ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

Ricardo
Castro Camba

Tese de doutoramento

Mecanismos reguladores da competencia para a rexeneración de raíces adventicias en especies leñosas.

Santiago de Compostela, 2023

Programa de Doutoramento en Biodiversidade e Conservación do Medio Natural

ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

TESE DE DOUTORAMENTO

MECANISMOS REGULADORES DA COMPETENCIA PARA A REXENERACIÓN DE RAÍCES ADVENTICIAS EN ESPECIES LEÑOSAS

Ricardo Castro Camba

Director: Conchi Sánchez Fernández, Jesús María Vielba Villegas

Titor: Andrés Baselga Fraga

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN BIODIVERSIDADE E CONSERVACIÓN DO MEDIO NATURAL

SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

O traballo de investigación realizado durante o presente doutoramento foi financiado polo Contrato Programa 2016-2018, Contrato Programa 2019-2020, Contrato Programa 2021 (AGI/CSIC I+D+I 2021, Ref- ACAM 20210200033), e os proxectos IN607A 2017/6, *Enraizamento adventicio en material adulto de fagáceas. Mecanismos epigenéticos* e *Conservación y mejora de sistemas agroforestales*.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECEMENTOS

Toda a xente que me coñece sabe dúas cousas de min: que son moi da Estrada e que me custa poñerme serio. É por iso que para min esta primeira sección da tese é a máis difícil de redactar. O ser humano é un ser social, polo que nin as persoas máis intelixentes - grupo ao que estou lonxe de pertencer - poden traballar e desenvolverse sen o apoio e a axuda do seu entorno. Como ser social, tamén é certo que non se poden individualiza-las aportacións de cada persoa concreta durante o desenvolvemento desta tese. Porén, si que hai persoas ás quen debo agradece-la súa influencia e o seu apoio durante estes anos, tanto a nivel de traballo como a nivel persoal.

Si que quero agradecer primeiramente a Conchi e a Jesús a dirección desta tese, que probabelmente non foi a labor máis sinxela, xa que me consta que hai doutorandos ben máis guiados ca min. A pesar de non ter un papel legal no desenvolvemento da tese, e polo tanto tampouco un recoñecemento oficial; si que cómpre que quede por escrito un recoñecemento a (non procuredes un patrón, a orde é puramente alfabética) Anxela, a Fátima, a Laura, a Mari Carmen, a Maria Jose, a Nieves, a Noelia, a Puri, a Saleta e a Sara. Grazas a todas por todo o que aprendín, aprendo e seguirei aprendendo, grazas pola paciencia e tamén de nada polo que eu vos puidese aportar, que en cinco anos espero que fose algo.

Tal e como aparece nalgún dos papeis que tiven que presentar ante a USC "A tese abarca os resultados do meu traballo". É dicir, que a fixen eu. Pero "eu" son quen son en boa parte grazas á miña familia. Por iso esta tese é tan miña como da miña nai Sabela, do meu pai Luís, de Dolo e Susana, do meu irmao Guille, de Mei e Alfonso, do meu avó Tito - "o meu amigho" - e dos meus avós Preciosa e Santiago. Todos eles fixéronme quen son; os meus logros son grazas a eles pero os meus fallos a saber de quen serán culpa.

Non toda a familia deriva da consanguinidade. É por iso que tamén se deben incluír no apartado anterior os meus amigos. Martín, Fernández, David e Sandra. A eles hai que lles recoñece-lo mérito especial de aturarme a pesar de non estaren socialmente obrigados polo parentesco.

Moitas amizades non se forman na infancia, pero si que poden ser igual de importantes. Por iso teño que agradecer por todo, que non é pouco, a Sheila e Elsa. Elas son amigas, compañeiras de carreira, asesoras e co-directoras extraoficiais desta tese. Iso de momento, a saber que serán no futuro.

Agradecer especificamente a Sheila, crede ben que este agradecemento por duplicado non só non é un erro senón que é ben merecido.

Se de alguén me esquecín nestes agradecementos, por favor, que disimule. Foron os nervios.

Quero finalizar estes agradecementos pedindo desculpas ao tribunal pola extensión desta sección, poida que fose excesivamente longa. Tamén quero pedir desculpas ás persoas que saen nomeadas neste apartado pola extensión desta sección, xa que estou certo de que é demasiado curta para agradecervos todo da forma que merecedes.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A Estrada - 2023

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



"Val máis unha Terra con árbores nos montes
que un Estado con ouro nos Bancos"

Castelao

"A visión dialéctica insiste na idea de que a persistencia e o equilibrio non son os estados naturais das cousas pero que requiren explicación, que debe buscarse na acción das forzas opostas"

Richard Levins e Richard Lewontin

"O que nos diga que temos
que ter pacencia e calar;
ou é que xa manda en nós
ou é que pensa en mandar"

Manuel María

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Contido

Abreviaturas e acrónimos 13
RESUMO 17
ABSTRACT 21
1. INTRODUCIÓN 25
1.1 AS FRAGAS 25
1.2 O CASTIÑEIRO 26
1.3 PROPAGACIÓN VEXETATIVA 28
1.4 MICROPROPAGACIÓN MEDIANTE PROLIFERACIÓN DE XEMAS AXILARES 30
1.4.1 Condicións da micropropagación 31
1.4.2 Fases da micropropagación por xemas axilares 32
1.4.3 Vantaxes da micropropagación 36
1.4.4 Limitacións da micropropagación 38
1.5 CAMBIO DE FASE 39
1.5.1 Regulación do cambio de fase 41
1.5.2 Reversión do cambio de fase 43
1.6 ENRAIZAMENTO ADVENTICIO 44
1.6.1 Fases do enraizamento adventicio 44
1.6.2 Factores ambientais implicados na formación de raíces adventicias 46
1.7 ANÁLISES MOLECULARES 51
2. OBXECTIVOS 55
3. ASPECTOS METODOLÓXICOS 59
3.1 MATERIAL VEXETAL 59
3.1.1 Castiñeiro 59
3.1.2 Bidueiro 59
3.1.3 Carballo 59
3.2 PROLIFERACIÓN DOS CULTIVOS 59
3.2.1 Metodoloxía 59
3.2.2 Medios de cultivo 60
3.2.3 Medios alternativos 60
3.3 ENRAIZAMENTOS 61
3.3.1 Medios alternativos de enraizamento 62
3.3.2 Efecto da concentración de auxina 62
3.3.3 Efecto do NPA 62
3.3.4 Xiberelinas 62

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.3.5 Etileno ... 63
3.3.6 Outros compostos ... 64
3.3.7 Toma de datos e análise estatística dos enraizamentos ... 64
3.4 ANÁLISES MOLECULARES ... 65
3.4.1 Recollida de material e extracción de ARN ... 65
3.4.2 Transcritómica ... 67
3.4.3 qPCR ... 70
4. RESULTADOS ... 75
4.1 EXPERIMENTOS DE PROLIFERACIÓN DE REBENTOS EN MEDIOS ALTERNATIVOS ... 79
4.1.1 Custo ... 79
4.1.2 Efecto da fonte de carbono e do axente xelificante na proliferación de rebentos ... 79
4.2 EXPERIMENTOS DE ENRAIZAMENTO ... 81
4.2.1 Efecto da fonte de carbono e do axente xelificante no enraizamento ... 81
4.2.2 Efecto da concentración do AIB na calidade do enraizamento ... 83
4.2.3 Efecto da inhibición do transporte polar de auxinas ... 85
4.2.4 Efecto das xiberelinas no enraizamento adventicio ... 86
4.2.5 Efecto do etileno no enraizamento ... 88
4.2.6 Efecto do peróxido de hidróxeno no enraizamento adventicio ... 90
4.2.7 Efecto dun derivados da urea durante o enraizamento ... 91
4.2.8 Efecto da diminución do calcio no enraizamento adventicio ... 92
4.2.9 Efecto dun bio-estimulador natural no enraizamento ... 92
4.3 ANÁLISES TRANSCRITÓMICOS ... 95
4.3.1 Resposta aos tratamentos de corte ... 96
4.3.2 Resposta aos tratamentos indutores do enraizamento ... 100
4.3.3 Mudanzas na expresión asociadas á sinalización hormonal ... 103
4.4 Análise da expresión xénica de xenes identificados na transcritómica por medio da técnica de qPCR ... 111
4.4.1 Tratamentos con xiberelinas en P2Rb ... 111
4.4.2 Tratamentos con etileno en P2C ... 113
5. DISCUSIÓN ... 119
5.1 Substitución do agar e sacarosa de laboratorio por alternativas comerciais ... 119
5.2 Efecto da modificación da concentración de AIB exóxeno durante o enraizamento ... 121
5.3 O transporte polar de auxinas é necesario para un correcto enraizamento ... 122
5.4 Efecto diferencial das xiberelinas exóxenas sobre o enraizamento adventicio ... 123
5.5 Efecto diferencial do etileno na calidade do sistema radicular tralo cambio de fase ... 124

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.6 Relación do estrés oxidativo e a capacidade de enraizamento adventicio 126
5.7 Efecto das difenil-ureas sobre calidade dos rebentos durante o enraizamento.....127
5.8 O calcio é necesario para o enraizamento adventicio do castiñeiro 127
5.9 Efecto dun bio-estimulante do enraizamento 128
5.10 Implicacións xerais do enraizamento adventicio do castiñeiro 128
5.11 Análise transcritómica da resposta dos rebentos ao corte 129
5.12 Xenes expresados de xeito diferencial tralo tratamento do castiñeiro xuvenil con xiberelinas 131
5.13 Análise dos xenes expresados de xeito diferencial ante a inhibición do etileno en castiñeiro adulto 134
5.14 Efecto das xiberelinas no enraizamento e na expresión xénica en P2Rb 135
5.15 Efecto do etileno no enraizamento e na modulación xénica en P2C.....137
6. CONCLUSIÓNS.....141
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....145
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....193
LISTAXE DE FIGURAS.....195
LISTAXE DE TÁBOAS.....199
RELACIÓN DE PUBLICACIÓNS 201

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

A

ABA: Ácido abscísico
ANOVA: Analysis of Variance; *análise da varianza*
ABCB/MDR/PGP: ATP-BINDING CASSETTE TYPE B/P-GLYCOPROTEIN/ MULTIDRUG RESISTANT
ACC: Ácido 1-Aminociclopropano-1-carboxílico
$AgNO_3$: Nitrato de prata
AIA: Ácido indol-3-acético
AIB: Ácido indol-3-butírico
AUX1: AUXIN-RESISTANT 1

B

BA: 6-benciladenina
BZR1: BRASSINAZOLE-RESISTANT 1

C

$CaCl_2$.: Cloruro de calcio
CRISPR/Cas9: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein 9
CRF9: Cytokinin Response Factor 9
Cs22D: *Castanea sativa Auxin-induced protein 22D-like*
CsACO1-like: *Castanea sativa ACC Oxidase 1-like*
CsACS1-like: *Castanea sativa ACC Synthase 1-like*
CsACT2: *Castanea sativa Actina 2*
CsEIN2: *Castanea sativa Ethylene Insensitive 2*
CsELF-1: *Castanea sativa Elongation factor alpha 1*; *Factor de elongación alfa 1*
CsERF3: *Castanea sativa Ethylene Responsive Factor 3*
CsGID1B: *Castanea sativa GA-INSENSITIVE DWARF1b*
CsGID2: *Castanea sativa F-box protein GID2*
CsHDA14: *Castanea sativa Histone Deacetylase 14*
CsIAA29: *Castanea sativa AUX/IAA29*
CsJMJ30: *Castanea sativa lysine-specific demethylase Jumonji 30*
CsLOB16: *Castanea sativa LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN 16*
CsTUB: *Castanea sativa β-Tubulina*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

D

DEGs: Differential expressed genes; *xenes expresados de xeito diferencial*

E

EGTA: Ácido tetraacético N',N',N,N-etilenglicol-O,O'-bis(2-aminoetil eter)

G

GA_3: Gibberellic acid; *ácido xiberélico*
GABA: gamma-aminobutyric acid; *ácido gamma-aminobutírico*
GD: Gresshoff and Doy medium
GFF: General Feature Format
GID: Gibberellin Insensitive Dwarf
GO: Gene ontology

H

H_2O_2: Peróxido de hidróxeno

J

JAZ: JA ZIM domain

K

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

L

LAX: Like-AUX

M

3,4-MDPU: N,N′-bis-(3,4-methilenedioxifenil)urea
miR156: miRNA156
miR172: miRNA172
miRNA: microRNA; *microARN*
MS: Murashige and Skoog

N

NPA: N-(1-naphthyl)thalamic acid; *Ácido naftil-talámico*

O

ONT: Oxford Nanopore Technology

P

PBZ: Paclobutrazol
phyB: Phytochrome B; *fitocromo B*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

R

ROS: Reactive Oxygen Species; *Especies Reactivas de Oxíxeno*
SnRKs: Suc nonfermenting-1-related protein kinases

S

SPL: Squamosa Protein Like
STS: Silver Thiosulfate Solution; *Tiosulfato de prata*

T

TOE1: TARGET OF EAT 1

W

WPM: Woody Plant Medium

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMO

As fragas son ecosistemas chave para o planeta e para o ser humano xa que favorecen o secuestro de carbono, a biodiversidade, melloran a saúde e son os alicerces de diversas industrias con grande importancia económica. Entre os ecosistemas da Galiza resalta unha tipoloxía de fraga denominada souto. Este é unha fraga poboada con castiñeiros e, alén do seu papel ecolóxico e económico, tamén xogan un destacado papel social e cultural. Por iso, é de especial interese a súa conservación, xa que están afectadas por diferentes problemas entre os que cómpre salienta-lo cambio climático, a fragmentación do hábitat, os incendios e o despoboamento rural, así como ameazas bióticas específicas como a doenza da tinta, o cancro ou a avespa do castiñeiro.

Unha posíbel estratexia para reverter o declive dos soutos é a súa valoración grazas ó uso de variedades altamente produtivas ou resistentes tanto a doenzas como a condicións de estrés ambiental. Para iso pódense empregar técnicas de propagación vexetativa, asexual, que aseguren o mantemento desas características durante a reprodución dos tecidos. Se ben existen técnicas tradicionais para consegui-la clonación do material vexetal – a estacaxe, a porbaixa e maila enxertía – o uso de técnicas biotecnolóxicas permite unha produción maior e máis rápida á vez que se controlan as condicións ambientais e nutricionais durante o crecemento dos tecidos. Deste xeito, o uso de técnicas de micropropagación permiten o cultivo de micro-rebentos, cun cultivo axénico, libre de patóxenos, en ambiente estéril e con condicións ambientais optimizadas. Este é o punto de partida do ciclo de propagación por xemas axilares; un ciclo que consta de cinco fases: a selección de material que se vai propagar, estabelecemento *in vitro* do material esterilizado, a proliferación dos rebentos para obte-lo número de explantes desexado, o enraizamento adventicio dos rebentos e a aclimatación que permita formar plantas funcionais capaces de sobreviviren *ex vitro*.

A micropropagación permite – ademais do seu uso científico para experimentación – a produción en masa de individuos xeneticamente idénticos e libres de patóxenos, a síntese de substancias en biorreactores ou a conservación de especies endémicas ou ameazadas, o que axuda a preserva-la biodiversidade e a abrir novas industrias potenciais. Porén, estas técnicas tamén teñen limitacións como poden se-lo custo, a escolla do xenotipo que se quere micropropagar, o ruído de desenvolvemento, a variación somaclonal ou a falta de predición do fenotipo unha vez se estabeleza *ex vitro*. Outra das limitacións é a recalcitrancia. Esta enténdese como a perda de capacidade das plantas para responderen ás técnicas de cultivo *in vitro* polo que, para poder levar a cabo con éxito o ciclo de micropropagación, é preciso comprende-las causas da recalcitrancia e elaborar estratexias específicas que permitan superar este estado. A recalcitrancia a procesos concretos, como por exemplo ao enraizamento, pode deberse ao propio

USC DE SANTIAGO

estado de desenvolvemento do material. Deste xeito, a maduración dos individuos reduce a súa capacidade para formar raíces. O proceso de transición do estado xuvenil ao adulto coñécese como cambio de fase e modifica diversos patróns de morfoxénese, crecemento, capacidade reprodutiva ou a resposta ao estrés. Polo tanto, a pesar de que as árbores que se queren micropropagar adoitan seleccionarse durante a etapa adulta procura estabelecerse material con características xuvenís para conseguir unha axeitada resposta aos procesos de propagación *in vitro*. Isto é posíbel porque o cambio de fase non afecta aos órganos pre-existentes, o que xera un cono de xuventude onde as zonas máis altas son máis adultas que as máis baixas xa que sufriron máis divisións celulares. Porén, non tódolos individuos presentan material con características xuvenís dispoñíbeis para o estabelecemento *in vitro*. A regulación do cambio de fase está mediada por diferentes determinantes xenéticos – como os miR156 e miR172 – e hormonais, polo que comprende-la súa acción e a súa relación co proceso de maduración é un paso chave para induci-lo rexuvenecemento do material e así axudar a supera-la recalcitrancia ao enraizamento adventicio. O enraizamento adventicio é un proceso complexo que permite producir raíces en tecidos nos que normalmente non se formarían. Na formación de raíces adventicias inflúen o xenotipo do material, os estados ontoxenético e fisiolóxico do material, a luz, o medio mineral e as hormonas, con grande influencia das auxinas, a principal hormona relacionada co desenvolvemento das raíces.

Debido ao elevado custo da micropropagación, o primeiro paso desta tese foi un abaratamento do protocolo de proliferación e enraizamento por medio da substitución da sacarosa de laboratorio por azucre comercial e do agar específico de laboratorio por agar comercial de produción local. Como o material micropropagado adoita ser moi sensíbel aos cambios na fonte de carbono e ao axente xelificante do medio de cultivo avaliáronse os cambios na calidade dos rebentos e das raíces formadas. A substitución da sacarosa e do agar por alternativas comerciais mantivo a calidade dos rebentos nos parámetros analizados; o que si produciu foi un descenso no custo do medio de cultivo de máis do 80%. Do mesmo xeito, unha redución na concentración de ácido indol-3-butírico (AIB) de até o 90% produciu resultados similares no sistema radicular mais si que produciu menores taxas de rebentos con calo e reduciu drasticamente a necrose apical. Na liña adulta de castiñeiro nin o aumento nin a diminución do AIB mellorou a calidade do rebento.

Tras isto, analizouse a capacidade rizoxénica en resposta a diferentes tratamentos. Primeiramente ratificouse a necesidade do transporte polar das auxinas para unha correcta formación de raíces adventicias grazas ao uso do Ácido naftil-talámico (NPA). Unha vez dilucidado o papel da concentración de auxinas exóxenas e do seu transporte no enraizamento fixéronse ensaios adicionais con dúas das principais hormonas vexetais: as xiberelinas e o etileno. Ámbalas dúas tiveron efectos no enraizamento adventicio só que, mentres que as xiberelinas inhibían a formación de raíces en explantes xuvenís de castiñeiro, mais non en rebentos adultos, o etileno presentaba o patrón oposto. As xiberelinas diminuíron a capacidade de enraizamento do castiñeiro xuvenil ao tempo que as raíces formadas foron máis longas e a inhibición das xiberelinas endóxenas por parte do paclobutrazol (PBZ) foi quen de induci-la formación de raíces incluso en ausencia dun tratamento con auxinas. A pesar diso o tratamento

con NPA demostrou que o transporte polar de auxinas era necesario para a indución do enraizamento por parte do PBZ. No caso do etileno, esta hormona reduciu a taxa de enraizamento e a calidade das raíces formadas en castiñeiro adulto. Así, ao inhibi-la acción do etileno por medio dun pre-tratamento con tiosulfato de prata ou con nitrato de prata mellorou as taxas de enraizamento, a súa lonxitude e maila formación de raíces laterais. Outros tratamentos non hormonais foron probados no castiñeiro. O H_2O_2 foi quen de induci-lo enraizamento adventicio do castiñeiro en ausencia de auxina exóxena á vez que impedía a formación do calo basal e diminuía a porcentaxe de rebentos necrosados. Porén, cando este tratamento se combinaba con AIB estes efectos diminuían. A 3,4-MDPU, un derivado da urea, demostrou a súa capacidade para mellora-la calidade dos rebentos durante o enraizamento adventicio. O uso do EGTA, un quelante do calcio demostrou que este mineral é preciso para a formación de raíces adventicias en castiñeiro. Por último, probouse o efecto no enraizamento do Charkor, un bio-estimulador de orixe natural, que deu en mellores taxas de enraizamento no castiñeiro adulto e a un meirande número de raíces, a pesar de teren unha menor lonxitude.

Tralos resultados obtidos dos experimentos fisiolóxicos realizáronse experimentos de transcritómica, escolléronse xenes potencialmente implicados no enraizamento adventicio e ratificáronse os seus niveis de expresión por medio da técnica da qPCR. Foron analizadas mostras de ARN do experimento onde a liña de castiñeiro xuvenil foi tratada con auxinas e moduladores das xiberelinas e tamén mostras do experimento onde a liña de castiñeiro adulto foi tratada con auxina e máis con moduladores do etileno. Deste xeito identificáronse xenes que interveñen potencialmente no enraizamento adventicio. As xiberelinas demostraron actuar a través dos xene de resposta a auxinas *Cs22D* e *CsLOB16*, dunha forma independente da degradación das proteínas DELLA, mentres que o PBZ, que foi quen de producir raíces alongadas a pesar de inhibi-las xiberelinas endóxenas, pode actuar indirectamente a través do óxido nítrico. Por outra banda, a inhibición do etileno parece mellora-la calidade das raíces formadas por medio dun aumento do transportador de auxinas *CsPIN1* e a través da represión do modulador epixenético *CsJMJ30*.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ABSTRACT

Forests are key ecosystems for the planet and for human beings, as they promote carbon sequestration, biodiversity, improve health, and serve as the foundation for various industries with significant economic importance. Among the ecosystems in Galicia, a particular type of woodland stands out, known as 'souto.' This woodland is populated with chestnut trees, and besides its ecological and economic role, it also plays a prominent social and cultural role. Therefore, its conservation is of special interest, as it is affected by different problems, among which climate change, habitat fragmentation, wildfires, rural depopulation, as well as specific biotic threats such as ink disease, chestnut blight, or chestnut wasp, should be highlighted.

A possible strategy to reverse the decline of chestnut groves is their assessment through the use of highly productive or disease- and environmentally stress-resistant varieties. For this purpose, vegetative, asexual propagation techniques can be employed to ensure the maintenance of these traits during tissue reproduction. While there are traditional techniques for plant material cloning, such as cuttings, layering, and grafting, the use of biotechnological techniques allows for greater and faster production, while controlling the environmental and nutritional conditions during tissue growth. In this way, the use of micropropagation techniques allows for the cultivation of micro-shoots in an axenic culture, free of pathogens, in a sterile environment with optimised environmental conditions. This is the starting point of the propagation cycle through axillary buds, a cycle consisting of five phases: the selection of material to be propagated, *in vitro* establishment of sterilised material, proliferation of shoots to obtain the desired number of explants, adventitious rooting of the shoots, and acclimation to develop functional plants capable of surviving *ex vitro*.

Micropropagation allows, in addition to its scientific use for experimentation, the mass production of genetically identical and pathogen-free individuals, the synthesis of substances in bioreactors, and the conservation of endemic or threatened species, which helps preserve biodiversity and opens up new potential industries. However, these techniques also have limitations, such as cost, the choice of the genotype to be micropropagated, developmental noise, somaclonal variation, or the lack of prediction of the phenotype once established *ex vitro*.

Another limitation is recalcitrance, which refers to the loss of the plant's ability to respond to *in vitro* cultivation techniques. To successfully carry out the micropropagation cycle, it is necessary to understand the causes of recalcitrance and develop specific strategies to overcome this state. Recalcitrance to specific processes, such as rooting, may be due to the developmental stage of the material. The maturation of individuals reduces their ability to develop roots. This transition process from a juvenile to an adult state is known as phase change and modifies

various patterns of morphogenesis, growth, reproductive capacity, or stress response. Therefore, despite the fact that trees to be usually micropropagated are selected during the adult stage, efforts are made to establish material with juvenile characteristics to achieve an appropriate response to *in vitro* propagation processes. This is possible because phase change does not affect pre-existing organs, generating a cone of juvenility where the upper parts are more adult than the lower ones as they have undergone more cell divisions. However, not all individuals have material with juvenil-like characteristics suitable for *in vitro* establishment

The regulation of phase change is mediated by different genetic determinants – such as miR156 and miR172 – and hormones, therefore understanding their action and their relationship with the maturation process is a key step in inducing the rejuvenation of the material and thus helping to overcome recalcitrance to adventitious rooting. Adventitious rooting is a complex process that allows the production of roots in tissues where they would not normally form. The genotype of the material, light, mineral medium, and hormones, with a great influence of auxins, the main hormone related to root development, play a role in the formation of adventitious roots.

Due to the high cost of micropropagation, the first step of this work was a cheapening of the proliferation and rooting protocols by replacing laboratory sucrose with commercial sugar and laboratory-specific agar with locally produced commercial agar. Since micropropagated material tends to be very sensitive to changes in the carbon source and gelling agent of the culture medium, the changes in the quality of the shoots and roots formed were evaluated. The substitution of sucrose and agar with commercial alternatives did not result in any decrease in the quality of the analysed parameters; instead, it led to a cost reduction of more than 80% in the culture medium. Similarly, a reduction in the concentration of IBA (Indole-3-butyric acid) of up to 90% not only did not worsen the root system but also led to lower rates of callused shoots and significantly reduced apical necrosis. In the adult chestnut clone, neither the increase nor the decrease in IBA improved the quality of the shoot.

After that, the rhizogenic capacity in response to different treatments was analysed. Firstly, the necessity of polar transport of auxins for the proper formation of adventitious roots was ratified using NPA. Once the role of exogenous auxin concentration and its transport in rooting was clarified, additional experiments were conducted with two of the main plant hormones: gibberellins and ethylene.

Both had effects on adventitious rooting, but while gibberellins inhibited root formation in young chestnut explants, they did not have the same effect on adult shoots. On the other hand, ethylene showed the opposite pattern. Gibberellins reduced the rooting capacity of young chestnut, but the formed roots were longer, and the inhibition of endogenous gibberellins by PBZ induced root formation even in the absence of auxin treatment. However, the NPA treatment demonstrated that polar auxin transport was still necessary for PBZ-induced rooting.

In the case of ethylene, this hormone reduced the rooting rate and the quality of the roots formed in adult chestnut. Inhibiting ethylene action through pretreatment with silver thiosulfate or

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

silver nitrate improved rooting rates, root length, and the formation of lateral roots. Other non-hormonal treatments were also tested in chestnut.

H_2O_2 induced adventitious rooting in chestnut while preventing callus formation and reducing the percentage of necrotic shoots. However, when combined with IBA, these effects diminished. 3,4-MDPU, an urea derivative, showed its ability to improve shoot quality during adventitious rooting. The use of EGTA, a calcium chelator, demonstrated the necessity of calcium for adventitious root formation in chestnut.

Finally, the effect of Charkor, a natural bio-stimulator, on rooting was tested. It resulted in better rooting rates and a greater number of roots in adult chestnut, despite the roots being shorter.

After obtaining the results from the physiological experiments, transcriptomic experiments were conducted, genes implicated in adventitious rooting were chosen and their expression levels were confirmed using qPCR. RNA samples from the experiment where the young chestnut line was treated with auxins and gibberellin modulators were sequenced, as were samples from the experiment where the adult chestnut line was treated with auxin and ethylene modulators. This allowed the identification of genes potentially involved in adventitious rooting.

Gibberellins were found to act through the auxin responsive genes *Cs22D* and *CsLOB16* independently of the degradation of DELLA proteins. On the other hand, PBZ, which induced elongated roots despite inhibiting endogenous gibberellins, may indirectly act through nitric oxide. Furthermore, the inhibition of ethylene seems to improve the quality of the formed roots by increasing the expression of the auxin transporter *CsPIN1* and repressing the epigenetic modulator *CsJMJ30*.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. INTRODUCIÓN

1.1 AS FRAGAS

As comunidades humanas estábeis están historicamente formadas nun territorio, cunha vida económica e hábitos psicolóxicos reflectidos nunha unidade de cultura e idioma. Todas estas características vense influenciadas polo medio xeográfico e natural no que se desenvolven estas comunidades. No caso galego, as fragas teñen un papel predominante e representan un 68,7% de toda a superficie galega (Xunta de Galicia, 2021), a segunda maior porcentaxe en Europa só por detrás de Finlandia (FOREST EUROPE, 2020). Esta vasta superficie forestal foi chave na distribución e asentamento da poboación, moldeou a nosa evolución económica e, con ela, o noso desenvolvemento cultural. A nivel económico Galiza representa o 56,4% das cortas de madeira de todo o Estado, dato que reflexa a súa vocación forestal (MITECO, 2022).

As fragas son ecosistemas con predominancia arbórea. Estas cobren arredor do 30% da superficie da Terra e son responsábeis das tres cuartas partes da produción primaria bruta terrestre (Pan *et al.*, 2013). A súa presenza ten implicacións ecolóxicas profundas, modifican o réxime de chuvias (Aragão, 2012), favorecen a biodiversidade (Huang *et al.*, 2018) e aumentan o secuestro de carbono (Birdsey e Pan, 2015). A conservación das fragas pode combinarse cos beneficios económicos co deseño dunha estratexia bio-económica que valorice o monte mediante o desenvolvemento de produtos forestais con alto valor engadido (Verkerk *et al.*, 2018). As fragas teñen tamén efectos positivos sobre a saúde humana a diferentes niveis (Marta-Pedroso *et al.*, 2014) e o seu mantemento é unha das principais maneiras de asegura-la mellora da calidade do aire (Nowak e Van den Bosch, 2019).

A pesar da importancia capital das fragas estes ecosistemas están expostos a múltiples perigos ao longo de todo o planeta tales como a mudanza climática, os incendios (Riveiro *et al.*, 2019), talas e abandono, a fragmentación dos hábitats para a expansión urbana e a creación de infraestruturas, o cambio de usos dos terreos forestais para favorecer usos agrícolas e para a extracción de recursos, as pragas (Scullion *et al.*, 2019), a introdución de especies invasoras (Essl *et al.*, 2011; Riveiro *et al.*, 2020) ou a expansión do monocultivo (Mo *et al.*, 2011).

Entre as diversas fragas que existen en Galiza hai unha que destaca por riba de todas debido ás súas implicacións ecolóxicas, económicas e culturais; os soutos. A simple existencia dunha palabra específica para designalos dá conta da importancia que teñen en Galiza, unha formación que está presente en máis do 60% das parroquias galegas. Un souto é un hábitat semi-natural dominado por castiñeiros para o aproveitamento de madeira ou froito.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2 O CASTIÑEIRO

O castiñeiro[1] (*Castanea sativa* Mill.) é unha especie arbórea amplamente distribuída ao longo da rexión mediterránea. A pesar das teorías amplamente reproducidas sobre a introdución do castiñeiro na Galiza por parte dos romanos durante a conquista de Gallaecia sábese da súa presenza dende o Último Máximo Glacial, tempo no que o sur da Europa actuou como refuxio para diversas especies de plantas e animais (Roces-Díaz *et al.*, 2018).

Os bosques de castiñeiros exercen un papel importante no mantemento da biodiversidade. Os soutos xestionados de xeito tradicional están relacionados cunha meirande riqueza específica vexetal (Guitián *et al.*, 2012) e os cultivos de castiñeiros están vencellados a un incremento no número de especies de paxaros (Morelli *et al.*, 2019). Amais os castiñeiros poden contribuír a mitiga-lo cambio climático debido á súa capacidade de secuestraren carbono (Castaño-Santamaría *et al.*, 2013), como se confirmou en América en plantacións de castiñeiro americano (*Castanea dentata*) (Jacobs *et al.*, 2009). Porén, esta capacidade depende do réxime de xestión das forestas (Prada *et al.*, 2016) e aumenta cando se combina a plantación cun manexo baseado en técnicas tradicionais (Seijo *et al.*, 2018).

Á parte do seu relevante papel ecolóxico é de grande importancia o papel cultural do castiñeiro (Martínez *et al.*, 2010) polo que é considerado, xunto co carballo, a grande árbore da cultura galega. Así se testemuña na súa ampla presenza a través da cultura popular na forma de cantigas (Schubarth e Santamarina, 1991), de festas coma o magosto (Quintáns Suárez, 1994) ou a través da toponimia, con 278 lugares oficiais chamados souto (Xunta de Galicia, 2023) e máis de 3.500 referencias aos soutos na microtoponimia (Xunta de Galicia e Real Academia Galega, 2023). A valoración do castiñeiro como especie sobranceira tamén se observa no feito de se-la segunda especie máis abondosa no catálogo de árbores senlleiras de Galiza (Subdirección Xeral de Biodiversidade e de Recursos Cinexéticos e Piscícolas, 2021).

Mais o castiñeiro é unha das especies máis rendíbeis na bacía mediterránea (Martín *et al.*, 2012) cunha importancia económica crecente (Braga *et al.*, 2015), nomeadamente dende os anos 90. Para ilustrar isto, entre 1961 e 2021 a produción mundial anual de castañas acrecentou de 594.398 toneladas a 2.269.923 e acadou o seu segundo valor máximo nese ano. A área total cultivada medrou dende as 102.870 hectáreas até as 568.175. Asemade a produción bruta incrementouse dos 1.512 millóns de dólares no 1961 aos 7.325 millóns de dólares no 2021. Seguindo a mesma tendencia, na España, a produción anual de castaña medrou das 99.000 toneladas ás 188.690 no mesmo período. A área cultivada no estado creceu das 7.000 hectáreas en 1985 (primeiro ano con datos dispoñíbeis) ás 38.230 hectáreas no ano 2021 (FAO, 2023). É dicir, que mentres que as hectáreas plantadas aumentaron un 546%, a produción de castañas aumentou só un 89%. Disto dedúcese que as variedades plantadas resultan en rendementos decrecentes. Isto fai que sexa necesaria a introdución de variedades máis produtivas para aumenta-la taxa de beneficio da actividade agrícola e forestal.

[1] O nomes comúns empregados nesta tese foron d'achave (Chave, 2020) a excepción da especie modelo *Arabidopsis* que na que se mantivo o nome en latín; cando non se achou rexistro no dicionario estes foron tomados do portugués, en consonancia coas "Normas ortográficas e morfolóxicas do idioma galego" (Instituto da Lingua Galega e Real Academia Galega, 2012).

O interese produtivo do castiñeiro non se detén na obtención de froitos para o consumo ou para a súa transformación en derivados. Unha das claves na importancia económica desta especie radica na súa explotación para a obtención de madeira empregada na construción (Vega *et al.*, 2019). De feito, en Europa, o principal destino das plantacións de castiñeiro é a produción de madeira (Carbone *et al.*, 2020), a cal non só é interesante para a construción polas súas propiedades físicas senón tamén polas químicas. Nos últimos tempos estanse a estuda-los metabolitos secundarios con efectos médicos (Ronsisvalle *et al.*, 2019; Cacciola *et al.*, 2020) que contribúen a maximiza-lo aproveitamento dos castiñeiros, abren a posibilidade de desenvolver novas industrias e incrementan o valor das actualmente existentes.

A pesar da súa importancia, os soutos non escapan dos problemas xerais que afectan ao resto de fragas. A súa ameaza principal é o contexto de cambio climático ao que nos enfrontamos (Freitas *et al.*, 2021). Esta mudanza global vai afectar ao castiñeiro, vai diminuí-la súa distribución potencial e vai elimina-la súa presenza en lugares como o sur da Península Ibérica (Anaya-Romero *et al.*, 2015). Unha das principais características do cambio climático é o aumento de eventos climáticos extremos como os períodos de seca e as inundacións. A pesar de que o castiñeiro amose unha capacidade aceptábel de adaptación ás condicións de seca (Lauteri *et al.*, 2004), hai estudos que suxiren que tanto esta como as elevadas temperaturas esperadas aumentan a mortalidade dos castiñeiros (Conedera *et al.*, 2010, 2021). Con todo, se o cambio climático aumenta os períodos de seca tamén se manifesta en forma de precipitacións torrenciais e inundacións, e o castiñeiro parece ter unha tolerancia menor á inundación que á seca (Camisón *et al.*, 2020). Sumada a estas problemáticas ecolóxicas os castiñeiros tamén teñen en contra a evolución demográfica e económica. Nun contexto de concentración da poboación nas áreas metropolitanas que arrodean as cidades, as parroquias rurais teñen cada vez menos veciños e estes traballan cada vez menos o monte. Este abandono das forestas e a súa falta de xestión é especialmente relevante para árbores que, coma o castiñeiro, son especialmente sensíbeis á ausencia de tratamentos silvícolas regulares (Conedera *et al.*, 2021).

Ademais o castiñeiro tamén se enfronta a ameazas biolóxicas e relativamente autónomas do cambio climático e do abandono rural. Entre estes destacan a tinta, o cancro, a avespa ou a mancha vermella do castiñeiro.

Phytophthora cinnamomi é o patóxeno causante da doenza da tinta do castiñeiro, a praga máis severa que padecen hoxe en día esta especie en Europa (Jung *et al.*, 2017). A pesar de non existir na actualidade mecanismos de prevención e erradicación axeitados para controla-la doenza da tinta, a existencia de exemplares resistentes (Santos *et al.*, 2015) permite iniciar estratexias de control mediante programas de cruzamento controlado ou o uso de patróns de enxerto.

O cancro do castiñeiro, causado polo fungo *Cryphonectria parasitica*, foi identificado en América e estímase a súa chegada a Europa a mediados do S.XX no norte de Italia (Perlerou e Diamandis, 2006). Esta peste estendeuse rapidamente por tódalas áreas de produción do castiñeiro, ocasionou profundas transformacións ecolóxicas (Holmes *et al.*, 2009) e provocou perdas económicas millonarias. Isto imposibilitou a produción rendíbel dos produtos derivados

do castiñeiro e aumentou o éxodo rural (Diamandis, 2018). Para loitar contra esta praga comezaron a empregarse cepas hipovirulentas, cepas que producen unha resposta inmune na árbore a pesar de presentaren sintomatoloxía leve e que son quen de transferir esa hipovirulencia a cepas máis agresivas. O uso destas cepas evitou a morte das árbores e favoreceu a recuperación das plantacións de castiñeiro na Europa (Bragança *et al.*, 2007; Diamandis, 2018).

A avespa do castiñeiro, *Dryocosmus kuriphilus*, é unha das maiores ameazas que ten hoxe en día o castiñeiro (Fernandes *et al.*, 2022) xa que aumenta de xeito significativo a mortalidade das árbores (Conedera *et al.*, 2021). Esta praga infecta xemas novas e pode levar a perdas na produción de castaña de até un 80% (Battisti *et al.*, 2014). Non obstante, unhas axeitadas prácticas silvícolas poden axudar a contrarresta-las perdas producidas por esta peste (Castedo-Dorado *et al.*, 2023b). Amais, recentemente foron abertas novas vías para o control deste insecto grazas á descrición de clons híbridos resistentes (Castedo-Dorado *et al.*, 2023a) e das bases bioquímicas da resistencia (Lombardero *et al.*, 2022). O desenvolvemento de estratexias para a loita contra a avespa do castiñeiro é chave xa que este insecto parece empeora-los efectos de *C. parasitica* e alarga-los danos provocados polo cancro incluso naqueles castiñeiros nos que a doenza estivese controlada pola aplicación de cepas hipovirulentas (Meyer *et al.*, 2015). Esta sinerxía entre pragas pode representar problemas futuros para a viabilidade dos castiñeiros.

Recentemente o fungo *Fistulina hepatica*, foi relacionado como o causante da mancha vermella do castiñeiro. Esta patoloxía fai que a madeira do castiñeiro destinxa nunha tonalidade avermellada. A presenza desta doenza xa causa perdas de até o 70% do valor da madeira producida no nordeste da península ibérica (Yurkewich *et al.*, 2017).

1.3 PROPAGACIÓN VEXETATIVA

Unha das mellores estratexias para evita-lo declive dos soutos é a valorización do castiñeiro, a mellora da rendibilidade dos cultivos e a creación de novas industrias vencelladas á transformación dos seus produtos. Para isto cómpre traballar con xenotipos mellorados ou escollidos en función de características seleccionadas, máis produtivos ou resistentes contra as pragas (Vieitez *et al.*, 2007). Dende o comezo da agricultura intentouse mellora-los rendementos da produción por medio de cruzamentos máis ou menos controlados e a xeración de híbridos. Mais as sementes melloradas aínda presentan algunhas limitacións como a variabilidade fenotípica resultante producida pola súa alta heterocigosidade ou a gran cantidade de tempo que fai falta para obter liñas melloradas debido á necesidade de levar a cabo varios cruzamentos (Watson *et al.*, 2018), sobre todo cando se traballa con especies forestais (Yu *et al.*, 2021). Así e todo, as plantas non se vén limitadas a reproducírense por medio da reprodución sexual. A propagación vexetativa é unha forma de reprodución asexual común nos vexetais, principalmente especies suculentas e herbáceas, que permite a obtención de individuos coa mesma carga xenética que a planta nai (Liu *et al.*, 2014b; Souza-Alonso e González, 2017). O ser humano puído replicar esta práctica natural e estendela a outras especies, incluso forestais. O uso deste tipo de reprodución diminúe a variabilidade asociada ao uso de sementes e permite a obtención de plantas produtivas nun menor espazo de tempo.

As técnicas de reprodución por propagación vexetativa son coñecidas desde a antigüidade. Entre elas as que tiveron especial presenza son a estacaxe, o empozado e o enxerto.

A estacaxe consiste na propagación de plantas xa formadas por medio da plantación de esgallos. Para a realización deste tipo de reprodución sepárase un esgallo con gomos e plántase en substrato para favorece-la formación de raíces (Abdullah *et al.*, 2006). Existen diversas especies leñosas nas que a estacaxe é unha forma habitual de propagación como o salgueiro (Grace, 1945), a oliveira (Denaxa *et al.*, 2020), a roseira (Ghazijahani *et al.*, 2018) ou a viña (Waite *et al.*, 2015). Porén, non tódalas especies teñen boas taxas de propagación polo que é usual o uso de reguladores de crecemento para mellora-la eficacia deste método (Sriskandarajah *et al.*, 1982). Amais da especie hai factores como a idade da planta nai ou a topófise, concepto que se refire á influencia da localización na planta na que se recolecta o material vexetal, que repercuten na capacidade de enraizamento e propagación dos esgallos (Amri *et al.*, 2010).

O empozado ou porbaixa é un tipo de propagación similar á estacaxe. Neste proceso as raíces fórmanse nas pólas aínda unidas á planta nai (Kozlowski, 2002). A diferenza fundamental entre estas dúas formas de reprodución é que na estacaxe o esgallo é separado da planta para ser enraizado e plantado mentres que no empozado as raíces son formadas *a priori* na planta e é despois cando se separa o esgallo para a plantación. Esta é unha forma habitual de reprodución en diversas especies leñosas (Li *et al.*, 2013) e pode supoñer unha vantaxe ao permitir unha maior e máis rápida capacidade de colonización (Vacek *et al.*, 2020). Este método de propagación vexetativa tamén é unha práctica silvícola que pode realizarse nunha póla aérea (Kathiresan e Ravikumar, 1995) ou soterrando a póla no solo para o seu enraizamento (Vacek *et al.*, 2012).

A enxertía é unha técnica de propagación asexual na que dúas plantas vivas, o enxerto e mailo patrón, se unen para continua-lo seu crecemento como un único organismo. Son múltiples as vantaxes da propagación por enxertos. Entre elas destacan a resistencia a pragas, o aumento da tolerancia ao estrés abiótico (Wang *et al.*, 2017a) ou a propagación de plantas en solos con requirimentos nutricionais diferentes aos da planta enxertada (Lazare *et al.*, 2020). Os enxertos tamén teñen a capacidade para anovar árbores vellas (Pliego-Alfaro e Murashige, 1987) e acelera-lo ciclo da planta enxertada para que acaden máis rapidamente a súa madureza (Zhou *et al.*, 2020). Este método de propagación tamén se emprega para obter plantas ananas, o que permite mante-la produción en extensións de terreo pequenas, o que é útil sobre todo en cultivos de árbores froiteiras que requiren moito espazo (Gjamovski e Kiprijanovski, 2011; Hayat *et al.*, 2022). Ademais, moitas variedades híbridas obtidas mediante o uso de outras técnicas son estériles e o enxerto é unha das principais vías para a súa reprodución (Zhang *et al.*, 2022). Con todo, a propagación por enxertía é unha técnica que conta con limitacións operacionais xa que é un proceso lento, traballoso e caro. Amais tamén presenta limitacións biolóxicas xa que precisa que se dea compatibilidade entre o enxerto e o patrón e pode causar trastornos fisiolóxicos nas plantas cando esta compatibilidade non existe (Rasool *et al.*, 2020).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Estas técnicas de clonación clásicas levábanse a cabo no campo, cunha capacidade moi reducida no control das condicións ambientais, nutricionais e reprodutivas e cuns longos ciclos de produción. A micropropagación é a evolución biotecnolóxica destas antigas técnicas de clonación, que permite un maior control en tódolos aspectos do ciclo e, polo tanto, abre camiño a novas investigacións e a novas formas de produción. As principais técnicas de micropropagación son a proliferación mediante xemas axilares, a formación de rebentos adventicios ou a embrioxénese somática (Dobránszki e Teixeira da Silva, 2010).

1.4 MICROPROPAGACIÓN MEDIANTE PROLIFERACIÓN DE XEMAS AXILARES

A micropropagación mediante proliferación de xemas axilares é unha técnica de cultivo *in vitro* de tecidos vexetais que consiste no cultivo de clons vexetais en medio sintético baixo condicións estériles. Esta técnica caracterízase por realizarse con micro-rebentos, dentro do laboratorio, cun cultivo axénico, nun ambiente estéril e libre dos patóxenos vexetais (fungos, bacterias, virus, insectos e nematodos) e coas condicións ambientais optimizadas (tanto as condicións físicas como as condicións nutricionais).

O alicerce desta técnica é a idea da totipotencia vexetal. Descrita por Haberland en 1902 este concepto enuncia que tódalas células vexetais conservan a información xenética necesaria para reproduciren unha planta enteira e funcional sempre que sexan cultivadas no medio de cultivo apropiado (Haberlandt, 1902). Tras décadas de avances no cultivo de células deuse un salto cualitativo en 1939 cando, grazas ao uso de auxinas, se consigue o cultivo indefinido de tecidos de *Daucus carota* (Gautheret, 1939; Nobécourt, 1939). Co paso do tempo e o descubrimento de máis reguladores do crecemento vexetal aumenta a capacidade técnica do cultivo *in vitro* até que en 1958 Steward e Reinert conseguen, por separado, cultivar células somáticas en medio estéril e obter embrións somáticos capaces de rexenerar plantas funcionais (Reinert, 1958; Steward *et al.*, 1958). Tamén se dan pasos cara adiante na consecución de material estéril; Limasset e Cornuet suxeriron que o alto contido de auxinas dos meristemas apicais poden previ-la infección de virus (Limasset e Cornuet, 1949) e, en 1952, Morel e Martin conseguiron obter plantas de dalia libres de virus mediante o cultivo de meristemas (Morel e Martin, 1952). Esta técnica foi refinada por Quak (1957) quen, tras aplicar un tratamento térmico, puido propagar meristemas de caravel máis grandes, con primordios foliares, e mante-la esterilidade á vez que aumentaba o éxito da propagación (Quak, 1957)**.** En 1962 descríbese o primeiro medio mineral para cultivar calos de tabaco mais que servirá como medio xeral de multiplicación e facilitará a práctica do cultivo *in vitro* (Murashige e Skoog, 1962). Co paso do tempo e a mellora desta técnica, a micropropagación converteuse nun piar indispensábel do desenvolvemento da biotecnoloxía vexetal e foi chave para as aplicacións máis recentes como a obtención de organismos modificados xeneticamente.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Desta forma, a micropropagación representa a continuación biotecnolóxica das antigas técnicas de propagación vexetativa. A gran diferenza entre estas técnicas é que a micropropagación traballa en condicións de esterilidade e cun control moito máis estrito das condicións ambientais do cultivo que a propagación vexetativa clásica. Isto permite optimiza-los procesos, aumenta-la capacidade de propagación e mellora-lo rendemento (Amoo *et al.*, 2011).

1.4.1 Condicións da micropropagación

O control das condicións de propagación inclúe tanto o medio físico como o medio nutricional ou medio de cultivo. Factores físicos coma o O_2 ou o CO_2, regulados pola ventilación (ou a falta dela) afectan ao desenvolvemento. Así, os cultivos de castiñeiro en recipientes con aireación axudan a controla-la perda de auga e a aumenta-la capacidade fotosintética dos explantes (Sáez *et al.*, 2012). Tamén a calidade e cantidade de luz afecta ao desenvolvemento das plantas durante o crecemento *in vitro* (Batista *et al.*, 2018) en especies como pistacho (Abdouli *et al.*, 2023) ou castiñeiro (Sáez *et al.*, 2012), mellora a multiplicación en *Camellia oleifera* (He *et al.*, 2020) e eucaliptos híbridos (Santana Costa Souza *et al.*, 2022). Os factores físicos regulan diversos procesos, entre eles a evaporación, a respiración, o nivel de fotosíntese e o crecemento. Dada a súa importancia, estes factores son controlados nas cámaras de crecemento para asegurar un correcto desenvolvemento das plantas grazas á regulación da temperatura, a intensidade da luz, e os ciclos de luz e escuridade para maximiza-lo crecemento e a produción segundo a especie e o proceso.

Ademais do medio físico tamén é necesaria unha escolla axeitada dos medios de cultivo nos que a planta se vai desenvolver. A composición mineral dos medios de cultivo, é dicir, a composición de macro e micronutrientes, é crítica xa que diferenzas nas concentracións de minerais como o silicio (Sivanesan e Park, 2014), o calcio ou o boro (Al-Mayahi, 2020) producen variación nas respostas no desenvolvemento. Polo tanto, é necesario deseñar correctamente os medios minerais (Nezami-Alanagh *et al.*, 2019) para asegurar unha morfoxénese óptima e para reduci-los trastornos fisiolóxicos no desenvolvemento dos rebentos *in vitro* en diferentes especies como a pereira (Reed *et al.*, 2013) ou nogueira (Bosela e Michler, 2008). Para axilizar este proceso existen diversos medios de cultivo xerais como o MS (Murashige e Skoog, 1962), DKW (Driver e Kuniyuki, 1984), GD (Gresshoff e Doy, 1972) ou WPM (Lloyd e McCown, 1980), que son válidos para multitude de especies ou que poden servir como punto de partida para a súa optimización. No cultivo *in vitro*, a inhibición da enzima RuBisCO (de la Viña *et al.*, 1999) provocan que as plantas se comporten de xeito heterótrofo. É por iso que neste tipo de cultivo cómpre engadir unha fonte de carbono para nutrir á planta. Esta engádese no medio de cultivo mediante un azucre, usualmente sacarosa que, durante o proceso de esterilización no autoclave, se divide en glicosa e frutosa, que son menos eficientes á hora de prover de enerxía á planta. Por iso a modificación de factores como a luz ou o contido en sacarosa no medio son importantes para aumenta-la taxa fotosintética de especies como o castiñeiro (Sáez *et al.*, 2016).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Un factor específico que se emprega nos medios para cultivo *in vitro* é o axente xelificante que permite o cultivo das plantas en medio semi-sólido. Estes medios axudan a minimiza-la mobilidade de axentes contaminantes, provén dun soporte físico para a planta, e permiten, pola súa transparencia, a observación e avaliación do desenvolvemento dos tecidos. Tanto a concentración como a substancia que se van usar como axente xelificante teñen de ser escollidos con atención xa que poden ter efectos no desenvolvemento posterior da planta (Podwyszynska e Olszewski, 1995; Lebedev *et al.*, 2018; Bayraktar *et al.*, 2020). Até agora, o axente xelificante máis empregado é o agar debido á súa consistencia, contido mínimo en minerais e a súa transparencia. Porén, o seu elevado prezo está a facer que se exploren outras alternativas ao agar que, sen modifica-lo desenvolvemento xeral das plantas, permitan abarata-los custos da micropropagación para permiti-la súa explotación a escala comercial (Deb e Pongener, 2022). Neste senso tamén se están a investigar alternativas para o cultivo en medio líquido en biorreactores (Vidal e Sánchez, 2019).

