Development*. 125: 521-531.
- **Woo, H.H., Hackett, W.P., Das, A.** 1994. Differential expression of a chlorophyll a/b binding protein gene and a proline rich protein gene in juvenile and mature phase English ivy (*Hedera helix*). *Physiologia Plantarum*. 92: 69-78.
- **Wysocka-Diller, J.W., Helariutta, Y., Fukaki, H., Malamy, J.E., Benfey, P.N.** 2000. Molecular analysis of *SCARECROW* function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development*. 127: 595-603.
- **Xie, Q., Frugis, G., Colgan, D., Chua, N.H.** 2000. Arabidopsis *NAC1* transduces auxin signal downstream of *TIR1* to promote lateral root development. *Genes & Development*. 14: 3024-3036.
- **Xie, Q., Guo, H.S., Dallman, G., Fang, S., Weissman, A.M., Chua, N.H.** 2002. *SINAT5* promotes ubiquitin-related degradation of *NAC1* to attenuate auxin signals. *Nature*. 419: 167-170.
- **Xu, J., Hofhuis, H., Heidstra, R., Sauer, M., Friml, J., Scheres, B.** 2006. A molecular framework for plant regeneration. *Science*. 311: 385-388.
- **Yu, N., Lee, S., Lee, M., Heo, J., Chang, K., Lim, J.** 2010. Characterization of SHORT-ROOT function in the Arabidopsis root vascular system. *Molecules and Cells*. 30:113-119
- **Zagory, D., Libby, W.J.** 1985. Maturation-related resistance of *Pinus radiata* to western gall rust. *Phytopatology*. 75: 1443-1447.
- **Zhang, B., Tong, C., Yin, T., Zhang, X., Zhuge, Q., Huang, M., Wang, M., Wu, R.** 2009. Detection of quantitative trait loci influencing growth trajectories of adventitious roots in *Populus* using functional mapping. *Tree Genetics & Genomes*. 5: 539-543.
- **Zimmerman, R.H., Hackett W.P., Pharis, R.P.** 1985. Hormonal aspects of phase change and precocious flowering. En: *Encyclopedia of Plant Physiology*. Pharis, R.P., Reid, D.M., Eds. Springer-Verlag. Berlin. 79-115.