
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
GRADO EN BIOTECNOLOGÍA



TRABAJO FIN DE GRADO

**Caracterización molecular de la formación
de raíces adventicias en explantos foliares
de *Arabidopsis thaliana***

Sergio Ibáñez López

Director: José Manuel Pérez Pérez

Departamento de Biología Aplicada

Área de Genética

Curso 2015-16



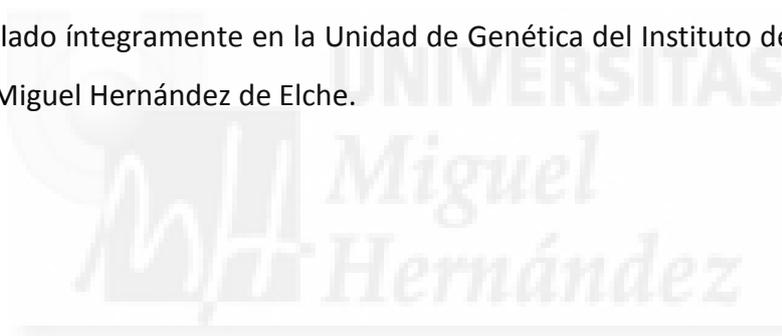
Instituto de Bioingeniería

Universidad Miguel Hernández

JOSÉ MANUEL PÉREZ PÉREZ, Profesor Titular de Universidad en el área de conocimiento de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HAGO CONSTAR

que el presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección y recoge fielmente la labor realizada por el alumno Sergio Ibáñez López. Las investigaciones reflejadas en esta memoria se han desarrollado íntegramente en la Unidad de Genética del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'JMP', is written over a horizontal line.

José Manuel Pérez Pérez

Elche, 6 de septiembre de 2016

RESUMEN

El presente Trabajo Fin de Grado pretende contribuir a la disección genética de la formación de raíces adventicias a partir de explantos foliares en *Arabidopsis thaliana*. En el sistema experimental que hemos utilizado, la formación de raíces adventicias se produce en una región localizada de la base del peciolo en respuesta a la escisión foliar y sin la adición exógena de hormonas. Mediante el uso de líneas marcadoras, hemos caracterizado a nivel espacial y temporal los principales eventos moleculares que tienen lugar durante el desarrollo de las raíces adventicias. Nuestros resultados nos permiten proponer algunas de las rutas genéticas implicadas en las distintas etapas durante el proceso de regeneración tisular. Por último, hemos estudiado los niveles de expresión de algunos de estos genes en mutantes afectados en el proceso de formación de raíces adventicias.

PALABRAS CLAVE: raíces adventicias, regeneración, *Arabidopsis thaliana*, organogénesis.



ABSTRACT

The objective of this work is to contribute to the genetic dissection of adventitious root formation in *Arabidopsis thaliana* leaf explants. In our experimental approach, adventitious root formation proceeds from a defined location in the petiole base after leaf excision and without exogenously-added hormones. By means of defined marker lines, we temporally and spatially characterized the major molecular events happening during adventitious root development. Our results allowed us to propose some of the genetic pathways involved in the different stages of plant tissue regeneration. Finally, we studied the expression level of some of these genes in mutants affected in adventitious root formation.

KEYWORDS: adventitious roots, regeneration, *Arabidopsis thaliana*, organogenesis.



ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

Página

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 OBJETO DE ESTUDIO.....	1
1.2 FORMACIÓN DE RAÍCES ADVENTICIAS EN PLANTAS DICOTILEDÓNEAS.....	1
1.3 REGULACIÓN HORMONAL DE LA FORMACIÓN DE RAÍCES ADVENTICIAS.....	2
1.3.1 AUXINAS.....	2
1.3.2 CITOQUININAS.....	4
1.3.3 OTRAS HORMONAS.....	6
1.4 SEMEJANZAS Y DIFERENCIAS ENTRE RAÍCES LATERALES Y RAÍCES ADVENTICIAS...	7
1.5 SISTEMAS BASADOS EN EXCISIÓN Y CULTIVO DE EXPLANTOS FOLIARES.....	9
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	10
3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.....	12
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	12
3.2 CULTIVOS EN CAJAS DE PETRI.....	13
3.3 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA Y TINCIÓN GUS.....	14
3.4 AISLAMIENTO DE ARN DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	15
3.5 PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL.....	15
3.6 PRUEBAS ESTADÍSTICAS.....	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
4.1 ESTUDIO DE LA SEÑALIZACIÓN HORMONAL DE AUXINAS Y CITOQUININAS DURANTE LA FORMACIÓN DE RAÍCES ADVENTICIAS EN EXPLANTOS FOLIARES.....	17
4.1.1 SEÑALIZACIÓN DE AUXINAS.....	17
4.1.2 SEÑALIZACIÓN DE CITOQUININAS.....	20
4.2 ESTUDIO DE MARCADORES IMPLICADOS EN LA DESDIFERENCIACIÓN Y ESPECIFICACIÓN CELULAR.....	22
4.2.1 EXPRESIÓN DE <i>WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN11</i>	22
4.2.2 EXPRESIÓN DE MARCADORES DE IDENTIDAD DE PERICICLO.....	23

4.2.3 EXPRESIÓN DE <i>GATA23</i>	25
4.3 ESTUDIO DE MARCADORES IMPLICADOS EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....	26
4.3.1 EXPRESIÓN DE <i>CYCLINB1;1</i>	27
4.4 ESTUDIO DE MARCADORES IMPLICADOS EN LA DETERMINACIÓN DE LA IDENTIDAD RADICULAR.....	28
4.5 EXPRESIÓN DE ALGUNOS GENES MARCADORES DURANTE LA FORMACIÓN DE RAÍCES ADVENTICIAS EN MUTANTES.....	29
4.5.1 EXPRESIÓN DE <i>SLR/IAA14</i>	30
4.5.2 EXPRESIÓN DE <i>WOX11</i>	31
4.5.3 EXPRESIÓN DE <i>CYCB1;1</i>	32
4.5.4 EXPRESIÓN DE <i>WOX5</i>	34
5. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA.....	35
6. BIBLIOGRAFÍA.....	36



ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1 Líneas de *Arabidopsis thaliana* que se han utilizado en este trabajo..... 12

Tabla 2 Oligonucleótidos que se han utilizado en este trabajo..... 16



ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1	Función de los transportadores PIN durante el desarrollo vegetal.....	3
Figura 2	Distintos módulo durante el desarrollo de raíces laterales.....	8
Figura 3	Formación de raíces adventicias en explantos foliares en la línea <i>ProDR5:GUS</i>	18
Figura 4	Formación de raíces adventicias en explantos foliares en la línea <i>ProDR5:GFP</i>	19
Figura 5	Capacidad de enraizamiento adventicio de explantos foliares de los mutantes relacionados con el transporte de auxinas (<i>pin2pin7</i> , <i>pin3pin7</i>), señalización de auxinas (<i>axr2-1</i>) y señalización de citoquininas (<i>ahp2,4,5</i>) su fondo genético Col-0	20
Figura 6	Formación de raíces adventicias en explantos foliares en la línea <i>ProARR5:GUS:GFP</i>	21
Figura 7	Formación de raíces adventicias en explantos foliares en la línea <i>ProWOX11:GUS</i>	23
Figura 8	Formación de raíces laterales en la línea <i>J0121</i>	24
Figura 9	Formación de raíces adventicias en explantos foliares en la línea <i>J0121</i>	24
Figura 10	Inducción de la expresión del gen GFP en la línea <i>J2661</i>	25
Figura 11	Formación de raíces adventicias en explantos foliares en la línea <i>ProGATA23:NLS:GFP</i>	26
Figura 12	Formación de raíces adventicias en explantos foliares en la línea <i>ProCYCB1;1:CYCB1;1:GFP</i>	27
Figura 13	Formación de raíces adventicias en explantos foliares en la línea <i>ProWOX5:YFP ; ProCYCB1;1:CYCB1;1:GFP</i>	28
Figura 14	Expresión de <i>SLR/IAA14</i> durante la formación de raíces adventicias en explantos foliares en distintos genotipos.....	31
Figura 15	Expresión de <i>WOX11</i> durante la formación de raíces adventicias en explantos foliares en distintos genotipos.....	32
Figura 16	Expresión de <i>CycB1;1</i> durante la formación de raíces adventicias en explantos foliares en distintos genotipos.....	33
Figura 17	Alineamiento parcial de las secuencias aminoacídicas de LARS3 y DDX3 mediante el uso del software Clustal Omega.....	33
Figura 18	Expresión de <i>WOX5</i> durante la formación de raíces adventicias en explantos foliares en distintos genotipos.....	34



INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Objeto de estudio

La actividad investigadora llevada a cabo en el laboratorio del Prof. José Manuel Pérez pretende enriquecer los conocimientos relacionados con el control genético, además del componente fisiológico y hormonal, que regula la regeneración de órganos vegetales. Para contribuir a la disección genética del proceso de regeneración radicular, usaremos la crucífera *Arabidopsis thaliana*, la cual ha sido ampliamente adoptada como sistema modelo del desarrollo vegetal (Page y Grossniklaus, 2002). Durante el proceso de regeneración se ha observado que el ratio hormonal auxinas/citoquininas tiene un papel protagonista, de manera que si es elevado se induce la formación de raíces, mientras que si es bajo se propicia la formación de tallos y hojas (Skoog y Miller, 1957). En última instancia, el balance hormonal regula la organogénesis adventicia mediante la activación o represión de rutas génicas específicas que controlan los procesos del desarrollo de los nuevos órganos (Ikeuchi et al., 2016). El estudio de los mecanismos moleculares que controlan la organogénesis *de novo* a partir de órganos adultos es de interés fundamental en agricultura ya que esta información sería útil para optimizar los procesos de multiplicación clonal de variedades de élite o contribuir a la mejora de especies recalcitrantes.

1.2 Formación de raíces adventicias en plantas dicotiledóneas

Las raíces adventicias son aquellas que se originan a partir de tejidos no radiculares como tallos u hojas (da Rocha Correa et al., 2012). La formación de este tipo de raíces se produce en respuesta a estímulos externos, generalmente estreses abióticos tales como inundaciones (Vidoz et al., 2010), déficits nutricionales (Miller et al., 2003) o tras una herida (Ahkami et al., 2009).

La formación de raíces adventicias a partir de tallos preformados o esquejes se ha dividido en tres etapas: (1) la fase de inducción, durante la cual algunas células revierten su identidad y se especifican como células iniciadoras de los nuevos primordios radiculares, (2) la fase de iniciación, en la que domina la proliferación celular y se forman los primordios, y (3) la fase de expresión (también llamada fase de elongación), que comprende el crecimiento macroscópico de los primordios y se establece su conexión vascular con el tallo (Cano et al., 2014, de Klerk et al., 1999).

En muchas especies vegetales las células precursoras de las raíces adventicias no están preformadas y derivan de células específicas, como las células del periciclo en el hipocótilo de *Arabidopsis thaliana* tras una herida (Sukumar et al., 2013, Verstraeten et al., 2013), o las células del cambium vascular en los esquejes de clavel o petunia (Agulló-Antón et al., 2013, Ahkami et al., 2013).

1.3 Regulación hormonal de la formación de raíces adventicias

1.3.1 Auxinas

Las auxinas presentan una función relevante durante la formación de raíces adventicias en muchas especies vegetales (Bellini et al., 2014). Una elevada concentración endógena de esta hormona está normalmente asociada con altas tasas de enraizamiento adventicio (Caboni et al., 1997, Wiesman et al., 1988).

Se conocen dos vías principales de biosíntesis del ácido indolacético o AIA, que se corresponde con la auxina biológicamente activa: (1) síntesis del AIA independiente del triptófano (Zhang et al., 2008, Ouyang et al., 2000) y (2) síntesis del AIA dependiente del triptófano. La ruta principal de síntesis de AIA es la del ácido indol-3-pirúvico (IPA) y tiene lugar en dos etapas. En la primera, el triptófano es transformado en IPA por la enzima triptófano aminotransferasa (TAA1). El IPA se transforma en AIA por las flavinas monooxigenasas de la familia YUCCA (Dai et al., 2013). Por otro lado cabe destacar la ruta de la indol-3-acetaldoxima (IAOX), que solo se encuentra en algunas especies de crucíferas, como *Arabidopsis thaliana*, que poseen la familia enzimática CYP79B, concretamente las enzimas CYP79B2 y CYP79B3, capaces de transformar el triptófano en indol-3-acetaldoxima (Mano et al., 2012, Mashiguchi et al., 2011, Sugawara et al., 2009). La síntesis de AIA se lleva a cabo en la parte aérea de la planta, principalmente en las hojas jóvenes y se transporta polarmente hasta las raíces por acción de las proteínas PIN. El primer miembro descrito de esta familia es *PIN-FORMED1* (*PIN1*), cuyo mutante, *pin1*, presenta un fenotipo similar a plantas silvestres tratadas con inhibidores químicos del transporte polar de auxinas, como TIBA (ácido 2,3,5-triyodobenzóico) y NPA (ácido N-1-naftiltalámico). El gen *PIN1* codifica una proteína transmembrana que se localiza en la membrana basal de las células vasculares (Krecek et al., 2009, Paponov et al., 2005). Debido a su función esencial en el transporte polar de auxinas, las proteínas PIN se requieren de manera específica en

diversos procesos del desarrollo vegetal que requieran concentraciones elevadas de dicha hormona. Durante la embriogénesis, PIN1, PIN4 y PIN7 contribuyen a la correcta especificación del eje apical-basal del embrión (Friml et al., 2003; Figura 1A). El crecimiento de la raíz principal requiere del establecimiento de un máximo de auxina en el ápice de la raíz y un reflujó de auxina hacia la zona meristemática que depende de la expresión y localización subcelular de los transportadores PIN1, 2, 3, 4 y 7 (Blilou et al., 2005; Figura 1B).

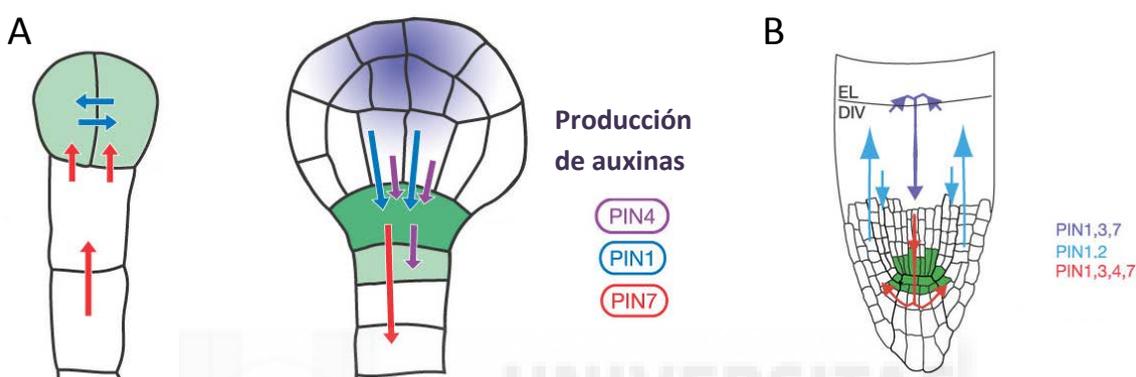


Figura 1.- Función de los transportadores PIN durante el desarrollo vegetal. (A) Generación del eje apical-basal durante la embriogénesis de *Arabidopsis thaliana*. (B) Generación y mantenimiento del reflujó de auxina en el ápice radicular. En morado se indica la síntesis de auxinas. En verde se indica la respuesta a auxinas. Las flechas indican la dirección del transporte de auxinas y su color se corresponde con las distintas proteínas PIN. EL: zona de elongación. DIV: zona de división. Tomado de (A) Friml et al. (2003) y (B) Blilou et al. (2005) con ligeras modificaciones.

Una vez llegan al tejido diana, las auxinas ejercen su acción a través de su unión al receptor TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1), que forma parte del complejo SCF^{TIR1} de ligasa de ubiquitina. La activación del complejo SCF^{TIR1} en respuesta a la auxina promueve la degradación de los correpresores transcripcionales de la familia AUXIN/INDOLE3-ACETIC ACID (Aux/IAA) por el proteosoma 26S (Tan et al., 2007). Las proteínas Aux/IAA inhiben la actividad de los factores de transcripción de la familia AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) que regulan directamente la transcripción de los genes diana de la señal de auxina mediante su unión *en cis* a los elementos *AuxRE* (*Auxin Responsive Element*) en la región reguladora de estos genes (Krogan et al., 2015). Algunos de estos factores de transcripción regulados por auxinas y que participan en la formación de raíces adventicias son *ARF6* y *ARF8*, que actúan como

reguladores positivos de la formación de raíces adventicias en el hipocótilo, y *ARF17*, que actúa como un regulador negativo. Aguas abajo de estos tres factores de transcripción se han identificado los genes *GH3.3*, *GH3.5* y *GH3.6* que codifican amido sintasas que conjugan residuos de aminoácidos, como aspártico (Asp) o isoleucina (Ile), a diversas hormonas, como AIA o ácido jasmónico. Estos genes *GH3* se requieren para la modulación de los niveles endógenos de AIA y ácido jasmónico durante las primeras etapas del desarrollo de las raíces adventicias (Gutierrez et al., 2012, 2009). Otros genes situados aguas abajo de la auxina en el hipocótilo son *LBD16* y *LBD29*, que contribuirían a la iniciación y diferenciación, de los primordios radiculares (Welander et al., 2014).

