



Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Identificación de genes implicados en el desarrollo de
meristemos inducidos por benciladenina en tejidos de *Pinus*
spp.**



María Hernández Munuera
Julio 2014

Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y
Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Identificación de genes implicados en el desarrollo de
meristemas inducidos por benciladenina en tejidos de *Pinus*
spp.**

María Hernández Munuera

Ricardo Javier Ordás Fernández

RESUMEN

La formación *in vitro* de brotes adventicios es un buen sistema para estudiar el desarrollo de las plantas. Para esclarecer los eventos que tienen lugar durante el desarrollo de yemas adventicias *in vitro* en coníferas, es necesario evaluar los genes que participan en él. A día de hoy, los estudios realizados se centran en angiospermas, no pudiéndose extrapolar al caso de las coníferas, por ello nos hemos propuesto estudiar 7 genes (*ARR1*, *CLV1L*, *WUS*, *KN1*, *KN2*, *KN3* y *KN4*) implicados putativamente en el desarrollo de meristemos inducidos por benciladenina (BA) en *Pinus pinea* L. Para ello se han cultivado cotiledones de embriones no germinados en medio de inducción ½ LP suplementado con diferentes concentraciones de BA (2,2 µM, 4,4 µM, 8,8 µM, 22 µM, 44 µM y 88 µM) y transferidos a medio ½ LPC sin hormona transcurridos los 2, 4, 8 y 16 días de inducción. Se ha evaluado la respuesta caulogénica y el número de yemas por cotiledón después de 60 días de cultivo. Los resultados muestran que el periodo de inducción mínimo para la formación de yemas adventicias es de 4 días durante los cuales las células meristemáticas adquieren la competencia. A partir del cuarto día, las células se encuentran determinadas a la formación de yemas. Se ha podido relacionar positivamente la respuesta caulogénica con la concentración de BA. Por otro lado, se ha estudiado la expresión de los 7 genes mostrando que los genes *ARR1* y *CLV1L* se expresan durante la etapa de adquisición de competencia y podrían ser homólogos a los genes *ARR1* y *CLV1L* de *Arabidopsis*; los genes *WUS*, *KN1*, *KN2*, *KN3* y *KN4* se expresan durante la etapa de determinación.

ABSTRACT

Adventitious shoot formation *in vitro* is a good experimental tool for studying plant development. To clarify the events that occur during the *in vitro* adventitious buds development in conifers, it is necessary to study the concerned genes. To date, the vast majority of researchs have been carried in angiosperms and not in conifers, therefore we aim to study 7 genes (*ARR1*, *CLV1L*, *WUS*, *KN1*, *KN2*, *KN3* and *KN4*) involved putatively in meristems development induced by benciladenine (BA) in *Pinus pinea* L. Isolated cotyledons from mature embryos were cultured in caulogenic induction meduim (1/2 LP) with differents BA concentrations (2,2 µM, 4,4 µM, 8,8 µM, 22 µM, 44 µM y 88 µM) and transferred to a hormone-free medium ½ LPC after 2, 4, 8 and 16 days of induction culture. We assessed the caulogenic response and the number of buds per cotyledon after 60 days of culture. The results show that the minimum period for bud induction is 4 days during in which the meristematic cells are at a stage of acquiring competence. Since fourth day, cells are determined to form buds. It has been positively relate caulogenic response to BA concentration. Moreover, we have studied the expression of the 7 genes showing that *ARR1* and *CLV1L* are expressed during the competence acquisition stage and may be homologous to *Arabidopsis* *ARR1* and *CLV1L* genes; *WUS*, *KN1*, *KN2*, *KN3* and *KN4* genes are expressed during induction phase.

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------------------|--|
| ARN | Ácido Ribonucleico |
| ARR1 | Regulador de respuesta tipo A 1 |
| BA | N ₆ -benciladenina |
| cDNA | ADN complementario |
| Cks | Citoquininas |
| CLV1 | <i>CLAVATA-1</i> |
| H₂O₂ | Peróxido de hidrógeno |
| Hpt | Histidina fosfotransferasa |
| KN1 | <i>KNOTTED-1</i> |
| KN2 | <i>KNOTTED-2</i> |
| KN3 | <i>KNOTTED-3</i> |
| KN4 | <i>KNOTTED-4</i> |
| KNAT1 | Knotted-1 like in <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| KNOX | Knotted-1 like homeobox |
| LiCl | Cloruro de litio |
| LP | Medio de cultivo Le Poivre modificado por Aitken-Christie et al. 1988 |
| LPC | Medio de cultivo Le Poivre modificado por Aitken-Christie et al. 1988 con carbón 5 g/L activo y libre de hormona |
| N₂ | Nitrógeno |
| qRT-PCR | PCR cuantitativa en tiempo real |
| RR | Reguladores de Respuesta |
| SAM | Meristemo apical (Shoot Apical Meristem) |
| STM | <i>SHOOTMERISTEMLESS</i> |
| WUS | <i>WUSCHEL</i> |

INDICE

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| 1.1 | Antecedentes..... | 5 |
| 1.1.1 | Distribución y usos de la especie objeto de estudio..... | 5 |
| 1.1.2 | Programas de conservación y mejora..... | 5 |
| 1.1.3 | Caulogénesis adventicia..... | 6 |
| 1.1.4 | Citoquininas..... | 7 |
| 1.1.5 | Bases moleculares de la caulogénesis adventicia inducida por citoquininas..... | 7 |
| 1.2 | Planteamiento y objetivos..... | 9 |
| 2 | MATERIAL Y MÉTODOS..... | 10 |
| 2.1 | Material Vegetal..... | 10 |
| 2.1.1 | Elección y Procedencia..... | 10 |
| 2.1.2 | Asepsia..... | 10 |
| 2.1.3 | Escisión de cotiledones..... | 10 |
| 2.2 | Condiciones y Medio de cultivo..... | 11 |
| 2.3 | Extracción de ARN y Síntesis de cDNA..... | 12 |
| 2.4 | PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)..... | 13 |
| 2.5 | Análisis estadístico..... | 16 |
| 3 | RESULTADOS..... | 17 |
| 3.1 | Inducción de meristemas..... | 17 |
| 3.2 | Expresión diferencial de los genes objeto de estudio durante la inducción caulogénica..... | 19 |
| 4 | DISCUSIÓN..... | 24 |
| 5 | CONCLUSIONES..... | 28 |
| 6 | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 29 |

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

1.1.1 Distribución y usos de la especie objeto de estudio

Pinus pinea L., comúnmente llamado pino piñonero, manso o doncel, es una conífera de la familia de las pináceas que se distribuye en toda la franja mediterránea (Figura 1), sobre todo en el centro y Sur de la Península Ibérica. Su área de distribución en España se centra en Andalucía, Cataluña y la Meseta, procediendo muchas de las poblaciones actuales de repoblaciones a lo largo de la historia debido a su explotación para la producción de piñón. Actualmente se planta ampliamente en el área mediterránea para protección ambiental (fijación de dunas) y por su gran valor ornamental en parques y jardines de todo el mundo (California, Escocia y sur de Inglaterra). Sin embargo, su principal interés es el económico basado en la producción de piñón, incluyéndose en la lista de especies de comercialización de materiales forestales de reproducción. España se sitúa como el primer productor mundial de piñones, seguido de Francia, Italia y Turquía (Carneros, 2009). También es cultivado por su madera ligera y flexible usada en carpintería y en estructuras, sobre todo en la construcción marítima, en la fabricación de carbón vegetal, pasta de papel y obtención de resina.

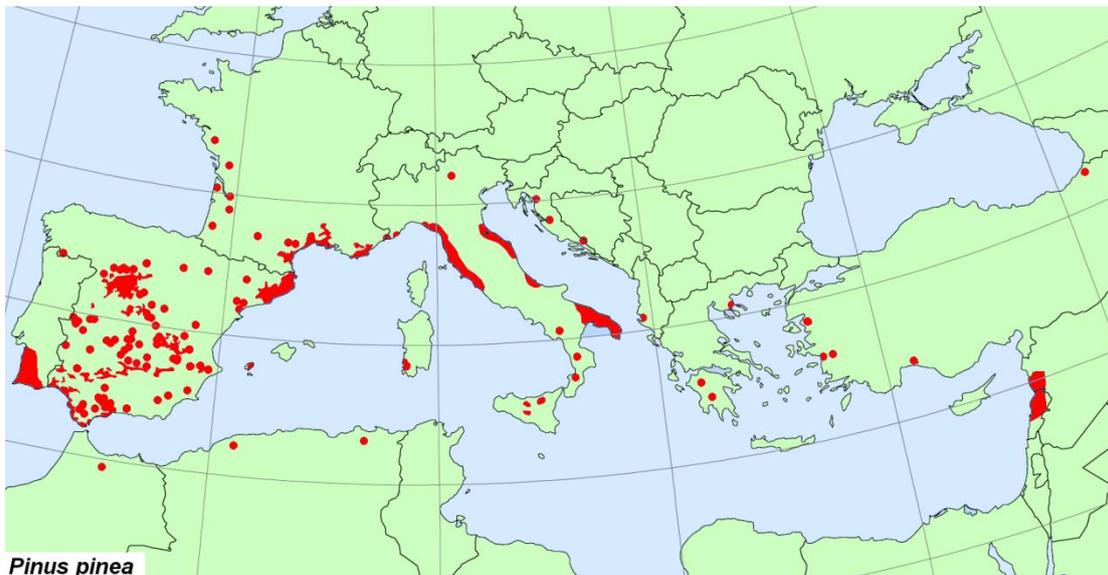


Figura 1: Área de distribución de *Pinus pinea*. EUFORGEN 2009, www.euforgen.org.

1.1.2 Programas de conservación y mejora

En Europa existe una fuerte antropización de la mayor parte del terreno, siendo muy importante la preservación de los espacios naturales considerados de especial interés por la flora y la fauna que albergan sus bosques. Un importante ejemplo de ello son los pinares de piñonero (puros o en mezcla con *Pinus pinaster*) que se encuentran principalmente por toda la región mediterránea de forma discontinua y están considerados como hábitat prioritario para su conservación en Europa por la Directiva Hábitats (1992/43/CEE de 21 de mayo de 1992). A esto se añade la preocupación, cada vez mayor, por preservar los bosques frente al cambio climático y sobre todo la

necesidad de conservar los recursos genéticos de las especies que en un futuro se pueden ver amenazadas por él. El Plan Forestal Español (2002 a 2035) incide sobre la importancia de frenar los efectos de la desertización y la deforestación proponiendo el aumento de los terrenos forestales y el desarrollo de métodos y técnicas de producción de plantas adecuadas para desarrollarse bajo los diferentes tipos de estrés (bióticos y abióticos) a los que están sometidas.

Tanto por su interés económico como por el de su conservación, es esencial crear y poner en práctica programas de mejora genética que aborden tanto el manejo y cultivo de plantaciones de coníferas como las metodologías necesarias para preservar su diversidad genética y el estudio de los mecanismos que regulan su desarrollo. Para ello es necesario ampliar el conocimiento sobre la biología de *Pinus spp.* de tal modo que permita indagar sobre sus características fisiológicas, genéticas, bioquímicas, etc. con el fin de esclarecer los mecanismos implicados en su regeneración vegetativa en laboratorio y superar todos los problemas que supone hoy en día la micropropagación de coníferas. Actualmente existen una serie de técnicas avanzadas de última generación en biotecnología que se centran en el *cultivo in vitro* de tejidos para la propagación vegetativa de las especies vegetales. La técnica del *cultivo in vitro* puede desarrollarse mediante tres vías (Bonga *et al.*, 2010):

- El desarrollo de meristemas preexistentes (yemas apicales o axilares).
- La organogénesis, basada en la diferenciación de yemas o raíces adventicias.
- La embriogénesis somática, que es el proceso de formación del embrión a partir de células somáticas.

En el caso de *Pinus pinea* L., estudios recientes demuestran que la técnica más adecuada para su propagación vegetativa es la organogénesis adventicia inducida por reguladores del crecimiento como son las auxinas y citoquininas (López *et al.*, 1996).