Para asegurar un correcto desenvolvemento das plantas os medios de cultivo tamén poden incorporar diversos reguladores do crecemento, entre os que destacan a presenza das citoquininas, as auxinas e as xiberelinas.

A actividade do meristema apical, necesaria para o crecemento do rebento está directamente controlado pola acción das citoquininas (Sakakibara, 2021). Así, estas impulsan o crecemento en especies leñosas como a bananeira (Siamak *et al.*, 2010) ou a figueira (Ling *et al.*, 2018). As auxinas son os reguladores de crecemento utilizados para a indución de raíces en diversas especies forestais (Gonçalves *et al.*, 2008; Nakhooda *et al.*, 2011). A utilidade das auxinas vai moito máis alá da formación de raíces; tamén manteñen a dominancia apical dos rebentos mediante a inhibición do crecemento dos rebentos secundarios (Koike *et al.*, 2020) e mediante o control da biosíntese de citoquininas (Nordström *et al.*, 2004) e poden axudar a indución de rebentos durante a fase de proliferación (Martin, 2003). Outro regulador do crecemento que se emprega de xeito habitual, aínda que menos adoito cós outros dous, son as xiberelinas. Durante a micropropagación, a adición de xiberelinas no medio de cultivo pode ser útil para promove-la formación de meristemas florais en oliveira (Chaari-Rkhis *et al.*, 2006) así como para conseguir unha maior elongación dos rebentos durante a fase de multiplicación do carballo rubio (Vengadesan e Pijut, 2009) ou da vide (Khan *et al.*, 2015).

1.4.2 Fases da micropropagación por xemas axilares

A multiplicación por xemas axilares utilízase tamén na industria forestal para multiplicar en masa clons de individuos seleccionados en función dalgunha característica destacábel ou sobresaínte, os denominados xenotipos *plus*. Desta forma, a micropropagación consiste nun ciclo que comeza no campo ca selección do material vexetal que se vai estabelecer *in vitro*, a súa propagación masiva en medio de cultivo ata obte-lo número desexado de exemplares do clon seleccionado e, por último, a aclimatación dos exemplares propagados para que sexan capaces de crecer de novo en condicións *ex vitro*.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A micropropagación por xemas axilares pode dividirse nas seguintes fases:

a) Selección das plantas para propagar: O primeiro paso da micropropagación é escolle-lo material vexetal que se quere multiplicar. Este material adoita escollerse debido á presenza de determinadas características fenotípicas como poden se-la produción de biomasa (Han *et al.*, 2020a), a produción de froito (Yazdanpour *et al.*, 2018), a resistencia a doenzas ou a condicións climáticas extremas etc.
b) Estabelecemento *in vitro*: Trala selección da planta nai cómpre recolle-lo material vexetal para a súa instalación en condicións de asepsia *in vitro*. Este é procesado de diversas maneiras dependendo do material (incubación en frío das xemas en repouso, instalación directa na cámara de crecemento para que agromen as xemas axilares dormentes etc.). Unha vez obtido-los rebentos producidos nas xemas axilares estes poden ser utilizados para o estabelecemento *in vitro*.
   Durante a fase de estabelecemento é necesario levar a cabo procedementos de esterilización superficial do material para evita-la contaminación dos explantes por fungos ou bacterias (Wen *et al.*, 2020), xa que pode levar á morte das plantas e imposibilita-lo seu estabelecemento *in vitro*. Existen tamén, sobre todo en especies leñosas, contaminantes endóxenos polo que a desinfección superficial que se leva a cabo durante o proceso de estabelecemento non é suficiente para acadar unha desinfección real do material. Nestes casos é necesario empregar técnicas de saneamento como a termoterapia ou o cultivo de meristemas.
   O outro paso limitador no estabelecemento de especies leñosas é a liberación ao medio de cultivo de substancias castaño-arroxadas compostas principalmente por fenois oxidados (Permadi *et al.*, 2023). As plantas con crecemento activo teñen grandes cantidades de fenois que son liberados ao medio tralo corte do material e aí son oxidados polo oxíxeno e pola acción de polifenol oxidases e peroxidases activadas polo corte. Estes compostos poden chegar a causa-la morte do material polo que é necesario evita-la súa presenza no medio de cultivo. Para isto hai diversos procedementos como o cultivo en escuridade (Krishna *et al.*, 2008), o cambio repetido a novo medio de cultivo fresco (Singh e Patel, 2016), a adición no medio de poliaminas (Tang *et al.*, 2004), carbón activo (Thomas, 2008), ou axentes antioxidantes como o ácido cítrico ou ácido ascórbico (Wu e du Toit, 2004).
c) Proliferación de rebentos: O obxectivo desta fase nos procesos de micropropagación é obte-la maior cantidade de rebentos e a súa elongación para poder iniciar un novo ciclo de multiplicación con máis material vexetal có que había á fin do anterior ciclo. Esta é a única fase do proceso de micropropagación na que hai unha ganancia neta de individuos e na que se está a realizar un proceso de multiplicación do material. Durante esta fase prodúcese un aumento exponencial no número de individuos coa reactivación das xemas axilares; polo que é necesario optimiza-la para obter taxas de multiplicación óptimas. Na mellora das taxas de multiplicación inflúen unha miríade de factores, como a luz (Li *et al.*, 2019), a composición do medio mineral (Nezami-Alanagh *et al.*, 2018), o recipiente no que se cultivan as plantas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(McClelland e Smith, 1990) ou o propio xenotipo que se pretende propagar (Gomes *et al.*, 2010).

Un dos factores chave na fase de multiplicación é o axuste dos reguladores de crecemento nos medios de cultivo. A presenza de citoquininas, usualmente a 6-benciladenina (BA), no medio de cultivo permite aumenta-lo número de xemas, rebentos e follas (Pasa *et al.*, 2012)**.** Se ben é certo que a presenza doutros reguladores do crecemento é menos común si que poden ser precisos para mellora-lo desenvolvemento das plantas.

Durante a fase de multiplicación os grandes problemas presentes son a necrose apical e maila hiperhidricidade dos rebentos. A necrose apical sucede cando o ápice dunha planta se torna marrón e acaba por morrer. Esta comeza no ápice e vai avanzando de forma basipétala, pode chegar a causa-la morte da planta. A diminución da necrose apical é chave para asegurar taxas de multiplicación adecuadas mais as causas deste problema son múltiples. Algúns estudos demostraron que se podía reverter en marmeleiro ao aumenta-lo calcio (Kovalchuk *et al.*, 2017) mentres que en pistacho pode estar causada por unha deficiencia de boro (Abousalim e Mantell, 1994).

Outra causa da necrose do ápice parece estar relacionada coas citoquininas. A ausencia de BA no medio incrementa a necrose apical en pistacho (Nezami-Alanagh *et al.*, 2019) e maceira (Kataeva *et al.*, 1991). Non obstante, este efecto depende da especie xa que na pereira (Thakur e Kanwar, 2011) ou no hibisco parece darse a relación inversa entre BA e necrose apical (Compton e Preece, 1988). A necrose apical tamén parece estar influenciada pola presenza de auxinas no medio de cultivo, que promoven a necrose apical na pereira (Thakur e Kanwar, 2011), abeleira (Perez *et al.*, 1985) ou salgueiro (Amo-Marco e Lledo, 1996).

A hiperhidricidade implica cambios a nivel citolóxico, bioquímico, funcional e morfolóxico. O funcionamento deficiente dos estomas produce alteracións na súa función e no equilibrio hídrico; a acumulación de auga nos tecidos leva á hipoxia e incrementa a produción de especies reactivas de oxíxeno (ROS) que producen danos máis graves nas estruturas celulares. Isto é o que recoñecemos *de visu* como síntomas da hiperhidricidade. Os rebentos hiperhídricos caracterízanse por talos engrosados, entrenós curtos, e follas translúcidas, alongadas e retorcidas. A composición do medio de cultivo é un factor moi relevante á hora de controla-la hiperhidricidade. Unha alta concentración de nitratos aumenta a hiperhidricidade dos rebentos durante a micropropagación de especies como *Amelíancher arborea* (Brand, 1993) e salgueiro chorón (Daguin e Letouze, 1986). Pola outra banda, baixas doses de potasio producen unha maior taxa de rebentos hiperhídricos en maceira (Pasqualetto *et al.*, 1988) mentres que o aumento da concentración de calcio no medio mineral reduce a hiperhidricidade en cultivos de marmeleiro (Singha *et al.*, 1990). Mais non só a composición mineral do medio de cultivo é relevante para o control da hiperhidricidade. Os reguladores do crecemento presentes no medio tamén poden influír no desenvolvemento desta sintomatoloxía. A presenza de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

citoquininas, usadas normalmente para combate-la necrose apical, pode agrava-la hiperhidricidade en diversas especies leñosas (San José *et al.*, 2021). Outra hormona que parece estar relacionada coa aparición da hiperhidricidade é o etileno. En análises de patróns de metilación observouse que había unha maior desmetilación, e polo tanto activación, nos promotores de xenes relacionados coa síntese de etileno (Gao *et al.*, 2022). Así, o uso de compostos que interfiren coa acción do etileno como o nitrato de prata reducen os síntomas de hiperhidricidade en cambroeira (Li *et al.*, 2022) ou maceira (Lee *et al.*, 2023). O efecto do etileno na hiperhidricidade tamén explica a redución deste problema cando os cultivos se expoñen a unha maior ventilación (Palhares Neto *et al.*, 2018), o que reduce a concentración de etileno na atmosfera de cultivo. Outros elementos como o axente xelificante teñen tamén implicacións no desenvolvemento da hiperhidricidade como se demostra coa diminución dos síntomas en albaricoqueiro ante o aumento das concentracións de agar (Pérez-Tornero *et al.*, 2001). Mais tamén o tipo de axente xelificante afecta ao desenvolvemento dos rebentos (Bayraktar *et al.*, 2020). As plantas multiplicadas en medio xelificado con gelrite tenden a seren máis hiperhídricas en especies como *Prunus avium* (Franck *et al.*, 2004) ou maceira (Tabart *et al.*, 2015). Unha vía pola que o tipo de axente xelificante pode afectar á hiperhidricidade é mediante a síntese de citoquininas. Estudos realizados en rebentos que medran en medios xelificados con gelrite amosan unha meirande concentración de citoquininas endóxenas (Ivanova *et al.*, 2006).

d) Enraizamento: Trala produción do número desexado de explantes co tamaño axeitado é necesario que estes enraícen para poderen ser trasladadas fóra do laboratorio. Neste proceso, as raíces fórmanse sobre tecidos nos que normalmente non se desenvolvería un sistema radicular, isto denomínase enraizamento adventicio. Esta clase de raíces xorden como resposta a diferentes tipos de estrés (Steffens e Rasmussen, 2016), factores ambientais (Hansen, 1989; Iacona e Muleo, 2010) ou ante o efecto de diversos reguladores do crecemento vexetal entre os que destacan as auxinas (Kumar *et al.*, 2022). Este é un complexo proceso fisiolóxico polo que é imprescindíbel elaborar protocolos adecuados para o desenvolvemento dun sistema radicular funcional que permita a aclimatación das plantas producidas durante a propagación *in vitro*. Nesta fase tamén é importante tentar controla-la necrose apical. En especies de árbores como o carballo ou o castiñeiro a adición de citoquininas axuda a reduci-la necrose (Vieitez *et al.*, 1989).

e) Aclimatación: Debido ás condicións ambientais controladas durante o cultivo *in vitro* as plantas micropropagadas non son quen de manter unha actividade fotosintética axeitada, carecen de ceras cuticulares adecuadas e teñen unha baixa funcionalidade estomatal (Ďurkovič *et al.*, 2009). Por iso, tralo enraizamento dos explantes, estes teñen de pasar por un proceso de aclimatación que permita obter plantas capaces de sobrevivir no campo baixo condicións naturais (Trasar-Cepeda *et al.*, 2022). Unha transferencia directa das plantas ao exterior baixo a luz solar causa fotoinhibición en explantes de castiñeiro (Sáez *et al.*, 2013). Así, o tipo e a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

calidade da luz inflúen na capacidade de aclimatación posterior das plantas (Iacona e Muleo, 2010). O retraso no desenvolvemento das cutículas e a alta humidade constante no medio de desenvolvemento producen grandes perdas de auga na transferencia ao medio natural, polo que unha exposición diaria e gradual a baixas humidades relativas aumenta a taxa de supervivencia (Marin, 2003). O tratamento con ácido abscísico, un regulador do crecemento caracterizado por regula-lo peche dos estomas, tamén axuda a controla-la perda de auga dos rebentos e mellora a aclimatación en especies como *Aronia arbutifolia* L. (Colón-Guasp *et al.*, 1996). Outras substancias como o ácido ascórbico demostraron ser útiles á hora de mellora-las taxas de supervivencia durante a aclimatación de cerdeira (Vasar, 2003). Amais dos factores físicos, a esterilidade na que se desenvolven as plantas durante a micropropagación tamén ten efectos na aclimatación. A exposición repentina á comunidade microbiana presente no solo poden reduci-la taxa de supervivencia das plantas propagadas mentres que a colonización das plantas micropropagadas por rizobacterias e endófitos permiten aumenta-las taxas de aclimatación e supervivencia *ex vitro* en especies como pereira (Lotfi *et al.*, 2019), vide (Essalimi *et al.*, 2022) ou bananeira malaia (Suada *et al.*, 2015).

1.4.3 Vantaxes da micropropagación

Cando se acadan tódolos pasos do ciclo de micropropagación conséguese replicar plantas xeneticamente iguais á planta doadora. O deseño de protocolos eficaces de micropropagación é beneficioso a diferentes niveis. Existen diversas especies de alto valor económico actual ou potencial; desenvolver protocolos de micropropagación para estas especies permite clonar exemplares altamente produtivos de xeito rápido e eficaz. Así, xa existen protocolos que permiten propagar especies de alto interese económico como a alfarrobeira (Osório *et al.*, 2012), a pereira (Regni *et al.*, 2023), a figueira (Sriskanda *et al.*, 2021), a xoxoba (Singh e Agarwal, 2016) ou ameixa (Aloufa *et al.*, 2003), entre outros. Mais as técnicas de micropropagación non son soamente útiles para especies dedicadas á explotación agrícola ou forestal. O estabelecemento *in vitro* permite crear bancos de xermoplasma *ex situ* e axuda así á conservación e á preservación da biodiversidade. Desta forma pódense protexe-los recursos xenéticos dos exemplares catalogados como *plus* que conforman árbores monumentais concretas (Khamushi *et al.*, 2019) ou pódense protexer especies endémicas, máis vulnerábeis ante a perda de hábitat debido ao seu rango de distribución local (Gaidamashvili e Benelli, 2021). A propagación en masa de exemplares de especies ameazadas mais con alto valor económico, como o caso das orquídeas (Pant, 2013) permite manter e mesmo expandi-la produción e á vez reduci-la presión sobre as súas poboacións naturais. Deste xeito asegúrase a explotación dun cultivo rendíbel ao tempo que se conserva a especie no medio natural. Ademais, o aumento de protocolos de propagación axeitados para un número maior de especies e xenotipos permite que exemplares destas especies estean sempre dispoñíbeis para levar a cabo plans de renaturalización. A nivel forestal, o aumento da diversidade de especies propagadas permite deseñar programas de reforestación máis diversificados, contar con especies autóctonas

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ou de interese e con diferentes especies, aumenta-la biodiversidade e evita-la reforestación con especies substitutas pola falta de exemplares (Kodym *et al.*, 2014). As técnicas de micropropagación, ao seren combinadas con procesos de mellora e cruzamento clásicos teñen un gran potencial na restauración ecolóxica de especies, como xa se demostrou no caso do castiñeiro americano (Nelson, 2022).

As plantas producidas mediante cultivo *in vitro* poden ser saneadas para elimina-la presenza de virus. A principal técnica de eliminación *in vitro* dos virus dos explantes é o cultivo dos meristemas apicais xa que os virus non se distribúen uniformemente polas plantas e as zonas meristemáticas teñen menor carga viral (Kokane *et al.*, 2021). Os tratamentos con termoterapia inhiben a replicación vírica e reducen o movemento dos virus. Isto permite aumenta-la área libre de virus da planta e mellora-la eficiencia do cultivo de meristemas (Tan *et al.*, 2010).. A combinación de termoterapia con crioterapia está a demostrar ser un método que mellora a eficiencia do saneamento (Wang *et al.*, 2022a). Outra estratexia empregada para asegura-la esterilidade das plantas é a utilización de substancias con actividade quimioterápica (Kudělková *et al.*, 2017) a pesar de que pode causar toxicidade.

Os metabolitos secundarios son substancias sintetizadas polas plantas para diversas funcións diversas mais que poden ter aplicacións importantes para o ser humano tanto a nivel médico, como a nivel cosmético, agrícola ou industrial. A biotecnoloxía vexetal pode utiliza-las plantas como bio-fábricas destas substancias mediante o cultivo de calos, unha masa de células vexetais non diferenciadas (Bemani *et al.*, 2013; Hazrati *et al.*, 2022) ou por medio da infección con *Agrobacterium rhizogenes* para á produción das chamadas *hairy roots*, raíces finas e alongadas inducidas sen presencia de auxinas. Estas son moi estábeis desde o punto de vista fenotípico, mais tamén desde o punto de vista xenético ou bioquímico (Hussain *et al.*, 2022). Para a produción destas substancias a grande escala é necesaria a utilización de bioreactores, sistemas estériles co medio controlado e condicións físico-químicas homoxéneas (Mamun *et al.*, 2015). A modificación dos factores ambientais pode influír nas rutas de síntese de metabolitos na planta (Yang *et al.*, 2018). Entre estas condicións pódense incluí-los elicitores, substancias abióticas ou bióticas (Thakur *et al.*, 2019) que activan ou potencian a biosíntese dun composto específico nas plantas cultivadas. Amais hoxe en día é posíbel a transformación xenética dos cultivos para que sinteticen substancias concretas, sobre todo desde a aparición da tecnoloxía CRISPR/Cas9 (Bhagwat *et al.*, 2022).

Polo tanto o cutlivo *in vitro* ten múltiples aplicacións para as industrias alimentaria, cosmética ou farmacéutica (Hasnain *et al.*, 2022). A maiores das potencialidades puramente produtivas o cultivo *in vitro* de tecidos vexetais ten grande importancia a nivel científico. Ao ter plantas xeneticamente idénticas en ambientes controlados pódense modificar unicamente as variábeis escollidas, o que fai deste sistema un modelo ideal para levar a cabo estudos (Gómez-Martínez *et al.*, 2019), polo que son un piar actual da ciencia agroforestal e da mellora de organismos vexetais. O uso destas técnicas ábrese paso en cada vez máis disciplinas como sistema de experimentación pola súa rapidez e pola uniformidade do material. Estudos diversos como efecto de diferentes substancias sobre a fisioloxía das plantas (Ada e Enrico, 2020), a

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

análise de substancias alelopáticas que permiten seleccionar plantas resistentes a bioherbicidas (Aryakia *et al.*, 2015), a selección *in vitro* de xenotipos resistentes a fontes de estrés (Wijerathna-Yapa e Hiti-Bandaralage, 2023), a dilucidación do papel que teñen as plantas nos procesos de fitorremediación (Doran, 2009) ou a descrición de normas de reacción (Bandau *et al.*, 2015; Kenta *et al.*, 2016), fanse *in vitro* porque este sistema permite obte-los resultados moito máis rapidamente e de forma máis precisa cós obtidos no campo.

1.4.4 Limitacións da micropropagación

O cultivo *in vitro* conta cunha serie de limitacións. A principal dificultade que ten a súa implantación, especialmente a nivel comercial e nos países en desenvolvemento é o custo. A micropropagación precisa dun elevado investimento en infraestruturas, sobre todo na electricidade, na forza de traballo e nos elementos de equipo necesarios (Hempel *et al.*, 1986; Chen, 2016). Os clons que se estabelecen no laboratorio tamén poden ser un factor limitador para aplicar estas técnicas. A escolla do xenotipo é chave nos procesos de cultivo *in vitro* xa que este inflúe na resposta á micropropagación da planta tanto coma as propias técnicas empregadas (Gomes *et al.*, 2010). En moitas ocasións o clon que se estabelece para micropropagar é unha árbore con algunha característica de interese. Así a todo, a escolla do exemplar tamén ten un punto azaroso xa que non é posíbel saber se a árbore escollida ten un xenotipo mellor ou simplemente tivo un desenvolvemento máis favorábel cás árbores da contorna. A pesar deste azar, a selección de xenotipos *plus* pode mellorar grazas ao coñecemento das normas de reacción e á selección guiada por marcadores (Martins *et al.*, 2022). Unha vez estabelecidas *in vitro* as plantas teñen de evita-la variación somaclonal, a variación xenética producida durante a práctica de cultivo de tecidos que poden altera-la estabilidade xenética dos clons (Ranghoo-Sanmukhiya, 2021). Con todo, a variación somaclonal pode ser útil para a produción de novas variedades que potencien certas características desexadas (Ferreira *et al.*, 2023), polo que é necesario facer unha elección entre as vantaxes e as desvantaxes da variación somaclonal á hora de decidir se inducila ou controlala (Duta-Cornescu *et al.*, 2023). Tamén é moi complicado predicir cal será o fenotipo resultante das plantas multiplicadas no laboratorio unha vez retornen a condicións *ex vitro* a pesar de que ultimamente, grazas aos avances na computación e o desenvolvemento do *machine learning*, a capacidade de predición de fenotipos en función dos xenotipos é moito máis precisa (Guo e Li, 2023; Sehrawat *et al.*, 2023). Non obstante, a falta de control do ambiente no que se desenvolven as plantas no campo, a súa variación no contexto da mudanza climática e tamén o propio proceso de construción de nicho dos organismos (Laland *et al.*, 2016) poden entorpecer esta capacidade de predición, Ademais, por moito que mellore esta capacidade hai que ter en conta que a variabilidade nunca se vai poder eliminar a pesar de contar con un xenotipo nun ambiente controlado debido ao ruído de desenvolvemento (Kiskowski *et al.*, 2019).

Outra limitación que existe durante a micropropagación é a recalcitrancia (Abdalla *et al.*, 2022). Se o cerne das técnicas de propagación *in vitro* é a totipotencia das células vexetais a recalcitrancia é o seu contrario. Polo tanto, pódese definir como a incapacidade das plantas para

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

responderen ás técnicas de cultivo *in vitro*, en calquera etapa da micropropagación por causas máis ou menos coñecidas (Benson, 2000). Esta depende de moitos factores tales como a especie, o xenotipo, os estados epixenético ou ontoxenético da planta doadora etc. Así e todo, non pode considerarse unha característica esencial e irreversíbel do material senón que hai que entendela máis como un estado mutábel. Isto quere dicir que é posíbel crear protocolos que permitan supera-la recalcitrancia e conseguir rexenerar por completo os clons. Polo tanto, pode ser superada en calquera das fases do proceso de micropropagación, na proliferación de rebentos, no enraizamento, ou na aclimatación (Patel *et al.*, 2022). Existen numerosas estratexias para reverte-lo estado recalcitrante das plantas, entre as que se atopan a optimización dos medios de cultivo. Esta optimización pode facerse axustando a composición mineral, o axente xelificante, a fonte de carbono ou engadindo os reguladores do crecemento axeitados. Tamén os factores ambientais como a luz e a temperatura poden optimizarse para evita-la recalcitrancia (Patel *et al.*, 2022). É por isto que para conseguir superar este estado é necesario coñecer cales son os mecanismos que operan en cada etapa da micropropagación.

Un dos principais factores que intervén na recalcitrancia é o estado ontoxenético da planta doadora. Deste xeito, cando un individuo pasa de estado xuvenil a estado adulto torna en recalcitrante para diversos procesos de cultivo *in vitro* polo que as técnicas empregadas teñen de mudar en función do estado ontoxenético do material. Estes cambios prodúcense como consecuencia do denominado cambio de fase.

1.5 CAMBIO DE FASE

O cambio de fase comprende tódalas mudanzas que se producen no momento en que o material xuvenil adquire as características do material vexetal adulto pola maduración (Poethig, 2010). O cambio de fase regula e modifica os patróns de morfoxénese, o crecemento dos rebentos, a forma das follas, a capacidade de floración presente na idade adulta ou a resposta ao estrés tanto biótico como abiótico (Poethig, 2013). Estas mudanzas teñen unha importancia capital na propagación *in vitro* de especies leñosas xa que os xenotipos elite son usualmente seleccionados tralo cambio de fase, na súa etapa adulta, cando o material vexetal xa responde de forma diferente aos procesos *in vitro* (Zhang *et al.*, 2015).

A maduración asociada ao cambio de fase adoita ter un efecto negativo no enraizamento adventicio (Kumari *et al.*, 2022). Así, en especies leñosas como *Pinus taeda* (Hamann, 1998), maceira (Xiao *et al.*, 2014) ou *Eucalyptus* (Abu-Abied *et al.*, 2014; Aumond *et al.*, 2017) a capacidade de enraizamento mingua abruptamente coa idade. No castiñeiro non é diferente, cunha diminución na competencia para enraizamento en exemplares de campo durante os primeiros anos da árbore (López-Villamor *et al.*, 2017), estado que se traslada tamén aos exemplares *in vitro* onde os tecidos maduros presentan menores taxas de enraizamento adventicio (Sanchez e Vieitez, 1991). En campo, esta perda parece ocorrer xa durante os primeiros anos do desenvolvemento. Isto representa un problema xa que a falta de capacidade de enraizamento non permite avanzar ao paso de aclimatación das plantas e imposibilita completa-lo ciclo do cultivo *in vitro* orientado á produción de plántulas.

Polo tanto a micropropagación de material que retén as características xuvenís é máis efectiva para a propagación de xenotipos elite que só poden ser seleccionados durante a etapa adulta (Vieitez *et al.*, 2007). Isto é posíbel porque o cambio de fase non altera as características dos órganos pre-existentes aínda que non estean desenvolvidos, polo que as características xuvenís persisten ao longo do tempo nalgunhas partes da árbore mentres que outras zonas do mesmo individuo xa son maduras (Caso, 1992). Estas diferenzas no estado ontoxenético en función da zona da árbore é o que se coñece como cono de xuventude (Fig. 1). Os tecidos que se atopan na copa da árbore sufriron máis divisións celulares, polo que son ontoxeneticamente máis maduros aínda que sexan cronoloxicamente máis novos. De xeito complementario, os meristemas latentes formados durante a fase xuvenil, a pesar de seren cronoloxicamente máis vellos son ontoxeneticamente máis xuvenís (Li e Chang, 2022). É por tanto o número de divisións o que caracteriza o estado de madureza dos tecidos (Bonga, 1982). Todo isto forma un gradiente de madureza ao longo da árbore segundo o cal as partes basais son máis xuvenís e a maduración aumenta cara a parte alta da árbore (Greenwood e Hutchison, 1993; Bonga *et al.*, 2010). Polo tanto, material que retén características xuvenís pode ser aquel obtido de rebentos epicórmicos, rebentos de cepo, rebentos trala poda severa ou rebentos orixinados da raíz (Bonga, 1982; Wendling *et al.*, 2014). Porén non sempre hai material dispoñíbel que reteña estas características xuvenís. Por iso cómpre comprender mellor os procesos implicados no cambio de fase e tratar de desenvolver protocolos específicos para a propagación do material en función do seu estado ontoxenético (Pant e Husen, 2022).

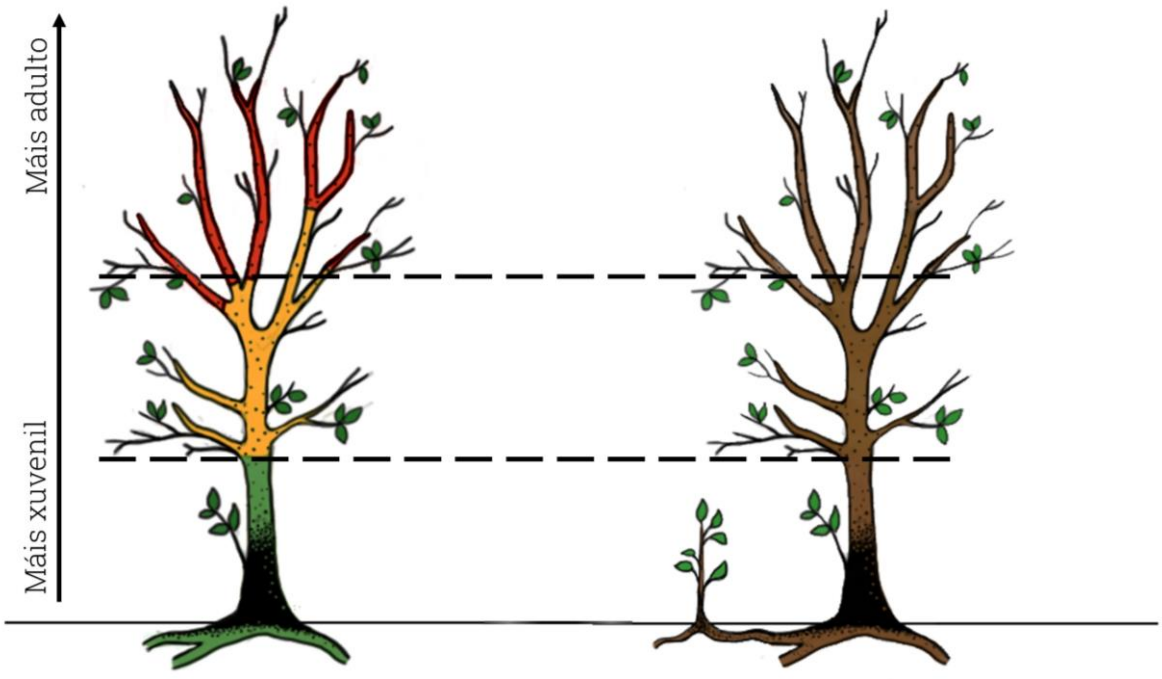


Figura 1. Representación do cono de xuvenilidade, onde as zonas baixas son máis xuvenís e son máis maduras conforme se van achegando á copa.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.5.1 Regulación do cambio de fase

A regulación do cambio de fase nas especies forestais ten un forte compoñente xenético mais tamén se ve influenciada a nivel xeral polos niveis hormonais, polo estado nutricional ou a fenoloxía (Brunner *et al.*, 2017).

1.5.1.1 Bases xenéticas do cambio de fase

Os tecidos adultos sufriron máis divisións ao longo da súa vida polo que é posíbel que houbese unha acumulación de mutacións. Por outra banda, xa que o xenotipo dun individuo é, *a priori*, inalterábel ao longo da súa historia vital o lóxico é pensar que os cambios que producen o cambio de fase teñen unha base epixenética. Efectivamente, a recalcitrancia á organoxénese *in vitro* observada en individuos adultos de especies forestais está relacionada coa metilación e acetilación das histonas (Valledor *et al.*, 2010). Cambios nas marcas epixenéticas asócianse cos cambios morfolóxicos e fisiolóxicos producidos polo cambio de fase sendo que existe unha correlación entre o grao de metilación do ADN e o estado ontoxenético do individuo (Bräutigam *et al.*, 2013). Así, un incremento no nivel do regulador epixenético H3K27me3 e unha baixada no nivel de H3K27ac leva a un descenso no microRNA156 (Picó *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2016b). Isto é chave porque a presenza de miR156 é imprescindíbel para o mantemento do carácter xuvenil dos tecidos (Xu *et al.*, 2018) e unha baixada nos niveis de miR156 promove a transición á etapa adulta. Este cambio de fase permite a acumulación dos xenes *SQUAMOSA PROTEIN LIKE* (*SPL*) que favorece o incremento dos niveis de miR172 (Trindade *et al.*, 2017). Isto é o que se coñece como ruta da idade. Deste xeito, pódese dicir que o miR156 é o miRNA asociado a xuventude mentres que o miR172 é o miRNA asociado á madureza e que ambos miRNAs presentan patróns de expresión antitéticos entre si (Wang *et al.*, 2011).

Unha alta expresión de miR156 é precisa para a indución do enraizamento adventicio mediado por auxinas (Xu *et al.*, 2017). Isto suxire que baixos niveis de expresión de miR156 se asocia co estado de recalcitrancia ao enraizamento dos tecidos adultos (Ye *et al.*, 2020), efecto confirmado pola promoción do enraizamento adventicio en liñas que sobre-expresan miR156 (Massoumi *et al.*, 2017). No entanto, esta relación pode ser menos universal do que se pensa. En especies como *Eucalyptus* non parece haber relación entre os niveis de miR156 e miR172 e a perda da capacidade de formar raíces adventicias (Levy *et al.*, 2014). Isto pode deberse a que a presenza de miR156 é necesaria mais non suficiente para posibilita-lo enraizamento adventicio (Wang *et al.*, 2023). Polo tanto, a pesar de que os miR156 e miR172 e as súas interaccións con outras rutas de sinalización parecen se-las principais vías que gobernan o proceso do cambio de fase á madureza, outros miRNAs que se están a estudar recentemente poden ser chave para ter un panorama máis completo entre a acción dos miRNA, o cambio de fase e as respostas fisiolóxicas asociadas (Krivmane *et al.*, 2023).

1.5.1.2 Hormonas e cambio de fase

O medio no que as plantas se desenvolven ten grandes implicacións na regulación do cambio de fase xa que a súa aplicación pode modifica-la expresión ou a sinalización de diferentes miRNAs, freando ou acelerando a transición á madureza. Sábese que o metabolismo dos azucres reprime a expresión dos miR156 e acelera o cambio de fase (Yu *et al.*, 2013) polo

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

que a modificación dos azucres no medio de cultivo pode ter efectos no patrón de xuvenilidade. Nos medios de cultivo adoitan engadirse hormonas para inducir certas respostas polo que comprende-los efectos das distintas hormonas sobre o cambio de fase pode axudar a manipular este proceso como estratexia para loitar contra a recalcitrancia á organoxénese *in vitro*.

A pesar de que non hai moita evidencia sobre a acción das auxinas no cambio de fase estas parecen participar no proceso mediante a promoción do miR172 (Díaz-Manzano *et al.*, 2018).

As xiberelinas son un dos reguladores do crecemento máis recoñecidos como promotores do cambio de fase (Manuela e Xu, 2020). As xiberelinas actúan a través da degradación das proteínas DELLA. Estas proteínas DELLA retrasan o cambio de fase interactuando e desactivando os efectos de PICKLE (PKL), un represor da expresión do miR156 (Yu e Wang, 2020), das proteínas SPL e da familia de factores de transcrición MADS-box (Yu *et al.*, 2012) que está relacionada co estado maduro dos tecidos (Castillo *et al.*, 2013; García-López *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2021).

O etileno é coñecido por ser un regulador do crecemento chave no proceso de avellentamento das plantas (Iqbal *et al.*, 2017). Esta hormona vexetal regula diferentes procesos do desenvolvemento vexetal asociados á maduración e ao cambio de fase (Haffner *et al.*, 1991; Schaller, 2012). De feito, a presenza desta hormona gasosa na atmosfera parece estar relacionada co cambio de fase de *Hemerocallis* (Smith *et al.*, 1989), malia que o efecto parece depender da especie (Song *et al.*, 2020).

Os brasinosteroides promoven o cambio de fase mediante a interacción do factor de transcrición BRASSINAZOLE-RESISTANT 1 (BZR1) con diversos xenes *SPL*, especialmente con *SPL9* (Wang *et al.*, 2021a). Deste xeito, os brasinosteroides conducen á estabilización dos niveis de SPL9 para promove-lo cambio de fase. De xeito complementario, mutantes cunha menor cantidade de brasinosteroides ven retrasado o seu cambio de fase (Zhou *et al.*, 2023a).

As citoquininas están relacionadas coa indución do cambio de fase. Deste xeito, as liñas mutantes con altos niveis de citoquininas sofren máis cedo a transición xuvenil-adulto (Werner *et al.*, 2021a) e a sobre-expresión do *Cytokinin Response Factor 9* (*CRF9*), un represor da acción das citoquininas, conduce a un retardo na transición da fase vexetativa á fase reprodutiva (Swinka *et al.*, 2023). A súa influencia no cambio de fase débese a un punto posterior á modulación do miR156. Isto promove a expresión de *MIR172* e coopera con *TOE1* e *TOE2* (Werner *et al.*, 2021b). Porén, neste caso esta relación é ambigua xa que as citoquininas son coñecidas por atrasaren o avellentamento dos órganos e dos tecidos (Sosnowski *et al.*, 2023).

O ácido abscísico, pola outra banda, axuda ás plantas a conserva-lo estado xuvenil. A molécula chave na ruta de sinalización de ABA, ABI3, reprime a acción dos SPL por medio da activación do miR156 (Manuela e Xu, 2020). Tres *Suc nonfermenting-1-related protein kinases* (*SnRKs*) que actúan como moléculas de sinalización do ABA (Yoshida *et al.*, 2019) activan as rutas de sinalización vencelladas ao miR156 (Feyissa *et al.*, 2021).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Os xasmonatos están tamén implicados no mantemento da fase xuvenil onde o material adulto de pereira presentaba niveis máis baixos de xasmonatos que o material xuvenil (Song *et al.*, 2020), e tamén na recuperación da capacidade de enraizamento de explantes enxertados de *Sequoia sempervivens* (Chen *et al.*, 2013). Non obstante, aínda que os xasmonatos sexan suficientes para retrasaren o cambio de fase non poden facelo de forma indefinida debido á interacción directa do dominio JA ZIM (JAZ) co SPL9 reducindo a resposta aos xasmonatos coa idade (Mao *et al.*, 2017).

1.5.2 Reversión do cambio de fase

O conxunto de procesos e tratamentos polos que se recuperan as características xuvenís do material vexetal adulto é coñecido como rexuvenecemento. Este concepto baséase en que aínda que as características relacionadas coa madureza son estábeis estas poden ser reversíbeis baixo certas condicións (Hackett, 1985). Entre os procesos máis habituais para o rexuvenecemento *in vitro* de especies leñosas están o propio proceso de micropropagación repetida (Mullins *et al.*, 1979; Brand e Lineberger, 1992), o cultivo de meristemas, os tratamentos químicos como a BA, a reversión ao estado embrionario mediante as técnicas de embrioxénese somática ou o uso de micro-enxertos (Read e Bavougian, 2012).

A embrioxénese somática permite o paso de células somáticas ao estado embrionario recuperando un estado ontoxeneticamente xuvenil (Mignon e Werbrouck, 2018) en especies como a cafeeira (Georget *et al.*, 2017) ou a aciñeira (Martínez e Corredoira, 2023). O uso de microenxertos permite rexuvenece-lo material vexetal e recupera-la capacidade de enraizamento por medio da modificación dos perfís hormonais (Liu *et al.*, 2018a), do transporte de moléculas de sinalización e miRNAs entre o enxerto e o patrón modificando a súa expresión xénica (Vidoy-Mercado *et al.*, 2021) e do perfil epixenético, chave nos procesos de rexuvenecemento (Smulders e de Klerk, 2011). Así, durante o proceso de rexuvenecemento a sinalización dos miRNA e os cambios epixenéticos aumentan os niveis de miR156 e diminúen os niveis de miR172 rexuvenecendo parcialmente os individuos (Chen *et al.*, 2013; Raihan *et al.*, 2021). A nivel epixenético o rexuvenecemento *in vitro* aumenta os niveis de metilación do ADN ao reverte-lo estado de recalcitrancia á organoxénese e recupera-la capacidade de formar raíces adventicias en especies como maceira (Wang *et al.*, 2023) ou *Eucalyptus* (Shanthi *et al.*, 2015). Isto contrasta coas diferenzas no grao de metilación que adoitan seren maiores nos tecidos adultos (Bräutigam *et al.*, 2013; Picó *et al.*, 2015).

Aínda que se levan feito moitos intentos de rexuvenecer árbores adultas (Ballester *et al.*, 1989; Diaz-Sala *et al.*, 1994; Sánchez *et al.*, 1997) a propagación de árbores derivadas de tecidos adultos aínda é unha barreira importante para o cultivo *in vitro*, xa que a recalcitrancia ao enraizamento adventicio asociada ao cambio de fase impide completa-lo ciclo de micropropagación para a produción de plantas (Vielba *et al.*, 2020).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.6 ENRAIZAMENTO ADVENTICIO

A recalcitrancia dos tecidos ao enraizamento limita a propagación vexetativa de moitas especies forestais e varía en función das especies e do xenotipo (Vielba *et al.*, 2020). No caso das especies de *Castanea*, cultivadas e hibridadas entre elas dende hai tempo, hai unha alta taxa de heterocigose e existe unha cantidade innumerábel de variedades locais con diferentes capacidades de enraizamento (Viéitez e Merkle, 2005). Estas características limitan o estabelecemento de protocolos xerais para este xénero, polo que é preciso amplia-la investigación para cada unha das especies e incluso adecua-la investigación a cada xenotipo.

O enraizamento adventicio é un proceso fisiolóxico e molecular complexo que permite producir raíces en tecidos nos que normalmente non se formarían, usualmente os talos e as follas. Este proceso prodúcese de xeito espontáneo ou en resposta á sinalización de auxinas ou a diferentes tipos de condicións de luz, nutrición ou temperatura así como diferentes tipos de estrés como o encharcado, o corte ou o estrés oxidativo (Kumar *et al.*, 2022). O enraizamento adventicio é unha estratexia que permite á planta adaptarse aos cambios no ambiente e responder a situacións de estrés recuperándose de eventos traumáticos. O desenvolvemento dun sistema radicular completo con raíces adventicias e raíces laterais é indispensábel para proveer á planta dun sistema de soporte e dunha rede de absorción de auga e nutrientes.

1.6.1 Fases do enraizamento adventicio

As células pre-procambiais actúan como un nicho de células multipotentes, pluripotentes e totipotentes que poden dar lugar a diferenciación vascular e organoxénese en función da localización celular, do plano de división celular, da interacción coas células veciñas e do balance entre auxinas e citoquininas (de Almeida *et al.*, 2012). A aplicación dos estímulos externos ou ambientais correctos pode muda-lo destino celular predeterminado grazas á plasticidade e ao potencial morfoxenético das células vexetais (Díaz-Sala, 2014). En especies de enraizamento sinxelo, como pode se-lo álamo (Bannoud e Bellini, 2021), o propio efecto do corte xa pode ser suficiente para estimula-la indución do enraizamento adventicio. Porén, outras especies con menor capacidade de formación de raíces, como case tódalas especies forestais, requiren a aplicación de auxinas exóxenas (Zhao *et al.*, 2022b) para intentar desencadea-la formación de raíces adventicias. Este proceso pode dividirse en tres fases ben conservadas en tódalas especies: indución, iniciación e extensión (Guan *et al.*, 2015), aínda que pode engadirse unha primeira fase de des-diferenciación (de Klerk *et al.*, 1999).

- Des-diferenciación: Se as células son competentes para a formación de raíces poden responder ante un factor indutor e formar raíces de forma relativamente simple (da Costa *et al.*, 2013). Así e todo, en moitas especies, normalmente en especies leñosas, as raíces adventicias teñen de iniciarse a partir de células que xa posúen algún grao de diferenciación ou células que non están predispostas ao desenvolvemento radicular. Neste caso é preciso un paso previo de des-diferenciación antes do inicio da indución radicular (Díaz-Sala, 2014). Polo tanto, a des-diferenciación, tamén denominada re-programación celular (Fehér, 2019) é un proceso polo cal as células especializadas

poden reverte-lo seu status a un estado de desenvolvemento anterior (Sugimoto *et al.*, 2011) chegando incluso a un estado de célula nai (Jiang *et al.*, 2015).

- Indución: Durante a fase de indución as células adquiren competencia para responder aos estímulos de enraizamento. Ante ese estímulo muda o patrón de expresión xénica das células para entrar nunha vía de formación de células iniciais da raíz o que conduce a importantes cambios transcricionais e bioquímicos durante as primeiras horas. O primeiro evento do proceso de enraizamento adventicio é o corte, un proceso que produce cambios hormonais que, en combinación coa actividade da maquinaria do transporte de auxinas leva a unha acumulación asimétrica desta hormona entre tecidos veciños (de Klerk *et al.*, 1999). Esta distribución asimétrica de auxinas activa a proliferación celular (Lup *et al.*, 2016). Desa forma os picos de auxina nas células activan redes de sinalización celular para modifica-lo programa xenético e induci-la formación de raíces adventicias (da Costa *et al.*, 2013). O estabelecemento de máximos de auxina localizados suxiren a existencia dun papel predominante das proteínas transportadoras de auxinas, que poden se-lo factor determinante na formación dunha nova raíz a nivel celular.
- Iniciación: O pico máximo nos niveis de auxinas endóxenos determinan a fin da fase de indución para dar paso á fase de iniciación da raíz, na que os niveis de auxinas chegan ó mínimo do proceso. Nesta fase as células activadas comezan a sufrir cambios no plano de orientación das divisións e a proliferar rapidamente e forman conxuntos de células meristemáticas que darán lugar a meristemoides (Druege *et al.*, 2016). Estas primeiras divisións adoitan comezar entre as 48 e 96 horas trala aplicación do tratamento (Guan *et al.*, 2020) aínda que poden variar coa especie e co modo de indución.
- Extensión: A derradeira fase do proceso de enraizamento adventicio é a fase da extensión (Guan *et al.*, 2015) ou expresión (de Klerk *et al.*, 1999). Durante esta última fase non é necesaria a acción de auxinas exóxenas, mais si das endóxenas que de modo local facilitan a ruptura das paredes das células veciñas. Así, esta fase caracterízase polo crecemento dos primordios radiculares xa autónomos e remata coa emerxencia das raíces, a conexión dos feixes vasculares do rebento cos das raíces e a diferenciación dos tecidos radiculares (Larskaya *et al.*, 2020).

Pódese estabelecer unha correlación entre os niveis de auxina endóxenos e as etapas do enraizamento adventicio. Deste xeito, a distribución de auxinas nos tecidos é un factor determinante na emerxencia das raíces adventicias. É por iso que en moitas especies é necesario elimina-las auxinas do medio de cultivo trala fase de iniciación do enraizamento adventicio para permitir que as raíces se poidan desenvolver (Lawson *et al.*, 2023).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.6.2 Factores ambientais implicados na formación de raíces adventicias

1.6.2.1 Luz

A luz, tanto pola súa intensidade como pola súa lonxitude de onda, afecta ao desenvolvemento dos rebentos durante a propagación *in vitro*. Amais, a luz tamén ten un efecto directo sobre as raíces (Yun *et al.*, 2023) e afecta ao seu crecemento e desenvolvemento a través de rutas de sinalización, e mesmo directamente mediante a activación do fitocromo phyB nas células da raíz (Lee *et al.*, 2016). A cascada de sinalización de phyB diminúe a concentración de transportadores de auxinas e reduce o crecemento radicular en presenza de luz vermella (van Gelderen *et al.*, 2018). Pola contra a luz azul promove o enraizamento adventicio (Zhai *et al.*, 2021). De forma indirecta, a luz promove a síntese de citoquininas (Dobisova *et al.*, 2017) que reducen o crecemento da raíz (Werner *et al.*, 2011). Por isto é común que a fase de indución do enraizamento adventicio se desenvolva en condicións de escuridade e que despois os rebentos sexan transferidos á luz para mellora-la elongación das raíces (Monteuuis e Bon, 2000). No caso dos castiñeiros, en *Castanea dentata* os rebentos tratados con AIB que se someteron a un período de escuridade tiveron un mellor enraizamento cós cultivados baixo un foto-período normal (Oakes *et al.*, 2013).

1.6.2.2 Medio mineral

As concentracións dos macro e micronutrientes dos medios de cultivo afectan ao desenvolvemento das raíces adventicias en formación. Minerais como o calcio, o zinc e a fonte de nitróxeno parecen influír no número de raíces e o fósforo, o ferro, a fonte de nitróxeno e o manganeso afectan á lonxitude das raíces (Schwambach *et al.*, 2005)**.** O calcio promove o enraizamento en álamo e ten un importante papel na elongación do primordio trala fase de indución grazas á súa participación na división celular (Bellamine *et al.*, 1998) e o uso de compostos como o $CaCl_2$ teñen efectos promotores no enraizamento adventicio (Falasca *et al.*, 2004). Ademais, actúa conxuntamente coas auxinas e o óxido nítrico para modula-lo enraizamento adventicio en cogombro (Lanteri *et al.*, 2006). Non obstante, este papel do calcio en especies leñosas aínda non está suficientemente analizado. O nitróxeno en altas concentracións inhibe o crecemento tanto da raíz primaria como das raíces secundarias. Demostrouse en diferentes especies que para o proceso de enraizamento non só é relevante a concentración de nitróxeno senón tamén a forma na que este se engade ao medio de cultivo (Woodward *et al.*, 2006). O óxido nítrico, unha molécula de sinalización, media en procesos inducidos polas auxinas, pode participar tamén na resposta das plantas a diferentes fontes de estrés (Nabi *et al.*, 2019) ou na formación de raíces adventicias (Wei *et al.*, 2019). A produción de óxido nítrico redúcese, xunto coa capacidade rizoxénica, coa maduración dos individuos (Abu-Abied *et al.*, 2012). Outros minerais teñen tamén efecto no desenvolvemento do enraizamento. Por exemplo o aluminio ten efecto inhibidor na elongación das raíces (Horst *et al.*, 2010) a través da modificación dos transportadores de auxinas (Sun *et al.*, 2010). O fósforo ten tamén incidencia na elongación das raíces así como na formación dos pelos radiculares e na densidade do sistema radicular. Porén, este efecto é altamente dependente da especie e das condicións de crecemento das plantas (Liu, 2021).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.6.2.3 Carbohidratos

A fonte de carbono é indispensábel para o desenvolvemento dos rebentos e das raíces (Hussein *et al.*, 2012). Mais non só afecta a fonte do carbono senón tamén a concentración. É necesario un aporte suficientemente elevado de carbohidratos para asegura-lo enraizamento adventicio, xa que é un proceso con alta demanda enerxética. Con todo, doses excesivamente altas suprimen a indución (Calamar e De Klerk, 2002; Takahashi *et al.*, 2003). O modo de acción da sacarosa no crecemento radicular parece se-la cooperación coas auxinas.