En un trabajo reciente realizado en esquejes de clavel (Agulló-Anton et al., 2014), se ha observado que tras la formación de las raíces adventicias, los niveles endógenos de auxina decrecen hasta recuperar unos niveles basales, lo que concuerda con el efecto inhibitorio de la auxina cuando se aplica exógenamente en estadios avanzados de la formación de raíces adventicias (de Klerk et al., 1999). Se ha propuesto que la restauración de niveles basales de auxina endógena se llevaría a cabo por los mecanismos habituales de degradación de hormonas en los que intervienen distintas peroxidasas, o mediante su conjugación con aminoácidos y azúcares que dan lugar a formas inactivas de la hormona (Caboni et al., 1997, Nordstrom et al., 1991).

1.3.2 Citoquininas

Las citoquininas son, junto a las auxinas, otra de las hormonas que también contribuyen a la formación de raíces adventicias (Della Rovere et al., 2013). Los niveles endógenos de citoquininas descienden durante las fases tempranas de la organogénesis radicular, para alcanzar su máximo en la fase de emergencia y crecimiento macroscópico de los primordios (Della Rovere et al., 2016). Se ha observado que la aplicación exógena de citoquininas inhibe la formación de raíces adventicias (de Klerk et al., 1999), probablemente debido a su efecto positivo para la diferenciación prematura del primordio radicular durante las fases iniciales del crecimiento de los primordios (Bollmark y Eliasson, 1986).

La biosíntesis de citoquininas se lleva cabo a partir del AMP (adenosín monofosfato cíclico) en varios órganos de la planta, tanto de la parte aérea como en

las raíces (Miyawaki et al., 2004). La enzima isopentenil transferasa (IPT) transfiere el grupo pentilo desde el pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) al AMP, formando el ribótido de isopenteniladenina. Este compuesto es finalmente hidrolizado gracias a la enzima LONELY GUY, con la consecuente pérdida de la ribosa y un grupo fosfato para dar lugar a las citoquininas activas, la isopentenil adenina y la *trans*-zeatina (El-Showk et al., 2013). Evidencias experimentales señalan que algunas citoquininas, como la *trans*-zeatina, se transportan desde la raíz hasta los órganos aéreos en respuesta a los niveles de nutrientes del substrato y son utilizadas como una señal para coordinar el crecimiento de la parte aérea con la cantidad de nutrientes disponibles en el suelo (Hirose et al. 2008, Matsumoto-Kitano et al. 2008).

La vía de señalización intracelular de las citoquininas se basa en un sistema de transducción de dos componentes similar a los encontrados en bacterias. En primer lugar, la citoquinina se une al dominio extracelular de su receptor transmembrana que contiene un dominio histidina kinasa intracelular. Tras la unión de las citoquininas, se transfiere un grupo fosfato desde su dominio aceptor hasta un residuo de aspartato situado en el dominio kinasa. Posteriormente se produce la transferencia del grupo fosfato del dominio kinasa hasta la proteína histidina fosfotransferasa (AHP), la cual se trasloca al núcleo, y transfiere finalmente dicho grupo fosfato hasta un residuo aspartato de los efectores, llamados RESPONSE REGULATORS (RR) y Arabidopsis RESPONSE REGULATORS (ARR) en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, los cuales actuarán como represores o activadores de los genes diana de las citoquininas (El-Showk et al., 2013).

Los ejemplos de genes regulados por citoquininas e involucrados en la formación de raíces adventicias no son tan abundantes como en el caso de las auxinas, aunque sí que existen algunas referencias bibliográficas. PtRR13 ha sido descrito como un RR de tipo B que actúa como un regulador negativo de la formación de raíces adventicias en un híbrido de chopo (*Populus tremula x Populus alba*) (Ramírez-Carvajal et al., 2009). La sobreexpresión de *PtRR13* disminuye la tasa de producción de raíces adventicias a partir de explantos de tallo y, además, éstas presentan menor longitud que las raíces adventicias silvestres. Además de las respuestas individuales inducidas por auxinas y citoquininas, se ha descrito la interconexión de sus vías de señalización para regular algunos procesos del desarrollo radicular (Muraro et al., 2011). Por un lado, se ha

demostrado que la señal de las auxinas regulan positivamente los genes *IPT7* e *IPT5*, responsables de la biosíntesis de citoquininas (Miyawaki et al., 2004), mientras que las citoquininas son capaces de regular los genes *YUCCA5*, *YUCCA5-like* y *YUCCA6*, que intervienen en la biosíntesis de auxinas, mediante la acción de los reguladores *ARR3*, *ARR4*, *ARR5*, y *ARR6*, ya que el cuádruple mutante *arr3,4,5,6* mostraba niveles de biosíntesis de auxina más elevados que su fondo genético silvestre (Jones et al., 2010). Por otro lado, se ha determinado que las citoquininas parecen estar involucradas en la inhibición del transporte polar de auxinas, a través de la regulación de la expresión de los *PIN* (Šimášková et al., 2015, Ruzicka et al., 2009).

1.3.3 Otras hormonas

Recientemente se ha descrito que otras hormonas vegetales, como el ácido jasmónico y las estrigolactonas, también estarían involucradas en la formación de raíces adventicias en distintas especies (Shinohara et al., 2013, Gutierrez et al., 2012, Rasmussen et al., 2012). En *Arabidopsis*, el jasmonato parece tener un efecto represor en la formación de raíces adventicias dado que niveles endógenos elevados de esta hormona están correlacionados con un menor número de raíces adventicias (Gutierrez et al., 2012). En el triple mutante *gh3.3 gh3.5 gh3.6* se observó una disminución notable en la formación de raíces adventicias y niveles de jasmonatos anormalmente superiores respecto a su fondo silvestre. Esto parece indicar que los niveles endógenos de jasmonatos estarían regulados indirectamente por componentes de la vía de las auxinas, presumiblemente debido a la sobreexpresión de las enzimas de biosíntesis de ácido jasmónico que origina la pérdida de función de los genes *GH3.3*, *GH3.5* y *GH3.6*. En el mismo trabajo se observó que los mutantes *opr3* y *dde2-2*, deficientes en la biosíntesis de jasmonatos, presentaron una mayor capacidad para la formación de raíces adventicias a partir de hipocótilos etiolados (Gutierrez et al., 2012).

En cuanto a las estrigolactonas, se ha propuesto que ejercen una función represora en la formación de raíces adventicias, de forma independiente a las citoquininas (Rasmussen et al., 2012). Esta función se llevaría a cabo a través del control de la iniciación de las raíces adventicias, de manera directa por la inhibición de las divisiones formativas, y de manera indirecta limitando el transporte de auxinas. Esto último concuerda con el trabajo de Shinohara et al. (2013), en el que se

determinó que las estrigolactonas inducen la endocitosis de los transportadores PIN1 en la membrana plasmática en los tallos.

1.4 Semejanzas y diferencias entre raíces laterales y raíces adventicias

A pesar de la aparente similitud morfológica entre las raíces laterales y las adventicias, existen diferencias importantes en el proceso de formación de estos dos tipos de raíces. En *Arabidopsis*, las raíces laterales se originan a partir de las células del periciclo adyacentes a las células polares del xilema (*xylem pole pericycle cells*) en las raíces previamente existentes (de Smet et al., 2006) y siguiendo un patrón predeterminado (Goh et al., 2016, Péret et al., 2009, Casimiro et al., 2003). Por el contrario, las raíces adventicias se originan de distintos órganos (hipocótilos, hojas, tallos, etc.) y por tanto, de diferentes tipos celulares. Las raíces adventicias generadas a partir del hipocótilo pueden surgir de células del parénquima vascular, células jóvenes del floema o células del cambium interfascicular próximas a las del floema. Las raíces formadas en explantos de tallo parecen generarse a partir de células del tejido vascular en *Arabidopsis*, a partir de células cercanas al tejido vascular en *Populus trichocarpa* o de células del cambium interfascicular en *Malus domestica* (Bellini et al., 2014). Concretamente en *Arabidopsis*, las raíces adventicias generadas en el hipocótilo proceden de las células del periciclo adyacentes a las células polares del xilema, al igual que las raíces laterales (Sukumar et al., 2013), mientras que las raíces adventicias generadas a partir de hojas se desarrollan del cambium vascular (Correa et al., 2012). Estos resultados sugieren que, en *Arabidopsis*, la formación de raíces adventicias a partir de hipocótilo o a partir de hoja en no seguirían rutas idénticas.

Las raíces adventicias no se diferencian de las raíces laterales únicamente en el tejido a partir del cual se forman o la identidad de las células que dan lugar al nuevo órgano, sino que también existen diferencias en los mecanismos moleculares que regulan la formación de ambos tipos de raíces. Se han descrito genes específicos de la formación de raíces adventicias a partir de hipocótilo que no estarían involucrados en la formación de raíces laterales de *Arabidopsis thaliana* (Verstraeten et al., 2014). Algunos de estos genes son *ARGONAUTE1 (AGO1)*, cuyo mutante *ago1* muestra defectos en la formación de raíces adventicias pero no laterales (Sorin et al., 2005), *PECTIN METHYLESTERASE3 (PEM3)*, cuya mutación provoca una disminución en el

número de raíces adventicias pero no en el número de raíces laterales (Guénin et al., 2011) o *ROOT INITIATION DEFECTIVE1 (RID1)*, necesario en la fase de iniciación de la formación de raíces adventicias a partir de hipocótilo pero no para la iniciación de las raíces laterales (Konishi y Sugiyama, 2003). Además, también se han descrito mutantes de maíz que son capaces de desarrollar raíces adventicias situadas en la base del tallo (llamadas raíces en corona en esta especie), pero que no forman raíces laterales y viceversa (Coudert et al., 2010, Hochholdinger et al., 2009).

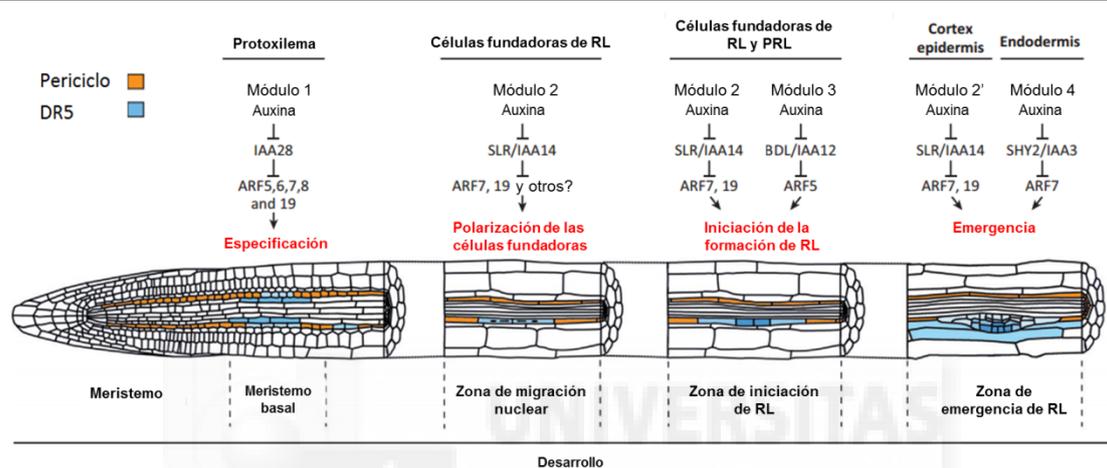


Figura 2.- Distintos módulos durante el desarrollo de raíces laterales. Las células de color naranja se corresponden con células del periciclo y las células de color azul se corresponden a células que muestran la expresión de un marcador de respuesta a auxinas. En rojo se muestran las consecuencias de la acción de los distintos módulos. (PRL: primordio de raíz lateral; RL: raíz lateral). Imagen obtenida de Lavenus et al. (2013), con ligeras modificaciones.

No obstante, la formación de raíces laterales y adventicias también presenta módulos comunes (Figura 2), en el que tres proteínas ARF (ARF17, ARF6 y ARF8) estarían regulando la formación de raíces adventicias y dos de ellas (ARF6 y ARF8) se encontrarían también involucradas en la formación de raíces laterales junto a *MONOPTEROS (MP)/ARF5*, ARF7 y ARF19, concretamente durante la fase de especificación, en la que se marcan las células que más tarde darán lugar a la raíz lateral, siendo regulados negativamente por IAA28. Además, *MP/ARF5*, ARF7 y ARF19 intervienen en otras fases de la formación de raíces laterales como la fase de migración nuclear, donde estarían regulados negativamente por *SOLITARY ROOT (SLR)/IAA14*, la fase de iniciación (regulados negativamente por *SLR/IAA14* y *BODENLOS (BDL)/IAA12*) y la fase de emergencia (regulados negativamente por *SLR/IAA14* y *SHY2/IAA3*) (Lavenus et al., 2013, Gutierrez et al., 2012; Figura 2).

1.5 Sistemas basados en la escisión y cultivo de explantos foliares

Recientemente se han desarrollado en *Arabidopsis* protocolos de análisis de enraizamiento adventicio a partir de explantos de hoja en los que el medio de cultivo no contiene tratamiento hormonal exógeno para favorecer la producción de raíces adventicias (Chen et al., 2014, Correa et al., 2012). Con este abordaje se ha conseguido esclarecer algunos de los factores que afectan a la formación de este tipo de raíces, tales como las condiciones lumínicas, la edad de la hoja o la demanda de carbohidratos del explanto. El establecimiento de este protocolo le ha permitido al grupo del investigador Lin Xu describir los primeros eventos de reprogramación celular y determinar algunos marcadores clave en estas etapas (como *WOX11* o *WOX5*) en un primer enfoque a pequeña escala (Liu et al., 2014). Para finalizar, su trabajo más reciente trata de un ensayo de secuenciación del transcriptoma por *RNA-Seq*, gracias al cual fueron capaces de identificar un enriquecimiento en factores de transcripción de la familia NAC (acrónimo resultante de las iniciales de los genes a partir de los cuales se identificó esta familia: *NAC*, *ATAF1/2* y *CUC2*) entre 24 y 48 horas tras el corte. Estos factores de transcripción no son regulados por auxina, se expresan de manera asimétrica (únicamente en el explanto y no en la planta madre) y parecen ser necesarios para la formación de raíces adventicias ya que la línea transgénica *Pro35S:NAC1-SRDX*, la cual posee un mecanismo molecular de silenciamiento génico específico para *NAC1*, mostró una reducción del 80% de la capacidad de enraizamiento adventicio (Chen et al., 2016). Con todo, consideramos que el estudio de la formación de raíces adventicias a partir de explantos foliares en el modelo de *Arabidopsis* puede aportarnos información relevante sobre los componentes genéticos específicos de la inducción de raíces adventicias a partir de tejidos diferenciados y que esta información podrían aplicarse a la formación de raíces adventicias en otras especies de plantas no modelo, como tomate o clavel.



ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Los estudios genéticos destinados a la identificación de los factores moleculares implicados en la formación de raíces adventicias en *Arabidopsis thaliana* son escasos. El protocolo desarrollado con anterioridad en el laboratorio del Prof. José Manuel Pérez para la inducción de raíces adventicias en ausencia de tratamiento hormonal (Ruiz-Cano, 2014) permitió cribar un elevado número de mutantes de ADN-T de *Arabidopsis thaliana* e identificar genes involucrados en el proceso de formación de raíces adventicias. En dicho trabajo se identificaron 63 mutantes afectados en la formación de raíces adventicias en el hipocotilo, 44 de ellos con menor capacidad de enraizamiento adventicio que el fondo genético Col-0, y 19 con más raíces adventicias que el silvestre. De esta manera fue posible clasificar los genes como reguladores positivos o reguladores negativos, respectivamente.

A nivel molecular, la formación de raíces adventicias conlleva eventos de reprogramación celular conducentes a dotar de identidad radicular a los nuevos primordios (Welander et al., 2014). En paralelo se produciría un aumento de la actividad mitótica, necesaria para el crecimiento y desarrollo de los primordios radiculares (Bellini et al., 2014). Dada la escasa información actualmente disponible acerca de los componentes moleculares responsables de la organogénesis adventicia, los objetivos específicos de este Trabajo Fin de Grado son:

- Caracterizar molecular y espaciotemporalmente el proceso de formación de raíces adventicias en explantos foliares.
- Generar un modelo de formación de raíces adventicias a partir de explantos foliares sobre el que llevar a cabo otro tipo de ensayos.
- Caracterizar mutantes afectados en la formación de raíces adventicias, con posibilidad de determinar en qué fase del proceso estaría involucrado el locus evaluado, lo que a su vez permitiría enriquecer el modelo establecido en este trabajo.

