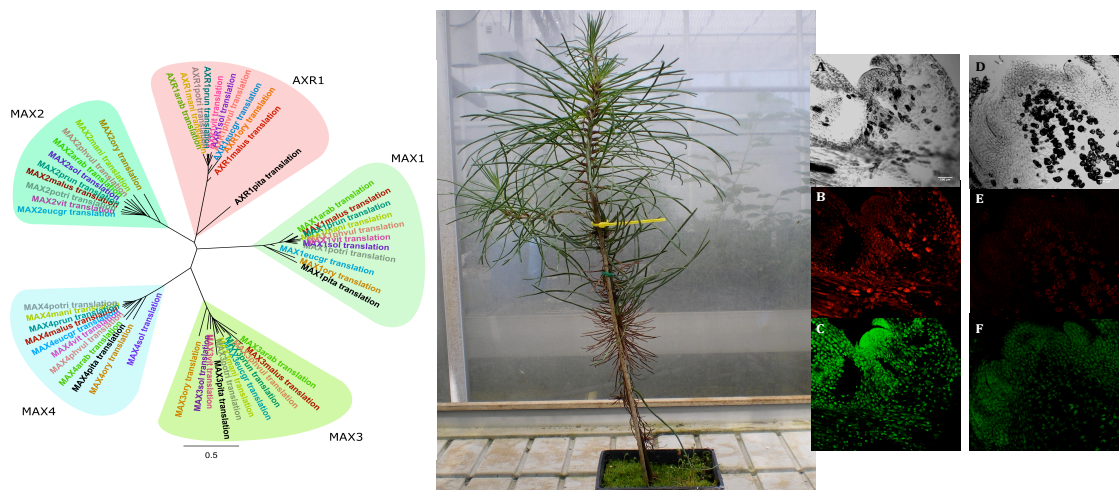




Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Implicación de las estrigolactonas en la señalización de dominancia apical y ramificación en *Pinus pinaster*



Álvaro Calderón González
22 de Julio de 2015

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

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Implicación de las estrigolactonas en la señalización de
dominancia apical y ramificación en *Pinus pinaster***

Strigolactones involvement in *Pinus pinaster* branching and apical
dominance signalling

Álvaro Calderón González

Firma

Mónica Meijón Vidal

M^a Jesús Cañal Villanueva

Firma

Firma

RESUMEN

El policiclismo, manifestación de más de un ciclo de crecimiento en un mismo periodo anual, lo cual incrementa el grado de ramificación, es un comportamiento que se da en algunas especies forestales como *Pinus pinaster*. La ramificación del tallo está controlada por diversos reguladores, habiendo surgido en la última década un nuevo grupo de fitohormonas, las estrigolactonas, que parecen tener un papel clave en el control de la dominancia apical y la ramificación. Recientemente, se han descubierto nuevos genes implicados en la señalización de estrigolactonas en *Arabidopsis*, sin embargo, apenas existe información acerca de estas hormonas en especies forestales. En este trabajo, se llevó a cabo un breve estudio filogenético de los principales genes de la ruta de señalización de estrigolactonas, además se cuantificó la expresión de dos de estos genes: PpAXR1 y PpMAX1 en yemas dominantes y laterales procedentes de plantas tratadas con un homólogo sintético de estrigolactonas y un inhibidor del transporte de auxinas, sobre la yema dominante y lateral en diferentes combinaciones. La cuantificación de la expresión de estos genes en muestras de campo de distintas procedencias que manifiestan diferente grado de policiclismo, junto con los datos de expresión de las plantas tratadas, demostró que existe una relación entre las estrigolactonas, las auxinas y el grado de ramificación y dominancia apical en *P. pinaster*. Por otro lado, mediante hibridación fluorescente *in situ* se identificó la localización exacta de la expresión de ambos genes en yemas dominantes y laterales. Este trabajo supone una primera aproximación a nivel molecular sobre la dominancia apical y la ramificación en *P. pinaster*, lo que permitiría, por otro lado, enriquecer el diseño de los programas de mejora forestal y facilitar el manejo de esta especie ya sea con fines económicos o ecológicos.

ABSTRACT

Polycyclism, is the manifestation of more than a growth cycle in the same anual period, which increases the degree of branching. This is a behavior that occurs in some forest species such as *Pinus pinaster*. The branching stem is controlled by various plant regulators. Among them a newly described group of plant hormones, the strigolactones, seem to have a key role in the control of apical dominance and branching. Recently, new genes involved in strigolactones signaling in *Arabidopsis* have been described, however, there is little information about the physiological and molecular implications of these hormones in forest species. In this work, we perform a brief phylogenetic study including the major genes in Strigolactone signaling pathway. We have also quantified the expression of two of these genes: PpAXR1 and PpMAX1 in dominant and lateral buds treated with a synthetic strigolactone and auxin transport inhibitor in different combinations and also in untreated field plants. The quantification of the expression levels of these genes in different field samples showing different degrees of polycyclism, together with the expression data of the treated plants demonstrated a relation between the strigolactones, auxins and the degree of branching and apical dominance in *P. pinaster*. Furthermore, fluorescence *in situ* hybridization analyses identified the exact location of the expression of both genes in lateral and dominant buds. This work is a first molecular approach to the determination of the apical dominance and branching signaling in *P. pinaster*, providing a knowledgebase that will benefit not only forest developmental biology but also tree breeding programs since branching is one of the current main challenges in forest management.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto se ha podido realizar gracias a la colaboración entre el Departamento de Fisiología Vegetal de la Universidad de Oviedo y el SERIDA (Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agropecuario del Principado de Asturias).

Es el fruto de varios meses de esfuerzo personal y colaboración con varias personas a las que es necesario agradecer todo su esfuerzo y dedicación.

En primer lugar, a mis dos tutoras, la Dr. María Jesús Cañal Villanueva, gracias a la cual he podido trabajar junto al grupo Ephemysage durante estos 2 años, y a la Dr. Mónica Meijón Vidal, quien me ha enseñado y ayudado durante todo el tiempo que he estado en este laboratorio, trasladándome sus conocimientos con una paciencia infinita y gracias a la cual he aprendido todo lo que sé del trabajo en el laboratorio.

También merecen todo mi agradecimiento, el Dr. Luis Valledor González y el doctorando Jesús Pascual Vázquez, quienes han estado ayudándome en todo momento y han sido imprescindibles para la realización de este trabajo.

A mis compañeros y amigos, Sara, Fran, Luz y Miguel, y al resto de las personas que me han acompañado en el laboratorio, gracias por hacer más ameno el trabajo todos los días.

Por último, agradecer a mi familia y amigos, por su apoyo incondicional en todo momento, espero que estén orgullosos de mí. Por todo esto y mucho más que no puedo expresar, gracias a todos.

ABREVIATURAS

ANOVA - ANalysis Of VAriance

AXR - AUXIN RESISTANT

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

CCD - CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASES

D - DWARF

DAD - DECREASED APICAL DOMINANCE

EDTA - Ethylenediaminetetraacetic Acid

FISH - Fluorescence *in situ* hybridization

GR-24 - Análogo sintético de estrigolactonas

HSD - Honestly-Significant-Difference

IAA - Indole-3-Acetic Acid

MAX - MORE AXILLARY GROWTH

NJ - Neighnor-Joining

NP-40 - Nonyl phenoxypolyethoxylethanol

NPA - 1-N-Naphthylphthalamic Acid

PCR - Polymerase Chain Reaction

PpAXR1 - Pinus pinaster AUXIN RESISTANT 1

PpMAX1 - Pinus pinaster MORE AXILLARY GROWTH 1

PSB - Phosphate-Buffered-Saline

qRT-PCR - Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

RMS - RAMOSUS

SSC - Saline-Sodium-Citrate

TIR - TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE

tto - tratamiento

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| MATERIAL Y MÉTODOS..... | 3 |
| 1) Material vegetal y diseño experimental..... | 3 |
| 2) Análisis filogenético de los genes más relevantes en la ruta de señalización de las estrigolactonas..... | 4 |
| 3) Análisis de la expresión de <i>PpAXR1</i> y <i>PpMAX1</i> | 4 |
| Extracción de ARN y síntesis de ADNc..... | 4 |
| PCR cuantitativa (qRT-PCR)..... | 5 |
| 4) Hibridación fluorescente “in situ” (FISH) de <i>PpAXR1</i> y <i>PpMAX1</i> | 6 |
| 5) Análisis estadístico..... | 7 |
| RESULTADOS..... | 8 |
| 1) Efectos morfométricos de los tratamientos hormonales..... | 8 |
| 2) Análisis filogenético de los principales genes de la ruta de señalización de las estrigolactonas..... | 9 |
| 3) Análisis de la expresión de <i>PpAXR1</i> y <i>PpMAX1</i> en las yemas apicales y laterales de las plántulas bifurcadas sometidas a los diferentes tratamientos hormonales..... | 10 |
| 4) Análisis de la expresión de <i>PpAXR1</i> y <i>PpMAX1</i> en las yemas apicales y laterales de las muestras de <i>P. pinaster</i> de diferentes procedencias con capacidad de crecimiento contrastante..... | 13 |
| 5) Hibridación in situ fluorescente (FISH)..... | 14 |
| DISCUSIÓN..... | 16 |
| CONCLUSIONES..... | 19 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 20 |

