

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

BÚSQUEDA DE GENES CANDIDATOS ASOCIADOS CON LA
DIFERENCIACIÓN DE RAÍCES ADVENTICIAS EN *Acca sellowiana* (Berg.)
Burret

por

José Pedro SCALTRITTI BENTANCUR

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el título
de Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO
URUGUAY
2016

Tesis aprobada por:

Director:

Ing. Agr. (Msc.) Silvia Ross

Lic. (MSc.) Susana Rodríguez

Ing. Agr. (MSc. PhD.) Pablo Speranza

Fecha:

17 de octubre de 2016

Autor:

José Pedro Scaltritti Bentancur

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de la República, por darme la oportunidad de estudiar esta carrera tan maravillosa e interesante como es la Agronomía.

A los tutores docentes Silvia Ross, Susana Rodríguez y Pablo Speranza por haber confiado en mí a la hora de realizar este trabajo de investigación y haberme guiado de la mejor forma posible para lograr un gran trabajo.

A mi familia, quienes me apoyaron en las buenas y en las malas, por haber soportado mis silencios y tiempos. A mis padres que lograron educarme de la mejor forma que puede haber y ser quien soy hoy. A mis hermanos, primos, abuela y tía que siempre estuvieron presentes y apoyándome.

A mi novia, Ximena, que con su empuje me ayudó a seguir, acompañándome en forma incondicional y creyó en mí.

A todos mis compañeros que, con un mate de por medio, me acompañaron en este camino y así poder lograr obtener este título.

No importa cuán fuerte golpees; importa lo fuerte que la vida puede golpearte y tener la capacidad de seguir avanzando, lo mucho que puedas resistir y seguir adelante. Así es cómo nacen los ganadores.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PAGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1 <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1 OBJETIVOS GENERALES	2
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
2 <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	3
2.1 IMPORTANCIA DE LAS DE RAÍCES ADVENTICIAS PARA LA PROPAGACIÓN VEGETATIVA EN ESPECIES LEÑOSAS	3
2.2 ORIGEN DE LAS RAÍCES ADVENTICIAS	3
2.3 FACTORES QUE INCIDEN EN LA DIFERENCIACIÓN DE RAÍCES ADVENTICIAS	5
2.3.1 <u>Factores ambientales</u>	5
2.3.1.1 Temperatura	5
2.3.1.2 Nutrición mineral.....	6
2.3.1.3 Luz.....	7
2.3.2 <u>Factores endógenos/fisiológicos</u>	8
2.3.2.1 Edad del material.....	8
2.3.2.2 Rol de las principales fitohormonas.....	9
2.3.3 <u>Factores genéticos</u>	12
2.4 GENES CANDIDATOS	13
2.4.1 <u>Genes constitutivos</u>	13
2.4.2 <u>Genes asociados con el enraizamiento</u>	14
2.4.2.1 Nitrate Reductase Gene (NIA).....	14
2.4.2.2 Auxin Efflux Carrier Gene (PIN-1)	15
2.4.2.3 Scarecrow Gene (SCR).....	16
2.4.2.4 Short Root Gene (SHR).....	17
2.4.2.5 Transport Inhibitor Response 1 Gene (TIR1).....	18
3 <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	20

3.1 MATERIAL VEGETAL.....	20
3.2 BÚSQUEDA IN SILICO DE SECUENCIAS GÉNICAS.....	20
3.3 DISEÑO DE CEBADORES	23
3.4 AMPLIFICACIÓN DE GENES EN <i>Acca sellowiana</i>	23
3.5 ANÁLISIS DE SECUENCIAS.....	24
3.6 DISEÑO DE CEBADORES ESPECÍFICOS Y PRUEBA CON ADN GENÓMICO	25
3.7 EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADN COPIA.....	26
4 <u>RESULTADOS</u>	27
4.1 GENES ANALIZADOS.....	27
4.2 GENES SECUENCIADOS.....	31
4.3 DISEÑO DE CEBADORES PARA qPCR Y AMPLIFICACIÓN A PARTIR DE ADN GENÓMICO.....	36
4.4 EXPRESIÓN DE GENES EN EXPLANTOS IN VITRO DE <i>Acca sellowiana</i>	40
5 <u>DISCUSIÓN</u>	42
6 <u>CONCLUSIONES</u>	45
7 <u>RESUMEN</u>	46
8 <u>SUMMARY</u>	47
9 <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	48
10 <u>ANEXOS</u>	54

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.		Página
1.	Secuencias de los cebadores y características de amplificación para cada uno de los 5 genes constitutivos.....	22
2.	Secuencias de cebadores y las características de amplificación para cada uno de los genes de interés.....	28
3.	Tamaños obtenidos de las secuencias de genes constitutivas y de interés seleccionado y los correspondientes porcentajes de identidad de acuerdo a diferentes bases de datos.....	36
4.	Secuencias de cebadores para qPCR y sus características de amplificación diseñados a partir de las secuencias obtenidas para cada uno de los genes de interés y constitutivos.....	37

Figura No.		
1.	Representación del alineamiento de las secuencias para el gen SHR en <i>A. thaliana</i> y <i>E. grandis</i>	23
2.	Electroforesis en gel de agarosa al 2% utilizando un juego de cebadores para el gen constitutivo H2B (izq.) y el juego de cebadores 2 para SHR (der.) en dos genotipos de <i>Acca sellowiana</i> (C-74 y 27-1) y <i>Eucalyptus grandis</i>	29
3.	Electroforesis en gel de agarosa al 2% utilizando los dos juegos de cebadores diseñados a partir del gen PIN1 en ADN genómico de <i>E. grandis</i> y dos genotipos contrastantes de <i>A. sellowiana</i> (C-74 y 27-1).....	29
4.	Electroforesis en geles de agarosa al 2% de agarosa utilizando los cebadores diseñados a partir de las secuencias de los genes constitutivos en ADN genómico de dos genotipos de <i>A. sellowiana</i> (C-74 y 27-1), <i>E. grandis</i> (Eug) y <i>A. thaliana</i> (At).....	30
5.	Electroforesis en gel de agarosa al 2% en donde no se obtuvo producto de PCR para algunos casos o el producto de PCR presentó amplificaciones inespecíficas, descartando los genes.....	31
6.	Secuencias de nucleótidos y aminoácidos obtenidos para los genes constitutivos EF2, H2B y UBI en <i>A. sellowiana</i>	32
7.	Secuencias de nucleótidos y aminoácidos obtenidas para SHR y TIR en <i>A. sellowiana</i>	33
8.	Secuencia de nucleótidos y aminoácidos obtenida del gen PIN en <i>A. sellowiana</i>	34
9.	Electroforesis en gel con prueba de cebadores diseñados para qPCR en ADN genómico de dos genotipos contrastantes de <i>Acca sellowiana</i> , C-74 y 27-1.....	40

10. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con producto de PCR
utilizando cDNA de los genotipos C-74 y 27-1 como material
molde..... 41

1 INTRODUCCIÓN

Acca sellowiana (Berg.) Burret es una especie nativa perteneciente a la familia *Myrtaceae*, distribuida desde el sur del Brasil al noreste de Uruguay. Debido a las cualidades organolépticas de sus frutos, la especie ha captado la atención de mercados internacionales tales como Nueva Zelanda y Colombia (Santos et al., 2011). Junto con otras especies nativas forma parte del Programa de Selección de Frutas Nativas con Potencial Comercial, llevado a cabo por la Facultad de Agronomía junto con otras entidades sociales y gubernamentales (INIA, MGAP entre otros).

Si bien esta especie se propaga fácilmente por semilla, para obtener fruta de calidad uniforme es necesario propagar los materiales seleccionados por alguna técnica de propagación vegetativa (Thorp y Bielecki, 2002), con lo cual se logra la fijación de genotipos superiores. Sin embargo, existe gran variabilidad en la respuesta que muestran los distintos genotipos de *A. sellowiana* cuando se propagan por estacas o microestacas. Es por esto que la capacidad de diferenciar raíces adventicias es una característica imprescindible a tener en cuenta al momento de seleccionar un material, que debería ser incluida en los programas de mejoramiento genético de cualquier especie.

Dicha capacidad es una característica compleja, afectada por múltiples factores tanto exógenos (luz, temperatura, nutrientes, etc.) como endógenos (edad del material, fitohormonas, factores genéticos) (Bellini et al., 2014). Los mecanismos por los cuales se forman las raíces adventicias son todavía desconocidos. Sin embargo, a partir de resultados obtenidos en *Arabidopsis thaliana* y sus mutantes se ha comenzado a interpretar los mecanismos moleculares que regulan este proceso (Geiss et al., 2009).

Las fitohormonas, y en particular las auxinas y sus múltiples vías de regulación metabólica (síntesis, transporte, percepción, etc.) juegan un papel fundamental en la regulación de las sucesivas etapas del proceso de rizogénesis. La biosíntesis, degradación metabólica, conjugación y transporte polar, son todos procesos que controlan la concentración de auxina en determinado tejido o célula blanco. Esta regulación temporal y espacial del metabolismo de las auxinas posibilita una regulación flexible del desarrollo. En otras especies se han identificado genes vinculados al metabolismo de auxinas y la adquisición de competencia de las células, que podrían ayudar a explicar las diferencias encontradas en cuanto a la capacidad de enraizamiento. Entre las especies leñosas, se destacan los estudios en el género *Eucalyptus*, especie emparentada con *A. sellowiana* por pertenecer al género *Myrtaceae*. Poder extrapolar genes estudiados en esta especie y probarlos en *A. sellowiana* sería considerado como una herramienta importante que ayude en la selección al programa de mejoramiento.

En este trabajo, se plantea la búsqueda e identificación de genes que estén asociados con la capacidad de diferenciar raíces adventicias utilizando dos genotipos contrastantes de *A. sellowiana*, con los cuales posteriormente se puedan desarrollar herramientas que ayuden en la identificación de materiales con buena capacidad rizogénica.

1.1 OBJETIVOS GENERALES

Poder identificar y aislar genes asociados con el enraizamiento a partir de especies que hayan sido analizadas y publicadas, que puedan ser utilizados para distinguir genotipos que enraicen fácilmente de los que no en cultivos de *Acca sellowiana*. Esto va a ser de utilidad para desarrollar herramientas moleculares que sirvan para caracterizar la capacidad de enraizamiento de *A. sellowiana* y puedan emplearse para mejorar las técnicas de propagación vegetativa.

Desarrollar herramientas moleculares que sirvan para caracterizar la capacidad de enraizamiento de la especie *A. sellowiana* y puedan emplearse para mejorar las técnicas de propagación vegetativa. Para ello, se espera poder identificar y aislar genes asociados con el enraizamiento, presentes en el genoma de *A. sellowiana*, que tengan una expresión diferencial en explantos *in vitro* de genotipos contrastantes en su capacidad de enraizamiento, y por lo tanto permita distinguirlos.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificación y selección de genes clave en el proceso de enraizamiento y búsqueda de secuencias génicas (de genes seleccionados) en el genoma de *Arabidopsis thaliana* y *Eucalyptus grandis*.

Aislamiento parcial de genes seleccionados, asociados a enraizamiento, en el genoma de *Acca sellowiana*, utilizando cebadores diseñados a partir del alineamiento de secuencias encontradas en los genomas de *A. thaliana* y *E. grandis*

Aislamiento parcial de genes comúnmente usados como constitutivos en estudios de expresión, en el genoma de *Acca sellowiana*, a partir de cebadores publicados para *Eucalyptus globulus*.

Análisis primario de expresión de los genes estudiados, en la porción basal de explantos *in vitro* de dos genotipos contrastantes en su capacidad de enraizamiento, utilizando cebadores específicos de *A. sellowiana* y diseñados para estudios de expresión mediante PCR cuantitativa.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 IMPORTANCIA DE LAS DE RAÍCES ADVENTICIAS PARA LA PROPAGACIÓN VEGETATIVA EN ESPECIES LEÑOSAS

La propagación vegetativa está extensamente utilizada en diversos rubros; desde la agricultura hasta la horticultura e incluso la forestación, donde se utiliza para la multiplicación de plantas elite seleccionadas a partir de poblaciones naturales u obtenidas de programas de mejoramiento (Hartmann et al., 2011).

El uso de clones en especies leñosas genera al menos un incremento del 10% de ganancia genética en relación al uso de especies regenerados por semillas de árboles selectos. Sin embargo, la máxima ganancia genética puede ser obtenida mediante el empleo conjunto de la propagación sexual (a través de la introducción de genes nuevos, prevenir los efectos de endogamia y el mejoramiento genético por efectos aditivos) y agámica (multiplicando individuos o grupo de individuos seleccionados que presentan una significativa ganancia genética debida a efectos no aditivos, Olmos et al., 2004). La selección de aquellos materiales con potencial agronómico, combinados con la habilidad de propagarse vegetativamente es la clave de la obtención de un cultivo (Janick, 2005).

La formación de raíces adventicias es una etapa clave en la propagación vegetativa y es donde a su vez ocurren las principales pérdidas debido a que los brotes (o tallos) no son capaces de formar raíces. Es, entonces, un pre-requisito para la exitosa producción de clones viables (Li et al., 2009).

2.2 ORIGEN DE LAS RAÍCES ADVENTICIAS

Li et al. (2009) las define como raíces originadas de un proceso post-embionario surgidas a partir del tallo, hojas y tejidos de raíces viejas que no hayan sido formadas a partir del periciclo. Pueden formarse a partir de tejidos del tallo en forma natural, bajo condiciones de stress, frente a algún daño mecánico o incluso por regeneración de algún tejido. Pueden iniciarse a partir del hipocótilo, células del periciclo, células parenquimáticas, etc. (Bellini et al., 2014). Hay al menos dos caminos por los cuales se pueden formar las raíces adventicias, o pueden ser inducidas: mediante la vía organogénica a partir de células establecidas, o a través callo, originados a partir de algún daño mecánico. De todas formas, la formación de raíces adventicias va a depender de la especie con la que se esté trabajando y de los órganos o tejidos a partir del cual se esté desarrollando (Bellini et al., 2014). En la mayoría de las especies monocotiledóneas, este proceso constituye el principal sistema radical, formándose naturalmente, mientras que en especies dicotiledóneas se generan al momento de propagarlas vegetativamente (Geiss et al., 2009).

En varias especies forestales la capacidad de generar raíces adventicias decae con la edad, reflejando un proceso de desarrollo que a su vez afecta a nivel morfológico como en la tasa de crecimiento (Sánchez et al., 2007). En especies como *Eucalyptus*, *Populus*, *Salix* o *Cryptomeria*, la formación de estas raíces es un factor limitante al momento de propagarlas *in vitro*, generando importantes pérdidas económicas (Geiss et al., 2009).

Varios autores coinciden con que el proceso de formación de raíces adventicias consiste en tres etapas fisiológicas sucesivas y con diferentes requerimientos, entre ellos hormonales (de Klerk et al. 1999, de Klerk 2002, Li et al. 2009, Bellini et al. 2014): inducción, iniciación y expresión.

- Fase de inducción: comprende eventos bioquímicos y moleculares sin cambios visibles en donde ciertas células se tornan competentes (o adquieren competencia), es decir que tienen la capacidad para responder a señales químico-metabólicas.
- Fase de iniciación: por la acción del estímulo, en este caso la auxina, las células se vuelven determinadas, es decir, captan el estímulo y se reactiva la división celular formando el primordio radical.
- La fase de expresión: se caracteriza por un crecimiento dentro del tallo del primordio radical y emergencia de la raíz. En esta etapa no se requiere una señal endógena y la auxina resulta un regulador negativo, inhibiendo el crecimiento.

En términos prácticos, las últimas dos fases son las que determinan la fase de formación de raíces. Cada una de estas fases tienen requerimientos específicos y conocer sus características resulta importante para la adecuada manipulación en esta etapa de desarrollo (Fett-Neto et al., 2001).

El desarrollo de la planta está regulado por factores genéticos y ambientales, los cuales tiene efectos en la síntesis de auxinas, su metabolismo, transporte y respuesta frente a alguna señal (Pop et al., 2011). Factores ambientales como la temperatura, condiciones lumínicas, concentraciones de azúcares y sales minerales y hormonas (principalmente auxinas), actúan como señales que inducen a grupos celulares que redefinen su orientación a la formación de raíces adventicias. Las hormonas desempeñan roles complejos, ya sea ejerciendo efectos directos como la división celular o crecimiento celular, o indirectos mediante la interacción con otras moléculas o fitohormonas (Li et al., 2009).

Debido a que la propagación vegetativa se emplea con frecuencia en viveros para mantener la fidelidad genética y lograr de forma más rápida la propagación de plantas, es necesario conocer los aspectos fisiológicos, bioquímicos y genéticos del desarrollo de las raíces adventicias y así poder mejorar los procedimientos que se emplean habitualmente (Li et al., 2009).