1.6.2.4 Hormonas

Os reguladores do crecemento vexetal, tamén chamados comunmente hormonas vexetais ou fito-hormonas, son un conxunto de compostos de diversa natureza química que inflúen nos programas de desenvolvemento das plantas en concentracións micromolares. Son os principais factores endóxenos que participan na integración de estímulos ambientais co desenvolvemento. A pesar de que os diversos reguladores do crecemento parecen dominar de forma destacada algún proceso concreto do desenvolvemento hai que ter en conta que forman entre eles complexas redes de interacción mutua, en ocasións contraditorias, polo que os cambios na concentración dun regulador afectan á síntese, transporte e vías de sinalización dos demais (Pacurar *et al.*, 2014; Castro-Camba *et al.*, 2022a). Non obstante, si que hai reguladores do crecemento vexetal que están moi presentes na regulación da formación de novas raíces adventicias. As citoquininas (Mao *et al.*, 2019) ou as xiberelinas (Castro-Camba *et al.*, 2022b) inhiben o enraizamento adventicio mentres que outros reguladores como os xasmonatos (Fattorini *et al.*, 2018) ou o ácido abscísico en bidueiro (Vaičiukynė *et al.*, 2019) parecen estimula-la formación de raíces adventicias.

1.6.2.4.1 Auxinas

As auxinas son os reguladores do crecemento vexetal máis relacionados co estabelecemento do patrón de desenvolvemento dos embrións ou durante a formación de órganos. Tamén inflúen no crecemento dos tecidos, a elongación do talo, o mantemento da dominancia apical, a resposta ante diferentes formas de estrés ou o estímulo de fenómenos como o gravitropismo ou o fototropismo (Luo *et al.*, 2018).

De entre tódolos procesos que gobernan o desenvolvemento das plantas as auxinas parecen estar especialmente implicadas no enraizamento (Druege *et al.*, 2019). O ácido indol-3-acético (AIA) é a auxina natural máis común nos tecidos da planta aínda que no laboratorio a máis empregada é o ácido indol-3-butírico (AIB). O AIB torna en bioactiva trala súa conversión en AIA nos peroxisomas (Rout, 2006; Damodaran e Strader, 2019). A aplicación de auxinas promoven a proliferación de células que forman calos indiferenciados e, en condicións óptimas, estes calos poden desenvolver primordios radiculares que inicien a formación de raíces (Yu *et al.*, 2017). O efecto da aplicación das auxinas no enraizamento depende do tipo de auxina utilizada, a concentración, o substrato, o tempo de exposición e o estado de desenvolvemento dos tecidos (Okao *et al.*, 2016; Denaxa *et al.*, 2022). Un tratamento con auxinas excesivo pode inhibi-los procesos de indución e elongación polo que estas son retiradas trala indución para permitir que as raíces se desenvolvan con normalidade (Lawson *et al.*, 2023).

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

A correcta distribución de auxinas a través da planta e a formación de gradientes son precisos para un correcto desenvolvemento (Petrášek e Friml, 2009). As auxinas son sintetizadas principalmente no meristema apical e nos órganos en desenvolvemento (Banasiak *et al.*, 2019) así como na raíz (Ljung *et al.*, 2005). Após a síntese as auxinas teñen de transportarse até as zonas da planta onde van actuar. O transporte polar de auxinas crea así máximos e mínimos locais de auxinas que modifican a expresión xénica. Ese transporte é consecuencia da actividade das proteínas de membranas encargadas de introduci-las auxinas na célula, as AUXIN-RESISTANT 1 (AUX1) e Like-AUX (LAX), e as proteínas que determinan o fluxo de saída das auxinas da célula, as proteínas PIN e as ATP-BINDING CASSETTE TYPE B / P-GLYCOPROTEIN / MULTIDRUG RESISTANT (ABCB/MDR/PGP) (Hammes *et al.*, 2022). A distribución polarizada e asimétrica dos transportadores na célula produce o transporte polar de auxinas encargado do movemento deste regulador do crecemento por toda a planta (Adamowski e Friml, 2015). Substancias como o NPA reprimen o transporte polar de auxinas inhibindo as proteínas PIN transportadoras de auxinas (Abas *et al.*, 2021). Así, a inhibición do transporte polar de auxinas polo NPA produce divisións celulares anormais durante os primeiros estadios do enraizamento adventicio (Guan *et al.*, 2020), reduce o número de raíces adventicias e atrasa a emerxencia dos primordios radiculares (Xu *et al.*, 2017). Estas consecuencias da aplicación do NPA demostran a implicación do transporte polar de auxinas no desenvolvemento radicular.

1.6.2.4.2 Xiberelinas

As xiberelinas son reguladores chave de múltiples procesos fundamentais para o correcto desenvolvemento das plantas. A pesar de que destacan de forma notábel na promoción da xerminación das sementes (Chen *et al.*, 2008) ou na elongación do talo (Wang *et al.*, 2017b) as xiberelinas tamén teñen implicacións no síndrome de evitación da sombra, na xiloxénese, no desenvolvemento das flores e dos froitos (Castro-Camba *et al.*, 2022b) ou na resposta a diferentes tipos de estrés (Castro-Camba *et al.*, 2022a). No caso das raíces, suxírese que as xiberelinas están implicadas na elongación (Rizza *et al.*, 2017) e no desenvolvemento das raíces laterais (Busov *et al.*, 2006). Polo xeral, as xiberelinas son represoras do enraizamento. Así, a aplicación exóxena de ácido xiberélico (GA_3), unha das xiberelinas bioactivas, inhibiu o enraizamento en álamo (Busov *et al.*, 2006). O mesmo ocorre coa adición do PBZ, un inhibidor da síntese xiberelinas, que incrementa a taxa de enraizamento adventicio en diferentes especies tales como oliveira (Salari *et al.*, 2017). Porén, este efecto inhibidor do enraizamento é dependente da especie. Hai estudos que amosan un aumento do enraizamento adventicio ante a aplicación de GA_3 en especies leñosas como o carballo (Eshed *et al.*, 1996).

As xiberelinas regulan o desenvolvemento vexetal a través da degradación de proteínas DELLA, factores de transcrición da familia GRAS que actúan como inhibidores do crecemento e bloquean a capacidade de unión dos factores de transcrición ao ADN (Davière e Achard, 2013). As xiberelinas únense ás proteínas receptoras Gibberellin Insensitive Dwarf (GID) para produci-la poli-ubiquitinación das proteínas DELLA, proceso que as deixa marcadas para a súa degradación polo proteosoma 26S (Xue *et al.*, 2022).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.6.2.4.3 Etileno

O etileno está implicado na resposta ao estrés e está asociado coa capacidade de resposta da planta a estímulos ambientais mediante a súa interacción co resto de rutas de sinalización. Por exemplo, interrompe a dominancia apical diminuíndo a relación auxinas:citoquininas, incrementa a biosíntese e a sensibilidade das xiberelinas ou promove a degradación do ácido abscísico (Žiauka e Kuusienė, 2010). O etileno tamén parece interactuar coas auxinas para influír no desenvolvemento da raíz primaria (Qin *et al.*, 2019). Secasí, o etileno pode ter un efecto promotor, neutro ou inhibidor do enraizamento adventicio en función da especie e da fase do proceso (Geiss *et al.*, 2009). O etileno foi descrito como un inhibidor do enraizamento adventicio en especies como pereira (Park *et al.*, 2017) ou maceira (Ma *et al.*, 1998). Por outra banda, hai especies leñosas como *Pinus thubergii* (Mori *et al.*, 2011) ou laranxeira (Mendes *et al.*, 2011) nas que o etileno estimula a formación de raíces adventicias. O etileno tamén inhibe o crecemento da raíz regulando a ruta de sinalización de auxinas (Cederholm *et al.*, 2012).

1.6.2.4.4 Citoquininas

Durante o proceso de enraizamento, ao igual que ocorría coas auxinas, a concentración das citoquininas varía en función da fase, diminúen durante a fase de indución e aumentan na iniciación e na extensión (Kevers *et al.*, 1997; Rasmussen *et al.*, 2015).

Aínda máis importante cás citoquininas é a relación entre a cantidade de citoquininas e a de auxinas. Este balance determina o proceso organoxénico que se produce no cultivo *in vitro* a partir mesmo de calos indiferenciados (Ikeuchi *et al.*, 2013). A relación entre ámbolos dous reguladores do crecemento determina aspectos chave do desenvolvemento da planta: a organoxénese, a formación do meristema apical, a proliferación e a diferenciación celulares (Schaller *et al.*, 2015) ou a determinación da morfoloxía dos órganos e tecidos, incluído o desenvolvemento dos rebentos e das raíces (Kurepa *et al.*, 2023). Desta forma, unha relación auxinas/citoquininas favorábel ás primeiras é necesaria para a indución do enraizamento adventicio (Kurepa e Smalle, 2022). As interaccións entre ambos reguladores do crecemento modulan a morfoxénese radicular por medio do control do meristema radicular e o crecemento da raíz (Su *et al.*, 2011).

1.6.2.4.5 Xasmonatos

A acción dos xasmonatos está principalmente relacionada coa resposta da planta ante diversos tipos de estrés, tanto bióticos coma abióticos. Este regulador modula o crecemento e desenvolvemento da planta, sobre todo, en resposta aos ambientes desfavorábeis (Kamińska, 2021). Entre estes procesos de resposta está a indución do enraizamento para resisti-lo estrés (Betti *et al.*, 2021). Porén, os xasmonatos teñen un efecto dual no enraizamento adventicio en función de factores como o tipo de material vexetal ou a idade dos explantes (Pan *et al.*, 2021). Así, en plántulas de *Arabidopsis* que creceron en escuridade a interacción dos xasmonatos, o etileno e as auxinas promoven o enraizamento adventicio (Fattorini *et al.*, 2018) mentres que poden inhibi-lo crecemento da raíz e dos pelos radiculares en condicións de estrés (Han *et al.*, 2023). Así a todo, os xasmonatos tamén parecen colaborar coas citoquininas para conteren o

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

inicio das raíces adventicias (Dob *et al.*, 2021). Isto demostra que as regulacións dinámicas e recíprocas entre xasmonatos, etileno, auxinas e citoquininas modifican os balances de auxina/citoquinina e os niveis de xasmonatos e modulan o desenvolvemento das raíces (Xu *et al.*, 2020; Abarca, 2021).

1.6.2.4.6 Ácido abscísico

O ácido abscísico está implicado na tolerancia ao estrés abiótico. Os principais efectos do ácido abscísico son a regulación da apertura estomática ou a síntese de ceras que forman a cutícula para reduci-la perda de auga e aumenta-la tolerancia ao estrés (Chen *et al.*, 2020). A adición de ácido abscísico exóxeno mellora a calidade do sistema radicular en bidueiro, con raíces máis longas e máis raíces laterais (Vaičiukynė *et al.*, 2019). No caso da vide, o aumento da concentración de ABA incrementou de xeito significativo o contido de IAA e a porcentaxe de rebentos enraizados (Tomiyama *et al.*, 2020).

1.6.2.4.7 Brasinosteroides

A acción dos brasinosteroides está relacionada principalmente co desenvolvemento das plantas en reacción a diversos tipos de estrés (Hafeez *et al.*, 2021). Os brasinosteroides parecen interactuar coas auxinas para promove-lo enraizamento adventicio (Maharjan *et al.*, 2014) como resposta directa ao estrés producido por metais pesados (Betti *et al.*, 2021). De xeito contrario, liñas transxénicas de álamo que presentan un peor enraizamento parecen sobre-expresar xenes da ruta de sinalización dos brasinosteroides (Ramírez-Carvajal *et al.*, 2009). Polo tanto, a acción dos brasinosteroides no control do desenvolvemento radicular parece estar influída por diversos factores, entre os que se atopa a propia concentración desta hormona, xa que promove o crecemento das raíces a baixas concentracións a inhíbeo cando a concentración de brasinosteroides aumenta (Wei e Li, 2016).

1.6.2.4.8 Estrigolactonas

As estrigolactonas son uns reguladores do crecemento descubertos hai relativamente pouco tempo e as súas respostas están menos caracterizadas en comparanza co resto de hormonas vexetais. Están implicadas no alongamento dos internodos, na senescencia foliar ou na simbiose con micorrizas arbusculares mentres que parecen inhibi-lo gravitropismo do talo ou o crecemento das xemas axilares (Waters *et al.*, 2017). En relación co enraizamento adventicio hai estudos que suxiren que as estrigolactonas están implicadas na inhibición da formación de raíces adventicias (Rasmussen *et al.*, 2012b). En especies como xasmín dos poetas, dentilaria do Cabo e *Millettia pinnata* a inhibición das estrigolactonas promoveu o enraizamento adventicio (Rasmussen *et al.*, 2012a), efecto que tamén se observou en liñas transxénicas de álamo deficientes na biosíntese de estrigolactonas (Muhr *et al.*, 2016).

1.6.2.5 Outros compostos

Mais non só os reguladores do crecemento vexetal clásicos están implicados na regulación do enraizamento adventicio. Diferentes compostos poden promover ou inhibir este proceso (Deng *et al.*, 2019), como é o caso dos compostos fenólicos (Denaxa *et al.*, 2022). Tamén pequenas moléculas como o peróxido de hidróxeno, un tipo de especie reactiva de osíxeno parecen promove-lo enraizamento adventicio en diferentes especies (Deng *et al.*, 2019;

Roussos, 2023). Outras moléculas, como o ácido gamma-aminobutírico (GABA) están tamén presente nas plantas e parece ter un rol inhibidor no enraizamento (Li *et al.*, 2021). Compostos como o $AgNO_3$ ou a putrescina (Amghar *et al.*, 2021) ou novos compostos sintéticos derivados da urea actúan como coadxuvantes das auxinas (Ricci *et al.*, 2008, 2016) e modulan o proceso de enraizamento. Outras estratexias inclúen o uso de estimuladores biolóxicos que permitan mellora-lo enraizamento ao tempo que se reduce o uso de auxinas exóxenas (Pacholczak *et al.*, 2015). Este tipo de bio-estimuladores naturais teñen efectos positivos en especies como a pereira (Dimitrova e Berova, 2020) ou terebinto (Nacheva *et al.*, 2019). Porén, contan coa desvantaxe de que a súa composición aínda non está caracterizada.

Aínda así, moitas especies, xenotipos ou material vexetal, como se dixo antes, son recalcitrantes á xeración de raíces adventicias a pesar de seren tratadas con auxinas. Este estado recalcitrante nas especies leñosas depende en grande medida do estado ontoxenético do material vexetal. O descenso na capacidade de enraizamento durante o cambio de fase está asociada a cambio na homeostase das auxinas (Aumond *et al.*, 2017), o que leva a cambios na na expresión de xenes de resposta a auxinas (Vielba *et al.*, 2016). Análises en castiñeiro amosaron un contido até cinco veces superior de AIA en tecidos adultos de difícil enraizamento en comparanza cos tecidos xuvenís (Ballester *et al.*, 1999) polo que o nivel de auxina endóxeno non é o único parámetro implicado na indución do enraizamento adventicio. O uso de técnicas e análises moleculares permiten profunda-lo coñecemento da relación entre o cambio de fase e o enraizamento adventicio. Este coñecemento é chave para conseguir propagar adecuadamente o material estabelecido a partir de tecidos adultos.

1.7 ANÁLISES MOLECULARES

Por todo isto é importante contarmos con protocolos ben definidos para a propagación *in vitro* de cada material. Para iso é imprescindíbel saber que xenes están implicados nos procesos de enraizamento e como os diferentes tratamentos empregados na indución de raíces adventicias afectan á súa expresión. Entre as ferramentas que a bioloxía molecular nos proporciona para analizar esta relación a secuenciación é unha das máis precisas e, desde hai uns anos, sinxelas e accesíbeis. O cultivo *in vitro* pode ser de grande utilidade para a secuenciación, xa que o control do medio de desenvolvemento das plantas e a clonación permiten reduci-la variabilidade e detecta-los cambios producidos de forma máis precisa que os exemplares obtidos por outros medios. A secuenciación de primeira xeración, inaugurada en 1977 (Sanger *et al.*, 1977) foi predominante durante tres décadas até a aparición da secuenciación de segunda xeración. Esta permitía obter datos de forma masiva, barata e rápida polo que impulsou en gran medida a investigación molecular, mais os fragmentos xerados tiñan a desvantaxe de seren máis curtos. Isto ocasionaba erros e ensamblaxes subóptimos, especialmente para ensamblaxes *de novo* de xenomas grandes e altamente repetidos, como o caso dos xenomas vexetais (Dumschott *et al.*, 2020). A secuenciación de terceira xeración chegou da man de Pacific Biosciences (PacBio) á que se uniría a tecnoloxía desenvolvida por Oxford Nanopore Technologies (ONT). Esta última vaga de avances nas técnicas de secuenciación estimulou o progreso no eido da transcritómica.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A transcritómica é a aplicación das técnicas de secuenciación ao transcritoma dun organismo, ao total de moléculas de ARN dun tecido particular durante un estadio do desenvolvemento ou proceso funcional concretos. Deste xeito, permite coñecer a un nivel máis profundo a regulación dos procesos biolóxicos e as redes de expresión implicadas nela.

Entre as tecnoloxías de secuenciación de terceira xeración destaca as desenvolvidas por ONT, nas que se atopa o dispositivo MiniON que permite a secuenciación de fragmentos longos por nanoporos. O seu baixo custo e a súa portabilidade permite un uso cada vez máis estendido das técnicas de secuenciación (Jain *et al.*, 2016). Esta tecnoloxía consiste nuns nanoporos unidos a unha membrana de polímero resistente á electricidade. Unha proteína motora con actividade helicase desenrola a dupla cadea de ADN e controla a velocidade coa que esta febra monocatenaria, cargada positivamente pasa polo poro desde o lado *cis*, cargado positivamente, até o *trans*, cargado negativamente. As mudanzas na corrente iónica que se producen durante a translocación son específicos de cada nucleótido (Wang *et al.*, 2021c). Esta tecnoloxía permite a secuenciación de lecturas longas que permiten mellora-la identificación de isoformas de transcrición, a certeza no mapeamento, a detección de variantes estruturais (Amarasinghe *et al.*, 2020), a caracterización de marcas epixenéticas, o desenvolvemento de marcadores moleculares etc. De entre estas aplicacións destacan a capacidade de completar ocos en xenomas de referencia e a posibilidade de ensamblaxes *de novo* de xenomas, aínda que estes sexan grandes e teñan moitos elementos repetidos, secuencias en tándem ou transposóns, o que permite a construción de novos xenomas de referencia (Wang *et al.*, 2021c; Tyagi *et al.*, 2022). Isto permite contar con xenomas de referencia para máis especies de forma máis rápida e, polo tanto, ao ter xenomas dispoñíbeis de especies relacionadas aumentase a calidade dos datos obtidos e pódense dilucida-las redes xenéticas implicadas nos procesos biolóxicos dun xeito máis preciso. Deste xeito, a secuenciación con MinION xa comeza prover de coñecemento nos procesos que interveñen durante o cambio de fase (Zhang *et al.*, 2021b) e o enraizamento adventicio (Cai *et al.*, 2023) en especies forestais.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2. OBXECTIVOS

O castiñeiro (*Castanea sativa* Mill.) é unha especie sobranceira na Galiza mais que está a enfrontar importantes problemas no noso país, o que pon en perigo a existencia dos soutos e os seus servizos económicos, biolóxicos e culturais derivados. Entre as principais causas deste devalo atópanse factores globais, como é o caso do cambio climático, que modifica os patróns climáticos e as redes de interacción ecosistémicas estabelecidas durante a evolución dos castiñeiros, ou do despoboamento rural, causado pola concentración dos traballos e os servizos nas zonas urbanas. Mais os castiñeiros tamén se enfrontan a problemas específicos como a existencia de patóxenos letais ou a propagación de variedades pouco produtivas, que reducen os incentivos para conservar esta especie. Deste xeito, é preciso atopar métodos eficaces, estábeis e económicos que permitan propagar variedades seleccionadas en función de diferentes trazos fenotípicos. Isto permitiría multiplicar castiñeiros resistentes ás novas condicións producidas pola mudanza climática, resistentes ante pragas e doenzas ou liñas altamente produtivas que incentivasen o traballo no rural, o que levaría a un círculo virtuoso entre a industria transformadora, o mantemento dos soutos e a repoboación rural.

Unha das estratexias para levar a cabo unha propagación masiva, efectiva e rápida que contribúa a soluciona-lo problema dos castiñeiros na Galiza é o cultivo *in vitro*, que permite a multiplicación de exemplares de castiñeiro seleccionados. Porén, para que esta técnica sexa realmente produtiva existen algunhas limitacións que deben de superarse. Entre estas dificultades está a formación de raíces adventicias. Unha vez os rebentos son multiplicados é necesario que estes formen raíces para poderen plantarse no campo. Isto non ten porqué supor maior problema agás nas especies recalcitrantes ao enraizamento, aquelas que non teñen a capacidade de desenvolveren un sistema radicular competente durante a micropropagación. Moitas das especies leñosas que se intentan propagar non son recalcitrantes en tódolos períodos do seu ciclo vital senón que perden a capacidade de enraizamento trala maduración, no coñecido como cambio de fase. Deste xeito, dáse o paradoxo de ter que selecciona-lo material vexetal que se vai estabelecer *in vitro* durante a época adulta – cando xa expresaron as características fenotípicas que os fan interesantes para a micropropagación – nunha fase na que xa non teñen a capacidade de enraizar e completa-lo ciclo que permita devolvelas ao campo despois da súa multiplicación. Por iso comprende-los factores implicados no enraizamento e no cambio de fase do castiñeiro é vital para desenvolver protocolos de micropropagación axeitados.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para este fin, durante a presente tese "Mecanismos reguladores da competencia para a rexeneración de raíces adventicias en especies leñosas" propóñense varios obxectivos específicos que axuden a profundar no coñecemento relacionado coa formación de raíces adventicias en castiñeiro:

1. Elaboración dun medio economicamente óptimo que permita a multiplicación e o enraizamento do castiñeiro asegurando a calidade do material.
    1. Axuste do axente xelificante no medio de cultivo.
    2. Modificación da fonte de carbono do medio de cultivo.
2. Análise da resposta rizoxénica ante diferentes tratamentos que estean implicados na adquisición de competencia para o enraizamento.
    1. Optimización da concentración de auxinas durante o enraizamento.
    2. Avaliación dos efectos producidos polo bloqueo do transporte polar de auxinas.
    3. Análise do efecto da promoción ou inhibición das xiberelinas sobre o enraizamento adventicio.
    4. Caracterización da resposta do sistema radicular ao etileno.
    5. Avaliación dos efectos de diferentes compostos non hormonais (H_2O_2, 3,4-MDPU, EGTA e Charkor) no enraizamento adventicio.
3. Identificación de xenes implicados na adquisición ou perda de competencia para o enraizamento en relación co cambio de fase e análise da súa expresión como resposta aos tratamentos de enraizamento.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3. ASPECTOS METODOLÓXICOS

3.1 MATERIAL VEXETAL

Nos experimentos realizados nesta tese empregáronse clons de especies leñosas importantes en Galiza. Este material xa fora estabelecido e empregado previamente no laboratorio e xa existían protocolos de multiplicación previamente estabelecidos.

3.1.1 Castiñeiro

O material vexetal utilizado consiste en dúas liñas de castiñeiro (*Castanea sativa* Mill.), o clon P2. A árbore da que se estabeleceron estas liñas é un castiñeiro adulto de máis de 80 anos de idade. As liñas empregadas foron P2Rb, derivada de rebentos basais da árbore e P2C estabelecida a partir de pólas da copa. Ámbalas dúas liñas difiren nas taxas de proliferación e enraizamento da forma descrita previamente (Sanchez e Vieitez, 1991).

3.1.2 Bidueiro

O clon de bidueiro (*Betula pubescens* ssp. celtiberica) empregado é o Piñoi, chamado así pola súa localización no campo onde medrou, que foi estabelecido das pólas da copa dun exemplar monumental (17602 en monumentaltrees.com) de bidueiro adulto de fácil enraizamento (Covelo *et al.*, 2019).

3.1.3 Carballo

O material de carballo (*Quercus robur* L.) utilizado corresponde ao clon Saínza, estabelecido a partir de rebentos basais dun carballo monumental que tiña no momento do estabelecemento *in vitro* máis de 300 anos de idade (Vieitez *et al.*, 1994).

3.2 PROLIFERACIÓN DOS CULTIVOS

3.2.1 Metodoloxía

Cada catro semanas os rebentos de castiñeiro cun bo desenvolvemento poden multiplicarse en medio de cultivo fresco ou seren empregados para experimentos de enraizamento. Para a multiplicación elimínase o calo basal e a metade apical das follas, secciónanse os rebentos en explantes de 1 - 1,5 cm que deben incluír ao menos dúas xemas laterais – e poden incluír tamén a xema apical – para iniciar de novo o ciclo de multiplicación.

Para o clon Saínza de carballo estabeleceuse un ciclo de multiplicación de catro semanas. Para a súa multiplicación decapítase o rebento desbotando o ápice e elimínanse as follas agás un anaco da folla máis apical. O rebento nu é chantado horizontalmente no medio de cultivo durante dúas semanas, momento no que será transferido durante dúas semanas adicionais a un medio coa concentración de citoquininas reducida á metade.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

O ciclo de multiplicación do clon Piñoi de bidueiro fixouse en oito semanas. Para a súa multiplicación empréganse explantes de 1 – 1,5 cm procedentes da base do rebento aos que se eliminaron as partes apicais das follas. Após dous meses no medio de cultivo reiníciase o ciclo de multiplicación.

Os clons multiplicados son cultivados en cámaras de cultivo a 25 ± 1 °C de temperatura diúrna, cunha humidade relativa do 80% - 90% e cun fotoperíodo de 16 h de luz dunha intensidade de 90-100 µmol m^{-2} s^{-1} proporcionado por lámpadas fluorescentes e 8 horas de escuridade a unha temperatura de 20 ± 1 °C.

3.2.2 Medios de cultivo

O medio de cultivo das liñas de castiñeiro, consistente en medio GD (Gresshoff e Doy, 1972) suplementado con benciladenina (BA) 0,44 µM, 30 g L^{-1} de sacarosa e 7 g L^{-1} de agar Bacto como axente xelificante, foi dispensado en tubos con 16,5 ml de medio.

A liña de carballo foi mantida en xerras con 70 ml de medio GD suplementado con 30 g L^{-1} de sacarosa, 7 g L^{-1} de Plant Propagation Agar como axente xelificante e dúas concentracións de BA (0,44 µM e 0,22 µM).

Os rebentos de bidueiro foron propagados en xerras de vidro con tapa plástica en 50 ml de medio MS (Murashige e Skoog, 1962) coas vitaminas modificadas e suplementado con 27,2 µM de Fe-EDTA, 56,8 µM de ácido ascórbico, 52 µM de ácido cítrico, 2,3 µM de ácido fólico, 0,5 µM de ácido 1-naftalenacético e 1,7 µM de meta-topolina. No medio engadíronse 30 g L^{-1} de sacarosa como fonte de carbono e 7 g L^{-1} de agar Bacto como axente xelificante.

Tódolos medios de cultivo axustáronse a un pH 5,6 – 5,7 e esterilizáronse no autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

3.2.3 Medios alternativos

Para comproba-los efectos do cambio do axente xelificante (agar Bacto ou agar comercial de produción local) e da fonte de carbono (sacarosa ou azucre comercial) deseñáronse catro medios de cultivo combinando os compoñentes fornecidos por provedores de material de laboratorio e por estabelecementos comerciais (Táboa 1).

Táboa 1. Composición dos medios de cultivo.

	Agar Bacto	Agar comercial	Sacarosa	Azucre comercial
CM	X		X	
M1	X			X
M2		X	X	
M3		X		X

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2.3.1 Toma de datos e tratamento estatístico da proliferación de rebentos

En P2Rb empregáronse 24 tubos con cadanseu rebento en cada ciclo e o experimento foi repetido 6 veces, 144 rebentos en total para cada tratamento. Para a multiplicación de bidueiro empregáronse tres réplicas e tres repeticións para cada tratamento, cun total de 63 rebentos por cada tratamento ao se multiplicaren 7 rebentos por xerra. Á fin do ciclo de cultivo recolléronse datos do número de rebentos formado, a altura do rebento máis alto e o número de follas novas formada en cada rebento.

A normalidade dos datos foi comprobada ca proba de Shapiro-Wilk e o suposto de homocedasticidade foi avaliado mediante a proba de Levene do paquete "car" (Fox e Weisberg, 2019). Cando se cumpriron as asuncións requiridas os datos foron analizados co test ANOVA e empregouse a proba HSD de Tukey como *post hoc*. Cando se descartou a existencia de normalidade aplicouse a proba non paramétrica de Kruskal-Wallis seguido da proba de Dunn – do paquete "FSA" (Ogle *et al.*, 2023) – con axuste de Bonferroni como *post hoc*. Nos parámetros que se expresan como unha porcentaxe levouse a cabo unha análise de regresión no que se asume unha distribución beta dos datos empregando o paquete "betareg" (Cribari-Neto e Zeileis, 2010) e o paquete "emmeans" como proba *post-hoc* (Lenth, 2023). Tódalas análises estatísticas foron feitas co programa R (R Core Team, 2021).

3.3 ENRAIZAMENTOS

Tódolos experimentos de indución de raíces adventicias en castiñeiro seguiron a mesma estrutura (Fig. 2). Eliminación do calo e das follas basais dos rebentos, incubación en escuridade durante cinco días en medio GD 1/3 de macronutrientes (medio basal de enraizamento) suplementado con 30 g L^{-1} de sacarosa, 7 g L^{-1} de agar Bacto e coas substancias que se van avaliar. Transferencia dos rebentos a un medio basal de expresión de raíces, de igual composición có de indución sen substancias que afecten de forma predominante ao enraizamento. Os rebentos cultiváronse a 25 °C cunha humidade relativa do 80% - 90% e cun fotoperíodo de 16 h dunha intensidade de 90-100 µmol m^{-2} s^{-1} durante 25 días adicionais. Tódolos experimentos de enraizamento foron levados a cabo en xerras de vidro con tampa plástica cun volume de medio de 50 ml e seis rebentos por xerra. En cada experimento fixéronse un mínimo de tres replicados e tres repeticións do experimento para asegurar un tamaño de mostra suficiente.

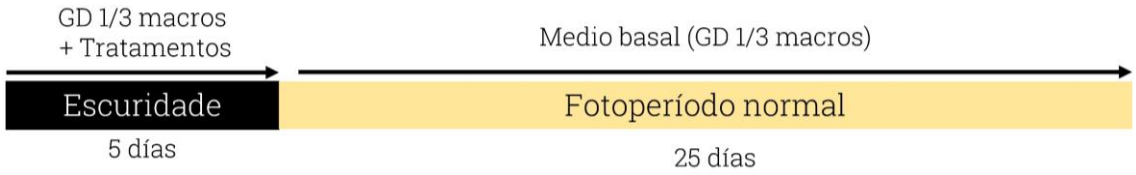


Figura 2. Representación esquemática do proceso de enraizamento do castiñeiro, onde os rebentos se incuban co tratamento durante cinco días en escuridade antes de seren transferidos a medio sen hormonas e condicións normais de luz.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.3.1 Medios alternativos de enraizamento

Comprobouse o efecto da substitución da fonte de carbono e do agar por marcas comerciais non específicas de laboratorio na calidade do enraizamento. Para iso deseñáronse medios de enraizamento de forma análoga aos medios de multiplicación. Mantívose o medio mineral e o aporte hormonal mais combináronse os diferentes tipos de agar e de azucres. O enraizamento levouse a cabo con AIB 25 μM. No caso dos rebentos de bidueiro estes amosan enraizamento espontáneo polo que se tomaron e trataron estatisticamente os datos mais sen realizar ningún experimento de enraizamento específico.

3.3.2 Efecto da concentración de auxina

Para comproba-los efectos da concentración das auxinas no enraizamento realizáronse experimentos de enraizamento no medio de enraizamento basal mais modificando as concentracións de AIB. No caso da liña xuvenil, P2Rb as concentracións testadas de AIB foron 25, 12,5, 10, 5 e 2,5 μM de AIB. No caso da liña derivada de material adulto, P2C, as concentracións testadas foron 12,5, 25 e 50 μM.

3.3.3 Efecto do NPA

Empregouse ácido NPA, unha substancia que bloquea o transporte polar de auxinas para dilucida-lo efecto deste transporte no enraizamento en P2Rb. O NPA foi engadido ao medio de cultivo esterilizado no autoclave mediante filtración (con filtros Millipore de 0,22 μm) nunha cámara de fluxo laminar en condicións de esterilidade. Para realizar este experimento os rebentos enraizáronse en medio basal con AIB 25 μM + NPA (0, 100 ou 200 μM) e AIB 2,5 μM + NPA (0 ou 100 μM).

3.3.4 Xiberelinas

Para comproba-lo efecto das xiberelinas sobre o enraizamento adventicio do castiñeiro xuvenil, P2Rb, empregáronse medios de enraizamento con diferentes concentracións de ácido xiberélico (GA_3), unha das xiberelinas bioactivas (Táboa 2). Os rebentos tratáronse con AIB 2,5 μM e diferentes concentracións de GA_3 (0, 5, 10, 20 ou 40 μM). No material adulto este efecto avaliouse enraizando P2C en medio basal suplementado con AIB 25 μM + GA_3 (0 ou 40 μM).

3.3.4.1 Paclobutrazol

Para observa-lo efecto complementario ao das xiberelinas tamén se fixeron experimentos en P2Rb con PBZ, un inhibidor da síntese de xiberelinas. Empregouse GD 1/3 de macronutrientes suplementado con AIB 2,5 μM + PBZ (0, 5, 10, 20 ou 40 μM). Avaliouse tamén a combinación de ambos compostos aplicados a un tempo (AIB 2,5 μM + GA_3 40 μM + PBZ 40 μM). Co fin de comproba-lo efecto das xiberelinas endóxenas na capacidade de enraizamento realizouse outro experimento con medio basal suplementado con PBZ 40 μM.

No material adulto, P2C, leváronse a cabo enraizamentos con AIB 25 μM + PBZ (0 ou 40 μM). Para avalia-lo efecto das xiberelinas endóxenas no enraizamento realizouse un experimento en medio basal suplementado con PBZ 40 μM.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.3.4.2 Efecto da inhibición do transporte polar de auxinas

Para dilucida-la implicación do transporte polar de auxinas nas modificacións do enraizamento producidas polas xiberelinas os rebentos de P2Rb foron enraizados en medio suplementado con AIB 2,5 μM + NPA 100 μM + PBZ 40 μM ou PBZ 40 μM + NPA 100 μM.

Táboa 2. Tratamentos de enraizamento para a análise do efecto das xiberelinas.

Liña	AIB (μM)	GA_3 (μM)	PBZ (μM)	NPA (μM)
P2Rb	2,5			
	2,5	5		
	2,5	10		
	2,5	20		
	2,5	40		
	2,5		5	
	2,5		10	
	2,5		20	
	2,5		40	
	2,5	40	40	
		40	40	
			40	
	2,5		40	100
			40	100
P2C	2,5			
	2,5	40		
	2,5		40	
			40	

3.3.5 Etileno

3.3.5.1 Tiosulfato de prata

Fixéronse experimentos de enraizamento con P2C nos que se fixo un pre-tratamento cun inhibidor da acción do etileno, o tiosulfato de prata (STS 20 μM) durante 48 h en escuridade, sen AIB, seguido do tratamento de AIB 25 μM de 48 h adicionais en escuridade, sen STS, antes da transferencia a medio libre de hormonas durante 25 días en condicións de crecemento estándar. Como control empregáronse rebentos que foron cortados e incubados en escuridade durante 48 h sen hormonas antes da súa transferencia a medio con AIB 25 μM durante dous días adicionais previamente á transferencia a medio libre de hormonas en condicións estándar de luz e temperatura.

3.3.5.2 ACC e $AgNO_3$

Para avalia-lo efecto do etileno no enraizamento adventicio de material xuvenil e material adulto tamén se fixeron experimentos de enraizamento con rebentos de P2Rb e P2C. Os tratamentos control utilizados nestes experimentos foron medio basal GD 1/3 de macronutrientes suplementados con AIB 2,5 μM (P2Rb) e 25 μM (P2C) durante cinco días.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para avalia-lo efecto do ACC e do $AgNO_3$ os rebentos de ámbalas dúas liñas foron tratados durante cinco días con cadansúa concentración de AIB + ácido 1-Aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) 30 μM ou con AIB + nitrato de prata ($AgNO_3$) 30 μM.

3.3.6 Outros compostos

3.3.6.1 H_2O_2

Na liña P2Rb, con características xuvenís, avaliouse o efecto do tempo de aplicación de H_2O_2 e a súa interacción coa auxina na formación de raíces adventicias. Para iso engadiuse H_2O_2 100 mM con ou sen adición simultánea de AIB 2,5 μM durante 3 h, 24 h ou 72 h.

3.3.6.2 MDPU

Avaliouse o efecto dun derivado das difenil-ureas proporcionado por Ada Ricci, da Universidade de Parma. O efecto da N,N′-bis-(3,4-methilenedioxifenil)urea (3,4-MDPU) estudouse na liña P2Rb incubando os rebentos durante cinco días nun medio basal de enraizamento suplementado con AIB 25 μM e con catro concentracións diferentes (0, 0,1 , 1 ou 10). Tamén se empregaron rebentos do clon Saínza de carballo que foron incubados en escuridade durante 24 h en medio GD 1/3 suplementado con AIB 75 μM en presenza de 3,4-MDPU a diferentes concentracións (0, 0,1, 1 ou 10) antes da transferencia dos rebentos a medio basal libre de hormona.

3.3.6.3 EGTA

Avaliouse o efecto do ácido tetraacético N',N',N,N-etilenglicol-O,O'-bis(2-aminoetil eter) (EGTA), un axente quelante do calcio, no enraizamento adventicio do material de castiñeiro adulto. Para iso, fíxose un enraizamento de P2C en medio de enraizamento basal suplementado con AIB 25 μM + EGTA 10 μM.

***3.3.6.4** Charkor*

Comprobouse o efecto dun composto orgánico promotor do enraizamento, o Charkor (Agrobiotech, Ukraine), unha substancia bioestimulante de orixe natural, subministrada por Alexey Melnikov (Agrobiotech, Ukraine), nunha concentración de 1 ml/L en combinación con AIB en rebentos de P2Rb e P2C.

3.3.7 Toma de datos e análise estatística dos enraizamentos

Tódolos experimentos de enraizamento se levaron a cabo con seis explantes en cada xerra de vidro. Empregáronse tres xerras por replicado e repetiuse o experimento tres veces para cada tratamento utilizando un total de 54 rebentos en total para cada tratamento.

Os parámetros analizados no enraizamento foron a porcentaxe de rebentos enraizados, o número medio de raíces en cada rebento enraizado, a lonxitude media das raíces, a porcentaxe de rebentos que formaron calo na base, a porcentaxe de rebentos que presentaron seca apical e aqueles onde unha xema secundaria foi quen de re-emprende-lo crecemento e a cinética do enraizamento, representada mediante o T50, unha medida que indica o día en que emerxeran o 50% das raíces finais.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A normalidade dos datos foi comprobada ca proba de Shapiro-Wilk e o suposto de homocedasticidade foi avaliado mediante a proba de Levene do paquete "car" (Fox e Weisberg, 2019). Cando se cumpriron as asuncións requiridas os datos foron analizados co test ANOVA e empregouse a proba HSD de Tukey como *post hoc*. Cando se descartou a existencia de normalidade aplicouse a proba non paramétrica de Kruskal-Wallis seguido da proba de Dunn – do paquete "FSA" (Ogle *et al.*, 2023) – con axuste de Bonferroni como *post hoc*. Nos parámetros que se expresan como unha porcentaxe levouse a cabo unha análise de regresión no que se asume unha distribución beta dos datos empregando o paquete "betareg" (Cribari-Neto e Zeileis, 2010) e o paquete "emmeans" como proba *post-hoc* (Lenth, 2023). Tódalas análises estatísticas foron feitas co programa R (R Core Team, 2021).

3.4 ANÁLISES MOLECULARES

3.4.1 Recollida de material e extracción de ARN

3.4.1.1 Recollida de material

Mostras de material vexetal de P2Rb foron recollidas ao final do ciclo de multiplicación (T0), e en tres puntos temporais (24 h, 48 h e 72 h) nos seguintes tratamentos: o control incubado en medio basal de enraizamento sen hormonas (W, do inglés *wounding*), en medio suplementado con AIB 2,5 μM (AIB), en medio suplementado con AIB 2,5 μM + GA_3 40 μM (AIB + GA) e en medio suplementado con PBZ 40 μM (PBZ). O material vexetal de P2C foi recollido para realiza-las análises moleculares dos experimentos con STS e dos experimentos de enraizamento con ACC e $AgNO_3$. No caso dos experimentos con STS as mostras foron recollidas ás 48 h após o corte e incubación en medio GD 1/3 0 sen ningún tratamento específico (W); ás 48 h após o corte e incubación en medio con STS 20 μM (STS), ás 96 h após o pre-tratamento de 48 h con STS 20 μM e o tratamento de 48 h con AIB 25 μM (STS + AIB) e tamén ás 96 h após 48 h en medio sen hormonas e outras 48 h en medio con AIB 25 μM (W + AIB). No caso dos tratamentos con ACC e $AgNO_3$ foron recollidas mostras á fin do ciclo de multiplicación (T0) e en dous puntos temporais (24 h e 120 h) despois do inicio dos experimentos de enraizamento (AIB 25 μM, AIB 25 μM + ACC 30 μM e AIB 25 μM + $AgNO_3$ 30 μM). A recolección das mostras foi igual en tódolos tratamentos. Seccionouse a parte basal dos rebentos (1 cm) e o material foi conxelado inmediatamente en nitróxeno líquido e gardado a -80 °C até o seu uso (Fig. 3).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

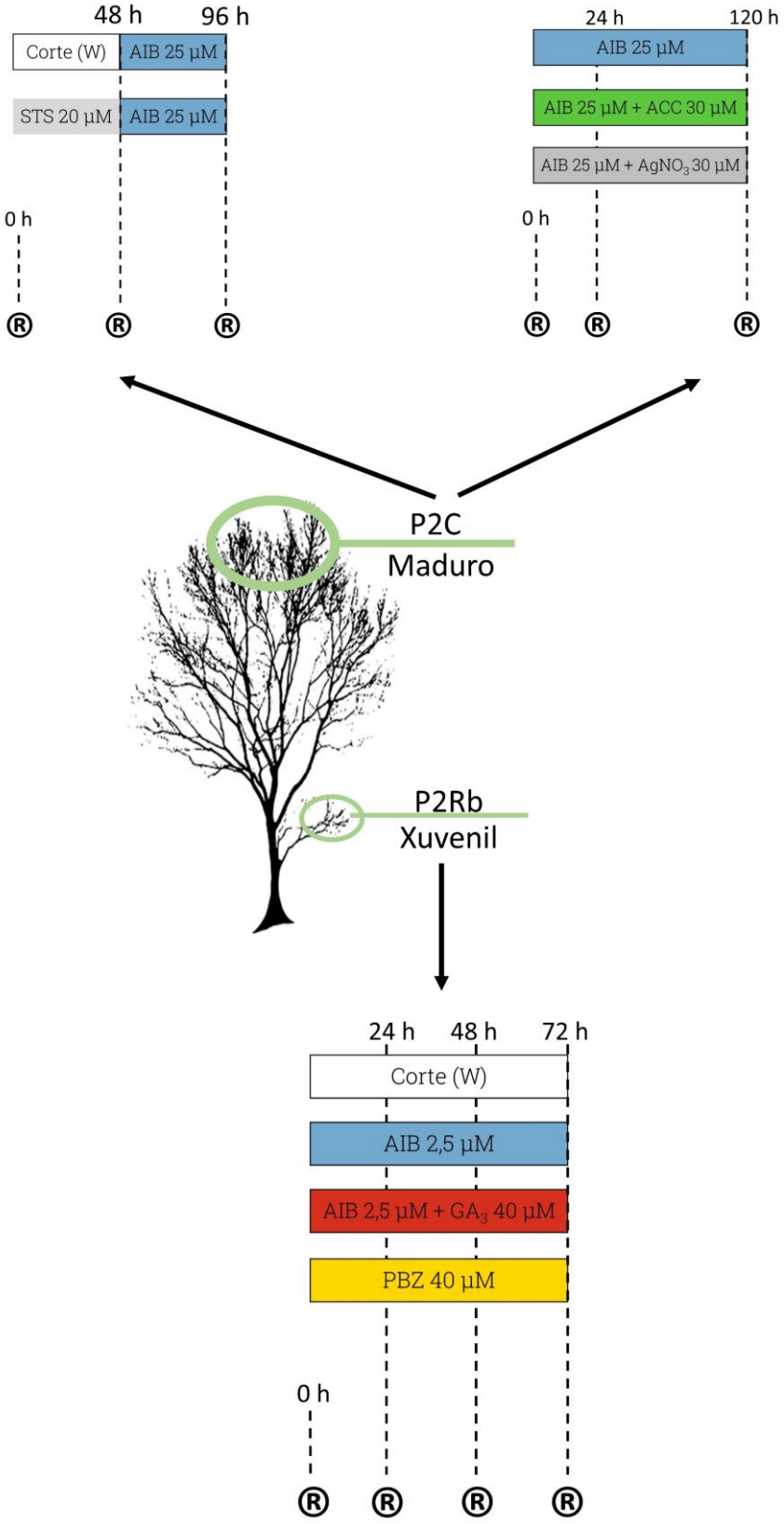


Figura 3. Representación esquemática do material recollido para as análises moleculares. Os R arrodeados indican o punto temporal no que se fixeron as recolleitas dos tratamentos especificados nos cadros.

3.4.1.2 Extracción de ARN total

O ARN total das mostras dos experimentos de P2Rb e as mostras dos experimentos de P2C enraizadas con STS foi extraído co kit "FavorPrep Plant Total RNA Purification Mini Kit (for woody Plant)" da empresa Favorgen (Favorgen Biotech corp., Taiwán). Por outra banda, o ARN das mostras de P2C enraizadas no experimento con ACC e $AgNO_3$ foi extraído co kit "Quick-RNA™ Miniprep Kit" da empresa ©Zymo Research (Zymo Research, Irvin, CA, EUA). Ámbolos dous kits, específicos de extracción de ARN mediante un método baseado en na afinidade a columnas de sílice, se utilizaron seguindo as instrucións dos fabricantes. En resumo, o protocolo consiste nunha secuencia de lise celular, unión específica dos ácidos nucleicos á membrana de sílice, lavados con etanol e elución.

3.4.1.3 Cuantificación de ARN

O ARN total foi tratado con ADNases ben na extracción, durante 15 minutos a temperatura ambiente utilizando "On Column DNase I Digestion set" (Sigma-Aldrich, Damstadt, Alemaña), ou ben xusto após a extracción durante 20 minutos a 37 °C empregando "RQ1 RNase free DNaseI" (Promega, Madison, WI, EUA). Tras estes tratamentos a concentración e a calidade do ARN foron avaliadas utilizando un espectofotómetro Nanodrop 2000c (NanoDrop Technologies, Wilmington, NC, EUA) e un fluorímetro Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific,Waltham, MA, EUA). A integridade do ARN foi avaliada nun xel cunha concentración de agarosa do 1,5% tinguido con Green safe Premium (NZYTech Lisboa, Portugal).

As mostras que cumpriron cos criterios de calidade esperada foron utilizadas nas análises moleculares posteriores. As mostras que non acadaron a calidade desexada foron depuradas mediante procesos de extracción fenólica e precipitación con etanol até obter un ARN cuns parámetros de pureza axeitados para o seu uso. Os criterios de calidade utilizados foron unha concentración maior de 100 ng/µl, e unha ratio OD260/OD280 de 2 e relación OD260/OD230 no rango de 2,0-2,2 para descarta-la contaminación con proteínas e fenois, respectivamente.

3.4.2 Transcritómica

3.4.2.1 Secuenciación

As mostras de ARN dos experimentos de P2Rb enraizados (T0, W, AIB, AIB + GA e PBZ) e os de P2C (W, STS, STS + AIB e W + AIB) foron secuenciadas utilizando un dispositivo MinION (Oxford Nanopore Technologies, ONT, Oxford, RU) e células de fluxo R9.4.1. As librarías da transcritómica foron creadas co PCR-cDNA Barcoding kit (SQK-PCB109, ONT), que permite secuenciar até doce librarías a un tempo, utilizando o ARN e seguindo as instrucións do fabricante. Resumidamente, o ARN retro-transcríbese, amplifícase por medio da reacción de PCR (14 ciclos) e únese a secuencias de "código de barras" específicos para cadansúa libraría e que permiten distingui-los datos que proceden de cada unha das mostras. Despois, uníronse adaptadores aos transcritos e cargáronse cantidades molares iguais das doce librarías nas células de fluxo R9.4.1 do MinION. Posteriormente levouse a cabo a secuenciación durante un período de 48 h.

3.4.2.2 Análise de secuencias

A análise das secuencias obtidas dos procesos de secuenciación no MinION foi realizada con diversos *softwares*. Debido á grande cantidade de datos e ao poder de computación preciso para levar a cabo estas análises empregouse o soporte computacional do Centro de Supercomputación de Galiza (CESGA).