INTRODUCCIÓN

Una de las singularidades que presentan algunas coníferas es su particular patrón de crecimiento, puesto que algunas son capaces de dar lugar a la formación y elongación de más de un ciclo de crecimiento en un mismo período anual, si las condiciones ambientales son favorables. Este comportamiento se denomina policiclismo, y se produce especialmente en *Pinus pinaster*, especie forestal de gran interés no solo para la industria maderera sino también a nivel ecológico en los programas de repoblación forestal. Este interés se debe fundamentalmente a su amplia distribución natural, a su capacidad de crecer en suelos pobres y bajo periodos de sequía prolongada (Alía y Martín. 2009) y a la gran diversidad genética de la especie, que da lugar a diferencias de comportamiento en función de la procedencia. Por todas estas razones, resulta interesante caracterizar el comportamiento de las procedencias de *P. pinaster* de regiones con climas contrastantes, con el fin de disponer de un modelo para el desarrollo de estudios genómicos y transcriptómicos.

Uno de los aprovechamientos más importantes de esta especie es la producción de madera y resina, siendo la industria del aserrado una actividad económica muy importante en la transformación del *P. pinaster*, no sólo por su elevado nivel de consumo de materia prima (67 % del total) sino también por su incidencia como fuente de abastecimiento de productos y subproductos destinados a otros subsectores. Todos estos sectores utilizan madera de alto valor comercial, sin nudos y homogénea. Sin embargo, este tipo de madera no es fácil de obtener debido a la alta proclividad de esta especie a un modelo de crecimiento policíclico, lo que hace que los individuos muestren una gran ramificación y, por tanto, un gran número de nudos. Este carácter se ha descrito que presenta una gran heredabilidad (Zas y Fernández-López. 2005), sin embargo se desconoce por completo las bases moleculares que inducen su manifestación.

La ramificación del tallo está controlada por la formación y subsecuente crecimiento de yemas axilares, que son estructuras indeterminadas cuyo crecimiento se activa por señales endógenas o ambientales. Más de 70 años después de que se propusiera que la fitohormona auxina, sintetizada en la zona apical de las plantas, actuaba como un inhibidor de la ramificación (Thimann y Skoog. 1933), y tras la propuesta teoría del segundo mensajero, estudios recientes han descubierto que un grupo específico de lactonas terpenoides, denominadas estrigolactonas, puede inhibir directa o indirectamente el crecimiento de la yema.

Las estrigolactonas, que fueron descritas como estimulantes de la germinación para las semillas de especies de plantas parasíticas del género *Striga*, *Orobanche* y *Phelipanche* (Cook *et al.* 1966; Cook *et al.* 1972; Bouwmeester *et al.* 2003), han sido recientemente relacionadas con la inhibición de la ramificación (Gómez-Roldán *et al.* 2008). De acuerdo con estos trabajos, las estrigolactonas serían el perfecto candidato para ser denominadas como “el inhibidor de la ramificación” (Domagalska y Leyser. 2011).

Trabajos realizados en la última década han hecho posible alcanzar un mayor conocimiento sobre la biosíntesis, las señales de transducción y las funciones fisiológicas de las estrigolactonas (Brewer *et al.* 2009; Beveridge y Kyojuka. 2010; Domagalska y Leyser. 2011; Brewer *et al.* 2013; Zheng *et al.* 2014). Además, se han identificado nuevos genes implicados en la ramificación de los brotes, tales como, *MORE AXILLARY GROWTH* (*MAX1*, *MAX2*, *MAX3* y *MAX4*) relacionados con la biosíntesis de estrigolactonas en

Arabidopsis thaliana, y sus homólogos en diferentes especies herbáceas: *RAMOSUS* (*RMS1*, *RMS2*, *RMS4* Y *RMS5*) en *Pisum sativum*, *DWARF* (*D17*, *D10*, *D27*, *D14*, *D88* y *D3*) en *Oryza sativa* y *DECREASED APICAL DOMINANCE* (*DAD1*) en *Petunia hybrida* (Beveridge y Kyojuka. 2010; Domagalska y Leyser. 2011; Wang y Li. 2011; Tsuchiya y McCourt. 2012; de Saint Germain *et al.* 2013). Incluso se han conseguido caracterizar en una especie forestal: *Populus trichocarpa* (Czarnecki *et al.* 2014). Según el modelo de inhibición de la ramificación vía estrigolactona, la biosíntesis de un precursor de estrigolactonas a partir de carotenoides tiene lugar en los plastidios, y es mediada por dos CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASES (CCD) codificadas por *MAX3* (CCD7) y *MAX4* (CCD8) y por una proteína enzimática, *D27*. Tras estos pasos, el precursor de estrigolactonas o intermediario no activo, descubierto recientemente: la carlactona (Booker *et al.* 2005; Alder *et al.* 2012; Seto *et al.* 2014), experimenta una conversión bioquímica que requiere del citocromo P450, codificado por *MAX1*, para transformarse en la estrigolactona activa. *MAX2*, codifica una proteína F-box rica en leucina que está involucrada en la señalización de estrigolactona. Por otro lado, las estrigolactonas inhiben la señalización de auxinas y otras señales de retroalimentación desconocidas; ambas, a su vez, regulan la biosíntesis de estrigolactona en el plastidio a través de la vía de transducción de señales *AUXIN RESISTAN1/ TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1* (*AXR1/ TIR1*) que estabiliza la proteína IAA12 (ácido indol acético 12) que, a su vez, regula la transducción de la señalización de auxinas.

Como objetivo inicial de este trabajo se planteó realizar un análisis filogenético de los principales genes de señalización de la ruta de las estrigolactonas. Además, con el fin de demostrar la posible implicación de estas hormonas en el control del crecimiento policíclico de *P. pinaster* y partiendo de los datos y secuencias obtenidas en el trabajo fin de grado, en este trabajo se planteó como objetivo principal, la cuantificación de la expresión de *PpMAX1* y *PpAXR1*, en yemas apicales y laterales de plántulas de *P. pinaster*, sometidas a diferentes combinaciones de tratamientos con estrigolactona y un inhibidor del transporte de auxinas, así como, determinar la expresión en tejido mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) en aquellos tratamientos y materiales más relevantes. También, se planteó, como objetivo secundario, cuantificar la expresión de ambos genes sobre muestras de campo de distintas procedencias de *P. pinaster*, con diferente grado de policiclismo, lo cual nos permitirá validar la posible función de las estrigolactonas en el control del crecimiento policíclico en *P. pinaster*.

MATERIAL Y MÉTODOS

1) Material vegetal y diseño experimental

Como material vegetal se utilizaron plántulas de semilla de *P. pinaster* (VG07 St. Augustin; Lote: PPIC54U1103A) de 2 años de edad, bifurcadas y crecidas en invernadero. Previamente, durante la primavera de 2014, se aplicaron en micropulverización, empleando Tween20 a 0,05 % como surfactante, sobre la rama lateral y/o la rama dominante los siguientes tratamientos según las combinaciones que se indican en la Figura 1: 5 μ M de GR-24 (estrigolactona sintética) y 1 mM de ácido naftil-p-talámico (NPA) (inhibidor del transporte de auxina). De este modo, se establecieron 7 tratamientos con 10 plántulas por tratamiento. Se midió la longitud inicial de las ramas dominantes y laterales de todas las plántulas, y a los 15, 30 y 45 días tras la aplicación de los distintos tratamientos, así como el número de nuevas yemas. A su vez, se muestrearon las yemas apicales dominantes y laterales y se ultracongelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para su posterior procesado. Además, se fijaron yemas apicales y laterales de cada tratamiento y tiempo para el análisis de hibridación *in situ*.