En la actualidad se han llevado a cabo estudios sobre la capacidad de enraizamiento en especies leñosas y herbáceas mediante la propagación *in*

vitro. Este método presenta diversos beneficios tales como controlar las concentraciones de hormonas (auxinas principalmente), nutrientes y carbohidratos, trabajar con un material saneado libre de patógenos y de alta calidad y poder llevar a cabo los experimentos utilizando explantos pequeños (a microescala) en un ambiente controlado (de Klerk et al., 1999).

Mediante herramientas moleculares se pueden emplear para determinar el desarrollo de raíces en los cultivos de interés, principalmente el desarrollo de raíces laterales, y el estudio del modo de acción que tiene la auxina en este proceso. Estos estudios resultan de vital importancia para conocer los mecanismos básicos que operan en el desarrollo de raíces adventicias (de Klerk et al. 1999, de Klerk 2002).

Poder conocer cuáles son los factores genéticos que puedan estar explicando el desarrollo radical en especies leñosas, permitirá seleccionar los mejores materiales madre y se podrá elaborar nuevos métodos para el enraizamiento.

2.3 FACTORES QUE INCIDEN EN LA DIFERENCIACIÓN DE RAÍCES ADVENTICIAS

2.3.1 Factores ambientales

2.3.1.1 Temperatura

A pesar de que hay poca información con respecto al efecto de la temperatura sobre la rizogénesis adventicia, algunos trabajos muestran que potencialmente influye en varios aspectos, desde la absorción de agua y nutrientes hasta diferentes procesos metabólicos, inhibiendo o promoviendo diferentes efectos enzimáticos. Estos efectos pueden influenciar el estado fisiológico de la planta madre, repercutiendo luego en el desarrollo de raíces adventicias de las plantas hijas (Geiss et al., 2009).

El rango de temperatura óptimo para el desarrollo de raíces a partir de tallos se encuentra entre los 18 y 27°C, aunque en ciertos protocolos reportan temperaturas óptimas entre 23 a 27°C. Es importante aclarar que el rango de temperaturas variará de acuerdo a la especie en la que se esté estudiando. Para el caso de especies coníferas, las bajas temperaturas tienden a ser beneficiosas para la inducción de raíces a partir de estacas (Ragonezi et al., 2010).

Sin embargo, Rasmussen et al. (2009) estudiaron cómo se ve afectada la formación de raíces de *Pinus elliotii* var. *elliotii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis* mediante el control de la temperatura en diferentes ambientes. En su trabajo observó que el porcentaje de sobrevivencia de raíces fue del 80% cuando se trataron con temperaturas de 13, 25 y 30°C, con

un óptimo de formación de 25°C, mientras que las bajas tasas de sobrevivencia ocurren en estacas con temperaturas sometidas a 35°C. A los 25°C las estacas tuvieron una tasa de desarrollo radical más rápido y de mejor calidad que los otros tratamientos, mientras que a los 15°C resultó en una lenta tasa de formación de raíces.

Las bajas temperaturas afectarán las tasas metabólicas, pudiendo explicar el motivo por el cual la tasa de desarrollo radical es menor a 15°C. Esto puede deberse a que los transportadores de auxinas estén afectados por la reducción de temperatura. Por tanto, la combinación de auxinas junto con temperatura cálida (25°C), genera un estímulo en la etapa de enraizamiento, además de aumentar el porcentaje de sobrevivencia de estacas, tamaño, largo y calidad de raíces (Alegre et al. 1998, Rasmussen et al. 2009).

Corrêa y Fett-Neto (2004) investigaron el efecto de la temperatura en el desarrollo de raíces adventicias en microestacas de dos especies de *Eucalyptus* (*E. saligna* y *E. globulus*) y la relación que tiene con la formación de raíces a través de la aplicación exógena de auxinas. Llegaron a la conclusión que para *E. globulus*, alternar el termoperíodo en 30°C día y 20°C noche promovía el crecimiento radical, mientras que para *E. saligna* temperaturas de entre 15 y 20°C en el día generaba un mejor crecimiento radical, demostrando que el rango de temperaturas óptimas varía de acuerdo a cada especie. Por último, demostraron que la aplicación exógena de auxinas provoca un mayor desarrollo radical en condiciones de temperaturas extremas, generando mejores respuestas.

Por tanto, los efectos de la temperatura vinculados con el proceso de desarrollo de raíces adventicias parecen estar relacionados con la modulación de transporte y metabolismo en los niveles de auxina endógena, además del consumo y metabolismo de esta hormona aplicada de manera exógena (Corrêa y Fett-Neto, 2004).

2.3.1.2 Nutrición mineral

Los nutrientes minerales tienen funciones específicas y esenciales no solo en el metabolismo de la planta, sino también en su arquitectura y desarrollo radical. Pueden ser empleados para la elaboración de constituyentes orgánicos, como activadores de reacciones enzimáticas o como agentes osmorreguladores. La disponibilidad tanto de macro como micronutrientes es de suma importancia para la planta y la arquitectura radical va a estar adaptándose frente a cualquier cambio en concentraciones de modo tal que pueda optimizar su consumo. Es un factor determinante que va a repercutir en la morfogénesis radical a través de la formación de raíces laterales, su largo y densidad (Li et al. 2009, Bellini et al. 2014).

Si bien los requerimientos nutricionales dependen de cada especie, Bellini et al. (2014) explican que el nitrógeno y el fósforo son los principales nutrientes limitantes en el desarrollo radical de las plantas. Otros minerales

como el calcio, zinc, hierro, boro y manganeso ejercen también un importante efecto en la formación y crecimiento de las raíces adventicias. Sin embargo, a pesar de que los requerimientos nutricionales se encuentran altamente relacionados con el desarrollo de raíces adventicias, pocos estudios han podido caracterizar los efectos minerales específicos que ocurren en cada una de las fases del proceso de enraizamiento debido a su complejidad (Li et al., 2009).

Por su parte, Schwambach (2005) demostró que el número, tamaño y densidad de las raíces en *Eucalyptus globulus* se ven afectadas por la nutrición mineral en las tres fases de desarrollo radical, repercutiendo finalmente en el porcentaje de sobrevivencia de las plantas luego de ser trasplantadas y sometidas a la fase de rustificación. En su trabajo llegó a la conclusión de que las combinaciones de ciertos nutrientes en determinadas concentraciones mejoran significativamente los parámetros anteriormente dichos cuando fueron analizados separadamente, mostrando la necesidad de tener en cuenta los requerimientos en cada paso cuando se quiere optimizar la propagación vegetativa en la especie estudiada. Nutrientes como calcio, nitrógeno y zinc afectan el número de raíces formadas, mientras que el largo de las raíces se ve afectadas por las concentraciones de fósforo, hierro y manganeso.

Por último, Bellamine et al. (1998) confirmaron que la ausencia de calcio en un medio de cultivo donde se incubaron *in vitro* estacas de *Populus tremula* x *Populus tremuloides* reduce el porcentaje de enraizamiento, sugiriendo que este mineral juega un rol importante en la últimas dos etapas de la formación de nuevas raíces (Bellamine et al., 1998).

Esto demuestra que no hay una regla general y un efecto positivo o negativo aplicado a un nutriente en particular. El efecto de los diferentes nutrientes va a estar afectando en distintas formas de acuerdo a la especie que se esté estudiando y las condiciones ambientales. Cada nutriente puede llegar a desencadenar una serie de procesos genético-fisiológicos que finalmente repercutirán en el desarrollo de nuevas raíces o su inhibición.

2.3.1.3 Luz

La luz es un parámetro que ha sido considerado desde hace tiempo en las prácticas de propagación vegetativa al momento de optimizar las condiciones de enraizamiento de estacas. Varios estudios se han concentrado en el efecto tanto de la intensidad y/o calidad como del tipo de luz aplicada al material enraizante, y subrayan posibles interacciones con los reguladores de crecimiento como auxinas o citoquininas, sugiriendo que los fotoreceptores se encuentran involucrados en la regulación de raíces adventicias, y de manera similar, en el desarrollo de raíces laterales (Bellini et al., 2014).

Puede modificar la eficiencia de los agentes reguladores de crecimiento, así como el balance hormonal. Es sabido que las condiciones

lumínicas afectan el metabolismo de esta hormona y la receptividad de los tejidos (Ragonezi et al., 2010).

A nivel forestal, estudios realizados en *Eucalyptus globulus* (especie de difícil enraizamiento) muestran que la aplicación exógena de auxinas anula la inhibición del enraizamiento causada por la exposición lumínica, sugiriendo que la inhibición del enraizamiento en esta especie pueden estar relacionadas con la actividad de esta hormona (Fett-Neto et al., 2001).

El efecto lumínico se correlaciona, entonces, con las auxinas presentes, y esto va a estar afectando positiva o negativamente dependiendo de qué especie se esté tratando y de la edad del material.

2.3.2 Factores endógenos/fisiológicos

2.3.2.1 Edad del material

Durante el desarrollo de todas las plantas leñosas desde semilla, ocurre una etapa que puede llegar a durar hasta aproximadamente los 40 años conocida como fase juvenil, en donde, a pesar de que estén las condiciones ambientales propicias, no ocurre la floración ni puede ser inducida. El tiempo que dura este período varía con la especie y puede ser afectado tanto por factores genéticos como ambientales. Asociado con esta transición, se encuentran cambios progresivos a niveles morfológicos y fisiológicos, desde cambios en caracteres foliares hasta la habilidad de formar raíces adventicias. El cambio de fase es de considerable importancia para el control morfogénico, la determinación y diferenciación en el desarrollo de la planta. En términos prácticos, la edad del material es importante debido a que va a estar relacionado con la eficiencia del cultivo y con la selección de cultivares mejorados; períodos más largos resultan menos eficientes a la hora de seleccionar especies perennes (Hackett 1987, Beyl y Trigiano 2015).

En especies leñosas (forestales, frutales y ornamentales) la pérdida de capacidad de enraizamiento es uno de los factores económicamente más importantes que limitan la propagación clonal en los genotipos elite. Varios autores confirman que la pérdida en la capacidad de regeneración potencial de raíces adventicias en especies forestales se debe al uso de material de edad avanzada (Hamann 1998, Husen y Pal 2006, 2007, Bellini et al. 2014).

El pasaje de fase juvenil a adulto no es un cambio abrupto, sino que se trata de una transición donde ciertas características típicas de la primera fase se pierden en forma progresiva (diferentes velocidades), entre ellas la capacidad de enraizamiento. En ciertas especies esta característica se ve comprometida rápidamente, mientras que en otras el cambio no resulta tan extremo. Tampoco se trata de un factor meramente genético, sino que epigenético, causado por la expresión diferencial de genes o genes que han

sido reprimidos o activados, dando como resultado la formación de células o tejidos con diferentes atributos (Beyl y Trigiano, 2015).

Husen y Pal (2007), estudiando la capacidad de enraizamiento utilizando materiales de diferentes edades de *Tectona grandis*, llegaron a la conclusión que la generación de raíces adventicias formadas a partir de estacas tomadas de plántulas de 2 meses de edad fue mayor que en aquellas obtenidas a partir de árboles de 15 y 30 años. En su trabajo, mostraron que la formación de estas raíces aumentaba con la aplicación exógena de auxinas, siempre en mayor proporción en aquellas muestras más jóvenes.

Esto puede deberse a que los requerimientos de auxinas que promueven y desarrollan el enraizamiento en esta especie aumentan a medida que aumenta la edad del material con el que se esté tratando. La alta demanda por esta hormona en materiales más antiguos puede deberse o a una disminución en el contenido endógeno de auxinas o a la pérdida de sensibilidad que pueden tener los receptores en los tejidos que promueven el enraizamiento (Husen y Pal, 2006).

Rasmussen et al. (2014) probaron en su trabajo realizado con plantas de *Pisum sativum* que la pérdida en la capacidad de generar raíces adventicias está correlacionada con un cambio ontogénico de fase vegetativa a reproductiva (formación de meristemas florales) debido a la competencia por los recursos. Esto se debe principalmente a una disminución en la expresión de genes asociados a la respuesta de la auxina en materiales maduros con respecto a los materiales más jóvenes. Esto sugiere que la disminución en la formación de raíces adventicias se encuentra vinculada con señales que controlan el pasaje a estado reproductivo y no por una señal o competencia por los recursos producidos por las mismas plantas.

2.3.2.2 Rol de las principales fitohormonas

Las fitohormonas son los reguladores más importantes en el desarrollo radical de las plantas. Los diferentes tipos de reguladores de crecimiento, tales como auxinas, citoquininas, gibrelinas, etileno, ácido abscísico y algunos compuestos fenólicos, influyen en el crecimiento e iniciación radical tanto directa como indirectamente. Cada una genera efectos únicos en la planta, pero también pueden trabajar en combinación, ya sea en forma sinérgica como antagonista para desencadenar diferentes tipos de respuestas dentro de la planta. De todo el pool de hormonas que regulan el desarrollo radical, es sabido que la auxina es la que juega el rol principal tanto en monocotiledóneas como dicotiledóneas, desde la capacidad de definir la función celular a iniciación del meristema, emergencia y elongación. Si bien se ha avanzado mucho, el modo de acción de las auxinas aún se desconoce con precisión (Li et al. 2009, Hartmann et al. 2011, Bellini et al. 2014, Beyl y Trigiano 2015).

Dentro del grupo de las auxinas, el ácido indolacético (AIA) y el ácido indolbutírico (AIB) son las más abundantes en la naturaleza y las más estudiadas. Varios autores establecen que AIA es la más abundante a nivel endógeno entre las especies, mientras que AIB ha sido encontrada endógenamente en ciertas especies. Si bien no es la más abundante dentro de las especies, AIB es más eficiente por tener un efecto promotor en la generación de raíces mucho mayor que AIA y, por tanto, es más empleada al momento de inducir el desarrollo radical. Sin embargo, la respuesta a este tipo de auxina va a depender de la especie que se esté trabajando (Li et al. 2009, Bellini et al. 2014).

Una excesiva aplicación de auxinas puede llegar a tener un efecto negativo en el desarrollo de raíces, inhibiendo su crecimiento. Esto puede deberse a que en las diferentes etapas de enraizamiento puedan haber diferencias en el requerimiento de acuerdo a la especie con la que se esté tratando (de Klerk et al., 1999).

A nivel fisiológico, las auxinas inducen a la desdiferenciación de células del periciclo y del parénquima, comenzando a generar divisiones celulares. En altas concentraciones, inhiben la elongación radical y estimula la diferenciación celular. La aplicación exógena de auxinas puede inducir la formación de raíces laterales adicionales, además de promover la formación de raíces adventicias en tallos u otros tejidos (Li et al., 2009).

Algunas plantas regeneran raíces en forma espontánea a partir de esquejes o tallos, mientras que, en otras plantas, la auxina producida en el ápice y transportada de forma basípeta hacia el tallo actúa como un disparador, desencadenando todo el proceso. La remoción del ápice reduce el nivel endógeno de auxinas en la zona basal del tallo y el número de raíces capaces de ser regeneradas. Es en estos casos donde la aplicación exógena de auxinas promueve el desarrollo radical de forma significativa (de Klerk et al., 1999).

Puede aplicarse por varios días, o semanas, a bajas concentraciones (rangos micromolares), o por varios segundos o minutos en altas concentraciones (rangos milimolares). Una leve exposición de una muestra de tallo en una solución concentrada de auxinas promueve rápidamente el desarrollo de raíces a partir de este órgano (de Klerk et al. 1999, Hartmann et al. 2011).

Se conocen tres receptores de auxinas, de los cuales la proteína TIR1 (Transport Inhibitor Response 1) es el más estudiado. Cuando la auxina se liga a TIR 1 se induce la expresión de genes que estaban reprimidos a nivel de represores de factores de transcripción. La respuesta frente a la auxina está regulada principalmente por dos factores de transcripción: proteínas ARF (factor de respuesta a auxina), las cuales se pueden unir a los elementos de respuestas a la auxina, y proteínas Aux/AIA, encargadas de reprimir la expresión de las proteínas ARF y son reguladas por la acción de la auxina. La

presencia de auxina promueve la degradación de los represores Aux/AIA. Esto se debe a la unión de la proteína TIR1 a la proteína Aux/AIA provocando su degradación (Parry y Estelle 2006, George et al. 2008).