3.4.2.2.1 Calidade

Empregouse o programa Guppy v3.3.1 (Oxford Nanopore Technologies, ONT, Oxford, RU) para os procesos de *basecalling* e de *demultiplexing*. A calidade inicial das lecturas foi avaliada co programa Epi2me (Metrichor Ltd., Oxford, RU). As lecturas obtidas foron recortadas con Porechop v0.2.4 (Wick *et al.*, 2017) para elimina-las secuencias dos adaptadores e despois re-avaliouse a calidade con FastQC v0.12.1 (Andrews, 2010).

```
      module load porechop
      #!bin/bash
      #SBATCH -t 02:00:00
      #SBATCH -p shared --qos=shared -n 1 --cpus-per-task=4 --mem-per-cpu=2
0GB
      porechop --discard_middle
      -i /ruta de acceso/   \
      -o /ruta de gardado/barcode.fastq/ \

      module load fastqc
      fastq barcode.fastq
```

3.4.2.2.2 Mapeado

As lecturas obtidas no experimento de secuenciación que cumpriron cos criterios de calidade exixidos foron aliñadas e mapeadas co programa Minimap2 v2.24 (Li, 2018) utilizando a opción -ax splice. Debido á falta dun xenoma de referencia de castiñeiro contra o que mapea-las lecturas obtidas no experimento de secuenciación, estas foron mapeadas contra o xenoma de *Quercus suber*, a especie máis relacionada co castiñeiro co arquivo fasta xenómico (.fna) dispoñíbel. Posteriormente os arquivos foron convertidos a formato .sam co programa Samtools v1.14 (Danecek *et al.*, 2021) que tamén foi utilizado para medi-la calidade do aliñamento, ordenar e indexa-los arquivos xerados.

```
module load minimap2
cd /ruta de acceso
minimap2 -ax splice qsuxenomico.fna barcode.fastq > barcode.sam

module load samtools
cd /ruta de acceso
samtools view -S -b barcode.sam > barcode.bam
samtools sort barcode.bam -o barcode.ordenado.bam
samtools index barcode.ordenado.bam
samtools flagstat barcode.bam > barcode.tsv
```

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.4.2.2.3 Ensamblaxe e cuantificación

Os transcritómas das librarías foron ensamblados e cuantificados utilizando o programa Stringtie 2 v2.1.7 (Kovaka *et al.*, 2019). Durante este proceso utilizouse un arquivo de anotación GFF (*General Feature Format*) de referencia de *Quercus suber* e creáronse arquivos .ctab, con información detallada sobre os transcritos esnsamblados tal como a identificación dos transcritos, dos xenes, a súa posición xenómica ou a abundancia de transcritos. Os aliñamentos foron comprobados de forma visual co Integrative Genomics Viewer (Robinson *et al.*, 2011).

```
      module load stringtie
      #!bin bash/
      #SBATCH -t 03:00:00
      #SBATCH -p shared --qos=shared --cpus-per-task=2 --mem-per-cpu=15GB
      cd /ruta de acceso
stringtie -L -B -G qsu.gff -o /ruta de acceso barcode.gtf /ruta de acceso/
barcode.ordenado.bam
```

3.4.2.2.4 Expresión diferencial

Para avalia-los xenes expresados de xeito diferencial (DEGs) entre os tratamentos empregouse o paquete "DESeq2" (Love *et al.*, 2014) do entorno de programación R. Impórtase unha matriz onde cada fila (i) representa un xene e cada columna (j) representa unha mostra onde cada media (μij) é a cantidade proporcional de fragmentos de ADNc do xene na mostra. Así, usouse DESeq2 para analiza-la expresión diferencial dos xenes aplicando un modelo lineal xeneralizado e asumindo unha distribución binomial negativa. Posteriormente compáraronse con DESeq2 os DEGs entre dúas condicións do modelo usando a proba de Wald. Trala aplicación do test Wald os p-valores obtidos correxíronse utilizando o axuste de Benjamini e Hochberg para estabelece-la taxa de descubrimento falso (FDR) en $p < 0,05$. Os resultados obtidos de DESeq2 filtráronse en función do p-valor < 0,05 e o "log2foldchange" para filtra-los xenes que se expresan de xeito diferencial entre as condicións comparadas e representáronse mediante mapas de calor (Kolde, 2019), *volcano plots*, *MA plots* e *PCA* (Love *et al.*, 2014).

```
ruta <- "C:/ruta de acceso"
arquivos <- list.files(ruta)
names(arquivos) <- arquivos
datos_arquivos <- lapply(arquivos, function(x) {
  read.table(x, header = TRUE, sep = "\t")
})

tx2gene <- read_tsv(arquivos)[, c("t_name", "gene_name")]
txi <- tximport(arquivos, type = "stringtie", tx2gene = tx2gene)

NomesMostras <- gsub("\\.\\d\\.ctab", "", as.character(arquivos))
Tratamento <- factor(rep(c("IBA", "IBAGA", "PBZ", "W", "T0"),
                         times = c(9, 9, 9, 9, 3)))
Tempo <- factor(rep(c(rep(c("24", "48", "72"), each = 3), "0"),
                    times = c(4, 1)))
```

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

```
Taboa <- data.frame(NomesMostras = as.factor(NomesMostras),
                    Tratamento = Tratamento,
                    Tempo = Tempo)

rownames(Taboa) <- colnames(txi$counts)
ddsTxi <- DESeqDataSetFromTximport(txi,
                                   Taboa,
                                   design = ~Tratamento)
dds <- DESeq(ddsTxi)
resultados <- results(dds)

#DEGs onde o tratamento está máis expresado que o control
sum(resultados$padj < 0.05 & resultados$log2FoldChange > 1, na.rm = T)
summary(resultados)
#DEGs onde o tratamento está máis expresado que o control
sum(resultados$padj < 0.05 & resultados$log2FoldChange < 1, na.rm = T)
summary(resultados)
```

3.4.2.2.5 Análise de enriquecemento de rutas de sinalización e ontoxenia

Coa información obtida dos DEGs realizáronse análises de enriquecemento das rutas de sinalización coas ferramentas KEGG mapper search (Kanehisa *et al.*, 2022) e Kobas (Bu *et al.*, 2021) para saber que vías están estatisticamente asociadas coa lista de xenes proporcionada. Esta lista de enriquecemento foi calculada utilizando os tests hiperxeométrico e exacto de Fisher (p-valor < 0,05 e p-valor axustado < 0,05).

3.4.3 qPCR

Tralas análises de DEGs realizadas a partir dos datos da transcritómica escolléronse algúns do xenes expresados de xeito diferencial que parecen estar relacionados cos procesos de enraizamento e sinalización de xiberelinas e etileno nas mostras e nos tratamentos analizados. A expresión diferencial destes xenes entre as mostras validáronse mediante a técnica da qPCR.

3.4.3.1 *Deseño de cebadores*

Tódolos cebadores de P2Rb deseñáronse mediante o programa Primer Designing Tool Primer-BLAST baseándonos en secuencias de *Quercus suber*, *Castanea mollisima* e información propia do laboratorio baseada en *Castanea sativa* (Táboa 3). Os criterios seguidos para o deseño de cebadores foron un tamaño do produto de PCR de arredor de 150 pares de bases, unha lonxitude dos cebadores de arredor de 20 nucleótidos, un contido en GC% en torno ao 50% e un punto de fusión óptima de 60 °C.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Táboa 3. Cebadores utilizados para as qPCR.

Xene	*Cebador*	Secuencia	Tamaño
Auxin-induced protein 22D-like	*Cs22D* Fw	AGATGGCGATTGGATGCTGG	175
	Cs22D Rv	CTGGCCAATCAATTTCCCTTCC	
Ethylene-responsive transcription factor RAP2-3-like	*CsRAP2-3* Fw	CTCGTGGATGATCTCTGGAGC	133
	*CsRAP*2-3 Rv	CTCCTAGTTCACAAACGACGAC	
LOB domain-containing protein 16	*CsLOB16* Fw	ATCCCATTTCCCCTCAGAGC	153
	CsLOB16 Rv	GTGTTTCAAGCTCACCCCAG	
Gibberellin receptor GID1B-like	*CsGID1B* Fw	TCTGCAACTCTGGGGGTTTG	118
	CsGID1B Rv	GGTGGTTCAGCCAAATGAGTG	
F-box protein GID2	*CsGID2* Fw	GTGGTCTTAGCTCTCGGTGG	180
	CsGID2 Rv	CATCGGAGGAAACGGAGACC	
B-Tubulina	*CsTUB* Fw	CTCGTGCTGTTCTCATGGATCT	198
	CsTUB Rv	TGGCCGAAAACGAAGTTGTC	
ACC Synthase 1-like	*CsACC 1-like Fw*	ACCCTTTGGGCACGGTTTTA	174
	CsACC 1-like Rv	TGAGATCACGGTCACATTCCA	
ACC oxidase 1-like	*CsACO 1-like Fw*	TGGACTAGAGAAAGGTTACCTGA	182
	CsACO 1-like Rv	GCTGGAGACCACTGACCTTG	
Ethylene Responsive Factor 3	*CsERF3 Fw*	TGATGGTGATTGATCCGCAG	177
	CsERF3 Rv	CGCTGTGGCAATCTTCAGGA	
Ethylene Insensitive 2	*CsEIN2 Fw*	ACTGTTGGGAGTGAAGGAGTT	204
	CsEIN2 Rv	TTTCTCTCTTGCGGCCACTC	
Ethylene-responsive transcription factor RAP2-12-like	*CsRAP2.12 Fw*	TGTCTGAGGAGCTATCAGCTTT	196
	CsRAP2.12 Rv	GCAAGCATGGGAGAATAGCA	
PIN1	*CsPIN1 Fw*	TCTAGGAGGTCGCAAGGATT	170
	CsPIN1 Rv	GAGTTCCTCCCACCAGCTC	
IAA29	*CsIAA29 Fw*	AACTTGCCCTCGCACTTCCA	197
	CsIAA29 Rv	GAATGTTTGTGGCACTCCTCC	
Jumonji 30	*CsJMJ30 Fw*	CAGCCAGGACAAAGTGGAATG	176
	CsJMJ30 Rv	TATGTAGGGTTGTCAGAACAGTTG	
Histone Deacetylase 14	*CsHDA14 Fw*	TGCCTCTACCTGGAGGATCA	221
	CsHDA14 Rv	AGCGTGTAGTATGTTCCCGT	
Factor de elongación 1 alpha	*CsEF1* Fw	TGTGCCGTCCTCATTATTGACT	189
	CsEF1 Rv	TCACGGGTCTGACCATCCTT	
Actina 2	*CsACT2* Fw	GCCCCACGAGCTGTGTTC	201
	CsACT2 Fv	TCTGGCCCATTCCAACCA	

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Os cebadores foron diluídos a unha concentración 10 mM e comprobados (Fig. 4), trala súa amplificación por medio de PCR, nun xel cun 2% de agarosa tinguido con Green safe Premium (NZYTech Lisboa, Portugal) para corrobora-lo tamaño dos produtos amplificados e asegurar que amplifican unha única banda.

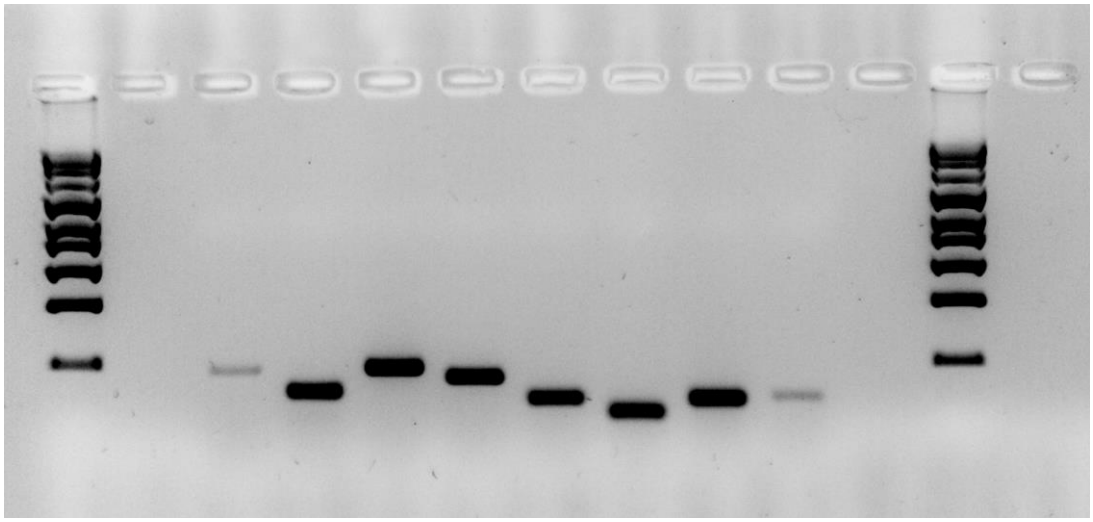


Figura 4. Exemplo dun xel de agarosa no que se comprobaron os cebadores recibidos.

3.4.3.2 Metodoloxía

As mostras de ARN de P2Rb extraídas do material recollido ao final do ciclo de multiplicación (T0), e en tres puntos temporais (24 h, 48 h e 72 h) nos seguintes tratamentos: o control incubado en medio basal de enraizamento sen hormonas (W), en medio suplementado con AIB 2,5 µM (AIB), en medio suplementado con AIB 2,5 µM + GA_3 40 µM (AIB + GA) e en medio suplementado con PBZ 40 µM (PBZ) utilizáronse para realiza-la qPCR. O ADNc sintetizouse a partir de 1 µg de ARN empregando o kit "High Capacity ADNc Reverse Transcription" (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) seguindo as indicacións do provedor. Os xenes seleccionados para o estudo foron *Castanea sativa auxin-induced protein 22D-like* (*Cs22D*), *Cs F-box protein GID1B* (*CsGID1B*), *Cs F-box protein GID2* (*CsGID2*), *Cs LOB16* e *Cs RAP2.3*. Empregáronse como xenes endóxenos de referencia a *actina 2* (*CsACT2*), a β-*tubulina* (*CsTUB*) e o *factor de elongación 1 alpha* (*CsELF-1*). Tres replicados biolóxicos e tres replicados técnicos foron incluídos en cada análise de qPCR, que se levou a cabo nun volume final de 20 µl cunha cantidade de ADNc de 12,5 ng utilizando o NZYSupreme qPCR Green Master Mix (2x), ROX plus (NZYTech Lisboa, Portugal). As condicións da qPCR foron: 50 °C/2 min, 95 °C/10 min, 40 ciclos de 95 °C/15 s e 60 °C/1 min. Tralos ciclos de qPCR comprobouse a presenza dun só produto mediante as curvas "melting", un barrido de temperatura con incrementos de 0,5 °C de temperaturas do produto amplificado. A qPCR realizouse nun dispositivo Step One Real Time PCR System en placas de 48 pozos (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

No caso de P2C as mostras de ARN recollidas á fin do ciclo de multiplicación (T0) e as recollidas en dous puntos temporais (24 h e 120 h) despois do inicio dos experimentos de enraizamento (AIB 25 μM, AIB 25 μM + ACC 30 μM e AIB 25 μM + $AgNO_3$ 30 μM) foron utilizadas para realiza-la qPCR. A síntese de ADNc foi feita a partir de 1 μg de ARN co NZY First-Strand cDNA Synthesis Flexible Pack kit (NZYTech Lisboa, Portugal) seguindo as indicacións do fabricante. Os xenes que se analizaron na qPCR foron: *Castanea sativa ACC synthase 1-like* (*CsACS1-like*), *Cs ACC oxidase 1-like* (*CsACO1-like*), *Cs* e*thylene insensitive 2* (*CsEIN2*), *Cs ethylene responsive factor 3* (*CsERF3*), o transportador de auxinas *CsPIN1*, AUX/*IAA29* (*CsIAA29*), a *Cs histone deacetylase 14* (*CsHDA14*), *Cs jumonji 30* (*CsJMJ30*) e o factor de resposta a etileno *CsRAP2.12*. *Cs actina-2* (*CsACT2*) e o *Cs factor de elongación 1 alpha* (*CsELF-1*) foron utilizados como xenes endóxenos de referencia. Tres replicados biolóxicos e tres replicados técnicos foron incluídos en cada análise de qPCR, que se levou a cabo usando o NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2x) (NZYTech Lisboa, Portugal) seguindo as instrucións provistas polo fabricante.

3.4.3.3 Análise de datos

O valor da expresión relativa dos xenes analizados en P2C calculouse de acordo co método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001). A expresión relativa dos xenes analizados en P2Rb foi calculada utilizando o método Ct comparativo (Schmittgen e Livak, 2008) e o programa DataAssist v3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para a normalización global dos datos.

Para analiza-los datos procedentes de qPCR con diferentes tratamentos e puntos temporais empregouse un modelo lineal. A normalidade dos datos foi comprobada ca proba de Shapiro-Wilk e o suposto de homocedasticidade foi avaliado mediante a proba de Breusch-Pagan do paquete "lmtest" (Achim e Hothorn, 2002). Cando se cumpriron as asuncións requiridas empregouse a proba HSD de Tukey como *post hoc*. Cando se descartou a existencia de normalidade aplicouse coa proba non paramétrica de Kruskal-Wallis seguido da proba de Dunn – do paquete "FSA" (Ogle *et al.*, 2023) – con axuste de Bonferroni como *post hoc*. Tódalas análises estatísticas foron feitas co programa R (R Core Team, 2021).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4. RESULTADOS

Os resultados expostos no apartado 4.1 e 4.2.1 reproducen o artigo "Reducing costs, improving profits: A low-cost culture media for woody plants micropropagation". O artigo completo reprodúcese ó final da tese, no anexo "Relación de publicacións".

ABSTRACT

Micropropagation has an enormous potential in the forestry industry for the mass production of elite genotypes. A limiting factor that hinders wider adoption of this technique is its high-associated cost, dissuading small producers and laboratories from its use. Thus, it is important to develop low-cost protocols to increase the competitiveness of micropropagation. The goal of the present study was to elaborate a low-cost culture medium that allowed plant growth without diminishing plant quality and production. The replacement of laboratory sucrose with commercial sugar as a carbon source, and laboratory agar with locally produced agar as a gelling agent was tested. To validate the effects of the medium for woody species micropropagation, two relevant forest species, chestnut and birch, were used and several phenotypic characteristics were recorded. Our data indicated that the substitutions made in the media composition did not alter growth or rooting parameters. Substitution of laboratory sucrose and Bacto agar by table sugar and local commercial agar provides a valuable alternative for forest species micropropagation and for increasing their potential profitability.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Os resultados expostos no apartado 4.2.7 reproducen o artigo “Effects of auxin and urea derivatives on adventitious rooting in chestnut and oak microshoots”. O artigo completo reprodúcese ó final da tese, no anexo “Relación de publicacións”.

ABSTRACT

The present study investigated how auxin concentration and the method of application affected the formation of adventitious roots in microshoots of chestnut (*Castanea sativa*) and oak (*Quercus robur*). The activity of two urea derivatives (2, 3-MDPU and 3, 4-MDPU) was also evaluated. Microshoots were derived from basal sprouts of two mature chestnut trees (P1 and P2) and one adult oak genotype (Sainza). In chestnut, rooting percentage was positively affected by auxin in a dose-dependent manner, particularly in shoots treated with the hormone for 24 h. The effect of auxin on rooting also differed depending on the application method. In shoots treated for 24 h, the highest concentration of auxin produced the healthiest rooted plantlets, in terms of the root system and shoot quality. By contrast, in shoots treated by the basal quick-dip method, the shoot quality was best at the lowest auxin concentration. The effect of urea derivatives on the root system depended on the species as well as on the auxin concentration and application period. Use of the MDPUs improved the root system architecture of auxin-treated shoots by promoting lateral root development and triggering the synchronous initiation of root primordia at the base of the shoot. Shoot quality was also improved by MDPUs, which promoted resumption of growth and reduced shoot-tip necrosis.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4.1 EXPERIMENTOS DE PROLIFERACIÓN DE REBENTOS EN MEDIOS ALTERNATIVOS

Para a substitución da sacarosa e do agar proporcionados por empresas fornecedoras de material de laboratorio por variedades comerciais de produción local o primeiro que se fixo foi comproba-la súa viabilidade tanto a nivel económico como a nivel produtivo.

4.1.1 Custo

En primeiro lugar calculouse o custo de cada litro de medio de cultivo usando o prezo medio de diferentes casas comerciais especializadas en material de laboratorio (Táboa 4). No caso do Bacto Agar o prezo medio foi de 587,9 €/kg segundo a información dispoñíbel nos catálogos de Midland Scientific, Bacto, Fischer Scientific e VWR. No caso da sacarosa o custo medio por kg foi de 19,2 € de acordo aos catálogos de Duchefa, Bacto e Fischer Scientific. Para as variedades comerciais os prezos do agar foron de 57 €/kg mentres que o prezo do azucre foi de 0,67 €/kg. Estes dous foron os elementos máis caros do medio de cultivo mentres que os do resto dos compoñentes do medio de cultivo nin representan un custo elevado (menos de 0,05€ por litro de medio) nin son substituíbeis por outras substancias.

Táboa 4. Composición e prezos dos medios de cultivo.

Medio de cultivo	Fonte de carbono	Axente xelificante	Custo (en €)	Diferenza (%)
CM	Sacarosa	Bacto Agar	5,2	-
M1	Azucre	Bacto Agar	4,7	- 10,5
M2	Sacarosa	Agar local	1,5	- 71,3
M3	Azucre	Agar local	0,95	- 81,8

Tódolos medios alternativos deseñados representaron un aforro comparados co medio empregado habitualmente, co agar como elemento central na conformación do prezo do medio de cultivo. No medio M3, ao substituí-lo agar Bacto por agar comercial producido localmente representa reducións no prezo de máis do 80%.

4.1.2 Efecto da fonte de carbono e do axente xelificante na proliferación de rebentos

Tras constatar que os medios alternativos eran máis baratos que os medios de cultivo empregados usualmente avaliouse o efecto potencial destas mudanzas sobre o desenvolvemento dos rebentos (Fig. 5). Para isto, a final do ciclo de proliferación medíronse o número de gomos producidos por explante, a lonxitude do rebento máis longo e mailo número de follas producidas por rebento (Táboa 5). Non se detectaron diferenzas significativas ($p \leq 0,001$) entre os diferentes medios en ningún dos parámetros medidos nos explantes de castiñeiro. O número medio de gomos variou desde os 1,9 ± 0,1 dos explantes multiplicados en medio CM até o 2 ± 0,4 dos explantes que foron multiplicados no medio M2, mentres que no caso da lonxitude media do rebento máis longo esta variou desde os 2,9 ± 0,5 cm no medio CM até os

3,3 ± 0,2 cm no medio M3. No caso das follas novas desenvolvidas por rebento o valor máis baixo foi obtido en M2, con 7,5 ± 0,3, mentres que o dato máis alto foi observado nos rebentos multiplicados en M3, con 7,7 ± 0,2.

Nos cultivos de bidueiro tamén non se detectaron diferenzas estatísticas ($p \leq 0,001$) en función da fonte de carbono nin do axente xelificante empregado durante a multiplicación en ningún dos parámetros analizados, a pesar de que o medio CM produciu unha media de 7,7 ± 0,3 gomos por explante multiplicado, número que se reduciu até os 7,2 ± 0,3 no M3. A lonxitude media dos rebentos tampouco se veu afectada (Fig. 6), chegando até os 8,9 ± 0,4 cm no medio con sacarosa e agar Bacto (CM) e acadando o seu valor máis baixo 8,6 ± 0,7 cm no medio M2. Por outra banda, o número medio de follas novas formada por explante foi de 10,7 ± 0,3 no medio M3 e 10,5 ± 0,3 no caso dos rebentos multiplicados en medio M1.

Á luz destes resultados pódese concluír que é viábel a substitución da sacarosa por azucre común e do agar de laboratorio por agar comercial de produción local sen ningunha redución da calidade na proliferación dos rebentos en ningunha das dúas especies.



Figura 5. Rebentos multiplicados de castiñeiro e bidueiro en CM (A, E), M1 (B, F), M2 (C, G) e M3 (D, H) .

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Táboa 5. Efecto da fonte de carbono e do axente xelificante na proliferación de rebentos. As letras indican diferenzas estatisticamente significativas (p-valor < 0,001).

Liña	Medio	Número de rebentos	Lonxitude dos rebentos (cm)	Número de follas novas
P2Rb	CM	1,9 ± 0,1 a	2,9 ± 0,5 a	7,2 ± 0,2 a
	M1	1,9 ± 0,2 a	3,1 ± 0,2 a	7,6 ± 0,1 a
	M2	2,0 ± 0,4 a	3,3 ± 0,2 a	7,5 ± 0,3 a
	M3	1,9 ± 0,3 a	3,3 ± 0,2 a	7,7 ± 0,2 a
Piñoi	CM	7,6 ± 0,3 a	8,9 ± 0,4 a	10,7 ± 0,2 a
	M1	7,3 ± 0,3 a	8,7 ± 0,2 a	10,5 ± 0,3 a
	M2	7,5 ± 0,2 a	8,6 ± 0,7 a	10,7 ± 0,2 a
	M3	7,2 ± 0,3 a	8,8 ± 0,7 a	10,7 ± 0,3 a

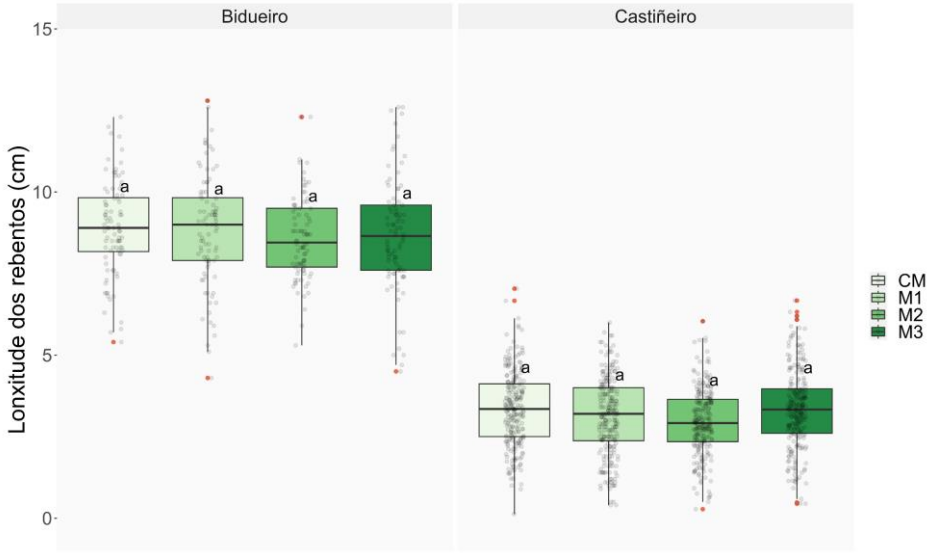


Figura 6. Lonxitude media dos rebentos (en cm) en castiñeiro e bidueiro dependendo do medio de cultivo. As letras indican diferenzas estatisticamente significativas (p-valor < 0,001) dentro de cada especie.

4.2 EXPERIMENTOS DE ENRAIZAMENTO

4.2.1 Efecto da fonte de carbono e do axente xelificante no enraizamento

Tamén se comprobou o efecto do uso de agar comercial de produción local e de azucre común durante o proceso de enraizamento e o desenvolvemento radicular (Táboa 6). Para iso foron medidos a porcentaxe de enraizamento, o número de raíces e a lonxitude da raíz máis longa. Tódolos parámetros analizados permaneceron estábeis ao longo dos tratamentos probados no castiñeiro. A porcentaxe de enraizamento variou entre o 95,8 ± 0,6 dos medios RM e R2 e o 97,9 ± 0,5 dos rebentos enraizados en medio R1 e R3 (Fig. 7). O rango do número de raíces por cada rebento enraizado variou entre as 4,1 ± 0,3 do medio R2 até as 4,6 ± 0,2 raíces producidas no medio R3, mentres que a lonxitude da raíz máis longa variou entre os 4,1 ± 0,3 cm das raíces que se desenvolveron en medio R2 e os 4,7 ± 0,6 cm das que o fixeron en medio R1.

USC DE COMPOSTELA

As raíces do bidueiro desenvolvéronse espontaneamente no propio medio de proliferación, polo que foron avaliadas ao final do ciclo de multiplicación. A porcentaxe de enraizamento nos medios CM e M2 foi do 96,6 ± 1,6 mentres que nos medios M1 e M3 a porcentaxe foi do 97,9 ± 0,5. No caso do número medio de raíces estas variaron entre os 4,2 ± 0,2 do medio M2 e o 4,4 ± 0,2 do medio M3. Por outra banda, os valores da lonxitude media das raíces máis longas flutuaron entre os 4,7 ± 0,2 cm nas raíces dos bidueiros cultivados no medio M1 e os 5,2 ± 0,2 cm das raíces desenvolvidas en RM. Ningún destes parámetros amosou diferenzas estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p \leq 0,001$).

Polo tanto, estes resultados apuntan a que é posíbel substituí-la sacarosa por azucre común e o agar de laboratorio por agar comercial de produción local sen ningún prexuízo para o desenvolvemento do sistema radicular en ámbalas dúas especies.

Táboa 6. Efecto da fonte de carbono e do axente xelificante no enraizamento de rebentos. As letras indican diferenzas estatisticamente significativas (p-valor < 0,001).

Liña	Medio	Enraizamento (%)	Número de raíces	Lonxitude das raíces (cm)
P2Rb	RM	95,8 ± 0,6 a	4,5 ± 0,2 a	4,3 ± 0,2 a
	R1	97,9 ± 0,5 a	4,4 ± 0,3 a	4,7 ± 0,6 a
	R2	95,8 ± 0,6 a	4,1 ± 0,3 a	4,1 ± 0,3 a
	R3	97,9 ± 0,5 a	4,6 ± 0,2 a	4,6 ± 0,2 a
Piñoi	CM	96,6 ± 1,6 a	4,4 ± 0,2 a	4,9 ± 0,2 a
	M1	97,9 ± 0,5 a	4,3 ± 0,1 a	4,7 ± 0,2 a
	M2	96,6 ± 1,6 a	4,2 ± 0,2 a	5,2 ± 0,2 a
	M3	97,9 ± 0,5 a	4,4 ± 0,2 a	5,0 ± 0,3 a

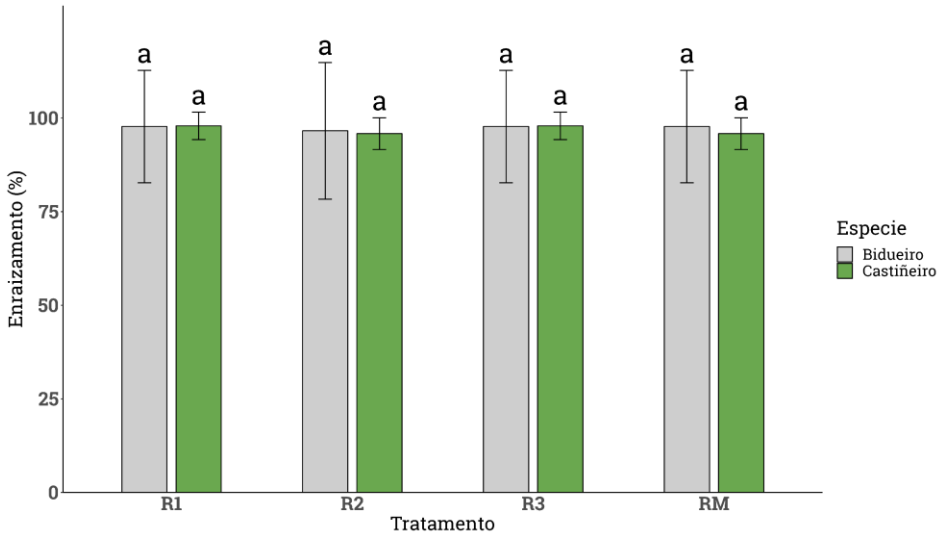


Figura 7. Porcentaxe de enraizamento de castiñeiro e bidueiro en función do medio de enraizamento. As letras indican diferenzas estatisticamente significativas (p valor < 0,001) dentro de cada especie.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.2 Efecto da concentración do AIB na calidade do enraizamento

Probáronse diferentes concentracións de AIB para escoller aquela que permita conseguir unha taxa de enraizamento óptima ao tempo que se evitan os posíbeis efectos secundarios da adición de AIB (Táboa 7). No caso da liña con características xuvenís, o P2Rb, as taxas de enraizamento mantivéronse estábeis por riba do 90%, variando entre o 93,2 ± 4,6 do enraizamento en medio suplementado con AIB 25 µM e o 97,2 ± 4,8 dos enraizamentos que se levaron a cabo nos medios suplementados con AIB 2,5 µM e 5 µM (Fig. 9). O número medio de raíces formadas en cada rebento enraizado foi desde as 3,1 ± 1,4 até os 4,3 ± 1,9 nos medios suplementados con AIB 2,5 µM e con AIB 10 µM, respectivamente, mentres que no caso da lonxitude media das raíces esta foi de 3,5 ± 1,4 cm no medio suplementado con AIB 25 µM, chegando até os 4,4 ± 1,8 cm no medio con AIB 2,5 µM. Si que se observaron diferenzas estatisticamente significativas no calo, a necrose apical desenvolvida durante o proceso de enraizamento e a taxa de rebentos que foron quen de retoma-lo crecemento após a seca apical (Fig. 8). A medida que diminúe a dose de auxinas a taxa de rebentos que forman calo na base diminúen dende o 100% até o 2,8 ± 1,4 dos tratamentos con AIB 5 e AIB 2,5 µM. Unha tendencia similar se observa na necrose apical onde o 72% ± 5,1 dos rebentos enraizados en medio suplementado con AIB 25 µM desenvolveron este problema, que se reduciu até o 2,8% ± 4,8 nos rebentos enraizados en medio suplementado con AIB 2,5 µM. A tendencia contraria foi observada na taxa de re-emprendemento do crecemento onde até no 69% ± 5,8 dos rebentos enraizados con AIB 5 µM houbo unha xema que retomase o crecemento do explante mentres que nos rebentos enraizados con AIB 25 µM tan só o 14% ± 5,2 foron quen de retomaren o crecemento (Fig. 10). Esta redución na concentración de auxinas no medio de cultivo non prexudica o desenvolvemento radicular e tampouco produce diferenzas na cinética do enraizamento onde as T50 oscilaron entre 8 e 9 días. Porén, unha menor concentración de auxinas si reduciu de xeito significativo a formación de calo, a necrose apical e permitiu retoma-lo crecemento nos rebentos coa xema apical necrosada.

Con respecto á liña de castiñeiro estabelecida a partir de material adulto, P2C, tanto o incremento como a diminución da concentración de auxinas ocasionaron un devalo na taxa de enraizamento, caendo dun 27,6% ± 2,6 no caso do AIB 25 µM até o 7,4% ± 1,8 no AIB 12,5 µM. O resto dos parámetros non sufriron modificacións estatisticamente significativas agás na cinética do enraizamento, onde unha menor concentración de auxina acelerou a emerxencia das raíces, pasando a T50 desde os 14 días nos medios suplementados con AIB 50 µM até os 8 días dos rebentos enraizados nunha concentración de AIB de 12,5 µM.

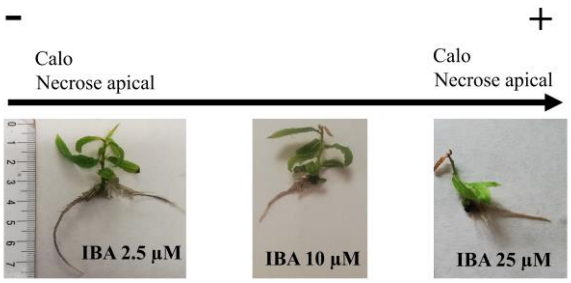


Figura 8. Rebentos de P2Rb enraizados en condicións crecentes de auxinas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Táboa 7. Efecto da concentración de AIB no enraizamento

Liña	AIB (µM)	Enraizamento (%)	Número de raíces	Lonxitude das raíces (cm)	Calo (%)	Necrose apical (%)	T50	Reemp. (%)
P2Rb	2,5	97,2 ± 4,8 a	3 ± 1,4 a	4,4 ± 1,8 a	2,8 ± 1,4 c	2,8 ± 4,8 d	8 a	-
	5	97,2 ± 4,8 a	3,7 ± 1,0 a	4,1 ± 0,8 a	2,8 ± 1,4 c	27,7 ± 4,1 c	7 a	69,9 ± 5,8 a
	10	94,4 ± 4,8 a	4,3 ± 1,9 a	4,2 ± 1,5 a	5,3 ± 2,1 c	27,7 ± 4,1 c	8 a	30,3 ± 4,6 b
	12,5	94,4 ± 9,3 a	4,2 ± 1,9 a	4,1 ± 1,2 a	27,7 ± 4,6 b	55,3 ± 9,2 b	8 a	20,4 ± 11,7 c
	25	93,2 ± 4,6 a	4,0 ± 1,8 a	3,5 ± 1,4 a	100 ± 0 a	72 ± 5,1 a	7 a	14 ± 5,2 c
P2C	12,5	7,4 ± 1,8 c	1,0 ± 0,0 a	3,4 ± 2,4 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a	8 a	0,0 ± 0 a
	25	27,6 ± 2,6 a	2,0 ± 1,1 a	1,5 ± 1,2 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a	12 b	0,0 ± 0 a
	50	18,5 ± 3,2 b	1,3 ± 0,6 a	2,3 ± 1,1 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a	14 b	0,0 ± 0 a

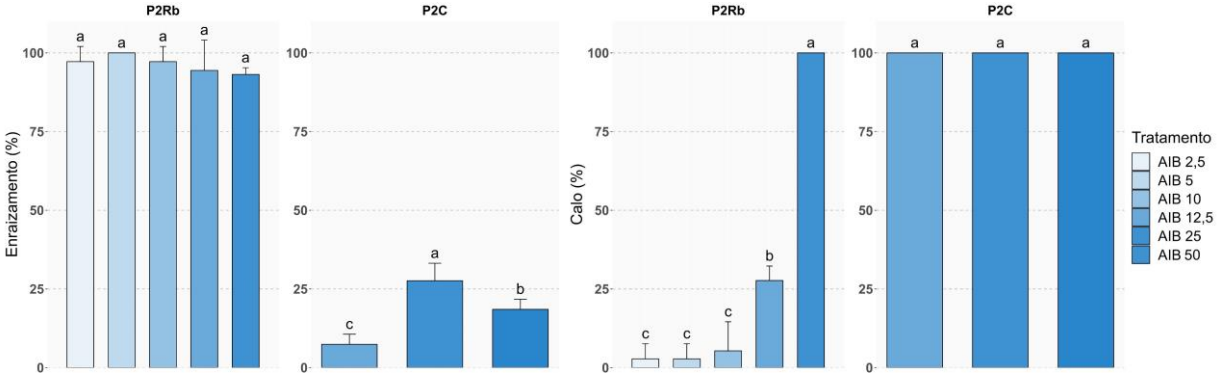


Figura 9. Porcentaxe de enraizamento (esquerda) e de calo (dereita) nos rebentos de P2Rb e P2C. As letras indican diferencias estatisticamente significativas (p-valor < 0,05).

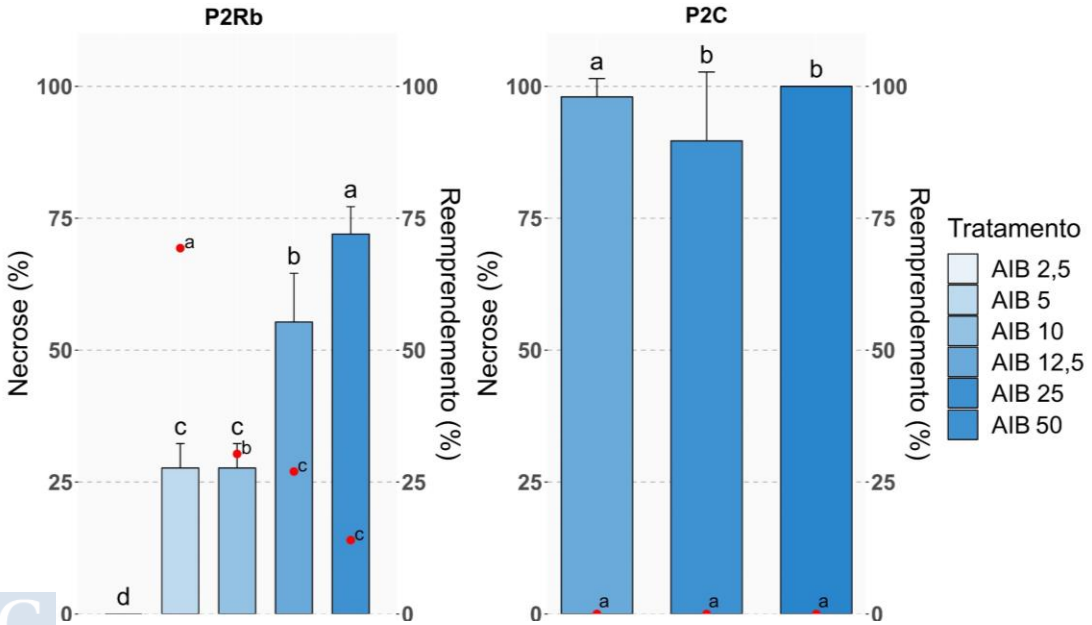


Figura 10. Porcentaxe de rebentos necrosados (escala esquerda) e de rebentos que retomaron o crecemento (escala dereita) de P2C e P2Rb. As letras indican diferencias estatisticamente significativas (p-valor < 0,05).

4.2.3 Efecto da inhibición do transporte polar de auxinas

Na liña P2Rb de castiñeiro comprobouse o efecto da inhibición do transporte polar de auxinas na calidade do enraizamento. Para isto empregouse AIB 25 µM complementado con NPA (0, 100 ou 200 µM) e AIB 2,5 µM con NPA 0 ou 100 µM (Táboa 8).

A inhibición do transporte polar de auxinas reduce a taxa de enraizamento nun xeito que depende da dose de NPA aplicada; pasa dun 100% de enraizamento no caso do tratamento AIB 25 µM ao 59,3% ± 7,4 do tratamento AIB 25 µM + NPA 100 µM e ao 20,2% ± 4,8 do tratamento AIB 25 µM + NPA 200 µM. Ao reduci-la cantidade de auxinas exóxenas a inhibición é máis acusada caendo dende o 92,4% ± 8,4 nos enraizamentos en AIB 2,5 µM até o 0% no caso do AIB 2,5 µM + NPA 100 µM. As mesmas tendencias se confirman no caso da lonxitude das raíces e do número medio de raíces formadas en cada rebento enraizado. A inhibición do transporte polar de auxinas tamén aumenta a formación de calo e agrava a necrose apical. O 100% dos rebentos enraizados en medio AIB 2,5 µM + NPA 100 formaron calo, en contrasto co 25,3% ± 8,6 dos enraizados en AIB 2,5 µM, sen adición de NPA. No caso da necrose apical o control producía necrose no 9,3% ± 2,3 dos rebentos, porcentaxe que se elevou até o 60,7% ± 5,5 cando se bloqueou o transporte polar de auxinas. Ademais, o transporte polar de auxinas tamén intervén no tempo que tardan as raíces en emerxer e a súa inhibición por parte do NPA pode atrasa-la súa aparición até nunha semana. A nivel visual, a inhibición do transporte polar de auxinas produce unhas follas con forma de serra e unhas estruturas brancas similares ao calo ao longo de todo o talo (Fig. 11).

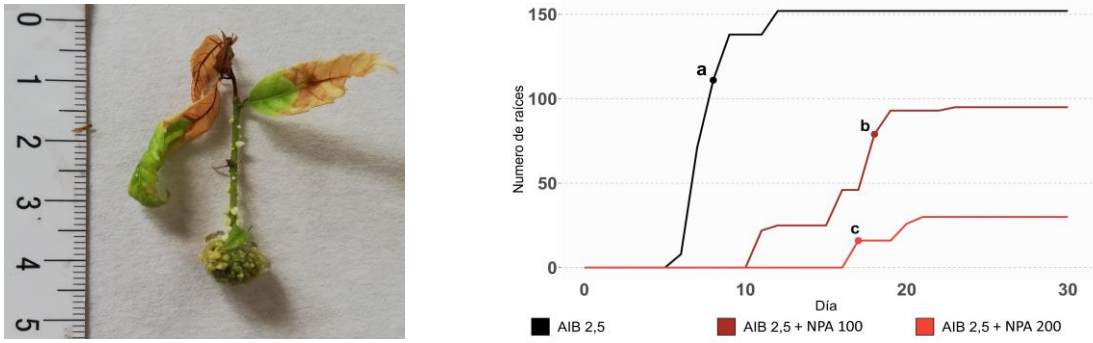


Figura 11. Esquerda: Rebento de P2Rb trala inhibición do transporte polar de auxinas. Dereita: Cinética do enraizamento de P2Rb tralo tratamento con AIB, AIB + NPA 100 e AIB + NPA 200.

Táboa 8. Efecto fenotípico da concentración de inhibición do transporte polar de auxinas no enraizamento (esquerda). Cinética do enraizamento con diferentes concentracións de NPA (dereita). As letras indican diferencias estatisticamente significativas (p-valor < 0,05).

Tratamento (µM)	Enraizamento (%)	Número de raíces	Lonxitude das raíces (cm)	Calo (%)	Necrose apical (%)	T50
AIB 25	100 ± 0 a	6,3 ± 0,7 a	3,6 ± 0,3 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a	8 ± 1,5 a
AIB 25 + NPA 100	59,3 ± 7,4 b	3,3 ± 0,4 b	2,4 ± 0,3 b	100 ± 0 a	100 ± 0 a	18 ± 3,1 b
AIB 25 + NPA 200	20,2 ± 4,8 c	2,5 ± 0,5 c	1,1 ± 0,2 c	100 ± 0 a	100 ± 0 a	17 ± 3,6 b
AIB 2,5	92,4 ± 8,4 a	2,1 ± 0,1 a	4,6 ± 0,4 a	25,3 ± 8,6 b	9,3 ± 2,3 b	8 ± 2,6
AIB 2,5 + NPA 100	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b	100 ± 0 a	60,7 ± 5,5 a	-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.4 Efecto das xiberelinas no enraizamento adventicio

Para avalia-los efectos das xiberelinas no enraizamento adventicio da liña P2Rb fixéronse enraizamentos con AIB 2,5 µM e diferentes concentracións de GA_3 (0, 5, 10, 20, 40 µM) e do inhibidor da síntese de xiberelinas, o PBZ (0, 5, 10, 20, 40 µM). Non se observaron diferenzas estatisticamente significativas entre parámetros como a formación de calo na base dos rebentos, a taxa de necrose apical ou de re-emprendemento do crecemento nin tampouco na cinética de enraizamento (Táboa 9). Tocante á taxa de enraizamento, o enraizamento en medio AIB 2,5 µM + GA_3 40 µM reduce a porcentaxe de rebentos enraizados até o 6,5% ± 0,9 desde o 90,7% ± 2,3 dos que foran enraizados en AIB 2,5 µM. No caso dos medios en que as auxinas foron suplementadas con PBZ non se observou un aumento signifiactivo na porcentaxe de enraizamento, debido probabelmente a que as taxas obtidas en AIB 2,5 µM son tan altas que é difícil observar eses cambios. As xiberelinas parecen influír negativamente no número de raíces formadas en cada rebento enraizado (Fig. 13). Deste xeito no tratamento control, AIB 2,5 µM, o número medio de raíces era de 4,1 ± 0,2, mentres que este número baixou até a 1 ± 0 raíces en medio AIB 2,5 µM + GA_3 40 µM. Este parámetro subiu até as 5,4 ± 0,2 raíces cando o medio de enraizamento foi en medio suplementado con AIB 2,5 µM + PBZ 40 µM. Na lonxitude das raíces a tendencia foi a contraria, cun aumento desde os 3,6 ± 0,1 cm no medio con AIB 2,5 µM até os 6,5 ± 0,7 cm no medio con AIB 2,5 µM + GA_3 40 µM e, complementariamente, cunha diminución até os 1,8 ± 0,1 cm no medio con AIB 2,5 µM + PBZ 40 µM (Fig. 14).

Cando o AIB se combina co GA_3 e PBZ a un tempo vólvense a valores similares aos dos rebentos enraizados en medio con AIB 2,5 µM. Cando se combinan os tratamentos de GA_3 e PBZ sen adición de auxinas non se conseguiu o enraizamento de ningún rebento.

Para comproba-las consecuencias da acción das xiberelinas endóxenas realizáronse experimentos de enraizamento en PBZ 40 µM sen adición de auxinas no medio. Nestes experimentos acadouse unha porcentaxe de rebentos enraizados de 40,7% ± 3,7, cun número medio de raíces de 1,2 ± 0,1 e cunha lonxitude media de 3 ± 0,3 cm (Fig. 12). Realizáronse experimentos onde se combinaba PBZ 40 µM con NPA 100 µM e a taxa de enraizamento reduciuse até o 0%.

Na liña con características adultas, P2C, realizáronse enraizamentos en AIB 25 µM só e AIB 25 µM suplementado ben con GA_3 40 µM, ben con PBZ 40 µM. Nesta liña non se observaron as mesmas tendencias que en P2Rb, xa que non houbo diferenzas estatisticamente significativas entre os tratamentos en ningún dos parámetros. Tamén se realizaron enraizamentos con PBZ 40 µM sen AIB, mais nesta liña este tratamento mantivo a taxa de enraizamento no 0%.



Figura 12. Rebentos de P2Rb enraizados con AIB (A), AIB + GA (B) e PBZ sen auxinas (C).

Táboa 9. Efecto das xiberelinas no enraizamento adventicio. Letras indican diferencias estatisticas.

Liña	Tratamento (µM)	Enraizamento (%)	Número de raíces	Lonxitude das raíces (cm)	T50
P2Rb	AIB 2,5	90,7 ± 2,3 a	4,1 ± 0,2 bc	3,6 ± 0,1 b	11 ± 0,4 a
	AIB 2,5 + GA_3 5	92,6 ± 7,4 a	4,6 ± 0,3 ab	5 ± 0,2 ab	11 ± 0 a
	AIB 2,5 + GA_3 10	86,1 ± 5,6 a	3,2 ± 0,2 cd	4,3 ± 0,6 ab	12 ± 0,6 a
	AIB 2,5 + GA_3 20	87 ± 6,1 a	3 ± 0,2 cde	5,6 ± 0,2 a	12 ± 0,6 a
	AIB 2,5 + GA_3 40	6,5 ± 0,9 c	1,0 ± 0 de	6,5 ± 0,7 a	15 ± 0,6 a
	AIB 2,5 + PBZ 5	95,4 ± 2,4 a	3,7 ± 0,2 bc	2,3 ± 0,1 bc	11 ± 0,3 a
	AIB 2,5 + PBZ 10	93,8 ± 0,7 a	3,7 ± 0,4 bc	3 ± 0,3 bc	11 ± 0,9 a
	AIB 2,5 + PBZ 20	88,7 ± 3,2 a	4,6 ± 0,2 ab	2,1 ± 0,1 bc	9 ± 0,3 a
	AIB 2,5 + PBZ 40	94,2 ± 2,5 a	5,4 ± 0,2 a	1,8 ± 0,1 c	10 ± 0,3 a
	AIB 2,5 + GA_3 40 + PBZ 40	94,4 ± 3,2 a	4,4 ± 0,3 bc	3,7 ± 0,1 b	8 ± 0 b
	AIB 0 + GA_3 40 + PBZ 40	0 ± 0 c	- e	- d	-
	AIB 0 + PBZ 40	40,7 ± 3,7 b	1,2 ± 0,08 d	3 ± 0,3 b	12 ± 0 a
	AIB 0 + PBZ 40 + NPA 100	0 ± 0 c	- e	- d	-
P2C	AIB 25	41,5 ± 4,9 a	2 ± 0,3 a	3,1 ± 0,4 a	14 ± 0,2 a
	AIB 25 + GA_3 40	36,8 ± 6,8 a	2,4 ± 0,3 a	3,5 ± 0,2 a	15 ± 0,1 a
	AIB 25 + PBZ 40	41,5 ± 4,9 a	2,3 ± 0,3 a	3 ± 0,2 a	14 ± 0,4 a
	AIB 0 + PBZ 40	0 ± 0 b	-	-	-

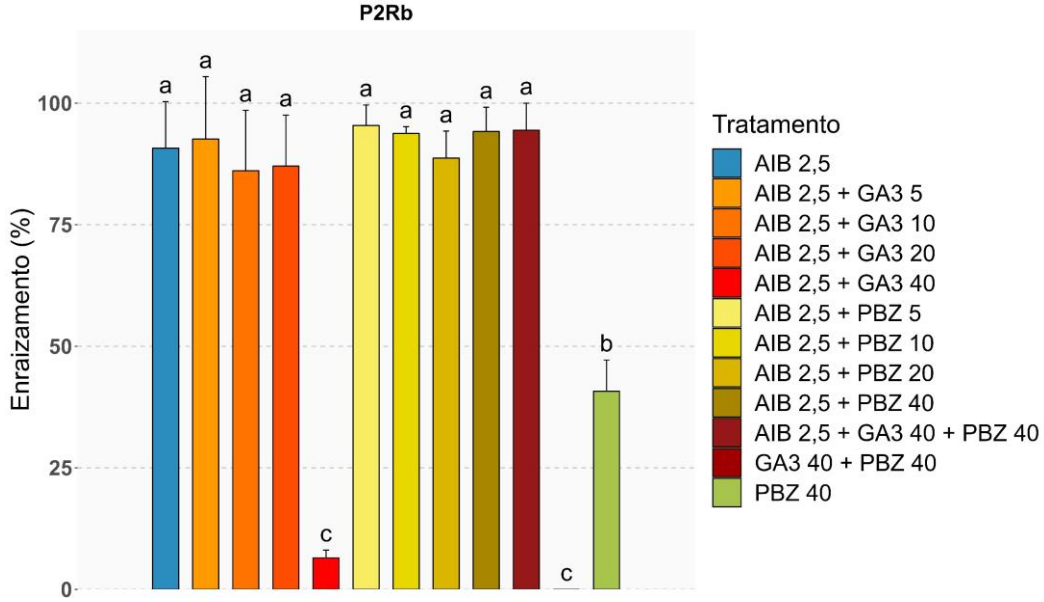


Figura 13. Taxa de enraizamento de P2Rb tralos tratamentos que aumentan ou inhiben as xiberelinas. As letras indican diferencias estatisticamente significativas (p-valor < 0,05).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

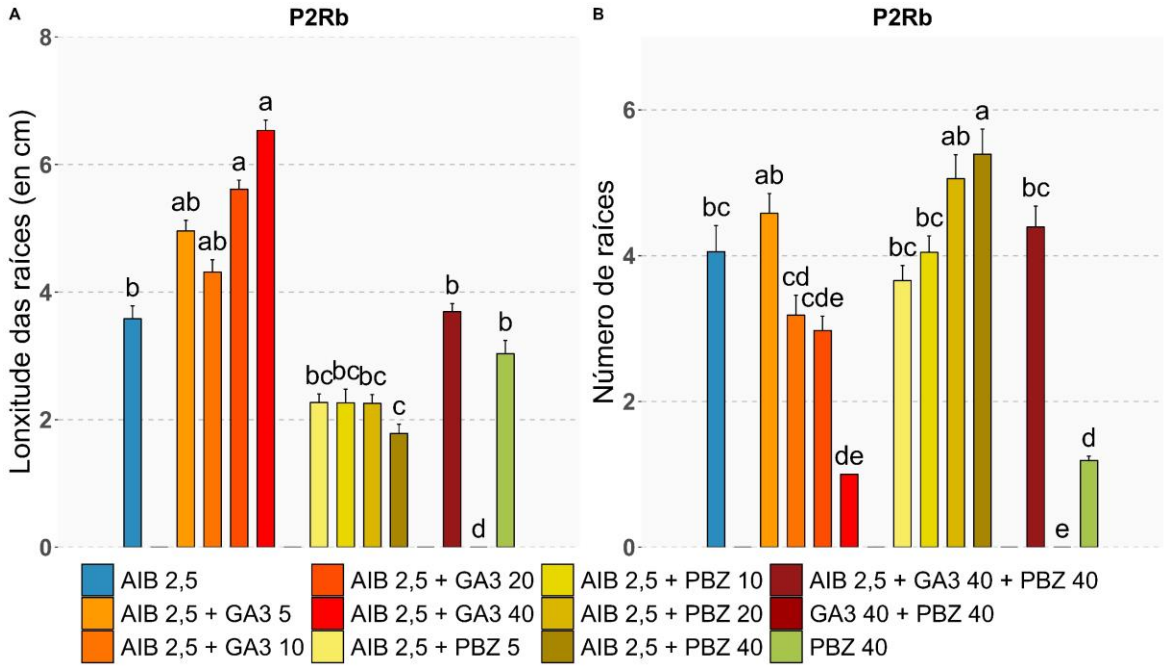


Figura 14. Lonxitude das raíces (A) e número de raíces formadas (B) en P2Rb tralos tratamentos que aumentan ou inhiben as xiberelinas. As letras indican diferencias estatisticamente significativas (p-valor < 0,05).