1.1.3 Caulogénesis adventicia

La organogénesis es el proceso mediante el cual se forman nuevos órganos en una planta a partir de la formación de una estructura unipolar, tallos (caulogénesis) o raíces (rizogénesis), en respuesta a un tratamiento concreto de cultivo. Durante la caulogénesis adventicia se formarán brotes meristemáticos en zonas donde no aparecen normalmente. Para comprender los mecanismos que ocurren durante la organogénesis es importante aclarar algunas bases fisiológicas del desarrollo del meristemo caulinar (Shoot Apical Meristem, SAM). Éste es el encargado de la formación de tallo, hojas, ramas laterales y meristemas florales, lo cual va estar desencadenado por un balance de distintos reguladores del crecimiento y dependerá del estado fisiológico o sensibilidad de unas células, tejidos u órganos en un momento dado. La importancia del SAM radica en su pluripotencialidad y en su capacidad para suministrar las células necesarias en la formación de los diferentes órganos que derivan de él (Barton, 2010). Su mantenimiento durante toda la vida de la planta se debe a la existencia de un grupo de células totipotentes que suministra constantemente células indiferenciadas en los meristemas. El balance que se establece entre proliferación celular y diferenciación está controlado por señales externas e internas (Werner y Schmülling, 2009), como son las fitohormonas y varios factores de transcripción.

En cuanto a la organogénesis, ésta se puede inducir en laboratorio aplicando un balance hormonal de auxinas y citoquininas adecuado en el medio de cultivo, lo que originará el desarrollo del meristemo apical y la posterior formación de los diferentes órganos de la planta. Christianson y Warnick (1983, 1984, 1985 y 1988) describieron el proceso de organogénesis a partir del modelo experimental usado en *Convulvulus* y establecieron así las pautas que se llevan a cabo en este proceso de diferenciación (Sugiyama, 1999; Jérôme Duclercq, 2011):

- Adquisición de competencia morfogénica (desdiferenciación celular).
- Inducción (determinación celular hacia la formación de un órgano específico en respuesta a la inducción de fitohormonas exógenas).
- Diferenciación morfológica (formación de órganos de forma independiente a la inducción de hormonas exógenas).

Para que estas fases tengan lugar con éxito, se requiere un balance hormonal diferente en cada una de ellas. Por este motivo, la fase de inducción requerirá un medio de cultivo suministrado con un balance hormonal diferente al de la fase de diferenciación. A día de hoy, se sabe que la inducción de la caulogénesis adventicia en coníferas funciona bien a partir de cotiledones aislados o embriones completos en un medio de cultivo suplementado únicamente con citoquininas y buenas condiciones ambientales (Flinn *et al.* 1988; Ellis y Bilderback, 1989; López *et al.* 1996; Moncaleán *et al.* 2005; Cortizo *et al.*, 2010). Por otro lado, debemos tener en cuenta que en el caso de las coníferas, los cotiledones pierden su potencial organogénico con la germinación, por lo que es conveniente realizar el cultivo de los cotiledones antes de que éstos germinen (Valdés *et al.* 2001).

1.1.4 Citoquininas

Las citoquininas (Cks) son un grupo de fitohormonas que realizan importantes funciones en todas las fases del desarrollo de las plantas (Taiz y Zeiger, 2010). Actualmente, existe un amplio conocimiento sobre la percepción y transducción de la señal de Cks en angiospermas gracias a los estudios llevados a cabo en *Arabidopsis thaliana* entre otras. Se sabe que las Cks juegan un papel fundamental en el desarrollo y función del meristemo apical del tallo (Werner *et al.*, 2001 y 2003; Bartrina *et al.*, 2011) entre otras funciones. Junto con diversos factores de transcripción, las Cks y auxinas van a crear un gradiente en el meristemo caulinar de tal forma que en el centro del SAM se mantenga una concentración de Cks mayor que de auxinas mientras que en los laterales ocurrirá lo contrario. De esta forma, en el centro del SAM se mantendrá una regulación positiva de la división celular restringiéndose su diferenciación y en los laterales comenzarán a diferenciarse los futuros órganos de la planta (Werner y Schmölling, 2009).

1.1.5 Bases moleculares de la caulogénesis adventicia inducida por citoquininas

La organogénesis adventicia inducida en cotiledones es una herramienta muy útil para el estudio de los mecanismos moleculares que tienen lugar durante el desarrollo de los meristemas y del modo de acción de las citoquininas en coníferas (Moncaleán *et al.* 2005; Alonso *et al.* 2007; Cortizo *et al.* 2009; Cortizo *et al.* 2010; Álvarez *et al.* 2013).

Actualmente, tan sólo podemos basarnos en el modelo de transducción de señal de las citoquininas (Cks) propuesto en *Arabidopsis thaliana* para estudiar su papel en la organogénesis (Figura 2).

Este modelo determina que, una vez la hormona se encuentra en el espacio intercelular, se produce la unión de ésta a un receptor de membrana tipo histidina quinasa (Heyl y Schmülling, 2003). El receptor se autofosforila y transfiere el grupo fosfato a las proteínas Hpt (Histidine phosphotransfer protein) (Hwang *et al.* 2002), que serán importadas al núcleo dónde, a su vez, transferirán el fosfato a los genes RR (genes reguladores de respuesta). Estos genes serán los encargados de activar las proteínas y genes implicados en la respuesta a las citoquininas (Kakimoto, 2003). En última instancia, las citoquininas activarán o reprimirán de forma directa o indirecta una serie de genes reguladores involucrados en la formación del meristemo como son los genes *SHOOTMERISTEMLESS (STM)*, *KNOTTED-1 (KN1)*, *WUSCHEL (WUS)* y *CLAVATA-1 (CLV1)* (Cary *et al.* 2002; Che *et al.* 2002; Zhang and lemaux, 2004). Estos genes serán los encargados de mantener la integridad del meristemo actuando de forma coordinada gracias al estímulo inducido por citoquininas. Éstas van a actuar concretamente en la zona central del SAM, como se ha comentado anteriormente, gracias a la acción de los factores de transcripción KNOX y WUS (Shani *et al.*, 2006; Perilli *et al.*, 2009; Sawblowski, 2009; Hay y Tsiantis, 2010; Traas y Monéger, 2010).

El gen *WUS*, que forma parte de la familia de genes *WUS/WOX5*, codifica un factor de transcripción encargado de asegurar un suministro continuo de células madre en el centro de organización del meristemo apical (Carles and Fletcher, 2003). El hecho de que *WUS* se exprese en esa zona concreta del meristemo se debe a la acción del péptido extracelular *CLV3*, cuya expresión es a su vez inducida por el péptido *WUS*. *CLV3* se une a *CLV1*, un receptor transmembrana, desencadenando una cascada de señalización que finaliza reprimiendo la transcripción de *WUS* (Schoof *et al.* 2000). Se crea de esta manera un bucle que proporciona un control del balance entre la proliferación celular del meristemo y su diferenciación (Fletcher *et al.*, 1999; Schoof *et al.*, 2000). Del mismo modo, se ha demostrado que *WUS* es capaz de reprimir la transcripción de *ARR*, un regulador de respuesta de tipo A implicado en la regulación negativa de la cascada de señalización de citoquininas (Hwang *et al.*, 2002; To *et al.*, 2004).

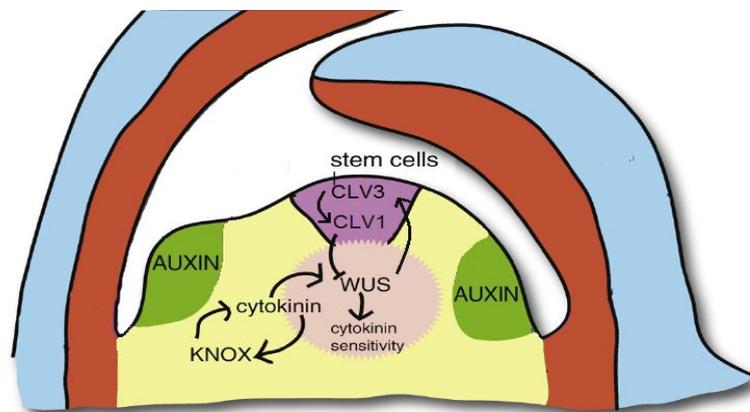


Figura 2: Dominios de expresión de los genes *CLAVATA 1*, *CLAVATA 3* y *WUSCHEL* y zonas de acción de citoquininas y auxinas en el meristemo. Adaptado de Barton, 2010.

Por otro lado encontramos a los genes de la familia KNOX (Knotted-1 like homeobox), que también participan en el desarrollo y mantenimiento del meristemo apical. Estos genes son *STM*, *KNAT1* (Knotted-1 like in *Arabidopsis thaliana*) y *KNAT2*. Los datos aportados por varios investigadores (Hake *et al.*, 1989; Vollbrecht *et al.*, 1991; Chuck *et al.* 1996; Ori *et al.*, 1999; Takada *et al.*, 2001; Jasinki *et al.*, 2005; Yanai *et al.*, 2005) sugieren que los genes KNOX ejercen su efecto regulando la biosíntesis de las citoquininas y parecen otorgarles un papel importante en el mantenimiento/ desarrollo del SAM a través del control transcripcional de los principales genes reguladores del meristemo apical (Hay y Tsiantis, 2010).

Este modelo propuesto para angiospermas no puede extrapolarse al caso de las coníferas debido a la distancia evolutiva que las separa y al método usado para inducir organogénesis, a saber: indirecta en el caso de *Arabidopsis thaliana*, en la que es necesaria la formación preliminar de callo, y directa en coníferas, dónde no es necesario inducir la formación de callo (Gordon *et al.* 2009; Sablowski 2009). Pero gracias a estudios recientes, se han podido caracterizar genes implicados en la respuesta a las Cks en *Pinus* spp.. Se han descrito dos *RR-A*, *PipsRR1* y *PipiRR1* (Cortizo *et al.*, 2010a; Álvarez *et al.* 2012a), que son inducidos por Cks y muestran una estructura y comportamiento similar al descrito en angiospermas, sugiriendo un alto grado de conservación.

1.2 Planteamiento y objetivos

Como se ha comentado anteriormente, es necesario validar el modelo de transducción de señal de citoquininas en coníferas. Estudios recientes apuntan que la N⁶-benciladenina (BA) es la hormona más idónea para inducir la formación de meristemas en coníferas en un sistema de cultivo in vitro (López *et al.*, 1996; Valdés *et al.*, 2001; Moncaleán *et al.*, 2005; Alonso *et al.*, 2007). De este modo, se pretende inducir la formación de meristemas adventicios en cotiledones de *P. pinea* L. bajo la acción de diferentes concentraciones de BA (0µM, 2,2µM, 4,4µM, 8,8µM, 22µM, 44µM y 88µM). Se recogerán muestras a varios tiempos (2, 4, 8 y 16 días) de las diferentes concentraciones para analizar la expresión transitoria de los genes implicados en la transducción de la señal de Cks. Los genes estudiados en el presente trabajo son *WUS/WOX5*, perteneciente a la familia de genes *WOX* y *KN1*, *KN2*, *KN3* y *KN4*, pertenecientes a la familia de genes *KNOX* para lo cual se realizará una PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Este trabajo trata de esclarecer las bases moleculares que actúan en la formación del meristemo bajo la inducción de citoquininas, así como caracterizar los genes implicados en su desarrollo.

2 MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

2.1.1 Elección y Procedencia

El material vegetal de partida con el que se ha trabajado son semillas de *Pinus pinea* L. procedentes de la Meseta Norte (región de procedencia ES01). El año de maduración es 2011/2012. Las semillas fueron suministradas por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.

2.1.2 Asepsia

El material de trabajo fue sometido a un proceso de esterilización superficial según el protocolo de Alonso *et al.* 2006 previo a la escisión de los cotiledones. Cabe destacar que el protocolo de esterilización se realizó en todo momento bajo condiciones totales de asepsia, con el uso de una campana de flujo laminar, material estéril y guantes. Para ello, una vez desprovistos de la testa, los gametófitos se sumergieron en una solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 7,5%, preparada a partir de una solución comercial al 33%, y se mantuvieron en agitación durante 45 minutos (Figura 3). Posteriormente se realizaron 3 lavados consecutivos en agua destilada estéril de 5, 10 y 15 minutos cada uno. Los gametófitos lavados se colocaron sobre discos de papel de filtro en placas petri (unos 50 gametófitos por placa) y se dejaron embebidos en agua durante 48 h a 4°C y en oscuridad hasta que fueron requeridos para la extracción de los embriones.