Por otro lado, las citoquininas son un grupo de fitohormonas esenciales para el desarrollo de las plantas debido a su efecto promotor en la división celular, ejerciendo un gran efecto sobre las yemas iniciales y cultivo de tejidos. Dentro de las principales, se encuentran la zeatina, quinetina y benciladenina (BA). Por lo general, una relación alta de auxinas y baja de citoquininas promueve el desarrollo de raíces adventicias mientras que, si la relación se invierte, se promueve la formación de yemas adventicias. Las citoquininas son, entonces, hormonas antagonistas a las auxinas, modificando la expresión de los genes encargados del transporte polar de las auxinas (PIN) y reprime la formación tanto de raíces laterales como adventicias en varias especies. Sin embargo, en muy bajas concentraciones son requeridas en los primeros estados de iniciación de rizogénesis adventicia (Hartmann et al. 2011, Bellini et al. 2014, Beyl y Trigiano 2015).

Las gibrelinas, por su parte, son un grupo de hormonas que se encuentran fundamentalmente bajo la forma de ácido gibrelíco (GA), siendo la GA₃ la más utilizada a nivel comercial, conocidas principalmente por sus efectos promotores en la elongación de tallo mediante la estimulación de la división y elongación celular. En altas concentraciones pueden inhibir la formación de raíces adventicias, impidiendo la diferenciación de los tejidos a un estado meristemático. Sin embargo, se ha visto que en bajas concentraciones pueden promover la iniciación radical en especies como *Pisum sativum*, especialmente cuando las estacas de estas plantas crecieron en condiciones con baja intensidad lumínica. En otras especies, como en arroz o en los álamos, se observó que la aplicación exógena de GA inhibe la formación de raíces adventicias, mientras que plantas mutantes carentes de poder sintetizar GA son capaces de desarrollar mayor cantidad de estas raíces. Todavía está sin resolver si el efecto sobre el desarrollo radical es directo o indirecto (Hartmann et al. 2011, Bellini et al. 2014).

El rol del etileno (C₂H₄) en la formación de raíces laterales y adventicias es complejo, ya que la síntesis está controlada de acuerdo a los niveles de auxinas y viceversa. Altas concentraciones de auxinas pueden desencadenar el proceso de síntesis de etileno. Esta hormona regula el transporte y señalización de las auxinas, actuando en forma tanto antagónica como sinérgica en el desarrollo radical. C₂H₄ puede entonces mejorar, reducir o no ejercer efecto alguno en la formación de raíces adventicias (Hartmann et al. 2011, Bellini et al. 2014). Estudios realizados sobre el efecto del ácido abscísico (ABA) en la formación de raíces son contradictorias y su resultado va a depender de la concentración utilizada, del ambiente y estado nutricional de las estacas obtenidas (Hartmann et al., 2011). Bellini et al. (2014) describen en su trabajo que esta fitohormona tiene un efecto negativo en el

desarrollo radical tanto de raíces adventicias como laterales en plantas como tomate y arroz.

2.3.3 Factores genéticos

El desarrollo radical y su respuesta frente a diversos factores ambientales son controlados por una compleja serie de genes involucrados entre sí. En plantas/cultivos que son propagados vegetativamente a través de estacas, su respuesta frente a las condiciones ambientales es importante debido a que va a estar condicionando fuertemente los procesos fisiológicos y bioquímicos de la planta madre y, en consecuencia, influyendo en la capacidad de enraizamiento del material a propagar. A pesar de que han habido avances significativos en comprender los factores genéticos que desencadenan el proceso de desarrollo radical, poco se conoce con certeza cómo los factores endógenos y ambientales interactúan en el control de la rizogénesis adventicia (Geiss et al. 2009, Bellini et al. 2014).

En *Arabidopsis* y otras plantas herbáceas, se han hecho avances importantes en comprender los mecanismos genéticos y moleculares asociados a la rizogénesis adventicia permitiendo obtener un modelo inicial en la formación de raíces adventicias. Sin embargo, lograr extrapolar lo obtenido a especies leñosas de interés comercial, donde el desarrollo radical adventicio se considera como uno de los principales cuellos de botella en el momento de propagarlos vegetativamente, es un asunto pendiente (Bellini et al., 2014).

Estudios recientes indican que la formación de raíces adventicias es un carácter cuantitativo y hereditario, cuantificándose en especies leñosas a través del porcentaje de estacas enraizadas o número de raíces por estacas enraizadas. En plantas leñosas, las especies se clasifican de acuerdo a su capacidad de enraizamiento, diferenciando aquellas que presentan mayor facilidad para enraizar de las que muestran dificultad para enraizar (Geiss et al., 2009).

Se ha demostrado, entonces, que varios genes se encuentran involucrados en el desarrollo radical, con funciones diferentes y que van a codificar diferentes proteínas o factores de transcripción, resultando luego en una respuesta determinada (Scheres et al., 2002). Es en este proceso donde la auxina juega un papel importante promoviendo el desarrollo radical. Durante la etapa de formación del meristema radical, el nivel de expresión de genes involucrados en el transporte de auxinas y los transcritos involucrados en la respuesta frente a la auxina aumenta, lo que concuerda con el rol principal de esta hormona durante este proceso (Abu-Abied et al., 2012).

2.4 GENES CANDIDATOS

2.4.1 Genes constitutivos

Para evaluar los niveles de expresión de determinados genes, el uso de qPCR (quantitative real-time Polymerase Chain Reaction, en inglés) es uno de los métodos más ampliamente utilizados debido a su alta sensibilidad, velocidad, especificidad, facilidad en cuanto a su uso y la capacidad de llevar a cabo varias mediciones de expresión génica en diferentes muestras para un número limitado de genes en comparación con las técnicas convencionales. Para poder cuantificar la expresión de los genes de interés en forma precisa y reproducible, esta técnica utiliza controles standards denominados genes constitutivos (Thellin et al. 1999, Vandesompele et al. 2002, de Almeida et al. 2010).

Se denominan genes constitutivos ("housekeeping genes", en inglés), genes de referencia o genes de control interno a aquellos genes que se encuentran ampliamente expresados en abundancia y que son utilizados usualmente como genes de referencia para la normalización en la real time PCR, asumiendo que se están expresando en forma constante. La tendencia actual es en primer lugar comprobar cuáles genes constitutivos son los adecuados para el estudio de la célula o tejido objetivo y luego poder utilizar más de uno de ellos en la etapa de normalización (Dorak, 2006). Un gen de referencia se considera que se expresa en un nivel constante en la mayor parte de los estudios vinculados a organismos celulares, a través de diferentes estados de desarrollo y en diferentes órganos, a diferencia de un gen de interés, que puede mostrar cambios variables en el nivel de expresión durante el experimento. Además, se asume que su expresión no se va a ver afectada por parámetros experimentales, considerándolas como un método seguro y constante al momento de utilizarlos como controles standards (Thellin et al. 1999, Nicot et al. 2005).

Por normalización se entiende el uso de un gen control que se expresa a un nivel constante para comparar los resultados de la expresión génica en cuanto a la cantidad o calidad variable del gen en estudio. El enfoque más comúnmente aplicado para la normalización de RT-PCR es el uso de uno o más genes de referencia, el cual será sometido al mismo tipo de variación y preparación que los genes de interés utilizados en el estudio (de Almeida et al., 2010). Varios autores están de acuerdo con que el uso de múltiples genes es más apropiado para la normalización y así optimizar la reacción, debido a que el uso de un único gen de referencia aumenta las posibilidades de obtener resultados erróneos en la expresión (Dorak 2006, de Almeida et al. 2010). Si los rangos de los genes de referencia empleados como estándares son constantes o estadísticamente no presentan diferencias, pueden ser empleados como genes de referencia (Thellin et al., 1999).

En los años recientes se han reportado numerosos trabajos en los que se han validado un gran número de genes de referencia en plantas, principalmente en plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* y en aquellos cultivos comercialmente importantes tales como, raigrás, tabaco, tomate, papa, café, soja, trigo, cebada, algodón, entre otros. Solamente unos pocos trabajos se han encontrado vinculados con especies forestales como las del género *Populus* y *Eucalyptus*. De Almeida et al. (2010) evaluaron 11 genes de referencia para el estudio de expresión de genes asociados al enraizamiento en cultivos *in vitro* de *Eucalyptus globulus*, entre ellos los genes Actine (ACT), Translation Elongation Factor 2 (EF2), Histone (H2B), Polyubiquitin (UBI) y Alpha-Tubulin (TUA), cada uno con diferentes funciones a nivel celular. En este trabajo, concluyeron que *H2B* y *TUA* fueron los genes de referencia más adecuados al momento de la normalización del experimento en microestacas de *E. globulus* enraizadas *in vitro*. Esta información resulta de gran importancia a la hora de realizar la normalización de los resultados de qPCR y permitirá estudios de expresión génica más precisos en cultivos leñosos propagados clonalmente *in vitro*.

2.4.2 Genes asociados con el enraizamiento

El nivel de expresión de algunos genes vinculados con los procesos metabólicos que regulan el nivel de auxinas en los tejidos y la adquisición de competencia, muestran una marcada correlación con la diferenciación de raíces laterales o adventicias en algunas especies estudiadas. A continuación, se describen algunos de ellos, asociados con los procesos de transporte polar (PIN1), percepción de la señal hormonal (TIR1 y NIA), y adquisición de competencia (SHR y SCR).

2.4.2.1 Nitrate Reductase Gene (NIA)

El gen *NIA* se encuentra involucrado en la producción de óxido nítrico (NO) en las plantas, reduciendo el nitrato a nitrito y aún más puede reducir nitrito a óxido nítrico. El óxido nítrico es un gas que está asociado en varios procesos y respuestas en las plantas, tales como germinación, expansión de hojas, floración, defensas frente agentes bióticos y abióticos y el desarrollo de raíces adventicias. Recientemente se ha demostrado que un incremento en el nivel de NO de la célula, estimula la expresión de genes regulados por auxina: el NO aumenta la interacción entre TIR1/AFB y AUX/AIA (Dharmasiri et al. 2005, Abu-Abied et al. 2012, Terrile et al. 2013).

Estudios realizados en plántulas de *Eucalyptus grandis* permitieron descubrir que este gen presenta un mayor nivel de expresión en estacas obtenidas a partir de material juvenil (aquel material obtenido a partir de la

base del tallo) que uno adulto, generando una mayor producción de óxido nítrico, asociado con el desarrollo de raíces adventicias. También se observó que los altos niveles basales de AIA y del gen *NIA* en estacas juveniles podrían estar involucrados la alta cantidad de óxido nítrico luego de la escisión (separación), siendo relevante (además de otros factores) para los procesos iniciales a nivel subcelular que llevarán a cabo luego la formación de las raíces adventicias (Abu-Abied et al. 2012, Terrile et al. 2013).

2.4.2.2 Auxin Efflux Carrier Gene (PIN-1)

Como se ha dicho anteriormente, la fitohormona auxina juega un rol importante en la capacidad de enraizamiento de una planta, proceso que se encuentra afectado por su contenido endógeno y por la tasa de transporte. Para asegurar una efectiva distribución de esta hormona, las plantas han desarrollado dos sistemas de transporte: uno para largas distancias a través del floema y otro más corto y lento de célula a célula. La zona apical de los brotes son una fuente importante de auxinas endógenas, las cuales son trasladadas por varias clases de proteínas transportadoras mediante *carriers* de entrada (AUX1) o de salida (PIN) de forma basípeta a través de los tejidos vasculares del tallo (Fett-Neto et al. 2011, Liu et al. 2014).

Las proteínas PIN pertenecen a una familia de proteínas transmembrana que actúan en el flujo de salida de la auxina de las células, localizadas asimétricamente. La acumulación de proteínas PIN en sitios específicos de la membrana plasmática origina el transporte polar de AIA y su dirección. En ápices radicales y de tallo estas proteínas de membrana son de fácil detección, probablemente debido a las altas concentraciones de AIA que presentan esas zonas. Los genes que codifican las proteínas PIN fueron encontrados exclusivamente en genomas de plantas terrestres y juegan un rol importante a través de la regulación y distribución asimétrica de la auxina en múltiples etapas del desarrollo de la planta, desde la embriogénesis y morfogénesis hasta la organogénesis (Aloni et al. 2006, Krecek et al. 2009).

Esta familia de genes que codifican proteínas transmembrana, fueron identificados y asociados con el transporte de auxinas inicialmente en *Arabidopsis thaliana*. Más adelante se logró identificar la expresión del gen *PIN1* en *Eucalyptus globulus* y en 2013 Liu et al. encontraron que *PIN1*, *PIN2*, *PIN3*, *PIN5*, *PIN6* y *PIN8* codificaban en el genoma de *Populus* (Vieten et al. 2007, Krecek et al. 2009, Fett-Neto et al. 2011, Liu et al. 2014).

La actividad de las proteínas PIN puede ser regulada en varios niveles, incluyendo la regulación de la transcripción, degradación proteica y en la actividad de transporte. Así como hay varias señales endógenas y exógenas que modulan la distribución de auxinas y, por tanto, el desarrollo de

esta mediante la actividad del gen *PIN*, la misma auxina puede regular la transcripción de varias proteínas PIN. Otras fitohormonas y reguladores del crecimiento en las plantas influyen en la actividad de los promotores de *PIN* en diferentes maneras, entre ellos brasinoesteroides, citoquininas, flavonoides, gibrelinas, etileno, etc. Los efectos van a ser específicos del órgano a nivel celular y va a depender de la zona de la planta en la cual se esté analizando (Krecek et al., 2009).

Todas las proteínas PIN analizadas en *A. thaliana* hasta ahora muestran una polaridad ubicada a nivel subcelular, a pesar de que algunas pueden encontrarse en células específicas sin una polaridad marcada. La polaridad de este gen se correlaciona tanto con la dirección del transporte de auxina y/o con la acumulación de esta hormona en células adyacentes, indicando que la polaridad de *PIN* determina la dirección del flujo intercelular de auxinas (Vieten et al., 2007).

Varias proteínas PIN tienen funciones específicas en el desarrollo de la planta, las cuales se encuentran determinadas por su alta especificidad en la expresión de determinados tejidos y en la diversidad de genes promotores de esta proteína. En el caso de *A. thaliana PIN1* se expresa en zonas apicales de embriones tempranos, a lo largo de los tejidos vasculares, en los meristemas apicales y en órganos de desarrollo (Krecek et al., 2009).

2.4.2.3 Scarecrow Gene (SCR)

La proteína SCR es un factor de transcripción putativo que forma parte de la familia de las proteínas GRAS (derivado de los tres miembros inicialmente identificados: GAI, RGA y SCR), las cuales se caracterizan por tener una región N-terminal variable y una región C-terminal altamente conservada. Las proteínas GRAS están compuestas por entre 400 a 700 residuos aminoacídicos y una gran homología en la zona C-terminal. Esta familia de proteínas es específica de las plantas participando en una amplia variedad de procesos esenciales para su desarrollo, desde el mantenimiento de meristemas a la señalización de hormonas (Pysh et al. 1999, Bolle 2004, Sánchez et al. 2007).

El gen *SCR* fue el primero de la familia GRAS que se aisló en plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* por Di Laurenzio et al. (1996). AtSCR fue identificado ya que la pérdida de función de este gen provocó malformaciones en el desarrollo radical de esta planta. Gracias a esto, se demostró que el gen *SCR* juega un rol importante en la organización radial de la raíz, responsable de la generación correcta de parénquima cortical y endodermis (Di Laurenzio et al. 1996, Bolle 2004). Por tanto, el gen *SCR* codifica un factor de transcripción que primero se expresa en el centro quiescente de las células precursoras durante la embriogénesis, extendiéndose después a las células iniciales para la formación de endodermis y corteza (Sabatini et al., 2003).

Varios autores coinciden con que el gen *SCR* contiene motivos que sugieren que actúa como un factor de transcripción. Estos dominios ricos en residuos glutamina, serina, treonina y prolina han sido encontrados en co-activadores y factores que activan la transcripción (Di Laurenzio et al. 1996, Pysh et al. 1999, Xuan et al. 2014). Otra evidencia de que las proteínas GRAS se encuentran involucrada en la regulación de la transcripción deriva de la relación entre *SCR* y *SHR*, donde *SHR* puede inducir la expresión de *SCR* en *A. thaliana* (Bolle, 2004). El gen *SCR* se encuentra presente no solo en especies herbáceas como arroz (*Oryza sativa*), maíz (*Zea maíz*) o tomate (*Solanum lycopersicum*), sino que parecería también estar presente en especies leñosas como *Castanea*, *Pinus* o *Populus* (Sánchez et al. 2007, Xuan et al. 2014).

En *Castanea sativa* o *Pinus radiata*, las secuencias proteicas obtenidas contienen dominios característicos presentes en las proteínas GRAS y muestran una fuerte similitud con *SCR*; a estos se les conoce como SCL, por sus siglas en inglés “SCARECROW-LIKE” (Sánchez et al., 2007). En este trabajo, al realizar el estudio en la expresión de genes en estacas capaces de enraizar 24 horas después de la aplicación de auxinas, demostraron la inducción de este gen, por lo que su expresión se encuentra asociada con la distribución de auxinas en el meristema apical de raíces en los primeros estados de formación de raíces adventicias.