Por otro lado, como material vegetal de campo, se emplearon clones de *P. pinaster* obtenidos por esquejado e instalados desde 2010 en una parcela experimental perteneciente al SERIDA en “La Mata” (Grado, Asturias; 43° 32'N 7°00'W, 65 m). La parcela alberga 10 procedencias que representan todo el área de distribución natural de la especie, distribuidas en bloques aleatorizados. Durante la primavera de 2014, se recolectaron yemas apicales dominantes y yemas apicales de ramas laterales de las tres procedencias con crecimiento más contrastante: Tamrabta, Oria y Cadavedo (Tab. 1). Se ultracongelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C hasta su empleo.

tto. 1: Control

tto. 2: Adición de GR-24 sobre la rama dominante

tto. 3: Adición de GR-24 sobre la rama lateral

tto. 4: Adición de GR-24 sobre la rama lateral y de NPA sobre la rama dominante

tto. 5: Adición de GR-24 sobre la rama dominante y de NPA sobre la rama lateral

tto. 6: Adición de GR-24 y NPA sobre la rama dominante

tto. 7: Adición de GR-24 y NPA sobre la rama lateral

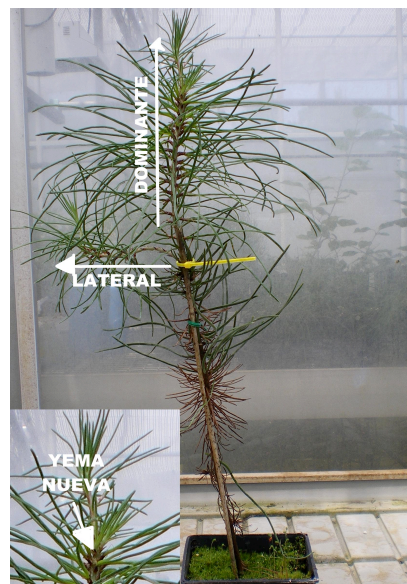


Figura 1. Tratamientos aplicados y ejemplo de plántula *P. pinaster* bifurcada sobre la que se marca la rama dominante y lateral. Abreviaturas: GR-24: Estrigolactona sintética; NPA = ácido naftil-p-talámico, inhibidor del transporte de las auxinas.

Tabla 1: Origen, y detalles climáticos y de crecimiento de las procedencias bajo estudio. Los datos climáticos fueron tomados de Sánchez-Gómez *et al.* (2010), los datos de irradiación de “European Climate Assessment & Dataset”, y los datos de crecimiento y policiclismo fueron proporcionados por el SERIDA en septiembre de 2013.

| Procedencia | Origen | Latitud y longitud | Altitud (m) | Pluviosidad anual (mm) | Temperatura anual (°C) | Índice de aridez | Irradianza directa (Wh/m ² /día) | Policiclismo (número de verticilos) | Crecimiento anual (cm) |
|-------------|-------------------|-----------------------|-------------|------------------------|------------------------|------------------|---|-------------------------------------|------------------------|
| Cadavedo | Asturias (España) | 43° 32' N 6° 25' W | 180 | 1316 | 13,2 | 00,8 | 3366,923 | 5,278 | 48,014 |
| Tamrabta | Marruecos | 33° 36' N 5° 01' W | 1760 | 763 | 10,8 | 67,9 | 5565,384 | 3,980 | 36,424 |
| Oria | Almería (España) | 37° 30' N 2° 20' W | 1150 | 357 | 13,1 | 110,0 | 5935,384 | 4,450 | 44,594 |

2) Análisis filogenético de los genes más relevantes en la ruta de señalización de las estrigolactonas

Se ha realizado un búsqueda mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) por homología de los genes relacionados con la biosíntesis y señalización de estrigolactonas en el genoma de distintas especies de interés, empleando *Arabidopsis thaliana* como especie de referencia. Para ello se han utilizado bases de datos moleculares como Phytozome, SustainPineDB, Arabidopsis.org y Congenie, lográndose obtener las secuencias de *AXR1*, *MAX1*, *MAX2*, *MAX3* y *MAX4* para las siguientes especies: *Eucaliptus grandis*, *Malus domestica*, *Manihot esculenta*, *Oryza sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Populus trichocarpa*, *Prunus persica*, *Pinus taeda*, *Solanum tuberosum*, *Vitis vinifera*. El análisis filogenético, se llevó a cabo mediante el uso de las secuencias de longitud completa de las proteínas traducidas de cada gen y especie y utilizando el método de neighbor-joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987) implementado en Geneious v8.0.5. La gráfica final se generó mediante el programa Geneious v8.0.5.

3) Análisis de la expresión de *PpAXR1* y *PpMAX1*

Se llevó a cabo la cuantificación de la expresión de los genes de estudio a partir de yemas apicales y laterales de las plantas sometidas a los tratamientos descritos previamente, en las muestras recolectadas a los 30 días de la aplicación de los tratamientos. Además también se llevó a cabo la cuantificación de la expresión de *PpAXR1* y *PpMAX1* en las yemas apicales y laterales recolectadas en las muestras de campo.

- Extracción de ARN y síntesis de ADNc

El ARN se extrajo siguiendo el protocolo descrito en Valledor *et al.* (2014). Las muestras, ultracongeladas en N₂ líquido, se homogenizaron en Silamat S6 (Ivoclar vivadent, USA), añadiendo 600 µl de tampón de extracción (PSB) (7 M Guanidina HCl, Tween-20 2%, NP-40 4 %, 50 mM Tris, pH 7,5, β-mercaptoetanol 1 %) y seguidamente se incubaron 5 min a 37 °C. Posteriormente, se centrifugaron 3 min a 14.000 g, transfiriéndose el sobrenadante a una columna de sílice. A continuación, se centrifugó 1 min a 10.000 g transfiriéndose el eluido a un tubo eppendorf, al que se adicionaron previamente 400 µl de acetonitrilo. Posteriormente a su vorteo, se transfirieron 600 µl de la mezcla a una nueva columna de sílice, centrifugándose durante 2 min a 12.000 g. A continuación se añadieron 600 µl de tampón de lavado 1 (2 mM Tris pH 7.5, 20 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, etanol 90 %), centrifugándose

nuevamente durante 2 min a 12.000 g. Sobre la columna se le lleva a cabo un tratamiento con ADNsa (Machery-Nagel) y siguiendo las instrucciones del fabricante, se añadieron 300 µl de tampón de lavado 1 y 50 µl de mezcla ADNsa: tampón del enzima (1:10) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación, se añadieron 600 µl de tampón de lavado 1 y se centrifugó 1 min a 10.000 g. Consecutivamente, se añadieron 600 µl de tampón de lavado 2 (2 mM Tris pH 7,5, 20 mM NaCl, 0.1 EDTA, etanol 70 %) y se centrifugó durante 2 min a 12.000 g. Posteriormente, se volvió a centrifugar 1 min a 20.000 g y se transfirió la columna a un tubo eppendorf. Se añadieron 50 µl de agua estéril libre de ARNsas, incubándose durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó 1 min a 21.000 g para recoger el eluido. La integridad del ARN se comprobó en gel de agarosa.

A partir del ARN purificado, obtenido de cada una de las muestras, se sintetizó el ADN copia (ADNc) empleando como cebadores hexámeros aleatorios y transcriptasa reversa M-MuLV (Fermentas, Cat. #EP0351). Siguiendo las instrucciones del fabricante de la transcriptasa reversa, a 500 ng de ARN, previamente desnaturalizado a 65 °C durante 5 min, se le adicionó la mezcla de reacción de transcriptasa reversa: 0.5 µl Ribolock (Thermo Scientific. #EO0381), 4 µl de dNTPs 5 mM, 4 µl de tampón M-MuLV RT (5x) y 1 µl de M-MuLV RT. Se realizó un ciclo de retrotranscripción de 10 min a 25 °C, 75 min a 45 °C y, finalmente, la transcriptasa reversa se inactivó a 80 °C durante 10 min. El ADNc obtenido fue diluido 1:10.

- PCR cuantitativa (qRT-PCR)

Los cebadores empleados para realizar la qRT-PCR (Tabla 2) fueron diseñados usando el software libre Primer3 a partir de las secuencias putativas previamente obtenidas de *AXR1* y *MAX1* de *P. pinaster* (*PpAXR1*, *PpMAX1*) en el trabajo fin de grado. La qRT-PCR se llevó a cabo siguiendo el siguiente protocolo: 10 ng de ADNc, 0,3 µM de cada cebador y 12,5 µl de Maxima SYBR Green qPCR MasterMix (2x), no ROX (Thermo Scientific), en un volumen total de 25 µl, y se amplificó en el sistema CFX96™ Real-Time System (BIO-RAD). Se realizaron 3 medidas biológicas y 2 analíticas por tratamiento y gen. Los resultados fueron analizados mediante el software, Bio-Rad CFX Manager 3.1 empleando como gen control aquel que mejores resultados dio en un estudio previo: *TUBULINA*.

Tabla 2. Cebadores empleados para qRT-PCR

4) Hibridación fluorescente "in situ" (FISH) de PpAXR1 y PpMAX1

Yemas laterales y dominantes de todos los tratamientos y tiempos fueron fijadas, inmediatamente después de su recolección, con paraformaldehído 4 % en tampón fosfato salino (PBS) (3,2 mM Na₂HPO₄, 0,5 mM KH₂PO₄, 135 mM NaCl 1,3 mM KCl) durante 2 horas, lavadas a continuación en PBS durante 5 minutos y guardadas en PBS a 4 °C hasta su uso.