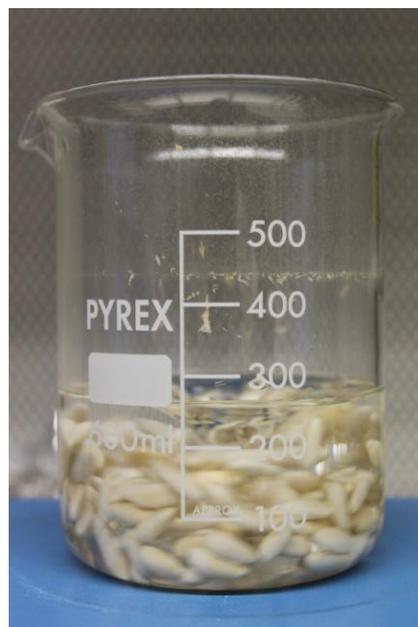


Figura 3: Megagametófitos desprovistos de la testa e inmersos en peróxido de hidrógeno al 7,5%.

2.1.3 Escisión de cotiledones

Los gametófitos embebidos fueron abiertos por la mitad mediante un corte longitudinal lo suficientemente superficial como para no dañar el embrión. Una vez abierto por la mitad el megagametófito, se extrajeron los embriones conteniendo cada uno de 9 a 12 cotiledones unidos al micrópilo. Éstos se escindieron del micrópilo de tal modo que cada cotiledón quedó separado del resto. Debido a la rápida deshidratación que experimentan los cotiledones, es necesario que sean puestos en contacto con el medio inmediatamente. De esta forma, cada cotiledón se introdujo en potitos de 150 ml con tapa magenta y con medio de cultivo suplementado con BA o sin ella (control), hasta un total de 10 cotiledones por potito. Se tuvo especial cuidado a la hora de repartir los cotiledones pertenecientes al mismo embrión en diferentes potitos para discriminar de esta forma el efecto que el genotipo puede causar en el estudio

estadístico posterior. Los cotiledones se colocaron horizontalmente y en contacto directo con el medio de cultivo (Figura 4).

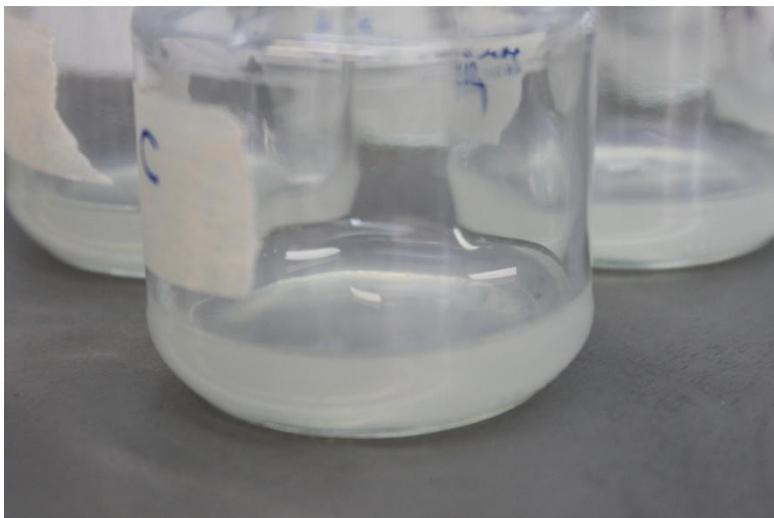


Figura 4: Cuatro cotiledones de *Pinus pinea* dispuestos sobre el medio de cultivo $\frac{1}{2}$ LP inmediatamente después de su escisión del embrión.

2.2 Condiciones y Medio de cultivo

Los cotiledones se cultivaron en medio de inducción Le Poivre (1/2 LP) modificado por Aitken-Christie et al. (1988), 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de agar y suplementado con distintas concentraciones de la hormona BA (2,2 μ M; 4,4 μ M; 8,8 μ M; 22 μ M; 44 μ M; 88 μ M). El pH se ajustó a 5,8 y el medio se autoclavó una vez dispensado en los potitos a 121°C durante 20 minutos. También se cultivaron cotiledones en el mismo medio pero sin adición de BA como control (0 μ M). Para todo ello se confeccionó un total de 112 potitos de 150 ml cubiertos con tapas tipo magenta® y con 20 ml de medio de cultivo con o sin BA.

Para determinar el periodo mínimo de inducción, se preparó el mismo medio de expresión $\frac{1}{2}$ LP con las mismas cantidades de sacarosa y agar pero esta vez suplementado con 5 g/L de carbón activado y sin BA (1/2 LPC). El pH se ajustó de nuevo a 5,8 y se autoclavó del mismo modo que se describió anteriormente. La fase de expresión se realizó para comprobar y observar el proceso organogénico inducido una vez tomadas las muestras de cotiledones necesarias para la extracción de ARN.

Los cultivos se mantuvieron en una cámara de cultivo a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 16 horas y un flujo de fotones de $20 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, provista de tubos fluorescentes de luz blanca fría (TLD 58 W/33, Phillips, France) (Figura 5). Los cotiledones se recolectaron a los 2, 4, 8 y 16 días de cultivo, pesados en un tubo eppendorf de 2 ml hasta un total aproximado de 100 mg/muestra, congelados en N_2 líquido y almacenados a -80°C . El resto de cotiledones correspondientes a cada tiempo de toma de muestras se subcultivaron a medio fresco $\frac{1}{2}$ LP suplementado con carbón activo y sin BA ($\frac{1}{2}$ LPC).

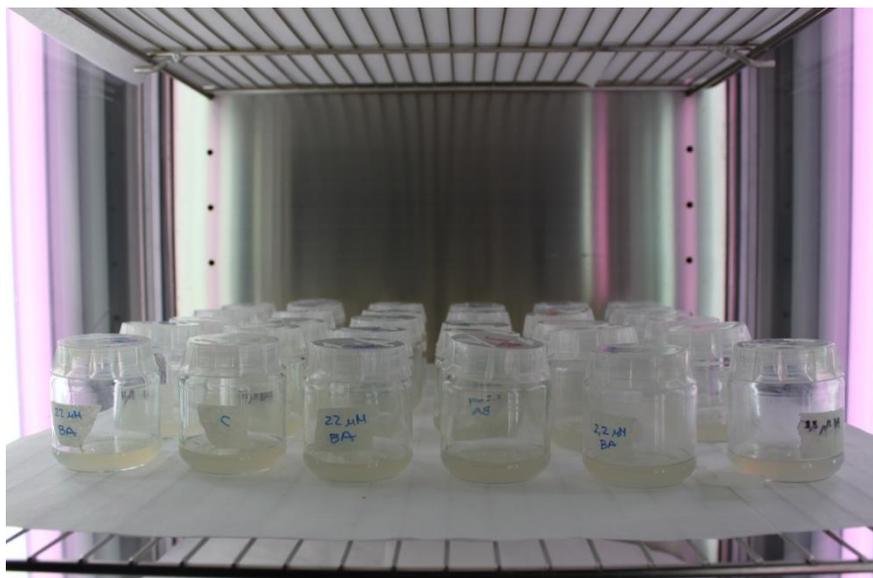


Figura 5: Disposición de los medios de cultivo en cámara de cultivo a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 16 horas y un flujo de fotones de $20 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.3 Extracción de ARN y Síntesis de cDNA

Se extrajo el ARN total de los cotiledones tratados con BA y los cotiledones control según el protocolo adaptado de Chang *et al.* (1993). Para ello se usó el kit Nucleospin RNA Plant (Macherey-Nagel). Posteriormente, la concentración de ARN de las muestras se determinó por espectrofotometría UV/Vis usando Picodrop Microliter (Picodrop Limited, United Kingdom) y su integridad se verificó mediante electroforesis en gel desnaturalizante de agarosa al 0,7%.

El ARN de las muestras obtenidas tras 8 y 16 días de cultivo fue extraído siguiendo una modificación del protocolo propuesto por Chang *et al.* (1993). En este protocolo, la lisis celular se consiguió al añadir el tampón de extracción a 65°C a la muestra, realizar dos extracciones con cloroformo:isoamil alcohol (24:1) y una con LiCl 10M. Después se continuó con las instrucciones del kit NucleoSpin® RNA Plant. Una vez extraído el ARN, las muestras se mantuvieron a -80°C hasta la realización de la síntesis del DNA complementario.

Para la retrotranscripción de ARN a cDNA se usó el kit High Capacity DNA Reverse Transcription (Applied Biosystems Inc.). Para ello, se partió de $1 \mu\text{g}$ de cada muestra de ARN y se actuó según el protocolo hasta que las muestras fueron procesadas en el termociclador según el siguiente programa:

- 1º Ciclo: 25°C , 10 minutos.
- 2º Ciclo: 37°C , 120 minutos.
- 3º Ciclo: 85°C , 5 minutos.
- 4º Ciclo: 4°C , ∞ .

Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización en qRT-PCR.

2.4 PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

La PCR cuantitativa en tiempo real permite determinar la variación en la abundancia relativa de los transcritos expresados diferencialmente entre varios tratamientos. El presente trabajo trata de estudiar la expresión diferencial de 5 genes durante la caulogénesis adventicia de *Pinus pinea* inducida por BA:

- Gen de la familia WOX: *WUS/WOX5*
- Genes de la familia KNOX: *KN1*, *KN2*, *KN3* y *KN4*.

Como genes control de la qRT-PCR se utilizaron dos genes previamente aislados en laboratorio:

- *ARR1* (Cortizo et al., 2010; Álvarez et al., 2012) y
- *CLV1L* (Álvarez et al., 2013).

Para medir la expresión génica a través de una qRT-PCR, es necesario realizar una normalización de los datos para que el análisis sea más fiable. Esto se debe a que la cuantificación realizada por la qRT-PCR es relativa, ya que se compara entre diferentes muestras la cantidad relativa o relación del mRNA de un gen específico respecto a la cantidad de mRNA de un gen constitutivo (endógeno). Para ello, se deben escoger dos genes endógenos cuya expresión no varíe en las condiciones del experimento, lo que permitirá conocer la cantidad inicial de molde de ADN para, a partir de ella, normalizar la expresión de los genes de interés.

Como genes de referencia endógenos se usaron las secuencias Pp4C3 (Accession EC611869) y Pp5F10 (Accession EC428628), ya que se conoce que su expresión no varía entre distintas condiciones probadas en el presente experimento (Cortizo et al., 2010). Además, al llevar a cabo la qRT-PCR, se utilizaron también las muestras del ARN extraído como control de retrotranscripción negativo.

Para la PCR se utilizaron cebadores específicos para los genes a estudiar que flanquean una secuencia de unos 80-130 pares de bases cada uno. La secuencia de los cebadores, su tamaño y el tamaño del amplicón se detallan en la tabla 1.