2.4.2.4 Short Root Gene (SHR)

SHORT ROOT (*SHR*) es otro factor de transcripción de la familia GRAS, requerido para la división asimétrica de las células responsables en la formación de tejidos subterráneos (endodermis y córtex), además de la especificación de la endodermis en raíces de *Arabidopsis thaliana*. *SHR* codifica un factor de transcripción que presenta homología con *SCR* (Helariutta et al., 2000).

Se ha demostrado que su expresión genera una sola capa de endodermis en la raíz a través de su pasaje desde el tejido vascular central en las células vecinas, donde, interactuando con *SCR* conduce a su secuestro en el núcleo (Abu-Abied et al., 2012). Junto con *SCR*, son reguladores claves en el desarrollo de raíces laterales y en la formación y mantenimiento de la estela, zona central de la raíz. A pesar de que *SHR* se transcribe solamente en la estela de la raíz, proteínas de *SHR* se encuentran en los centros de quiescencia adyacentes a las células, endodermis y zonas donde se desarrollan el córtex y endodermis, indicando el movimiento intercelular desde la estela hacia las células adyacentes. Mientras *SHR* regula tanto la división celular y la especificidad de la endodermis, *SCR* regula el proceso primario de división celular. Pérdidas de funciones en *SCR* y *SHR* en mutantes de

Arabidopsis producen raíces con malformaciones en los tejidos subterráneos (Abrash y Bergmann 2009, Xuan et al. 2014).

SHR y SCR son reguladores clave para el desarrollo de la raíz. SCR se requiere para reprimir el movimiento de SHR hacia la endodermis y se ha demostrado que SCR se une a SHR, secuestrándolo en el núcleo de las células endodérmicas (Abrash y Bergmann 2009, Xuan et al. 2014). Si bien ambos genes son esenciales para el desarrollo radical, *SHR* es importante para la división celular y la especificación de la célula. Por lo tanto SHR es necesario para la expresión de SCR, indicando que SHR se encuentra por encima dentro de la cascada metabólica (Helariutta et al., 2000).

2.4.2.5 Transport Inhibitor Response 1 Gene (TIR1)

La formación de raíces adventicias es un complejo proceso fisiológico en donde las auxinas juegan un rol importante. El modo de acción de esta hormona es mediante la regulación de la transcripción, promoviendo la degradación de una familia de represores transcripcionales conocidos como proteínas Aux/AIA. La proteína TIR es un receptor de auxinas que regula la degradación del factor de transcripción Aux/AIA, es decir, la unión directa de la auxina con TIR-1 promueve la degradación de estos represores transcripcionales. TIR-1 regula la rápida degradación de la proteína Aux/AIA y en consecuencia, genera un cambio en la expresión de los genes regulados por la auxina (Dharmasiri et al. 2005, Parry y Estelle 2006).

El gen *TIR-1* forma parte de una subfamilia conocida como F-box, las cuales funcionan como receptores de hormonas necesarios para varios receptores de auxinas en *Arabidopsis* (Dharmasiri et al. 2005, Woodward y Bartel 2005, Parry y Estelle 2006). La aplicación de auxinas promueve la interacción entre el gen *TIR-1* y la proteína Aux/AIA a los 5 minutos, desencadenando la reacción, con una saturación luego de los 30 minutos. En presencia de auxina, TIR1 se une a este grupo proteico provocando su degradación (Dharmasiri et al. 2005, Parry y Estelle 2006).

TIR-1 funciona junto con al menos otras tres proteínas F-BOX en la recepción de las auxinas, desencadenando en el crecimiento y desarrollo de la planta. La presencia de auxina actúa promoviendo la interacción entre el complejo Aux/AIA y el gen TIR1, degradando complejo proteico represor Aux/AIA, activando los factores de respuesta a la auxina, desencadenando

una catarata de procesos metabólicos en el desarrollo de la planta (Woodward y Bartel 2005, Li et al. 2009).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal fue proporcionado por el Programa de Selección de Frutas Nativas con potencial comercial, desarrollado en forma conjunta por la Facultad de Agronomía, el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA) Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) y varios actores sociales.

Las plantas madre preseleccionadas fueron cultivadas en invernáculo, con aplicaciones semanales de fungicida (Captan® 2 g.l⁻¹) y sometidas a podas severas para inducir la brotación de yemas axilares. Para este trabajo se seleccionaron dos de los materiales que presentaban capacidad contrastante de enraizamiento por estacas convencionales, identificados como C-74 (45% enraizamiento) y 27-1 (3,5% enraizamiento).

Los brotes obtenidos fueron cultivados *in vitro* en medio WPM (Lloyd y McCown, 1980), suplementado con vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962), 0.7% agar, 3% sacarosa, 0,44µM bencilaminopurina (BAP) y 0,054µM de ácido naftalenacético (ANA).

Para la inducción de raíces adventicias *in vitro* se utilizaron microestacas apicales de 1,5 a 2,0 cm de longitud en el mismo medio basal, con o sin agregado de 0,1µM de ácido indolbutírico (AIB). El cultivo se realizó en condiciones ambientales controladas, a una temperatura de 24°C ± 2°C, 30µmol.m⁻².s⁻¹ de intensidad lumínica y un fotoperiodo de 16/8.

3.2 BÚSQUEDA *IN SILICO* DE SECUENCIAS GÉNICAS

Las secuencias peptídicas correspondientes a los genes candidatos (PIN1, SCR, SHR, TIR, NIA) fueron tomadas de la especie *A. thaliana*, obtenidas de las bases de datos GenBank y PlantTFDB. Al no disponer de secuencias de *A. sellowiana*, estas secuencias fueron utilizadas para encontrar los genes correspondientes en el genoma de *Eucalyptus grandis*, (especie más emparentada con *A. sellowiana* por pertenecer a la familia Myrtaceae), para poder determinar regiones conservadas. Para esto se utilizó la plataforma Phytozome, que permite el acceso a las secuencias de genomas de plantas que han sido totalmente secuenciados. Tanto las secuencias codificantes de PIN1, SCR, SHR, TIR y NIA de *A. thaliana* como las encontradas en el genoma de *E. grandis* fueron utilizadas para los alineamientos realizados para el diseño de cebadores.

Por otro lado, los cebadores para los genes constitutivos fueron tomados de la publicación realizada por Almeida et al. (2010 Cuadro No.

1), en la que seleccionan posibles genes de referencia, requeridos para la normalización en ensayos de qPCR, para cuantificar la expresión de genes

durante el proceso de formación *in vitro* de raíces adventicias en *Eucalyptus globulus*.

Cuadro No. 1. Secuencias de los cebadores y características de amplificación para cada uno de los 5 genes constitutivos.

Gen	Secuencia de cebadores	Temperatura de annealing (°C)	Tamaño amplicón (p de b)
ACT2	F - 5' TCACGGAGAATTAGGGTTTCG 3'	60	100
	R - 5' CCGTGTCAGGATTGGGTAAT 3'		
EF2	F - 5' GCGTTCCTCAGTGTGTCTT 3'	60	126
	R - 5' GGTCATCTGCTCCTTCAAGC 3'		
UBI	F - 5' AGAAGGAATCGACCCTCCAC 3'	60	126
	R - 5' CCTTGACGTTGTCAATGGTG 3'		
TUA	R - 5' ACCGGTTGATCTCTCAGGTG 3'	60	103
	F - 5' TAAGGGACCAGGTTGGTCTG 3'		
H2B	F - 5' GAAGAAGCGGGTGAAGAAGA 3'	60	145
	R - 5' GGCGAGTTTCTCGAAGATGT 3'		

Fuente: de Almeida et al. (2010).

3.3 DISEÑO DE CEBADORES

Los cebadores se obtuvieron a partir de las regiones más conservadas de los genes de interés, es decir aquellas regiones similares o idénticas entre las diferentes especies analizadas. Para esto se realizó un alineamiento de las secuencias correspondientes a cada gen analizado de *A. thaliana* y *E. grandis*, de forma de poder localizar regiones con alta similitud, tratando de que difirieran lo mínimo posible entre las bases. Esta parte del trabajo se llevó a cabo utilizando clustalW en el programa Bioedit (Figura No. 1).

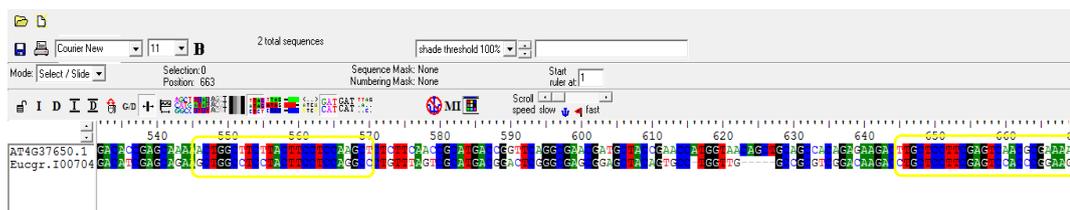


Figura No. 1. Representación del alineamiento de las secuencias para el gen SHR en *A. thaliana* y *E. grandis*. La zona recuadrada en amarillo indica las regiones más conservadas entre ambas secuencias para el diseño de cebadores.

Una vez localizadas las regiones conservadas, se diseñaron los cebadores utilizando el programa Primer 3 Plus como herramienta de software. Los cebadores diseñados fueron encargados a la empresa Macrogen, Corea.

3.4 AMPLIFICACIÓN DE GENES EN *Acca sellowiana*

Para corroborar si los cebadores fueron correctamente diseñados y presentaban homología con regiones genómicas de *A. sellowiana*, se extrajo ADN genómico de dos genotipos a partir de hojas frescas de acuerdo al protocolo de Doyle y Doyle (1987) con modificaciones. Muestras de *E. grandis* y *A. thaliana* también fueron incluidas, utilizando el mismo protocolo. La cantidad y concentración del ADN fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa 0,8% y la calidad mediante espectrofotometría con NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific®).

Mediante amplificación vía PCR se probaron los diferentes cebadores diseñados en muestras de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana*, *Eucalyptus grandis* y genotipos contrastantes de interés de *Acca sellowiana*. A su vez, se agregó una muestra sin ADN (de agua estéril) como control negativo.

Para la reacción de PCR se diseñó un mix a un volumen final de 20µl, utilizando Buffer de reacción 1x, 2mM MgCl₂, 1mM dNTP's (dNTP Set Thermo Scientific), 0,5µM de cada primer, 0,5U Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific), 100ng de ADN genómico. El programa de amplificación incluyó un paso de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, una temperatura de renaturalización ajustada a cada

iniciador entre 50 a 58°C por 30 segundos (de acuerdo a cada temperatura de annealing) y 72°C por 40 segundos, más un paso de extensión de 72°C por 3 minutos, realizado en el termociclador Gene Touch Thermal Cycler de Bioer Technology®.

Los productos de amplificación fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 2% con TBE 1X como solución tampón y visualizados por tinción con bromuro de etidio. Se utilizó el marcador de peso molecular Gene Ruler 1kb Thermo Scientific®. En los casos que se obtuvo un único producto de amplificación se enviaron junto con los cebadores respectivos a Macrogen, Corea, para su secuenciación.

3.5 ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Una vez enviados los productos al servicio de secuenciación, se recibió un electroferograma con diferentes formatos y una versión preliminar de la secuencia en formato texto. Estas secuencias recibidas son una primera aproximación y, dependiendo del uso que se vaya a hacer de ella, la magnitud del proyecto y los recursos humanos disponibles puede y debe ser corroborada y corregida con diferentes grados de rigor. Sólo para algunas aplicaciones se justifica su utilización directa.

Los resultados obtenidos de la secuenciación fueron analizados con el programa FinchTV (Geospiza®). Este programa permite observar y editar los archivos de las secuencias de ADN como cromatogramas. En un archivo de cromatograma, las intensidades de cada base son colocadas en gráficos y con un color determinado. Así, una base G será de color negro, C corresponde al azul, T al rojo y A al verde. La letra N corresponde a una zona en donde el nucleótido no pudo ser reconocido o determinado por el cromatograma. Utilizando el programa Sequencher (Gene Codes©) mediante la importación de las secuencias editadas, se logró obtener la secuencia consenso de ADN con un largo de bases determinada a partir de las secuencias de los cebadores F y R, conocida como "contigs" (segmentos de ADN superpuestos que forman la región consenso). Comparando los "contigs" que se solapan y observando los cromatogramas, se pudo editar la secuencia final o directamente descartar aquellas que presentaban irregularidades, ambigüedades o desacuerdos.

Con el propósito de confirmar que los fragmentos de las secuencias obtenidas, ya editadas, presentaban similitud con los genes buscados, se compararon los resultados con las secuencias que se encuentran en el banco de datos del GenBank. Esto se logró ingresando a la base de datos la secuencia y luego comparando con las demás secuencias existentes utilizando el programa BLAST ("Basic Local Alignment Search Tool", por su sigla en inglés). Esta herramienta permite comparar nucleótidos o secuencias proteicas con las del banco de datos, encontrando similitudes locales entre secuencias y calculando el porcentaje de similitud entre ellas y su significancia estadística, entre otras funciones. Se consultó la base de datos de proteínas,

utilizando las secuencias de nucleótidos obtenidas a través de su traducción (BLASTx). Además, se comparó el grado de similitud de las secuencias aisladas de *A. sellowiana* con proteínas con las que se cuenta con evidencia experimental en *A. thaliana*. Para ello se utilizó la base de datos UniProt, la cual identifica las proteínas a partir de la base de datos que han sido revisadas y anotadas manualmente (es decir, proteínas con información extraída de la literatura, de las que se tiene evidencia experimental a nivel de ARN y/o proteico).

3.6 DISEÑO DE CEBADORES ESPECÍFICOS Y PRUEBA CON ADN GENÓMICO

A partir de las secuencias encontradas en el genoma de *A. sellowiana*, sabiendo que presentan homología con los genes candidatos, se diseñaron nuevos cebadores específicos para ser utilizados en estudios de expresión mediante qPCR de dos genotipos contrastantes de *A. sellowiana*. Debido a que la eficiencia de amplificación del gen de referencia y el de interés debe ser similar cuando se realizan ensayos de expresión relativa, se diseñó más de un par de cebadores, tanto para los genes de interés como para los genes de referencia, previendo así más de una combinación posible. Se utilizó nuevamente el programa Primer3 Plus, opción q-PCR.

A diferencia de los cebadores convencionales, el diseño de los cebadores de q-PCR debe de cumplir determinados requerimientos particulares: la longitud del *primer* debe de estar entre 18 a 24 pb (óptimo, 20 pb), la región de amplificación no debe de ser mayor que 200 pb (por lo general, entre 60-150 pb), la T_m óptima debe de ser de 60 °C y la T_m de un par no debe de diferir entre más de dos grados, no deben formar ningún dímero ni estructura internas debido a que su formación implicaría la pérdida de precisión en la cuantificación y las eficiencias de amplificación de los genes en estudio deben ser similares.

Para corroborar que los cebadores fueron diseñados correctamente, se realizó PCR prueba utilizando muestras ADN de genómico. Las reacciones se llevaron a cabo a un volumen final de 20µl conteniendo 100ng de ADN genómico, 1x Buffer de reacción, 2mM MgCl₂, 1mM dNTP, 0.5µM de cada cebador y 0,5U Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific). El programa de amplificación incluyó un paso de 1 minuto a 94°C para la desnaturalización, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 30 segundos a una temperatura de anillamiento de entre 54 °C y 56 °C dependiendo del cebador y 72 °C por 40 segundos, más un paso de extensión de 72 °C por 3 minutos realizado en el termociclador Gene Touch Thermal Cycler de Bioer Technology®. Los productos de amplificación fueron separados en geles de agarosa al 2% con TBE 1X como solución tampón y visualizados por tinción en bromuro de etidio.

3.7 EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADN COPIA

Para corroborar si las secuencias amplificadas en el genoma de *A. sellowiana* se expresan en la porción basal del explanto, se realizó una extracción de ARN utilizando como material vegetal explantos *in vitro* de los genotipos C-74 (enraizante) y 27-1 (no enraizante), contrastantes para la característica de interés. Se extrajeron los primeros centímetros basales de tallo, tratando de obtener aproximadamente 50mg de tejido fresco.

Se probaron dos protocolos de extracción de ARN; para el primero se utilizó Trizol (guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction) (ver anexo), mientras que para el segundo se utilizó el RNeasy Plant Mini Kit (Quiagen) según instrucciones del fabricante. Se midió la concentración y calidad de ARN utilizando NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific©), buscando una relación $Abs_{260}/Abs_{280} = 2$. Las muestras de ARN fueron almacenadas en freezer de -80 °C para su posterior utilización.