Una vez cuantificada la expresión global de PpAXR1 y PpMAX1 mediante qRT-PCR, se decidió evaluar la expresión *in situ* de ambos genes en yemas laterales y dominantes del tratamiento con GR-24 sobre la rama lateral, que fueron los materiales más contrastantes. Las muestras fueron cubiertas por cryostat medio (Tissue-Tek, Killik; Sakura Finetek) y congeladas a -20 °C; a continuación, fueron seccionadas mediante criotomo (CM1510S, Leica Microsystems) realizándose cortes de un grosor de 40 μM. Siguiendo el protocolo de FISH de Villedor *et al* (2012) se procedió inicialmente al pretratamiento para permeabilizar los tejidos. Las secciones fueron incubadas durante 10 minutos en PBS (1x) con triton X-100 0,5 %. A continuación, se lavaron durante 5 minutos en PBS (1x) para eliminar los restos de detergente. Posteriormente, las secciones fueron incubadas con celulasa 2 % en PBS (1x) durante 2 horas, lavadas 5 minutos en PBS (1x) y desnaturalizadas en HCl 0.2 N durante 30 minutos. A continuación, se volvieron a lavar las muestras durante 5 minutos en PBS (1x) y se equilibraron 5 minutos en tampón SSC (2x) (citrato sódico salino). Entonces, las secciones fueron tratadas con la mezcla de prehibridación HB50 (50 % formamida, 25 % tampón SSC (2x), 25 % 50 mM tampón fosfato pH 7), siendo incubadas durante 2 horas a 37 °C.

Para la preparación de las sondas se llevó a cabo la amplificación de PpAXR1 y PpMAX1 por PCR usando ADNc de yemas control y los cebadores diseñados para la qRT-PCR. Una vez comprobado en gel de agarosa el tamaño correcto de ambas sondas se procedió a su marcaje mediante transferasa terminal y el empleo de nucleótidos marcados con fluorescencia. Siguiendo el protocolo del fabricante de la transferasa terminal (Ref.: 03 333 574 001, Roche) se añadieron 4 μl de tampón de transferasa terminal (5x), 9 μl de sonda (PpAXR1 o PpMAX1), 1 μl de dATP 10 mM, 1 μl de Cy-dUTP 100 nM (para PpMAX1) (Ref.: PA55026 GE Healthcare UK Limited) y 1 μl de Alexa Fluor 488-5-dUTP 1mM (Ref.: C11397 life technologies) (para PpAXR1), 1 μl de transferasa terminal 20 U/ μl y 4 μl de CoCl₂, en un volumen total de reacción de 20 μl. A continuación se incubó la reacción durante 15 min a 37 °C y transcurrido ese tiempo, se añadieron 2 μl de EDTA 0,2 M, pH 8 para detener la reacción.

Una vez obtenidas las sondas listas y pretratadas las muestras, se llevó a cabo la hibridación. Se preparó la mezcla de hibridación: añadiendo 40 μl de dextrano 20 %, 20 μl de HB50 y 10 μl de cada sonda. A continuación se desnaturalizaron las sondas a 100 °C durante 5 minutos y se transfirió la mezcla inmediatamente a hielo. Paralelamente, las muestras se desnaturalizaron a 78 °C durante 5 minutos empleando una placa térmica. Se añadieron 40 μl de la mezcla de las sondas desnaturalizadas sobre las muestras y se dejó hibridar 5 minutos a 78 °C. A continuación, se lleva a cabo un gradiente descendiente de temperaturas, 78-75-70 °C y se dejó hibridando a 70 °C en el horno de hibridación durante 16 horas. Para eliminar las hibridaciones inespecíficas así como los restos de la sonda no hibridados, se llevaron a cabo lavados sucesivos en tampón SCC: 2 lavados en SSC (4x) durante 15 minutos a 50 °C; 2 lavados en SSC (2x) durante 15 minutos a 50 °C; 2 lavados

en SSC (1x) durante 10 minutos a 50 °C; 2 lavados en x SSC (0,5) durante 10 minutos a temperatura ambiente; 1 lavado en agua estéril durante 2 minutos. Finalmente, las muestras fueron, lavadas con agua estéril durante 5 minutos y fijadas con mowiol.

La fluorescencia fue visualizada usando microscopia confocal con un objetivo de inmersión 20X (Leica TCS-SP2-AOBS). El fluorocromo Alexa 484 fue excitado a una longitud de onda de 488 nm y recogida la señal de emisión desde 500 a 550 nm de longitud de onda, mientras Cy-5 fue excitado a 649 nm y recogida la señal de emisión desde 650 a 675nm. Finalmente, las imágenes fueron procesadas mediante el software libre Fiji (Schindelin *et al.* 2012).

5) *Análisis estadístico*

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el software libre R versión 0.98.1091. Sobre los datos fenológicos se llevó a cabo un ANOVA de 2 factores (tiempo y tratamiento), mientras que en los valores finales acumulados (Tiempo 3) se realizó una t-Student para comparar cada uno de los tratamientos frente al control. Por otro lado, sobre los datos de expresión génica de las plantas bifurcadas, se realizó un ANOVA de 1 factor (tratamiento) y posteriormente una t-Student para comparar cada uno de los tratamientos frente al control (tto.1). Para los datos de expresión de las plantas de campo se realizó un ANOVA de 1 factor (tratamiento) y posteriormente un análisis post hoc mediante el Test HSD (Honestly-Significant-Difference) de Tukey, utilizando el paquete estadístico para R “agricolae”, para comparar a pares los diferentes tratamientos.

RESULTADOS

1) Efectos morfométricos de los tratamientos hormonales

En los datos de crecimiento, tanto de la rama dominante como de la lateral, se muestra un comportamiento significativamente diferencial entre los diferentes tratamientos. En la Figura 2, se representa el incremento en altura de la rama dominante (Fig. 2A) y de la rama lateral (Fig. 2B) a los 15, 30 y 45 días tras la aplicación de los diferentes tratamientos. En esta figura se observa que las plántulas tratadas con estrigolactonas (GR-24) en la yema lateral (tto. 3) representa el tratamiento que indujo el mayor crecimiento en altura de la rama dominante (Fig. 2A). Por otro lado, también se puede apreciar que la aplicación del inhibidor del transporte de auxinas (NPA) independientemente de su aplicación sobre la rama dominante o lateral, provoca una disminución en altura en la rama lateral (tto. 4,5 y 7; figura 2B). Tan solo en el caso de la aplicación de NPA sobre la rama dominante, cuando se aplicó además GR-24 sobre la misma rama, (tto. 6) se pierde el efecto de inhibición de crecimiento en la rama lateral provocado por este químico (Fig. 2B) aunque en este caso tampoco se aprecia un incremento significativo respecto al control en altura de la rama dominante (Fig. 2A).