Para ello usaremos un protocolo basado en la escisión y cultivo de explantos foliares de *Arabidopsis thaliana*, en los que se induce la formación de raíces adventicias en ausencia de aplicación exógena de hormonas. El proceso de desarrollo de raíces adventicias se estudiará a nivel histológico mediante el uso de microscopía láser confocal y microscopía óptica convencional, y se analizará una batería de líneas transgénicas portadoras de

construcciones que combinan secuencias de genes testigo, como el de la GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP), con secuencias de genes marcadores de los distintos eventos que tienen lugar durante la organogénesis adventicia.

En su vertiente más aplicada, este trabajo contribuirá a evaluar nuevas estrategias biotecnológicas con potencial para optimizar el enraizamiento adventicio, especialmente interesante en el sector agronómico ya que facilitaría la reproducción vegetativa de la planta, o la obtención de biomasa y productos de interés secretados por las raíces, actuando las plantas en este caso a modo de biorreactores, campo de la biotecnología con un gran futuro por delante.





PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

3.1. Material vegetal

Para la realización de los experimentos descritos en este trabajo se utilizaron los mutantes y las líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que se indican en la Tabla 1. Todas las líneas utilizadas eran homocigotas para las inserciones y/o las mutaciones indicadas. Se ha incluido también la estirpe silvestre Col-0 como referencia. Las semillas fueron conservadas a 4°C durante, al menos, una semana para romper la dormancia y favorecer la germinación de manera síncrona.

Tabla 1.- Líneas de *Arabidopsis thaliana* que se han utilizado en este trabajo

Línea	Función génica	Fondo genético	Referencias	Semillas cedidas por
<i>ProDR5:GUS</i>	Respuesta a auxinas	Col-0	Ulmasov et al., 1997	Dr. Jian Xu, University of Singapore
<i>ProDR5:GFP</i>		Col-0	Ottenschlager et al., 2003	NASC ^a
<i>ProARR5:GUS</i>	Respuesta a citoquininas	Col-0	D'Agostino et al., 2000	Dr. J. Xu
<i>ProWOX11:GUS</i>	Iniciación de raíces adventicias	Col-0	Xu et al., 2014	Dr. Lin Xu, Shanghai Institutes for Biological Sciences
<i>ProGATA23:NLS:GFP</i>	Iniciación de raíces laterales	Col-0	De Rybel et al., 2010	Dr. Miguel Moreno-Risueño, CBGP
<i>ProCYCB1;1:CYCB1;1:GFP</i>	Ciclo celular. Paso de fase G ₂ a fase M	Col-0	P. Doerner, sin publicar	Dr. Peter Doerner
<i>ProWOX5:YFP;</i> <i>ProCycB1;1:CYCB1;1:GFP</i>	Establecimiento y manutención de centro quiescente	Col-0	Pi et al., 2015	Dr. M. Moreno-Risueño
<i>J0121</i>	Expresión de GFP en periciclo	C24	Laplaze et al., 2005	Dr. M. Moreno-Risueño
<i>J2661</i>	Expresión de GFP en periciclo	C24	Levesque et al., 2006	Dr. M. Moreno-Risueño
<i>mars1-2</i>	Diferenciación del tejido vascular	Col-0	Wilson-Sánchez et al., 2014	Dr. José Luis Micol, UMH
<i>lars3-1</i>	Procesado de ARN ribosómico			
<i>pin2 pin7</i>	Transporte polar de auxinas	Col-0	Blilou et al., 2005	Dr. Ikram Blilou, Wageningen University
<i>pin3 pin7</i>	Transporte polar de auxinas	Col-0	Blilou et al., 2005	Dr. Ikram Blilou, Wageningen University
<i>axr2-1</i>	Respuesta de auxinas	Col-0	Timpte et al., 1994	NASC ^a
<i>ahp2 ahp4 ahp5</i>	Señalización de citoquininas	Col-0	Hutchison et al., 2006	NASC ^a

^a NASC: The European Arabidopsis Stock Centre.

3.2. Cultivos en cajas de Petri

Las semillas se sembraron en cajas de Petri de 120 × 120 × 10 mm, que contenían 65 mL de medio sólido de Murashige y Skoog con 1% de sacarosa (medio MS al 1% de sacarosa). Para la preparación de 1 L de este medio de cultivo se añaden a 900 ml de agua destilada: 2,15 g de sales de Murashige y Skoog (Duchefa), 10 g de sacarosa, 0,5 g de MES (ácido 2-[N-morpholino] etano sulfónico) y 2 mL de una mezcla de vitaminas Gamborg B5 (Duchefa). A continuación, se ajusta el pH a 5,7 con KOH 1 M, se añaden 6,5 g de agente gelificante *Plant agar* (Duchefa) y se ajusta el volumen a 1 L con agua destilada. El medio se esteriliza mediante autoclave (121°C durante 20 min) y se dispensa en las cajas de Petri en condiciones asépticas utilizando una cabina de flujo laminar horizontal (Telstar AH100).

Las semillas se esterilizaron mediante su inmersión, con agitación ocasional, durante 10 min en una disolución acuosa del 40% de lejía comercial (NaClO al 4% m/v) y 3 µL/mL de una disolución del 1% v/v de Tritón X-100. A continuación, se retiró la disolución anterior y se realizaron tres lavados, de 5 min cada uno, con 1 mL de agua destilada estéril, dejando finalmente las semillas en la suspensión acuosa del último lavado.

Para la siembra de las semillas, se tomaron con una pipeta y se depositaron de una en una sobre la superficie del medio de cultivo. Tras la siembra, las cajas de Petri se precintaron con cinta quirúrgica *Micropore* de 12,5 mm y se estratificaron durante 48 h a 4°C en oscuridad para sincronizar su germinación. Las cajas se incubaron en horizontal a 22 ± 1°C en una cámara de cultivo Panasonic MLR-352 y permanecieron 12 días en luz continua (50 µmol m⁻² s⁻¹) para favorecer el desarrollo de la parte vegetativa.

Se ha descrito previamente que la escisión de las hojas vegetativas y su cultivo induce la formación de raíces adventicias en la región del corte (Chen et al., 2014). A los 12 días después de la germinación se cortó el primer par de hojas por la base del peciolo y se pasaron éstas a cajas de Petri con medio MS al 2% de sacarosa (20 g de sacarosa en 1 L de medio de cultivo que se preparó tal como se ha indicado anteriormente). Las cajas de Petri con los explantos foliares procedentes de líneas marcadoras y los mutantes *lars3-1* y *mars1-2* se incubaron en las condiciones de cultivo descritas anteriormente pero en oscuridad. Las cajas de Petri se analizaron a diferentes tiempos después de la escisión: 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 4 días y 7 días.

Los explantos foliares de las líneas mutantes que se indican en la Tabla 1 (a excepción de los mutantes *lars3-1* y *mars1-2*) crecieron en la cámara de cultivo Panasonic MLR-352 a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y luz continua ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). En cada caja de Petri se depositaron 42 explantos de cada línea mutante y 7 de su fondo genético silvestre, que utilizó como referencia. El número de raíces adventicias se determinó 7 y 10 días después de la escisión.

3.3. Observación microscópica y tinción GUS

Las observaciones de rutina de las plántulas se llevaron a cabo con una lupa trinocular Motic SMZ-168, equipada con una cámara fotográfica Nikon D3200.

Los explantos foliares de las líneas testigo con el gen *GUS*, que codifica la β -glucuronidasa, se incubaron durante un mínimo de 4 h a 37°C en una disolución de tinción que contiene el sustrato cromogénico X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico). Para la preparación de 100 mL de la solución de tinción se añaden a 62 mL de agua destilada: 13,42 mL de NaH_2PO_4 (200 mM), 11,58 mL de Na_2HPO_4 (200 mM), 2 mL de Tritón X-100 (10% v/v), 5 mL de K_3FeCN_6 (100 mM), 5 mL de K_4FeCN_6 (100 mM) y 1 mL del sustrato X-Gluc (100 mM).

Para la observación microscópica de los explantos foliares, se fijaron en una disolución de etanol al 96% durante 48 h a 4°C . A continuación, los explantos se lavaron con una solución de tampón fosfato 0,1 M a pH 6,8 durante 1 h y se transfirieron a una disolución aclarante (80 g de hidrato de cloral en 30 mL de agua destilada) en la que se mantuvieron durante toda la noche. Las muestras se montaron en un portaobjetos de 76×26 mm, en una solución preparada a partir de 80 g de hidrato de cloral, 20 mL de glicerol y 10 mL de agua destilada, y se cubrieron con un cubreobjetos de 22×22 mm. La observación de estas preparaciones se realizó con un microscopio Motic BA210, bajo iluminación en campo claro, y su fotografía con un dispositivo fotográfico Moticam 580INT.

El análisis de la expresión de los marcadores basados en proteínas fluorescentes se llevó a cabo mediante un microscopio láser confocal Nikon D-ECCLIPSE C1 (Nikon Instruments) utilizando el software de control EZ-C1. Las muestras se montaron en un portaobjetos de 76×26 mm, en una solución de tampón fosfato 0,1 M a pH 6,8 y se cubrieron con un cubreobjetos de 22×22 mm. Para la excitación de las proteínas fluorescentes GFP (*GREEN FLUORESCENT PROTEIN*) y YFP (*YELLOW FLUORESCENT PROTEIN*) se utilizó el láser de Ar ($\lambda = 488 \text{ nm}$), y la detección de la fluorescencia emitida se llevó a

cabo entre 515 y 530 nm. Se utilizaron los otros dos láseres, el de He-Ne ($\lambda = 543$ nm) y el de UV ($\lambda = 408$ nm) para cuantificar la autofluorescencia de las muestras. Para la visualización de la estructura de los tejidos se utilizó el canal adicional de microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC o Nomarski) de este equipo. Para ajustar la intensidad de los láseres y descartar la autofluorescencia, se utilizaron los explantos foliares de la estirpe Col-0 de cada ensayo como referencia. Todas las imágenes de un determinado marcador y un determinado tiempo fueron obtenidas utilizando los mismos parámetros.

3.4. Aislamiento de ARN de *Arabidopsis thaliana*

Se ha obtenido ARN de explantos foliares a distintos tiempos después de la escisión y para los genotipos Col-0, *mars1-2*, *lars3-1* (Fernández-López, 2016). En cada uno de los tiempos ensayados se recolectaron y se congelaron en nitrógeno líquido un mínimo de 6 explantos foliares de cada genotipo en tubos *Eppendorff* de 1,5 mL (3 réplicas por genotipo y tiempo). La extracción del ARN se ha llevado a cabo con 50 mg de cada muestra utilizando el *Spectrum™ Plant Total RNA Kit* (Sigma) y siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. La eficacia de la extracción fue evaluada determinando, mediante un espectrofotómetro Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher), la concentración en ácidos nucleicos, y sometiendo 1 μ L de la disolución de ARN a electroforesis en un gel de agarosa al 1% con el fin de estimar la concentración de ARN no degradado y confirmar la ausencia de ADN genómico.

Para la síntesis del ADN complementario (ADNc) se empleó como molde 1 μ g del ARN total obtenido previamente y se utilizó el *iScript™ cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. El ADNc resultante fue diluido añadiendo 40 μ L de agua destilada estéril.

3.5. PCR cuantitativa en tiempo real

Para el diseño de oligonucleótidos cebadores se tuvo en cuenta que cada pareja amplificase fragmentos de pequeño tamaño del primer tercio de la secuencia codificante de cada gen. Para evitar amplificaciones inespecíficas de ADN genómico, uno de los cebadores de cada pareja se diseñó para que hibridase de manera específica con dos exones consecutivos. La especificidad de la hibridación de los cebadores se confirmó *in silico* con el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>). Las secuencias de los cebadores utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 2.

Las mezclas de reacción para la amplificación por PCR se prepararon con 7 μL de *SsoAdvanced SYBR Green Supermix* (Bio-Rad), 4 μL de la pareja de cebadores (5 μM), 1 μL del cDNA y 2 μL de agua destilada estéril. Las amplificaciones de PCR se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos en un termociclador *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Para cada genotipo en cada uno de los tiempos ensayados se obtuvieron dos réplicas de la síntesis del ADNc y tres réplicas técnicas de cada amplificación por PCR.

Tabla 2.- Oligonucleótidos que se han utilizado en este trabajo

Gen	Cebador <i>Forward</i> (F)	Cebador <i>Reverse</i> (R)	Tamaño (en pb)
<i>At4g26410</i>	GAGCTGAAGTGGCTTCCATGAC	GGTCCGACATACCCATGATCC	81
<i>IAA14/SLR</i>	AGTCCTTTACCATGGGGAG	GCCGATGTTTGTGCGAGTCATG	170
<i>WOX11</i>	AATTTTCAATACCAACAAGGGGC	CCAAATCTTCTCAAACGTTGC	106
<i>CYCB1;1</i>	CTACTAAGAAGAAAGCGACCA	CTCCATTCACTCTCAACAGAC	154
<i>WOX5</i>	TCATCAACCATCAACTAGAGATG	CTTAGCTCTCATTTGTCCAC	143

El programa del termociclador que se utilizó se detalla a continuación: (1) activación de la polimerasa 20 s a 95°C, y (2) 40 ciclos de: 15 s a 95°C y 1 min a 64°C. A continuación, se llevó a cabo un ensayo para la estimación de la cinética de disociación de los productos de PCR amplificados utilizando un rango de temperaturas de 65 a 95°C con incrementos de 0,3°C cada 5 s. El análisis de la cinética de disociación nos permitió confirmar la especificidad de los cebadores utilizados. La determinación de los valores de expresión relativa de cada locus amplificado se llevó a cabo mediante el método del $2^{-\Delta\Delta C_T}$, descrito en Livak y Scmittgen (2001), utilizando el gen *At4g26410* como referencia (Czechowski et al., 2005).

3.6. Pruebas estadísticas

Los parámetros estadísticos (media, desviación estándar, etc.) fueron calculados mediante el software Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies Inc., USA). Para comparar los distintos genotipos entre sí se ha utilizado la prueba de rango múltiple de la diferencia mínima significativa de Fisher (LSD; *Least Significant Difference*) (Sanchez-Rodriguez et al., 2010). Los valores críticos que se utilizaron para contrastar las diferencias entre los genotipos, correspondientes a un nivel de significación del 5%, fueron proporcionados por este programa.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Estudio de la señalización hormonal de auxinas y citoquininas durante la formación de raíces adventicias en explantos foliares

4.1.1. Señalización de auxinas

Para estudiar la señalización de las auxinas a nivel temporal y espacial hemos utilizado líneas transgénicas de *Arabidopsis* que contienen, en homocigosis, la construcción *ProDR5:GUS* (Ulmasov et al., 1997) o *ProDR5:GFP* (Ottenschläger et al., 2003). La secuencia *DR5* es un promotor sintético que contiene 9 repeticiones en tándem del elemento de respuesta a auxina *AuxRE* del gen *GH3* de la soja (Ulmasov et al., 1997). Este promotor dirige la expresión del gen testigo *GUS*, que codifica la β -glucuronidasa (*ProDR5:GUS*), o del gen testigo *GFP* (*GREEN FLUORESCENT PROTEIN*), que codifica la proteína fluorescente verde (*ProDR5:GFP*). La expresión de estos genes testigo depende de la unión de los factores de respuesta a auxina ARF a los elementos *AuxRE* del promotor *DR5*, que ocurre según los niveles de auxina intracelular (Chandler, 2016, Tan et al., 2007). En consecuencia, los niveles de expresión de la β -glucuronidasa, que se visualizan a partir del producto de la degradación del sustrato colorimétrico X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -glucurónico), o de la GFP, que se visualizan directamente mediante microscopía láser confocal, se correlacionan con los niveles de auxina intracelular y con la activación de su respuesta. Estas dos líneas marcadoras se han utilizado ampliamente para caracterizar la respuesta a auxina en distintos procesos del desarrollo, tales como el crecimiento de la raíz primaria (Liu et al., 2013), el desarrollo foliar (Koenig et al., 2009), la dehiscencia de la antera o la maduración del polen (Cecchetti et al., 2008).

A partir de explantos foliares de la línea *ProDR5:GUS* hemos determinado que la expresión del gen *GUS* se inicia en algunos explantos (54% de ellos) a las 24 horas después de la escisión (hde). A partir de las 48 hde, la expresión del gen *GUS* se generaliza a la totalidad de los explantos. La expresión se localiza en algunas células vasculares de la región basal del peciolo (0,1-0,3 mm desde la escisión) (Figura 3). A partir de las 48 hde se observa, además, un engrosamiento notable de la región vascular como consecuencia de la formación de nuevas células por división celular de las ya preexistentes.