Para la síntesis de ADNc, se utilizó ARN total tratado con DNAsa libre de RNAasa (Invitrogen, Carlsbad, USA) con el objetivo de eliminar cualquier posible residuo de ADN. Se partió de aproximadamente 1µg de ARN total tratado con DNAsa, usando un primer oligo (dT)₁₇ y la retrotranscriptasa reversa MMLV-RT/SS (Invitrogen, Carlsbad, USA). Dicha síntesis fue realizada según las indicaciones del fabricante con pequeñas modificaciones (ver anexo).

Se probaron los cebadores en una PCR utilizando el cDNA obtenido más un blanco para corroborar que no hubo contaminación. El ciclo de amplificación consistió en un paso a 94 °C por un minuto, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, Tan de cada cebador por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos y un paso final de 72 °C por 3 minutos, realizado en el termociclador Gene Touch Thermal Cycler de Bioer Technology®. Los productos de amplificación fueron separados en geles de agarosa al 2% con TBE 1X como solución tampón y visualizados por tinción en bromuro de etidio.

4 RESULTADOS

4.1 GENES ANALIZADOS

Para cada uno de los genes candidatos seleccionados se diseñaron dos juegos de cebadores, que se listan en la Cuadro No. 2. Para los genes TIR1 y SHR se obtuvieron productos de amplificación única y de un tamaño aproximado al esperado con un par de cebadores (Figuras No. 2 y 3), o en el caso de PIN1 con ambos juegos de cebadores (Figura No. 4). Para el gen SCR se obtuvieron varios productos de amplificación (posible amplificación inespecífica), mientras que para el gen NIA no se obtuvo producto de amplificación (Figura No. 5). Sólo se enviaron a secuenciar los productos de PCR en los que se obtuvo un único amplicón. Con respecto a los genes constitutivos, se obtuvo un único producto de amplificación los genes H2B, UBI, y EF2 y ACT (Figuras No. 2 y 4). Sin embargo, el gen TUA presentó amplificación inespecífica por lo que fue descartado (Figura No.5).

Cuadro No. 2. Secuencias de cebadores diseñados y las características de amplificación para cada uno de los genes de interés.

Gen	Secuencia de cebadores	Tamaño (p de b)	Tm (°C)	Región del cebador	Tamaño esperado (p de b)
1-NIA	F - 5' TCCATGGTCCGTCTCACC 3'	18	60,5°C	550 - 568	312
	R - 5' GCGGATCCCCAGTTGAA 3'	17	60,6°C	845 - 862	
2-NIA	F - 5' GGATCCGTCCCGAGACATC 3'	19	62,8°C	1094 - 1112	533
	R - 5' GACCAGAAGCACCAACACCA 3'	20	62,1°C	1607 - 1627	
1-PIN1	F - 5' CCTCATGGTCCAGATCGTC 3'	19	59,0°C	393 - 412	337
	R - 5' CGAGTATATCTCAGCATTGGTTAGG 3'	25	60,4°C	705 - 730	
2-PIN1	F - 5' ACGGGGTCGGACTTCTAC 3'	18	57,5°C	7 - 24	493
	R - 5' TCAGGGAAGTCTTGGAG 3'	18	57,3°C	481 - 500	
1-SCR	F - 5' TATACGAGGGCAGAGTAGACG 3'	21	57,2°C	848 - 869	183
	R - 5' CATGTTCCCTCCGTGAACAA 3'	19	58,0°C	1012 - 1031	
2-SCR	F - 5' ATCGGAGCAACCCTCCACT 3'	19	62,0°C	1122 - 1140	442
	R - 5' CCACCAGCGTCCACCAC 3'	17	62,3°C	1549 - 1564	
1-SHR	F - 5' AAGACTTGCTCCTTCGAGTCCA 3'	22	62,7°C	640 - 662	520
	R - 5' TCGGTCTTAACCGTCGGAAA 3'	20	62,8°C	1143 - 1163	
2-SHR	F - 5' GCTGGCCTCCTACTTCCTC 3'	19	59,0°C	546 - 565	427
	R - 5' GCCTCGCAAATTTCTCCAT 3'	19	60,2°C	955 - 973	
1-TIR1	F - 5' TCTTTTAAGAATTTTAAGGGTTCTTGT 3'	27	58,5°C	382-409	446
	R - 5' AGCAATCCCAAATCCAGA 3'	19	58,1°C	809-828	
2-TIR1	F - 5' ACGCGAGCTGAGAGTGTTC 3'	20	60,7°C	1020 - 1040	511
	R - 5' GATCGCATTGTCTCCAGCTT 3'	20	60,4°C	1510 - 1530	

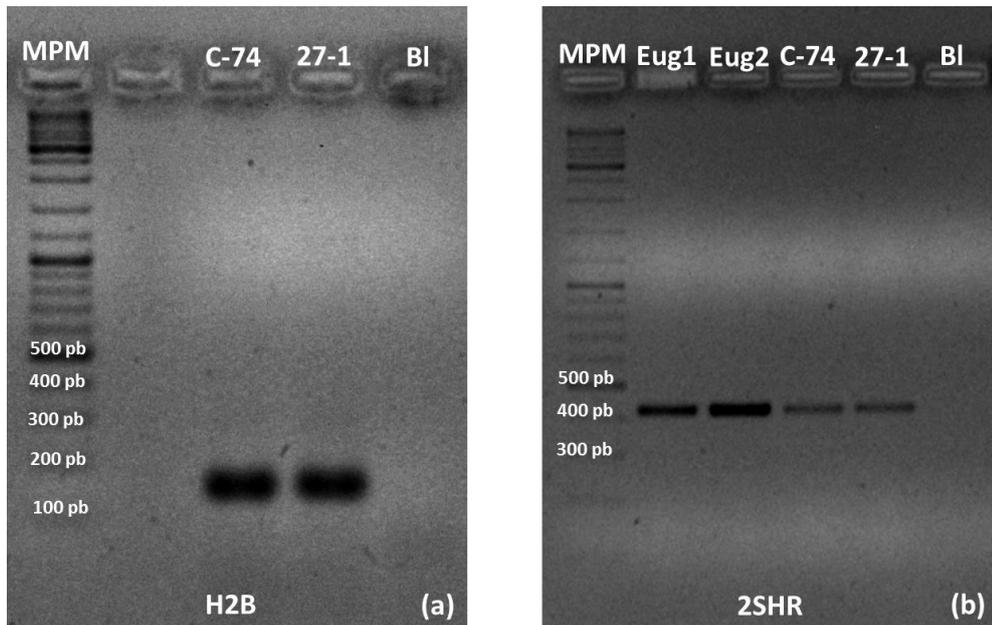


Figura No. 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% utilizando un juego de cebadores para el gen constitutivo H2B (a) y el juego de cebadores 2 para SHR (b) en dos genotipos de *Acca sellowiana* (C-74 y 27-1) y *Eucalyptus grandis*. Los resultados obtenidos coinciden con lo esperado (145 pb para H2B y 427 pb para 2SHR). Eug: *E. grandis*; BI: blanco; MPM: marcador de Peso Molecular 1Kb.

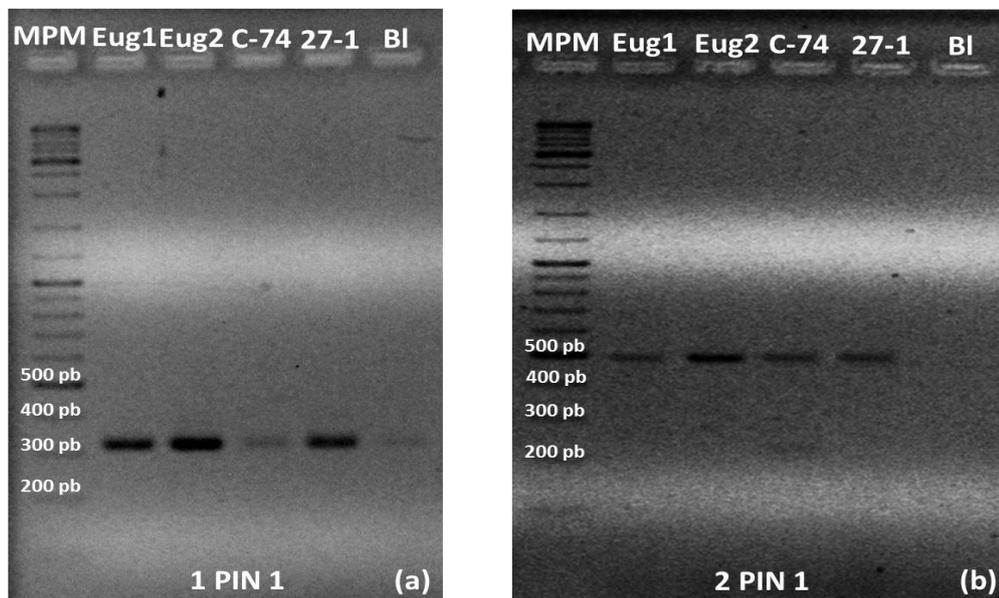


Figura No. 3. Electroforesis en gel de agarosa al 2% utilizando los dos juegos de cebadores diseñados a partir del gen PIN1 en ADN genómico de *E. grandis* y dos genotipos contrastantes de *A. sellowiana* (C-74 y 27-1). Los tamaños obtenidos coinciden con los esperados (337 p. de b. para 1-PIN1 (a); 493 p. de b. para 2-PIN1(b)). Eug: *E. grandis*; BI: blanco; MPM: marcador de Peso Molecular 1Kb.

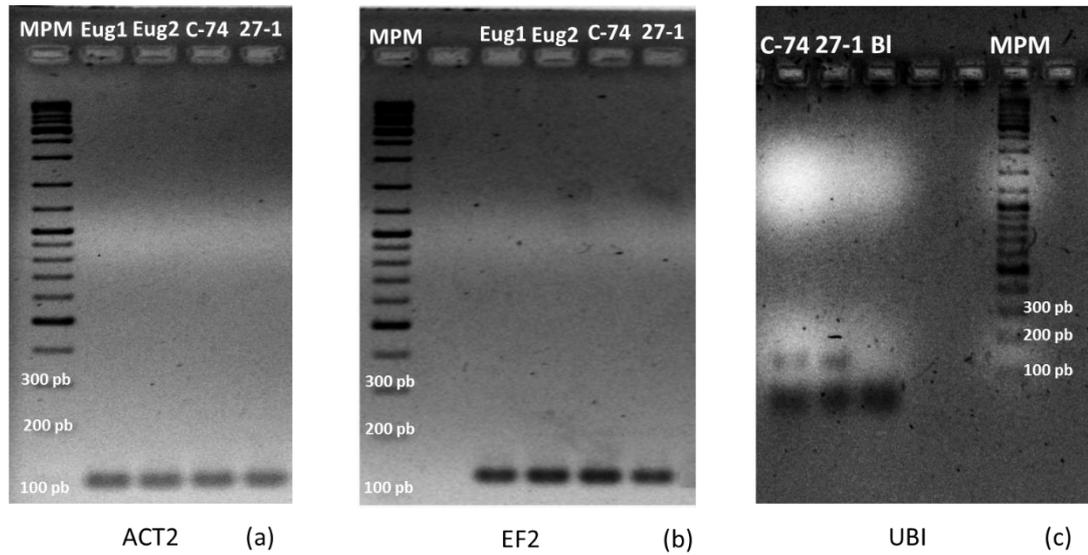
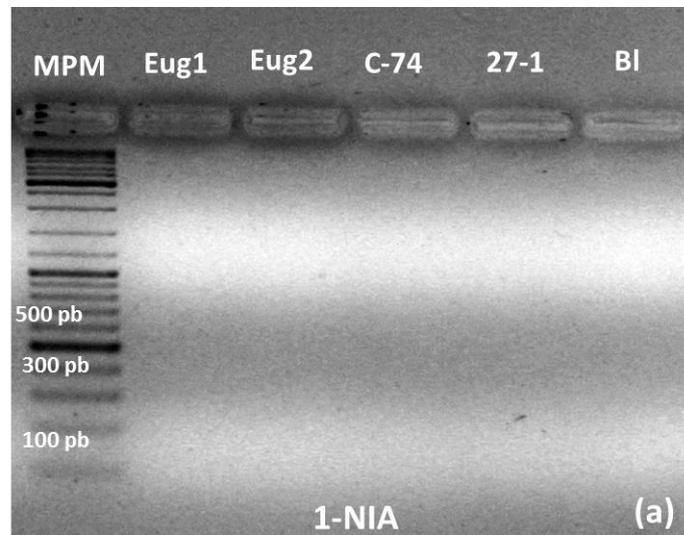


Figura No. 4. Electroforesis en gel de agarosa al 2% utilizando los cebadores diseñados a partir de las secuencias de los genes constitutivos en ADN genómico de dos genotipos de *A. sellowiana* (C-74 y 27-1), *E. grandis* (Eug) y *A. thaliana* (At). Los tamaños obtenidos coinciden con los esperados (ACT: 100 pb; EF2:126 pb; UBI: 126 pb) Bl: blanco; MPM: marcador de peso molecular 1Kb.



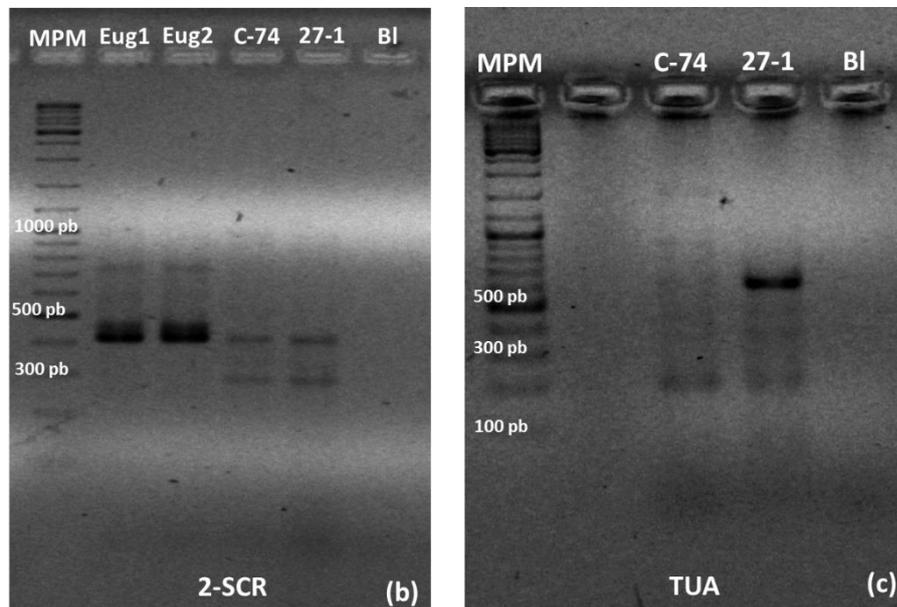


Figura No. 5. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en donde no se obtuvo producto de PCR (a) o el producto de PCR presentó amplificaciones inespecíficas (b y c), descartando los genes. C-74 y 27-1: genotipos de *A. sellowiana*; Eug: *E. grandis*; BI: blanco; MPM: marcador de Peso Molecular 1Kb.

4.2 GENES SECUENCIADOS

Las secuencias obtenidas fueron editadas, eliminando aquellas regiones que presentaron picos irregulares o erróneos, que tienden a aparecer fuera de fase. A partir de las secuencias editadas, se obtuvieron secuencias consenso para tres genes de interés y tres constitutivos, detalladas a continuación (Figuras No. 6 y 7). Para el caso del gen Actina, se descartaron las secuencias por presentar varias señales superpuestas.

EF2 Secuencia.

```
      C A F P Q C V F D H W D M M M S D
1    CTGTGCGTTCCCTCAGTGTGTCTTCGATCACTGGGATATGATGATGTCCGA
      P S G A W V S G S S L V T D I R
51   TCCTTCTGGAGCCTGGGTCTCAGGCAGCTCACTGGTTACTGATATCCGTA
      K R K G L K E Q M T K
101  AGAGGAAGGGCTTGAAGGAGCAGATGACCAAG
```

H2B Secuencia.

```
      S E E A G E E E R G D V Q D L H L
1    TCGGAAGAAGCGGGTGAAGAAGAGCGTGGAGACGTACAAGATCTACATCT
      Q G A E A G P P G H R H L Q Q G
51   TCAAGGTGCTGAAGCAGGTCCACCCGGACATCGGCATCTCCAGCAAGGCC
      H G H H E Q L H Q R H L R E T R P
101  ATGGGCATCATGAACAGCTTCATCAACGACATCTTCGAGAAACTCGCCCG
151  AA
```

UBI Secuencia.

```
      L E G M A L P L V S S S Q G G M Q
1    TTAGAAGGAATGGCCCTTCCCCTTGTTTCTTCGTCTCAGGGAGGCATGCA
      I F C R R L S P Q T I Y L S R W
51   GATCTTCTGTGGAAGACTCTCACCGCAGACCATCTACCTCTCGAGGTGGA
      R A P T P L T T S R
101  GAGCTCCGACACCATTGACAACGTCAAGG
```

Figura No. 6. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos obtenidos para los genes constitutivos EF2, H2B y UBI en *A. sellowiana*.