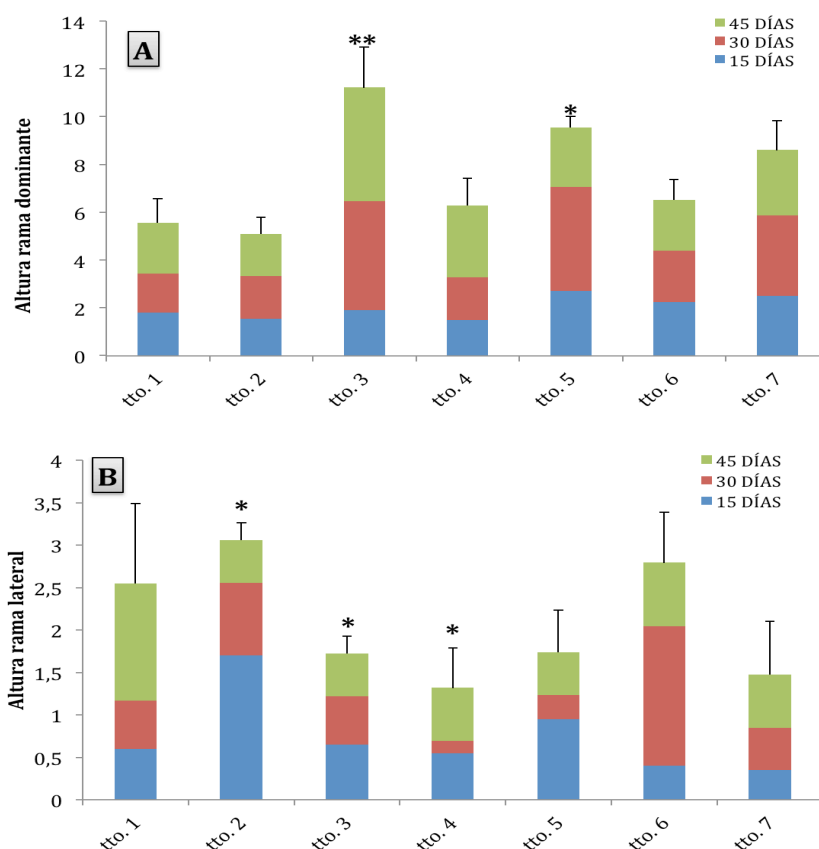


Figura 2. Datos de crecimiento de las plántulas bifurcadas. (A) Incremento en altura de la rama dominante a los 15, 30 y 45 días de la aplicación de los tratamientos. (B) Incremento en altura de la rama lateral a los 15, 30 y 45 días de la aplicación de los tratamientos. ANOVA y posterior t-Student comparando cada uno de los tratamientos frente al control (tto.1). Los asteriscos indican diferencias significativas (** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$; $n = 10$). Abreviaturas: tto. 1 = control; tto. 2 = adición de GR-24 sobre la rama dominante; tto. 3 = adición de GR-24 sobre la rama lateral; tto. 4 = GR-24 en rama lateral y NPA en rama dominante; tto. 5 = GR-24 en rama dominante y NPA en rama lateral; tto. 6 = GR-24 y NPA en rama dominante; tto. 7 = GR-24 y NPA en rama lateral.

A continuación, en la Figura 3, se representa el número de yemas nuevas producidas después de la aplicación de los diferentes tratamientos. Todas las combinaciones de tratamientos indujeron una disminución en el número de brotes apicales nuevos en relación al control (tto.1), siendo las plántulas tratadas con GR-24 en la rama lateral (tto. 3) las que presentan con mayor significancia menor número de yemas nuevas en relación al resto de tratamientos.

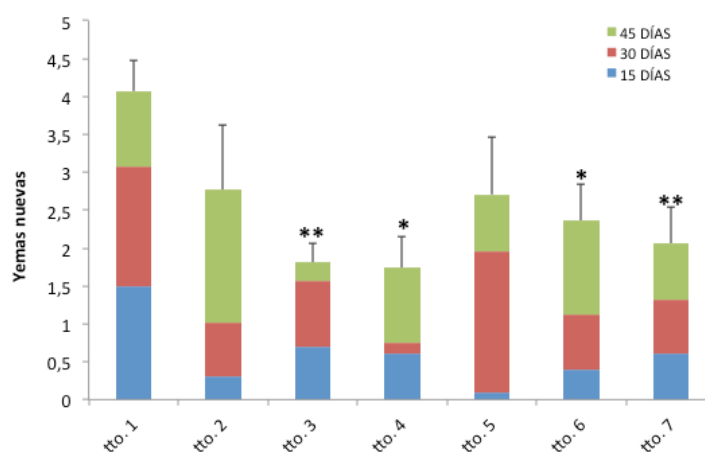


Figura 3. Nuevas yemas a los 15, 30 y 45 días de la aplicación de los tratamientos. ANOVA y posterior t-Student comparando cada uno de los tratamientos frente al control (tto.1). Los asteriscos indican diferencias significativas (** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$; $n = 10$). Abreviaturas: tto. 1 = control; tto. 2 = adición de GR-24 sobre la rama dominante; tto. 3 = adición de GR-24 sobre la rama lateral; tto. 4 = GR-24 en rama lateral y NPA en rama dominante; tto. 5 = GR-24 en rama dominante y NPA en rama lateral; tto. 6 = GR-24 y NPA en rama dominante; tto. 7 = GR-24 y NPA en rama lateral.

2) Análisis filogenético de los principales genes de la ruta de señalización de las estrigolactonas

Se ha llevado a cabo una agrupación filogenética (Fig. 4) de las secuencias de los principales genes de la ruta de señalización de las estrigolactonas: *AXR1*, *MAX1*, *MAX2*, *MAX3* y *MAX4*, partiendo de las especies secuenciadas de las cuales fue posible encontrar las secuencias homologas mediante BLAST. En el dendograma se puede observar una clara conservación evolutiva de estos genes en las distintas especies estudiadas. No obstante, la secuencia putativa de *AXR1* de *Pinus taeda* se mostró como la secuencia más diferencial dentro de las especies estudiadas, mientras que la superfamilia *MAX* parece estar más conservada dentro de las especies, independientemente de que se traten de especies herbáceas, tales como: *Arabidopsis thaliana* y *Oriza sativa*; o forestales, tales como: *Eucaliptus gradis* y *Pinus taeda*.

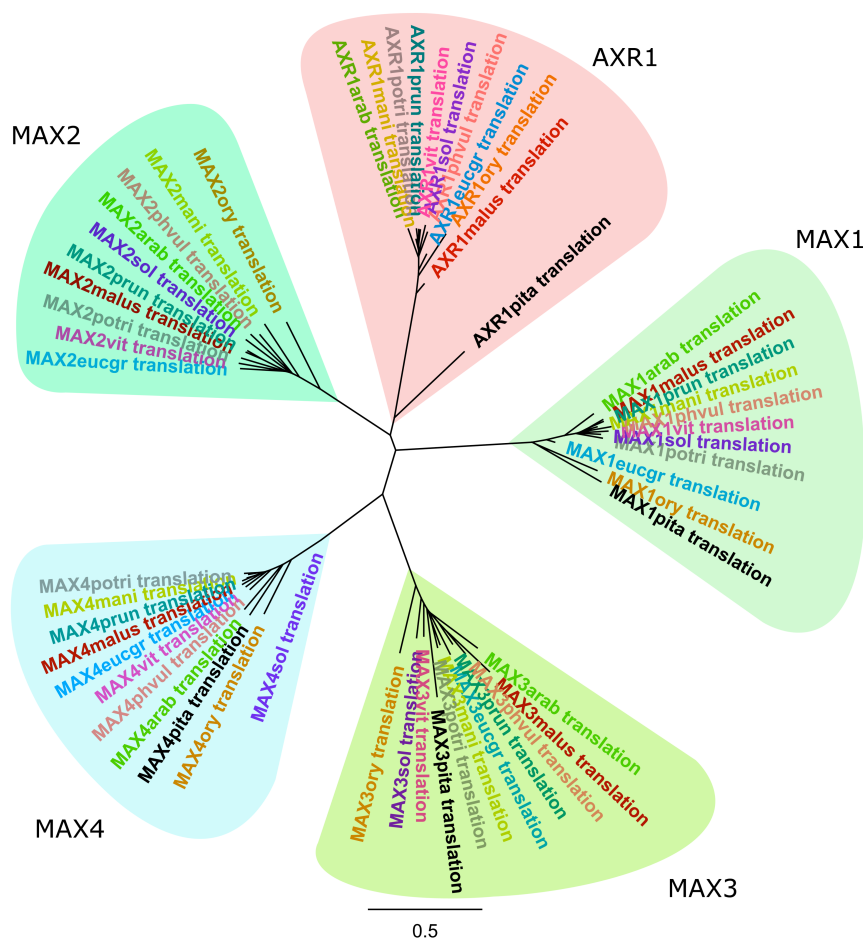


Figura 4. Dendrograma mostrando las relaciones de similitud existentes de los principales genes relacionados con la biosíntesis y señalización de estigolactonas entre distintas especies de interés. Abreviaturas de las especies utilizadas: arab = *Arabidopsis thaeada*; mani = *Manihot esculenta*; potri = *Populus trichocarpa*; prun = *Prunus pérsica*; vit = *Vitis vinifera*; sol = *Solanum tuberosum*; phvul = *Phaseolus vulgaris*; eucgr = *Eucalyptus grandis*; ory = *Oryza sativa*; malus = *Malus domestica*; pita = *Pinus taeda*.

3) Análisis de la expresión de PpAXR1 y PpMAX1 en las yemas apicales y laterales de las plántulas bifurcadas sometidas a los diferentes tratamientos hormonales

De acuerdo al estudio filogenético y datos bibliográficos disponibles, se seleccionó para el análisis de expresión: PpAXR1 por ser el gen que mostró más divergencia entre especies, y dentro de la superfamilia MAX, PpMAX1 por ser el gen de mayor relevancia en la señalización de la ruta de las estrigolactonas según la bibliografía.

Por otro lado, en el análisis de los datos de crecimiento (Fig. 2) se observó que es a partir de los 30 días después de la aplicación cuando se empiezan a apreciar mayores diferencias en crecimiento entre los diferentes tratamientos. Es por eso, que se seleccionó este material como objeto de estudio.

Así, podemos observar en la Figura 5 que, para PpAXR1 en yemas dominantes de plantas bifurcadas, solo mostraron diferencias significativas los tratamientos que incluyeron la adición de NPA (ya sea sobre la rama dominante o lateral) (tto. 4, 5, 6 y 7) mostrando estos tratamientos los valores más bajos de expresión.