El diseño de los primers específicos para los genes de estudio se realizó mediante el programa informático Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000). Para ello se tuvo en cuenta los siguientes parámetros:

- Tamaño del amplicón entre 60 y 150 pb.
- Longitud de los primers de 18 a 25 bases.
- Contenido en GC entre el 40 y el 60%.
- Temperatura de anillamiento (T_m): 60°C.

| Gen | Nombre primer | Longitud | Secuencia | Tm (°C) | % GC | Tamaño amplicón |
|-----------------|---------------|----------|-----------------------------------|---------|-------|-----------------|
| WUS/WOX5 | RealT-WUS-F | 21 | CGC CCC TGA TAA CAG CTC GGC | 62,90 | 66,7 | 89 |
| | RealT-WUS-R | 21 | GTT GGC TCA ATC GTC CCC GCA | 62,6 | 61,9 | |
| KN1 | KN-F | 20 | CGA ACA CCA AGA CCC ACA AC | 56,41 | 55 | 91 |
| | KN1-5'RO | 21 | AAG TGC AAG GGT GTC GAA ATT | 55,26 | 42,86 | |
| KN2 | KN2-FI | 23 | GCA CAA TGA CGA CGA GTA TGC CT | 59,45 | 52,17 | 122 |
| | KN2-5'R-2 | 21 | CCC GTG CTG CCG TTT TAG CTT | 60,83 | 57,14 | |
| KN3 | KN3-RealT-F | 22 | CTG AGC AGG CCG TCA TCT CT | 59,16 | 60 | 106 |
| | KN3-RealT-R | 21 | CTC CCC TCT TCT TTC CTG CGG | 59,81 | 61,90 | |
| KN4 | KN4-FI | 20 | CGC AGG TCA GGT TGA AGG TC | 58,27 | 60 | 116 |
| | KN4-5'I | 23 | GTT CTT GTG GTG GGA AAT GAC CA | 57,63 | 47,82 | |
| ARR1 | ARR-F | 20 | CAG AAG GCG CTC AAG AGT TT | | | 101 |
| | ARR-R | 20 | TTG TTG GTC CCT GGA TCT TC | | | |
| CLV1L | CLV1-F | 20 | ATG GCC AAA TTC CTG TTC AA | | | 100 |
| | CLV1-R | 20 | TCC AAT GCC AGA GGG AAT AG | | | |
| Pp4C3 | Pp4C3L | 20 | TTC TCC CAG TTC TCC CAA TG | | | 117 |
| | Pp4C3R | 20 | ATT GCA ACC GGA AAC AGA AC | | | |
| Pp5F10 | Pp5F10L | 20 | CCC TGT TAG ACG | | | 120 |

| | | | | | | |
|--|---------|----|-------------------------------|--|--|--|
| | | | AAG GGT CA | | | |
| | Pp5F10R | 20 | CTG GCC GAA AGC CAT AAA TA | | | |

Tabla 1: Primers utilizados en la qRT-PCR. En color rojo se muestran los genes de referencia endógenos y en color verde los genes utilizados como control del experimento.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en placas de qRT-PCR de 96 pocillos (MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate + Optical Adhesive Films, Applied Biosystem) que posteriormente fueron enviadas a la Unidad de Secuenciación de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo donde cuentan con un aparato ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA) para la cuantificación de la expresión génica. Se utilizó un programa que incluye un primer paso de 95°C durante 20 segundos seguidos de 45 ciclos (95°C durante 1 segundo y 60°C durante 30 segundos), realizando finalmente una curva de disociación para descartar la presencia de productos inespecíficos (95°C durante 15 segundos, 60°C durante 15 segundos y 95°C durante 15 segundos).

Para la realización de las placas se procedió del siguiente modo: cada placa de 96 pocillos corresponde a un gen por lo que se realizó un total de 9 placas (*CLV1L*, *ARR*, *Pp4C3*, *Pp5F10*, *WUS*, *KN1*, *KN2*, *KN3* y *KN4*). En cada pocillo se añadió 2 µl de cDNA diluido en una proporción 1:10 junto con 8 µl de Master Mix conteniendo los primers correspondientes de cada gen y el Fast SYBR Master Mix 2X (Applied Biosystem). Se realizaron 3 réplicas experimentales de cada uno de los tratamientos efectuados (tiempo y concentración de hormona) con un total de 28 muestras. Los pocillos sobrantes se utilizaron para el tiempo 0, un control negativo sin muestra y otro control de retrotranscripción negativa en el que la muestra es ARN (ver Tabla 2).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|--------------|---|---|--------------|---|---|--------------|---|---|---------------|----|----|
| A | NTC | | | t=0 | | | RT- | | | | | |
| B | 2 d - 0 µM | | | 4 d - 0 µM | | | 8 d - 0 µM | | | 16 d - 0 µM | | |
| C | 2 d - 2,2 µM | | | 4 d - 2,2 µM | | | 8 d - 2,2 µM | | | 16 d - 2,2 µM | | |
| D | 2 d - 4,4 µM | | | 4 d - 4,4 µM | | | 8 d - 4,4 µM | | | 16 d - 4,4 µM | | |
| E | 2 d - 8,8 µM | | | 4 d - 8,8 µM | | | 8 d - 8,8 µM | | | 16 d - 8,8 µM | | |
| F | 2 d - 22 µM | | | 4 d - 22 µM | | | 8 d - 22 µM | | | 16 d - 22 µM | | |
| G | 2 d - 44 µM | | | 4 d - 44 µM | | | 8 d - 44 µM | | | 16 d - 44 µM | | |
| H | 2 d - 88 µM | | | 4 d - 88 µM | | | 8 d - 88 µM | | | 16 d - 88 µM | | |

Tabla 2: Diseño de las placas utilizadas en la qRT-PCR para cada gen estudiado.

NTC: No Template Control (Master Mix sin muestra)

RT-: Retrotranscripción negativa (muestra = ARN)

El análisis de los resultados se realizó con el programa informático LinRegPCR, el cual proporciona una estimación de la cantidad inicial del transcrito analizado según el valor de Ct ("threshold cycle") y la eficiencia de la PCR. La abundancia relativa de cada transcrito se calculó como la media de las tres réplicas experimentales comparada con la media de los genes de referencia para el mismo tratamiento. A continuación, el valor normalizado de cada tiempo en presencia de BA se dividió entre el valor del control sin hormona correspondiente, calculando de esta forma el número de veces que el gen se sobreexpresa por acción de cada concentración de la hormona.

2.5 Análisis estadístico

La respuesta caulogénica de los cotiledones en el medio de inducción fue analizada y cuantificada tras dos subcultivos (60 días) en 1/2 LPC. Se estimó la supervivencia, el porcentaje de cotiledones que forman yemas y el número de yemas por cotiledón. Se aplicó un diseño experimental completamente aleatorizado, considerando el recipiente (potito) como unidad experimental de observación y utilizando 10 cotiledones por tratamiento (Compton, 1994).

Los resultados se muestran mediante gráficas en las que se indica el porcentaje de respuesta caulogénica observado y el número medio de yemas por cotiledón.

Los análisis estadísticos se realizaron con las aplicaciones informáticas XLSTAT y EXCEL. La variable cualitativa porcentaje de respuesta caulogénica se analizó mediante un test no paramétrico de Kruskal-Wallis o realizando una ANOVA de dos factores (concentración de citoquinina y periodo de exposición a ésta), en cuyo caso se realizó una transformación angular arcoseno de la variable. La variable cuantitativa número de yemas por cotiledón se contrastó usando un ANOVA de dos factores (concentración de citoquinina y periodo de exposición a ésta). La homogeneidad de varianzas se verificó aplicando el test de Levène y su normalidad con el test de Lilliefors.

3 RESULTADOS

3.1 Inducción de meristemas

La respuesta caulogénica que experimentaron los cotiledones en el medio de inducción $\frac{1}{2}$ LP fue analizada para los distintos tratamientos con BA tras dos subcultivos (60 días) en medio con carbón activo 1/2LPC. Los explantos cultivados mostraron la formación de primordios nodulares en toda la superficie que se mantuvo en contacto con el medio (Figuras 6 y 7).

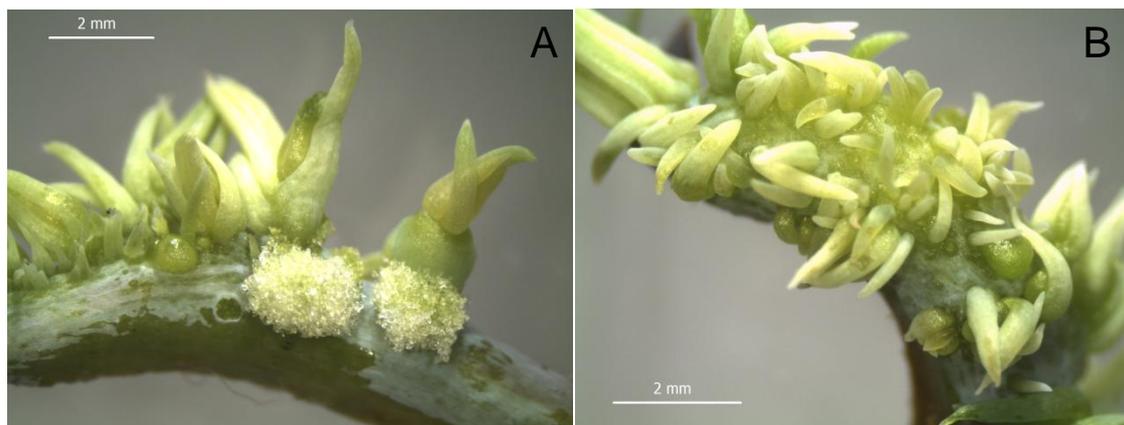


Figura 6: Detalle de las yemas adventicias formadas en dos cotiledones cultivados en medio de inducción $\frac{1}{2}$ LP con un tratamiento de 8 días $22 \mu\text{M}$ (A) y de 8 días $88 \mu\text{M}$ (B) y posteriormente subcultivados en medio de elongación con carbón activo $\frac{1}{2}$ LPC tras 60 días.

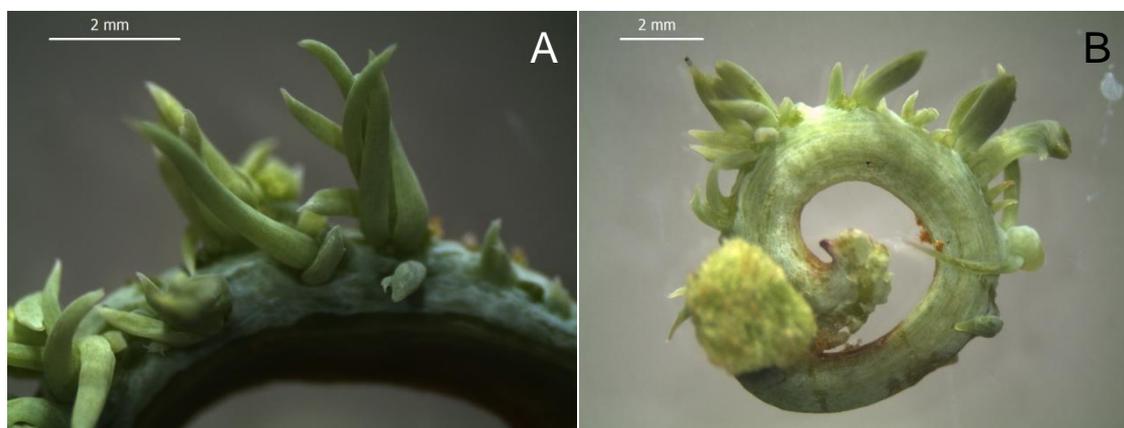


Figura 7: Fotografía de uno de los cotiledones cultivado durante 60 días en medio $\frac{1}{2}$ LPC tras un tratamiento con BA $44 \mu\text{M}$ durante 4 días (A) y $4,4 \mu\text{M}$ (B) durante 16 días. Obsérvese el desarrollo de yemas sobre la superficie cotiledonar.

La respuesta caulogénica (Figura 8), es decir el porcentaje de cotiledones que forman yemas, en el medio de cultivo $\frac{1}{2}$ LP suplementado con diferentes concentraciones de la hormona benciladenina (BA) se muestra en la Figura 5. Después de la inducción y 2 subcultivos en un medio de cultivo de expresión (2x30 d en 1/2LPC), se observa que, tanto la concentración de BA como el periodo de inducción afectan significativamente al porcentaje de cotiledones que forman yemas. Los cotiledones no respondieron a la formación de yemas hasta los 4 días de inducción y con un mínimo de $2,2 \mu\text{M}$, es decir, no se observa formación de yemas sin aplicación de BA. La concentración

mínima de hormona a la que responden los cotiledones es 2,2 μM , la concentración más baja suministrada al medio, aunque en este caso, no se observaron yemas hasta los 16 días de cultivo. Por otro lado, el periodo mínimo en el que los explantos estuvieron en contacto con BA para formar yemas es de 4 días con concentraciones de 22, 44 y 88 μM , 8 días con 8,8 μM y 16 días con 2,2 μM . La respuesta más alta (90%) se obtuvo cuando los cotiledones se cultivaron durante 16 días en presencia de BA 44 μM y 88 μM .