SHR Secuencia.

```
      D A G E R S Y R A L L A A S D K T
1    GACGCGGGCGAGCGGAGCTACCGTGCCTTGTTGGCCGCGTCAGACAAGAC
      R S F E S T R K M V L K F Q E V
51   CCGCTCCTTCGAGTCCACCCGGAAGATGGTGCTCAAGTTCCAGGAGGTGA
      S P W T T F G H V A C N G A I M E
101  GCCCGTGGACCACCTTCGGCCATGTGGCCTGCAACGGCGCAATCATGGAG
      A L E G E S K L H I V D I S N T Y
151  GCCCTTGAGGGCGAGAGCAAGTTGCACATAGTCGACATCAGCAACACGTA
      C T Q W P T L L E A L A T R T D
201  TTGCACCCAGTGGCCAACCCTGCTCGAGGCTCTGGCAACCCGGACGGACG
      E T P H L R L T T V V A S K A N G
251  AGACGCCCCACCTGCGGCTCACCACCGTCGTGGCGAGCAAGGCGAACGGT
      G A G A G G V P E C R S H E R M G
301  GGGGCGGGGGCGGGTGGCGTGCCGGAGTGCAGAAGTCATGAAAGAATGGG
      A G W R N L R G
351  AGCCGGATGGAGAAATTTGCGAGGCAA
```

TIR Secuencia.

V P Q E L E E F F R P S P S T V N
1 TGTACCCCAGGAGCTCGAAGAGTTTTTCCGTCCGAGCCCTTCAACCGTGAA
Q M Y L L T E Q G L V S V S E G
51 CCAAATGTATCTTTTAACAGAGCAGGGCCTCGTGTCAGTGTCTGAGGGTT
C P K L Q S V L Y F C R Q M S N A
101 GCCCCAAGCTTCAGTCAGTTTTGTACTTCTGCCGCCAGATGTCTAATGCA
A L V T I A R N R P N M T R F R L
151 GCCTTAGTTACCATAGCTCGGAACCGCCCTAACATGACTCGATTCCGACT
C I I E P R C P D Y L T L E P L
201 TTGTATCATTGAACCACGTTGTCCTGATTATTTAACTCTTGAGCCACTCG
D T G F G A I V Q Q C K D L Q R L
251 ATACAGGCTTCGGAGCCATTGTCCAACAGTGCAAGGATCTCCAGCGTCTC
S L S G L L T D R V F E Y I G T Y
301 TCTCTATCAGGTCTTCTAACCGACCGCGTGTGTTGAGTACATAGGGACTTA
A K K L E M L S V A F A G D S D
351 TGCCAAGAAGCTTGAGATGCTTTCTGTGGCATTGCTGGAGACAGTACT
L G L H H V L S G C D S L R K L E
401 TGGGACTGCACCATGTGCTATCGGGCTGCGACAGTCTTAGAAAATTAGAG
I R D C P F G D K A L L A N A A K
451 ATCCGAGACTGCCCGTTTGGCGACAAGGCGCTTTTGGCCAATGCTGCAAA
L E T M R S
501 GCTGGAGACAATGCGATCAA

Figura No. 7. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos obtenidas para SHR y TIR en *A. sellowiana*.

Para el gen PIN1 se obtuvieron secuencias de buena calidad con los dos juegos de cebadores diseñados (1PIN1= 325pb; 2PIN1= 430pb). Estos cebadores generaron amplicones que se solapan parcialmente, permitiendo obtener una mayor cobertura del gen PIN1, como se muestra en la Figura No.8 (Secuencia de PIN1 ensamblada: 672 pb).

PIN secuencia ensamblada.

```

      V D H V A V I L A Y G S V R W W R
1   GTCGATCACGTGGCTGTGATCCTGGCCTACGGCTCCGTCGGGTGGTGGCG
      I F T P D Q C S G I N R F V A L
51  AATCTTCACCCCGGACCAGTGCTCCGGCATCAACCGCTTCGTCGCCCTCT
      F A V P L L S F H F I S S N N P F
101 TCGCCGTCCCCCTCCTCTCCTTCCACTTCATCTCCTCCAACAACCCTTTT
      N M N L R F L A A D S L Q K L L I
151 AACATGAACCTCCGGTTCCTCGCCGCTGACTCCCTCCAGAAGCTCCTCAT
      L L A L A L W S R L S R R G S L
201 CCTCCTCGCCCTCGCCCTCTGGTCCCGCCTCTCCCGCCGCGGCTCCCTCG
      D W S I T L F S L A T L P N T L V
251 ACTGGTCCATTACCCTCTTCTCCCTCGCCACCCTCCCCAACACCCTCGTC
      M G I P L L R G M Y G P Y S G D L
301 ATGGGCATCCCCCTCCTCCGCGGCATGTACGGCCCCTACTCCGGTGACCT
      M V Q I V V L Q C I I W Y T L M
351 CATGGTCCAGATCGTCGTCCTCCAGTGCATCATCTGGTACACTCTGATGC
      L F L F E Y R A A R T L I S N Q F
401 TTTTCCTGTTTCGAGTACCGCGCCGCGGAACCCTCATCTCCAACCAGTTC
      P G A A A A S I V S I Q V D P D V
451 CCTGGCGCCGCCGCGCGTCCATCGTCTCCATCCAAGTCGACCCTGACGT
      V S L D G S R Q P L E T E A E V
501 CGTCTCCCTAGATGGCTCCCGGCAGCCCCTCGAGACCGAGGCTGAGGTTG
      G S D G K L R V T V R L S S A S R
551 GCAGCGACGGCAAGCTCCGCGTCACCGTCCGCCTCTCCAGCGCCTCGCGG
      S D V F K P A A W L S P R P S N L
601 TCGGACGTCTTCAAGCCGGCGGCATGGCTCTCCCCACGGCCGTGGAACCT
      T N A E I Y S
651 AACCAATGCTGAGATATACTCG

```

Figura No. 8. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos obtenida del gen PIN en *A. sellowiana*.

Al comparar con las secuencias del banco de datos del NCBI, las secuencias obtenidas en la Cuadro No. 3 mostraron un alto grado de similitud a los genes correspondientes en *E. grandis*. En todos los casos las regiones génicas aisladas de *Acca sellowiana* coincidieron en más de un 90% con las secuencias génicas presentes en el genoma de *E. grandis*.

Mediante blastx del NCBI, el cual busca en la base de datos de proteínas, utilizando la secuencia de nucleótidos traducida en los 6 marcos de lectura, se confirmó la similitud de las secuencias encontradas en *A. sellowiana* con las proteínas de interés en *E. grandis*. Esta herramienta permitió detectar dominios característicos de las proteínas estudiadas en las secuencias aminoacídicas obtenidas, aunque en algunos casos el dominio no se encuentra completo. Para todos los genes analizados también se encontró similitud con sus homólogos en *Arabidopsis* en la base de datos Uniprot (Cuadro No.3).

Cuadro No. 3. Tamaños obtenidos de las secuencias de genes constitutivas y de interés seleccionados y los correspondientes porcentajes de identidad con los genes homólogos de *E. grandis* y *A. thaliana*, de acuerdo a diferentes bases de datos.

Secuencia	Tamaño obtenido (p de b)	Identidad NCBI (%) con <i>E. grandis</i>	Número de referencia en NCBI	Identidad Uniprot (%) con <i>Arabidopsis</i>	Número de referencia en Uniprot	Dominio
PIN Ensamblada	672	94%	XM_010035442.1	76,40%	Q9C6B8-1	Familia Transmembrana
SHR	426	92%	XM_010029789.1	75,30%	Q9SZF7	GRAS
TIR-1	521	95%	XM_010039868.1	84,80%	Q570C0-1	AMN
EF2	135	96%	XM_010062544.1	69%	Q9ASR1	
H2B	152	97%	XM_010043098.1	94%	Q9SI96	
UBI	129	98%	XR_726060.1	85%	Q42009	

Fuentes: NCBI (s.f.), UNIPROT (s.f.)

4.3 DISEÑO DE CEBADORES PARA QPCR Y AMPLIFICACIÓN A PARTIR DE ADN GENÓMICO

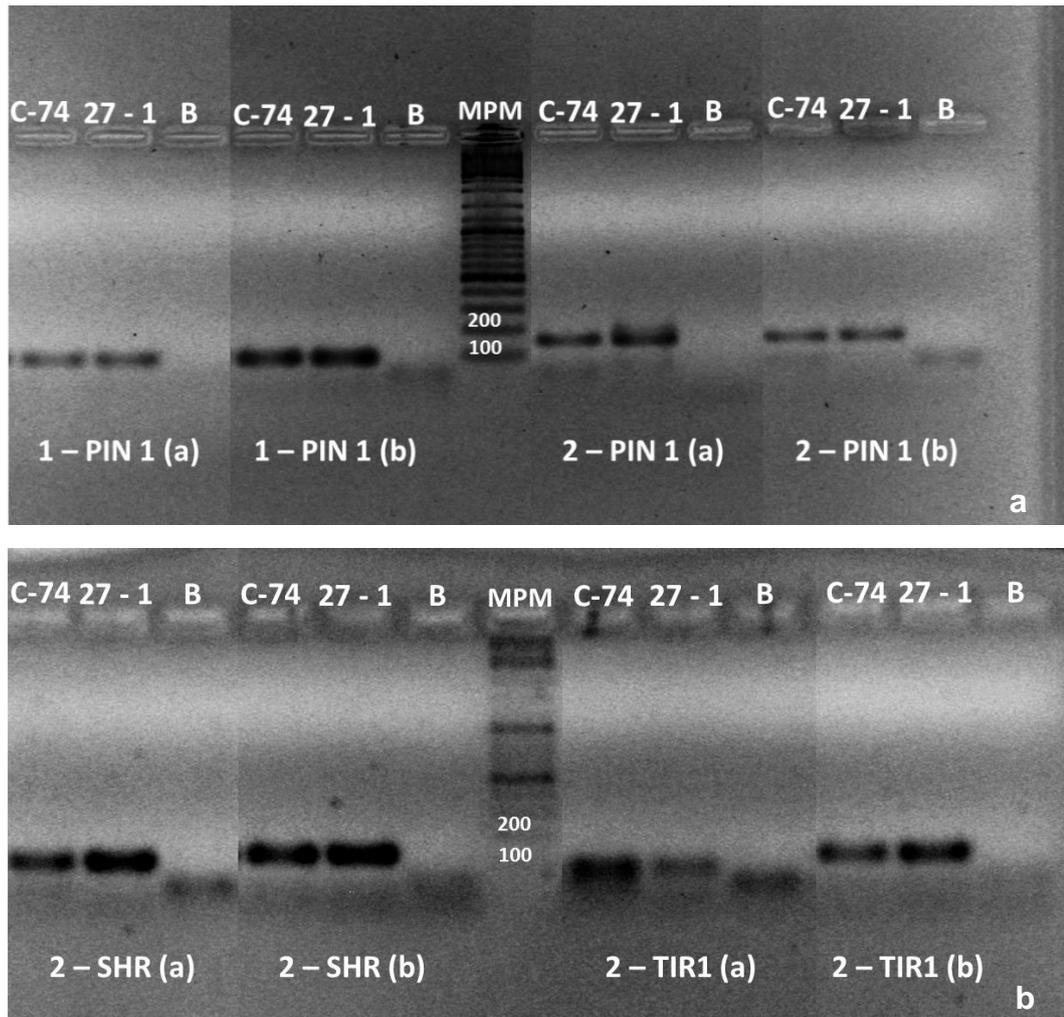
Para los genes TIR, SHR y H2B se pudieron diseñar dos juegos de cebadores, sin embargo, para PIN, EF2 y UBI se pudieron diseñar sólo un F y dos R o viceversa, por las características de las secuencias, que en algunas regiones no cumplen con los requisitos para qPCR (Cuadro No. 4).

Cuadro No. 4. Secuencias de cebadores para qPCR y sus características de amplificación diseñados a partir de las secuencias obtenidas para cada uno de los genes de interés y constitutivos.

Gen	Secuencia de cebadores	Tamaño	Tm (°C)	Tamaño amplificación	Comienzo
1-PIN1(a)	F1 - CTCTGATGCTTTTCCTGTTTCG	21 pb	60.0°C	94	45 pb
	R1 - TTGGATGGAGACGATGGAC	19 pb	59.4 °C		139 pb
1-PIN1 (b)	F2- CTGATGCTTTTCCTGTTTCGAG	21 pb	60.0 °C	95	47 pb
	R2 - GACTTGGATGGAGACGATGG	20 pb	60.5 °C		142 pb
2-PIN1 (a)	F1 - CTTCCACTTCATCTCCTCCAAC	22 pb	60.1 °C	149	120 pb
	R1 - AAGAGGGTAATGGACCAGTCG	21 pb	60.4 °C		269 pb
2-PIN1 (b)	F1 - CTTCCACTTCATCTCCTCCAAC	22 pb	60.1 °C	146	120 pb
	R2 - AGGGTAATGGACCAGTCGAG	20 pb	59.0 °C		266 pb
2SHR (a)	F1 - CAGGGCTTGCTTAGTCGTATG	21 pb	59.9 °C	115	22 pb
	R1 - TGGAACCTTGAGCACCATCTTC	21 pb	60.2 °C		137 pb
2SHR (b)	F2 - AAGATGGTGCTCAAGTTCCAG	21 pb	59.3 °C	130	118 pb
	R2 - CAATACGTGTTGCTGATGTCTG	21 pb	60.2 °C		248 pb
2TIR1 (a)	F1 - CATTGAACCACGTTGTCCTG	20 pb	60.0 °C	78	208 pb
	R1 - CTTGCACTGTTGGACAATGG	20 pb	60.2 °C		286 pb
2TIR1 (b)	F2 - CCATTGTCCAACAGTGCAAG	20 pb	60.2 °C	114	267 pb
	R2 - GCCACAGAAAGCATCTCAAG	20 pb	58.6 °C		381 pb
H2B (a)	F1 - AAGAAGCGGGTGAAGAAGAG	20 pb	58.7 °C	132	5 pb
	R1 - CGAAGATGTCGTTGATGAAGC	21 pb	60.8 °C		137 pb

H2B (b)	F2 - AAGAGCGTGGAGACGTACAAG	21 pb	59.6 °C	117	20 pb
	R1 - CGAAGATGTCGTTGATGAAGC	21 pb	60.8 °C		137 pb
EF2 (a)	F1 - TGATGTCCGATCCTTCTGG	19 pb	59.6 °C	76	42 pb
	R1 - TTCAAGCCCTTCCTTACG	20 pb	59.4 °C		118 pb
EF2 (b)	F2 - CAGTGTGTCTTCGATCACTGG	21 pb	59.3 °C	106	12 pb
	R1 - TTCAAGCCCTTCCTTACG	20 pb	59.4 °C		118 pb
UBI (a)	F1 - TCCCCTTGTTTCTTCGTCTC	20 pb	59.3 °C	111	18 pb
	R1 - CCTTGACGTTGTCAATGGTG	20 pb	60.0 °C		129 pb
UBI (b)	F2 - CCTTCCCCTTGTTTCTTCG	19 pb	59.6 °C	114	15 pb
	R1 - CCTTGACGTTGTCAATGGTG	20 pb	60.0 °C		129 pb

Los cebadores diseñados fueron probados mediante PCR convencional utilizando como molde ADN genómico (Figura No. 9). Todos los amplicones obtenidos tienen el tamaño esperado y corresponden con el esperado al amplificar a partir de ADNc.