4.2.5 Efecto do etileno no enraizamento

Para comproba-los efectos do etileno no enraizamento adventicio de P2Rb e P2C realizáronse experimentos con AIB 2,5 µM e 25 µM, respectivamente, e son suplementados ou cun promotor do etileno – o ACC – nunha concentración 30 µM, ou cun inhibidor da acción do etileno – o $AgNO_3$ – na mesma concentración (Fig. 15). Amais, no caso de P2C tamén se probou un pre-tratamento no que se incubaron os rebentos durante 48 h en tiosulfato de prata (STS) 20 µM para seren despois incubados durante 48 h adicionais en AIB 25 µM.

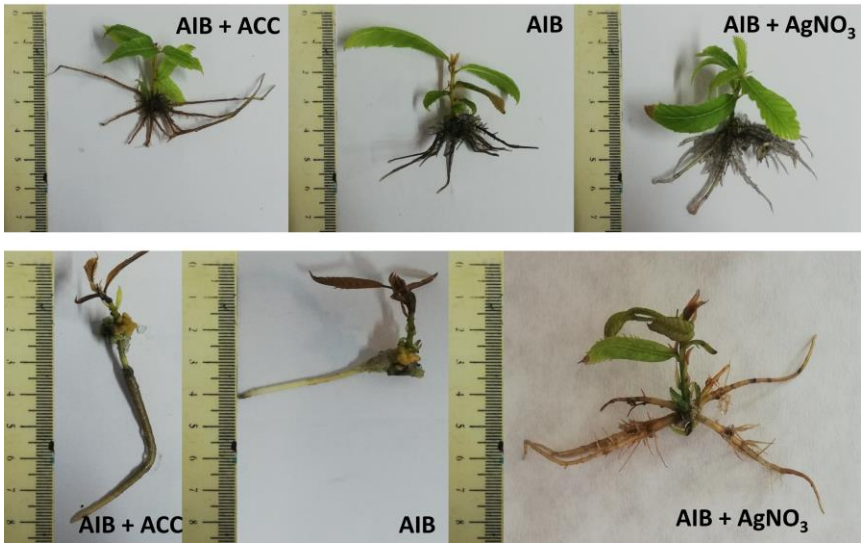


Figura 15. Rebentos de P2Rb (arriba) e P2C (abaixo) ao seren enraizados con AIB, AIB + ACC e AIB + nitrato de prata.

No caso da liña P2Rb só o calo amosou diferenzas estatisticamente significativas; cunha promoción por parte da acción do etileno e unha diminución ao ser inhibida esta hormona (Táboa 10). Pola banda do P2C o etileno amosou un efecto inhibidor do enraizamento, cunha taxa do 18,1 % ± 0,5 no medio suplementado con ACC, mentres que a porcentaxe do tratamento control só con auxinas é do 27,1% ± 2,0 e aumenta até o entorno do 40% nos tratamentos nos que se aplica un inhibidor do etileno. Tendencias similares se atopan no número e na lonxitude das raíces. O número medio de raíces formado no medio control é de 1,3 ± 0,3; este baixa até 1,0 ± 0,0 coa adición de ACC e aumenta até o 2,8 ± 0,5 no medio suplementado con nitrato de prata e até o 3,0 ± 0,3 nos rebentos pre-tratados con STS. No caso da lonxitude media das raíces esta descende coa promoción do etileno desde o 5,9 ± 0,3 cm até o 1,7 ± 0,7 cm namentres que medra até os 7,9 ± 0,5 cm e os 6,8 ± 0,2 nos tratamentos inhibidores do etileno (Fig. 16).

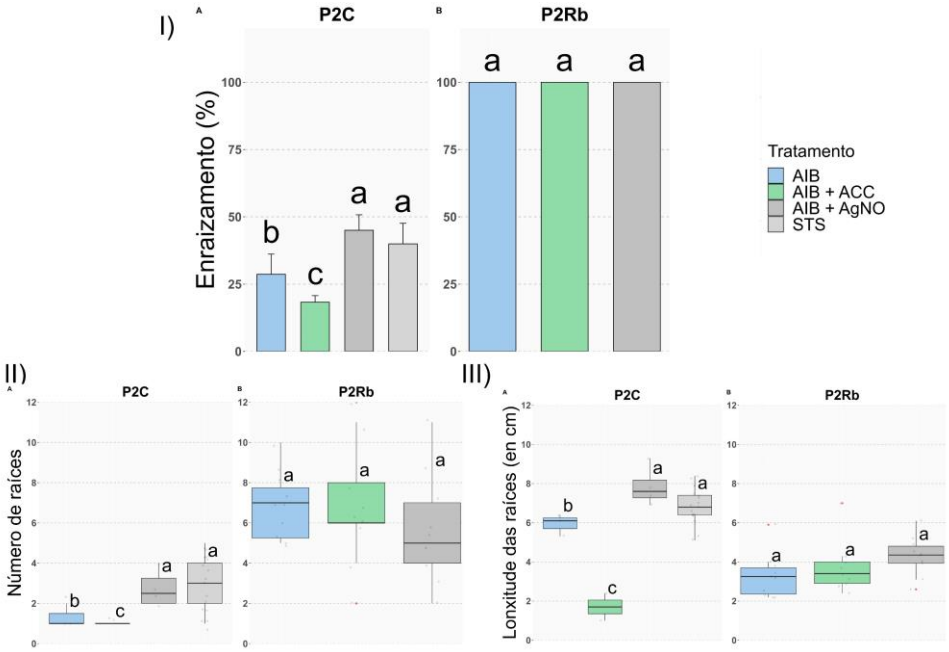


Figura 16. Porcentaxe de enraizamento (I), número de raíces (II) e lonxitude das raíces, en cm (III) de rebentos de P2Rb e P2C. As letras indican diferenzas estatísticas dentro de cada liña (p-valor < 0,05).

Táboa 10. Efecto do etileno no enraizamento adventicio. As letras indican diferenzas estatísticas (p-valor < 0,05).

Liña	Tratamento (µM)	Enraizamento (%)	Número de raíces	Lonxitude das raíces (cm)	Calo (%)	Necrose apical (%)
P2Rb	AIB 2,5	100 ± 0 a	6,9 ± 0,5 a	3,3 ± 0,4 a	12,5 ± 1,3 b	0 ± 0 a
	AIB 2,5 + ACC 30	100 ± 0 a	6,9 ± 1,0 a	3,7 ± 0,5 a	29,4 ± 1,4 a	0 ± 0 a
	AIB 2,5 + $AgNO_3$ 30	100 ± 0 a	6,5 ± 1,1 a	4,3 ± 0,3 a	9,7 ± 1,6 c	0 ± 0 a
P2C	AIB 25	27,1 ± 2 b	1,3 ± 0,3 b	6 ± 0,3 b	100 ± 0 a	100 ± 0 a
	AIB 25 + ACC 30	18,1 ± 0,5 c	1 ± 0 c	1,7 ± 0,7 c	100 ± 0 a	100 ± 0 a
	AIB 25 + $AgNO_3$ 30	44,4 ± 1,8 a	2,8 ± 0,5 a	7,9 ± 0,5 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a
	pre-trat STS 20	41,1 ± 1,2 a	3 ± 0,3 a	6,8 ± 0,2 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.6 Efecto do peróxido de hidróxeno no enraizamento adventicio

Para proba-los efectos do estrés oxidativo no enraizamento adventicio de P2Rb fixéronse enraizamentos con H_2O_2 100 mM, con ou sen suplemento de AIB 2,5 µM. Estes experimentos de indución de enraizamento fixéronse incubando os rebentos nos medios durante tres tempos diferentes (3, 24 e 72 h). O peróxido de hidróxeno tivo un efecto promotor do enraizamento, do número de raíces e da lonxitude media das mesmas e aumentaba a súa eficacia canto máis se prolongaba o tratamento (Táboa 11). Deste xeito, nos casos dos tratamentos con H_2O_2 durante 72 horas a taxa de enraizamento foi do 58,3% ± 8,9, o número de raíces foi de 1,92 ± 0,2 e a lonxitude media das raíces foi de 4,6 ± 0,4 cm. Porén, cando estas se combinaban coas auxinas esta promoción do sistema radicular diminuía caendo a taxa de enraizamento até o 35,2% ± 1,9 e a lonxitude media decreceu até os 2,5 ± 0,9 cm. A tendencia contraria se observou co calo e a seca apical, que diminuíron co tempo de exposición ao tratamento, excepto no caso do necrose, en que o tratamento con H_2O_2 sen auxina a inhibe case por completo (5,6% ± 2,8) en tódolos tempos (Fig. 17, dereita). Do mesmo xeito que no resto dos tratamentos nos medios con auxinas os efectos do H_2O_2 eran menores. Tamén un aumento no tempo de exposición ao H_2O_2 acelerou a emerxencia das raíces.

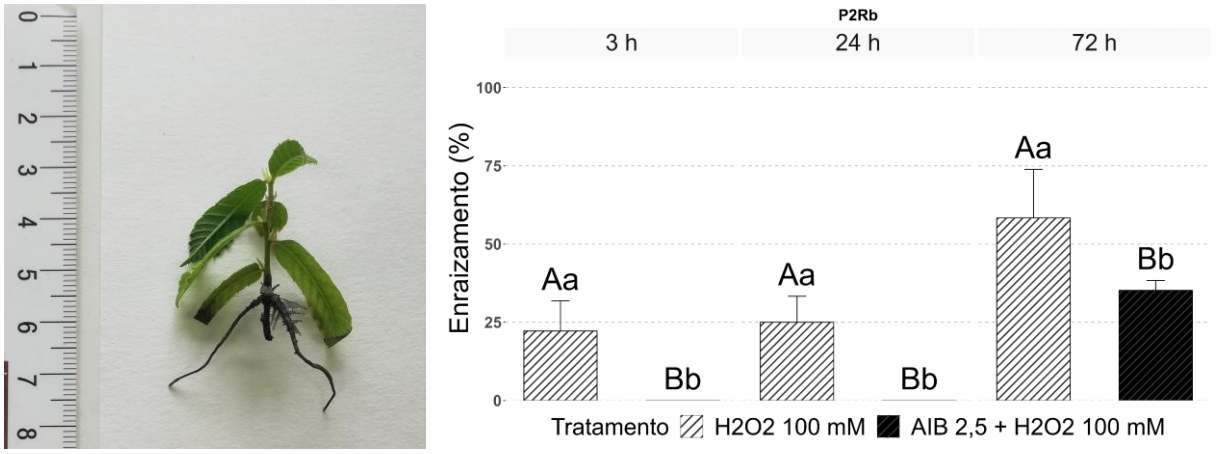


Figura 17. Exemplo dun rebento de P2Rb enraizado con H_2O_2 (esquerda) e a porcentaxe de enraizamento (dereita) dos tratamentos con H_2O_2 e H_2O_2 + AIB. As letras maiúsculas indican diferenzas estatisticamente significativas entre os tratamentos e as letras minúsculas diferenzas estatísticas dentro de cada punto temporal

Táboa 11. Efecto do H_2O_2 no enraizamento de P2Rb. Letras indican diferenzas estatisticamente significativas

Tratamento (µM/mM)	Tempo (en horas)	Enraizamento (%)	Número de raíces	Lonxitude das raíces (cm)	Calo (%)	Necrose apical (%)	T50
AIB 0 + H_2O_2 100	3	22,2 ± 5,5 c	1,0 ± 0 b	1 ± 0,2 c	100 ± 0 a	5,6 ± 2,8 d	21 ± 0,3 a
AIB 2,5 + H_2O_2 100	3	0 ± 0 d	-	-	100 ± 0 a	100 ± 0 a	-
AIB 0 + H_2O_2 100	24	25 ± 4,8 c	1,0 ± 0 b	4,6 ± 1,5 a	0 ± 0 c	5,5 ± 2,8 d	19 ± 1 a
AIB 2,5 + H_2O_2 100	24	0 ± 0 d	-	-	11 ± 5,5 b	88,9 ± 5,5 b	-
AIB 0 + H_2O_2 100	72	58,3 ± 8,9 a	1,9 ± 0,2 a	4,6 ± 0,4 a	0 ± 0 c	5,5 ± 2,8 d	13 ± 1,2 b
AIB 2,5 + H_2O_2 100	72	35,2 ±1,8 b	2 ± 0,4 a	2,5 ± 0,9 b	0 ± 0 c	55,6 ± 5,6 c	12 ± 0,7 b

4.2.7 Efecto dun derivados da urea durante o enraizamento

A influencia da 3,4-MDPU foi estudada tanto en P2Rb coma no clon Saínza de carballo. Para isto, os rebentos da liña P2Rb foron incubados durante cinco días en medio con AIB 25 μM mentres que o carballo foi incubados en medio suplementado con AIB 125 μM durante 24 h. Para ambas especies o medio de indución con auxina foi suplementado con diferentes concentracións de 3,4-MDPU (0, 0,1, 1 e 10 μM). Como se amosa na táboa 12 ningún destes tratamentos amosou diferenzas estatisticamente significativas na taxa de enraizamento, no número de raíces ou na lonxitude das mesmas. A 3.4-MDPU si que aliviou en cambio a necrose apical dos rebentos e aumentou a taxa de explantes que retomaban o crecemento trala necrose nunha forma proporcional á dose aplicada. No castiñeiro, en ausencia de 3,4-MDPU, a necrose apical foi de 88,9% ± 12,0 e só o 4,2% ± 4,0 dos rebentos retomaban o crecemento mentres que en carballo estas taxas eran de 46,8% ± 2,0 e do 10% ± 1,0. respectivamente. Coa aplicación de 3,4-MDPU nunha concentración de 10 μM a necrose apical baixou até o 55,6% ± 20,0 do castiñeiro e o 8,3% ± 4,0 no carballo, cunhas taxas de re-emprendemento do crecemento respectivas do 85,8% ± 9,0 e do 67,2% ± 5,0. Ademais, coa adición de difenil-ureas incluso na concentración máis baixa (0,1 μM) a taxa de formación de calo no castiñeiro diminuíu desde o 88,9% ± 12,0 até o 39,0% ± 0,7. As difenil-ureas tamén melloraron a calidade do sistema radicular coa promoción de raíces laterais (Fig. 18). Resultados similares foron observados en carballo, cunha mellora na formación de calo e nas taxas de necrose apical e de rebentos que son quen de retomaren o crecemento após sufriren necrose do seu ápice.

Táboa 12 Efecto da 3,4-MDPU no enraizamento adventicio. Letras diferentes indican diferenzas estatísticas.

Liña	Tratamento (μM)	Enraizamento (%)	Numero de raíces	Lonxitude das raíces (cm)	Calo (%)	Necrose apical (%)	Reemp. (%)
P2Rb	AIB 25 + 3,4 MDPU 0	94,4 ± 1,0 a	5,3 ± 0,4 a	4,1 ± 0,2 a	83,3 ± 2 a	88,9 ± 12,0 a	4,2 ± 4,0 c
	AIB 25 + 3,4 MDPU 0,1	100 ± 0 a	4,8 ± 0,4 a	4,1 ± 0,2 a	39,0 ± 0,7 b	63,9 ± 6,0 b	56,6 ± 0,5 b
	AIB 25 + 3,4 MDPU 1	100 ± 0 a	5 ± 0,4 a	4 ± 0,2 a	35,6 ± 3 b	72,2 ± 7,0 b	53,5 ± 11,0 b
	AIB 25 + 3,4 MDPU 10	100 ± 0 a	4,7 ± 0,4 a	3,9 ± 0,1 a	36 ± 3,3 b	55,6 ± 20,0 b	85,8 ± 9,0 a
Saínza	AIB 125 + 3,4 MDPU 0	80,5 ± 2,8 a	3,0 ± 0,3 a	3,9 ± 5,0 a	87,6 ± 3,7 a	46,8 ± 2,0 a	10 ± 1,0 d
	AIB 125 + 3,4 MDPU 0,1	75,0 ± 0,0 a	3,0 ± 0,2 a	3.5 ± 1,1 a	32,1 ± 3,1 b	30,7 ± 2,0 b	30,7 ± 3,0 c
	AIB 125 + 3,4 MDPU 1	75,0 ± 2,4 a	2,6 ± 0,2 a	4,0 ± 1,6 a	35,4 ± 6,2 b	15,5 ± 4,0 c	51,7 ± 4,0 b
	AIB 215 + 3,4 MDPU 10	86,1 ± 5,6 a	2,8 ± 0,2 a	3,9 ± 1,1 a	31,8 ± 3,6 b	8,3 ± 4,0 c	67,2 ± 5,0 a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

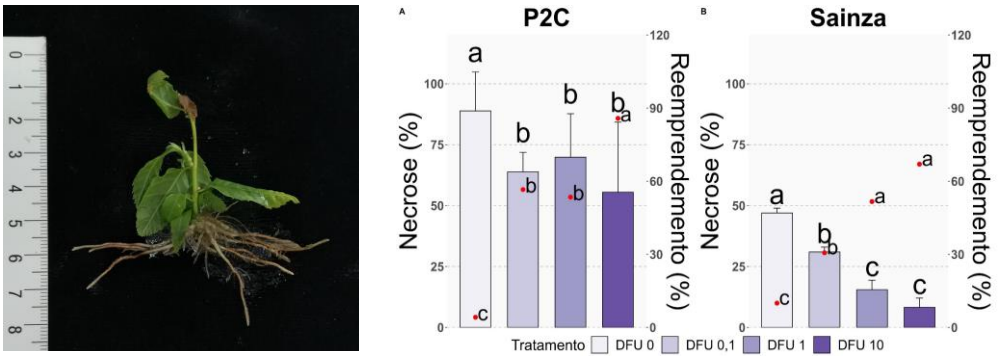


Figura 18. Exemplo de rebento enraizado con 3,4-MDPUs (esquerda) e porcentaxe de necrose (barras) e re-emprendemento do crecemento (puntos vermellos) dos rebentos de P2C e Saínza (gráfica). As letras indican diferenzas estatisticamente significativas dentro de cada liña (p < 0,05).

4.2.8 Efecto da diminución do calcio no enraizamento adventicio

Para valora-lo efecto do calcio no enraizamento adventicio tratáronse rebentos de P2C cun medio con AIB 25 µM suplementado con EGTA, un axente quelante do calcio, nunha concentración 10 µM e empregouse medio con AIB 25 µM como control (Táboa 13). A adición de EGTA no medio de enraizamento produciu unha inhibición total do enraizamento co que demostra que a acción do calcio é condición *sine qua non* do enraizamento adventicio.

Táboa 13. Efecto da diminución do calcio no enraizamento adventicio de P2C. Letras indican diferenzas estatisticamente significativas.

Tratamento (µM)	Enraizamento (%)	Número de raíces	Lonxitude das raíces (cm)	Calo (%)	Necrose apical (%)	T50	Reemp. (%)
AIB 25	27,6 ± 3,2 a	1,4 ± 0,2 a	6,5 ± 0,3 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a	5 ± 1,0	0 ± 0 a
AIB 25 + EGTA 10	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b	100 ± 0 a	100 ± 0 a	-	0 ± 0 a

4.2.9 Efecto dun bio-estimulador natural no enraizamento

Quíxose comproba-la eficacia dun bio-estimulador natural do enraizamento, o Charkor. Para iso analizouse a resposta das liñas de castiñeiro P2Rb e P2C ante unha concentración de Charkor 1ml/L e comparouse co control, o medio con auxinas empregado de forma habitual nesta tese, é dicir, AIB 2,5 µM no caso da liña con características xuvenís e AIB 25 µM na liña de material adulto. En P2Rb o Charkor non influíu na taxa de enraizamento, que se mantivo próxima ao 100% tanto no tratamento como no control. Porén, si que aumentou o número de raíces que pasaron de 3,0 ± 0,4 nos enraizamentos con AIB a 4,9 ± 0,8 nos rebentos enraizados con Charkor aínda que esas raíces foron máis curtas, cunha baixada desde os 4,5 ± 0,4 cm até os 2,9 ± 0,2 cm (Fig. 20). Unha tendencia similar se observou en P2C, con máis raíces e máis curtas nos explantes que se enraizaron por medio do Charkor (Fig. 19) só que no caso da liña con características maduras este bio-estimulador tamén afectou á taxa de enraizamento que aumentou desde o 27,6% ± 3,2 cando se empregaba AIB para promove-lo enraizamento até o 38,9% ± 2,7 cando o Charkor foi combinado co AIB para promove-lo enraizamento (Táboa 14).

Táboa 14. Efectos do Charkor no enraizamento adventicio. As letras indican diferenzas estatisticamente significativas (p-valor < 0,05).

Liña	Medio	Enraizamento (%)	Número de raíces	Lonxitude das raíces (cm)	Necrose apical (%)	T50	Reemp. (%)
P2Rb	AIB 2,5	97,2 ± 2,8 a	3,0 ± 0,4 b	4,5 ± 0,4 a	2,7 ± 2,7 a	8 ± 1 a	0 ± 0 a
	AIB 2,5 + Charkor	100 ± 0 a	4,9 ± 0,8 a	2,9 ± 0,4 b	2,7 ± 2,7 a	8 ± 0,7 a	0 ± 0 a
P2C	AIB 25	27,6 ± 3,2 b	2 ± 0,4 b	6,4 ± 0,8 a	100 ± 0 a	12 ± 0,6 a	0 ± 0 a
	AIB 25 + Charkor	38,9 ± 2,8 a	4,4 ± 2,3 a	2,2 ± 0,5 b	100 ± 0 a	11 ± 0,4 a	0 ± 0 a

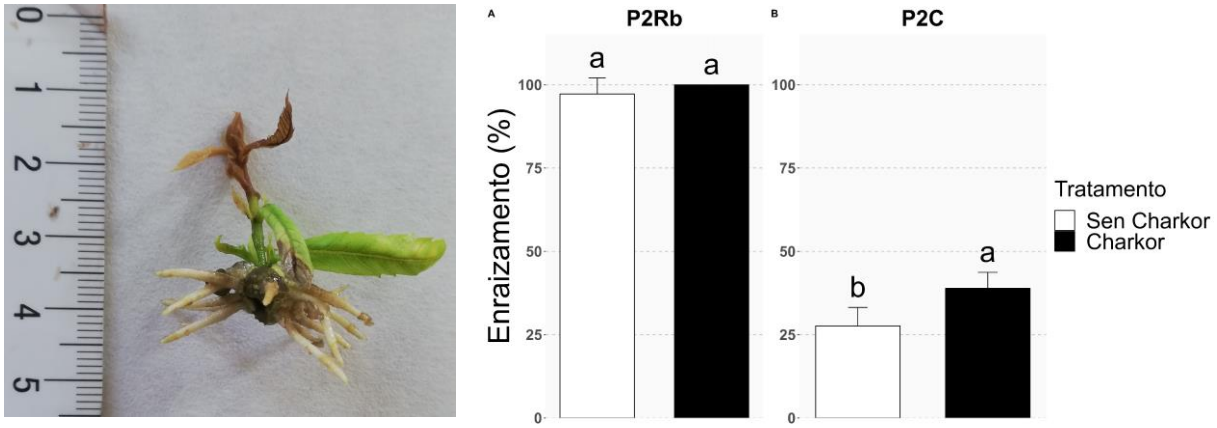


Figura 19. Esquerda: Foto dun rebento de P2C enraizado con Charkor e AIB. Dereita: Porcentaxe de enraizamento dos rebentos de P2Rb e P2C. As letras indican diferenzas estatisticamente significativas dentro de cada liña (p-valor < 0,05).

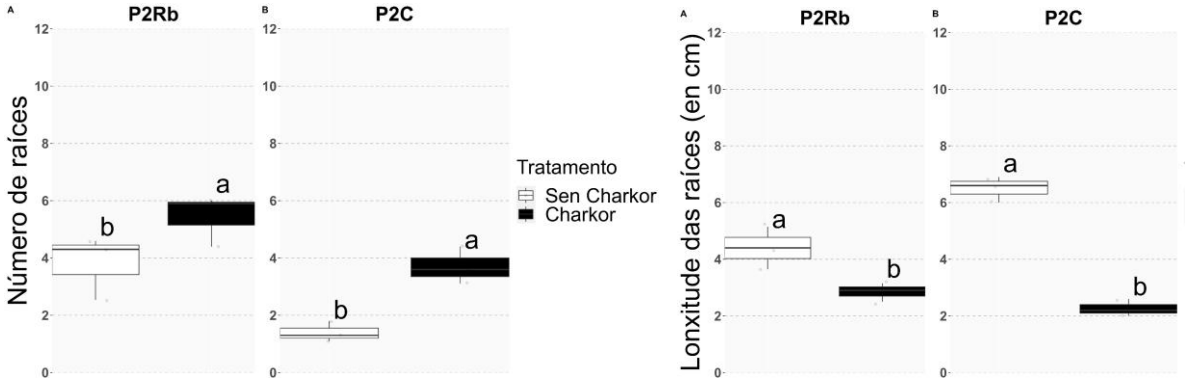


Figura 20. Número de raíces formadas (esquerda) e lonxitude das raíces (dereita) en P2Rb e P2C tralos tratamentos con AIB con e sen Charkor. As letras indican diferencias estatisticamente significativas en cada liña (p-valor < 0,05).

Táboa 15. Resumo dos tratamentos e a liña na que se aplicou cada un. O "+" indica unha promoción da variábel estudada, o "-" unha inhibición e o "0" unha falta de cambio no parámetro.

Tratamento	Liña	Enraizamento (%)	Numero de raíces	Lonxitude das raíces	Calo (%)	Necrose apical (%)	T50	Re-emprendemento (%)
Medios alternativos	P2Rb	0	0	0	0	0	0	0
Diminución AIB	P2Rb	0	0	0	-	-	0	+
	P2C	-	0	0	0	0	-	0
AIB + NPA	P2Rb	-	-	-	+	+	+	-
AIB + GA_3	P2Rb	-	-	+	0	0	+	0
	P2C	0	0	0	0	0	0	0
AIB + PBZ	P2Rb	0	+	-	0	0	0	0
	P2C	0	0	0	0	0	0	0
PBZ	P2Rb	+	+	+	0	0	0	0
PBZ + NPA	P2Rb	-			0	0		0
AIB + ACC	P2Rb	0	0	0	0	0	0	0
	P2C	-	-	-	0	0	+	0
AIB + $AgNO_3$/STS	P2Rb	0	0	0	0	0	0	0
	P2C	+	+	+	0	0	-	0
H_2O_2	P2Rb	+	+	+	-	-	+	+
AIB + 3,4-MDPUs	P2Rb	0	0	0	-	-	0	+
AIB + EGTA	P2C	-			0	0		0
Charkor	P2Rb	0	+	-	0	0	0	0
	P2C	+	+	-	0	0	0	0

4.3 ANÁLISES TRANSCRITÓMICOS

As lecturas obtidas do proceso de secuenciación foron previamente analizadas para comprobar unha serie de parámetros de calidade da secuenciación – que se presentan no material suplementario deste traballo – como a cantidade de xigabytes de datos obtida en cada experimento, a calidade das lecturas, o número de lecturas, os pares de bases medios, ou a eficiencia do mapeado contra o xenoma de referencia. Trala análise dos datos obtidos en DESeq2 fixéronse análises comparativas que renderon diferentes DEGs – en formato LOC, que corresponde ao GeneID dos xenes de *Quercus suber* – entre os tratamentos analizados (Fig 21). Unha vez obtidos os listados de DEGs realizáronse análises de enriquecemento para saber que rutas de sinalización están a ser activadas con cada tratamento e así poder explica-lo modo en que os diferentes tratamentos afectan ao enraizamento.

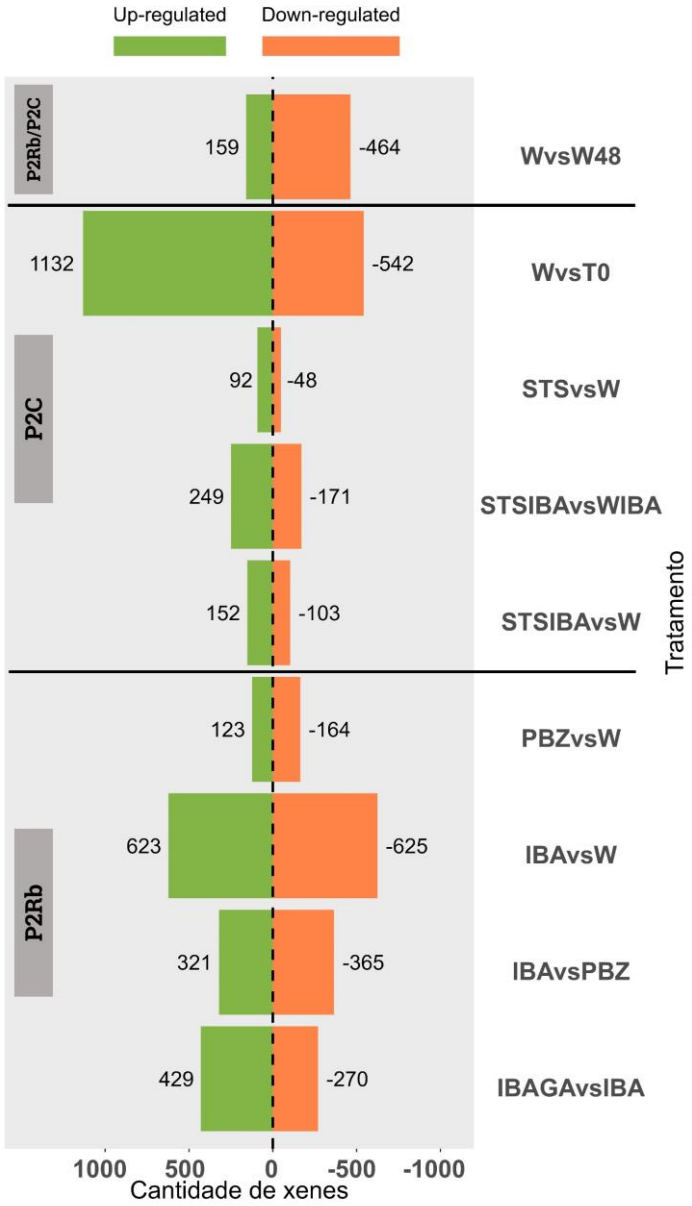


Figura 21. Número de xenes sobre-expresados no tratamento e no control nos experimentos de transcritómica realizados.

4.3.1 Resposta aos tratamentos de corte

En tódolos tratamentos de enraizamento os rebentos foron cortados e o calo basal foi eliminado. Ao se-lo corte un elemento necesario e constante en tódolos experimentos de enraizamento analizáronse os cambios na expresión que teñen lugar após o corte – mostras denominadas W, do inglés *wounding*.

No material de P2Rb recolléronse mostras do tratamento de corte ás 24, 48 e 72 horas e foron comparadas coa expresión basal no tempo 0 (T0) (Fig 22). No conxunto dos tres días, un total de 1132 xenes se expresaban con maior intensidade nas mostras cortadas que nas que non sufriran un corte. A maior parte destes DEGs corresponderon a rutas metabólicas e á biosíntese de metabolitos secundarios, 192 e 119, respectivamente. Entre os factores de transcrición identificados (32) destacan o *zinc finger protein MAGPIE-like* (*LOC112011855*), o *LOB domain-containing protein 16* (*LOC111987550*), o *AP2/ERF and B3 domain-containing transcription factor RAV1-like* (*LOC111984860*) e até 11 factores implicados na ruta de sinalización do etileno, principalmente da familia *ERF* e da súa subfamilia *RAP2*. Ademais de co etileno, tamén se expresan de xeito diferencial receptores do ácido abscísico como o *abscisic acid receptor PYL8* (*LOC 12011863*) e das xiberelinas, *gibberellin receptor GID1B-like* (*LOC 112001486*).

Para avalia-las diferenzas na expresión xénica entre os efectos do corte en función do estado ontoxenético do material utilizado compáraronse os efectos do corte en P2C e en P2Rb ás 48 h após o corte (Fig. 23 e Fig. 24). As análises con DESeq2 amosaron que hai 159 xenes máis expresados de xeito diferencial en P2C que en P2Rb e un total de 464 xenes que se expresan de xeito diferencial máis en P2Rb ca en P2C. En P2C aparecen expresados de xeito diferencial xenes asociados a rutas metabólicas (16) así como membros da ruta de sinalización das MAPK (8) e xenes de interacción planta-patóxeno (8). Entre os transcritos relacionados coa acción das hormonas vexetais, sete en total, atópanse catro *basic form of pathogenesis-related protein 1-like*, dúas *pathogenesis-related protein 1-like* relacionados co ácido salicílico e *abscisic acid-insensitive 5-like protein 3* (*LOC112026097*). Tamén se atopou nesta listaxe a *cytokinin dehydrogenase 1-like* (*LOC111999686*) implicada na síntese de zeatina. Os únicos factores de transcrición que se expresaron en P2C foron o *LOC112026097* antes mencionado e máis un o *RAP2.4* (*LOC112038037*) implicado na sinalización do etileno. Pola outra banda, os DEGs de P2Rb corresponden principalmente a xenes de rutas metabólicas (51) e de biosíntese de metabolitos secundarios (25). Con respecto ás hormonas vexetais están representados nestes tecidos a *histidine-containing phosphotransfer protein* (*LOC112027930*), relacionada coa sinalización de citoquininas e a *auxin-responsive protein SAUR32-like* (*LOC111993973*). Foron identificados oito factores de transcrición dous *ERF* (*LOC112033865* e *LOC112009599*), un *WRKY* (*LOC112028515*) e máis dúas acetiltransferases de histonas da familia MYST (*LOC112012489* e *LOC112037860*).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

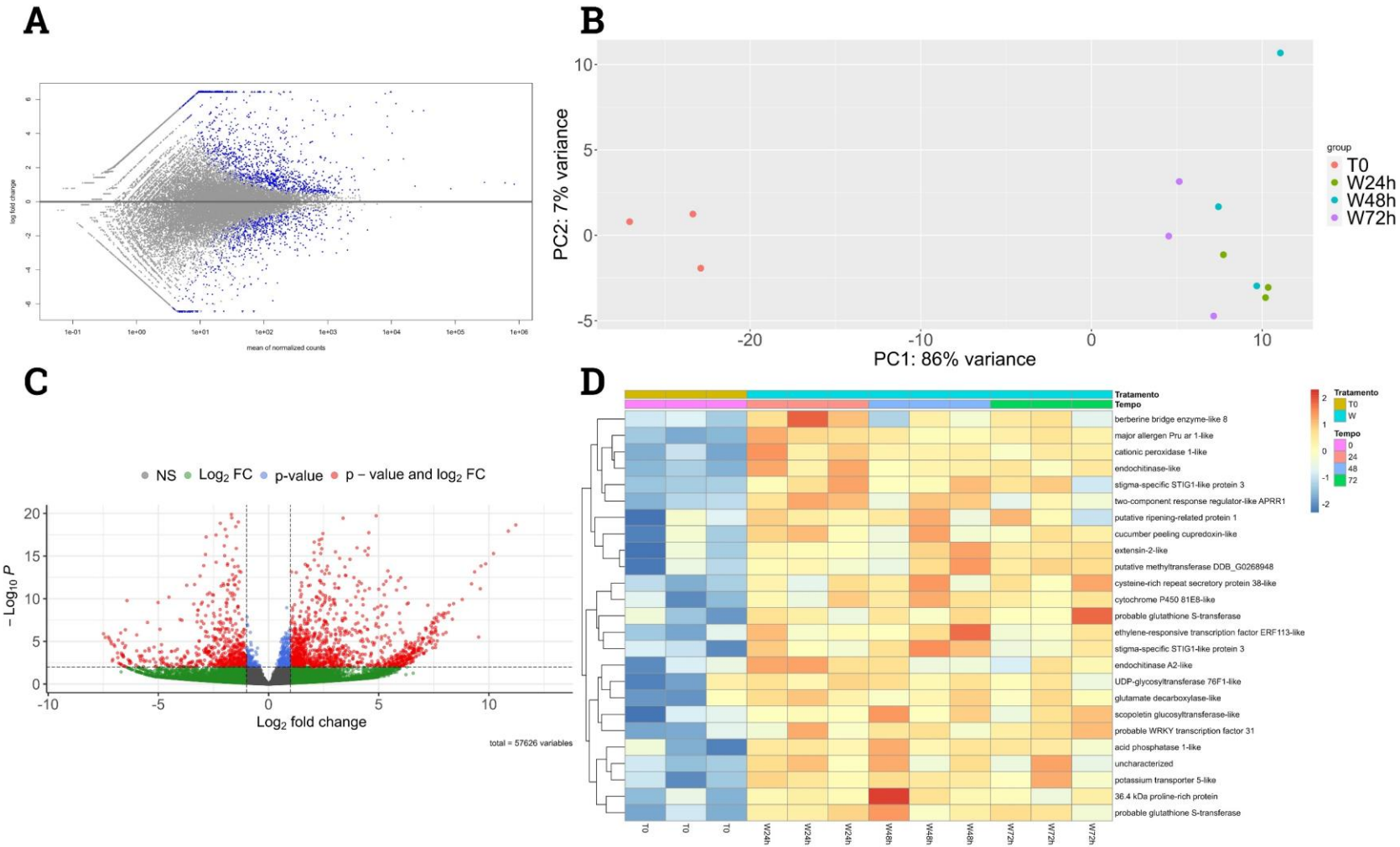


Figura 22. Gráficos asociados aos resultados obtidos da comparación entre o tempo 0 (T0) e os tratamentos de corte. A) Gráfico MA, B) Gráfico PCA, C) Volcano plot e D) Mapa de calor cos 25 xenes con maior taxa de cambio.

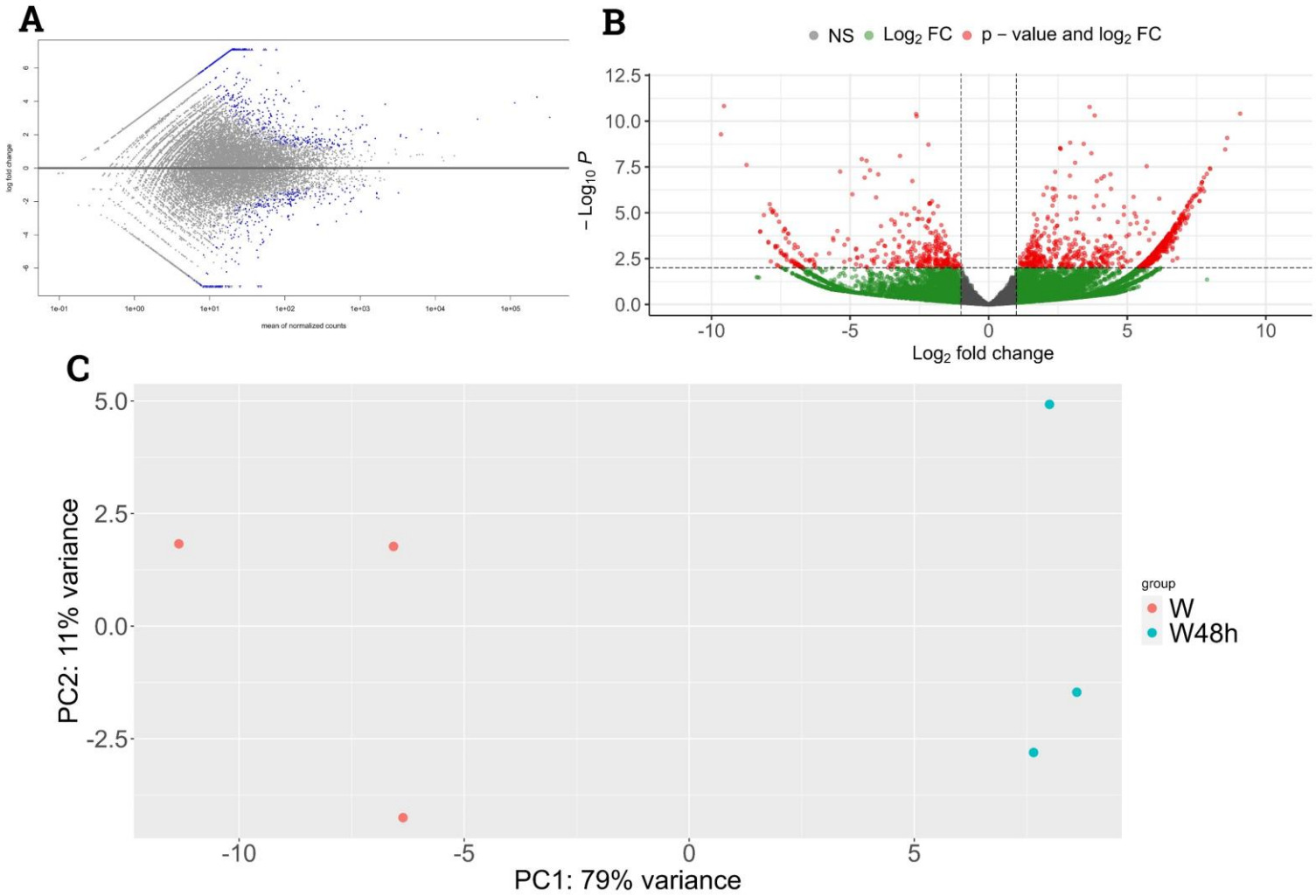


Figura 23. Gráficos asociados aos resultados obtidos da comparación entre o tratamento de corte antes do cambio de fase (W48) e despois do cambio de fase (W). A) Gráfico MA, B) Gráfico PCA e C) Volcano plot.

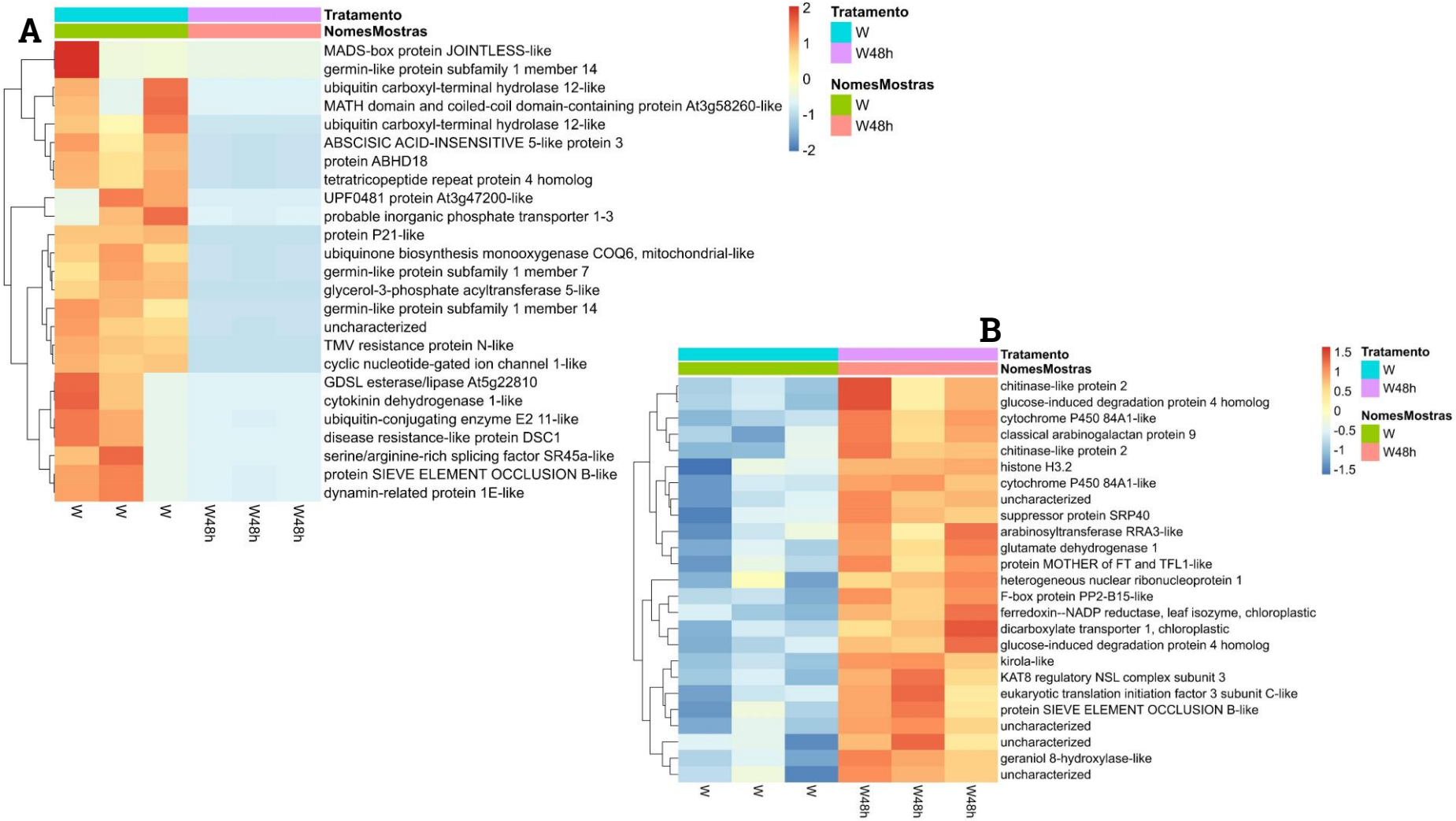


Figura 24. Gráficos asociados aos resultados obtidos da comparación entre as respostas ao tratamentos de corte en P2Rb e P2C. Mapa de calor cos 25 xenes con maior taxa de cambio antes (A) e despois (B) do cambio de fase.

4.3.2 Resposta aos tratamentos indutores do enraizamento

Unha vez obtidos os datos do corte analizáronse os xenes expresados de xeito diferencial entre os tratamentos que induciron unha resposta fisiolóxica positiva no enraizamento.

4.3.2.1 P2Rb

No P2Rb os tratamentos que se analizaron foron o AIB e o PBZ, que foron quen de enraizaren un 97,2% ± 4,8 e un 40,7% ± 3,7 dos rebentos, respectivamente. O tratamento con AIB resultou en 623 DEGs comparados co tratamento de corte (Fig. 25). De estes 623, 126 corresponden a proteínas e ARNs relacionados cos ribosomas. Entre os 19 DEGs asociados á transdución de sinais de hormonas o 74% están asociadas coa acción das auxinas, sobre todo membros da familia das AUX/IAA mais tamén están presentes as GH3.1 (*LOC112008862* e *LOC112032254*) e a *auxin-induced protein 22D-like* (*LOC111998829*). Tamén se expresaron cinco xenes relacionados coa biosíntese de ácido xasmónico e a *caffeic acid 3-O-methyltransferase-like isoform X1* (*LOC112034364*), implicada na síntese de melatonina, durante o tratamento con AIB. Entre os factores de transcrición descritos atópase a *LOB domain-containing protein 16* (*LOC111987550*) ou o *bZIP transcription factor 11-like* (*LOC111985380*). Tocante ao PBZ, este tratamento produciu a expresión diferencial de 123 xenes nos que predominan as rutas metabólicas (Fig. 26). Entre os DEGs relacionados coa sinalización das hormonas vexetais tamén atópase o receptor de xiberelinas *gibberellin receptor GID1B* (*LOC112001486*) ou, igual ca no caso do tratamento con AIB, a *auxin-induced protein 22D-like* (*LOC111998829*). Exprésanse tamén a *beta-carotene hydroxylase 2, chloroplastic-like* (*LOC112011901*), relacionada coa biosíntese de ácido abscísico e a *zeatin O-glucosyltransferase-like* (*LOC112025527*) que está implicada na biosíntese da citoquinina zeatina.