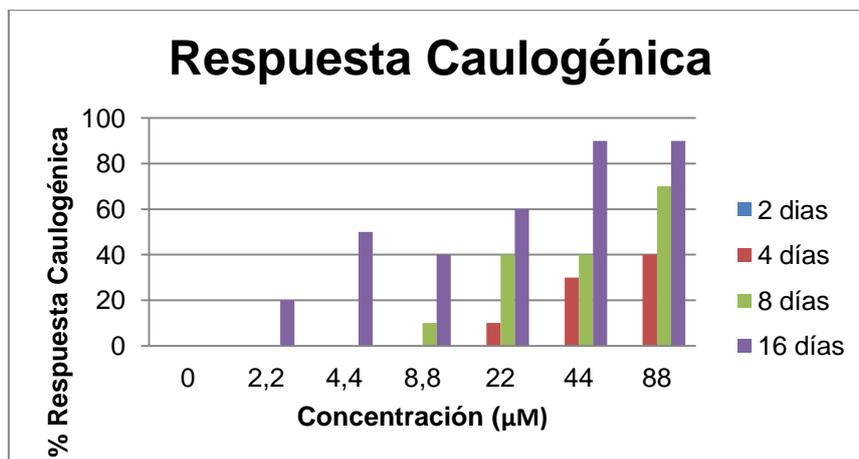


Figura 8: Porcentaje de respuesta caulogénica en cotiledones de *Pinus pinea* cultivados en $\frac{1}{2}$ LP con diferentes concentraciones de benciladenina (BA) durante 2, 4, 8 y 16 días y transferidos posteriormente a medio $\frac{1}{2}$ LP sin hormona. Los datos fueron recogidos después de 60 días de cultivo en $\frac{1}{2}$ LPC.

Los resultados referentes al número de yemas formadas por cotiledón (Figura 9), muestran que éstas comienzan a apreciarse a partir de los 4 días de inducción con una concentración de BA de 22 μM . Sin embargo, el mayor número de yemas por cotiledón ($4,5 \pm \text{E.E}$) se obtuvo en los cotiledones cultivados 16 días en presencia de 88 μM .

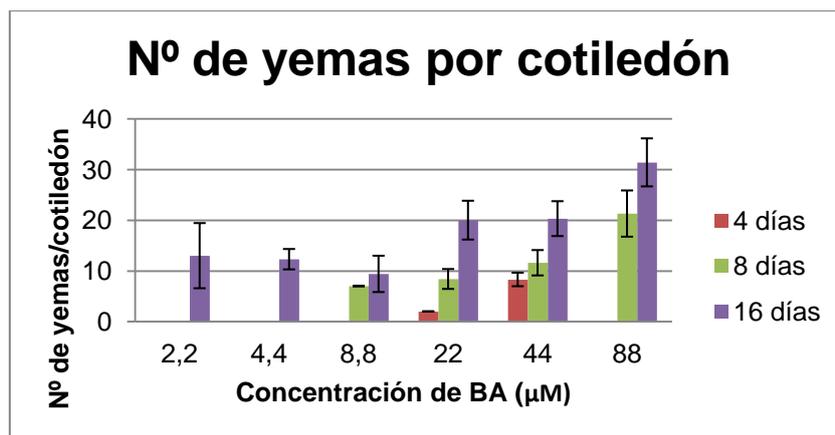


Figura 9: Número medio de yemas por cotiledón ($\pm \text{ES}$) en cotiledones de *Pinus pinea* cultivados en medio $\frac{1}{2}$ LP con diferentes concentraciones de benciladenina (BA) durante 2, 4, 8 y 16 días y transferidos posteriormente a medio $\frac{1}{2}$ LP sin hormona. Los datos se tomaron después de 60 días de cultivo.

3.2 Expresión diferencial de los genes objeto de estudio durante la inducción caulogénica.

Las dinámicas de expresión de los genes, *WUS*, *KN1*, *KN2*, *KN3*, *KN4*, *ARR1* y *CLV1* durante la inducción caulogénica en cotiledones de *P. pinea* se muestran en las figuras 10, 11 y 12 respectivamente.

La expresión de los genes *ARR1* y *CLV1* se muestran en las figuras 10.A y 10.B respectivamente. El gen *ARR1* muestra un aumento de su expresión a partir del cuarto día de cultivo en todos los tratamientos. Este aumento se prolonga hasta el octavo día creándose un pico de expresión para volver a descender el día 16 de cultivo. Del mismo modo, el gen *CLV1L* experimenta un aumento de su expresión a partir del cuarto día de cultivo y alcanza su máxima expresión al octavo día para todos los tratamientos estudiados, sin embargo su expresión vuelve a descender el último día de inducción. Según estos datos, no se encuentra ninguna relación entre la expresión de estos genes y la concentración de hormona aplicada en el medio de cultivo.

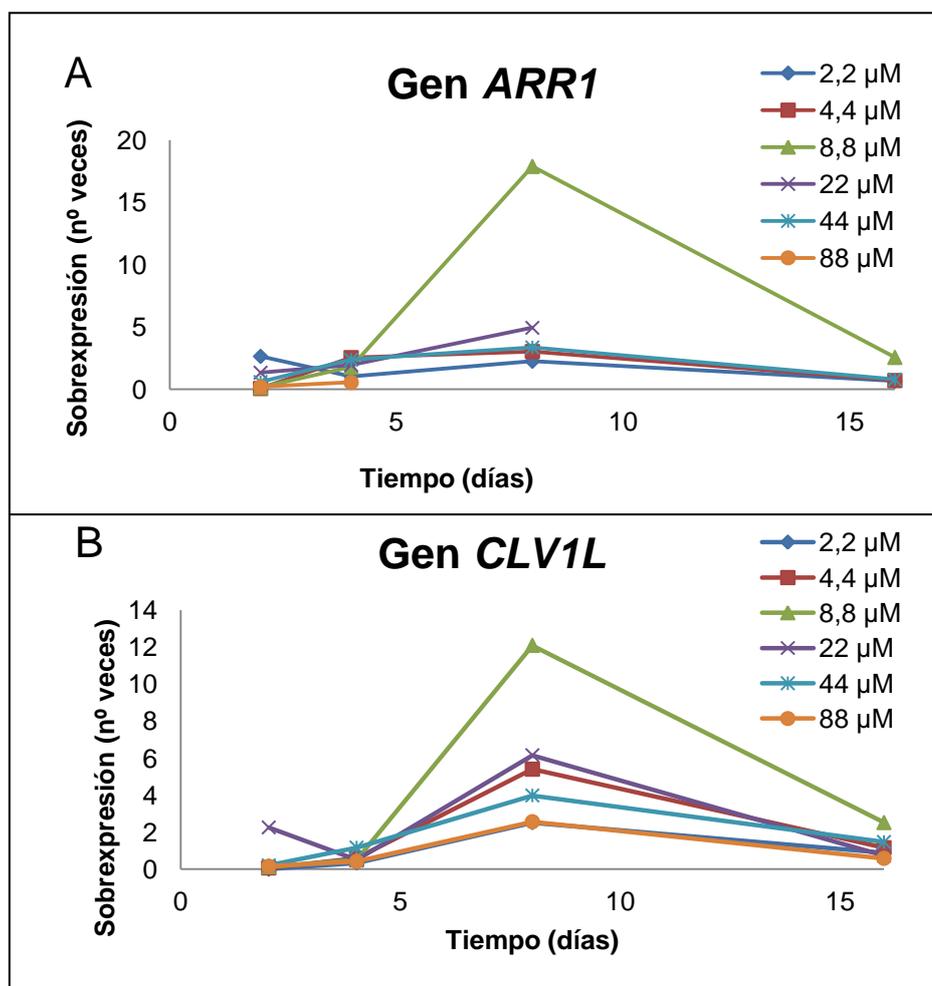


Figura 10: Número de veces que se expresan los genes *ARR1* (A) y *CLV1L* (B) en cotiledones de *P. pinea* con 2,2 μM, 4,4 μM, 8,8 μM, 22 μM, 44 μM y 88 μM comparados con el control para cada tiempo probado durante la inducción caulogénica determinada mediante qRT-PCR.

Los datos de expresión obtenidos en cuanto al gen *WUS* en la Figura 11 muestran un aumento entre los 4 y los 8 días de cultivo. A partir de este tiempo de inducción la expresión del gen decrece, excepto en el dato de concentración de 88 μM a partir de 8 días, el cual se dispara aumentando la expresión 25 veces.

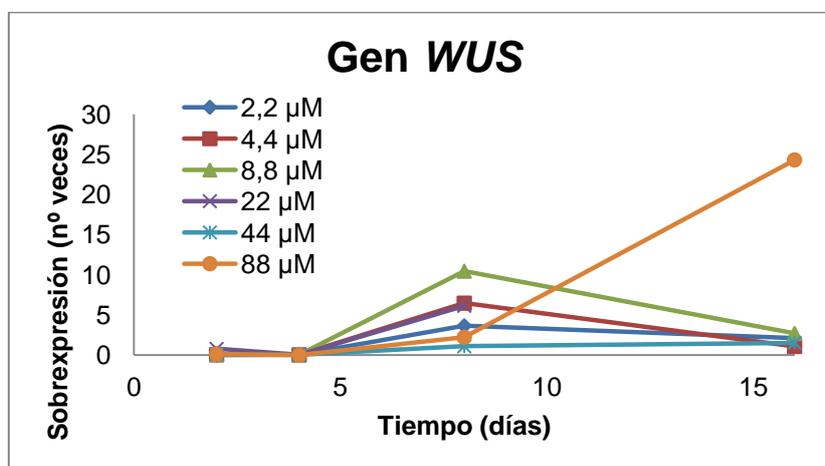
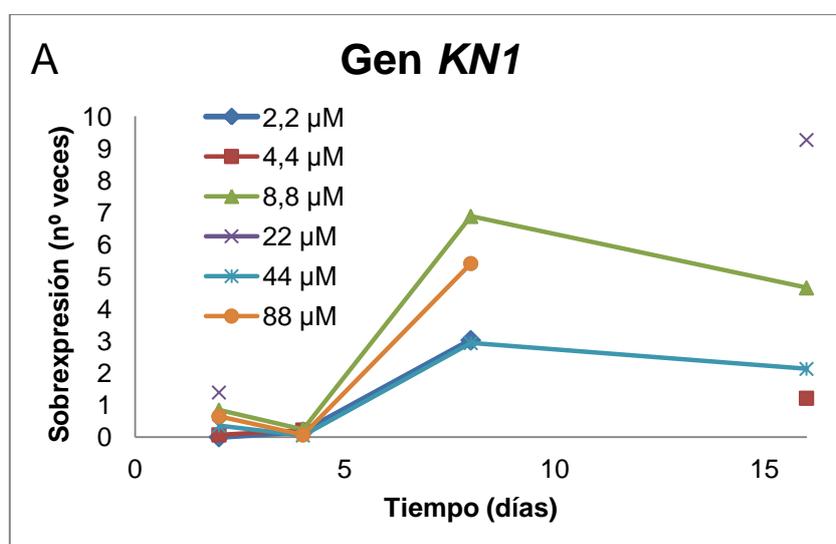


Figura 11: Sobreexpresión del gen *WUS* en los cotiledones sometidos a diferentes tratamientos con benziladenina durante diferentes tiempos. La expresión se determinó mediante RT-PCR cuantitativa y se normalizó con respecto a la expresión de un gen de referencia.

El resultado de la PCR cuantitativa a tiempo de real de los genes *KN1*, *KN2*, *KN3*, *KN4* se muestra en las figuras 12.A, 12.B, 12.C y 12.D, respectivamente. En ninguna de las condiciones analizadas se observa una sobreexpresión de estos genes con respecto al control durante los días 2 y 4. Tras tiempos más largos de cultivo con BA (8 y 16 días) se observan tendencias dispares entre las condiciones estudiadas. En algunos casos, se alcanza un máximo de sobreexpresión a los 8 días mientras que otras lo alcanzan a los 16. Estas diferencias no parecen estar relacionadas con la concentración de BA con la que los cotiledones fueron cultivados, por lo que estas desviaciones pueden deberse a errores experimentales.