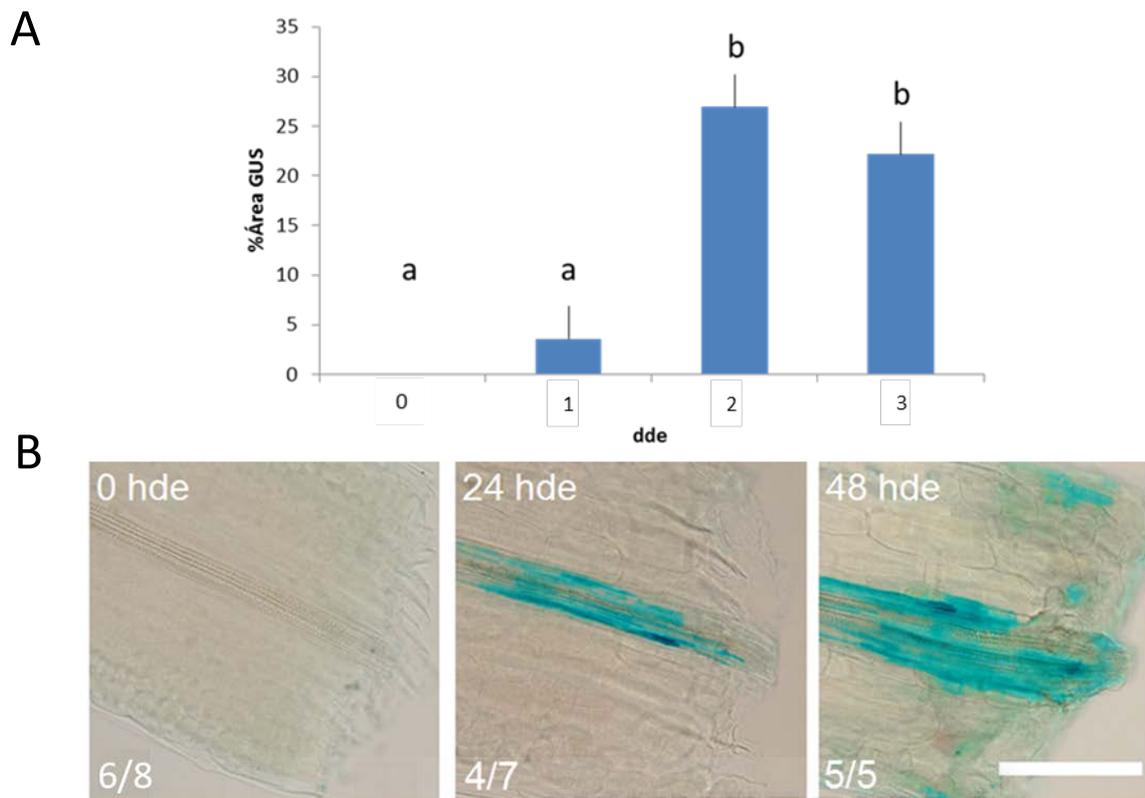


Figura 3.- Formación de raíces adventicias en explantos foliares en la línea *ProDR5:GUS*. (A) Porcentaje del área del peciolo que muestra expresión del gen *GUS*. Las letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). (B) Expresión de *GUS* durante la formación de raíces adventicias en la base del peciolo de explantos foliares. Los números en las imágenes indican el número de muestras que mostraron el patrón de expresión representado del total de muestras analizadas. dde/hde: días/horas después de la escisión. Las barras de escala indican 100 μm .

Hemos confirmado estos mismos resultados con la línea *ProDR5:GFP*, comprobándose que la expresión del gen testigo *GFP* se inicia a las 24 hde (93% de los explantos), se expande a continuación y se mantiene en esta región vascular hasta los 7 días después de la escisión (dde), momento en el que empieza a desaparecer de esta región (Figura 4). La acumulación progresiva de la señal del gen testigo *GUS* o *GFP* tras la escisión podría interpretarse como el resultado de un incremento en los niveles de auxina intracelular, un incremento en los niveles de respuesta a la auxina intracelular o una combinación de ambos procesos.

En hojas silvestres, la síntesis de auxinas se restringe a los hidatodos (Wang et al., 2011) y se transporta de manera polar hacia las raíces a través de sus haces vasculares (Blilou et al., 2005, Paponov et al., 2005). En nuestro caso, el incremento en los niveles de auxina en la región vascular próxima a la escisión podría estar causado por el transporte polar únicamente. Para confirmar nuestra hipótesis hemos cuantificado la respuesta de

formación de raíces adventicias en algunos mutantes afectados en el transporte polar de auxinas como los dobles mutantes *pin-formed3 (pin3) pin7* y *pin2 pin7* (Blilou et al., 2005). Estos mutantes mostraron una capacidad reducida de enraizamiento adventicio en relación a su fondo genético Col-0 (Figura 5). Nuestros resultados confirman la función esencial del transporte basípeto de auxinas en el establecimiento de un máximo de respuesta a esta hormona en la región vascular próxima a la escisión, que precede a la formación de raíces adventicias y que se requiere para este proceso.

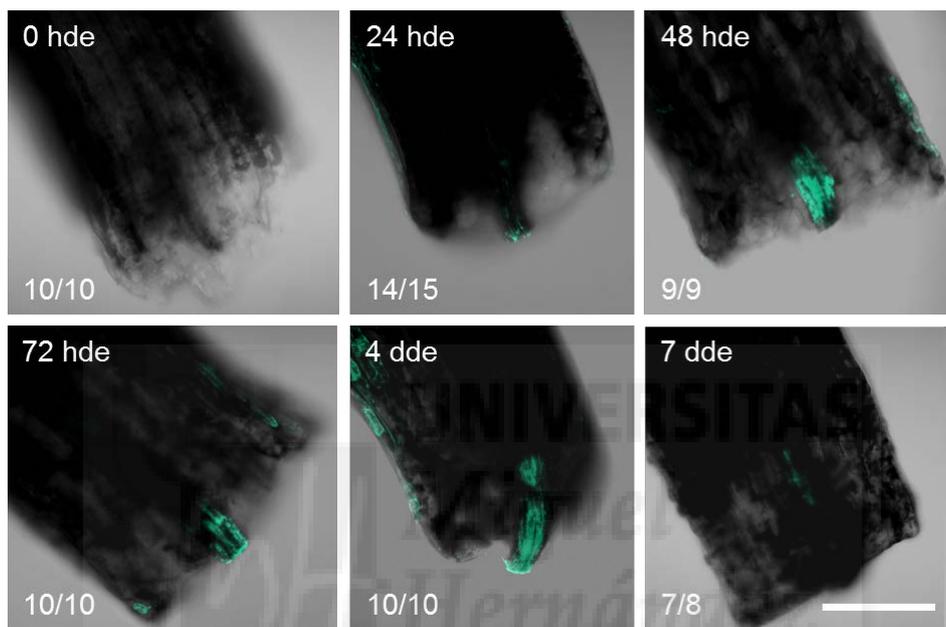


Figura 4.- Formación de raíces adventicias en explantos foliares en la línea *ProDR5:GFP*. Expresión de GFP durante la formación de raíces adventicias en la base del peciolo de explantos foliares. Los números en las imágenes indican el número de muestras que mostraron el patrón de expresión representado del total de muestras analizadas. dde/hde: días/horas después de la escisión. Las barras de escala indican 200 μm.

Durante la formación de raíces adventicias, el aumento de los niveles intracelulares de auxina, ya sea por causas genéticas, como en el mutante *sur2* (Pacurar et al., 2014), o fisiológicas, como la adición exógena de IBA (ácido indol-3-butírico) (Ludwig-Müller et al., 2005), incrementa la respuesta en la región basal del peciolo, y se confirma que la formación de un máximo de respuesta de auxinas la precede. En resultados recientes del grupo de la Dra. Lin Xu se ha observado que la escisión de la hoja induce la síntesis de auxinas en el limbo foliar a través de la expresión de algunos genes de la familia *YUCCA (YUC)*, como *YUC4* (Chen et al., 2016b) por lo que parte de la auxina acumulada en la zona del corte provendría de síntesis *in situ* y no debido al transporte polar de auxina procedente de los hidatodos.

Se analizó también el enraizamiento adventicio del mutante *axr2-1* (Timpte et al., 1994) que presenta una respuesta a auxinas constitutivamente menor respecto a su fondo genético Col-0. Nuestros resultados muestran que el mutante *axr2-1* es incapaz de generar tantas raíces adventicias como Col-0 a pesar de que el contenido intracelular de auxinas es constante en estos explantos (Figura 5).

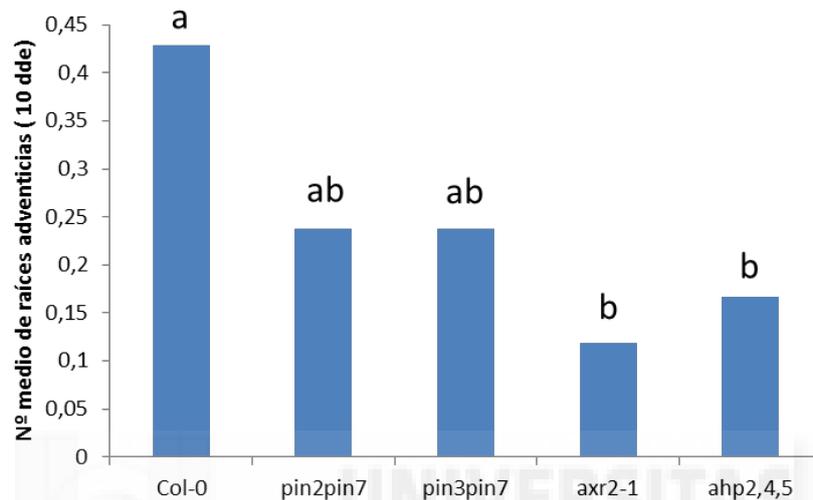


Figura 5.- Capacidad de enraizamiento adventicio de explantos foliares de los mutantes relacionados con el transporte de auxinas (*pin2pin7*, *pin3pin7*), señalización de auxinas (*axr2-1*) y señalización de citoquininas (*ahp2,4,5*) y su fondo genético Col-0. Las letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

4.1.2. Señalización de citoquininas

El gen *ARR5* de *Arabidopsis* codifica un factor de transcripción de la familia de los ARR de tipo A cuya expresión depende de la concentración de citoquinina (To et al., 2004). En ausencia de tratamiento hormonal exógeno, la expresión del gen *ARR5* se restringe a los meristemas apicales, tanto del tallo como de la raíz, y se correlaciona positivamente con las células en división celular (D'Agostino et al., 2000). Para estudiar la señalización de las citoquininas en los explantos foliares hemos utilizado líneas transgénicas de *Arabidopsis* que contienen, en homocigosis, la construcción *ProARR5:GUS:GFP*. Estas líneas contienen un fragmento de 1,5 Kb de la secuencia situada aguas arriba del sitio de inicio de la traducción de *ARR5*, suficiente para inducir la expresión de las secuencias de los genes testigo (*GUS* y *GFP*) mediada por citoquininas. Tras la adición de citoquinina exógena, todas las células de las líneas *ProARR5:GUS:GFP* expresan el gen testigo (D'Agostino et al., 2000).

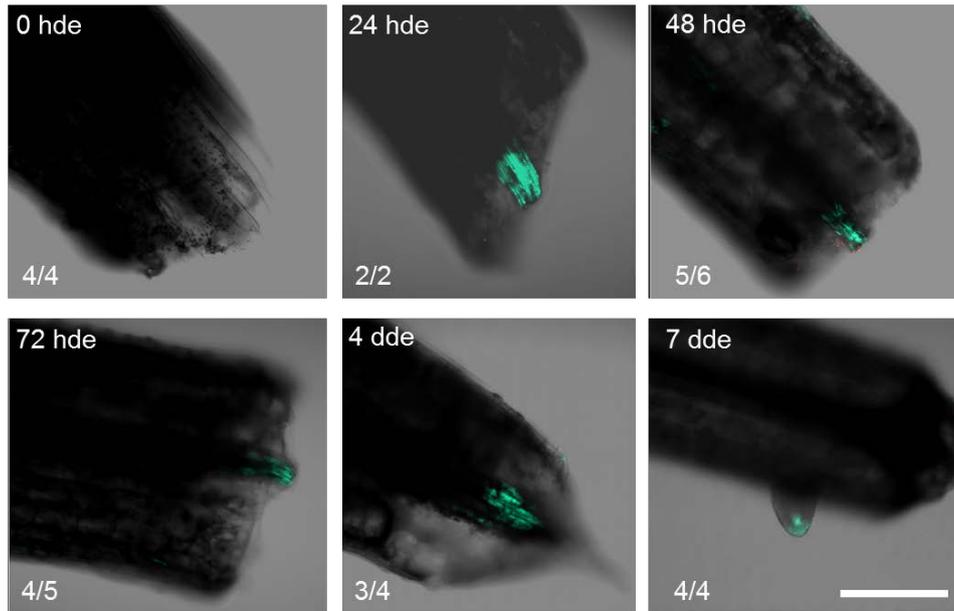


Figura 6.- Formación de raíces adventicias en explantos foliares en la línea *ProARR5:GUS:GFP*. Expresión de GFP durante la formación de raíces adventicias en la base del peciolo de explantos foliares. Se siguen las pautas definidas en la Figura 4.

Tras el análisis mediante microscopía confocal de fluorescencia de estas líneas (Figura 6), podemos confirmar que la expresión del gen GFP se hace patente a partir de las 24 hde en la zona basal del peciolo y se mantiene activa en la región vascular de la zona del corte hasta los 4 dde. A los 7 dde, con la formación de los nuevos primordios, la expresión del gen GFP se restringe a las células centrales de la columela y el centro quiescente, tal como se había descrito previamente (D'Agostino et al., 2000).

Con el objetivo de respaldar los resultados obtenidos y determinar qué tipo de regulación ejercen las citoquininas durante la formación de raíces adventicias, se analizó la capacidad de enraizamiento del triple mutante *arabidopsis histidine phosphotransfer protein2 (ahp2) ahp4 ahp5 (ahp2,4,5)*, afectado en la señalización de estas hormonas. Nuestros resultados muestran que dicho mutante presenta una menor capacidad de producción de raíces adventicias por lo que, durante la formación de este tipo de raíces a partir de explantos foliares, las citoquininas tendrían un papel regulador positivo (Figura 5).

4.2. Estudio de marcadores implicados en la desdiferenciación y especificación celular

Para profundizar en los eventos moleculares que tienen lugar durante la formación de raíces adventicias, hemos estudiado marcadores situados aguas abajo de la señal hormonal que podrían estar implicados en las etapas de desdiferenciación celular y especificación tisular, proliferación celular y determinación de la identidad radicular, respectivamente.

4.2.1 Expresión de *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX11*

WOX11 pertenece a la familia de genes *WOX* (*WUSCHEL-related homeobox*), conocidos por regular activamente diversos procesos del desarrollo vegetal (Zhang et al., 2010). En arroz, *OsWOX11* tiene una función esencial en la formación de las raíces en corona (*crown roots*), típicas de plantas monocotiledóneas, y los mutantes de pérdida de función en este gen son incapaces de generar correctamente este órgano (Zhao et al., 2009). *OsWOX11* actuaría junto con el factor de transcripción *ERF3*, activando la expresión de *RR2*, uno de los últimos componentes de la vía de señalización de las citoquininas que actúa positivamente en el crecimiento de estas raíces (Zhao et al., 2015). En un trabajo reciente del grupo de la Dra. Lin Xu, se ha determinado que *WOX11* y su parólogo *WOX12* son esenciales para la formación de raíces adventicias en explantos foliares de *Arabidopsis thaliana* (Liu et al., 2014). *WOX11* y *WOX12* actúan aguas abajo de la señal de auxina activando la expresión de *LBD16* y *LBD29*, los cuales promueven la transición a células fundadoras de raíces (*root founder cells*) de algunas células del procambium vascular en la región próxima a la herida (Liu et al., 2014).

Dado que la bibliografía existente otorga una función relevante a *WOX11* en la formación de raíces adventicias, se eligió el marcador *ProWOX11:GUS* para su estudio.

Solo fue posible observar expresión del gen *GUS* a las 48 horas después de la escisión. En ningún caso observamos expresión a tiempos anteriores, y solo en 1 de los 25 explantos de tiempos posteriores (72 hde). Este patrón de expresión parece indicar que la acción de *WOX11* solo es necesaria en momentos tempranos y durante un corto periodo de tiempo, en concordancia con su papel inductor durante la formación de las raíces adventicias. Además, estos resultados también muestran que es necesario el previo establecimiento de un máximo de auxinas y citoquininas para permitir la respuesta organogenética, ya que ambos marcadores hormonales (*DR5* y *ARR5*) se expresan antes que *WOX11*.