Figura 5. Expresión de *PpAXR1* en yemas dominantes de los distintos tratamientos 30 días después de su aplicación. Datos de expresión relativa normalizados frente al control (tto.1). ANOVA y posterior t-Student comparando cada uno de los tratamientos frente al control (tto.1). Los asteriscos indican diferencias significativas (** $p \leq 0,001$; * $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$; $n = 3$). Abreviaturas: Control (T0) = yema control a tiempo 0; tto. 1 = control; tto. 2 = adición de GR-24 sobre la rama dominante; tto. 3 = adición de GR-24 sobre la rama lateral; tto. 4 = GR-24 en rama lateral y NPA en rama dominante; tto. 5 = GR-24 en rama dominante y NPA en rama lateral; tto. 6 = GR-24 y NPA en rama dominante; tto. 7 = GR-24 y NPA en rama lateral.

Por otro lado, el análisis de expresión del gen *PpAXR1* en yemas laterales reveló datos más significativos (Fig. 6), mostrando que el mayor nivel de expresión de este gen se alcanza en las plántulas que han sido tratadas con GR-24 en la rama lateral, que a su vez, también han sido las plantas que han alcanzado mayor dominancia apical según los datos de crecimiento (Fig. 2) siendo las sometidas a NPA las que presentaron los valores más bajos de expresión (tto 4, 5, 6 y 7).

Figura 6. Expresión de *PpAXR1* en yemas laterales de los distintos tratamientos 30 días después de su aplicación. Datos de expresión relativa normalizados frente al control (tto.1). ANOVA y posterior t-Student comparando cada uno de los tratamientos frente al control (tto.1). Los asteriscos indican diferencias significativas (** $p \leq 0,001$; * $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$; $n = 3$). Abreviaturas: Control (T0) = yema control a tiempo 0; tto. 1 = control; tto. 2 = adición de GR-24 sobre la rama dominante; tto. 3 = adición de GR-24 sobre la rama lateral; tto. 4 = GR-24 en rama lateral y NPA en rama dominante; tto. 5 = GR-24 en rama dominante y NPA en rama lateral; tto. 6 = GR-24 y NPA en rama dominante; tto. 7 = GR-24 y NPA en rama lateral.

En relación a los análisis de expresión de *PpMAX1*, en las yemas dominantes (Fig. 7), se puede observar que, los tratamientos sobre los cuales se aplica NPA (tto. 4, 5, 6 y 7)

muestran claramente diferencias significativas respecto al control, presentando también, al igual que PpAXR1, una inhibición de su expresión en dichos tratamientos.

Figura 7. Expresión de PpMAX1 en yemas dominantes de los distintos tratamientos 30 días después de su aplicación. Datos de expresión relativa normalizados frente al control (tto.1). ANOVA y posterior t-Student comparando cada uno de los tratamientos frente al control (tto.1). Los asteriscos indican diferencias significativas (** $p \leq 0,001$; * $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$; $n = 3$). Abreviaturas: Control (T0) = yema control a tiempo 0; tto. 1 = control; tto. 2 = adición de GR-24 sobre la rama dominante; tto. 3 = adición de GR-24 sobre la rama lateral; tto. 4 = GR-24 en rama lateral y NPA en rama dominante; tto. 5 = GR-24 en rama dominante y NPA en rama lateral; tto. 6 = GR-24 y NPA en rama dominante; tto. 7 = GR-24 y NPA en rama lateral.

Finalmente, el análisis de expresión del gen PpMAX1 en yemas laterales (Fig. 8), nuevamente muestra que el mayor nivel de expresión de este gen se alcanza en las plántulas que han sido tratadas con GR-24 en la rama lateral (tto. 3). El resto de tratamientos muestran una clara inhibición de expresión respecto a los controles.

Figura 8. Expresión de PpMAX1 en yemas laterales de los distintos tratamientos 30 días después de su aplicación. Datos de expresión relativa normalizados frente al control (tto.1). ANOVA y posterior t-Student comparando cada uno de los tratamientos frente al control (tto.1). Los asteriscos indican diferencias significativas (** $p \leq 0,001$; * $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$; $n = 3$). Abreviaturas: Control (T0) = yema control a tiempo 0; tto. 1 = control; tto. 2 = adición de GR-24 sobre la rama dominante; tto. 3 = adición de GR-24 sobre la rama lateral; tto. 4 = GR-24 en rama lateral y NPA en rama dominante; tto. 5 = GR-24 en rama dominante y NPA en rama lateral; tto. 6 = GR-24 y NPA en rama dominante; tto. 7 = GR-24 y NPA en rama lateral.

4) *Análisis de la expresión de PpAXR1 y PpMAX1 en las yemas apicales y laterales de las muestras de P. pinaster de diferentes procedencias con capacidad de crecimiento contrastante*

En relación al análisis de las muestras de campo, nuevamente se cuantificó la expresión de ambos genes tanto en el brote dominante como en el procedente de la rama lateral. El análisis de la expresión del gen PpAXR1 en este material (Fig. 9) muestra que el mayor nivel de expresión de este gen se alcanza en las yemas laterales de la población Tamrabta (Marruecos), mientras que expresión más baja del gen se observa en la población de Cadavedo (Asturias). Siendo Tamrabta la procedencia que muestra menor grado de policiclismo en campo, en contraposición a Cadavedo que es la población con mayor frecuencia de policiclismo (tabla 1).

Figura 9. Expresión de PpAXR1 en muestras de procedencias de campo. ANOVA y Post-hoc test (Tukey HSD test). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos. Abreviaturas: Control (T0) = yema control a tiempo 0; tto. 1 = control; tto. 2 = adición de GR-24 sobre la rama dominante; tto. 3 = adición de GR-24 sobre la rama lateral; tto. 4 = GR-24 en rama lateral y NPA en rama dominante; tto. 5 = GR-24 en rama dominante y NPA en rama lateral; tto. 6 = GR-24 y NPA en rama dominante; tto. 7 = GR-24 y NPA en rama lateral.

En el análisis de la expresión del gen PpMAX1 de las muestras de distintas procedencias de *P. pinaster* (Fig. 10) se observa nuevamente que, son las yemas laterales de la población Tamrabta (Marruecos) las que alcanzan la mayor expresión de este gen, mientras que las de Cadavedo (Asturias) son las que presentan la expresión más baja tanto en la rama lateral como en la dominante.

Figura 10. Expresión de PpMAX1 en muestras de procedencias de campo. ANOVA y Post-hoc test (Tukey HSD test). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos. Abreviaturas: Control (T0) = yema control a tiempo 0; tto. 1 = control; tto. 2 = adición de GR-24 sobre la rama dominante; tto. 3 = adición de GR-24 sobre la rama lateral; tto. 4 = GR-24 en rama lateral y NPA en rama dominante; tto. 5 = GR-24 en rama dominante y NPA en rama lateral; tto. 6 = GR-24 y NPA en rama dominante; tto. 7 = GR-24 y NPA en rama lateral.

5) Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Mediante hibridación *in situ* y marcaje doble, se ha localizado simultáneamente la expresión de PpAXR1 y PpMAX1 en yemas dominantes y laterales, en el tratamiento que mostró mayor eficiencia en la inhibición del crecimiento de las ramas laterales aumentando, a su vez, significativamente el crecimiento de la rama dominante. Dicho tratamiento (tto. 3) también presentó en la cuantificación de la expresión global de ambos genes los valores más contrastantes frente al control observándose en ambos casos la mayor expresión de ambos genes en la yema procedente de la rama lateral.

Así, mediante el FISH se puede apreciar que, la actividad de PpMAX1 (Fig. 11B) se localiza principalmente en la zona de los haces vasculares de la yema lateral, mientras que en el caso de PpAXR1 (Fig. 11C) es el meristemo el que concentra la señal, fundamentalmente en la rama lateral nuevamente. La señal de ambos genes en la yema dominante es claramente inferior, aunque el patrón de distribución es similar.

Figura 11. FISH en yemas laterales y dominantes de *P. pinaster* de tto.3, doble marcaque: PpMAX1 y PpAXR1 (A) Microscopía de contraste por interferencia diferencial (DIC) con un objetivo de inmersión 20x en yemas laterales; (B) Expresión de PpMAX1 en yemas laterales (C) Expresión de PpAXR1 en yemas laterales (D) Microscopía de contraste por interferencia diferencial (DIC) con un objetivo de inmersión 20x en yemas dominantes (E) Expresión de PpMAX1 en yemas laterales. (F) Expresión de PpAXR1 en yemas laterales; La fecha blanca indica la posición del meristemo. Abreviaturas: tto. 3 = adición de GR-24 sobre la rama lateral.