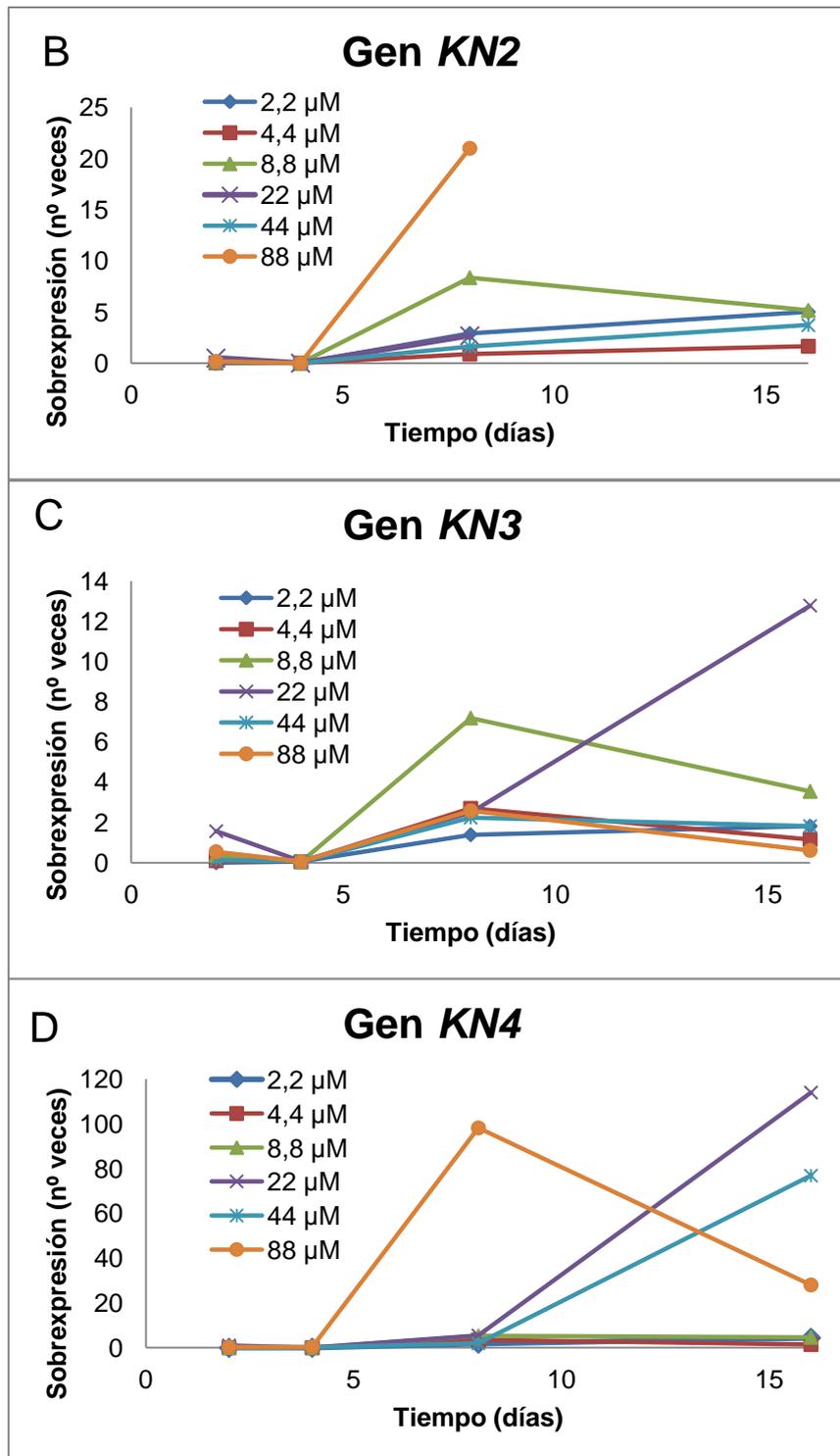


Figura 12: (A) Expresión del gen *KN1*, (B) *KN2*, (C) *KN3* y (D) *KN4* en cotiledones tratados con diferentes concentraciones de BA a distintos tiempos en *P. pinea* durante la inducción caulogénica, determinada mediante qRT-PCR. Los cotiledones fueron cultivados 2, 4, 8 y 16 días con BA 0, 2,2; 4,4; 8,8; 22, 44 y 88 μM.

Cuando se analiza la expresión de los genes en un mismo periodo de tiempo tras los diferentes tratamientos con BA en ninguno de los genes estudiados se observa una relación entre la concentración de benciladenina ensayada y la expresión génica tras tiempos de inducción de 8 o 16 días, solamente se obtiene una relación en aquellos

cotiledones tratados durante 2 días. Estos resultados se muestran en las figuras 13, 14 y 15.

Respecto al gen *ARR1* se observa un aumento de la expresión cuando la concentración es de 22 μM según los datos obtenidos. En concentraciones superiores desciende la expresión del gen como se muestra en la Figura 13.

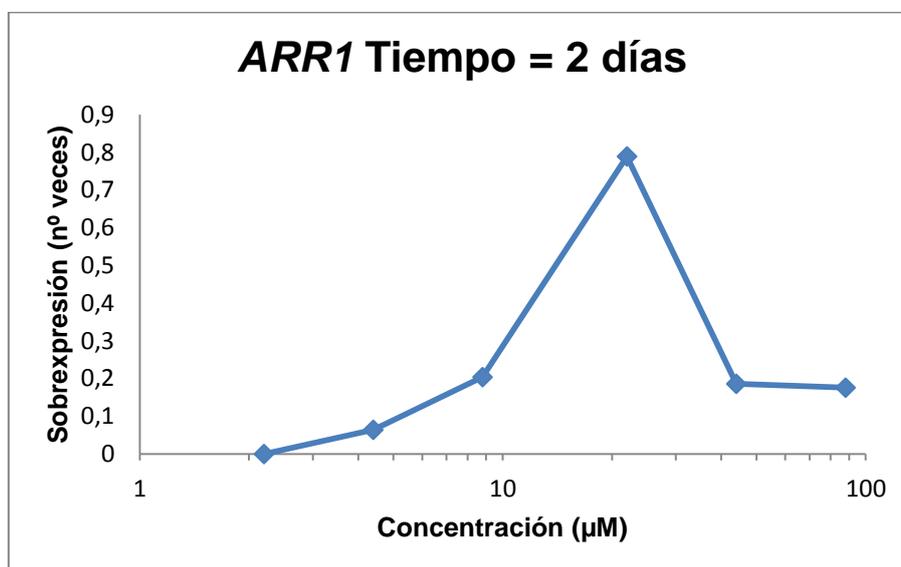


Figura 13: Expresión del gen *ARR1* en período de inducción caulogénica de 2 días con diferentes tratamientos de BA.

En la Figura 14 se representa la expresión de los genes *CLV1L* y *WUS* respectivamente tras los diferentes tratamientos. Los genes *WUS* y *CLV1L* muestran un pico de expresión a los 22 μM , siendo este incremento mayor en el gen *CLV1* que en *WUS*.

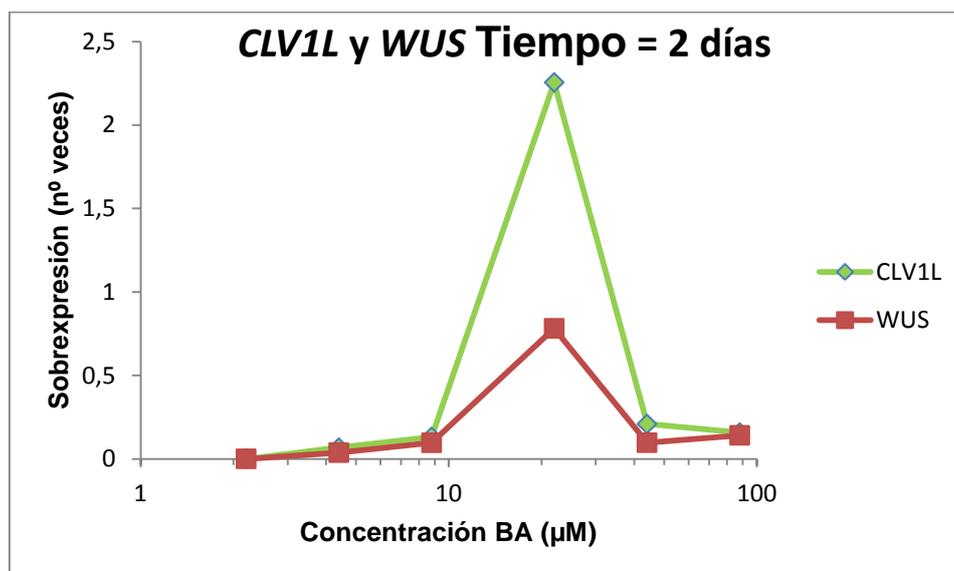


Figura 14: Expresión de los genes *CLV1* y *WUS* en período de inducción caulogénica de 2 días con diferentes tratamientos de BA.

En cuanto a los genes *KN1*, *KN2*, *KN3* y *KN4* se observa un patrón de expresión similar al de los genes estudiados con anterioridad, la expresión aumenta a partir del tratamiento con 22 μM de BA y luego sufre un marcado descenso para volver a aumentar levemente a altas concentraciones (Figura 15).

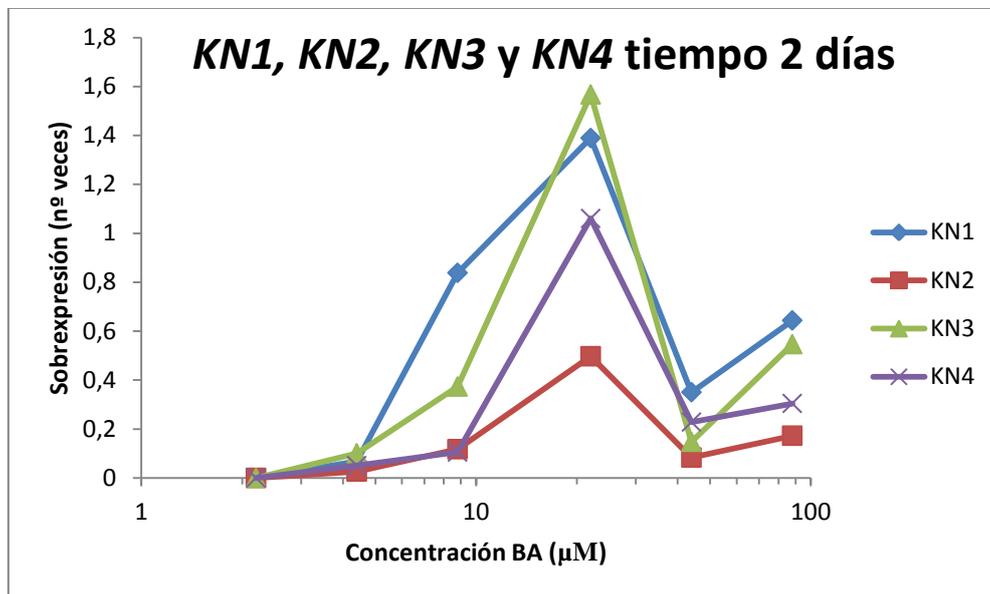


Figura 15: Expresión de los genes *KN1*, *KN2*, *KN3* y *KN4* en período de inducción caulogénica de 2 días con diferentes tratamientos de BA.

4 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se muestran los resultados obtenidos en cuanto a la inducción de yemas adventicias en cotiledones de *P. pinea* bajo diferentes tratamientos con BA. Trabajos anteriores demuestran que la citoquinina más empleada en el cultivo in vitro por su efectividad es la benciladenina (López et al., 1996; González et al., 1998; Valdés et al., 2001). Además es la fitohormona más eficiente para inducir yemas adventicias en cotiledones de pino piñonero (Alonso et al., 2006).