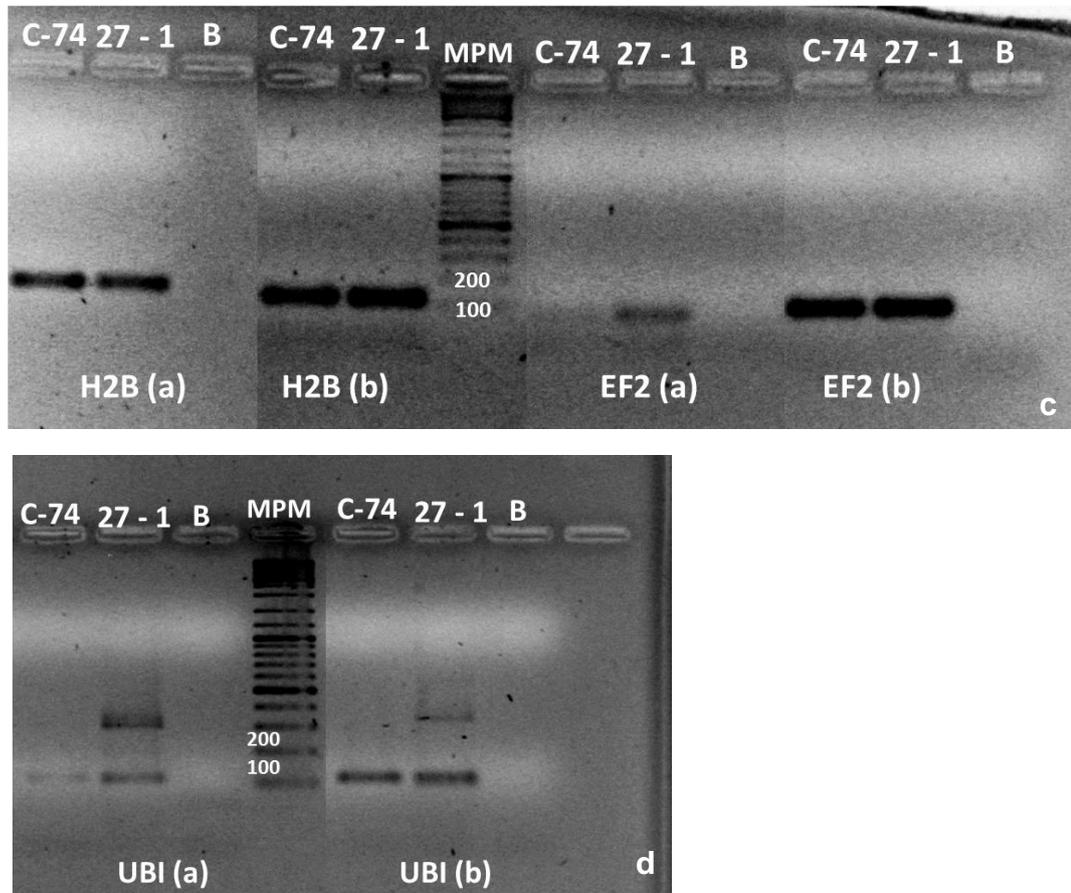


Figura No. 9. Electroforesis en gel con prueba de cebadores diseñados para qPCR en ADN genómico de dos genotipos contrastantes de *Acca sellowiana*, C-74 y 27-1. Figuras a y b representan los genes de interés. Figuras c y d representan los genes constitutivos. BI: blanco; MPM: marcador de Peso Molecular 1Kb.

4.4 EXPRESIÓN DE GENES EN EXPLANTOS *IN VITRO* DE *Acca sellowiana*

El ADNc sintetizado a partir de ARN de explantos *in vitro* de *A. sellowiana* se utilizó para evaluar el funcionamiento de los cebadores con ADNc y para detectar si los genes analizados se expresan o no en la porción basal de la microestaca extraído de los genotipos analizados, que son contrastantes en su capacidad de enraizamiento. Los resultados muestran que los tres genes de interés y los tres constitutivos se expresan en la porción basal de explantos *in vitro*, para ambos genotipos (Figura No. 10).

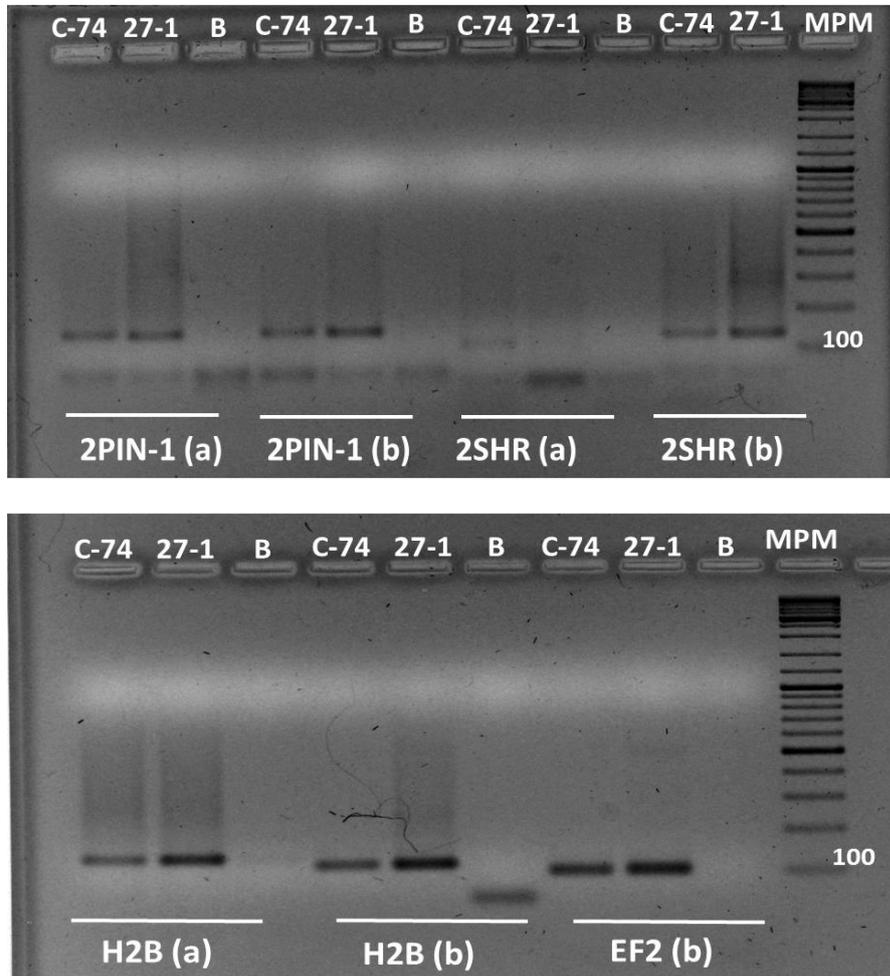


Figura No. 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con producto de PCR utilizando cDNA de los genotipos C-74 y 27-1 como material molde. Arriba: amplificación con dos juegos de cebadores PIN-1 y SHR. Abajo: amplificación con cebadores constitutivos H2B y EF2. El tamaño de amplificación coincide con los tamaños esperados. B: blanco. MPM: marcador de peso molecular 1kb.

5 DISCUSIÓN

La formación de raíces adventicias es un proceso clave en la propagación vegetativa de especies leñosas. Sin embargo, poco se conoce sobre los mecanismos moleculares asociados a este proceso, y menos en un cultivo como el de *Acca sellowiana*. Esto se debe a que el genoma de esta especie no ha sido secuenciado y no existen estudios hasta el momento sobre los mecanismos involucrados en la formación de raíces adventicias. Por esta razón, la estrategia elegida para el trabajo fue detectar posibles genes vinculados con la regulación de este proceso de desarrollo, presentes principalmente en *A. thaliana* y *E. grandis*, obtener sus secuencias en bases de datos y, a partir de las mismas, diseñar cebadores que permitan aislar estos genes en *A. sellowiana*.

En la especie modelo *A. thaliana*, se ha postulado que genes como SCR, SHR, TIR y PIN, entre otros, estarían formando parte de las redes regulatorias involucradas en el proceso de enraizamiento (De Lucas y Brady, 2013), por lo que fueron seleccionados para la búsqueda de secuencias. A partir de los alineamientos generados se lograron identificar regiones conservadas para el diseño de cebadores. En aquellas regiones donde las secuencias diferían en una o unas bases se consideró la base presente en el gen de *E. grandis* por ser una especie más emparentada con *A. sellowiana*. Esta metodología permitió aislar parcialmente tres de los cinco genes candidatos (PIN1, SHR y TIR1), al igual que tres de los cinco genes constitutivos seleccionados a partir de lo publicado por de Almeida et al. 2010 (EF2, H2B y TUA). Por cada juego de cebadores diseñados, si la amplificación era específica, se esperaba obtener un producto único de amplificación con un tamaño igual a lo esperado, siempre y cuando las secuencias no presentaran intrones (fragmentos de ADN presentes en un gen que no codifican ninguna proteína). Sin embargo, no fue posible para todos los casos. En el caso del gen SCR, al momento de realizar las pruebas se obtuvieron varios productos de amplificación, mientras que para el gen NIA, la reacción de PCR no dio productos de amplificación.

En el trabajo realizado se pudieron diseñar cebadores y se logró ajustar las condiciones para tres loci, obteniendo resultados más específicos. Sin embargo, no se logró obtener resultados de amplificación esperados, como ocurrió en el caso de los genes NIA y SCR, por presentar amplificación inespecífica o no amplificar directamente. La forma de poder descartar los productos de amplificación inespecíficos en SCR puede ser aumentando la especificidad al momento de realizar la PCR, ya sea al momento de realizar la mezcla de la reacción a través de la disminución las concentraciones de cebadores, dNTP's y MgCl₂, o cambiando las temperaturas de "annealing" y/o su tiempo de duración, junto con la de la fase de extensión. En general, altas temperaturas y disminuyendo los tiempos de "annealing" y extensión confieren alta especificidad y evitan la sobre amplificación (Cha y Thilly, 1993). Por otra

parte, para el gen NIA, al no haberse obtenido productos de amplificación, las modificaciones a realizar deberían de ser opuestas al caso de SCR.

Por otro lado, en cuanto a los cebadores diseñados, si bien fueron sesgados hacia la secuencia correspondiente a los genes de *E. grandis*, no necesariamente en *A. sellowiana* tendrán la misma secuencia de bases, y, por lo tanto, si las diferencias son importantes, la complementariedad entre el cebador y la hebra molde podrían ser insuficientes. Si las modificaciones en las condiciones de amplificación no fueran exitosas, se podrían diseñar nuevos cebadores para los genes SCR y NIA.

Con respecto a los genes constitutivos, para ACT2, EF2, H2B y UBI se obtuvo un único producto de amplificación, utilizando los cebadores reportados por De Almeida et al. (2010). En el caso de TUA, la amplificación dio como resultado varios fragmentos, por lo que se podría aumentar la especificidad de la misma manera que se explicó para SCR. Si bien ACT2 dio una única banda visible, el cromatograma resultante de la secuenciación del producto de PCR mostró varias secuencias superpuestas. En este caso pudo haber ocurrido una amplificación de varias regiones, pero con un tamaño similar. Es interesante destacar que estos genes se comportaron como constitutivos y son adecuados para estudios de expresión relativa de genes para la diferenciación de raíces de microestacas de *E. globulus*, por lo que podrían utilizarse para estudios de expresión de genes mediante qPCR en microestacas de *A. sellowiana*.

Al momento de analizar la secuenciación de los fragmentos aislados de *A. sellowiana*, se observó que presentaron una alta similitud de secuencia con los de los genes candidatos, principalmente en *E. grandis*. Además, las secuencias proteicas resultantes de la traducción de los fragmentos génicos aislados presentan, aunque en forma parcial, dominios característicos de las proteínas PIN1, SHR y TIR1. La secuencia de AsePIN1 presenta parte del dominio transmembrana típico de este tipo de proteínas (Gälweiler et al., 1998), al igual que la secuencia de AseSHR presenta parte del dominio GRAS como lo describe Helariutta et al. (2000). Sin embargo, al momento de analizar los resultados en AseTIR1, el fragmento aislado presenta un dominio parcial AMN, que se corresponde con 4 LRR (repeticiones ricas en leucina, por sus siglas en inglés) completos, pero no presenta el otro dominio FBox, típico de las proteínas TIR1. A pesar de esto, en la base de datos del NCBI coincide con que el gen aislado presenta similitudes con el gen TIR en *E. grandis*. Este dominio AMN contiene 16 repeticiones ricas en leucina (LRR) en *A. thaliana* y junto con el dominio FBox son características descriptivas para el gen TIR1 (Ruegger et al., 1998). Estos resultados confirmarían que los genes TIR1, PIN1 y SHR estarían presentes en el genoma de guayabo, y su secuencia presenta una similitud de más del 90 % con los respectivos genes de *E. grandis* en la región del gen que se logró aislar.

Con las secuencias obtenidas, se diseñaron nuevos cebadores, ahora específicos para los genes presentes en *A. sellowiana*, que cumplieran los

requisitos para ser usados en qPCR. Cuando estos cebadores fueron probados con ADN genómico, se obtuvieron bandas únicas en todos los casos, con el tamaño esperado, que se corresponde con el tamaño esperado para ADNc. Esto estaría indicando que los cebadores F y R diseñados (para cada gen) se encuentran en un mismo exón. De lo contrario, el tamaño del amplicón, al utilizar ADN genómico debería ser mayor al tamaño esperado para ADNc. Cuando se utilizó ADNc, sintetizado a partir de ARN de la porción basal de explantos *in vitro*, se observó que los tres genes de interés (SHR, TIR1 y PIN1) se expresan en esta porción de la microestaca, tanto en el genotipo que tiene buena capacidad de enraizamiento (C-74) como en el que no enraíza (27-1). Para conocer si existen diferencias cuantitativas en la expresión de dichos genes en los genotipos estudiados, se debería medir la acumulación de ARNm de los genes de interés, mediante qPCR. Para la cuantificación relativa, por PCR en tiempo real es necesaria la normalización del gen de interés con respecto a un gen de referencia (gen constitutivo). Para ello, ya contamos con secuencias para tres posibles genes constitutivos (H2B, EF2, UBI), y ya se evaluó el funcionamiento de los cebadores diseñados para los mismos. Estos cebadores podrán ser usados para determinar si estos genes se comportan como constitutivos en microestacas de genotipos de guayabo, contrastantes en su capacidad de enraizamiento.

El trabajo realizado constituye el primer estudio que intenta acercarse a la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la formación de raíces adventicias en *A. sellowiana*. La metodología utilizada permitió aislar parcialmente algunos genes reportados como clave en este proceso y podrá ser utilizada para la identificación de nuevos genes asociados con el proceso de enraizamiento. En futuras investigaciones se podrá realizar un análisis más detallado que incluya estudiar los niveles de expresión de los genes seleccionados, en respuesta a diferentes tratamientos hormonales, utilizando los cebadores específicos diseñados en este trabajo en ADNc de explantos *in vitro* de *A. sellowiana*

Los resultados de este trabajo, por lo tanto, aportan información que puede contribuir a entender las bases fisiológicas de la diferenciación de raíces adventicias. Tener conocimientos sobre los factores genéticos que inciden en este proceso al momento de propagar vegetativamente materiales de interés es un pilar fundamental al momento de llevar a cabo un programa de mejoramiento. Por tanto, los estudios de estos genes pueden utilizarse como una herramienta complementaria al momento de realizar la selección de los materiales previo a su propagación.

6 CONCLUSIONES

A partir de secuencias publicadas de especies como *Eucalyptus grandis* y *Arabidopsis thaliana* y se logró diseñar cebadores genéricos en las regiones más conservadas y amplificar tres de los cinco genes candidatos seleccionados relacionados con el proceso de enraizamiento en *Acca sellowiana*.

Las secuencias obtenidas con cebadores diseñados para estos tres genes, PIN-1, SHR y TIR1, presentan en la región aislada una similitud mayor al 90% con los correspondientes genes de *E. grandis*, por lo que se puede apoyar fuertemente la presencia de estos genes en el genoma de esta especie.

Los cebadores diseñados por de Almeida et al. (2010) para la amplificación de genes constitutivos utilizados en estudios de expresión mediante qPCR, que fueron probados en este trabajo, permitieron amplificar en *A. sellowiana* 3 genes constitutivos; EF2, H2B y UBI.

El diseño de cebadores específicos a partir de las secuencias obtenidas, permitió realizar un primer estudio sobre la expresión de los genes SHR, PIN-1 y TIR1 en la porción basal de explantos *in vitro* de genotipos contrastantes de *A. sellowiana*, mostrando que dichos genes se expresan en ambos genotipos. Estos cebadores podrán ser utilizados para estudiar en profundidad si existe una expresión diferencial de estos genes en ambos genotipos de guayabo, a partir de técnicas de PCR en tiempo real para estudios de expresión.