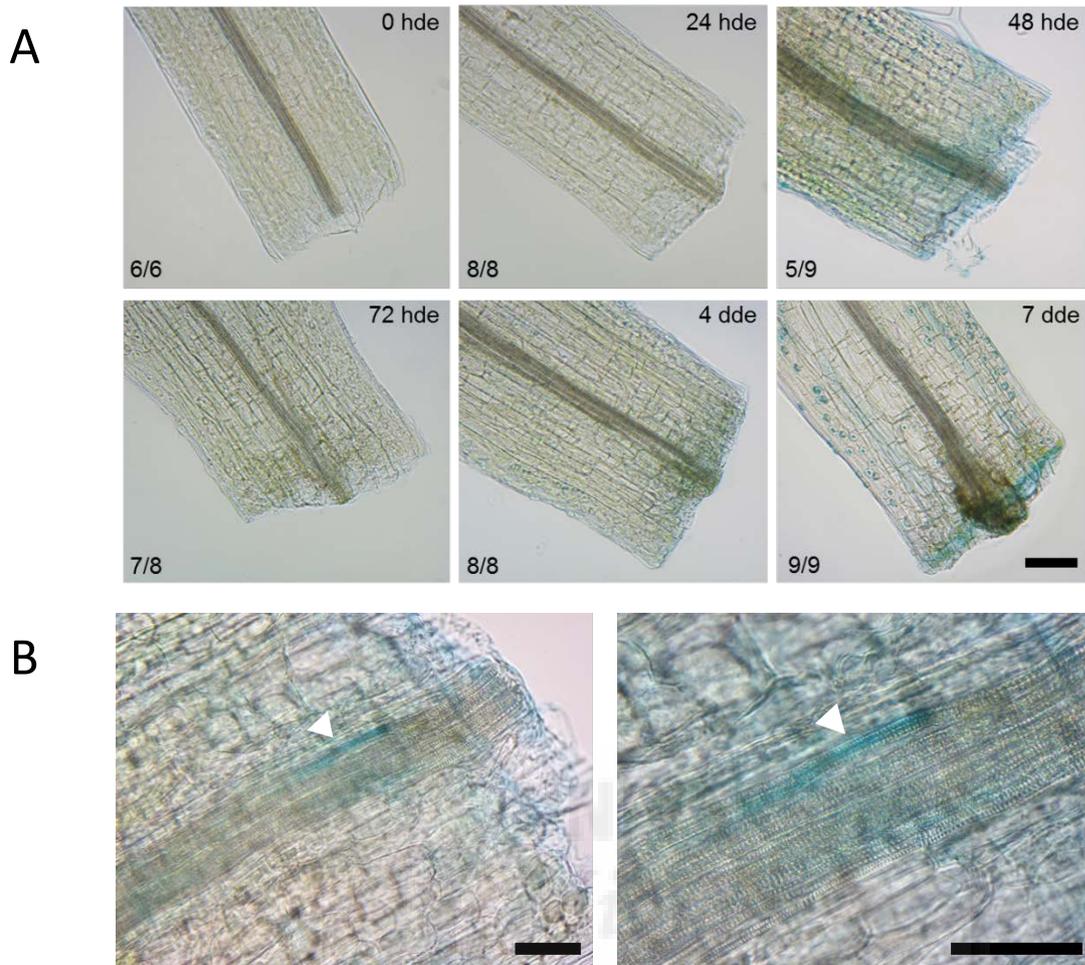


Figura 7.- Formación de raíces adventicias en explantos foliares en la línea *ProWOX11:GUS*. (A) Expresión de GUS durante la formación de raíces adventicias en la base del peciolo de explantos foliares. Se siguen las pautas definidas en la Figura 4. (B) Detalle de la expresión de *GUS* en explanto foliar 48 hde. La barra de escala indica 100 μm .

4.2.2 Expresión de marcadores de identidad del periciclo

A partir del sistema GAL4/UAS de *Drosophila melanogaster* (Brand y Perrimon, 1993), el Prof. Jim Haseloff desarrolló un sistema equivalente en *Arabidopsis* que ha permitido la obtención de líneas marcadoras que expresan la proteína GFP en tejidos concretos (Haseloff et al., 1999). Dos de estas líneas, *J0192* y *J0121*, presentan una expresión localizada de la GFP en las células del periciclo tanto de la raíz principal como de las laterales (Laplaze et al., 2005; Figura 8).

En el hipocótilo de *Arabidopsis*, las raíces adventicias surgen a partir de células del periciclo siguiendo un patrón similar al de las raíces laterales (Verstraeten et al., 2014). Para determinar si en los peciolo existían células con identidad de periciclo o si se inducía esta

identidad durante la formación de raíces adventicias, hemos estudiado la expresión de GFP en explantos foliares de la línea *J0121*.

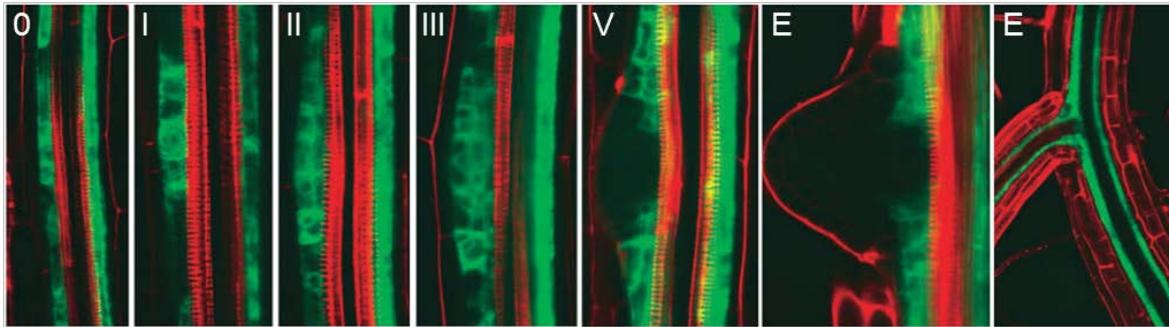


Figura 8.- Formación de raíces laterales en la línea *J0121*. En verde, expresión de GFP en los distintos estadios de la formación de raíces laterales de acuerdo a la clasificación de Malamy et al. (1997). E: Emergencia de la raíz. En rojo se muestra la pared celular de los haces vasculares y de la epidermis radicular. Tomado de Dubrovsky et al. (2006), con ligeras modificaciones.

Desde el momento del corte (0 hde) y hasta el final del experimento (7 dde) se observó expresión de *GFP* en las células de la epidermis del peciolo de los explantos (Figura 9). Sin embargo, en las células de la región vascular sólo se observó expresión de *GFP* a partir de las 48 hde, cuya intensidad se incrementó durante el experimento, alcanzando todo el haz vascular del peciolo a los 7 dde (Figura 9).

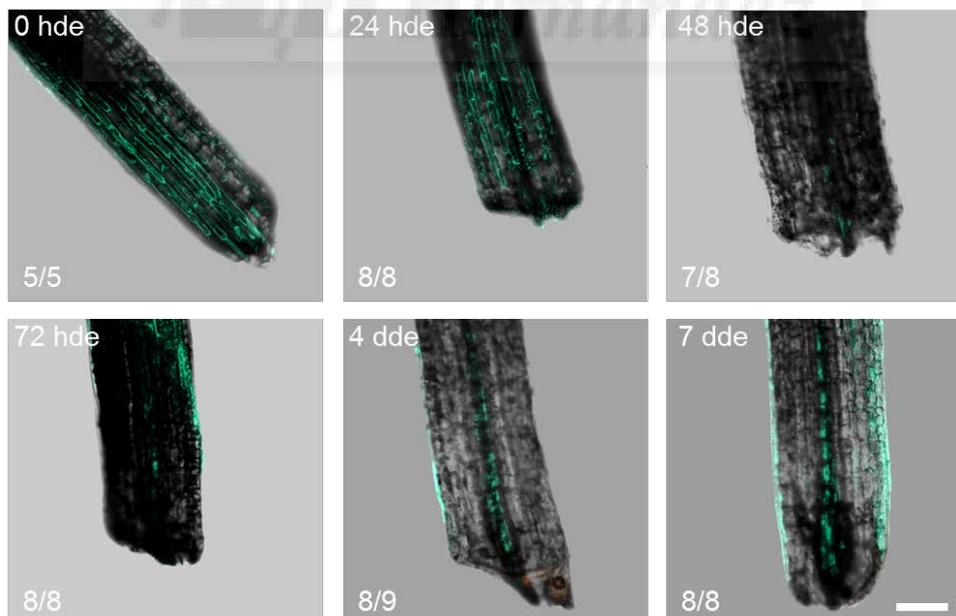


Figura 9.- Formación de raíces adventicias en explantos foliares en la línea *J0121*. Expresión de GFP durante la formación de raíces adventicias en la base del peciolo de explantos foliares. Se siguen las pautas definidas en la Figura 4.

Durante la formación de la raíz lateral, la expresión de la GFP en la línea *J0121* permanece constante en el periciclo hasta que el primordio llega a la fase III, momento en el que ésta disminuye localmente. En etapas más tardías del desarrollo de la raíz lateral, la expresión de la GFP se observó en la zona de unión del periciclo de la raíz lateral con el periciclo de la raíz principal (Dubrovsky et al., 2006; Figura 8). Siguiendo una deducción similar, las regiones del peciolo en las que no se visualiza la GFP serían, presumiblemente, zonas en las que se estarían dando las condiciones necesarias para la formación de raíces adventicias.

Para confirmar los resultados obtenidos, hemos analizado también la expresión del gen *GFP* en la línea *J2661*. Esta línea expresa el gen *GFP* en células del periciclo de la raíz, concretamente en las zonas de elongación y diferenciación (Levesque et al., 2006). Al contrario que en la línea *J0121*, fue posible observar fluorescencia procedente de la GFP a tiempo 0 tras el corte. No obstante, al igual que en la línea *J0121*, la intensidad de la fluorescencia fue aumentando progresivamente a lo largo de los días tras la escisión (Figura 10). Este patrón de expresión parece indicar que antes de la escisión existe cierta identidad de periciclo en las células de los haces vasculares, aunque ésta se intensifica durante la respuesta organogénica.

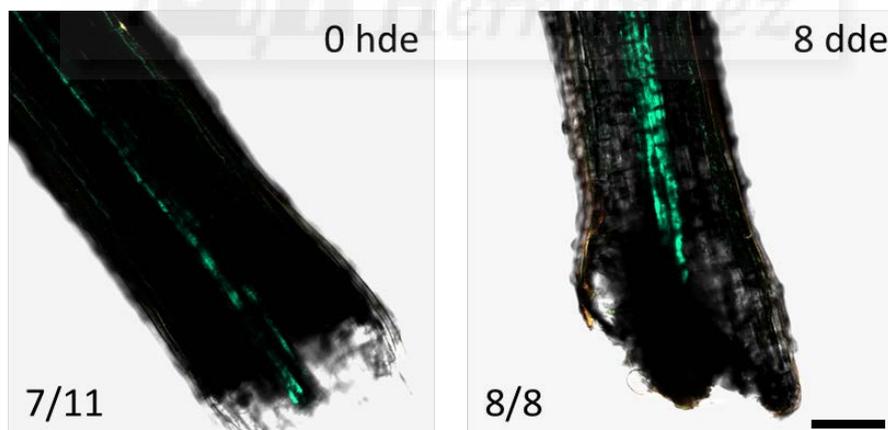


Figura 10.- Inducción de la expresión del gen *GFP* en la línea *J2661*. Se siguen las pautas definidas en la Figura 4.

4.2.3 Expresión de *GATA23*

GATA23 pertenece a la familia *GATA* de factores de transcripción, que en *Arabidopsis* comprende unos 30 miembros implicados en distintos procesos del desarrollo (Behringer y Schwechheimer, 2015). *GATA23* se expresa de manera específica durante la formación de

raíces laterales en las células del periciclo adyacentes al xilema, antes de que comience la primera división asimétrica que dará origen a la formación de las raíces laterales (De Rybel et al., 2010). Su función en la inducción de las raíces laterales se sitúa aguas abajo de la auxina, en la ruta del represor IAA28 y de los reguladores positivos ARF7 y ARF19 (Singh et al., 2012).

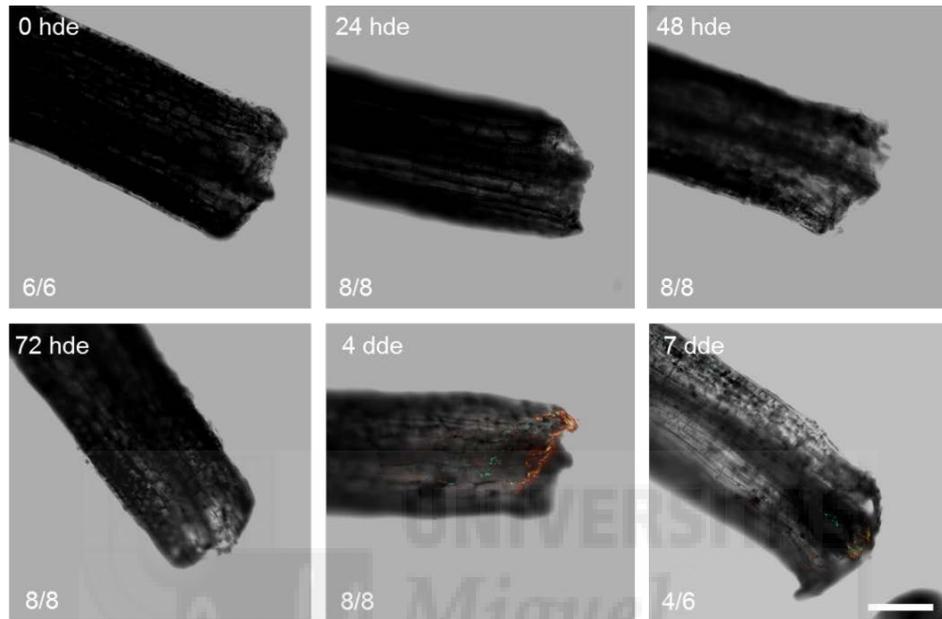


Figura 11.- Formación de raíces adventicias en explantos foliares en la línea *ProGATA23:NLS:GFP*. Expresión de GFP durante la formación de raíces adventicias en la base del peciolo de explantos foliares. Se siguen las pautas definidas en la Figura 4.

Como se puede observar en la Figura 11, la expresión de *GFP* en las líneas *ProGATA23:NLS:GFP* no se hizo patente hasta los 7 dde, cuando empezaron a formarse los primordios de las raíces adventicias. En ningún caso hemos observado expresión de *GFP* a tiempos anteriores. En un trabajo previo se observó que *GATA23* se expresa en una región concreta del primordio de la raíz principal 10 h tras la germinación (De Rybel et al., 2010). A diferencia de lo que ocurre en la formación de raíces laterales, en la que la función de *GATA23* se requiere en la etapa de inducción (De Rybel et al., 2010), nuestros resultados sugieren que *GATA23* no se requiere para la inducción de las raíces adventicias. Estos resultados son coherentes con la hipótesis de que la inducción de las raíces laterales y adventicias seguirían programas genéticos distintos (Ruiz-Cano, 2014, Verstraeten et al., 2014). Se necesitan estudios genéticos adicionales para confirmar esta hipótesis de trabajo.

4.3 Estudio de marcadores implicados en la proliferación celular

4.3.1 Expresión de *CYCLINB1;1*

El genoma de *Arabidopsis* codifica para 49 ciclinas que se clasifican en 10 subfamilias. La mayoría de las ciclinas se agrupan en 3 categorías: de tipo A, de tipo B y de tipo D. Las ciclinas de tipo A y D participan en la transición de la fase G1 a la fase S, y las de tipo B se requieren en la transición entre las fases G2 y M para la entrada de la célula en mitosis (Wang et al., 2004). Las ciclinas de tipo B se utilizan como marcadores de proliferación celular (Dewitte y Murray, 2003). La línea *ProCYCB1;1:CYCB1;1:GFP* que hemos analizado se había utilizado previamente para cuantificar las divisiones celulares en los distintos tejidos del meristemo apical del tallo (Reddy et al., 2004) y en raíces (Beeckman et al., 2001).

Las imágenes de microscopía confocal utilizando la línea *ProCYCB1;1:CYCB1;1:GFP* nos han permitido confirmar la existencia de actividad mitótica en las células colindantes al haz vascular en la región de la herida desde los 4 dde (Figura 12). Estos resultados coinciden con las observaciones histológicas previas en las que se observó el desarrollo de una estructura proliferativa en la base del peciolo entre 4 y 7 dde (Fernández-López, 2016).

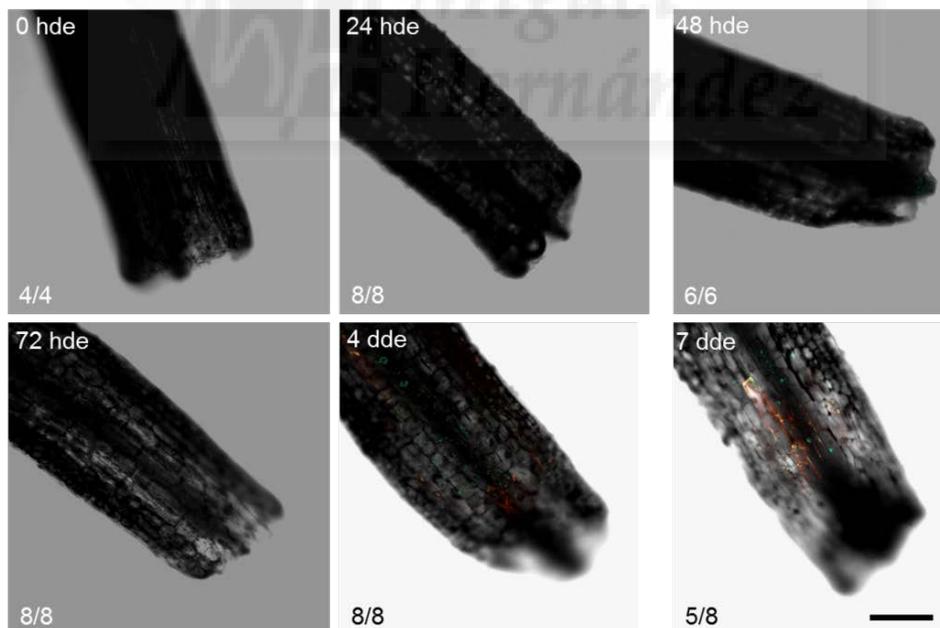


Figura 12.- Formación de raíces adventicias en explantos foliares en la línea *ProCYCB1;1:CYCB1;1:GFP*. Expresión de GFP durante la formación de raíces adventicias en la base del peciolo de explantos foliares. Se siguen las pautas definidas en la Figura 4.