4.3.2.2 P2C

No P2C o tratamento que induciu o enraizamento foi o de inhibición do etileno. Neste caso analizáronse os DEGs obtidos polo tratamento de AIB en combinación co pre-tratamento de STS e utilizouse como control o tratamento de AIB sen pre-tratamento con STS (Fig. 27). Desta forma, o pre-tratamento con STS produciu 249 DEGs dos que a meirande parte corresponden a rutas metabólicas. Dos factores de transcrición promovidos por este tratamento sobresaen o *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 5-like protein 2* (*LOC112035599*) e dúas isoformas da *DNA (cytosine-5)-methyltransferase CMT3-like* (*LOC112031183*). Tamén resalta a expresión diferencial de diversas proteínas IAA e do *probable auxin efflux carrier component 1c* e *b*, compoñentes do transportador de auxinas PIN1 (*LOC111993333*).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

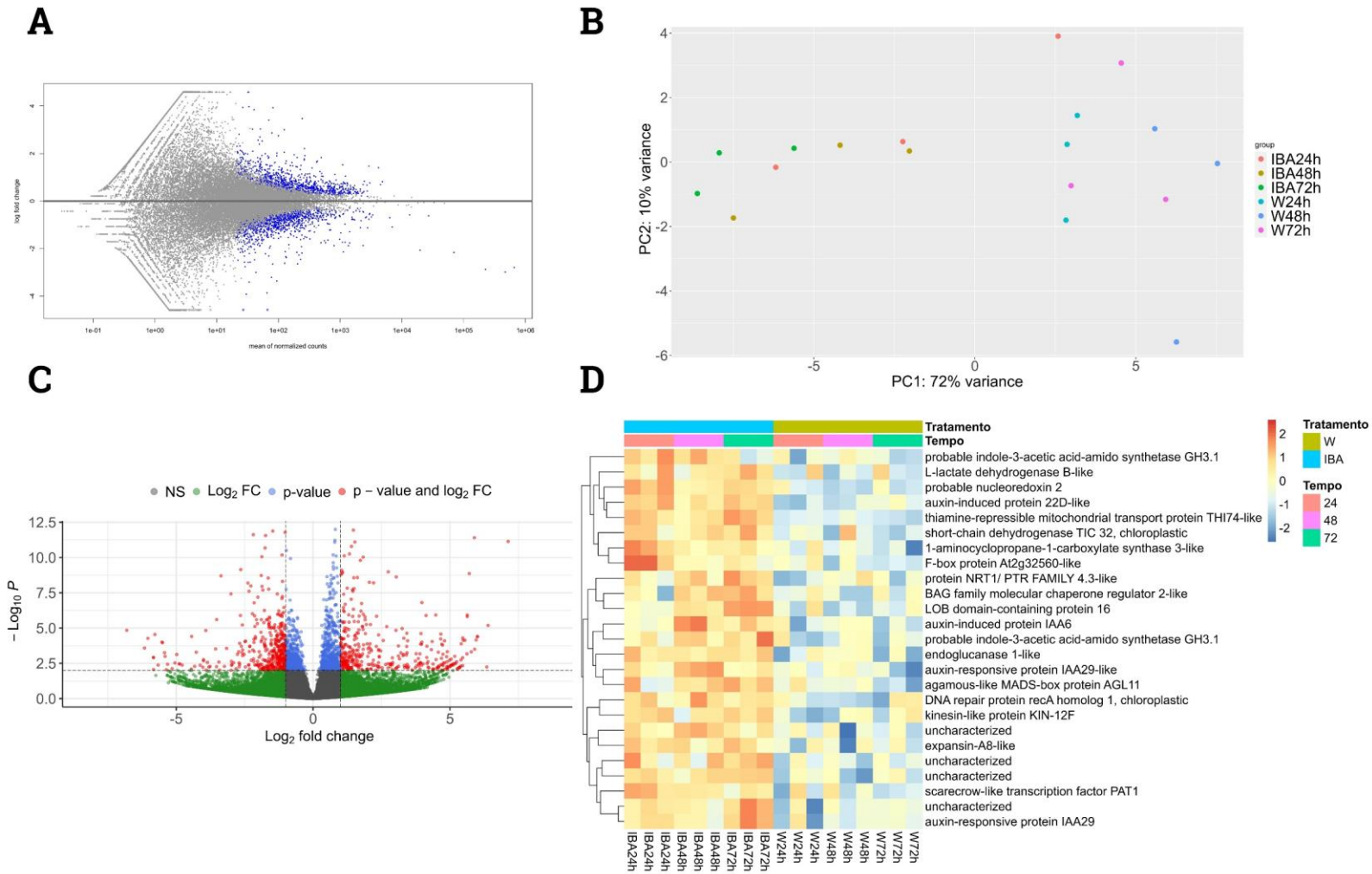


Figura 25. Gráficos asociados aos resultados obtidos da comparación entre os tratamentos de corte e os tratamentos con AIB. A) Gráfico MA, B) Gráfico PCA, C) Volcano plot e D) Mapa de calor cos 25 xenes con maior taxa de cambio.

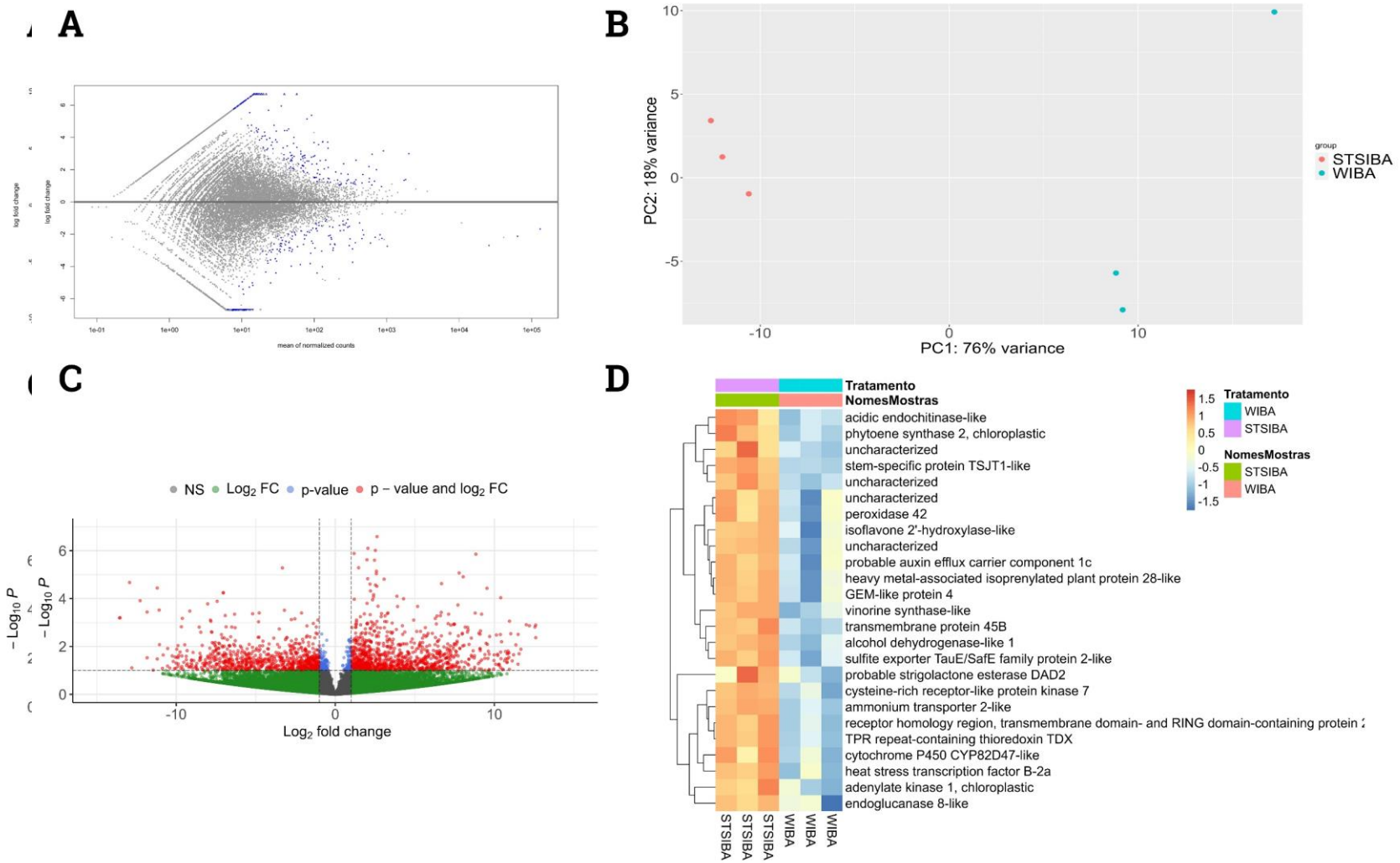


Figura 27. Gráficos asociados aos resultados obtidos da comparación entre os tratamentos de AIB con e sen pre-tratamento de STS. A) Gráfico MA, B) Gráfico PCA, C) Volcano plot e D) Mapa de calor cos 25 xenes con maior taxa de cambio.

4.3.3 Mudanzas na expresión asociadas á sinalización hormonal

Analizáronse os DEGs de tratamentos que, se ben non induciron o enraizamento, axudan a comprende-los procesos de sinalización subxacentes que poden estar a influír neste proceso.

4.3.3.1 P2Rb

Para elucida-lo papel que xogan as xiberelinas durante a inhibición do enraizamento adventicio no castiñeiro compáraronse as mostras extraídas do tratamento de AIB coas dos rebentos tratados en AIB e GA_3 (Fig. 28). A adición de xiberelinas resultou en 429 DEGs comparados co tratamento de AIB. Entre eles están o receptor do ácido abscísico *abscisic acid receptor PYL4-like* (*LOC111988217* e *LOC112017749*), o receptor do etileno *ethylene receptor 2-like* (*LOC111993884*) ou a *DELLA protein GAIP-like* (*LOC111998492*). Nos factores de transcrición expresados de xeito diferencial trala aplicación de xiberelinas están o *transcription factor MYB26* (*LOC112002235*) e varios *RAP2.3* de sinalización do etileno.

Ao compararse os tratamentos de AIB con respecto aos de PBZ (Fig. 29 e Fig. 30) observamos que hai 321 máis expresados en AIB ca no tratamento inhibidor das xiberelinas. Dos DEGs que corresponden coa sinalización hormonal case todos corresponden a factores directamente relacionados coas auxinas como diversos *AUX/IAA*, a *probable indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.1* (*LOC112032254*), ou a *auxin-induced protein 22D-like* (*LOC111998829*) mais tamén aparece un factor de transcrición do etileno (*LOC112018099*). Relacionado co etileno apareceron listados xenes de síntese como a *1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase* (*LOC111997410*) ou a *1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 3-like* (*LOC112007481*) e factores de transcrición *RAP2.12* e *ERF1*. Entre os factores de transcrición tamén estaba presente o *LOB domain-containing protein 16* (*LOC111987550*). Na comparación contraria, a avaliación dos xenes expresados de xeito diferencial nos tratamentos de PBZ a respecto dos tratamentos de AIB descubríronse 365 DEGs, grande parte deles sen caracterizar ou relacionados con ARN ribosomal. Deste xeito, a inhibición das xiberelinas favoreceu a expresión do *ethylene receptor 2-like* (*LOC111993884*), do receptor de xiberelinas *gibberellin receptor GID1B* (*LOC112001486*) e de diversos xenes relacionados coa acción das auxinas como o transportador *auxin transporter-like protein 2* (*LOC112022443*) ou varios *SAUR*. Entre os factores de transcrición promovidos polo PBZ atópanse varios *RAP2* da ruta de sinalización do etileno así como *homeobox-leucine zipper protein ATHB-12-like* (*LOC111993269*) ou *homeobox-leucine zipper protein REVOLUTA* (*LOC112038274*).

Como o PBZ actúa inhibido as xiberelinas tamén se comprobou cales son os DEGs no tratamento de corte a respecto do tratamento con PBZ (Fig. 30). Desta forma, ao saber que as xiberelinas inhiben o enraizamento e que o PBZ inhibe as xiberelinas, analízase que xenes ponde inhibi-lo enraizamento espontáneo por acción das xiberelinas endóxenas e poden expresarse grazas á acción do PBZ. Nesta comparativa atopamos 164 DEGs dos que só hai dous relacionados con hormonas: a proteína *auxin-responsive protein IAA27-like* (*LOC111986580*) e mailo *abscisic acid receptor PYL4-like* (*LOC111988217*). Tamén se expresan de xeito diferencial a *S-adenosylmethionine synthase 3* (*LOC112032159*) e a *1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase* (*LOC111997410*) que participan na biosíntese do etileno e a *ent-kaurene oxidase like* (*LOC112007897*) implicada na síntese de xiberelinas.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

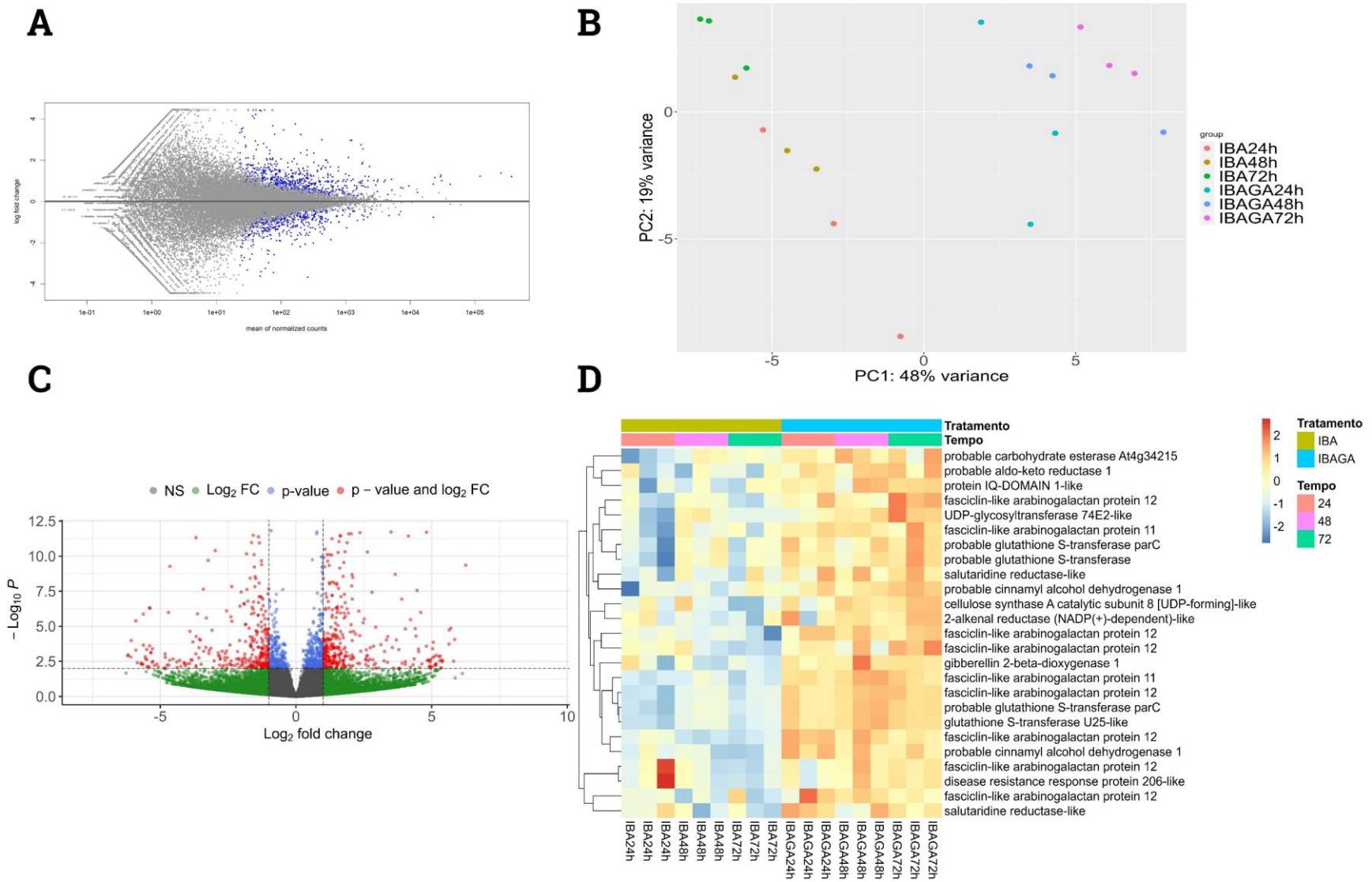


Figura 28. Gráficos asociados aos resultados obtidos da comparación entre os tratamentos de AIB con e sen xiberelinas. A) Gráfico MA, B) Gráfico PCA, C) Volcano plot e D) Mapa de calor cos 25 xenes con maior taxa de cambio.

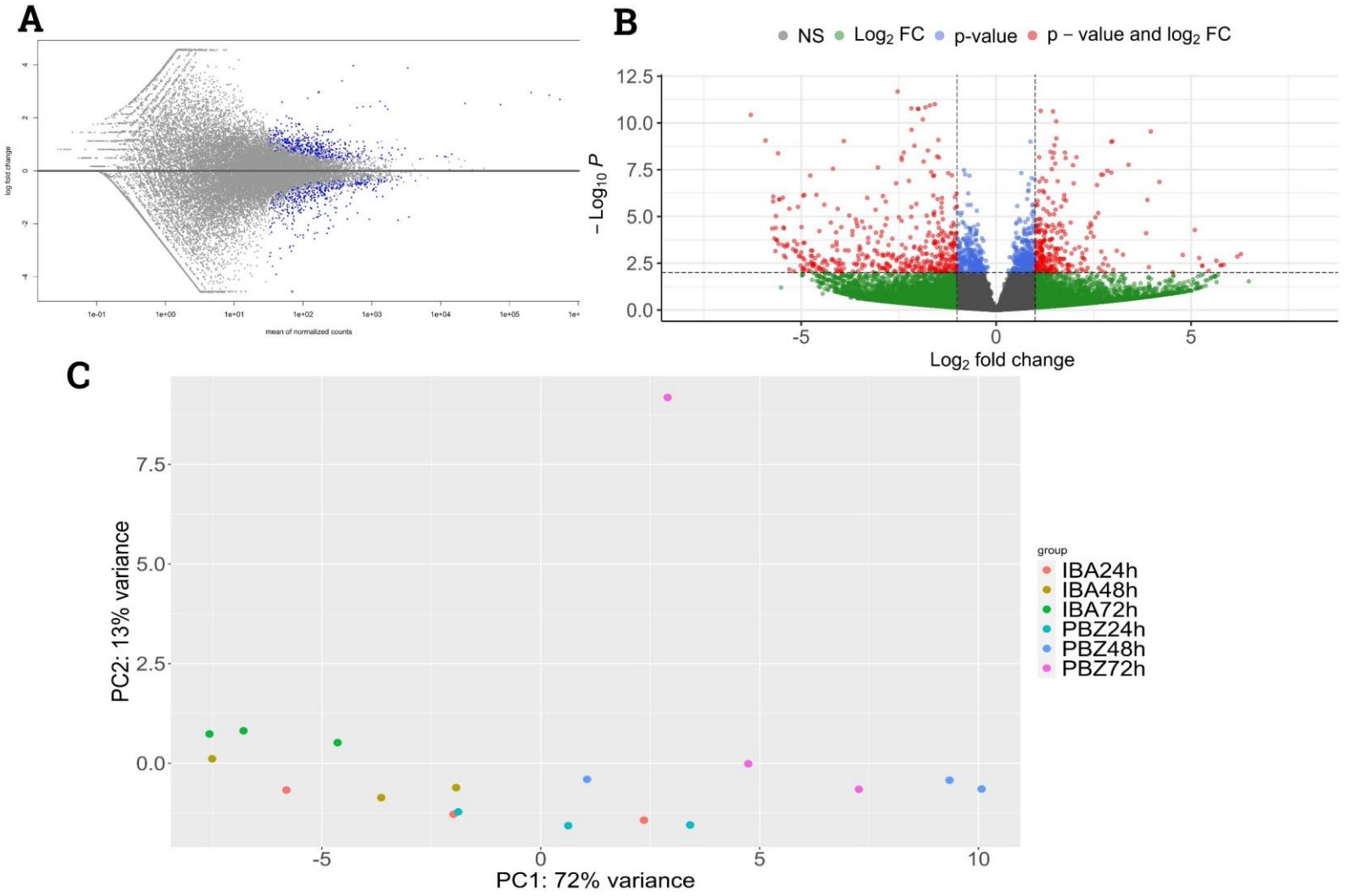


Figura 29. Gráficos asociados aos resultados obtidos da comparación entre os tratamentos de AIB e os tratamentos con PBZ. A) Gráfico MA, B) Gráfico PCA e C) Volcano plot.

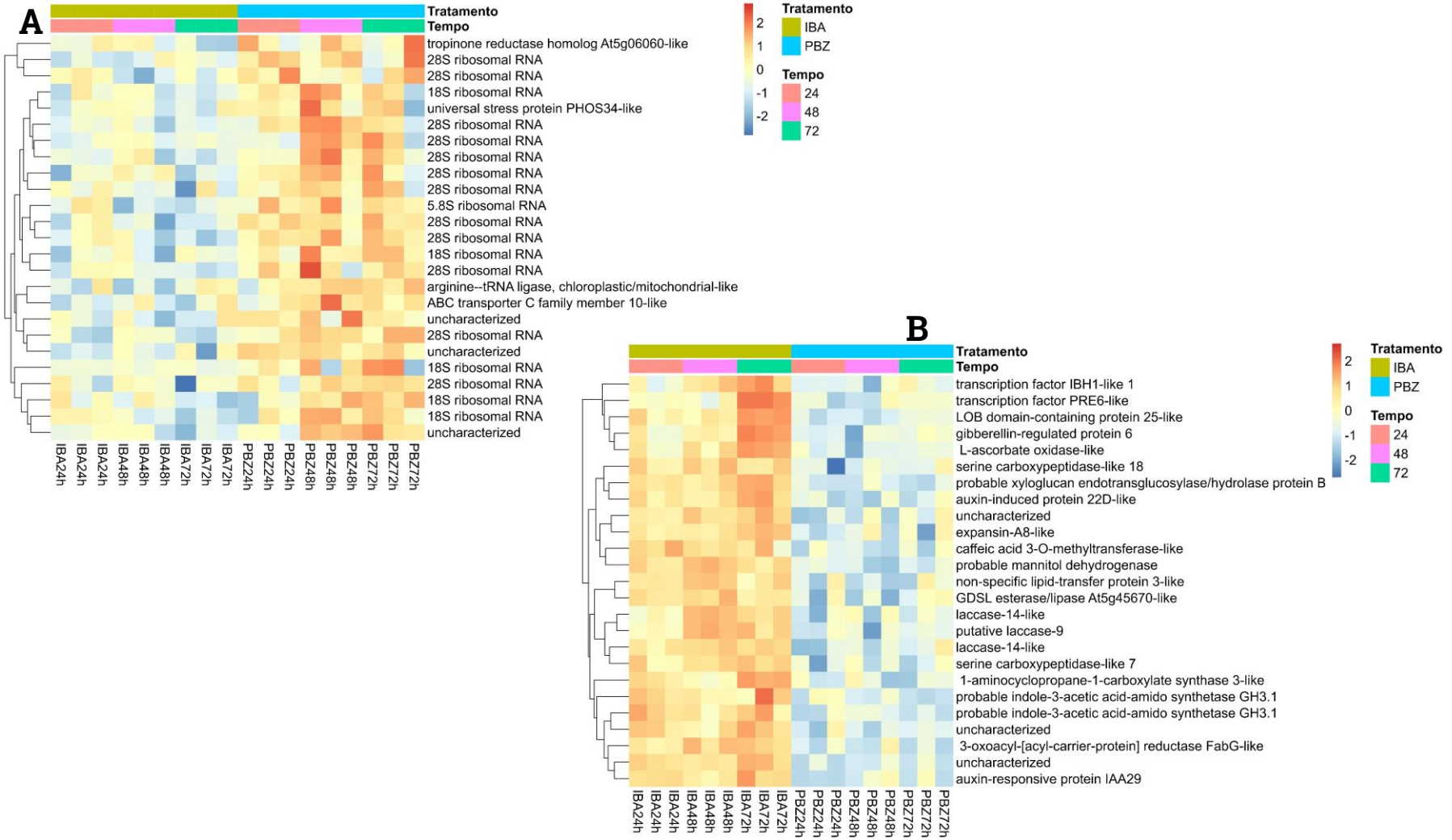


Figura 30. Gráficos asociados aos resultados obtidos da comparación entre os tratamentos de corte e os tratamentos con PBZ. Mapa de calor cos 25 xenes con maior taxa de cambio no tratamento de PBZ con respecto ao AIB (A) e AIB con respecto ao PBZ (B).

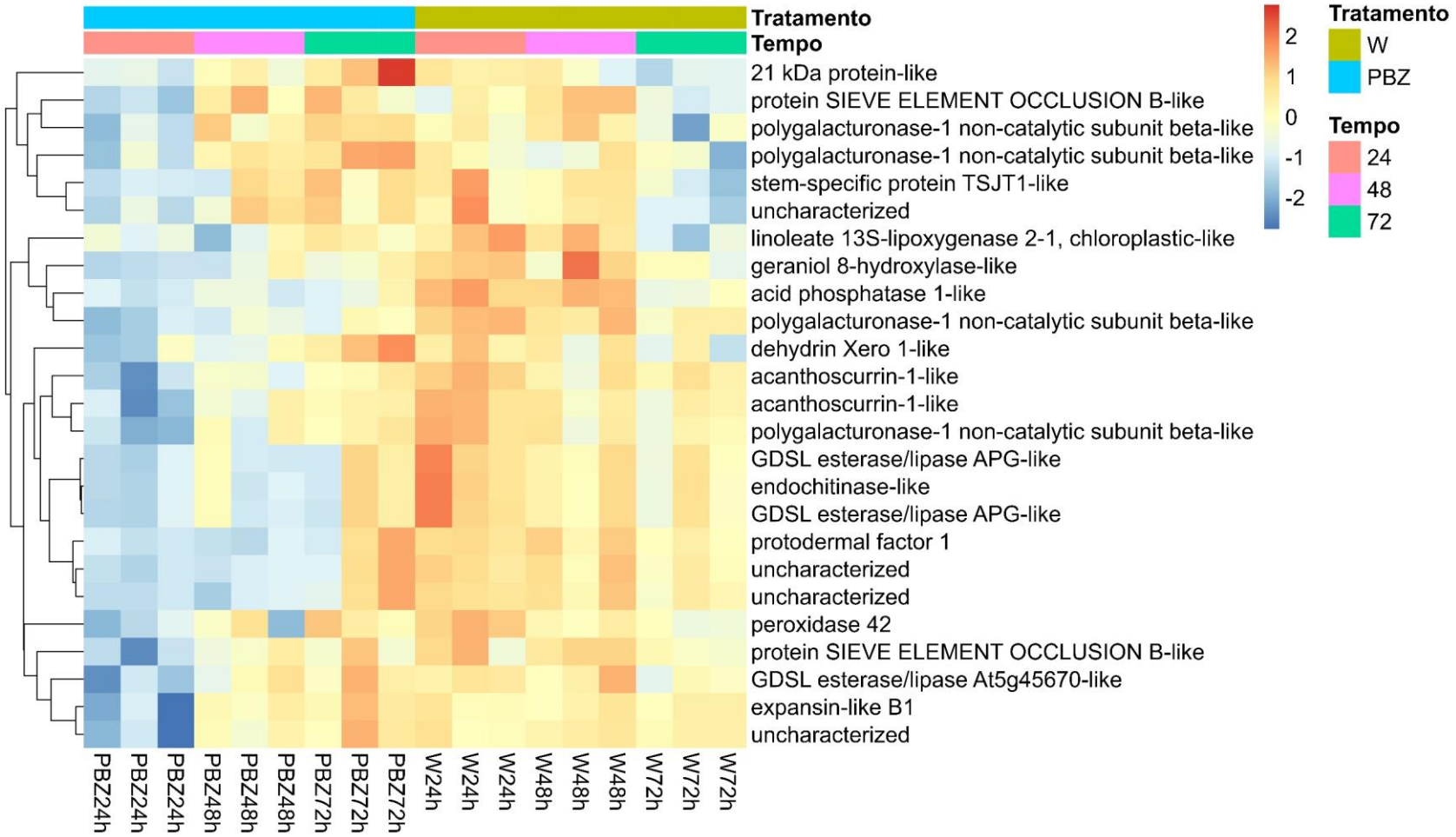


Figura 31. Mapa de calor cos 25 xenes con maior taxa de cambio do tratamento de corte con respecto ao tratamento con PBZ.

4.3.3.2 P2C

No P2C o efecto do inhibidor do etileno, o STS, foi comparado co efecto do corte ás 48 horas despois do tratamento (Fig. 32). Identificáronse 92 DEGs entre os rebentos que foran incubados durante 48 h en STS e os que foran incubados en medio basal após o corte. Entre estes DEGs os máis numerosos corresponden a rutas metabólicas e dentro dos factores de transcrición destacan dúas acetiltransferases de histonas da familia MYST (*LOC112037860* e *LOC112012489*). Tamén resalta a expresión diferencial do *probable auxin efflux carrier component 1c* (*LOC111993333*).

Do mesmo xeito có PBZ coas xiberelinas, o STS actúa inhibindo a acción do etileno, polo que tamén é interesante comparar que xenes están sendo potencialmente inhibidos pola acción do STS combinado co AIB e que, normalmente, estarían a seren funcionais pola acción do etileno (Fig. 33). Isto implica 102 DEGs identificados que se expresan normalmente e que a acción do STS limita. Destes 102 DEGs case un cuarto corresponden con rutas metabólicas mais tamén destaca a presenza da proteína *ethylene-insensitive protein 2* (*LOC112036364*) da ruta de sinalización do etileno. Só un factor de transcrición foi identificado neste experimento, o *ethylene-responsive transcription factor 3-like isoform X1* (*LOC112007198*). Identificáronse tres xenes relacionados coa biosíntese do etileno, a *S-adenosylmethionine synthase 3* (*LOC112032159*), a *1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 1-like* (*LOC111986768*) e a *1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1-like* (*LOC112025431*) e tamén dous membros da familia das aldehído deshidroxenases (*LOC112039267* e *LOC112015198*), implicadas na síntese de GABA. Outros xenes codificadores de enzimas como a desmetilases específica de lisina *JMJ30* (*LOC112002893*) foron identificados.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

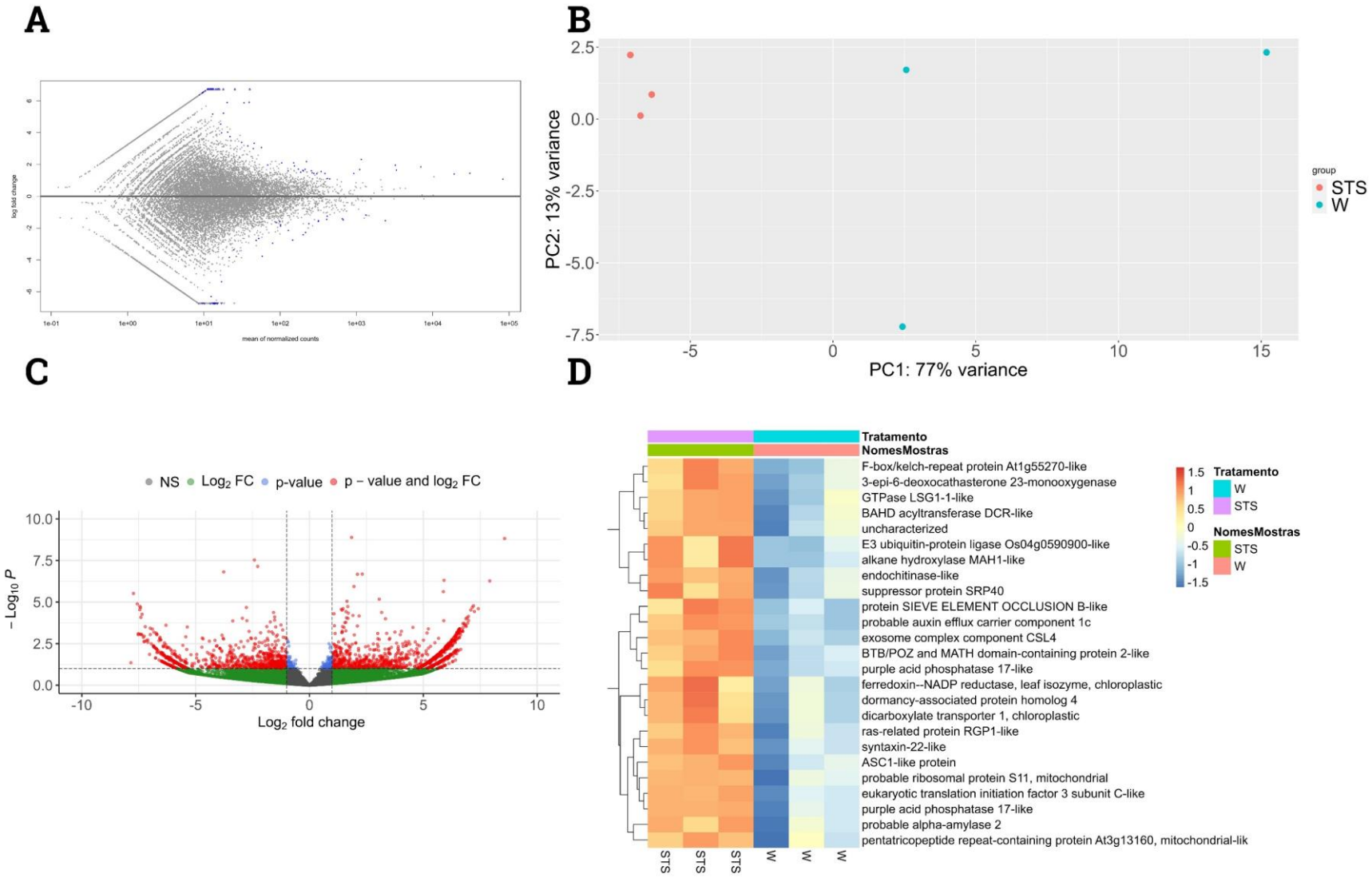


Figura 32. Gráficos asociados aos resultados obtidos da comparación entre os tratamentos de STS e o control, os rebentos que só sufriron corte. A) Gráfico MA, B) Gráfico PCA, C) Volcano plot e D) Mapa de calor cos 25 xenes con maior taxa de cambio.

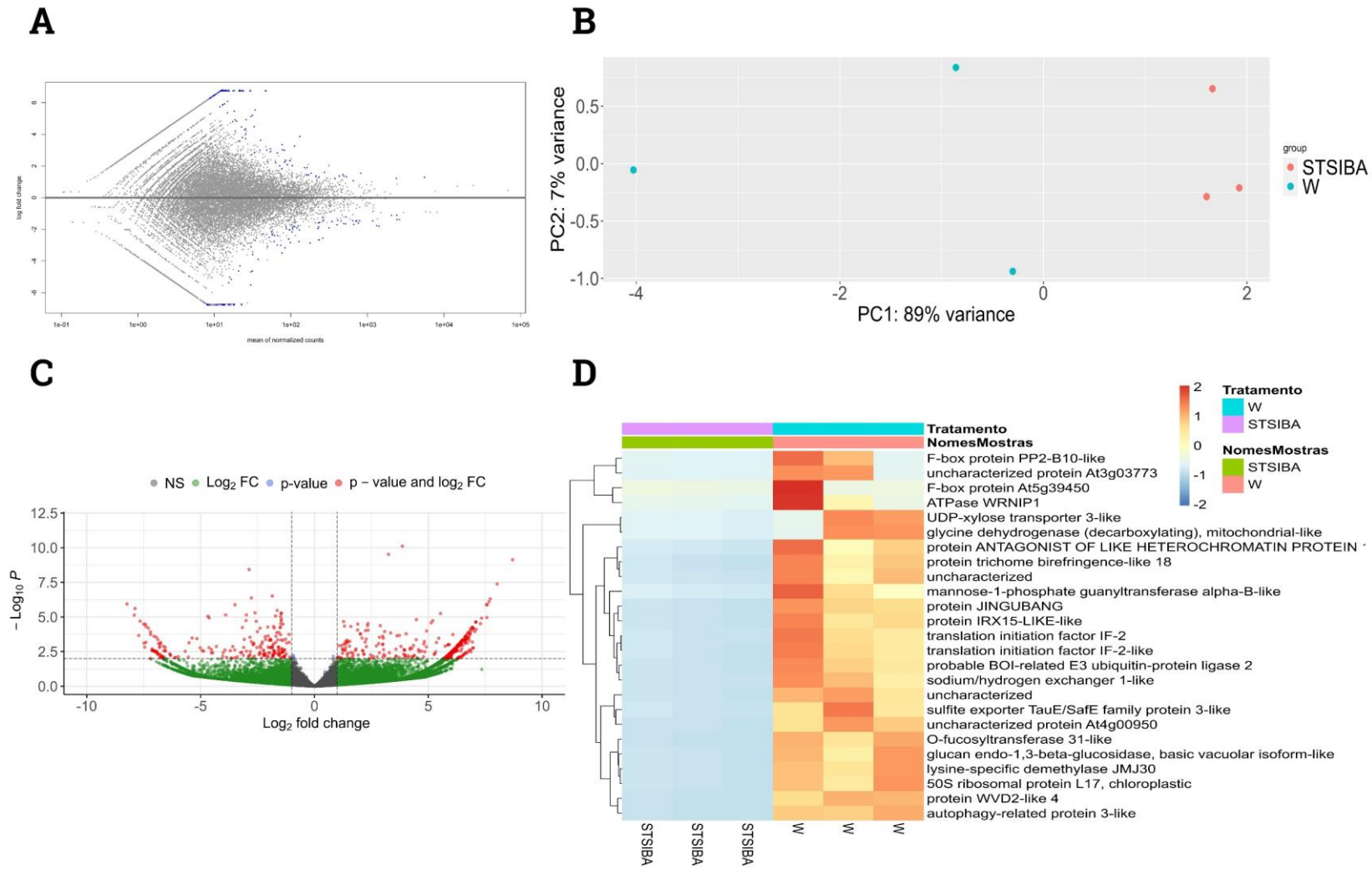


Figura 33. Gráficos asociados aos resultados obtidos da comparación entre os tratamentos de corte e os tratamentos con PBZ. A) Gráfico MA, B) Gráfico PCA, C) Volcano plot e D) Mapa de calor cos 25 xenes con maior taxa de cambio.

4.4 Análise da expresión xénica de xenes identificados na transcritómica por medio da técnica de qPCR

Despois da análise dos datos obtidos da transcritómica foron escollidos diferentes xenes para avalia-la súa expresión por medio da qPCR e así valida-los resultados da expresión diferencial obtidos da secuenciación.

4.4.1 Tratamentos con xiberelinas en P2Rb

Co propósito de ratifica-la expresión diferencial dos xenes e mailos efectos das xiberelinas durante o enraizamento adventicio no material xuvenil, analizouse a expresión de diferentes xenes escollidos entre aqueles que foron identificados nos experimentos de transcritómica realizados. Os xenes escollidos foron *Cs22D*, *CsGID1B*, *CsGID2*, *CsLOB16* e máis *CsRAP2.3* (Fig. 34). Para esta avaliación realizouse unha análise da expresión por qPCR nos tratamentos de P2Rb nos que se detectou previamente unha expresión diferencial.

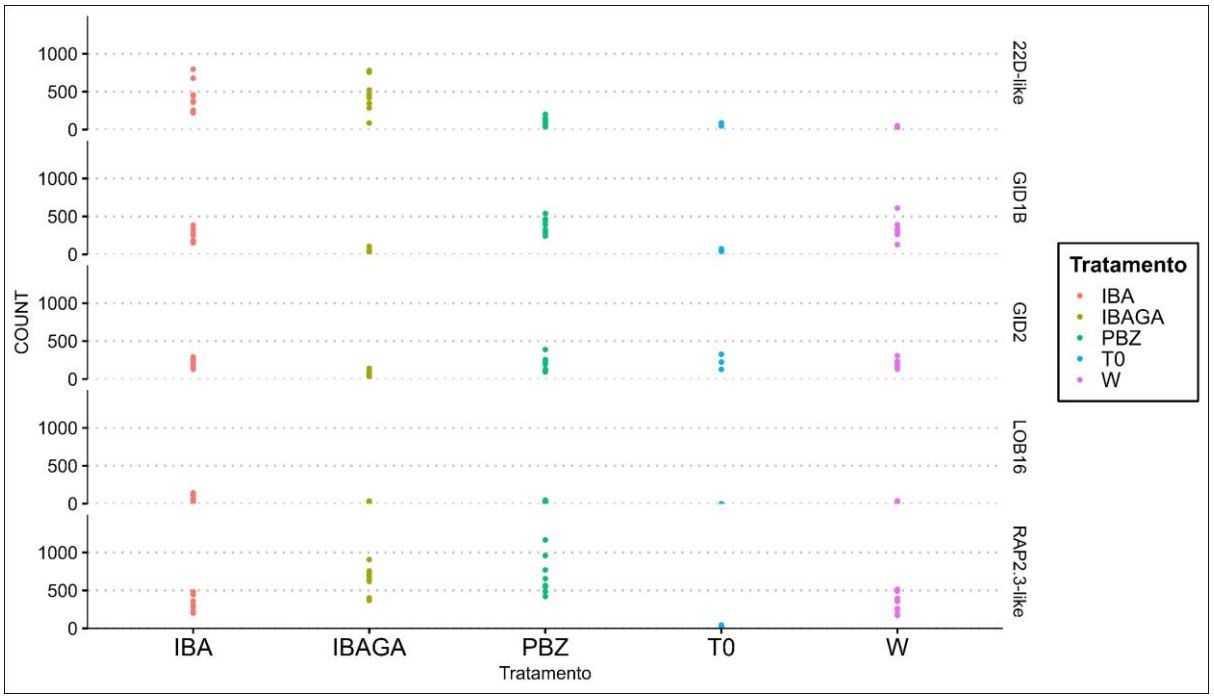


Figura 34. Número de *counts* obtidos nos experimentos de transcritómica en función do replicado e tratamento para os xenes seleccionados.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A expresión do *Cs22D*, un xene que codifica a *auxin-induced protein 22D-like*, analizouse entre os tratamentos de corte (W), AIB e PBZ en tres puntos temporais (24, 48 e 72 h) tomando como punto de control o corte ás 24 horas (W 24 h). Para a expresión deste xene só houbo diferenzas estatisticamente significativas en función do tratamento, cunha promoción da expresión tanto no tratamento de AIB como no de PBZ en comparación co corte, aínda que máis acusada no caso do AIB. Outro xene relacionado coa acción das auxinas é o *LOB16* (*LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN 16*). No caso deste xene tanto o tratamento con AIB como no caso do AIB + GA_3 tiveron niveis de expresión consistentemente maiores cós do tratamento de corte, independentemente do tempo no que se analizase a expresión (Fig. 35).

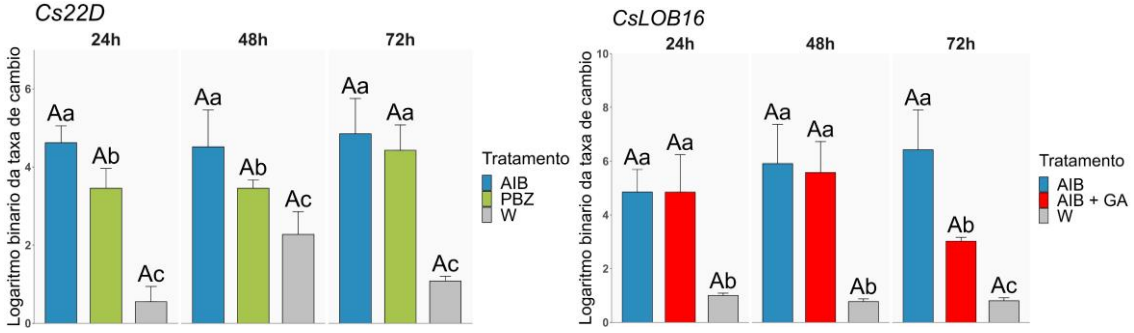


Figura 35. Logaritmo binario da taxa de cambio na expresión do xene *Cs22D* (esquerda) e *CsLOB16* (dereita). As letras maiúsculas indican diferenzas estatisticamente significativas do punto temporal e as minúsculas as diferenzas entre os tratamentos dentro de cada tempo.

Un receptor das xiberelinas, o *CsGID1B* e mailo *CsGID2*, elemento da ruta de sinalización de xiberelinas, foron comprobados nos tratamentos de AIB, AIB + GA_3, o inhibidor das xiberelinas PBZ e mailo tratamento de corte, todos eles en tres puntos temporais (24, 48 e 72 h) (Fig. 36). No caso do *CsGID1B* o tempo de recollida non foi significativo mais si o tratamento. Así, o PBZ foi o tratamento onde máis se expresou este receptor das xiberelinas, seguido do tratamento con AIB e o corte, que non amosaron diferenzas entre eles. Foi no caso do tratamento con AIB + GA_3 onde se detectou unha menor expresión do receptor. No caso do *CsGID2* non houbo ningunha diferenza estatisticamente significativa en ningún dos tratamentos e en ningún dos tempos, datos que confirman a análise previa de transcritómica, onde o *GID2* non foi identificado como un DEG.

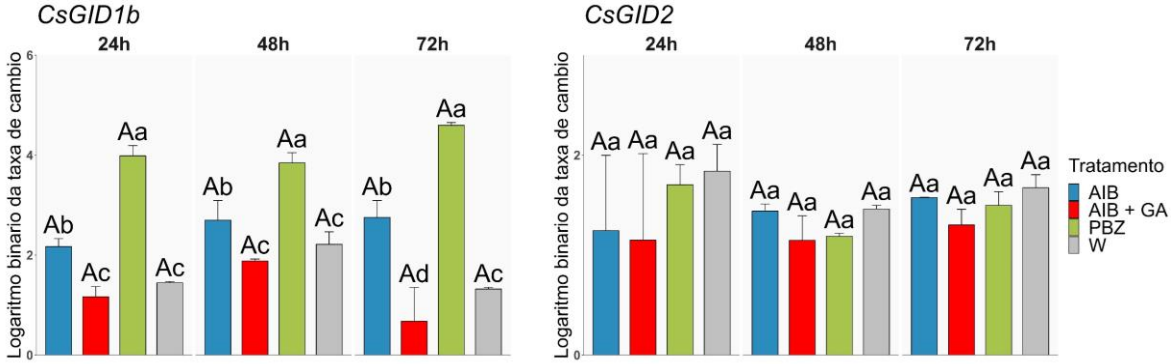


Figura 36. Logaritmo binario da taxa de cambio na expresión do xene *CsGID1b* (esquerda) e *CsGID2* (dereita). As letras maiúsculas indican diferenzas estatisticamente significativas do punto temporal e as minúsculas as diferenzas entre os tratamentos dentro de cada tempo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Un factor de transcrición relacionado coa sinalización do etileno foi analizado; o *RAP2.3*. A expresión deste factor de transcrición mediuse nos tratamentos de corte e PBZ ás 24, 48 e 72h e máis no T0, á fin do ciclo de multiplicación (Fig. 37). A expresión deste factor de transcrición amosou diferenzas estatisticamente significativas entre os diferentes tratamentos. Deste xeito, a inhibición das xiberelinas por parte do PBZ promoveu a súa expresión comparada cos tratamentos de corte, e tamén aumentou a expresión con respecto ao T0, mais dunha forma non significativa a nivel estatístico.

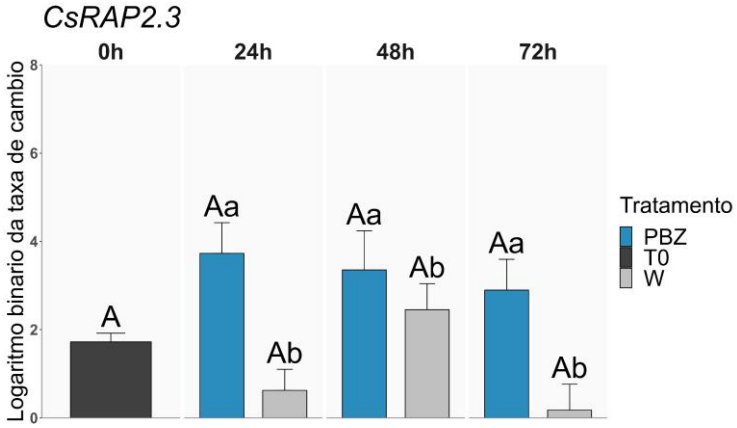


Figura 37. Logaritmo binario da taxa de cambio na expresión do xene *CsRAP2.3*. As letras maiúsculas indican diferenzas estatisticamente significativas do punto temporal e as minúsculas as diferenzas entre os tratamentos dentro de cada tempo.

4.4.2 Tratamentos con etileno en P2C

Trala análise dos datos obtidos nos experimentos de transcritómica en castiñeiro escolléronse determinados xenes en función da súa expresión diferencial para validar, mediante a qPCR, os resultados previamente obtidos.

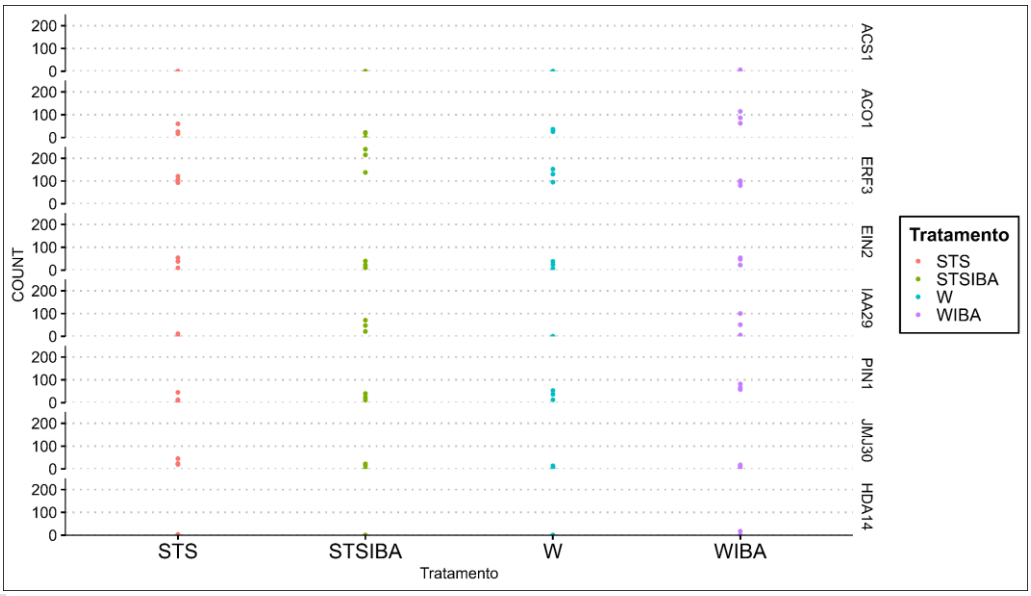


Figura 38. Número de *counts* obtidos nos experimentos de transcritómica en función do replicado e tratamento para os xenes seleccionados.

Para confirma-la expresión diferencial dos xenes e os efectos dos moduladores do etileno durante o proceso de enraizamento adventicio analizáronse xenes relacionados coa síntese e sinalización do etileno (*CsACS1-like, CsACO1-like, CsRAP2.12, CsERF3, CsEIN2*), coas auxinas (*CsPIN1* e *CsIAA29*) e xenes relacionados co estado epixenético do material que poden interferir nos mecanismos da indución do enraizamento adventicio en adultos (*CsHDA14* e *CsJMJ30*). Estas análises realizáronse en material de P2C co ARN extraído das bases ao final do ciclo de multiplicación (T0) ou tras tratamentos con AIB 25 µM suplementado con ACC 30 µM ou $AgNO_3$ 30 µM en dous puntos temporais (24 h ou 120 h).

Os tratamentos con AIB e con AIB suplementado co inhibidor da acción do etileno, $AgNO_3$ diminuíron a expresión dos xenes relacionados coa síntese de etileno, *CsACS1-like* e *CsACO1-like*, ás 24 h. O patrón contrario foi observado nos tratamentos de AIB suplementados con ACC, que aumentou a expresión destes xenes tras 24 horas (Fig. 39). Ás 120 h xa non se detectaron diferenzas entre ningún dos tratamentos, que volvían a ter un patrón de expresión similar entre eles e semellante ao do control no caso da *CsACO1-like*. No caso da *CsACS1-like* a inhibición producida polo AIB e pola combinación de AIB + $AgNO_3$ tamén se esvaecera mentres que a indución producida pola adición de ACC ao medio continuaba ao cabo destes cinco días. Estes datos suxiren a existencia dun ciclo de retroalimentación positiva do ACC na súa propia síntese polo que a súa adición no medio para incrementarao no curto prazo.