En este trabajo se observa que a mayores concentraciones de hormona aplicada (22, 44 y 88 μM), la respuesta caulogénica aumenta y el periodo de inducción es menor (4 días) que cuando se aplican concentraciones menores (Figura 3). En cuanto al número de yemas por cotiledón, éste aumenta también al aplicar mayores concentraciones de BA. Estos resultados están de acuerdo con lo expuesto por Moncaleán et al. (2005) que sostiene que incrementando la concentración de BA en el medio se reduce el periodo de inducción de yemas. Por otra parte, estos resultados aportan información sobre el desarrollo de yemas adventicias durante la organogénesis in vitro. En este proceso, las células deberán, en un primer momento, adquirir la competencia necesaria para responder a las señales organogénicas y, más tarde, adquirir la determinación hacia la formación de yemas (Christianson y Warnick, 1985). Ambos eventos deben ocurrir en un momento dado del cultivo y bajo una concentración idónea de benciladenina. En nuestro caso, el menor periodo de cultivo en el que se observa respuesta caulogénica es a los 4 días con concentraciones mayores de 22 μM , lo que indica que las células han debido adquirir la competencia necesaria para responder a las señales caulogénicas en un periodo anterior. Esto nos lleva a suponer que la adquisición de la competencia debe ocurrir antes del cuarto día de cultivo y la determinación hacia la formación de yemas después de los 4 días de cultivo. Estos resultados apoyan las investigaciones llevadas a cabo por Moncaleán et al. (2009) en las que se producen eventos de división celular y proliferación antes de los 3 días de cultivo en 4,4 μM , incluso antes de las 12 h en presencia de BA 44,4 μM (Candela et al. 2009), hechos característicos de células que se encuentran en la etapa de adquisición de competencia, pero no se observa formación de yemas hasta el cuarto día de cultivo. Candela et al. 2009, demostraron que el tiempo mínimo de inducción se podía reducir hasta las 6h en presencia de BA 44,4 μM y Flinn et al. (1988) sugieren que los cotiledones de pino sería competentes a las Cks “per se”. Los eventos de determinación hacia la formación de yemas (“shoot commitment”) tendrían lugar entre el cuarto y octavo día de cultivo y a partir de los 8-12 días los meristemos probablemente ya estarían completamente determinados a formar yemas independientemente de la aplicación exógena de fitohormonas. Es por ello que en nuestro caso, los cotiledones que estuvieron expuestos a hormona hasta el final del cultivo muestran una respuesta caulogénica del 90% (Figura 3).

Una vez estudiadas las diferentes etapas que ocurren durante la organogénesis adventicia inducida por Cks, es necesario esclarecer los mecanismos genéticos que ocurren durante la inducción organogénica. Por ello, nos hemos propuesto analizar el comportamiento de 5 genes (*WUS*, *KN1*, *KN2*, *KN3* y *KN4*) que pueden jugar un importante papel en la organogénesis adventicia por la similitud encontrada con sus homólogos en angiospermas. Por otro lado también se ha estudiado la expresión de

los genes *CLV1L* y *ARR1*, ya identificados anteriormente (Cortizo et al., 2010; Álvarez et al., 2012) para estudiar su implicación y las posibles interacciones con los demás genes, así como para validar el presente estudio.

Según nuestros resultados, el gen *ARR1* muestra un aumento de su expresión al cuarto día de cultivo en presencia de BA y experimenta un pico el día 8 para volver a niveles basales al final del cultivo (día 16). Estos resultados no están de acuerdo con estudios realizados anteriormente por Cortizo et al. (2010) en los que la expresión del gen *ARR1* extraído de cotiledones de *P. pinea* aumenta durante los dos primeros días, alcanzando un pico de hasta 4 veces que se mantiene hasta el final del cultivo en un medio con CKs (6 días). Por otro lado, este estudio demuestra que *ARR1* comparte una gran similitud estructural con los genes *ARR5* y *ARR15* de arábidoopsis comparándolos con un estudio de Che et al. (2005), en el que, además, se demuestra que los niveles de expresión del gen *ARR5* aumentan durante la formación de brotes adventicios en explantos de raíz. Ambos genes formarían parte de este evento a través de la regulación negativa de la expresión de *WUSCHEL*. Según estos autores, estos datos sugieren que el gen *ARR5* determinaría las zonas en las que se iniciaría el desarrollo de los meristemos en el explanto. Las similitudes encontradas tanto en la dinámica de expresión como a nivel estructural entre el gen *ARR1* de *P. pinea* y el gen *ARR5* de arábidoopsis hacen pensar que se trata de dos genes homólogos que realizan su función en la formación de brotes meristemáticos durante una etapa temprana del desarrollo caulogénico.

A partir de los resultados obtenidos no se ha podido determinar una relación entre la concentración de BA en el medio y la dinámica de expresión del gen *ARR1* pero sí se ha podido establecer un patrón común entre los cotiledones que fueron inducidos en medio con BA durante 2 días (Figura 13) observándose una mayor expresión puntual cuando la inducción tuvo lugar en un medio con 22 μM . A concentraciones mayores de 22 μM , la expresión volvió a niveles basales. Se sabe que la concentración de BA en el interior de cotiledones cultivados en 4,4 μM es de 25,3 μM y que aumenta hasta 57,4 μM cuando son cultivados en un medio con 10 veces más BA (Cuesta et al., 2009). De la misma manera, se observa también un incremento en el número de yemas por cotiledón y en la respuesta caulogénica. Sin embargo, la expresión de *ARR1* apenas se ve afectada cuando se dobla la concentración de BA en el interior de los cotiledones (Cortizo et al., 2010). Estos resultados concuerdan con lo obtenido en el presente trabajo.

La expresión del gen *CLV1L* es muy similar a la del gen *ARR1* según indican nuestros resultados, mostrando un aumento a partir del 4^o día de cultivo. Estos resultados parecen indicar que el gen *CLV1L* se expresa unos días después de la inducción con citoquininas, lo que coincide con los resultados descritos para el mismo proceso en *A. thaliana* (Cary et al., 2002). Sin embargo, el proceso de inducción de caulogénesis entre las dos especies es muy diferente ya que en *P. pinea* no ocurre tras una fase de formación de callo. Por otro lado, esta dinámica de expresión vuelve a no ser acorde con la obtenida en los estudios realizados por Álvarez et al. (2012) en los que ya había sido caracterizado e identificado el gen *CLV1L* en *P. pinea*. En este caso, el gen ya doblaba su expresión a las 24 h de cultivo en presencia de 4,4 μM de BA, lo que significa que el gen se expresaría antes de las primeras divisiones celulares que tienen

lugar en la formación de nuevos meristemos. De esta manera, *CLV1L* podría estar implicado tanto en la organización del meristemo como en la adquisición de competencia e iniciación en *P. pinea*. En este mismo estudio se estableció la similitud entre el gen *CLV1L* de *P. pinea* y su homólogo en arábidopsis. En cuanto a la relación entre la concentración de BA en el medio y la expresión de *CLV1L*, no se puede afirmar que ésta exista según la Figura 7. Sin embargo, podemos apoyarnos en la expresión de los cotiledones cultivados durante 2 días en medio con BA. Al igual que en el caso del gen *ARR1*, la expresión aumenta de manera puntual con 22 μ M.

La dinámica de expresión de gen *WUS* muestra que éste experimenta un pico de expresión el 8º día de cultivo bajo la inducción de Cks, para volver a los niveles basales al final del cultivo. El hecho de que el gen no manifieste un aumento de su expresión al cuarto día indicaría que *WUS* comenzaría a expresarse entre los días 4 y 8 de inducción. Estudios realizados por Cary et al. (2002) en *A. thaliana* muestran que la expresión de *WUS* comienza a ser importante a partir del 6º día de cultivo en medio de inducción (suplementado con citoquininas), lo que estaría de acuerdo con nuestros resultados. Sin embargo, es preciso tener en cuenta, como ya se ha comentado, que el sistema de inducción de la caulogénesis adventicia en arábidopsis no es el mismo que el realizado en *Pinus* spp, teniendo que inducir la formación de callo como paso previo a la inducción de brotes adventicios. Para ello, es necesario transferir los explantos desde un medio de inducción de callo (CIM) con auxinas a un medio de inducción de brotes (SIM) con Cks el segundo día de cultivo. Esto cambiaría por completo la supuesta relación existente entre expresión génica e inducción de la organogénesis por Cks en nuestro estudio, ya que ambos medios de cultivo usados por Cary et al. difieren en el contenido relativo de Citoquinina/Auxina.

Una vez que las citoquininas entran en el espacio intercelular, se van a producir una serie de eventos en los que están implicados los tres genes descritos anteriormente, *ARR1*, *CLV1L* y *WUS*. Los tres están envueltos en un bucle de retroalimentación negativa que va a mantener un balance entre la población de células madre y la diferenciación hacia órganos en el meristemo central. Es normal que estos genes se expresen durante la inducción pues son los encargados de activar las proteínas y genes implicados en la respuesta a Cks. Así, se observa que a mayores concentraciones de hormona, mayor expresión génica de los tres genes (*ARR1*, *CLV1L* y *WUS*) pero hasta cierto límite (22 μ M) a partir del cual la expresión vuelve a bajar. La explicación más plausible es que a mayor concentración de hormona en el medio, mayor expresión de genes implicados en la adquisición de competencia hasta que el sistema se satura para volver a disminuir los altos niveles de expresión.

Los resultados en la expresión de estos tres genes muestran que ésta es mayor durante los primeros días de cultivo en un medio con Cks. De esta forma, se podría afirmar que estos genes estaría implicados en el proceso organogénico en las etapas de adquisición de competencia y determinación descritas por Christianson y Warnick (1985).

Otra ruta de señalización que regula la actividad meristemática es la llevada a cabo por los genes *KNOX*. Hasta el momento, su función tan sólo ha sido identificada en maíz, arábidopsis y otras angiospermas durante el desarrollo de meristemos pero no en gimnospermas. Los resultados obtenidos en cuanto a la expresión de los cuatro

genes *KN1*, *KN2*, *KN3* y *KN4* estudiados en este trabajo (Figuras 9.A-D), muestran que su expresión aumenta hasta el día 8 de cultivo. Los días 2 y 4 no se observan diferencias en su expresión con respecto al control lo que podría indicar que su influencia se situaría en las etapas de determinación y desarrollo.