7 RESUMEN

La técnica de propagación *in vitro* es comúnmente utilizada en programas de producción y cultivo de especies clonales, con la finalidad de multiplicar aquellas plantas sin alterar sus características genéticas y, a su vez, mantenerlos libres de patógenos. La evaluación de la habilidad de enraizar en diferentes clones desarrollados *in vitro* es esencial para la selección de genotipos que luego pueden ser utilizados dentro de un programa de manejo y cultivo, para finalmente lograr multiplicarlos a un nivel comercial de manera exitosa. Los mecanismos por los cuales diferentes genotipos tienen habilidades para enraizar aún se desconocen. Sin embargo, se han realizado estudios moleculares con el propósito de detectar aquellos genes que se encuentren posiblemente implicados en este proceso. El objetivo de este trabajo fue encontrar aquellos genes candidatos asociados con el enraizamiento adventicio en *Acca sellowiana*, de manera de poder distinguir genotipos que presenten la habilidad de aquellos recalcitrantes. Dentro de la gran variedad de genes que se encuentran asociados con esta característica, NIA, PIN, SCR, SHR y TIR fueron seleccionados como genes candidatos para estos estudios. Se diseñaron cebadores a partir de las regiones conservadas publicadas de secuencias publicadas de *Eucalyptus grandis* y *Arabidopsis thaliana*. A su vez, se realizó el mismo procedimiento para obtener genes constitutivos que fueron validados en *Eucalyptus globulus* tales como ACT-2, EF2, H2B, TUA y UBI para ser utilizados como genes de referencias en estudios de expresión. Luego de haber secuenciado los productos de PCR, tres genes candidatos y tres genes constitutivos fueron seleccionados debido a que presentaron un alto porcentaje de identidad con respecto a las secuencias de origen (85-95%). La posterior amplificación de estas secuencias utilizando como hebra molde cDNA, podrá dar una conclusión más exacta de que estos genes se expresan en microestacas de *A. sellowiana*.

Palabras clave: Diseño de cebadores; Secuencias; Genes constitutivos; Genes candidatos.

8 SUMMARY

In vitro propagation is often used in clonal breeding programs to multiply plants without altering their genetic constitution and maintaining them free of pathogens. Assessing the ability of different clones to root *in vitro* is essential for the selection of genotypes that can be further used in a breeding program and commercially multiplied with success. The mechanisms underlying differences in adventitious rooting ability among genotypes are not fully understood. Molecular studies have been undertaken to detect genes possibly involved in this process. The aim of this work was to find candidate genes associated with adventitious rooting in *Acca sellowiana* to distinguish genotypes with this ability from recalcitrant types. Among the many genes that have been associated with adventitious rooting, SCR, NIA, PIN, SHR and TIR, were selected as candidate genes for this study. Primers were designed from conserved regions in published sequences of *E. grandis* and *A. thaliana*. The same procedure was followed for constitutive genes that had been validated in *E. globulus* such as ACT-2, EF2, TUA, UBI and H2B for further use as reference genes in expression studies. After sequencing the PCR products, three candidate genes and three constitutive genes, which showed a high percentage of identity with the source sequences (85 – 95%), were selected. Amplification of these sequences using cDNA as template allowed us to conclude that these genes are expressed in microshoots of *A. sellowiana*.

Keywords: Primer design; Sequences; Constitutive genes; Candidate genes.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Abrash, E.; Bergmann, D. 2009. Asymmetric cell divisions; a view from plant development. *Developmental Cell*. 16(6): 783-796.
2. Abu-Abied, M.; Szwerdszarf, D.; Mordehaev, I.; Levy, A.; Rogovoy, O.; Belausov, E.; Yaniv, Y.; Uliel, S.; Katzenellenbogen, M.; Riov, J.; Ophir, R.; Sadot, E. 2012. Gene expression profiling in juvenile and mature cuttings of *Eucalyptus grandis* reveals the importance of microtubule remodeling during adventitious root formation. *Plant Journal*. 71(5): 787-799.
3. Alegre, J.; Toledo, J. L.; Martínez, A.; Mora, O.; De Andrés, E. F. 1998. Rooting ability of *Dorycnium spp.* under different conditions. *Scientia Horticulturae*. 76(1-2): 123-129.
4. Aloni, R.; Aloni, E.; Langhans, M.; Ullrich, C. 2006. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture; regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals of Botany*. 97(5): 883-893.
5. Bellamine, J.; Penel, C.; Greppin, H.; Gaspar, T. 1998. Confirmation of the role of auxin and calcium in the late phases of adventitious root formation. *Plant Growth Regulation*. 26(3): 191-194.
6. Bellini, C.; Pacurar, D. I.; Perrone, I. 2014. Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Annual Review of Plant Biology*. 65: 639-666.
7. Beyl, C. A.; Trigiano, R. N. 2015. Plant propagation concepts and laboratory exercises. 2nd. ed. Boca Raton, FL, CRC. 480 p.
8. Bolle, C. 2004. The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta*. 218(5): 683-692.
9. Cha, R. S.; Thilly, W. G. 1993. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *Genome Research*. 3(3): S18-S29.
10. Correa, L.; Fett-Neto, A. G. 2004. Effects of temperature on adventitious root development in microcuttings of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. *Journal of Thermal Biology*. 29(6): 315-324.
11. de Almeida, M. R.; Ruedell, C.; Ricachenevsky, F.; Sperotto, R.; Pasquali, A. G.; Fett-Neto, A. G. 2010. Reference gene selection for quantitative reverse transcription-polymerase chain

reaction normalization during in vitro adventitious rooting in *Eucalyptus globulus* Labill. BMC Molecular Biology. 11: 73.

12. de Klerk, G. J.; van der Krieken, W.; de Jong, J. 1999. Review the formation of adventitious roots; new concepts, new possibilities. In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant. 35(3): 189-199.
13. _____. 2002. Rooting of microcuttings; theory and practice. In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant. 38(5): 415-422.
14. De Lucas, M.; Brady, S. M. 2013. Gene regulatory networks in the Arabidopsis root. Current Opinion in Plant Biology. 16(1): 50-55.
15. Dharmasiri, N.; Dharmasiri, S.; Estelle, M. 2005. The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. Nature. 435(7041): 446-451.
16. Di Laurenzio, L.; Wysocka-Diller, J.; Malamy, J. E.; Pysh, L.; Helariutta, Y.; Freshour, G.; Hahn, M. G.; Feldmann, K. A.; Benfey, P. N. 1996. The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root. Cell. 86(3): 423-433.
17. Dorak, T. 2006. Real-Time PCR. Newcastle, UK, Taylor and Francis. 362 p.
18. Fett-Neto, A. G.; Fett, J. P.; Veira Goulart, L. W.; Pasquali, G.; Termignoni, R. R.; Ferreira, A. G. 2001. Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globulus*. Tree Physiology. 21(7): 457-464.
19. _____.; de Almeida, M.; Ruedell, C. 2011. Expression of auxin carrier genes during adventitious rooting in *Eucalyptus globulus*. BMC Proceedings. 5(Suppl 7): P64.
20. Gälweiler, L.; Guan, C.; Muller, A.; Wisman, E.; Mendgen, K.; Yephremov, A.; Palme, K. 1998. Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue. Science. 282(5397): 2226-2230.
21. Geiss, G.; Gutierrez, L.; Bellini, C. 2009. Adventitious root formation; new insights and perspectives. Root Development. 37: 127-156.

22. George, E. F.; Hall, M. A.; Klerk, G. J. de. 2008. Plant growth regulators; I. Introduction; auxins, their analogues and inhibitors. In: George, E. F.; Hall, M. A.; Klerk, G. J. de eds. Plant propagation by tissue culture. 3rd. ed. Dordrecht, Netherlands, Springer. pp. 175-204.
23. Hackett, W. P. 1987. Cell and tissue culture in forestry. Dordrecht, Springer. v.1, 421 p.
24. Hamann, A. 1998. Adventitious root formation in cuttings of loblolly pine (*Pinus taeda* L.); developmental sequence and effects of maturation. *Trees*. 12(3): 175-180.
25. Hartmann, H. T.; Kester, D. E.; Davies, F. T.; Geneve, R. L. 2011. Plant propagation principles and practices. 8th. ed. Upper Saddle River, NJ, Prentice Hall. 928 p.
26. Helariutta, Y.; Fukaki, H.; Wysocka-Diller, J.; Nakajima, K.; Jung, J.; Sena, G.; Hauser, M. T.; Benfey, P. N. 2000. The short-root gene controls radial patterning of the Arabidopsis root through radial signaling. *Cell*. 101(5): 555-567.
27. Husen, A.; Pal, M. 2006. Variation in shoot anatomy and rooting behaviour of stem cuttings in relation to age of donor plants in teak (*Tectona grandis* Linn. f.). *New Forests*. 31(1): 57-73.
28. _____. 2007. Metabolic changes during adventitious root primordium development in *Tectona grandis* Linn. f. (teak) cuttings as affected by age of donor plants and auxin (IBA and NAA) treatment. *New Forests*. 33(3): 309-323.
29. Janick, J. 2005. The origin of fruits, fruit frowning and fruit breeding. *Plant Breeding Reviews*. 25: 255-320.
30. Krecek, P.; Skupa, P.; Libus, J.; Naramoto, S.; Tejos, R.; Friml, J.; Zazimalová, E. 2009. The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biology*. 10(12): 249.
31. Li, S.W.; Xue, L.; Xu, S.; Feng, H.; An, L. 2009. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. *Botanical Review*. 75(2): 230-247.
32. Liu, B.; Zhang, J.; Wang, L.; Li, J.; Zheng, H.; Chen, J.; Lu, M. 2014. A survey of *Populus* PIN-FORMED family genes reveals their

- diversified expression patterns. *Journal of Experimental Botany*. 65(9): 2437-2448.
33. NCBI (National Centre for Biotechnology Information, US). s.f. Genbank overview. (en línea). Bethesda, MD. s.p. Consultado ene. 2016. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
 34. Nicot, N.; Hausman, J. F.; Hoffmann, L.; Evers, D. 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*. 56(421): 2907-2914.
 35. Olmos, S.; Luciani, G.; Galdeano, E. 2004. Métodos de propagación y conservación de germoplasma. s.n.t. 353 p.
 36. Parry, G.; Estelle, M. 2006. Auxin receptors; a new role for F-box proteins. *Current Opinion in Cell Biology*. 18(2): 152-156.
 37. Pop, T. I.; Pamfil, D.; Bellini, C. 2011. Auxin control in the formation of adventitious roots. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 39(1): 307-316.
 38. Pysh, L. D.; Wysocka-Diller, J. W.; Camilleri, C.; Bouchez, D.; Benfey, P. N. 1999. The GRAS gene family in Arabidopsis; sequence, characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant Journal*. 18(1): 111-119.
 39. Ragonezi, C.; Klimaszewska, K.; Castro, M. R.; Lima, M.; de Oliveira, P.; Zavattieri, M. A. 2010a. Adventitious rooting of conifers; influence of physical and chemical factors. *Trees - Structure and Function*. 24(6): 975-992.
 40. _____.; Castro, M. R.; Klimaszewska, K.; Lima, M.; Zavattieri, M. A. 2010b. Influence of light quality and intensity on adventitious root formation in microshoots of *Pinus pinea* L. *Acta Horticulturae*. no. 865: 287-292.
 41. Rasmussen, A.; Smith, T. E.; Hunt, M. A. 2009. Cellular stages of root formation, root system quality and survival of *Pinus elliottii* var. *elliottii* × *P. caribaea* var. *hondurensis* cuttings in different temperature environments. *New Forests*. 38(3): 285-294.
 42. Ruegger, M.; Dewey, E.; Gray, W. M.; Hobbie, L.; Turner, J.; Estelle, M. 1998. The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes and Development*. 12(2): 198-207.

43. Sabatini, S.; Heidstra, R.; Wildwater, M.; Scheres, B. 2003. SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem. *Genes and Development*. 17(3): 354-358.
44. Sánchez, C.; Vielba, J. M.; Ferro, E.; Covelo, G.; Solé, A.; Abarca, D.; de Mier, B. S.; Díaz-Sala, C. 2007. Two SCARECROW-LIKE genes are induced in response to exogenous auxin in rooting-competent cuttings of distantly related forest species. *Tree Physiology*. 27(10): 1459-1470.
45. Santos, K.; Ducroquet, J. P.; Nodari, R. O. 2011. Caracterização genética de populações naturais de goiabeira serrana (*Acca sellowiana*) com marcadores microssatélites heterólogos. *Biotemas*. 24(4): 75-83.
46. Scheres, B.; Benfey, P.; Dolan, L. 2002. Root development. The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists. 1(1): e0101.
47. Terrile, M. C.; París, R.; Calderón-Villalobos, L.; Iglesias, M. J.; Lorenzo, L.; Estelle, M.; Casalengué, C. A. 2013. Nitric oxide influences auxin signaling through s-nitrosylation of the arabidopsis transport inhibitor response1 auxin receptor. *The Plant Journal*. 70(3): 492-500.
48. Thellin, O.; Zorzi, W.; Lakaye, B.; De Borman, B.; Coumans, B.; Hennen, G.; Grisar, T.; Igout, A.; Heinen, E. 1999. Housekeeping genes as internal standards; use and limits. *Journal of Biotechnology*. 75(2-3): 291-295.
49. UNIPROT (Universal Protein Resource). s.f. BLAST. (en línea). s.l. Consultado ene. 2016. Disponible en <http://www.uniprot.org/blast/>
50. Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 3(7): 11-25.
51. Vieten, A.; Sauer, M.; Brewer, P. B.; Friml, J. 2007. Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends in Plant Science*. 12(4): 160-168.

52. Woodward, A. W.; Bartel, B. 2005. A receptor for auxin. *The Plant Cell*. 17(9): 2425-2429.
53. Xuan, L.; Xu, M.; Chen, C.; Yang, C.; Xu, L.; Huang, M. 2014. Identification and characterization of three PeSHRs and one PeSCR involved in adventitious root development of *Populus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2014: 253-264.

10 ANEXOS

Protocolo de síntesis ADNc.

1- Cuantificación de ARN.

Observación: Debe realizarse el mismo día que la R.T.

Se busca cantidades equivalentes en todas las muestras, aprox. 1µg ARN y relación Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ =2.

2- ADNasa

2.1 Preparar mix para n reacciones +1

Mix para una reacción: Componentes	Cantidad	Concentración final
Buffer 10x	1µL	1 X
ARN	X µL (máximo 8µL)	aprox 1 µg
Dnasa (U/µL) Invitrogen	0.4µL	
H2O DEPC	X µL	
Vol. final	9.4µL	

2.2 17 min a T.A. (contar a partir del agregado del primer ARN)

2.3 Agregar 1 µL de EDTA a c/muestra

2.4 Inactivar 10 minutos a 65 °C (colocar tubos con termociclador prendido).

3- Síntesis de cDNA (Invitrogen) (Para 1ng-5µg de ARN total)

3.1 Preparar mix A para n reacciones +1

Mix para una reacción: Componentes	Cantidad	Concentración final
oligo(dT) (500 µg/mL)	1µL	
dNTPs Mix (10 mM c/u)	1µL	
ARN (tratado con DNAsa)	X µL	1 µg (1 ng - 5 µg)
Agua DEPC	X µL	
Vol. final	12 µL	

3.2 Incubar 5 minutos a 65 °C y enfriar rápidamente en hielo.

3.3 Centrifugar brevemente y agregar:

- 4 µL buffer 5x
- 2 µL dTT 0.1M
- 1 µL inhibidor de RNAsa (40 U/µL)

3.4 Mezclar e incubar 2 minutos a 37 °C.

3.5 Agregar 1µL MMLV- R

3.6 T/SS (200U/ μ L) y mezclar (volumen final 20 μ L).

3.7 Incubar en termociclador:

- 10 minutos a 25 °C
- 50 minutos a 37 °C
- 15 minutos a 70 °C (inactivación)

3.8 Para amplicones > 1kb agregar 1 μ L RNAsa H (2 U). Incubar 20 min. a 37 °C.

Protocolo de extracción del ARN con Trizol

1. Agregar 1mL de trizol* por cada 50-100mg de muestra en un epp de 2mL.
2. Mezclar bien e incubar 5 minutos a TA.
3. Agregar 0.2 mL de cloroformo.
4. Agitar los tubos por inversión 15 segundos e incubarlos 2-3 minutos a TA.
5. Centrifugar 10.000 rpm 15 minutos a 2-8 °C.
6. Transferir la fase acuosa a un epp. (1.5 mL) limpio previamente rotulado.
7. Agregar 0.5 ml de isopropanol (vol \approx 0.6).
8. Incubar 10 minutos a TA.
9. Centrifugar a 10.000rpm 10 minutos a 2-8°C.
10. Remover el sobrenadante.
11. Lavar el ARN con 1mL EtOH 75% Vortexear y centrifugar a no más de 6-7Krpm por 5 minutos a 2-8 °C.
12. Secar brevemente el pellet de ARN (si se seca mucho no se disuelve).

Disolver en 50 -100 μ L agua DEPC. Agitar a mano. Dejar unos minutos en hielo.