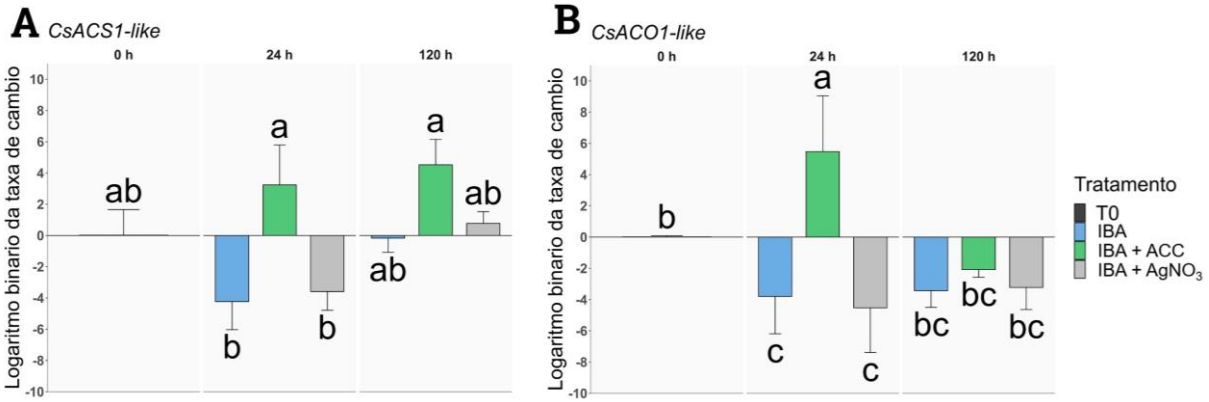


Figura 39. Logaritmo binario da taxa de cambio na expresión do xene *CsACS-like* (A) e *CsACO1-like* (B). As letras indican diferenzas estatisticamente significativas entre as mostras (p-valor < 0,05).

Para profundar na caracterización das respostas ao etileno, analizáronse tamén a expresión do *CsEIN2*, do *CsRAP2.12* e do *CsERF3* (Fig. 40); xenes relacionados coa sinalización do etileno. O *CsEIN2*, un dos xenes centrais que modula o control da expresión xénica en resposta ao etileno, amosou diferenzas significativas ante os diversos tratamentos. O tratamento con AIB por si mesmo non foi quen de modificar en ningún sentido a expresión de *CsEIN2*. O AIB + $AgNO_3$ si causou unha diminución na súa expresión tanto ás 24 como ás 120 horas despois do tratamento, polo que o nitrato de prata inhibe a sinalización do etileno de xeito duradeiro. Ao contrario, a adición do ACC no medio aumentou no curto prazo, ás 24 horas, a expresión desta ruta de sinalización. Non houbo ningún cambio na expresión no caso do factor de transcrición *CsRAP2.12* en ningún dos puntos temporais nin como resposta a ningún dos tratamentos aplicados. Diferente é o caso do *CsERF3* que non amosou diferenzas estatísticas

USC DE COMPOSTELA

aos cinco días mais si ás 24 h onde o tratamento de AIB + ACC aumentou a súa expresión mentres que o tratamento contrario de AIB + $AgNO_3$ a inhibiu. Isto axuda a confirma-lo papel represor do nitrato de prata na acción do etileno, da mesma forma que a inhibición de *CsEIN2*.

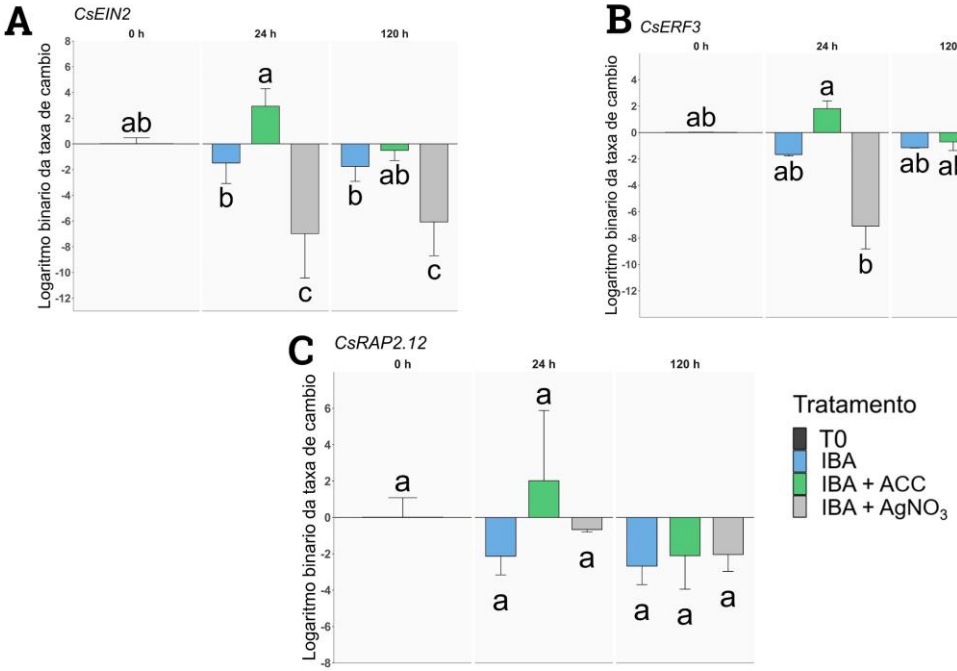


Figura 40. Logaritmo binario da taxa de cambio na expresión do xene *CsEIN2* (A), *CsERF3* (B) e *CsRAP2.12* (C). As letras indican diferenzas estatisticamente significativas entre as mostras (p-valor < 0,05).

En base aos resultados da análise transcritómica e ao papel das auxinas no proceso de enraizamento adventicio foron analizados dous xenes relacionados coa auxina (Fig. 41), o *CsPIN1* e mailo *CsIAA29*. Na expresión deste último xene non se detectou ningunha modificación nin a respecto do tratamento ou do tempo. No caso do *CsPIN1*, que codifica un transportador das auxinas si que se produce, tanto ás 24 horas como ás 120, unha promoción tanto por parte do tratamento con AIB e, en maior medida, por parte do tratamento con AIB + $AgNO_3$. Polo tanto, o etileno parece inhibi-lo enraizamento e o desenvolvemento radicular dos tecidos adultos de castiñeiro a través da súa relación coas auxinas, especialmente a través do seu transporte.

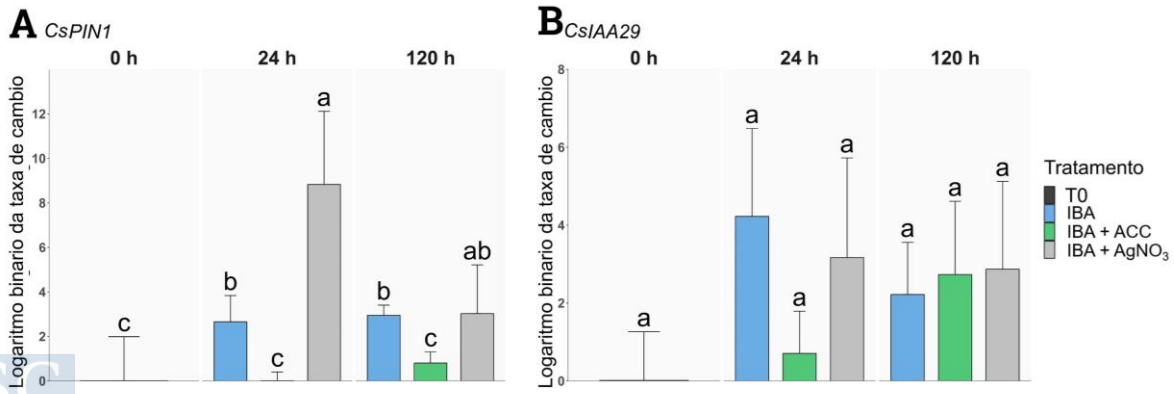


Figura 41. Logaritmo binario da taxa de cambio na expresión do xene *CsPIN1* (A) e *CsIAA29* (B). As letras indican diferenzas estatisticamente significativas entre as mostras (p-valor < 0,05).

Tamén foron analizados dous xenes relacionados coas respostas epixenéticas; o *CsHDA14* e o *CsJMJ30* (Fig. 42). A expresión de *CsHDA14*, unha histona desacetilase, non amosa diferenzas estatisticamente significativas entre os tratamentos en ningún dos puntos temporais analizados. Cousa diferente sucede na expresión de *CsJMJ30* que, tanto ás 24 horas como aos cinco días, amosaron un comportamento similar. Nos dous puntos temporais a acción do ACC promoveu a expresión desta demetilase de histonas, que foi inhibido pola acción do AIB + $AgNO_3$. Estas tendencias modéranse aos cinco días, mais permanecen as diferenzas estatisticamente significativas, polo que se pode asegurar que estas modificacións do estado epixenético son prolongadas no tempo.

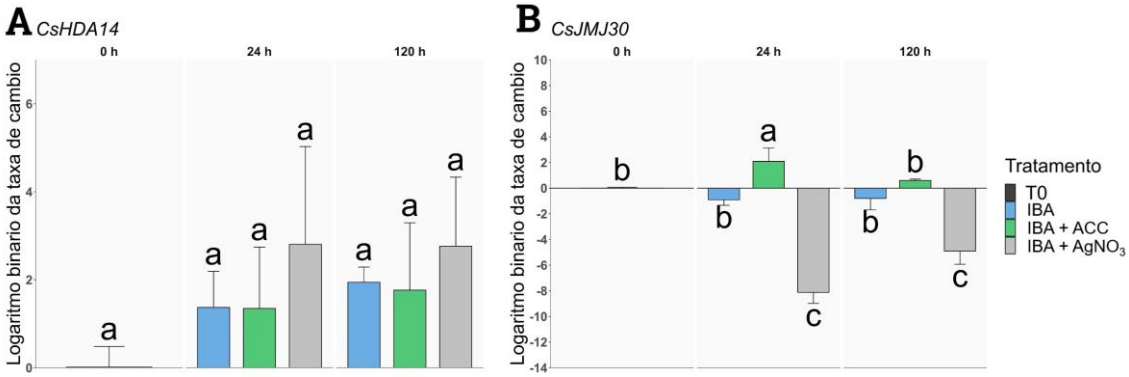


Figura 42. Logaritmo binario da taxa de cambio na expresión do xene *CsHDA14* (A) e *CsJMJ30* (B). As letras indican diferenzas estatisticamente significativas entre as mostras (p-valor < 0,05).

Unha vez obtidos os datos da qPCR as taxas de cambio na expresión dos xenes seleccionados foron comparadas coas calculadas durante os experimentos de transcritómica. Tras unha análise de correlación entre ambos valores obtivéronse valores de correlación por riba de 0,8 que suxire que os datos obtidos nos experimentos de transcritómica se axustan aos valores reais de expresión dos xenes nos tecidos. Polo tanto podemos asumir que as taxas de cambio producidas durante os experimentos de transcritómica se corresponden de forma bastante axustada coa realidade (Fig. 43).

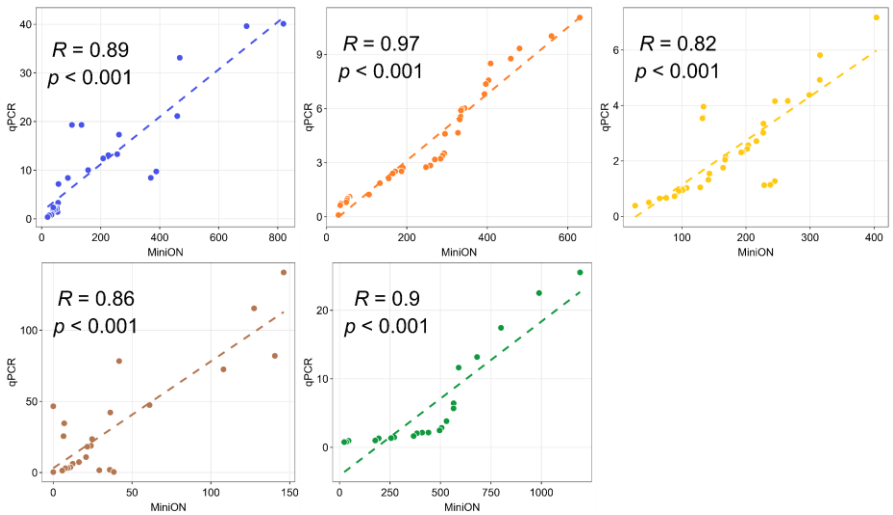


Figura 43. Gráfico de correlación entre as taxas de cambio preditas pola transcritómica e as obtidas na qPCR.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5. DISCUSIÓN

5.1 Substitución do agar e sacarosa de laboratorio por alternativas comerciais

A mellora e abaratamento dos protocolos de multiplicación e enraizamento *in vitro* é chave para producir plantas de forma masiva dun xeito competitivo mais tendo conta de non reduci-la calidade dos exemplares producidos. Para acadar este obxectivo foron avaliados os custos dos medios de cultivo e analizados cales deles tiñan un substituto máis barato e que non producise desordes no desenvolvemento dos rebentos. Deste xeito decidiuse substituí-la fonte de carbono e mailo axente xelificante por alternativas máis baratas producidas localmente. Estudos previos amosaron taxas de aforro que variaron entre o 58,7%, cando o agar de laboratorio foi substituído por Isubgol e a sacarosa por azucre (Agrawal *et al.*, 2010), e o 86,4% cando se empregou Sago como axente xelificante (Saraswathi *et al.*, 2016). No presente estudo, o cambio de sacarosa por azucre comercial e a substitución de agar fornecido por empresas de material de laboratorio por agar comercial de produción local rebaixaron os custos por litro de medio de cultivo nun 82%, un valor comparábel ás mellores alternativas publicadas previamente.

Os efectos da substitución da sacarosa como fonte de carbono por azucre comercial xa se comprobaron durante a micropropagación de ananás en medio líquido (Dutta *et al.*, 2013) ou na propagación de pachulí (Swamy *et al.*, 2010) ou pataca (Demo *et al.*, 2008) en medio semi-sólido. No presente traballo obtivéronse resultados similares aos de estudos con especies non leñosas (Kuria *et al.*, 2008; Swamy *et al.*, 2010), sen cambios substanciais nin na fase de multiplicación nin nos parámetros avaliados durante o enraizamento, cunha calidade similar dos explantes e da arquitectura radicular ao longo de tódolos tratamentos. Tamén apoian estes achados os resultados obtidos durante o enraizamento doutras especies leñosas coma o sarandí ou *Balanites aegyptica* (Gour e Kant, 2011), nas que tampouco houbo mudanzas substanciais a nivel fenotípico trala substitución da sacarosa por azucre comercial.

A substitución da sacarosa por azucre comercial é relativamente intuitiva xa que, segundo a regulación europea, o azucre comercial ten que ter un contido en sacarosa pura igual ou superior ao 99,5% (Consello da Unión Europea, 2002; Parlamento Europeo e Consello da Unión Europea, 2013). No caso do axente xelificante a procura dun substituto acaído xa é máis complexa e adoitan usarse diferentes substancias para intentar substituí-lo agar do medio, principalmente amidón (Martin-Gordo *et al.*, 2012). A pesar de que os substitutos máis comúns son axentes xelificantes baratos e abundantes como a goma *guam* ou o *Isubgol*, neste estudo usouse agar comercial de produción local. Este agar ten a vantaxe de ter unha composición similar á do agar específico de laboratorio ao ser producido a partir da mesma división de alga que o agar de laboratorio (*Rodophyta*). En estudos realizados en pataca (Kuria *et al.*, 2008) ou

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

en *Vainilla planifolia* (Mengesha *et al.*, 2012) nos que o agar mudaba por amidón de mandioca ou de falsa-bananeira, ou trala substitución do agar por *Isubgol* durante a propagación de *Dendrobium chrysotoxum* (Jain e Babbar, 2005), do tabaco (Ozel *et al.*, 2008) ou do pastel dos tintureiros (Saglam e Cifici, 2010), a presenza destes compostos no medio de cultivo aumentaba o número de rebentos en comparanza cos medios con agar de laboratorio. Tiráronse resultados similares en especies leñosas como arandeira (Clapa *et al.*, 2008) ou *Crataeva nurvala* (Jain e Babbar, 2006) cando foron cultivados en medios xelificados con *Isubgol* ou goma *guam*, respectivamente. Outros parámetros como o número de novas follas desenvolvidas durante o ciclo de multiplicación foron analizados noutros estudos e non foron atopadas diferenzas notábeis entre os diferentes axentes xelificantes (Agrawal *et al.*, 2010; Ullah *et al.*, 2015). Por outra banda, en experimentos levados a cabo en lombulwa (*Uapaca kirkiana*), espiñeiro de Angola (Maliro e Lameck, 2004) ou bananeira (Buah, 2014; Saraswathi *et al.*, 2016) si que se observou un efecto positivo neste parámetro cando os axentes xelificantes, como a fariña de mandioca ou o sagu foron empregados en combinación con agar de laboratorio. Nos experimentos levados a cabo durante a presente tese non se atoparon diferenzas estatisticamente significativas en ningunha das variábeis analizadas durante a fase de proliferación. Isto confirma os resultados previos obtidos por outros autores tanto en especies leñosas como non leñosas (Babbar e Jain, 1998; Jain e Babbar, 2006; Clapa *et al.*, 2010; Raina e Babbar, 2011).

Neste traballo tampouco se acharon diferenzas na capacidade de enraizamento nin na calidade dos sistemas radiculares de castiñeiro ou bidueiro tralo troco do agar e do azucre de laboratorio polas súas alternativas comerciais. Estes resultados están en liña cos obtidos ben para especies herbáceas como o tabaco (Ozel *et al.*, 2008) ou ben para leñosas como o brinco de viúva (Babbar e Jain, 1998) ou bananeira (Saraswathi *et al.*, 2016). Ao usar compostos alternativos de menor custo promoveuse a lonxitude das raíces en especies no caso de cúrcuma (Tyagi *et al.*, 2007) ou en especies leñosas (Babbar *et al.*, 2005) mentres que o uso de *Isubgol* como axente xelificante produciu efectos negativos nesta variábel (Ullah *et al.*, 2015). No caso dos experimentos levados a cabo nesta tese non se atoparon diferenzas na lonxitude das raíces, en liña do observado en estudos previos con outras especies (Ozel *et al.*, 2008; Raina e Babbar, 2011). Respecto do número de raíces formadas, o cambio da sacarosa por azucre común tivo un efecto negativo neste parámetro durante a micropropagación de pataca (Demo *et al.*, 2008). Ao substituí-lo agar por *Isubgol* durante a multiplicación da bananeira (Buah, 2014) ou ao combinalo con amidón no cultivo *in vitro* de cúrcuma (Agrawal *et al.*, 2008) aumentaba o número de raíces producidas, un parámetro que non se modificou durante os experimentos aquí presentados en castiñeiro e bidueiro. Deste xeito, a substitución dos compostos específicos de laboratorio por alternativas comerciais de produción local é un método efectivo para asegura-la súa dispoñibilidade e para abarata-los protocolos de micropropagación de castiñeiro e bidueiro.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2 Efecto da modificación da concentración de AIB exóxeno durante o enraizamento

A adición de auxinas é necesaria para o enraizamento do castiñeiro e mailo cambio na concentración engadida de auxinas pode altera-la calidade do sistema radicular. Polo tanto, é preciso atopa-la concentración de auxinas que asegure un correcto equilibrio entre un enraizamento axeitado e un estado óptimo das plantas. O aumento da concentración de AIB mellorou o número de raíces e, tras fixa-la concentración óptima en 7,5 mM, un aumento na cantidade de AIB diminuíu a porcentaxe de enraizamento en caqui (Hejazi *et al.*, 2018). Unha diminución de AIB exóxeno por debaixo dun limiar podería levar a unhas menores taxas de enraizamento e a unha arquitectura radicular de peor calidade. Porén, nos nosos experimentos de enraizamento con P2Rb atopamos que unha diminución do AIB de até 10 veces sobre o nivel engadido inicialmente (de 25 μM até os 2,5 μM) non reduce os parámetros relacionados co enraizamento mentres que si aumenta a calidade xeral do rebento. En P2C si se observa unha baixada nos niveis de enraizamento cando se reduce á metade a cantidade de auxina engadida no medio. O efecto contrario tamén se observou, cun menor enraizamento tras dobra-la cantidade de AIB no medio de enraizamento (dende os 25 μM até os 50 μM). Efectos similares se atoparon na árbore de nim (Gehlot *et al.*, 2015) ou pexegueiro (Park *et al.*, 2017), nos que un nivel insuficiente de auxinas non produciu a máxima porcentaxe posíbel de rebentos enraizados e un nivel excesivo de auxinas no medio produciu un efecto tóxico que limitou o enraizamento.

Na liña xuvenil, P2Rb, a diminución da cantidade de AIB levou aparellada unha redución similar nas taxas de formación de calo e na necrose apical. Un aumento no AIB no medio de enraizamento aumentou a incidencia de necrose apical en rebentos de roseira (Podwyszyńska e Goszczyńska, 1998), pereira (Thakur e Kanwar, 2011) ou salgueiro tarraconense (Amo-Marco e Lledo, 1996). En castiñeiro demostrouse que a adición de citoquinina no ápice do rebento reducía a necrose apical (Vieitez *et al.*, 1989). O agravamento dos síntomas co aumento do AIB ou o seu alivio após a adición de BA no medio suxire que a necrose apical pode ser resultado da modificación no balance auxina/citoquinina. Por iso, unha redución do AIB no medio de enraizamento pode ser unha estratexia para diminuír este problema sempre e cando non comprometa a calidade do sistema radicular. No caso do calo obtivéronse resultados similares en pexegueiro (Park *et al.*, 2017), laranxeira (Hu *et al.*, 2017) ou maceira (Welander e Snygg, 1987). En todas estas especies, ao igual que no castiñeiro, unha elevación na concentración de auxinas aumenta a formación de calo. De igual modo que na necrose apical a modificación da razón entre auxinas e citoquininas podería se-lo mecanismo subxacente deste fenómeno (Ikeuchi *et al.*, 2013). Polo tanto, a comprensión dos efectos da modificación do balance entre auxinas e citoquininas neste proceso pode axudar a optimiza-los niveis de enraizamento á vez de mellora-la saúde xeral do rebento. En P2C non se observou esta baixada nos niveis de necrose nin na cantidade de calo formado; é posíbel que unha meirande redución de AIB no medio de enraizamento conseguise mellorar estes parámetros mais a costa dunha menor cantidade de rebentos enraizados, polo que esa mellora non sería realmente funcional.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.3 O transporte polar de auxinas é necesario para un correcto enraizamento

O ácido N-1-naftil-talámico (NPA) é unha molécula capaz de inhibi-lo transporte polar de auxinas. Aínda que o modo de actuación concreto non está claro de todo existen varias explicación posíbeis (Teale e Palme, 2018). Diversas familias de proteínas que transportan as auxinas (Geisler, 2021) poden ser obxecto da acción do NPA. De entre estas familias, o transporte polar de auxinas está moi vencellado á acción das proteínas PIN, transportadores transmembrana que serven como saída das auxinas da célula. Existen evidencias da inhibición específica da proteína PIN1 por parte do NPA para modifica-lo transporte polar de auxinas (Teale *et al.*, 2021); aínda que tamén poden unirse a outros membros da familia das proteínas PIN para bloquea-la súa actividade (Abas *et al.*, 2021). Isto é importante porque a actividade das proteínas PIN é precisa para xera-los máximos locais de auxinas necesarios durante os primeiros estadios do enraizamento adventicio en oliveira (Velada *et al.*, 2020) e maceira (Guan *et al.*, 2020).

Nos experimentos realizados en castiñeiro durante o desenvolvemento desta tese a adición de NPA durante a incubación dos rebentos diminuíu tanto a porcentaxe de enraizamento como a lonxitude e o número das raíces dun xeito dependente da dose, así como tamén atrasou a emerxencia das raíces. O transporte polar de auxinas é necesario para o enraizamento de diferentes especies e a súa inhibición por medio da adición de NPA reduciu as taxas de enraizamento adventicio en petunia (Ahkami *et al.*, 2013) e tomate (Guan *et al.*, 2019) ou tamén en especies arbóreas como o eucalipto (Negishi *et al.*, 2014), o piñeiro taeda (Diaz-Sala *et al.*, 1996), a maceira (Tian *et al.*, 2023) ou o carballo (Vidal *et al.*, 2003). En viña tamén se atopou unha inhibición do enraizamento dependente da dose de NPA aplicada (Chang *et al.*, 2022).

Trala inhibición do transporte polar de auxinas non só houbo menos rebentos que formaran raíces adventicias senón que deles emerxeron un menor número de raíces. Reducións similares se atoparon tralo uso de NPA durante o enraizamento en especies herbáceas como en tremozo branco (Lopez Nicolas *et al.*, 2004), arroz (Xu *et al.*, 2005), petunia (Ahkami *et al.*, 2013) ou *Arabidopsis* (Mauriat *et al.*, 2014), mais tamén en especies leñosas como o carballo (Vidal *et al.*, 2003), ou piñeiro taeda (Diaz-Sala *et al.*, 1996). Ademais as raíces formadas non só son menos ao inhibi-lo transporte polar de auxinas, tamén son máis curtas, polo que un correcto transporte das auxinas é necesario para a elongación radicular. Así se demostrou en tremozo branco (Lopez Nicolas *et al.*, 2004), tomate (Guan *et al.*, 2019), *Arabidopsis* (Sassi *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2021b) ou petunia (Ahkami *et al.*, 2013). En especies forestais este efecto está menos estudado mais si se demostrou unha redución da lonxitude das raíces tralo tratamento dun híbrido de bidueiro con NPA (Yang *et al.*, 2015b) e tamén se pode apreciar nas fotos de eucaliptos presentadas por Negishi (Negishi *et al.*, 2014) aínda que non se menciona este efecto ao longo do seu traballo. As raíces que se formaron durante o enraizamento do castiñeiro con NPA emerxeron máis tarde, cunha T50 que pasou dos 8 aos 17 días, é dicir, máis que duplicou o seu valor con respecto ao control con AIB. Resultados similares foron obtidos en tomate (Guan *et al.*, 2019) e en diferentes especies leñosas tais como o *Pinus taeda* (Diaz-Sala *et al.*, 1996; Greenwood *et al.*, 2001) ou álamo híbrido (Mauriat *et al.*, 2014).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tódolos castiñeiros enraizados en medios cunha concentración de AIB 25 μM produciron calo, mais ao baixar esta cantidade até os 2,5 μM a taxa de calo diminuíu até o 25%. Coa adición de NPA 100 μM no medio de enraizamento con AIB 2,5 μM non só se inhibiu por completo a formación de raíces senón que tamén aumentou a taxa de formación de calo até o 100%. Debido á falta de estudos específicos sobre a formación de calo e á desatención que recibiu este parámetro nos outros estudos nos que se empregou NPA para inhibi-lo transporte polar de auxinas o efecto deste composto no desenvolvemento do calo non está definido. O que si parece é que a combinación de auxinas con NPA aumenta a produción de calo en *Pinus taeda* (Greenwood *et al.*, 2001) ou *Selaginela kraussiana* (Spencer *et al.*, 2023) probabelmente debido á acumulación da auxina exóxena aplicada na base do rebento.

Estes experimentos demostran o papel imprescindíbel que xoga o transporte polar das auxinas non só na capacidade dos rebentos de castiñeiro de formar raíces senón tamén no correcto desenvolvemento do sistema radicular.

5.4 Efecto diferencial das xiberelinas exóxenas sobre o enraizamento adventicio

Nos experimentos realizados en castiñeiro xuvenil, P2Rb, un aumento da concentración de xiberelinas levou a unha menor taxa de enraizamento até que, nos enraizamentos con GA_3 40 μM o enraizamento foi case inexistente a pesar da presenza de AIB no medio. Estes resultados observáronse en P2Rb mais non en P2C, suxerindo que os procesos de indución do enraizamento adventicio varían dependendo do estado de maduración do material.

A pesar do efecto promotor do enraizamento observado en carballo (Eshed *et al.*, 1996) e cerdeira (Ford *et al.*, 2002) tralo uso de xiberelinas, este regulador do crecemento presenta normalmente a tendencia contraria. A adición exóxena de GA_3 tamén produciu unha redución do enraizamento adventicio en álamo (Busov *et al.*, 2006) ou en piñeiro de repoboación (Pizarro e Díaz-Sala, 2020). Liñas transxénicas de *Arabidopsis* e álamo que sobre-expresan *AtGA20ox1*, un xene chave na biosíntese de xiberelinas, vén alterado o transporte polar de auxinas e teñen unha menor capacidade de formar novas raíces adventicias (Mauriat *et al.*, 2014), o que apoia a hipótese de que as xiberelinas modulan o enraizamento a través da inhibición do transporte de auxinas (Li *et al.*, 2018). Outra liña de álamo que sobre-expresa a histona desacetilase *PtHDT902* e promove a síntese de xiberelinas amosa unha menor taxa de enraizamento (Ma *et al.*, 2020). Así como a sobre-expresión de xiberelinas ou a súa aplicación exóxena causa a inhibición do enraizamento adventicio o silenciamento de *GA2ox*, implicado na desactivación das xiberelinas, diminúe a biomasa radicular en arroz (Lo *et al.*, 2008) ou álamo (Gou *et al.*, 2011). A diminución da síntese de xiberelinas mediante a acción do PBZ tamén incrementou a taxa de enraizamento en especies como a goiaba (Qadri *et al.*, 2018) ou a oliveira (Salari *et al.*, 2017). Nos experimentos levados a cabo en castiñeiro durante a presente tese a inhibición das xiberelinas por parte do PBZ foi quen de promove-lo enraizamento adventicio incluso en ausencia de auxinas, consideradas até entón condición necesaria para desencadear este proceso. Un efecto similar, aínda que con menores taxas de enraizamento que no castiñeiro, foi descrito recentemente para *Rubus brasiliensis* (Bueno *et al.*, 2021). No noso sistema experimental a

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

adición de NPA ao medio de enraizamento con PBZ inhibiu por completo o enraizamento, polo que o transporte polar de auxinas é preciso para a promoción do enraizamento adventicio mediado polo PBZ. Isto indica que o enraizamento espontáneo do castiñeiro pode estar reprimido polo efecto das xiberelinas endóxenas sobre o transporte polar de auxinas, o que confirmaría a hipótese de que a inhibición do enraizamento producida polas GAs se debe á modulación das proteínas PIN (Mauriat *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2018).

Amais dunha inhibición da taxa de enraizamento o número de raíces formado en cada rebento tamén foi menor. Isto parece se-la tendencia xeral xa que sucede o mesmo en especies herbáceas como o tabaco (Niu *et al.*, 2013) ou leñosas ben trala adición de xiberelinas exóxenas en álamo (Busov *et al.*, 2006) ou piñeiro de repoboación (Pizarro e Díaz-Sala, 2020). De xeito complementario a inhibición de xiberelinas por medio do PBZ aumentou o número de raíces primarias en rebentos de maceira (Kepenek e Karoğlu, 2011).

Se ben o número de raíces é menor nos tratamentos con xiberelinas espérase que estas sexan máis longas xa que esta hormona se asocia coa promoción do mersitemo radicular e coa elongación das raíces (Achard *et al.*, 2009; Rizza *et al.*, 2017). Nas raíces obtidas no presente traballo si se observou esta tendencia ao igual que xa se tiña descrito noutras especies como *Arabidopsis* (Tan *et al.*, 2019), arroz (Qin *et al.*, 2022) ou álamo (Ma *et al.*, 2020). Porén hai outras especies onde as xiberelinas teñen efectos moito menos marcados no crecemento radicular (Ramon *et al.*, 2021) ou mesmo efectos negativos (Fonouni-Farde *et al.*, 2019). Outro efecto que se observou no experimento é que as raíces formadas en medio suplementado con xiberelinas eran máis finas que as raíces control e que as formadas en medio con PBZ estaban máis engrosadas, a pesar de que este efecto non se cuantificou de ningunha forma e só foi unha descrición *de visu*. Este fenotipo ten sentido á luz do efecto das xiberelinas en diversos cultivos de tubérculo como a pataca doce (Singh *et al.*, 2019) ou xinsén menor (Zhang *et al.*, 2021a), onde un aumento das xiberelinas produce lignificación e prevén do cambio de raíz a órgano de almacenamento radicular. Deste xeito, a adición de xiberelinas aumentaría a ratio GA/ABA e atrasaría a formación de tubérculos (Chen *et al.*, 2022). A pesar de que as raíces de castiñeiro non forman tubérculos é posíbel que o mecanismo subxacente que regula negativamente a formación de tubérculos poida ser común co fenotipo observado nos nosos experimentos.

5.5 Efecto diferencial do etileno na calidade do sistema radicular tralo cambio de fase

Debido ao papel predominante do etileno durante o cambio de fase fixéronse experimentos de enraizamento con promotores e inhibidores da acción do etileno tanto en P2Rb como en P2C. Nos rebentos xuvenís non houbo cambios estatisticamente significativos entre os tratamentos. Por outra banda, a modulación do etileno tivo importantes consecuencias na resposta fisiolóxica dos tecidos adultos, entre os que se inclúen a taxa de enraizamento, o número de raíces por rebento enraizado e a lonxitude media das raíces. Isto parece indicar que o mecanismo de indución do enraizamento varía en función do estado ontoxenético do material, do mesmo xeito que se observou nos enraizamentos con xiberelinas.

No presente estudo, a porcentaxe de enraizamento da liña P2C diminuíu trala aplicación do ACC, un precursor do etileno. En liña con estes resultados o etileno xa amosou ser un

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

inhibidor do enraizamento adventicio en especies leñosas como maceira (Ma *et al.*, 1998), pexegueiro (Park *et al.*, 2017), eucalipto (Kilkenn *et al.*, 2012) ou follas de *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2020). Así e todo, o etileno non é un inhibidor universal do enraizamento adventicio e seu efecto sobre este proceso parece ser altamente dependente da especie xa que é promotor do enraizamento en especies como a petunia (Druege *et al.*, 2014), no caravel de defunto (Jin *et al.*, 2017), no cogombro (Deng *et al.*, 2022) ou en especies leñosas tales como a laranxeira (Mendes *et al.*, 2011) ou o *Pinus thunbergii* (Mori *et al.*, 2011). Tamén o número de raíces medio se viu reducido polo tratamento con ACC, un resultado que coincide cos obtidos en guindeira (Sarropoulou *et al.*, 2016), papaia do mato (Gallo *et al.*, 2015), maceira (Bai *et al.*, 2020) ou en follas de *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2020) a pesar de que no caravel de defunto (Jin *et al.*, 2017), a petunia (Druege *et al.*, 2014), o cogombro (Lyu *et al.*, 2021) ou a laranxeira (Mendes *et al.*, 2011) se observase a tendencia contraria.

O etileno tamén tivo un efecto inhibidor no alongamento das raíces formadas en castiñeiro adulto. Resultados similares se obtiveron en experimentos levados a cabo en especies como *Arabidopsis* (Achard *et al.*, 2003; Růžička *et al.*, 2007), arroz (Ma *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015a), grelo (Lemaire *et al.*, 2013) ou maceira (Bai *et al.*, 2020), nas que a adición de ACC reduciu a lonxitude das raíces. Amais, en *Arabidopsis*, o etileno media a inhibición da elongación radicular como resposta ao estrés alcalino (Li *et al.*, 2015). Do mesmo xeito que a taxa de enraizamento ou o número de raíces o efecto do etileno sobre a lonxitude das raíces non é aplicábel de xeito automático a tódolos e depende de moitos factores. Así, a pesar de que a adición de ACC exóxeno promoveu o alongamento das raíces en arroz, a modulación dos niveis de expresión de *ERF3* – un factor de resposta ao etileno (Müller e Munné-Bosch, 2015) – modificou a lonxitude da raíz principal nesta especie. Tamén en arroz, liñas transxénicas que sobre-expresaban o *ERF3* tiñan unha meirande lonxitude da raíz mentres que as liñas cunha menor expresión de *ERF3* presentaban o patrón contrario (Zhao *et al.*, 2015). Este efecto sobre a lonxitude da raíz tamén se describiu en especies como a laranxeira (Mendes *et al.*, 2011).

A incapacidade dos tratamentos con AIB de xerar raíces secundarias demostra que o etileno endóxeno é capaz de impedi-la súa emerxencia en P2C. A inhibición da formación de raíces laterais por causa do etileno xa se describiu en *Arabidopsis* (Negi *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2018) e tomate (Negi *et al.*, 2010). O tratamento co nitrato de prata, que reprime a acción do etileno, non só foi quen de aumenta-las taxas de enraizamento, o número de raíces e o alongamento radicular senón que foi o único tratamento capaz de producir raíces secundarias, o que indica unha mellora na calidade do sistema radicular. A formación de raíces laterais está relacionada co transporte de auxinas (Casimiro *et al.*, 2001; Jing e Strader, 2019) polo que o efecto promotor do $AgNO_3$ neste proceso permite intuír unha relación negativa entre o etileno e o transporte de auxinas no castiñeiro adulto, superada pola acción do nitrato de prata.

Deste xeito, o etileno diminúe a calidade do sistema radicular en tecidos adultos de castiñeiro. Porén, o efecto desta hormona no enraizamento adventicio nunca fora analizado en función do estado ontoxenético do material en especies leñosas. En *Arabidopsis* observouse que a sinalización de etileno era máis activa nas follas vellas, feito que foi ligado a unha menor capacidade de rexeneración *de novo* das raíces (Li *et al.*, 2020). Polo tanto, a influencia do

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

etileno nos procesos de xeración de raíces adventicias deben analizarse tendo tamén en conta a súa relación coa idade da planta.

5.6 Relación do estrés oxidativo e a capacidade de enraizamento adventicio

Numerosos estudos indican un rol positivo do H_2O_2 na formación de raíces adventicias en especies herbáceas como poden se-lo feixón da China (Li *et al.*, 2017), caravel de defunto (Liao *et al.*, 2009), liño (Takáč *et al.*, 2016) ou crisantemo (Liao *et al.*, 2010) e tamén en especies leñosas como a oliveira (Sebastiani e Tognetti, 2004) ou en híbridos de amendoeira e pexegueiro (Zilkah *et al.*, 2006). Este efecto do H_2O_2 é, en moitas ocasións, dependente da dose co que o enraizamento aumenta de forma proporcional ao H_2O_2 engadido (Kora e Bhattacharjee, 2020). Así sucedeu por exemplo en experimentos realizados con crisantemo (Liao *et al.*, 2010). No caso dos experimentos que se realizaron no castiñeiro nesta tese só se probou unha concentración de H_2O_2 mais durante diferentes tempos de aplicación o que pode ser considerado un efecto análogo á mudanza da dose en si xa que a planta consumirá o composto ao longo do tempo ao engadir concentracións capaces de satura-la catalase. Asumindo esta analoxía, o aumento da dose efectiva na planta, expresada a través da duración do tratamento, tamén é un factor importante xa que a maior tempo de tratamento maior foi a taxa de enraizamento obtido.

En bérberis xaponés (Tehranifar *et al.*, 2014), milgrandeira (Sarrou *et al.*, 2014), louro pardo (Silva *et al.*, 2022) ou oliveira (Sebastiani e Tognetti, 2004) observouse un efecto sinerxético entre o H_2O_2 e mailas auxinas, con mellores taxas de enraizamento ao combinárense ambos tratamentos. Isto contrasta cos resultados obtidos na liña P2Rb onde unha combinación do H_2O_2 co AIB amosou unha diminución estatisticamente significativa nas taxas de enraizamento así como na lonxitude das raíces formadas. En liño atopouse un comportamento similar ao observado en castiñeiro, o que indica que entre o H_2O_2 e o AIB existe un balance homeostático necesario para o desenvolvemento do enraizamento adventicio (Takáč *et al.*, 2016).

En caravel de defunto a aplicación de H_2O_2 estimulou os niveis endóxenos de calcio e calmodulina, que actúan como moléculas de sinalización do H_2O_2 no enraizamento (Liao *et al.*, 2012). A adición de calcio é unha estratexia para a redución da necrose apical (Teixeira da Silva *et al.*, 2020) polo que o aumento nos niveis deste mineral trala aplicación de H_2O_2 pode se-lo mecanismo polo que se reduce esta sintomatoloxía nos rebentos de castiñeiro tratados con H_2O_2.

Tamén se observou que o tratamento con H_2O_2 eliminou por completo a formación de calo nos rebentos de castiñeiro. Sábese que o H_2O_2 eleva o nivel endóxeno de auxinas (Takáč *et al.*, 2016) e que tamén pode reprimi-la síntese de citoquininas (Pérez *et al.*, 2021). Desta forma, o H_2O_2 pode modifica-lo balance entre auxinas e citoquininas para evita-la formación de calo, producido normalmente por un exceso desta última hormona (Vieitez *et al.*, 1989). O efecto do H_2O_2 sobre este balance hormonal xa foi suxerido noutros procesos como o desenvolvemento das xemas apicais (Chen *et al.*, 2016).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.7 Efecto das difenil-ureas sobre calidade dos rebentos durante o enraizamento

Os derivados da urea foron descritos como coadxuvantes das auxinas durante o proceso de enraizamento adventicio en maceira (Ricci *et al.*, 2006) e alcaparreira (Carra *et al.*, 2012). En concreto, a presenza de difenil-ureas (MDPUs) promoveu o enraizamento adventicio en piñeiro de repoboación (Ricci *et al.*, 2008) e en maceira cando as concentracións de AIB non eran as óptimas para desencadear ese proceso (Ricci *et al.*, 2003). Este efecto non se observou nos rebentos de castiñeiro ou carballo durante os experimentos conducidos na presente tese. A pesar de non mellora-lo sistema radicular o uso de 3,4-MDPU axudou a mellora-la calidade xeral dos explantes enraizados, cunha redución do calo e un maior número de rebentos capaces de retoma-lo crecemento en caso de necrose apical, o que podería implicar unha meirande capacidade de supervivencia na fase de aclimatación.

O modo de acción dos derivados da urea durante o enraizamento adventicio parece estar ligado aos gradientes de auxina ou da súa distribución en células específicas que formarán o primordio radicular e inhibir así a formación de calo (Brunoni *et al.*, 2014). Non obstante este efecto é dependente tanto da dose do composto como da auxina. A presenza de 3,4-MDPU reduciu tamén os síntomas de necrose apical e aumentou o re-emprendemento do crecemento. A necrose apical foi relacionada en maceira cun baixo nivel de hormonas endóxenas (Kataeva *et al.*, 1991) e parece estar asociada, en concreto, a distribución e transporte das citoquininas (Bairu *et al.*, 2011). Deste modo, os derivados da urea poden influír no balance de auxinas/citoquininas o que permite que as auxinas marquen un máximo local nas células iniciadoras da raíz ao tempo que facilitan o transporte das citoquininas até o ápice nun sistema aínda por definir completamente (Durán-Medina *et al.*, 2017). Isto explicaría a un tempo a falta de calo, que se considera un sumidoiro de citoquininas (Vieitez *et al.*, 1989) e o control da necrose apical producido pola acción desta hormona (Teixeira da Silva *et al.*, 2020).

5.8 O calcio é necesario para o enraizamento adventicio do castiñeiro

O calcio demostrou ser un mineral necesario para o enraizamento e o seu secuestro impediu a formación de raíces adventicias en híbridos de álamo tremedor (Bellamine *et al.*, 1998) e máis en cogombro (Lanteri *et al.*, 2006; Niu *et al.*, 2017). Deste xeito, o calcio e a calmodulina aumentan o número de raíces formadas en caravel de defunto, e o seu bloqueo por medio do EGTA reduce estes efectos (Liao *et al.*, 2012). Porén, o papel máis destacado do calcio no desenvolvemento radicular atópase no alongamento das raíces. A acción do calcio favorece polo xeral o crecemento da raíz primaria (Zhang *et al.*, 2020a) e axentes quelantes como o EGTA reducen a calidade do sistema radicular tralo bloqueo da acción do calcio. Isto sucede en especies como o tomate (Qi *et al.*, 2022) ou laranxeira aceda da china (Wu *et al.*, 2014b). A necesidade do calcio na adquisición da competencia para o enraizamento foi confirmado polos nosos resultados, onde o secuestro do calcio por medio do EGTA reduciu a cero a taxa de enraizamento en material adulto. En exemplares adultos de especies leñosas hai un aumento do contido de calcio (Haffner *et al.*, 1991), polo que o calcio non é suficiente por si mesmo, a pesar de ser preciso para a promoción do enraizamento adventicio en exemplares adultos de castiñeiro.

Hasenstein e Evans demostraron que o calcio é un contra-ión das auxinas (Hasenstein e Evans, 1988) polo que o efecto promotor do calcio sobre o enraizamento adventicio pode deberse á súa promoción do transporte polar de auxinas. Porén, o calcio por si mesmo non é quen de asegura-lo enraizamento de castiñeiro adulto xa que, a pesar de que o contido en AIA é maior en adultos ca en exemplares xuvenís, ningunha das dúas liñas – nin a adulta nin a xuvenil – tiña uns niveis suficientes de auxina sen un tratamento de AIB exóxeno (Ballester *et al.*, 1999).

5.9 Efecto dun bio-estimulante do enraizamento

Existen fungos endófitos que promoven o desenvolvemento vexetal e o enraizamento adventicio. Tal é o caso, por exemplo, de *Piriformospora indica* que aumenta o número e a lonxitude das raíces adventicias do xeranio ou da flor de Nadal (Druege *et al.*, 2007). Deste coñecemento sobre o efecto dos fungos ou bacterias endófitas sobre o desenvolvemento das raíces xurde o Charkor, un extracto acuoso-alcólico dos fungos endófitos simbióticos das raíces do xinsén.

No noso sistema experimental observouse que o Charkor tiña unha resposta similar tanto na liña xuvenil como na liña adulta. Tan só houbo diferenzas na taxa de enraizamento, que si se veu moderadamente promovida no P2C. Do mesmo xeito que no tratamento con xiberelinas, a utilización dun método de enraizamento óptimo con AIB pode estar ocultando un posíbel efecto promotor do enraizamento en P2Rb. En P2C si se atopou un lixeiro efecto positivo na taxa de enraizamento adventicio, resultado similar ao obtido en pereira (Dimitrova e Berova, 2020) ou en terebinto (Nacheva *et al.*, 2019). En ámbalas dúas liñas o suplemento do medio de enraizamento con Charkor aumentou o número de raíces, mais diminuíu o seu tamaño medio. Estas tendencias observáronse en pereira (Dimitrova e Berova, 2020) cunhas raíces máis curtas e numerosas, até a metade de longas que as obtidas no tratamento control.

Non se sabe cal é a composición exacta deste composto, mais é probábel que os endófitos dos que se compón o extracto acuoso sexan produtores de auxinas xa que esta capacidade é coñecida en numerosos fungos (Suebrasri *et al.*, 2020; Sarkar *et al.*, 2021) e bacterias (de Andrade *et al.*, 2023). Deste xeito, a acción do Charkor probabelmente se deba á adición de diversos tipos de auxinas ao medio, que se combinan co AIB utilizado no medio de enraizamento. Nos experimentos de P2C antes presentados observouse que un aumento da concentración de AIB exóxeno pode reduci-la calidade do sistema radicular polo que, de ser certa a hipótese de que a acción do Charkor se alicerza na produción de auxinas, é plausíbel supoñer que as auxinas producidas polos fungos dos que se compón o Charkor probabelmente serían AIA ou ANA.

5.10 Implicacións xerais do enraizamento adventicio do castiñeiro

Tomados en conxunto os efectos observados nos experimentos de enraizamento a nivel fisiolóxico, o efecto atopado máis destacábel foi o efecto contraditorio que teñen algúns reguladores do crecemento antes e despois do cambio de fase. Se ben a adición de auxinas é necesaria para o enraizamento dos rebentos sexa cal for o estado ontoxenético do material

USC DE SANTIAGO

vexetal, as xiberelinas son limitadoras do enraizamento no material xuvenil mentres que o etileno limita a calidade do enraizamento mais só após o cambio de fase. Na liña P2Rb o calcio pode se-lo modo en que as xiberelinas, a pesar de diminuíren as taxas de enraizamento, promoven a elongación radicular (Okada *et al.*, 2017). Tamén pode se-lo incremento dos niveis de calcio o que promove un incremento do enraizamento trala adición de H_2O_2 (Han *et al.*, 2015), composto que tamén pode aumenta-lo enraizamento adventicio por medio da represión da síntese de xiberelinas (Li *et al.*, 2017). Deste xeito o H_2O_2 tería dúas vías de promoción do enraizamento, pode que sinerxéticas entre elas. Por outra banda, na liña P2C o calcio parece ser preciso para a formación de raíces adventicias, aínda que non ser condición suficiente para producilas, mentres que o etileno limitaría este proceso, coas xiberelinas xogando un papel menos determinante nos procesos de enraizamento do material adulto. Os experimentos con NPA e PBZ, con EGTA e maila acción promotora do enraizamento do $AgNO_3$ demostraron que non soamente as auxinas son necesarias para o enraizamento, senón que máis importante aínda é asegura-lo mantemento do seu transporte polar (Strader *et al.*, 2009) independentemente do estado ontoxenético dos tecidos.

Máis aló do enraizamento, a mellora na saúde xeral dos explantes e na calidade do sistema radicular producida durante diversos experimentos – coa redución na concentración do AIB, coa adición de 3,4-MDPU ou coa adición de H_2O_2 – parece descansar sobre a modificación do balance entre as auxinas e as citoquininas.

Polo tanto, ademais dos efectos das xiberelinas – no material xuvenil – e do etileno – nos tecidos adultos – parecen ser factores chave no desenvolvemento de raíces adventicias tanto antes como despois do cambio de fase o transporte polar de auxinas, a acción do calcio e mailo balance entre auxinas e xiberelinas. Deste xeito, é preciso profundar no coñecemento destes factores e, sobre todo, estuda-los procesos que suceden durante o cambio de fase – probabelmente a través da acción dos miRNAs e de modificacións epixenéticas – para dilucidar que leva ás xiberelinas a perde-lo seu papel dominante en favor da regulación mediada polo etileno no enraizamento adventicio do castiñeiro.