DISCUSIÓN

Pinus pinaster Aiton, es una conífera natural de la región mediterránea occidental y de la fachada atlántica, que constituye masas forestales en Francia, España, Portugal, Italia, Marruecos, Argelia y Túnez. En España es el pino que ocupa de forma natural mayor superficie, siendo también el que más se ha usado en los programas de repoblación. Dentro de esta especie se distinguen dos poblaciones: la atlántica, que ocuparía el norte de Portugal, noroeste de España y suroeste de Francia, y la mediterránea, que ocuparía el resto del área (Rodríguez *et al.* 2007). *P. pinaster* ocupa de forma natural una gran superficie del territorio asturiano, esto hace que represente valores próximos al 10 % del total de la superficie arbolada de la provincia. Por otro lado, el Plan Forestal de Asturias, elaborado por la Consejería de Medio Rural y Pesca en el año 2000, marca como uno de sus objetivos duplicar la superficie de plantación de esta especie a lo largo de un horizonte temporal de 60 años.

Su amplia distribución natural y su gran capacidad para crecer en diversas condiciones ambientales hacen que esta especie sea de gran interés económico y ecológico. Se trata por tanto, de un buen activo para la industria maderera europea, sin embargo, este sector exige un producto de alta calidad, sin nudos e imperfecciones. Este tipo de madera no es fácil de obtener debido a que esta especie presenta un tipo de crecimiento policíclico, que implica, una mayor ramificación y por consiguiente, la formación de un mayor número de nudos en el árbol, haciendo que la madera pierda valor y calidad.

El nuevo papel de las estrigolactonas en la ramificación y dominancia apical ha logrado que se avanzara en este campo de investigación, consiguiendo la identificación de los genes responsables de la inhibición de la ramificación en distintas especies, aunque la especie de referencia de la que se dispone de mayor información acerca de la actividad de los mismos sigue siendo *Arabidopsis thaliana*, disponiéndose de muy poca información o casi ninguna acerca de esta ruta de señalización en especies de interés forestal.

En este trabajo, a través de un breve estudio filogenético, hemos podido comprobar que la ruta de señalización de las estrigolactonas está bastante conservada entre distintas especies vegetales, especialmente la superfamilia MAX tal como ya anotaron Ward *et al.*, (2013) los cuales fueron capaces de recuperar en *Arabidopsis* la función de varios mutantes para los genes de la superfamilia MAX mediante la transgénesis de esos genes procedentes de una especie forestal: *Salix spp.* No obstante, a pesar de ser una ruta muy conservada entre las especies, en este trabajo se ha podido observar que otros genes pertenecientes a la señalización de estrigolactonas, tales como *AXR1*, a pesar de estar también bastante conservados entre la mayoría de las especies, en *Pinus taeda*, la única conífera introducida en el estudio, mostraron cierta divergencia evolutiva. Es por eso que para este estudio se decidió analizar el papel de este gen, junto con otro perteneciente a la familia MAX, *MAX1*, para analizar la relevancia de esta ruta de señalización en la ramificación de *P. pinaster*.

Así, los resultados obtenidos en este trabajo a través del análisis de expresión de PpAXR1 y PpMAX1 en las plántulas tratadas con diferentes combinaciones de estrigolactonas y un inhibidor de auxinas, muestran la importancia tanto de las estrigolactonas como de las auxinas en el control de la dominancia apical. Estos resultados concuerdan con la hipótesis de la inhibición de la ramificación a través del modelo del segundo mensajero, descrito en *Arabidopsis* (Brewer *et al.* 2009). De acuerdo a este modelo, las auxinas en el tallo regulan

la producción de un segundo mensajero, las estrigolactonas, que se transportan acrópetamente hacia las yemas y regulan su actividad. El modelo de inhibición de la ramificación vía estrigolactonas relacionado con la hipótesis del segundo mensajero que se presenta en la Figura 12, muestra los genes y proteínas identificados en esta ruta hasta la fecha en *Arabidopsis*. *MAX3* media en los primeros pasos de la ruta biosintética, actuando a continuación *MAX4* y *D27*. Un producto móvil, la carlactona, es la que sale del plastidio y necesita del citocromo P450, codificado por *MAX1*, para convertirse en una estrigolactona bioactiva, por lo que es un punto clave en la regulación de esta ruta. Finalmente, una proteína F-box y una α/β hidroxilasa están involucradas en la señalización local de las estrigolactonas en la yema. Por otro lado *AXR1*, relacionado con la señalización de auxinas, a través de la vía de transducción de señales *AXR1/TIR1* regula la expresión de *MAX3* y *MAX4* mediante la degradación del represor transcripcional *IAA12*. *AXR1*, además, suprime la biosíntesis de citoquininas inhibiendo la formación de nuevas yemas.

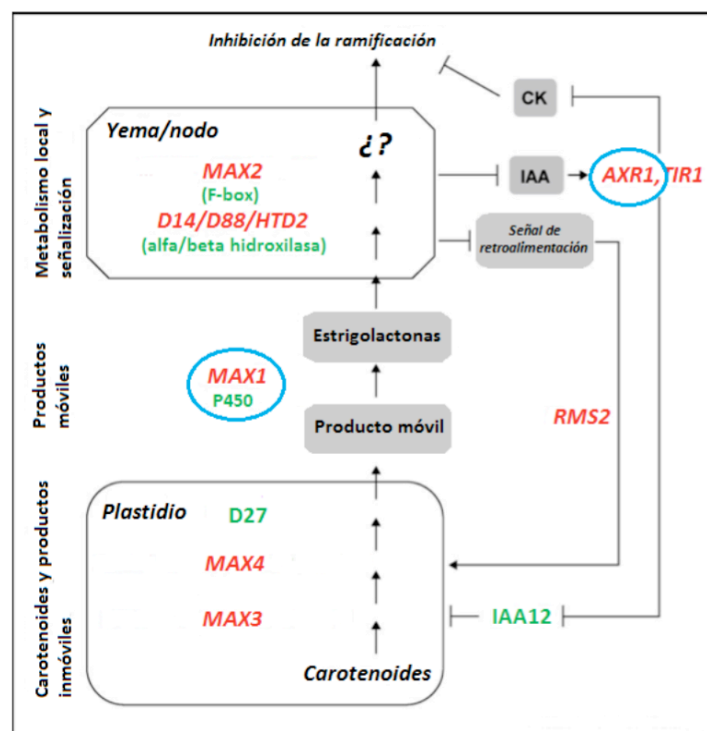


Figura 12. Modelo simplificado de la inhibición de la ramificación de los brotes vía estrigolactona. Modificado de Beveridge y Kyozyuka (2010). Genes: en rojo; Proteínas: en verde. Se resaltan en marco azul los genes estudiados.

Mediante los resultados de este trabajo en plántulas bifurcadas de *P. pinaster*, se observa que la relación auxina-estrigolactona es clave en la regulación de la dominancia apical de la plántula y en su grado de ramificación, de acuerdo con los estudios realizados en *Arabidopsis thaliana* y *Pisum sativum* (Gómez-Roldán *et al.* 2008; Brewer *et al.* 2009) en los cuales mediante la aplicación de GR-24, mutantes de *Arabidopsis* extra-ramificados (*axr1*) eran capaces de recuperar el fenotipo salvaje y la función de *AXR1*. En los resultados obtenidos, se observaron elevados niveles de expresión de *PpAXR1* y *PpMAX1* en las plántulas de *P. pinaster* sobre las que se aplicó GR-24 sobre las yemas laterales. Dichas plántulas, a su vez, son las que han experimentado un mayor incremento de la altura de la rama dominante, un menor incremento en la altura de la rama lateral, además de menor

producción de nuevas yemas. Con estos resultados se puede afirmar que la función de las estrigolactonas en la inhibición de la ramificación se ejerce fundamentalmente a nivel de las yemas laterales que, a su vez, repercute en un mayor incremento en longitud de la rama dominante. Por otro lado, a través de la adición del inhibidor del transporte de auxinas, se puede deducir que las auxinas juegan un papel clave para que las estrigolactonas puedan ejercer su función en la inhibición de la ramificación puesto que el mismo tratamiento con GR-24, cuando previamente se habían tratado las plantas con el inhibidor del transporte de auxinas, no muestra diferencias significativas respecto al control, ni a nivel fenológico, ni a nivel de expresión de PpAXR1 o PpMAX1.