Dada la existencia de redundancia génica en la familia de las ciclinas, no podemos descartar que se hayan producido divisiones celulares antes de los 4 dde pero que pudieran estar reguladas por otras ciclinas. Nuestros resultados confirman que la formación de raíces adventicias en explantos foliares de *Arabidopsis* se produce por la vía de la organogénesis indirecta, dado que la formación de un callo precede al establecimiento de los primordios radiculares.

4.4 Estudio de marcadores implicados en la determinación de la identidad radicular

4.4.1 Expresión de *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX5*

En el ápice radicular, el centro quiescente está formado por un grupo de células carentes de actividad mitótica que contacta con las células con capacidad pluripotente del meristemo y mantiene su estado indiferenciado a través de una señalización directa (Sabatini et al., 2003, van den Berg et al., 1997). *WOX5* se expresa de manera específica en el centro quiescente y tiene una función esencial en este proceso (Kong et al., 2015), por lo que se ha utilizado éste como marcador de la identidad del nicho de células madre en raíces, tanto laterales como adventicias (Della Rovere et al., 2013).



Figura 13.- Formación de raíces adventicias en explantos foliares en la línea *ProWOX5:YFP ; ProCYCB1;1:CYCB1;1:GFP*. Expresión de GFP durante la formación de raíces adventicias en la base del peciolo de explantos foliares. Las flechas blancas indican la fluorescencia procedente de la YFP. Se siguen las pautas definidas en la Figura 4.

En el laboratorio disponíamos de líneas que contenían las construcciones *ProWOX5:YFP* y *ProCycb1;1:CYCB1;1:GFP* en la misma planta. Dado que no nos ha sido posible separar la fluorescencia de la GFP y la YFP, la comparación de los resultados obtenidos con esta línea y los de la línea *ProCYCB1;1:CYCB1;1:GFP* nos han permitido separar

la expresión de *ProWOX5:YFP*. Hemos encontrado expresión de la YFP a partir de los 7 dde en la región adyacente superior a las estructuras proliferativas identificadas en la base del peciolo (Figura 13). Dado que a nivel histológico los primordios no son aparentes, nuestros resultados sugieren que la expresión de *WOX5* precede a la formación del primordio radicular. Esto coincide con resultados previos (Liu et al., 2014, Weelander et al., 2014), en los que la expresión de *WOX5* en las raíces adventicias se induce tras las primeras divisiones celulares asimétricas. En este punto, *WOX5* organizaría el centro quiescente, alrededor del cual se organizaría el nicho de células madre de la nueva raíz adventicia en formación.

Son muchos los estudios que proponen que el balance de auxinas y citoquininas regula la función de *WOX5* en la región del centro quiescente (Della Rovere et al., 2016; 2013, Zhang et al., 2013, Ding y Friml, 2010). En estos estudios se concluye que es necesaria una regulación fina de los niveles de auxinas y de citoquininas endógenas para el correcto desarrollo de las células iniciadoras en la región del centro quiescente.

4.5. Expresión de algunos genes marcadores durante la formación de raíces adventicias en mutantes

Para cada etapa de las que hemos identificado en el apartado anterior, hemos seleccionado un gen representativo para confirmar su utilidad en la caracterización de mutantes afectados en la formación de raíces adventicias.

- **Etapa 1:** respuesta hormonal de auxinas y citoquininas: *SOLITARY ROOT (SLR) / IAA14*. Hemos escogido el gen *SLR/IAA14* como marcador de la respuesta hormonal primaria ya que ha demostrado ser inducible ante el aumento de la concentración de auxina intracelular. Además, se ha descrito que *SLR/IAA14* tiene un papel fundamental en procesos del desarrollo relacionados con las auxinas, como la formación de raíces laterales y de pelos radiculares o la respuesta gravitrópica (Fukaki et al., 2002).
- **Etapa 2:** reprogramación celular de las células iniciadoras: *WOX11*. Como se ha comentado anteriormente, *WOX11* es responsable de la diferenciación a célula fundadora de raíces (root founder cell) mediante su asociación con *WOX12*. De manera conjunta, *WOX11/WOX12* son capaces de activar la expresión de *LBD16* y *LBD29*, que promueven la transición a célula fundadora de raíces a partir de células del procambium foliar (Liu et al., 2014).

- **Etapa 3:** activación de la proliferación celular: *CycB1;1*. Se eligió el gen *CycB1;1* como representante de las ciclinas de tipo B, protagonistas en el paso de la fase G2 del ciclo celular a la fase M. Este tipo de ciclinas se expresan en tejidos proliferativos ya que inducen la entrada de la célula a la mitosis (Wang et al., 2004).
- **Etapa 4:** especificación de la identidad radicular: *WOX5*. Dado que *WOX5* es el gen principal que se encarga de la formación y la conservación del centro quiescente, tanto en raíz principal como en raíces laterales y adventicias consideramos que el gen *WOX5* puede servir como marcador de la especificación de la identidad radicular ya que su expresión está indicando la presencia de un primordio radicular organizado (Della Rovere et al., 2013).

Para llevar a cabo estos análisis, se ha estudiado la expresión de estos genes mediante retrotranscripción del ARNm seguida de PCR cuantitativa (*RT-qPCR*) a cuatro tiempos (0, 2, 7 y 10 días) después de la escisión y en tres genotipos que difieren en la formación de raíces adventicias en explantos foliares: el silvestre Col-0 y los mutantes *mars1-2* y *lars3-1* (Fernández-López, 2016). El mutante *mars1-2* se caracteriza por desarrollar un mayor número de raíces por explanto y presenta, en homocigosis, una inserción en el gen *MARS1* implicado en la diferenciación del tejido vascular (Fernández-López, 2016). El mutante *lars3-1* presenta un retraso considerable en la formación de callo y, en consecuencia, un menor número de raíces adventicias por explanto; *lars3-1* presenta, en homocigosis, una inserción en un gen que codifica una helicasa de ARN que participa en la biogénesis de ARN ribosómico (Fernández-López, 2016).

4.5.1. Expresión de *SLR/IAA14*

Hemos determinado que los niveles de expresión de *SLR/IAA14* se inducen de manera significativa tras la escisión tanto en Col-0 como en el mutante *mars1-2* (Figura 14). El mutante *mars1-2* presenta una mayor expresión de este gen que el silvestre en todos los tiempos estudiados. Por otro lado, aunque el mutante *lars3-1* presenta un mayor nivel de expresión basal de *SLR/IAA14* que el silvestre, su expresión no cambia, e incluso se reduce, tras la escisión de los explantos foliares (Figura 14).

Se conocía con anterioridad que la proteína *SLR/IAA14* se degrada en respuesta a niveles elevados de auxina y que actúa como un represor de la formación de raíces laterales

(Fukaki et al., 2002). Por otro lado, se sabe que la expresión de los genes Aux/IAA, como *SLR/IAA14*, se induce por auxina (Fukaki et al., 2002).

Nuestros resultados son coherentes con la hipótesis de que el mutante *mars1-2* presenta una respuesta hipersensible a la auxina mientras que el mutante *lars3-1* presentaría una respuesta a auxinas similar a la de la estirpe silvestre. Son necesarios experimentos adicionales para confirmar que la diferente sensibilidad a las auxinas en los mutantes *mars1-2* causaría las diferencias observadas en la formación de raíces adventicias en explantos foliares entre sí y con respecto al silvestre Col-0.

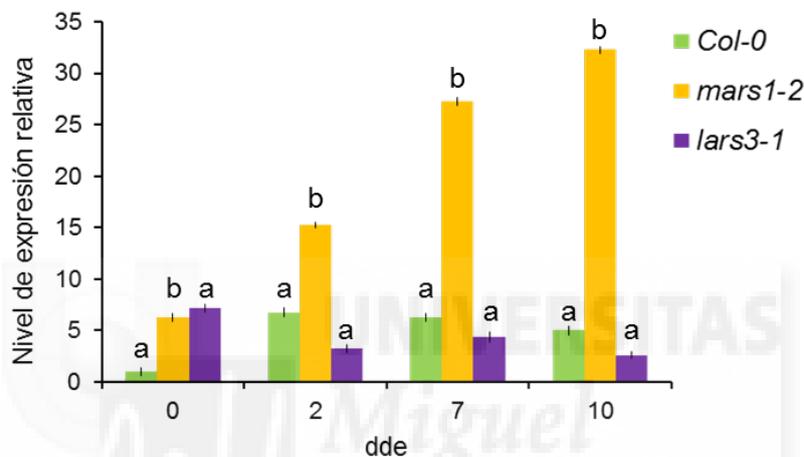


Figura 14.- Expresión de *SLR/IAA14* durante la formación de raíces adventicias en explantos foliares en distintos genotipos. Las barras indican la expresión relativa del gen *SLR/IAA14* respecto a la expresión a tiempo 0 en el silvestre Col-0, calculada según el método del $2^{-\Delta\Delta C_T}$. La expresión del gen *SLR/IAA14* se normalizó respecto a la expresión del gen de referencia At4g26410. Las letras minúsculas indican las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$) entre los distintos genotipos ensayadas. dde: días después de la escisión.

4.5.2. Expresión de *WOX11*

En la Figura 16 se muestran los resultados de expresión relativa de *WOX11* en los explantos foliares de la estirpe silvestre Col-0 y en los dos mutantes afectados en la formación de raíces adventicias. Tanto en el silvestre como en el mutante *mars1-2* se observa que los niveles basales (0 hde) de *WOX11* se incrementan a partir de los 2 dde, lo que coincide con los resultados observados en las líneas *ProWOX11:GUS*. Además, en el mutante *mars1-2* los niveles de expresión de *WOX11* son sensiblemente superiores a los de la estirpe silvestre a partir de los 7 dde (Figura 15). Por otro lado, el mutante *lars3-1* presenta unos niveles relativos de *WOX11* significativamente mayores que los dos genotipos

anteriores. La explicación más probable es que se esté dando una acumulación del transcrito de *WOX11* ante la imposibilidad de *lars3-1* de llevar a cabo las primeras divisiones formativas y, por lo tanto, pasar de la fase de inducción a la de iniciación del primordio, donde *WOX11* ya no es necesario. Estos resultados sugieren que *WOX11* podría actuar como limitante de la señal hormonal inicial en la etapa de inducción de los primordios.

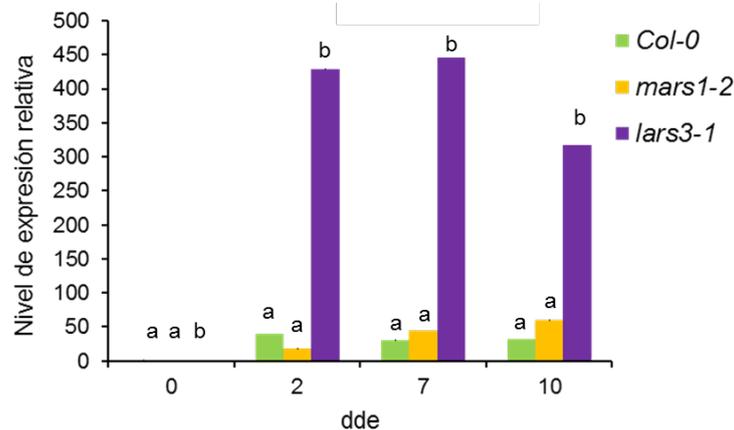


Figura 15.- Expresión de *WOX11* durante la formación de raíces adventicias en explantos foliares en distintos genotipos. Se siguen las pautas definidas en la Figura 14.

4.5.3. Expresión de *CYCB1;1*

Tanto en la estirpe silvestre como en el mutante *mars1-2*, los niveles de expresión del marcador *CycB1;1* aumentan durante la formación de raíces adventicias (Figura 16), lo que concuerda con estudios histológicos previos que indican la formación de tejido proliferativo a partir de los 4 dde (Fernández-López, 2016). En contraste con estos dos genotipos, el mutante *lars3-1* muestra mayores niveles de expresión de *CycB1;1* a todos los tiempos estudiados (Figura 16).

A nivel histológico, los mutantes *lars3-1* presentaron ausencia de proliferación celular en la región vascular del peciolo próxima al corte y no se observó la formación de callos a los 7 dde, como en la estirpe silvestre (Fernández-López, 2016). En *Arabidopsis* se han descrito mutantes afectados en la regulación del ciclo celular, como *bin4*, en los que también se ha observado un aumento de los niveles de expresión basal del gen *CycB1;1* en ausencia de proliferación celular (Breuer et al., 2007). *BIN4* codifica un componente de una ADN topoisomerasa que se requiere durante la fase S del ciclo celular y sus mutaciones de pérdida de función causan defectos durante la división celular (Breuer et al., 2007). Se ha propuesto la existencia de un mecanismo de compensación de defectos del ciclo celular a

Curiosamente, el gen *LARS3* codifica una helicasa de ARN que también participa en la biogénesis de ARN ribosómico (Fernández-López, 2016). Hemos realizado un alineamiento *in silico* utilizando la herramienta Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) entre estas dos proteínas y hemos determinado que el residuo de Thr231 se encuentra conservado (Figura 17), por lo que la actividad de *LARS3* durante el ciclo celular podría estar regulada de manera similar a la descrita para su homólogo DDX3.

4.5.4. Expresión de *WOX5*

En la estirpe silvestre, la expresión de *WOX5* aumenta a partir de los 7 dde (Figura 18), lo que coincide con los resultados que hemos obtenido previamente con la línea *ProWOX5:YFP*. En el mutante *mars1-2* los niveles basales de expresión de *WOX5* son mayores y aumentan significativamente a los 7 dde, en consonancia con el mayor número de raíces adventicias que se forman en este mutante (Figura 18). Por el contrario, en el mutante *lars3-1*, los niveles de expresión de *WOX5* no cambian durante el experimento (Figura 18), en consonancia con el menor número de raíces adventicias que se forman en este mutante. Estos resultados apoyan la hipótesis de que este mutante presenta un bloqueo en el paso de la etapa de inducción a la de iniciación de los primordios.

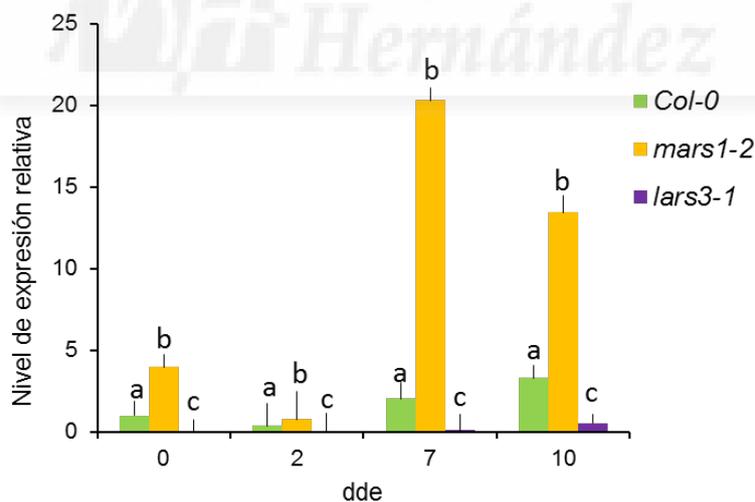


Figura 18.- Expresión de *WOX5* durante la formación de raíces adventicias en explantos foliares en distintos genotipos. Se siguen las pautas definidas en la Figura 14.



CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

5 CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

- Uno de los primeros eventos observables después de la escisión de la hoja es la generación de un máximo de respuesta a auxinas en algunas células del haz vascular cercanas a la herida, seguido de la respuesta local de citoquininas en la misma región.
- Aguas abajo de la señalización hormonal, la expresión localizada de *WOX11* especifica las células iniciadoras de las raíces adventicias. Nuestros resultados confirman la utilidad de *WOX11* como marcador específico de la etapa de inducción.
- A la activación local de la proliferación celular le sigue la adquisición de identidad de tejido radicular, por la expresión de marcadores de periciclo (*JO121*, *J2661*) y del centro quiescente (*WOX5*).
- Nuestro trabajo ha permitido determinar que el gen *GATA23*, a diferencia de su contribución en la formación de raíces laterales, no participa en la inducción de las adventicias. Este hecho apoya la hipótesis de que la etapa de inducción de raíces laterales y la de raíces adventicias no seguirían la misma ruta.
- Los marcadores que hemos utilizado en este trabajo han hecho posible la caracterización preliminar de algunos mutantes afectados en la regeneración radicular, como *mars1-2* o *lars3-1*.
- El mutante *mars1-2*, con más raíces adventicias que el silvestre, presentó una mayor respuesta a auxinas respecto a su fondo genético; mientras que el mutante *lars3-1*, con menos raíces adventicias, presentó un bloque en la etapa de inducción de raíces adventicias.