5 CONCLUSIONES

1. En la inducción de la organogénesis adventicia en cotiledones de *P. pinea* por citoquininas, la respuesta caulogénica y el número de yemas por cotiledón aumenta con la concentración de benciladenina aplicada en el medio.
2. Todos los genes estudiados muestran un aumento de su expresión durante la inducción caulogénica en presencia de la citoquinina benciladenina en el medio de cultivo por lo que podrían desempeñar un papel importante en la formación de brotes adventicios.
3. Las citoquininas inducen la expresión de los genes *CLV1L* y *ARR1* durante el periodo de adquisición de competencia.
4. Las citoquininas inducen la expresión de los genes *WUS*, *KN1*, *KN2*, *KN3* y *KN4* durante la etapa de determinación hacia la formación de yemas.
5. No se encuentra relación entre la concentración de BA en el medio y la expresión génica cuando los cotiledones son cultivados en medio de inducción con concentraciones superiores a los 22 μ M.
6. Puesto que los datos obtenidos a partir de nuestro estudio no son completamente acordes con la expresión esperada sería conveniente, dada la importancia del estudio, repetir el experimento y realizar nuevas aproximaciones acerca de la ruta de señalización de las citoquininas en el meristemo caulinar de coníferas.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aitken-Christie, J., Singh, A.P. & Davies, H. (1988). Multiplication of meristematic tissue: a new tissue culture system for radiata pine. En: Hanover, I.W. & Keathley, D.E. (Eds) Genetic Manipulation of Woody Plants. New York: Plenum Press, pp. 413–432.
- Alonso, P., Cortizo M., Cantón, F. R., Fernández, B., Rodríguez, A., Centeno M.L., Ordás R.J. (2007). Identification of genes differentially expressed during adventitious shoot induction in *Pinus pinea* cotyledons by subtractive hybridization and quantitative PCR. En *Tree Physiology* 27, pp. 1721–1730.
- Alonso, P., Moncaleán, P., Fernández, B., Rodríguez, A., Centeno, M.L., Ordás, R. J. (2006). An improved micropropagation protocol for stone pine (*Pinus pinea* L.). En *Ann. For. Sci.* 63 (8), pp. 879–885.
- Alvarez, J. M., Bueno, N., Cortizo, M., Ordás, R. J. (2013). Improving plantlet yield in *Pinus pinaster* somatic embryogenesis. En *Scandinavian Journal of Forest Research* 28 (7), pp. 613–620.
- Alvarez, J. M., Cortizo, M., Bueno, N., Rodríguez, A., Ordás, R. J. (2013). CLAVATA1-LIKE, a leucine-rich-repeat protein receptor kinase gene differentially expressed during adventitious caulogenesis in *Pinus pinaster* and *Pinus pinea*. En *Plant Cell Tissue Organ Culture* 112 (3), pp. 331–342.
- Álvarez, J. M., Cortizo, M., Ordás, R. J. (2012). Characterization of a type-A response regulator differentially expressed during adventitious caulogenesis in *Pinus pinaster*. En *Journal of Plant Physiology* 169 (18), pp. 1807–1814.
- Barton, M. K. (2010). Twenty years on: The inner workings of the shoot apical meristem, a developmental dynamo. En *Developmental Biology* 341 (1), pp. 95–113.
- Bartrina, I., Otto, E., Strnad, M., Werner, T., Schmülling, T. (2011). Cytokinin Regulates the Activity of Reproductive Meristems, Flower Organ Size, Ovule Formation, and Thus Seed Yield in *Arabidopsis thaliana*. En *The Plant Cell*, 23: 69–80.
- Bonga, J. M., Klimaszewska, K. K., Aderkas, P. von (2010). Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. En *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 100 (3), pp. 241–254.
- Carneros, E., Celestino, C., Klimaszewska, K., Park, Y.-S., Toribio, M., Bonga, J. M. (2009). Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis. En *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 98 (2), pp. 165–178.
- Carry, A. J., Che P., Howell, S. H. (2002). Developmental events and shoot apical meristem gene expression patterns during shoot development in *Arabidopsis thaliana*. En *The Plant Journal* 32, pp. 867–877.
- Chang, Puryear, Cairney (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. En *Plant Molecular Biology Reporter* 11 (2), pp. 113–116.
- Che, P. (2002). Global and Hormone-Induced Gene Expression Changes during Shoot Development in *Arabidopsis*. En *The Plant Cell Online* 14 (11), pp. 2771–2785.

- Che, P. (2006). Gene Expression Programs during Shoot, Root, and Callus Development in Arabidopsis Tissue Culture. En *Plant Physiology* 141 (2), pp. 620–637.
- Christianson, M. L y Warnick, D. A. (1983). Competence and determination in the process of in vitro shoot organogenesis. En *Developmental Biology* 95 (2), pp. 288–293.
- Christianson, M. L. y Warnick, D. A. (1984). Phenocritical times in the process of *in vitro* shoot organogenesis. En *Developmental Biology* 101 (2), pp. 382–390.
- Christianson, M. L. y Warnick, D. A. (1985). Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis *in vitro*. En *Developmental Biology* 112 (2), pp. 494–497.
- Christianson, M. L. y Warnick, D. A. (1988). Organogenesis *in vitro* as a developmental process. En *Developmental Biology* 23 (3), pp. 515–519.
- Comptom, M. E. (1994). Statistical-Methods suitable for the analysis of plant-tissue culture data. En *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 37 (3), pp. 217-242.
- Cortizo, M., Álvarez, J. M., Rodríguez, A., Fernández, B., Ordás, R. J. (2010). Cloning and characterization of a type-A response regulator differentially expressed during adventitious shoot formation in *Pinus pinea* L. En *Journal of Plant Physiology* 167 (12), pp. 1023–1026.
- Cortizo, M., Diego, N., Moncalean, P., Ordas, R. J. (2009). Micropropagation of adult Stone Pine (*Pinus pinea* L.). En *Trees-Structure and Function* 23 (4), pp. 835–842.
- Cortizo, M. (2008). Micropropagación de *Pinus pinea* L. Factores fisiológicos y moleculares implicados. Tesis doctoral.Universidad de Oviedo, Oviedo.
- Carles, C. C. y Fletcher, J. C. (2003). Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance. En *Trends in Plant Science* 8 (8), pp. 394–401.
- Cuesta, C., Novák, O., Ordás, R. J., Fernández, B., Strnad, M., Doležal, K., Rodríguez, A. (2012). Endogenous cytokinin profiles and their relationships to between-family differences during adventitious caulogenesis in *Pinus pinea* cotyledons. En *Journal of Plant Physiology* 169 (18), pp. 1830–1837.
- Cuesta, C., Rodríguez, A., Centeno, M. L., Ordás, R. J., Fernández, B. (2009). Caulogenic induction in cotyledons of stone pine (*Pinus pinea*): Relationship between organogenic response and benzyladenine trends in selected families. En *Journal of Plant Physiology* 166 (11), pp. 1162–1171.
- Distribution map of Italian stone pine (*Pinus pinea*). Euforgen (2009), www.euforgen.org.
- Duclercq, J., Sangwan-Norreel, B., Catterou, M., Sangwan, R. S. (2011). De novo shoot organogenesis: from art to science. En *Trends in Plant Science* 16 (11), pp. 597–606.
- Ellis, D. D. y Bilderback, D. E. (1989). Temporal competence of embryonic *Pinus ponderosa* cotyledons to form multiple buds in vitro. En *American Journal of Botany* 76 (3), pp. 348–355.

- Fletcher, J.C., Brand, U., Running, M.P., Simon, R., Meyerowitz, E.M. (1999). Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristems. En *Science*. 283:1911-1914.
- Flinn B.S., Webb D.T., Newcomb W. (1988). The role of cell clusters and promeristemoids in determination and competence for caulogenesis by *Pinus strobus* cotyledons *in vitro*. En *Canadian Journal of Botany*, 66 (8):1556-1565.
- Gonzalez, M. V., Rey, M., Tavazza, R., La Malfa, S., Cuzzo, L., Ancora, G. (1998). *In vitro* adventitious shoot formation on cotyledons of *Pinus pinea*. En *Hortoscience* 33 (4), pp. 749–750.
- Gordon, S. P., Chickarmane, V. S., Ohno, C., Meyerowitz, E. M. (2009). Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem. En *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (38), pp. 16529–16534.
- Hake, S., Walko, R., Lane, B., Lowe, B. (1989). Transposon mutagenesis in developmental biology – Methodology and results. En *D. D. Randall, D. G. Blevins (Eds.): Current topics in Plant Biochemistry and Physiology, Vol. 8, Natural Science Foundation University of Missouri Columbia, Food 21st Century Program. Columbia: Interdisciplinary Plant Biochemistry & Physiology Program (Current Topics In Plant Biochemistry and Physiology)*. pp. 237-250.
- Hay, A. y Tsiantis, M. (2010). *KNOX* genes: versatile regulators of plant development and diversity. En *Development* 137 (19), pp. 3153–3165.
- Heyl A. y Schmülling T. (2003). Cytokinin signal perception and transduction. En *Current Opinion in Plant Biology* 6 (5), pp. 480–488.
- Hwang, D., Chen, H. C., Sheen, J. (2002). Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. En *Plant Physiology* 129 (2), pp. 500–515.
- Jasinski, S., Piazza, P., Craft, J., Hay, A., Woolley, L., Rieu, I. et al. (2005). *KNOX* action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. En *Current Biology* 15 (17), pp. 1560–1565.
- José Manuel Álvarez Díaz (2012). Aplicaciones biotecnológicas para la propagación de *Pinus pinaster* Ait. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo, Oviedo.
- Kakimoto, T. (2003). Perception and signal transduction of cytokinins. En *Annual Review Of Plant Biology* 54, pp. 605–627.
- López, M., Pacheco, J., Rodríguez, R., Ordás, R. J. (1996). Regeneration of plants from isolated cotyledons of Salgareño Pine (*Pinus nigra* arn. ssp. *slazmannii* (dunal) Franco). En *In Vitro Cell Development Biology Plant* 32, pp. 109–114.
- Moncaleán, P., Alonso, P., Centeno, M. L., Cortizo, M., Rodríguez, A., Fernández, B., Ordás, R. J. (2005). Organogenic responses of *Pinus pinea* cotyledons to hormonal treatments: BA metabolism and cytokinin content. En *Tree Physiology* 25, pp. 1–9.
- Ori, N., Juárez, M. T., Jackson, D., Yamaguchi, J., Banowetz, G. M., Hake, S. (1999). Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize homeobox

- gene knotted1 under the control of a senescence-activated promoter. En *Plant Cell* 11 (6), pp. 1073–1080.
- Perilli, S, Moubayidin, L., Sabatini, S. (2010). The molecular basis of cytokinin function. *Current Opinion in Plant Biology* 13 pp. 21-26.
- Randall, D. D. y Blevins, D. G. (Eds.) (1989). En *D. D. Randall, D. G. Blevins (Eds.): Current topics in plant biochemistry and physiology, Vol. 8., Natural Science Foundation University of Missouri Columbia, Food 21st Century Program. Columbia: Interdisciplinary Plant Biochemistry & Physiology Program (Current Topics In Plant Biochemistry and Physiology).*
- Rozen, S. y Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Eds Krawetz S. y Misener S. Humana Press, Totowa, pp 365-386.
- Sablowski, R. (2009). Cytokinin and *WUSCHEL* tie the knot around plant stem cells. En *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (38), pp. 16016–16017.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K., Jürgens, G., Laux, T. (2000). The stem cell population of Arabidopsis shoot meristem is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. En *Cell*. 100 (6): 635-644.
- Shani, E., Yanai, O., and Ori, N. (2006). The role of hormones in shoot apical meristem function. En *Current Opinion in Plant Biology*. 9: 484-489.
- Sugiyama y Munetaka (1999). Organogenesis in vitro. En *Current Opinion in Plant Biology* 2 (1), pp. 61–64.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2010). Cytokinins: regulators of division. En *Licolen Taiz y Eduardo Zeiger (Eds) Plant Physiology*, 5^a ed, Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachussets, pp. 621-648.
- Takada, S., Hibara, K., Ishida, T., Tasaka, M. (2001). The *CUP-SAPED COTYLEDON1* gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. En *Development* 128: 1127-1135.
- To, J., Haberer, G., Ferreira, F., Deruere, J., Mason, M., Schaller, G., Alonso, J., Ecker, J., Kieber J. (2004). Type-A Arabidopsis response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signalling. En *The Plant Cell*. 16 (3): 658-671.
- Traas, J. y Monéger F. (2010). Systems Biology of Organ Initiation at the Shoot Apex. En *Plant Physiology*, 152.
- Valdés, A. E., Ordás, R. J., Fernández, B., Centeno, M. L. (2001). Relationships between hormonal contents and the organogenic response in *Pinus pinea* cotyledons. En *Plant Physiology and Biochemistry* 39 (5), pp. 377–384.
- Vollbrecht, E., Veit, B., Sinha, N., Hake, S. (1991). The developmental gene Knotted is a member of a maize homeobox gene family. En *Nature*, 350, 241-243.
- 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. In *The Plant Cell*, 15: 2532-2550.

Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., Schmülling, T. (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 10487-10492.

Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., Schmülling, T. (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. In *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (18), pp. 10487–10492,

Werner, T. y Schmülling T. (2009). Cytokinin action in plant development. In *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 527-538.

Yanai, O., Shani, E., Dolezal, K., Tarkowski, P., Sablowski, R., Sandberg, G., Samach, A., Ori, N. (2005). Arabidopsis KNOXI proteins activate cytokinin biosynthesis. In *Current Biology*, 15: 1566–1571.

Zhang, S. B. y Lemaux, P. G. (2004). Molecular analysis of in vitro shoot organogenesis. In *Critical Reviews in Plant Scsiences* 23 (4), pp. 325–335.