Los resultados obtenidos de la expresión de PpAXR1 y PpMAX1 en las plantas de campo validan el posible papel de las estrigolactonas en la regulación de la ramificación en *P. pinaster*. De este modo, se apreció que la procedencia con menor grado de policiclismo Tamrabta (Marruecos) (Tab. 1) fue, a su vez, la procedencia que presentó mayor sobreexpresión de ambos genes en sus yemas laterales; mientras que, Cadavedo (Asturias) que representa por otro lado la procedencia con mayor grado de policiclismo y en consecuencia mayor ramificación (Sánchez-Gómez *et al.* 2010) mostró los valores más bajos de expresión tanto en las yemas laterales como en la dominante. Oria (Almería), por otro lado, representa una procedencia intermedia en relación a su comportamiento policíclico y esto también se vio reflejado en los nivel de expresión de PpAXR1 y PpMAX1.

Finalmente, mediante la hibridación fluorescente *in situ*, no solo se ha confirmado la relevancia de ambos genes en la inhibición de la ramificación de *P. pinaster* sino que además se ha logrado visualizar la expresión de ambos genes simultáneamente sobre muestras de tejido vegetal, descubriendo la localización exacta donde se origina su actividad que, aunque en ambos casos se localice fundamentalmente en la yema lateral, es diferente para cada gen; de tal modo que PpAXR1, relacionado con la señalización de las auxinas y la inhibición de la actividad de las citoquininas (Beveridge y Kyojuka, 2010) presenta mayor expresión en la zona meristemática de la yema lateral, mientras que PpMAX1, implicado en la activación de las estrigolactonas (Scaffidi *et al.* 2013), muestra mayor expresión en la zona vascular de la yema.

Este trabajo representa una primera aproximación en el estudio del papel de las estrigolactonas en el control de la ramificación y dominancia apical en *Pinus pinaster*. Mediante este trabajo se ha cuantificado la expresión de dos genes claves en la ruta de biosíntesis de estrigolactonas, bajo distintas situaciones experimentales y en muestras de campo de distintas procedencias, obteniendo datos importantes no solo a nivel de ciencia base sobre la implicación de estas hormonas en ramificación del tallo y la dominancia apical en *P. pinaster*, sino también a nivel aplicado desde una perspectiva biotecnológica. En definitiva, estos resultados, permitirán ampliar el conocimiento sobre la señalización de la ramificación en coníferas así como mejorar el diseño de programas de mejora de esta especie. De tal modo que, mediante un análisis sencillo de expresión génica sería posible determinar de un modo temprano el grado de policiclismo de un cultivar determinado lo cual facilitaría la determinación de la idoneidad de dicho cultivar para diferentes fines ya sea producción de madera o repoblación paisajística.

CONCLUSIONES

- Se confirma que la ruta de señalización de estrigolactonas está conservada entre las especies estudiadas, aún existiendo cierta divergencia evolutiva en coníferas en relación a AXR1.
- Las medidas de expresión de PpAXR1 y PpMAX1 en las plántulas bifurcadas, confirman que, las estrigolactonas ejercen la inhibición de la ramificación en las yemas laterales.
- Las auxinas parecen jugar un papel clave, junto a las estrigolactonas, en la inhibición de la ramificación.
- Los resultados de expresión de PpAXR1 y PpMAX1 en las plantas de campo, confirman que, las estrigolactonas están implicadas en la inhibición del policiclismo en *Pinus pinaster*.
- Se ha confirmado que, la expresión de PpAXR1 y PpMAX1 en yemas dominantes y laterales presenta una localización tisular diferencial para cada gen.
- Los datos obtenidos, permitirán desarrollar los programas de mejora de *P. pinaster*, facilitando el manejo de la especie tanto con fines económicos como ecológicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alder, A., Jamil, M., Marzorati, M., Bruno, M., Vermathen, M., Bigler, P., Ghisla, S., Bouwmeester, H., Beyer, P., Al-Babili, S. (2012). The path from β -carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone. *Science*, 335, 1348-1351.
- Alía, R., Martín, S. (2009). Guía técnica para la conservación genética y utilización del pino negral (*Pinus pinaster*) en España. Foresta. Madrid. España.
- Beveridge, C.A., Hyozuka, J. (2010). New genes in the strigolactones-related shoot branching pathway. *Curr Opin Plant Biol.* 13, 34-39.
- Booker, J., Sieberer, T., Wright, W., Wilhamson, L., Willett, B., *et al.* (2005). *MAX1* encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of *MAX3/4* to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Dev Cell.* 8, 443-449.
- Bouwmeester, H.J., Matusova, R., Zhongkui, S., Beale, M.H. (2003). Secondary metabolite signalling in host-parasitic plant interactions. *Curr Opin Plant Biol.* 6, 358-364.
- Brewer, P.B., Dun, E.A., Ferguson, B.J., Rameau, C., Beveridge, C.A. (2009). Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 150, 482-493.
- Brewer, P.B., Koltai, H., Beveridge, C.A. (2013). Diverse roles of strigolactones in plant development. *Mol Plant.* 6, 18-28.
- Czarnecki, O., Yang, J., Wang, X., Muchero, W., Tuskan, G. A., Chen, J. G.. (2014). Characterization of MORE AXILLARY GROWTH genes in *Populus*. *PLoS ONE*.
- Cook, C.E., Whichard, L.P., Turner, B. Wall, M.E. & Egley, G.H. (1966). Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour.): Isolation and properties of a potent stimulant. *Science*, 154, 1189-1190.
- Cook, C.E., Whichard, L.P., Wall, M.E., Egley, G.H., Coggon, P., Luhan, P.A., McPhail, A.T. (1972). Germination stimulants. II. The structure of strigol: a potent seed germination stimulant for witchweed (*Striga lutea* Lour.). *J Am Chem Soc.*, 94, 6198-6199.
- de Saint Germain, A., Bonhomme, S., Boyer, F.D., Rameau, C. (2013), Novel insights into strigolactones distribution and signalling. *Curr Opin Plant Biol.* 16, 583-589.
- Domagalska, M.A., Leyser, O. (2011). Signal integration in the control of shoot branching. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12, 211-221.
- Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P.B., Puech-Pages, V., Dun, E.A., Pillot, J.p., Letisse, F., Matusova, R., Danoun, S., Portais, J.C., Bouwmeester, H., Becard, G., Beveridge, C.A., Rameau, C., Rochange, S.F. (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, 455, 189-194.
- Rodríguez, R., Majada, J., Benito, J. L., Braña, M. (2007). Manual básico de selvicultura del Pino pinaster (*Pinus pinaster*).Ed.SERIDA.ASI870/07.

- Saitou, N., Nei, M. (1987). The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4), 406-425.
- Sánchez-Gómez, D., Majada, J., Alí, R., Feito, I., Aranda, I. (2010). Intraspecific variation in growth and allocation patterns in seedlings of *Pinus pinaster* Ait. submitted to contrasting watering regimes: can water availability explain regional variation?. *Ann. For. Sci.* 67, 505.
- Scaffidi, A., Waters, M. T., Ghisalberti, E. L., Dixon, K. W., Flematti, G. R., Smith, S. M. (2013). Carlactone-independent seedling morphogenesis in Arabidopsis. *The Plant Journal.* 76, 1-9.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A.. (2012). "Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis." *Nat Meth* 9, 676–82.
- Seto, Y., Sado, A., Asami, K., Hanada, A., Umehara, M., Akiyama, K., Yamaguchi, S. (2014). Carlactone is an endogenous biosynthetic precursor for strigolactones. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 111, 1640-1645.
- Thimann, K.V., Skoog F. (1933). Studies on the growth hormone of plants: III. The inhibiting action of the growth substance on bud development. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 19, 714-716.
- Tsuchiya, Y., McCourt, P. (2012). Strigolactones as Small Molecule Communicators. *Molecular BioSystems*, 8, 464-469.
- Valledor L., Cañal M, Pascual J, Rodriguez R, Meijón M. (2012). Early induced protein 1 (PrELIP1) and other photosynthetic, stress and epigenetic regulation genes are involved in *Pinus radiata* D. Don UV-B radiation response. *Physiologia plantarum.* 146, 308-320.
- Valledor. L., Escandón M., Meijón, M., Nukarinen, E., Cañal, M., Weckwerth, W. (2014). A universal protocol for the combined isolation of metabolites, DNA, long RNAs, small RNAs, and proteins from plants and microorganisms. *The plant journal.* 79(1), 173-180.
- Wang, Y.H., Li, J.Y. (2011) Branching in rice. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 14, 94-99.
- Ward, S.P., Salmon, J., Hanley, S. J., Karp, A., Leyser, O. (2013). Using Arabidopsis to study shoot branching in biomass Willow. *Plant Physiology.* 162, 800-811.
- Zas, R., Fernández-López, J. (2005). Juvenile genetic parameters and genotypic stability of *pinus pinaster* Ait. Open-pollinated families under different water and nutrient regimes. *Forest Science*, 51(2), 165-174(10).
- Zheng, Z., Germain Ade, S., Chory, J. (2014). Unfolding the mysteries of strigolactone signalling. *Mol Plant.* 7, 934-936.