El estudio de otros marcadores asociados a la identidad radicular, como *SCARECROW* (*SCR*) o *SHORT-ROOT* (*SHR*), a la señalización hormonal del estrés abiótico como *JASMONATE ZIM-DOMAIN* (*JAZ*) o a la reparación de tejidos como *ANAC071*, nos permitirá establecer la relación existente entre los mecanismos de respuesta a herida y de la formación de raíces adventicias. Además, el análisis de la expresión de estos marcadores en líneas mutantes afectadas en la regeneración radicular, aisladas previamente en el laboratorio (Fernández-López, 2016; Ruiz-Cano, 2014), permitirá seleccionar mutantes afectados en etapas específicas, como la desdiferenciación celular o la especificación de los primordios.



BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Agulló-Antón, M.A., Olmos, E., Pérez-Pérez, J.M., Acosta, M.** (2013) Evaluation of ploidy level and endoreduplication in carnation (*Dianthus* spp.). *Plant Sci* **201-202**: 1-11.
- Ahkami, A.H., Melzer, M., Ghaffari, M.R., Pollmann, S., Ghorbani Javid, M., Shahinnia, F., Hajirezaei, M.R., Druge, U.** (2013) Distribution of indole-3-acetic acid in *Petunia hybrida* shoot tip cuttings and relationship between auxin transport, carbohydrate metabolism and adventitious root formation. *Planta* **238**: 499-517.
- Ariumi, Y.** (2014) Multiple functions of DDX3 RNA helicase in gene regulation, tumorigenesis, and viral infection. *Front Genet* **5**: 423.
- Beeckman, T., Bursens, S., Inze, D., Moleculaire, V., Plantengenetica, D., Interuniversitair, V.** (2001) The peri-cell cycle in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **52**: 403-411.
- Behringer, C., Schwechheimer, C.** (2015) B-GATA transcription factors - insights into their structure, regulation, and role in plant development. *Front Plant Sci* **6**: 90.
- Bellini, C., Pacurar, D.I., Perrone, I.** (2014) Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Annu Rev Plant Biol* **65**: 639-666.
- Van Den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Scheres, B.** (1997) Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* **390**: 287-289.
- 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.
- Bollmark, M., Eliasson, L.** (1986) Effects of exogenous cytokinins on root-formation in pea cuttings. *Physiol Plant* **68**: 662-666.
- Brand, A.H., Perrimon, N.** (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **415**: 401-415.
- Breuer, C., Stacey, N.J., West, C.E., Zhao, Y., Chory, J., Tsukaya, H., Azumi, Y., Maxwell, A., Roberts, K., Sugimoto-Shirasu, K.** (2007) BIN4, a novel component of the plant DNA topoisomerase VI complex, is required for endoreduplication in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 3655-68.
- Caboni, E., Tonelli, M.G., Lauri, P., Lacovacci, P., Kevers, C., Damiano, C., Gaspar, T.,** (1997) Biochemical aspects of almond microcuttings related to in vitro rooting ability. *Biol Plant* **39**: 91-97.
- Calo, E., Flynn, R.A., Martin, L., Spitale, R.C., Chang, H.Y., Wysocka, J.** (2015) RNA helicase DDX21 coordinates transcription and ribosomal RNA processing. *Nature* **518**: 249-253.
- Cano, E., Pérez-Pérez, J.M., Acosta, M.** (2014) Adventitious root development in ornamental plants: insights from carnation stem cuttings. *Soil Biology Series: Root engineering* **40**: 423-441.
- Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., Sandberg, G., Bennett, M.J.** (2003) Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci* **8**: 165-171.
- Cecchetti, V., Altamura, M.M., Falasca, G., Costantino, P., Cardarelli, M.** (2008) Auxin regulates *Arabidopsis* anther dehiscence, pollen maturation, and filament elongation. *Plant Cell* **20**: 1760-1774.
- Chandler, J.W.** (2016) Auxin response factors. *Plant Cell Environ* **39**: 1014-1028.
- Chen, X., Cheng, J., Chen, L., Zhang, G., Huang, H., Zhang, Y., Xu, L.** (2016a) Auxin-Independent NAC Pathway Acts in Response to Explant-Specific Wounding and Promotes Root Tip Emergence during *de Novo* Root Organogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **170**: 2136-2145.
- Chen, L., Tong, J., Xiao, L., Ruan, Y., Liu, J., Zeng, M., Huang, H., Wang, J.-W., Xu, L.** (2016b) YUCCA-mediated auxin biogenesis is required for cell fate transition occurring during *de novo* root organogenesis in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **67**: 4273-4284.
- Chen, X., Qu, Y., Sheng, L., Liu, J., Huang, H., Xu, L.** (2014) A simple method suitable to study *de novo* root organogenesis. *Front Plant Sci* **5**: 208.
- da Rocha Correa, L., Troleis, J., Mastroberti, A.A., Mastroberti, J.E., Fett-Neto, A.G.** (2012) Distinct modes of adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol (Stuttg)* **14**: 100-109.
- Coudert, Y., Périn, C., Courtois, B., Khong, N.G., Gantet, P.** (2010) Genetic control of root development in rice, the model cereal. *Trends Plant Sci* **15**: 219-226.
- Culligan, K.M., Robertson, C.E., Foreman, J., Doerner, P., Britt, A.B.** (2006) ATR and ATM play both distinct and additive roles in response to ionizing radiation. *Plant J* **48**: 947-961.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K.** (2005) Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization. *Plant Physiol* **139**: 5-17.

- D'Agostino, I.B., Deruere, J., Kieber, J.J., (2000) Characterization of the Response of the Arabidopsis Response Regulator Gene Family to Cytokinin. *Plant Physiol* **124**: 1706–1717.
- Dai, X., Mashiguchi, K., Chen, Q., Kasahara, H., Kamiya, Y., Ojha, S., DuBois, J., Ballou, D., Zhao, Y. (2013) The biochemical mechanism of auxin biosynthesis by an *Arabidopsis* YUCCA flavin-containing monooxygenase. *J Biol Chem* **288**: 1448–1457.
- de Klerk, G.J., Van der Krieken, W., De Jong, J.C. (1999) The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cell Develop Biol Plant* **35**: 189-199.
- De Rybel, B., Vassileva, V., Parizot, B., Demeulenaere, M., Grunewald, W., Audenaert, D., Van Campenhout, J., Overvoorde, P., Jansen, L., Vanneste, S., Möller, B., Wilson, M., Holman, T., Van Isterdael, G., Brunoud, G., Vuylsteke, M., Vernoux, T., De Veylder, L., Inzé, D., Weijers, D., Bennett, M.J., Beeckman, T. (2010) A novel aux/IAA28 signaling cascade activates GATA23-dependent specification of lateral root founder cell identity. *Curr Biol* **20**: 1697–1706.
- De Smet, I., Tetsumura, T., De Rybel, B., Frei dit Frey, N., Laplaze, L., Casimiro, I., Swarup, R., Naudts, M., Vanneste, S., Audenaert, D., Inzé, D., Bennett, M.J., Beeckman, T. (2007) Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of Arabidopsis. *Development* **134**: 681–90.
- Della Rovere, F., Fattorini, L., D'Angeli, S., Velocchia, A., Falasca, G., Altamura, M.M. (2013) Auxin and cytokinin control formation of the quiescent centre in the adventitious root apex of Arabidopsis. *Ann Bot* **112**: 1395–407.
- Della Rovere, F., Fattorini, L., Ronzan, M., Falasca, G., Altamura, M.M. (2016) The quiescent center and the stem cell niche in the adventitious roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav* **11**: e1176660.
- Dewitte, W., Murray, J.A.H. (2003) The plant cell cycle. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 235–264.
- Ding, Z. (2010) Auxin regulates distal stem cell differentiation in *Arabidopsis* roots. *PNAS* **107**: 12046–12051.
- Dubrovsky, J.G., Gambetta, G. a, Hernández-Barrera, a, Shishkova, S., González, I. (2006) Lateral root initiation in *Arabidopsis*: developmental window, spatial patterning, density and predictability. *Ann Bot* **97**: 903–915.
- El-Showk, S., Ruonala, R., Helariutta, Y. (2013) Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development* **140**: 1373–1383.
- Fernández-López, M.A. (2016) Caracterización de mutantes de *Arabidopsis thaliana* afectados en la formación de raíces adventicias. Trabajo de fin de Máster, Universidad Miguel Hernández.
- Fukaki, H., Tameda, S., Masuda, H., Tasaka, M. (2002) Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the *SOLITARY-ROOT/IAA14* gene of *Arabidopsis*. *Plant J* **29**: 153–168.
- Goh, T., Toyokura, K., Wells, D.M., Swarup, K., Yamamoto, M., Mimura, T., Weijers, D., Fukaki, H., Laplaze, L., Bennett, M.J., Guyomarc'h, S. (2016) Quiescent center initiation in the *Arabidopsis* lateral root primordia is dependent on the *SCARECROW* transcription factor. *Development*. En prensa.
- Guenin, S., Mareck, A., Rayon, C., Lamour, R., Ndong, Y.A., Domon, J.M., Senechal, F., Fournet, F., Jamet, E., Canut, H., Perococo, G., Mouille, G., Rolland, A., Rusterucci, C., Guerinéau, F., Van Wuytswinkel, O., Gillet, F., Driouch, A., Lerouge, P., Gutierrez, L., Pelloux, J. (2011) Identification of pectin methylesterase 3 as a basic pectin methylesterase isoform involved in adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **192**: 114–126.
- Gutierrez, L., Bussell, J.D., Pacurar, D.I., Schwambach, J., Pacurar, M., Bellini, C. (2009) Phenotypic plasticity of adventitious rooting in *Arabidopsis* is controlled by complex regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR transcripts and microRNA abundance. *Plant Cell* **21**: 3119-3132.
- Gutierrez, L., Mongelard, G., Flokova, K., Pacurar, D.I., Novak, O., Staswick, P., Kowalczyk, M., Pacurar, M., Demailly, H., Geiss, G., Bellini, C. (2012) Auxin controls *Arabidopsis* adventitious root initiation by regulating jasmonic acid homeostasis. *Plant Cell* **24**: 2515-2527.
- Haseloff, J. (1999) GFP variants for multispectral imaging of living cells. *Methods Cell Biol* **58**: 139–151.
- Hirose, N., Takei, K., Kuroha, T., Kamada-Nobusada, T., Hayashi, H., Sakakibara, H. (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J Exp Bot* **59**: 75–83.
- Hochholdinger, F. (2009) The Maize Root System: Morphology, Anatomy, and Genetics. *Handbook of Maize: Its Biology*. : 145–160.
- Hutchison, C.E., Li, J., Argueso, C., Gonzalez, M., Lee, E., Lewis, M.W., Maxwell, B.B., Perdue, T.D., Schaller, G.E., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Kieber, J.J. (2006) The *Arabidopsis* histidine

- phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* **18**: 3073–3087.
- Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A., Sugimoto, K.** (2016) Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *Development* **143**: 1442–1451.
- Jones, B., Gunnerås, S.A., Petersson, S.V., Tarkowski, P., Graham, N., May, S., Dolezal, K., Sandberg, G., Ljung, K.** (2010) Cytokinin regulation of auxin synthesis in *Arabidopsis* involves a homeostatic feedback loop regulated via auxin and cytokinin signal transduction. *Plant Cell* **22**: 2956–2969.
- Koenig, D., Bayer, E., Kang, J., Kuhlemeier, C., Sinha, N.** (2009) Auxin patterns *Solanum lycopersicum* leaf morphogenesis. *Development* **136**: 2997–3006.
- Kong, X., Lu, S., Tian, H., Ding, Z.** (2015) WOX5 is Shining in the Root Stem Cell Niche. *Trends Plant Sci* **20**: 601–603.
- Křeček, P., Skůpa, P., Libus, J., Naramoto, S., Tejos, R., Friml, J., Zažímalová, E.** (2009) Protein family review The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biol* **10**: 1–11.
- Krogan, N.T., Yin, X., Ckurshumova, W., Berleth, T.** (2014) Rapid report Distinct subclades of *Aux/IAA* genes are direct targets of ARF5/MP transcriptional regulation. *New Phytol* **204**: 474–483.
- Laplaze, L., Parizot, B., Baker, A., Ricaud, L., Martinière, A., Auguy, F., Franche, C., Nussaume, L., Bogusz, D., Haseloff, J.** (2005) GAL4-GFP enhancer trap lines for genetic manipulation of lateral root development in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **56**: 2433–2442.
- Lavenus, J., Goh, T., Roberts, I., Guyomarc'h, S., Lucas, M., De Smet, I., Fukaki, H., Beeckman, T., Bennett, M., Laplaze, L.** (2013) Lateral root development in *Arabidopsis*: fifty shades of auxin. *Trends Plant Sci* **18**: 450–458.
- Liu, J., Sheng, L., Xu, Y., Li, J., Yang, Z., Huang, H., Xu, L.** (2014) WOX11 and 12 are involved in the first-step cell fate transition during *de novo* root organogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**: 1081–1093.
- Liu, Y., Lai, N., Gao, K., Chen, F., Yuan, L., Mi, G.** (2013) Ammonium inhibits primary root growth by reducing the length of meristem and elongation zone and decreasing elemental expansion rate in the root apex in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **8**: e61031.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods* **25**: 402–408.
- Ludwig-Müller, J., Vertocnik, A., Town, C.D.** (2005) Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on *Arabidopsis* stem segments. *J Exp Bot* **56**: 2095–105.
- Mano, Y., Nemoto, K.** (2012) The pathway of auxin biosynthesis in plants. *J Exp Bot* **63**: 2853–2872.
- Mashiguchi, K., Tanaka, K., Sakai, T., Sugawara, S., Kawaide, H., Natsume, M.** (2011) The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *PNAS* **108**: 18512–18517.
- Matsumoto-Kitano, M., Kusumoto, T., Tarkowski, P., Kinoshita-Tsujimura, K., Václavíková, K., Miyawaki, K., Kakimoto, T.** (2008) Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **105**: 20027–20031.
- Miller, C.R., Ochoa, I., Nielsen, K.L., Beck, D., Lynch, J.P.** (2003) Genetic variation for adventitious rooting in response to low phosphorus availability: potential utility for phosphorus availability: acquisition from stratified soils. *Funct Plant Biol* **30**: 973–985.
- Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M., Kakimoto, T.** (2004) Expression of cytokinin biosynthetic *isopentenyltransferase* genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J* **37**: 128–138.
- Muraro, D., Byrne, H., King, J., Voss, U., Kieber, J., Bennett, M.** (2011) The influence of cytokinin-auxin cross-regulation on cell-fate determination in *Arabidopsis thaliana* root development. *J Theor Biol* **283**: 152–167.
- Ouyang, J., Shao, X., Li, J.** (2000) Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **24**: 327–334.
- Pacurar, D.I., Pacurar, M.L., Bussell, J.D., Schwambach, J., Pop, T.I., Kowalczyk, M., Gutierrez, L., Cavel, E., Chaabouni, S., Ljung, K., Fett-Neto, A.G., Pamfil, D., Bellini, C.** (2014) Identification of new adventitious rooting mutants amongst suppressors of the *Arabidopsis thaliana* *superroot2* mutation. *J Exp Bot* **65**: 1605–1618.
- Page, D.R., Grossniklaus, U.** (2002) The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nat Rev Genet* **3**: 124–136.
- Paponov, I.A., Teale, W.D., Trebar, M., Blilou, I., Palme, K.** (2005) The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *Trends Plant Sci* **10**: 170–177.

- Péret, B., De Rybel, B., Casimiro, I., Benková, E., Swarup, R., Laplace, L., Beeckman, T., Bennett, M.J. (2009) Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci* **14**: 399–408.
- Rasmussen, A., Mason, M.G., De Cuyper, C., Brewer, P.B., Herold, S., Agusti, J., Geelen, D., Greb, T., Goormachtig, S., Beeckman, T., Beveridge, C.A. (2012) Strigolactones suppress adventitious rooting in Arabidopsis and pea. *Plant Physiol* **158**: 1976–1987.
- Reddy, G.V., Heisler, M.G., Ehrhardt, D.W., Meyerowitz, E.M. (2004) Real-time lineage analysis reveals oriented cell divisions associated with morphogenesis at the shoot apex of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **131**: 4225–4237.
- Ruiz-Cano, H. (2014) Análisis genético de la formación de raíces adventicias en *Arabidopsis thaliana*. Trabajo de fin de Grado, Universidad Miguel Hernández.
- Ruzicka, K., Simaskova, M., Duclercq, J., Petra, J., Simon, S., Van Montagu, M.C.E., Benkova, E. (2009) Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *PNAS* **106**: 4284–4289.
- Sabatini, S., Heidstra, R., Wildwater, M., Scheres, B. (2003) *SCARECROW* is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem. *Genesdev* **17**: 354–358.
- Sánchez-Rodríguez, E., Rubio-Wilhelmi, M.M., Cervilla, L.M., Blasco, B., Rios, J.J., Rosales, M. A., Romero, L., Ruiz, J.M. (2010) Genotypic differences in some physiological parameters symptomatic for oxidative stress under moderate drought in tomato plants. *Plant Sci* **178**: 30–40.
- Sekiguchi, T., Kurihara, Y., Fukumura, J. (2007) Phosphorylation of threonine 204 of DEAD-box RNA helicase DDX3 by cyclin B/cdc2 in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **356**: 668–673.
- Shinohara, N., Taylor, C., Leyser, O. (2013) Strigolactone can promote or inhibit shoot branching by triggering rapid depletion of the auxin efflux protein PIN1 from the plasma membrane. *PLoS Biol* **11**: e1001474.
- Šimášková, M., O'Brien, J.A., Khan, M., Van Noorden, G., Otvos, K., Vieten, A., De Clercq, I., Van Haperen, J.M.A., Cuesta, C., Hoyerova, K., Vanneste, S., Marhavy, P., Wabnik, K., Van Breusegem, F., Nowack, M., Murphy, A., Friml, J., Weijers, D., Beeckman, T., Benkova, E. (2015) Cytokinin response factors regulate PIN-FORMED auxin transporters. *Nat Commun* **6**: 1–11.
- Skoog, F., Miller, C.O. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp Soc Exp Biol* **54**: 118–130.
- 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. *Plant Cell* **17**: 1343–59.
- Sugawara, S., Hishiyama, S., Jikumaru, Y., Hanada, A., Nishimura, T., Koshiba, T., Zhao, Y., Kamiya, Y., Kasahara, H. (2009) Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **106**: 5430–5435.
- Sukumar, P., Maloney, G.S., Muday, G.K. (2013) Localized induction of the *ATP-binding cassette B19* auxin transporter enhances adventitious root formation in Arabidopsis. *Plant Physiol* **62**: 1392–1405.
- Tan, X., Calderon-Villalobos, L.I.A, Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C. V, Estelle, M., Zheng, N. (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* **446**: 640–645.
- Timpte, C., Wilson, A.K., Estelle, M. (1994) Mutation of *Arabidopsis thaliana* is a gain-of-function mutation that disrupts an early step in auxin response. *Genetics* **138**: 1239–1249
- To, J.P.C., Deruère, J., Maxwell, B.B., Morris, V.F., Hutchison, C.E., Ferreira, F.J., Schaller, G.E., Kieber, J.J. (2007) Cytokinin regulates type-A Arabidopsis Response Regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay. *Plant Cell* **19**: 3901–3914.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., Guilfoyle, T.J. (1997) Creation of a Highly Active Synthetic AuxRE. *The Plant Cell* **9**: 1963–1971.
- Verstraeten, I., Schotte, S., Geelen, D. (2014) Hypocotyl adventitious root organogenesis differs from lateral root development. *Front Plant Sci* **5**: 1–13.
- Vidoz, M.L., Loreti, E., Mensuali, A., Alpi, A., Perata, P. (2010) Hormonal interplay during adventitious root formation in flooded tomato plants. *Plant J* **63**: 551–562.
- Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R., Ju, G. (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical – basal axis of Arabidopsis. *Nature* **426**: 147–153.

- Verstraeten, I., Beeckman, T., Geelen, D.** (2013) Adventitious root induction in *Arabidopsis thaliana* as a model for in vitro root organogenesis. *Methods Mol Biol* **959**: 159-175.
- Wang, G., Kong, H., Sun, Y., Zhang, X., Zhang, W., Altman, N., Claude, W., Ma, H.** (2004) Genome-Wide Analysis of the Cyclin Family in Arabidopsis and Comparative Phylogenetic Analysis of Plant Cyclin-Like Proteins. *Plant Physiol* **135**: 1084–1099.
- Wang, W., Xu, B., Wang, H., Li, J., Huang, H., Xu, L.** (2011) *YUCCA* genes are expressed in response to leaf adaxial-abaxial juxtaposition and are required for leaf margin development. *Plant Physiol* **157**: 1805–1819.
- Welander, M., Geier, T., Smolka, A., Ahlman, A., Fan, J., Zhu, L.H.** (2014) Origin, timing, and gene expression profile of adventitious rooting in Arabidopsis hypocotyls and stems. *Am J Bot* **101**: 255–266.
- Wiesmann, Z., Riov, J., Epstein, E.** (1988) Comparison of movement and metabolism of indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid in mung bean cuttings. *Physiol Plant* **74**: 556–560.
- Wilson-Sánchez, D., Rubio-Díaz, S., Muñoz-Viana, R., Pérez-Pérez, J.M., Jover-Gil, S., Ponce, M.R., Micol, J.L.** (2014) Leaf phenomics: a systematic reverse genetic screen for Arabidopsis leaf mutants. *Plant J* **79**: 878-891.
- Wolff, P., Wolverton, C., Bhalerao, R.P., Evans, M., Palme, K.** (2002) Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *PNAS* **100**: 2987-2991.
- Zhang, S.W., Li, C.H., Cao, J., Zhang, Y.C., Zhang, S.Q., Xia, Y.F., Sun, D.Y., Sun, Y.** (2009) Altered architecture and enhanced drought tolerance in rice via the down-regulation of indole-3-acetic acid by *TLD1/OsGH3.13* activation. *Plant Physiol* **151**: 1889–1901.
- Zhang, W., Swarup, R., Bennett, M., Schaller, G.E., Kieber, J.J.** (2013) Cytokinin induces cell division in the quiescent center of the Arabidopsis root apical meristem. *Curr Biol* **23**: 1979–1989.
- Zhang, X., Zong, J., Liu, J., Yin, J., Zhang, D.** (2010) Genome-wide analysis of *WOX* gene family in rice, sorghum, maize, Arabidopsis and poplar. *Plant Biol* **52**: 1016–1026.
- Zhao, Y., Cheng, S., Song, Y., Huang, Y., Zhou, S., Liu, X., Zhou, D.X.** (2015) The Interaction between Rice ERF3 and WOX11 Promotes Crown Root Development by Regulating Gene Expression Involved in Cytokinin Signaling. *Plant Cell* **27**: 2469–2483.



ANEXO

XIII REUNIÓN DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS

A developmental framework for adventitious root development in *Arabidopsis thaliana*

María Ángeles Fernández-López, Sergio Ibáñez, Samuel Daniel Lup,
José Luis Micol, José Manuel Pérez-Pérez

*Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández,
Avda. de la Universidad s/n, 03202 Elche, Spain*

Adventitious roots (ARs) are ectopic roots that arise either naturally or in response to stress from various plant tissues, such as stems and leaves; they may also be induced by mechanical damage or following *in vitro* tissue culture regeneration. The formation of ARs is a complex genetic process regulated by both environmental and endogenous factors, among which the plant hormone auxin plays a central role (Bellini et al. 2014).

Using *Arabidopsis thaliana* excised leaves as a model for de novo root organogenesis (Chen et al. 2014), we characterized both at the histological and molecular level the different stages during AR formation. Our results indicate that, shortly after excision, a localized auxin maximum is established on a subset of vascular cells near the wound. Then, cytokinin-dependent cell proliferation leads to callus formation in this region which will later acquire root identity markers.

To identify additional gene functions required for AR development, we previously screened the *Arabidopsis thaliana* unimutant collection with a visible leaf phenotype (Wilson-Sánchez et al. 2014). Here, we present new data on a subset of these mutants selected on the basis of their defective AR formation from excised leaves.

Bellini C, et al. (2014) Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 65: 639-66

Chen X, et al. (2014) A simple method suitable to study de novo root organogenesis. *Front. Plant Sci.*, 5: 208

Wilson-Sánchez D, et al. (2014) Leaf phenomics: a systematic reverse genetic screen for *Arabidopsis* leaf mutants. *Plant J.*, 79: 878-91

Work funded by MINECO/FEDER (AGL2012-33610 and BIO2015-64255)

A developmental framework for adventitious root development in *Arabidopsis thaliana*

María Ángeles Fernández-López, Sergio Ibáñez, Samuel Daniel Lup, José Luis Micol, José Manuel Pérez-Pérez



Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Avda. de la Universidad s/n, 03202 Elche, Spain
jmperez@umh.es

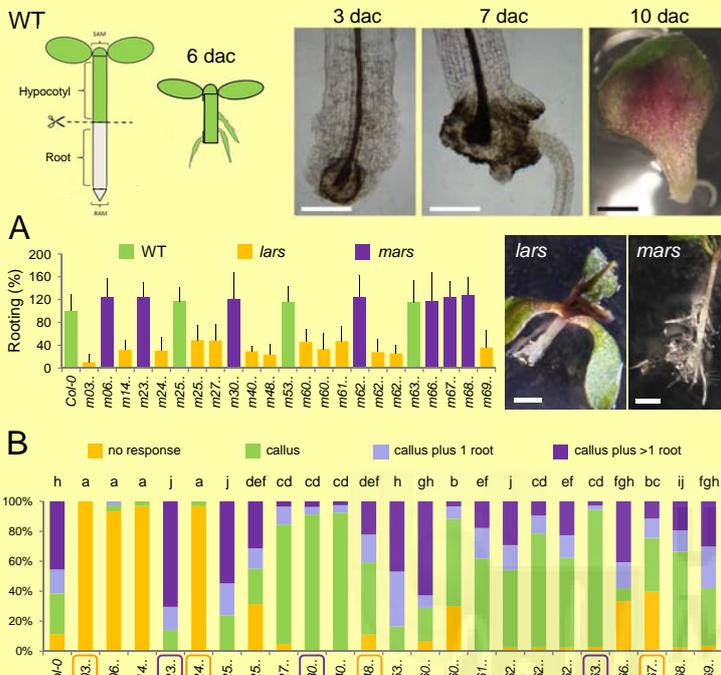
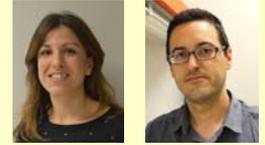


Figure 1.- Organ regeneration after wounding in a collection of leaf mutants

The number of ARs was scored several days after cutting (dac) in (A) hypocotyl (6 dac) or (B) excised leaves (10 dac) in a number of T-DNA insertional lines. *lars* and *mars* mutants respectively displayed a decreased or an increased number of ARs compared with the wild type. Letters indicate significant differences ($P < 0.01$) between samples. Scale bars: 2 mm.

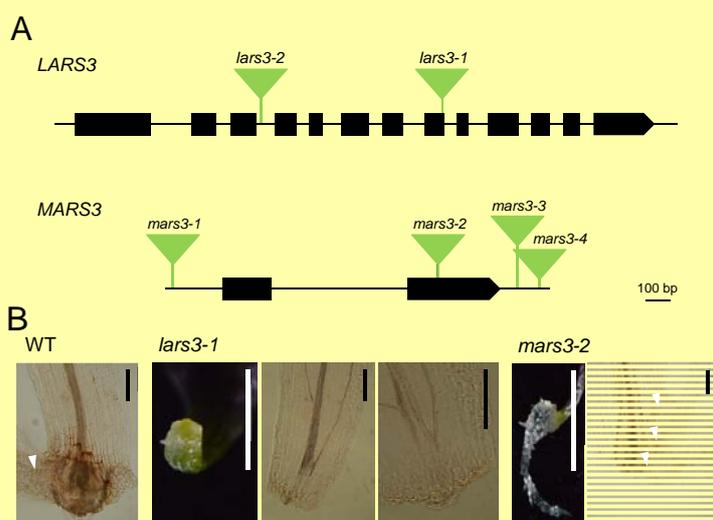


Figure 3.- Functional analysis of AR formation in selected mutants

(A) Gene structure of *LARS3* and *MARS3* genes with location of the T-DNA insertions (green triangles) studied. (B) Details of AR formation in excised leaves at 10 dac. Arrowheads indicate root primordia. Notice adjacent AR formation in *mars3* mutants. Scale bars: 15 mm (white) and 200 μ m (black).

Introduction

Adventitious roots (ARs) are ectopic roots that arise naturally in response to harmful environmental conditions from non-root tissues, such as stems and leaves; they may also be induced by mechanical damage or following *in vitro* tissue culture regeneration. The formation of ARs is a complex genetic process regulated by both environmental and endogenous factors, among which the plant hormone auxin plays a central role¹.

Results

To identify novel genes required for AR formation, we screened 139 lines from the PhenoLeaf collection². Twenty-three of these mutants displayed altered adventitious rooting phenotypes from both hypocotyls and leaves compared to their wild-type background. For six of these genes we confirmed, by studying additional T-DNA lines, that the mutant phenotype was caused by the annotated insertion. The function of these genes has not been associated to organ regeneration yet.

In hypocotyls, ARs are derived from pericycle-like cells through direct organogenesis. In leaf explants however, ARs arise from callus tissue grown from some vasculature-associated cells near the wound.

We studied AR formation in several auxin and cytokinin mutants. We confirmed that a local auxin maximum built up by polar auxin transport and canonical downstream auxin signaling is essential for AR formation.

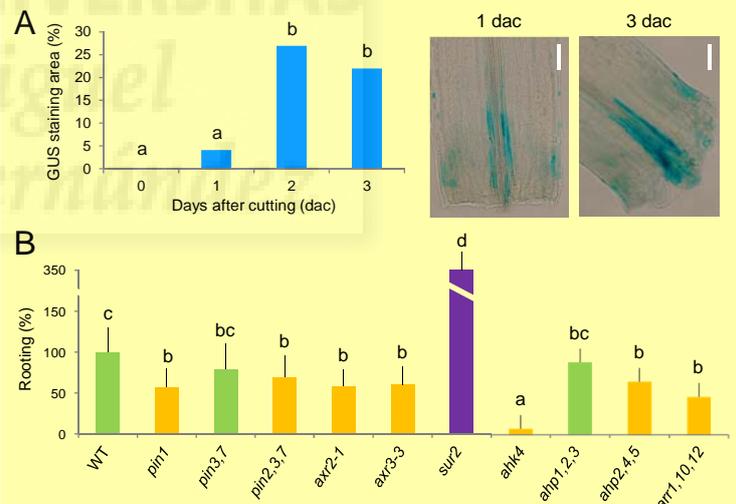


Figure 2.- Hormone crosstalk during AR formation

(A) *DR5::GUS* expression in excised petioles in response to endogenous auxin. (B) Rooting percentage in hypocotyls after wounding (6 dac) in a number of auxin and cytokinin mutants. Letters indicate significant differences ($P < 0.01$) between samples. Scale bars: 100 μ m.

Conclusions

Our results indicate a positive crosstalk between auxin transport and cytokinin signaling during early formative stages of adventitious rooting.

AR formation from wounded tissues involves two processes that could be independently dissected by using genetics: (1) timing of AR initiation, and (2) the production rate of new AR.

Mutants affected in vesicle trafficking and transcriptional stress responses display an increased number of ARs.

References

- 1.- Bellini *et al.* (2014). *Annu Rev Plant Biol*, 65: 639-666.
- 2.- Wilson *et al.* (2014). *Plant J*, 79: 878-891.



www.arolab.es
laboratory of adventitious rooting and organogenesis

Acknowledgements

Work in the laboratory of J.M.P.-P. is funded by FEDER/MINECO grants (AGL2012-33610 and BIO2015-64255-R). We thank Dr. Ikram Bilou for providing seeds of the *pin* mutants and Drs. Eduardo Fernández and Gema Martínez-Navarrete for help with microscopy.

AGRADECIMIENTOS

La realización de este Trabajo de Fin de Grado ha sido posible gracias a la financiación por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO; proyectos AGL2012-33610 y BIO2015-64255-R) y por fondos FEDER de la Comisión Europea.

A José Manuel Pérez, por haberme permitido realizar este trabajo en su laboratorio y haberme guiado de la mejor manera posible, haciendo que aprenda en cada momento.

A José Luis Micol, Miguel Ángel Sogorb y Ángel Nadal, por dejarnos utilizar el microscopio confocal, el termociclador y el nanodrop respectivamente.

A Miguel Moreno-Risueño, por proporcionarnos semillas de la mayoría de las líneas marcadoras utilizadas en este trabajo.

A Aurora Alaguero, Rebeca González, María Salud Justamante, José Manuel Pérez y Ana Belén Sánchez, por hacerme sentir tan integrado en el equipo.

A Joan Villanova, por haberme enseñado todo durante mis primeros pasos en el laboratorio, por haber sido compañero y amigo.

A Noelia Sánchez, por haber sido mi gran compañera estos años y haberme dado su apoyo y su ayuda en todo momento. Sin ti nada de esto habría sido lo mismo.

A mi padre, a mi madre y a mi hermana, por su cariño y comprensión en las épocas más duras.