5.11 Análise transcritómica da resposta dos rebentos ao corte

É sabido que o efecto do corte é un dos precursores na indución do enraizamento adventicio. Ademais, no sistema de enraizamento adventicio estabelecido para o castiñeiro, o corte é unha acción ineludíbel xa que é precisa a eliminación do calo basal para facilita-la absorción das auxinas e doutros compostos. Polo tanto, o elemento de corte vai estar sempre presente na indución do enraizamento nesta especie. Cómpre por tanto compara-los procesos xenéticos que se desencadean como resposta ante o estrés do corte. Para avaliar estes efectos compáraronse os transcritos expresados após o corte e cotexáronse cos expresados á fin do ciclo de multiplicación, antes do tratamento de corte. Ademais, diversos traballos suxiren que o corte é un estrés necesario para a indución de raíces adventicias en diferentes especies (da Costa *et al.*, 2013; Druege *et al.*, 2019) xa que pode levar a un aumento nos niveis de auxina endóxena (De Klerk *et al.*, 2011). Entre os xenes que se expresan de xeito diferencial como resposta ante o

USC DE COMPOSTELA

corte atópanse varios relacionados co etileno. Están promovidos xenes involucrados na súa síntese, como o *ACO1*, diferentes membros da ruta de sinalización, como o *EIN3* e membros da familia *ERF* e da subfamilia *RAP2* coñecidos por seren inducidos como resposta ante factores causantes de estrés abiótico como o corte (Savatin *et al.*, 2014; Moore *et al.*, 2022). Ademais dos xenes relacionados co etileno tamén se viu promovida a expresión de *O zeatin O-glucosyltransferase-like*, un xene implicado na síntese de zeatina. Esta citoquinina é promotora da división celular, polo que a súa activación tralo corte pode se-lo factor determinante na proliferación celular que dá lugar á formación do calo (Ikeuchi *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2023). Exprésanse tamén diferentes xenes implicados na biosíntese de monolignol, a molécula na que se alicerza a síntese de lignina así como diferentes membros da familia das peroxidases (Minibayeva *et al.*, 2009) e das lacases, relacionadas coa oxidación do monolignol para formaren lignina (Liu, 2012). Relacionado coa lignificación tamén se detectou nesta tese a expresión do factor de transcrición *MYB63-like* (Zhou *et al.*, 2009) polo que cabe espera-la formación dun calo lignificado como resposta ao estrés producido polo corte (Gao *et al.*, 2023), condición que diminúe a capacidade dos rebentos para formar raíces adventicias (Chang *et al.*, 2023). Así, o tratamento de corte promove unha serie de mecanismos relacionados coa defensa da planta ante a aplicación do estrés e podería aumenta-la sensibilidade dos tecidos a sinais indutoras e predispo-la planta cara unha resposta morfoxenética.

Ademais da activación de xenes directamente relacionados co estrés tamén se atoparon sobre-expresados xenes codificadores dos transportadores da familia de proteínas *NRT1/PRT FAMILY (NPF).* Das tres proteínas NPF detectadas, a NPF 3.1 foi previamente relacionada co transporte das xiberelinas (David *et al.*, 2016; Tal *et al.*, 2016). Entre os transcritos sobre-expresados está o *zinc finger protein GIS2*, un factor de transcrición relacionado coa formación de tricomas, estruturas que xa demostraron ser promovidas como resposta a diferentes tipos de estrés como é o corte (Castro-Camba *et al.*, 2022b; Cunha *et al.*, 2023). A formación de tricomas, polo tanto, está relacionada *zinc finger protein GIS2* que se activa pola acción das xiberelinas (Zhou *et al.*, 2012). Deste xeito, a expresión diferencial de *NPF* e do *GIS2* parecen indicar unha maior acción das xiberelinas. Polo tanto, é posíbel que entre os efectos do corte se tope un aumento da acción das xiberelinas e, á luz dos resultados observados nos experimentos de enraizamento con GA_3, unha inhibición da capacidade de enraizamento dos rebentos xuvenís. Mais non só a acción das xiberelinas, senón tamén a síntese doutras moléculas represoras do enraizamento como a espermina (Tonon *et al.*, 2001) ou o GABA se sobre-expresaron após o corte no sistema aquí analizado. No caso do GABA, unha molécula represora do enraizamento adventicio (Xie *et al.*, 2020; Pei *et al.*, 2022), existe evidencia da súa acumulación tralo corte como estratexia das plantas para loitar contra o estrés (Bown e Shelp, 2016; Scholz *et al.*, 2017) o que vén a confirma-los efectos aquí expostos.

Por outra banda, tamén aparecen expresados xenes que, *a priori*, estarían relacionados cunha promoción do enraizamento e do desenvolvemento radicular. Entre eles destacan a proteína PIN-LIKES 3-like, que codifica unha proteína transportadora das auxinas, diversos membros da família das glutatión S-transferases, implicadas na formación de raíces laterais (Jiang *et al.*, 2010) ou o *LOB domain-containing protein 16* de resposta a auxina (Grimplet *et*

al., 2017), relacionado coa formación de raíces adventicias (Lee *et al.*, 2019), raíces laterais (Schiessl *et al.*, 2019), mais tamén coa formación de calo (Zhang *et al.*, 2020b). Polo tanto, estes datos parecen indica-la expresión previa de xenes precisos para o desenvolvemento radicular unha vez os tecidos sexan expostos aos tratamentos indutores.

Após o corte, polo tanto, parecen expresarse familias implicadas en diferentes rutas biolóxicas con potencial tanto para promover como para inhibi-lo enraizamento adventicio. Deste xeito, a comprensión das rutas implicadas permite a súa modificación para inclina-lo balance cara o enraizamento ou cara a formación de calo. O corte parece entón ser un paso necesario para a des-diferenciación e a entrada a novas rutas morfoxenéticas. A pesar de non ser suficiente para que os tecidos sexan competentes para o enraizamento adventicio, o corte predisponos para acadar esta capacidade ante o estímulo das auxinas, a pesar de que o material xuvenil e adulto pode diferir nos elementos precisos para adquirir esta capacidade.

Porén, os cambios na expresión xénica producidos polo corte poden variar tralo cambio de fase, e iso pode dar lugar ó pulo ou represión da expresión de xenes que modifiquen as respostas posteriores ante as auxinas. Así, comparáronse os xenes expresados tralo tratamento de corte en material adulto cos expresados baixo este tratamento en material xuvenil. Entre os xenes promovidos polo cambio de fase atópanse factores de resposta ao etileno ou diversos xenes implicados na síntese de monolignol. Polo tanto, do mesmo xeito que ao compara-lo tratamento do corte co estado da planta no tempo 0, isto parece apuntar a unha maior lignificación dos tecidos e unha maior cantidade de xenes de resposta ao estrés. Ademais destes xenes tamén se corroboraron os datos de Vielba *et al* (Vielba *et al.*, 2022) ao identificar tamén *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 5-like protein 3* e diferentes membros da familia de factores de transcrición MADS-box o que confirma que tanto o ABA como os MADS-box reprimen as respostas morfoxenéticas e alicerzan a perda de competencia para a formación de raíces adventicias após o cambio de fase.

5.12 Xenes expresados de xeito diferencial tralo tratamento do castiñeiro xuvenil con xiberelinas

Nos experimentos realizados ao longo da presente tese observouse unha redución na competencia para a formación de raíces adventicias en material xuvenil trala adición de xiberelinas no medio de enraizamento. Os poucos rebentos que foron quen de enraizar formaron menos raíces pro máis longas. A inhibición das xiberelinas endóxenas co PBZ, sen presenza de auxinas no medio, foi quen de promove-lo enraizamento adventicio, con raíces máis curtas e sen raíces secundarias. Porén, aínda que non se aplicasen auxinas directamente no medio de cultivo, experimentos con NPA demostraron que a promoción do enraizamento adventicio causado polo PBZ é dependente do transporte polar de auxinas. Sábese polo tanto que o PBZ e o AIB son suficientes para promove-la formación de raíces adventicias e pódese supoñer que ámbolos dous procesos actúan a través do transporte polar de auxinas. Por iso, para dilucida-los xenes implicados na adquisición desta competencia, os DEGs que se expresaban de forma conxunta nos tratamentos con AIB e con PBZ comparáronse co estado da planta após o corte, que é condición necesaria mais non suficiente para o enraizamento. Entre estes xenes comúns

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

destacaron dous xenes relacionados coas auxinas: o *Cs22D-like* e mailo *probable auxin efflux carrier component 1b*. O *Cs22D-like* foi recentemente identificado como un xene da familia dos *AUX/IAA* que media en diversos procesos biolóxicos como a floración (Xu *et al.*, 2016a) ou a frutificación (Su *et al.*, 2021) mais a súa función concreta ou modo de actuación aínda está por esclarecer. No caso do *probable auxin efflux carrier component 1b* é un xene implicado na síntese dun compoñente da proteína PIN1, un transportador de auxinas relacionado coa indución de raíces en especies leñosas como a papaia (Estrella-Maldonado *et al.*, 2016) ou a oliveira (Velada *et al.*, 2020). Tralos tratamentos con AIB ou PBZ tamén se identificaron outros xenes relacionados con hormonas como a *zeatin O-glucosyltransferase-like*, que se identificou no meristema radicular e nos primordios de raíces laterais (Shang *et al.*, 2016), ou a *basic form of pathogenesis-related protein 1-like*, relacionada coa resposta ante o ácido salicílico (Gu *et al.*, 2002). O ácido salicílico demostrou promove-lo enraizamento adventicio e o número de raíces formadas mentres que diminuía a súa lonxitude (Bagautdinova *et al.*, 2022) por medio da modificación na distribución de auxinas (Pasternak *et al.*, 2019).

A pesar de que o AIB e o PBZ foron quen de induci-lo enraizamento adventicio, o tratamento con AIB mostrou un meirande número de primordios radiculares desenvolvidos. Por iso, os DEGs observados nas mostras tratadas con AIB ao se compararen cos producidos polo PBZ, para desentraña-los xenes chave na promoción dun maior número primordios radiculares. Entre os xenes expresados de xeito diferencial identificáronse xenes relacionados coa síntese e a sinalización do etileno, como o *RAP2.12*. A promoción dos xenes de sinalización do etileno xa se observou durante a fase de indución do enraizamento do té e o factor de transcrición *RAP2.12* parece estar implicado na des-diferenciación e na re-diferenciación da raíz nesta especie (Gao *et al.*, 2019). No estudo previo de Valladares *et al*. (Valladares *et al.*, 2020) non se observou variación algunha na expresión do *RAP2.12* ante o estímulo con auxinas. Así, no castiñeiro, este factor de transcrición podería estar sendo promovido pola acción das xiberelinas, como sucede noutros procesos do desenvolvemento (Marín-de La Rosa *et al.*, 2014). Tamén se expresaron de xeito diferencial diversos xenes de resposta a auxinas como o *probable indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.1*, implicado na homeostase desta hormona (Staswick *et al.*, 2005) ou varios membros da familia *AUX/IAA*, que actúan inhibindo a transcrición de xenes activados polos ARF (Luo *et al.*, 2018). Entre os xenes da familia *AUX/IAA* detectáronse o comentado *Cs22D* ou o *IAA27*, relacionado cunha meirande cantidade de raíces adventicias en maceira (Zhao *et al.*, 2022a). Pola contra, tamén se detectou a expresión de *IAA9* e *IAA17*, que reducen a capacidade de enraizamento de *Arabidopsis* (Lakehal *et al.*, 2019). Amais dos xenes directamente relacionados coa acción hormonal foron identificados outros xenes, como os implicados na formación de ascorbato, que ao ser aplicado sobre estacas de buganvílea menor amosou un maior número de raíces adventicias desenvolvidas. Tamén se atopou unha promoción da expresión do factor de transcrición *MYB114-like*, que fora relacionado co enraizamento adventicio inducido polo estrés oxidativo (Li *et al.*, 2017) e do *LOB domain-containing protein 16*, unha proteína relacionada co inicio do desenvolvemento de raíces adventicias (Liu *et al.*, 2018b) e aumento do seu número e lonxitude en maceira (Zhao

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

et al., 2022a). Houbo tamén un aumento na expresión do *cyclin-D3-3-like*, un xene implicado na división celular e na elongación das raíces (Wang e Ruan, 2013).

A acción das xiberelinas reduciu o número de rebentos con capacidade de enraizar mais produciu raíces máis longas. Por conseguinte, estudáronse os xenes expresados de xeito diferencial entre as mostras tratadas con AIB + GA_3 en comparanza coas tratadas só con AIB, que produciu raíces máis curtas. Deste xeito identificáronse as familias de xenes implicadas na elongación radicular como consecuencia da adición de xiberelinas. O tratamento con xiberelinas promoveu a expresión de dúas pectato liases, coñecidas pola súa capacidade para a degradación da pectina (Uluisik e Seymour, 2020). Así, as xiberelinas poden causa-la debilitación da parede celular ou desestabiliza-la formación de nova parede, o que permite a elongación das raíces. Por outra banda detectouse a expresión diferencial de *probable cinnamyl alcohol dehydrogenase 1*, un promotor da lignificación das raíces e inhibidor do crecemento radicular (Lima *et al.*, 2013; Salvador *et al.*, 2013). Deste xeito, a acción das xiberelinas pode promove-la elongación das raíces degradando a pectina da parede celular e a un tempo pode promove-la lignificación para evita-la completa desaparición da mesma e asegura-la integridade do sistema vascular da raíz, nun balance entre degradación e lignificación. Tamén se viu promovida a expresión do *cyclin-D3-3-like*, un xene implicado no ciclo e máis na división celular que xa se detectara na comparanza entre o tratamento con AIB e o tratamento con PBZ polo que esta ciclina pode estar implicada na promoción da elongación radicular mediada polas xiberelinas.

As xiberelinas promoveron a expresión de diversos xenes relacionados coa nutrición mineral como foron o *potassium transporter 5-like* ou o probable *calcium-binding protein CML13*, relacionados co transporte do potasio e a sinalización do calcio, respectivamente. Esta modulación da acción dos minerais pode ter efectos no desenvolvemento da raíz xa que tanto o potasio (Tahir *et al.*, 2021) como o calcio (Hepler, 2005) teñen un efecto positivo sobre o enraizamento adventicio e o crecemento das raíces formadas. Diversos membros dos xenes que codifican a familia das glutatión-transferases foron tamén expresados de xeito diferencial trala adición de xiberelinas. Esta pode ser unha vía pola cal as xiberelinas aumentan a lonxitude das raíces (Espunya *et al.*, 2006). O uso de xiberelinas en combinación con AIB tamén produciu unha expresión diferencial dos xenes relacionados coa síntese de espermidina. Noutras especies como o repolo de Kerguelen (Hummel, 2002) ou o piñeiro de Virxinia (Tang e Newton, 2005) a espermidina promoveu unha maior división celular que conduciu a unha elongación da raíz primaria. Estes resultados suxiren que as xiberelinas tamén poden impulsa-la elongación radicular por medio dun aumento na expresión deste tipo de poliaminas, unha sinerxía xa demostrada noutros procesos biolóxicos como o desenvolvemento floral (Xu *et al.*, 2022).

Con respecto a xenes implicados na sinalización e transporte hormonal, a adición de xiberelinas no medio con AIB aumentou a expresión de xenes relacionados coas auxinas tales como o *auxin-responsive protein SAUR21*, un membro da familia SAUR, e SAUR19 implicada nunha maior lonxitude das raíces producida por unha promoción da expansión celular (Spartz *et al.*, 2012) ou o *auxin-responsive protein IAA14*, que explicaría a menor cantidade de raíces

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

laterais tralo tratamento con xiberelinas (Fukaki *et al.*, 2005). Pola contra, tamén parece estar inducida a expresión do importador de auxinas *LAX3*, implicado na promoción deste tipo de raíces (Swarup *et al.*, 2008) polo que é posíbel que este transportador de auxinas se sobre-exprese para intentar transportar unha meirande cantidade desta hormona para promove-las raíces laterais e para desactiva-la proteína represora IAA14. A adición de xiberelinas no medio de enraizamento tamén induce a expresión da *gibberellin 2-beta-dioxygenase 1*, o que indica que a presenza deste regulador do crecemento desata a existencia dun mecanismo de retroalimentación que limita os efectos desta hormona (Liu *et al.*, 2021).

5.13 Análise dos xenes expresados de xeito diferencial ante a inhibición do etileno en castiñeiro adulto

Durante os experimentos realizados con etileno observouse que esta hormona reducía a capacidade de formar raíces adventicias e maila calidade do sistema radicular en material adulto de castiñeiro mentres que na liña xuvenil non se apreciou ningún efecto a nivel fisiolóxico. Neste caso compáraronse os tratamentos de AIB co corte, para identifica-los xenes implicados na formación de raíces adventicias relacionados coa auxina. A adición de AIB no medio de cultivo ocasionou un aumento na expresión do xene que codifica o transportador de auxinas PIN1, o que pode favorece-lo enraizamento adventicio por dúas vías; pola propia acción das auxinas (Liu *et al.*, 2014a) e polo aumento na biosíntese de flavonoides que se observa após o tratamento con auxinas (Kurepa *et al.*, 2023) e que aumenta o enraizamento en *Eucalyptus* (Di Battista *et al.*, 2019) ou oliveira (Denaxa *et al.*, 2020). As auxinas aumentan tamén a expresión de diversas glutatión-transferases que parecen estar implicadas no desenvolvemento radicular por medio da regulación das proteínas PIN (Koprivova *et al.*, 2010). Acompañando a esta promoción do sistema radicular desátanse potenciais bucles de retroalimentación para limita-la acción da auxina, cuxo transporte é reprimido pola acción dos flavonoides (Kurepa *et al.*, 2023), e tamén para a desactivación da propia síntese de flavonoides producida pola acción de *MYB4-like* (Wang *et al.*, 2020). Porén, tamén parece estar expresado, probabelmente como consecuencia do corte previo ao tratamento con auxina, o RAP2.3, un factor de transcrición relacionado co etileno. Tralos resultados observados nos experimentos de enraizamento pódese suxerir que a promoción de factores de transcrición relacionados con esta hormona está a limita-la calidade do enraizamento.

Os xenes sobre-expresados ao compara-las mostras pre-tratadas con STS coas non pre-tratadas antes do traamento con auxina dá conta dos xenes que permiten mellora-la calidade do sistema radicular, cunha meirande cantidade de raíces, máis longas e coa presenza de raíces secundarias. Entre os xenes reprimidos polo etileno e que estarían relacionados coa mellora da calidade das raíces atópanse o *ABC transporter G family member 11-like*, un transportador exportador que foi relacionado co desenvolvemento vascular (Le Hir *et al.*, 2013), a glutatión-transferase, ou represor da transcrición MYB6. O MYB6 inhibe en álamo a formación da parede celular secundaria (Wang *et al.*, 2019). É sabido que a parede celular secundaria se forma unha vez cesa a expansión celular dos tipos celulares especializados (Zhong *et al.*, 2019) polo que a súa inhibición por medio de MYB6 indica que o STS permite a expansión celular e,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

polo tanto, sería unha das formas nas que a inhibición do etileno participa na elongación das raíces que se observou a nivel fisiolóxico. Amais destes tamén destacan xenes implicados na síntese de ácido ascórbico, que estimula o enraizamento (de Cabo *et al.*, 1996), a elongación radicular e a organización do centro quiescente (Bilska *et al.*, 2019). Tamén aparecen sobre-expresados xenes implicados na síntese de flavonoides, un *probable calcium-binding protein CML41* que impulsa a acción do calcio para mellora-lo enraizamento adventicio (Niu *et al.*, 2017) e tamén o transportador do amonio *ammonium transporter 2-like*, que demostrou ser necesario para o desenvolvemento das raíces e a formación de raíces secundarias (Hao *et al.*, 2020; Amghar *et al.*, 2021). Trala inhibición da acción do etileno coa aplicación de tiosulfato de prata, detectouse a expresión diferencial de *DNA (cytosine-5)-methyltransferase CMT3-like*, unha metiltransferase que está implicada no silenciamento epixenético (Pavlopoulou e Kossida, 2007; Deng *et al.*, 2016). Isto suxire que, ademais da inhibición física por parte dos ións de prata, o STS pode reprimi-los xenes inducidos pola acción do etileno mediante a modificación do estado epixenético.

5.14 Efecto das xiberelinas no enraizamento e na expresión xénica en P2Rb

Nas análises levadas acabo durante esta tese caracterizáronse xenes relacionados coa acción das auxinas, como por exemplo a expresión diferencial do xene *Cs22D-like*. Este xene fora identificado en diversos estudos de transcritómica mais até o de agora as súas funcións non están dilucidadas. A tal hora a expresión deste xene foi descrita durante o proceso de desenvolvemento do froito en cogombro (Su *et al.*, 2021) ou albaricoqueiro (Manganaris *et al.*, 2011), durante a maduración da flor de piñón manso (Xu *et al.*, 2016a), como resposta ante o estrés biótico (Ortiz *et al.*, 2019) ou abiótico (Krishnamurthy *et al.*, 2017) e participando na embrioxénese somática de eucalipto (Xiao *et al.*, 2020). Así, a expresión deste xene foi recentemente relacionada coa adquisición da capacidade de enraizamento (Fu *et al.*, 2023) e no desenvolvemento das raíces (Wu *et al.*, 2021). A expresión deste xene en rebentos de castiñeiro tratados con AIB foi superior á expresión dos tratados con PBZ, e a expresión dos rebentos tratados con PBZ foi superior á dos rebentos que só sufriron o estrés do corte A nivel fisiolóxico observouse que os rebentos tratados con PBZ acadaron taxas de enraizamento do 40% e os tratados con AIB enraizaron no 100% dos casos. O aumento da expresión tralo tratamento con AIB foi observado recentemente en maceira (Meng *et al.*, 2019). Ademais, esta correlación directa da expresión do xene coa porcentaxe de enraizamento suxire unha promoción do enraizamento mediada polo nivel de expresión do *Cs22D-like*. A caracterización do *Cs22D-like* como un membro dos *AUX/IAA* en conxunto cos datos fisiolóxicos obtidos indica que, en presenza de auxina, o *Cs22D-like* bloquea a expresión de xenes implicados na represión do enraizamento por parte das xiberelinas endóxenas o que mellora a formación de raíces. Por outra banda, tamén se analizou a expresión do *LOB domain-containing protein 16*, un xene implicado na indución de raíces adventicias e laterais así como na formación do calo basal (Liu *et al.*, 2018b; Zhang *et al.*, 2020b). Así, os niveis de expresión aumentaron tanto no tratamento con AIB como no tratamento AIB + GA_3 en comparación cos rebentos cortados e sen tratar, mais non houbo diferenza de expresión entre os rebentos tratados con AIB e os rebentos nos

USC DE COMPOSTELA

que se aplicaron xiberelinas. Isto contrasta cos resultados obtidos en papaia, onde o tratamento con GA_3 aumentou tanto a formación de raíces laterais como a expresión de *LOB16* (Zhou *et al.*, 2023b). O xene *LOB16* co-exprésase co *LAX3* (Lee *et al.*, 2015), un importador de auxinas inducido polas xiberelinas segundo os datos obtidos da transcritómica. Deste xeito, a pouca cantidade de raíces laterais desenvolvidas nos rebentos de castiñeiro tratado con AIB + GA_3 suxire que o *LOB16* non é a vía principal de desenvolvemento de raíces laterais nesta especie. Destaca que, para ámbolos dous xenes, tanto o efecto promotor do PBZ sobre o *Cs22D* como o efecto inhibidor das xiberelinas sobre a expresión do *LOB16* se acentúan nas 72 h, polo que as xiberelinas poderían actuar durante a fase de iniciación das raíces.

Tralas análises transcritómicas identificáronse diferentes xenes relacionados coa acción das xiberelinas. Un deses xenes foi o *GID1b*, un xene que codifica un receptor de xiberelinas (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2008). O outro xene analizado foi o *GID2*, implicado na degradación das proteínas DELLA como fase da sinalización de xiberelinas (Sasaki *et al.*, 2003; Gomi *et al.*, 2004). Ámbolos dous xenes seleccionados foron analizados nos rebentos tratados con AIB, con AIB + GA_3 e con PBZ e a súa expresión foi comparada coa dos rebentos control sen suplemento hormonal. Deste xeito, observouse que o tratamento con xiberelinas diminuíu a expresión do receptor das xiberelinas *GID1b* con respecto ao tratamento con AIB, un resultado que coincide cos obtidos en *Arabidopsis* (Middleton *et al.*, 2012). Tamén se observou unha inhibición do *GID1b* a respecto do tratamento de corte, máis esta só foi estatisticamente significativa ás 72 h. De xeito contrario, a inhibición das xiberelinas por parte do PBZ produciu un aumento na expresión deste xene, do mesmo xeito que ocorreu en *Pinus tabuliformis* (Du *et al.*, 2017). Ámbolos dous resultados foron confirmados en experimentos con tomate (Illouz-Eliaz *et al.*, 2019) o que suxire a existencia dun bucle de retroalimentación que favorece a expresión dos receptores de xiberelinas ante a falta desta hormona e unha baixada na súa expresión como resposta ante o exceso de hormona. Unha vez as xiberelinas son detectadas por un receptor, estas adoitan actuar a través da degradación das proteínas DELLA, que en condicións normais reprimirían a resposta ante esta hormona (Castro-Camba *et al.*, 2022a). Un factor chave da degradación das proteínas DELLA mediada polas xiberelinas é o GID2, unha proteína con caixa F que fai parte do complexo SCF E3, encargado desta eliminación (Gomi *et al.*, 2004). Isto suxire que un aumento no contido de xiberelinas debería levar a un aumento da expresión dos niveis de GID2 ou podería desatar un bucle de retroalimentación como o observado no caso do receptor GID1b. Este sistema de retroalimentación foi descrito a partir de estudos transcritómicos levados a cabo en soxa (Han *et al.*, 2020b), tomate (Tang *et al.*, 2015) ou *Chimonanthus praecox* (Zhu *et al.*, 2022). Porén, nos datos obtidos durante a presente tese a expresión do xene *GID2* foi constante ao longo dos diferentes tratamentos e durante os diversos tempos. Esta ausencia de flutuacións na expresión do *GID2* trala adición de GA_3 ou trala súa inhibición por PBZ indican a existencia dun modelo de sinalización das xiberelinas independente da proteína GID2 e da degradación das proteínas DELLA. Isto viría a confirma-la hipótese proposta por Ueguchi-Tanaka para o arroz (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2008) e apoiada tamén nos estudos realizados en lirio dos finados (Zhu *et al.*, 2016). Este modo de actuación tamén corroboraría os cambios observados na expresión do receptor GID1b xa que é este

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

receptor o que parece mediar na sinalización das xiberelinas nesta ruta non proteolítica, que non precisa da degradación das proteínas DELLA (Hauvermale *et al.*, 2014).

A relación entre as xiberelinas e o etileno é complexa, mais no caso das raíces estas dúas hormonas parecen ter un comportamento antagónico (Castro-Camba *et al.*, 2022a). Nas análises levadas a cabo nos rebentos da liña de castiñeiro P2Rb analizouse a expresión do factor de resposta ao etileno *RAP2.3* nas mostras tratadas con PBZ ou sen tratar. Observouse que a inhibición das xiberelinas por medio do PBZ sempre producía niveis de expresión superiores aos dos rebentos non tratados. A proteína RAP2.3 está implicada na inhibición do óxido nítrico (León *et al.*, 2020), unha molécula que está implicada na diminución da elongación radicular a pesar da acción das xiberelinas (Wu *et al.*, 2014a). Os rebentos enraizados con PBZ teñen unha lonxitude menor que aqueles enraizados con AIB ou con AIB + GA_3 mais son quen de se desenvolver a pesar da inhibición das xiberelinas, que xogan un importante papel na elongación radicular. Á luz dos resultados observados, a elongación das raíces formadas nos rebentos tratados con PBZ pode ser causada non pola acción das xiberelinas senón pola inhibición do óxido nítrico producida pola activación de RAP2.3.

5.15 Efecto do etileno no enraizamento e na modulación xénica en P2C

Os resultados obtidos no presente estudo suxiren que a sinalización do etileno está implicado na represión do enraizamento adventicio de material adulto de castiñeiro. A adición de compostos que aumentan o contido en etileno influenciaron directamente os xenes de sinalización e síntese de etileno. Os rebentos de P2C tratados con ACC, un precursor do etileno, amosaron un incremento significativo na expresión tanto do *CsACS1-like* e do *CsACO1-like* ao tempo que diminuía o enraizamento neste material. O ACC desatou un sistema de retroalimentación positivo na expresión de *CsACS1-like* que durou a lo menos cinco días desde o inicio do tratamento. Este xene codifica unha enzima que cataliza a conversión da S-adenosil-l-metionina (SAM) en ACC, que se transformará en etileno grazas á acción da enzima *ACO*. Así, en rebentos maduros, o ACC induce un incremento na súa propia síntese. A existencia destes bucles de retroalimentación positiva xa foi descrita noutras especies (Choudhury *et al.*, 2008; Vandenbussche *et al.*, 2012). Recentemente, diversos estudos suxiren que o ACC podería formar parte de rutas de sinalización por si só, non só polo seu papel como precursor do etileno. Esas rutas descritas están relacionadas con procesos de desenvolvemento e respostas ao estrés, para as que se suxiren posíbeis transportadores de ACC (Polko e Kieber, 2019). Porén, o efecto do ACC na expresión dos xenes de biosíntese de etileno suxire que debe se-la ruta do etileno a empregada polo ACC no noso sistema.

Por outra parte, tanto o tratamento con AIB como o tratamento con AIB + $AgNO_3$ reducen a expresión dos xenes relacionados coa síntese do etileno, nomeadamente ás 24h, o que indica que un menor contido de etileno mellora a respostas relacionadas co enraizamento en rebentos adultos, polo que xoga un importante papel durante a fase de indución. A expresión do xene *CsEIN2*, un compoñente que se atopa na cerna da sinalización do etileno, modificouse en función dos tratamentos, cunha maior expresión nas mostras con meirande cantidade de etileno

e cunha menor expresión baixo os tratamentos que inhibiron a acción do etileno. O *EIN2* modula a actividade dos factores de transcrición de resposta ao etileno (ERFs). No noso sistema experimental os niveis do ARNm de *CsEIN2* estiveron claramente relacionados coas respostas rizoxénicas dos rebentos adultos xa que a inhibición da sinalización do etileno, e polo tanto a baixada na expresión de *CsEIN2* induciu un sistema radicular máis desenvolvido. En *Arabidopsis*, o tratamento con ACC + AIB reduciu o número de raíces adventicias formadas, coa interacción antagónica entre o *AtEIN2* e o xene *AtCOI1* de sinalización dos xasmonatos como resposta ao AIB (Betti *et al.*, 2019). Amais, o *EIN2* tamén parece controla-los xenes relacionados co etileno inducindo a acetilación das histonas, o que aumenta a rapidez da regulación transcricional (Zhang *et al.*, 2017). Os nosos datos apoian esta idea dun control rápido e dinámico xa que o *CsERF3* amosou un patrón de expresión paralelo ao do *CsEIN2*. Porén, outros estudos, ao contrario dos nosos resultados, amosan que o *ERF3* ten un papel promotor da formación de raíces adventicias en especies como álamo a través do seu vencello coa sinalización das auxinas (Trupiano *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2022b). O factor de transcrición *RAP2.12* pertence ao grupo VII de ERFs e a súa actividade está ligada a respostas específicas ante o estrés oxidativo ou a condicións de baixo nivel de oxíxeno (Papdi *et al.*, 2015; Gasch *et al.*, 2016) e, en consecuencia, regulan o crecemento das raíces baixo estas condicións (Eysholdt-Derzsó e Sauter, 2017). Este factor de transcrición foi relacionado coa inhibición das raíces laterais en *Arabidopsis* (Shukla *et al.*, 2019) mentres que en castiñeiro non se atopou ningunha diferenza de expresión, o que confirma os resultados obtidos por Valladares *et al*. (Valladares *et al.*, 2020). Isto permite descarta-lo *RAP2.12* como o factor polo cal o etileno reprime a formación de raíces laterais.

O etileno e as auxinas, chaves na indución do enraizamento adventicio, interactúan en diversos procesos a varios niveis. O etileno parece influír no transporte das auxinas a través da modificación dos transportadores de auxinas (Veloccia *et al.*, 2016), imprescindíbeis para a formación de gradientes auxínicos que desencadeen o enraizamento (Li, 2021). A inhibición da acción do etileno tralo tratamento con AIB + $AgNO_3$ induciu a expresión do transportador *CsPIN1* ás 24 h de forma moito máis acusada que a indución producida polo AIB. A actividade dos transportadores PIN é crucial nos primeiros pasos do enraizamento adventicio como se observou, por exemplo, en maceira e té (Guan *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2023). Noutros sistemas experimentais o etileno tamén parece influencia-los procesos de rexeneración a través da modificación da distribución de auxinas, como no tomate de árbore (Neves *et al.*, 2023). Deste xeito o etileno, que parece bloquea-lo transporte de auxinas en tecidos maduros de castiñeiro, impide a formación do gradiente de auxinas necesario para a indución das raíces. As AUX/IAA son proteínas de sinalización das auxinas que actúan como represoras dos Factores de Resposta a Auxina para modula-la súa actividade (Li *et al.*, 2016). O *CsIAA29* parece estar implicado no desenvolvemento do sistema radicular de *Arabidopsis* (Tang *et al.*, 2022). Porén, en castiñeiro non se observou ningunha diferencia estatisticamente significativa entre os tratamentos en ningún tempo de aplicación.

Como se mencionou previamente, o *EIN2* pode actuar influíndo na acetilación das histonas. Así, o etileno podería bloquea-lo enraizamento do P2C mediante mecanismos epixenéticos. A

HDA14, unha histona desacetilase que incrementa a accesibilidade do ADN á maquinaria transcricional, non amosou diferenzas estatisticamente significativas entre as mostras tratadas independentemente do tempo no que se realizasen as análises. Isto concorda con estudos previos onde a acción do etileno non foi quen de inducir cambios na expresión desta desacetilase (Zhou *et al.*, 2005). Por outra banda, a expresión do *CsJMJ30* foi claramente influenciada polo etileno, con maior expresión nos explantes tratados con ACC e unha marcada inhibición tralo tratamento con $AgNO_3$. Esta demetilase de histonas, a *JMJ30*, promove a formación de calo en *Arabidopsis* trala indución dos xenes *AtLBD16* e máis *AtLBD29* (Lee *et al.*, 2018). Tamén parece xogar un papel na elongación das raíces en resposta ao ácido abscísico (Wu *et al.*, 2019), unha hormona cuxa síntese parece estar promovida pola acción do etileno (Li e Huang, 2011) e que está relacionada coa inhibición do crecemento radicular producida por esta última (Ma *et al.*, 2014). Amais, estudos recentes demostraron que o ácido abscísico é máis activo nos tecidos adultos de castiñeiro (Vielba *et al.*, 2022). O conxunto dos datos permite suxerir que o *CsJMJ30* pode integrar diferentes sinais para influír no comportamento recalcitrante dos tecidos adultos de P2C.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

6. CONCLUSIÓNS

The results presented in this work provided answers to the objectives formulated at the beginning of this thesis. Thanks to the study carried out, a contribution was made to expanding the knowledge of the mechanisms involved in the acquisition or loss of competence for adventitious rooting and its relationship with phase change. Potential molecular mechanisms that mediate these processes were also identified.

Below are the conclusions drawn after the study of chestnut adventitious rooting:

1. Substituting laboratory agar with locally produced commercial agar and sucrose with common sugar leads to a cost reduction of more than 80% while maintaining shoot proliferation rates and rooting quality.

2. The induction and development of adventitious roots in chestnut are influenced by factors such as oxidative stress or the action of minerals like calcium and can be modulated by using various substances, either synthetic (3,4-MDPU) or natural (Charkor).

3. A decrease in the concentration of IBA in the rooting medium improved the quality of shoots formed in juvenile chestnut material, with reduced callus formation and apical necrosis, without compromising the quality of the roots formed. Additionally, the inhibition of polar auxin transport through NPA reduced root formation in a dose-dependent manner.

4. The wounding effect and rooting treatments trigger a cascade of hormonal signaling primarily related to stress response pathways, notably involving ethylene and lignification.

5. The action of gibberellins reduces root formation in juvenile material primarily at 72 hours, during the root initiation phase, through the auxin signaling pathway and operating on rooting independently of *CsGID2*, in a signaling pathway alternative to the classical pathway in which DELLA proteins are degraded.

6. The action of paclobutrazol was able to induce root formation even in untreated juvenile shoots without auxins - which were previously considered essential for initiating this process - although it requires polar auxin transport to achieve this effect. The inhibition of endogenous gibberellins induces positive feedback mechanisms that promote the expression of GAs receptors *CsGID1b* in an attempt to compensate for the hormone deficiency.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7. The percentage of rooted shoots and the quality of the root system in adult chestnut were improved by using AgNO3 to inhibit the action of ethylene. Ethylene induces a positive feedback system that increases its own synthesis and reduces the rooting rate and the quality of the roots formed – always in the presence of auxins in the medium – while the use of AgNO3 has the opposite effects, not only at a physiological level but also at a molecular level.
8. Inhibiting ethylene allows for the improvement of the root system through the promotion of auxin transport – via the *CsPIN1* transporter – and epigenetic regulation – via the action of the *CsJMJ30* gene.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abarca, D., 2021. Identifying Molecular Chechkpoints for Adventitious Root Induction: Are We Ready to Fill the Gaps? Frontiers in Plant Science 12. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.621032

Abas, L., Kolb, M., Stadlmann, J., Janacek, D.P., Lukic, K., Schwechheimer, C., Sazanov, L.A., Mach, L., Friml, J., Hammes, U.Z., 2021. Naphthylphthalamic acid associates with and inhibits PIN auxin transporters. Proceedings of the National Academy of Sciences 118. https://doi.org/10.1073/pnas.2020857118

Abdalla, N., El-Ramady, H., Seliem, M.K., El-Mahrouk, M.E., Taha, N., Bayoumi, Y., Shalaby, T.A., Dobránszki, J., 2022. An Academic and Technical Overview on Plant Micropropagation Challenges. Horticulturae 8, 677. https://doi.org/10.3390/horticulturae8080677

Abdouli, D., Soufi, S., Bettaieb, T., Werbrouck, S.P.O., 2023. Effects of Monochromatic Light on Growth and Quality of Pistacia vera L. Plants 12, 1546. https://doi.org/10.3390/plants12071546

Abdullah, A.T.M., Hossain, M.A., Bhuiyan, M.K., 2006. Clonal propagation of guava (Psidium guajava Linn.) by stem cutting from mature stockplants. Journal of Forestry Research 17, 301–304. https://doi.org/10.1007/s11676-006-0069-2

Abousalim, A., Mantell, S.H., 1994. A practical method for alleviating shoot-tip necrosis symptoms in in vitro shoot cultures of Pistacia vera cv. Mateur. Journal of Horticultural Science 69, 357–365. https://doi.org/10.1080/14620316.1994.11516465

Abu-Abied, M., Szwerdszarf, D., Mordehaev, I., Levy, A., Stelmakh, O.R., Belausov, E., Yaniv, Y., Uliel, S., Katzenellenbogen, M., Riov, J., Ophir, R., Sadot, E., 2012. Microarray analysis revealed upregulation of nitrate reductase in juvenile cuttings of Eucalyptus grandis, which correlated with increased nitric oxide production and adventitious root formation. The Plant Journal 71, 787–799. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05032.x

Abu-Abied, M., Szwerdszarf, D., Mordehaev, I., Yaniv, Y., Levinkron, S., Rubinstein, M., Riov, J., Ophir, R., Sadot, E., 2014. Gene expression profiling in juvenile and mature cuttings of Eucalyptus grandis reveals the importance of microtubule remodeling during adventitious root formation. BMC Genomics 15. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-826

Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., Beemster, G.T.S., Genschik, P., 2009. Gibberellin Signaling Controls Cell Proliferation Rate in Arabidopsis. Current Biology 19, 1188–1193. https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.05.059

Achard, P., Vriezen, W.H., Van Der Straeten, D., Harberd, N.P., 2003. Ethylene Regulates Arabidopsis Development via the Modulation of DELLA Protein Growth Repressor Function. The Plant Cell 15, 2816–2825. https://doi.org/10.1105/tpc.015685

Achim, Z., Hothorn, T., 2002. Diagnostic Checking in Regression Relationships. R News 2, 7–10.

Ada, R., Enrico, R., 2020. Some Urea Derivatives Positively Affect Adventitious Root Formation: Old Concepts and the State of the Art. Plants 9, 321. https://doi.org/10.3390/plants9030321

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Adamowski, M., Friml, J., 2015. PIN-Dependent Auxin Transport: Action, Regulation, and Evolution. The Plant Cell 27, 20–32. https://doi.org/10.1105/tpc.114.134874

Agrawal, A., Mahalakshmi, C., Tyagi, R.K., 2008. Use of commercial sugar, isabgol and ordinary water in culture medium for conservation of curcuma longa l. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 17, 85–89. https://doi.org/10.1007/BF03263266

Agrawal, A., Sanayaima, R., Tandon, R., Tyagi, R.K., 2010. Cost-effective *in vitro* conservation of banana using alternatives of gelling agent (isabgol) and carbon source (market sugar). Acta Physiologiae Plantarum 32, 703–711. https://doi.org/10.1007/s11738-009-0450-9

Ahkami, A.H., Melzer, M., Ghaffari, M.R., Pollmann, S., Ghorbani Javid, M., Shahinnia, F., Hajirezaei, M.R., Druege, U., 2013. Distribution of indole-3-acetic acid in Petunia hybrida shoot tip cuttings and relationship between auxin transport, carbohydrate metabolism and adventitious root formation. Planta 238, 499–517. https://doi.org/10.1007/s00425-013-1907-z

Al-Mayahi, A.M.W., 2020. Effect of calcium and boron on growth and development of callus and shoot regeneration of date palm 'Barhee'. Canadian Journal of Plant Science 100, 357–364. https://doi.org/10.1139/cjps-2019-0084

Aloufa, M.A.I., Bezerra, S.M.L., Jordâo, G.P.T., 2003. In vitro clonal mass propagation of Ximenia americana L. Fruits 58, 175–178. https://doi.org/10.1051/fruits:2003006

Amarasinghe, S.L., Su, S., Dong, X., Zappia, L., Ritchie, M.E., Gouil, Q., 2020. Opportunities and challenges in long-read sequencing data analysis. Genome Biology 21, 30. https://doi.org/10.1186/s13059-020-1935-5

Amghar, I., Ibriz, M., Ibrahimi, M., Boudra, A., Gaboun, F., Meziani, R., Iraqi, D., Mazri, M.A., Diria, G., Abdelwahd, R., 2021. In Vitro Root Induction from Argan (Argania spinosa (L.) Skeels) Adventitious Shoots: Influence of Ammonium Nitrate, Auxins, Silver Nitrate and Putrescine, and Evaluation of Plantlet Acclimatization. Plants 10, 1062. https://doi.org/10.3390/plants10061062

Amo-Marco, J.B., Lledo, M.D., 1996. In vitro propagation ofSalix tarraconensis Pau ex Font Quer, an endemic and threatened plant. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 32, 42–46. https://doi.org/10.1007/BF02823012

Amoo, S.O., Finnie, J.F., Van Staden, J., 2011. The role of meta-topolins in alleviating micropropagation problems. Plant Growth Regulation 63, 197–206. https://doi.org/10.1007/s10725-010-9504-7

Amri, E., Lyaruu, H.V.M., Nyomora, A.S., Kanyeka, Z.L., 2010. Vegetative propagation of African Blackwood (Dalbergia melanoxylon Guill. & Perr.): effects of age of donor plant, IBA treatment and cutting position on rooting ability of stem cuttings. New Forests 39, 183–194. https://doi.org/10.1007/s11056-009-9163-6

Anaya-Romero, M., Abd-Elmabod, S.K., Muñoz-Rojas, M., Castellano, G., Ceacero, C.J., Alvarez, S., Méndez, M., De la Rosa, D., 2015. Evaluating Soil Threats Under Climate Change Scenarios in the Andalusia Region, Southern Spain. Land Degradation & Development 26, 441–449. https://doi.org/10.1002/ldr.2363

Andrews, S., 2010. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data.

Aragão, L.E.O.C., 2012. The rainforest's water pump. Nature 489, 217–218. https://doi.org/10.1038/nature11485

Aryakia, E., Naghavi, M., Farahmand, Z., Fazeli, A., 2015. Evaluating Allelopathic Effects of Some Plant Species in Tissue Culture Media as an Accurate Method for Selection of Tolerant Plant and Screening of Bioherbicides. Journal of Agricultural Science and Technology 17, 1011–1023.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Aumond, M.L., de Araujo, A.T., de Oliveira Junkes, C.F., de Almeida, M.R., Matsuura, H.N., de Costa, F., Fett-Neto, A.G., 2017. Events Associated with Early Age-Related Decline in Adventitious Rooting Competence of Eucalyptus globulus Labill. Frontiers in Plant Science 8. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01734

Babbar, S.B., Jain, N., 1998. `Isubgol' as an alternative gelling agent in plant tissue culture media. Plant Cell Reports 17, 318–322. https://doi.org/10.1007/s002990050400

Babbar, S.B., Jain, R., Walia, N., 2005. Guar gum as a gelling agent for plant tissue culture media. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant 41, 258–261. https://doi.org/10.1079/IVP2005628

Bagautdinova, Z.Z., Omelyanchuk, N., Tyapkin, A. V., Kovrizhnykh, V. V., Lavrekha, V. V., Zemlyanskaya, E. V., 2022. Salicylic Acid in Root Growth and Development. International Journal of Molecular Sciences 23, 2228. https://doi.org/10.3390/ijms23042228

Bai, T., Dong, Z., Zheng, X., Song, S., Jiao, J., Wang, M., Song, C., 2020. Auxin and Its Interaction With Ethylene Control Adventitious Root Formation and Development in Apple Rootstock. Frontiers in Plant Science 11. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.574881

Bairu, M.W., Novák, O., Doležal, K., Van Staden, J., 2011. Changes in endogenous cytokinin profiles in micropropagated Harpagophytum procumbens in relation to shoot-tip necrosis and cytokinin treatments. Plant Growth Regulation 63, 105–114. https://doi.org/10.1007/s10725-010-9558-6

Ballester, A., San-José, M.C., Vidal, N., Fernández-Lorenzo, J.L., Vieitez, A.M., 1999. Anatomical and Biochemical Events during in vitro Rooting of Microcuttings from Juvenile and Mature Phases of Chestnut. Annals of Botany 83, 619–629. https://doi.org/10.1006/anbo.1999.0865

Ballester, A., Sanchez, M.C., Vieitez, A.M., 1989. Etiolation as a pretreatment for in vitro establishment and multiplication of mature chestnut. Physiologia Plantarum 77, 395–400. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1989.tb05659.x

Banasiak, A., Biedroń, M., Dolzblasz, A., Berezowski, M.A., 2019. Ontogenetic Changes in Auxin Biosynthesis and Distribution Determine the Organogenic Activity of the Shoot Apical Meristem in pin1 Mutants. International Journal of Molecular Sciences 20, 180. https://doi.org/10.3390/ijms20010180

Bandau, F., Decker, V.H.G., Gundale, M.J., Albrectsen, B.R., 2015. Genotypic Tannin Levels in Populus tremula Impact the Way Nitrogen Enrichment Affects Growth and Allocation Responses for Some Traits and Not for Others. PLOS ONE 10, e0140971. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140971

Bannoud, F., Bellini, C., 2021. Adventitious Rooting in Populus Species: Update and Perspectives. Frontiers in Plant Science 12, 7. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.668837

Batista, D.S., Felipe, S.H.S., Silva, T.D., de Castro, K.M., Mamedes-Rodrigues, T.C., Miranda, N.A., Ríos-Ríos, A.M., Faria, D.V., Fortini, E.A., Chagas, K., Torres-Silva, G., Xavier, A., Arencibia, A.D., Otoni, W.C., 2018. Light quality in plant tissue culture: does it matter? In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 54, 195–215. https://doi.org/10.1007/s11627-018-9902-5

Battisti, A., Benvegnù, I., Colombari, F., Haack, R.A., 2014. Invasion by the chestnut gall wasp in Italy causes significant yield loss in Castanea sativa nut production. Agricultural and Forest Entomology 16, 75–79. https://doi.org/10.1111/afe.12036

Bayraktar, M., Hayta-Smedley, S., Unal, S., Varol, N., Gurel, A., 2020. Micropropagation and prevention of hyperhydricity in olive (Olea europaea L.) cultivar 'Gemlik'. South African Journal of Botany 128, 264–273. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.11.022

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

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, 191–194. https://doi.org/10.1023/A:1006182801823

Bemani, E., Ghanati, F., Rezaei, A., Jamshidi, M., 2013. Effect of phenylalanine on Taxol production and antioxidant activity of extracts of suspension-cultured hazel (Corylus avellana L.) cells. Journal of Natural Medicines 67, 446–451. https://doi.org/10.1007/s11418-012-0696-1

Benson, E.E., 2000. In vitro Plant Recalcitrance : An Introduction. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 36, 141–148.

Betti, C., Della Rovere, F., Piacentini, D., Fattorini, L., Falasca, G., Altamura, M.M., 2021. Jasmonates, Ethylene and Brassinosteroids Control Adventitious and Lateral Rooting as Stress Avoidance Responses to Heavy Metals and Metalloids. Biomolecules 11, 77. https://doi.org/10.3390/biom11010077

Betti, C., Della Rovere, F., Ronzan, M., Fattorini, L., 2019. EIN2 and COI1 control the antagonism between ethylene and jasmonate in adventitious rooting of Arabidopsis thaliana thin cell layers. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 138, 41–51. https://doi.org/10.1007/s11240-019-01601-x

Bhagwat, A.C., Patil, A.M., Saroj, S.D., 2022. CRISPR/Cas 9-Based Editing in the Production of Bioactive Molecules. Molecular Biotechnology 64, 245–251. https://doi.org/10.1007/s12033-021-00418-4

Bilska, K., Wojciechowska, N., Alipour, S., Kalemba, E.M., 2019. Ascorbic Acid—The Little-Known Antioxidant in Woody Plants. Antioxidants 8, 645. https://doi.org/10.3390/antiox8120645

Birdsey, R., Pan, Y., 2015. Trends in management of the world's forests and impacts on carbon stocks. Forest Ecology and Management 355, 83–90. https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.04.031

Bonga, J.M., 1982. Vegetative Propagation in Relation to Juvenility, Maturity, and Rejuvenation 387–412. https://doi.org/10.1007/978-94-017-3538-4_13

Bonga, J.M., Klimaszewska, K.K., von Aderkas, P., 2010. Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 100, 241–254. https://doi.org/10.1007/s11240-009-9647-2

Bosela, M.J., Michler, C.H., 2008. Media effects on black walnut (Juglans nigra L.) shoot culture growth in vitro: evaluation of multiple nutrient formulations and cytokinin types. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 44, 316–329. https://doi.org/10.1007/s11627-008-9114-5

Bown, A.W., Shelp, B.J., 2016. Plant GABA: Not Just a Metabolite. Trends in Plant Science 21, 811–813. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.001

Braga, N., Rodrigues, F., P.P. Oliveira, M.B., 2015. Castanea sativa by-products: a review on added value and sustainable application. Natural Product Research 29, 1–18. https://doi.org/10.1080/14786419.2014.955488

Bragança, H., Simões, S., Onofre, N., Tenreiro, R., Rigling, D., 2007. Cryphonectria parasitica in Portugal: diversity of vegetative compatibility types, mating types, and occurrence of hypovirulence. Forest Pathology 37, 391–402. https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2007.00513.x

Brand, M.H., 1993. Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (Amelanchier arborea) shoots in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 35, 203–209. https://doi.org/10.1007/BF00037271

Brand, M.H., Lineberger, R.D., 1992. In Vitro Rejuvenation of Betula (Betulaceae):

USC DE COMPOSTELA

Morphological Evaluation. American Journal of Botany 79, 618. https://doi.org/10.2307/2444877

Bräutigam, K., Vining, K.J., Lafon-Placette, C., Fossdal, C.G., Mirouze, M., Marcos, J.G., Fluch, S., Fraga, M.F., Guevara, M.Á., Abarca, D., Johnsen, Ø., Maury, S., Strauss, S.H., Campbell, M.M., Rohde, A., Díaz-Sala, C., Cervera, M.-T., 2013. Epigenetic regulation of adaptive responses of forest tree species to the environment. Ecology and Evolution 3, 399–415. https://doi.org/10.1002/ece3.461

Brunner, A.M., Varkonyi-Gasic, E., Jones, R.C., 2017. Phase Change and Phenology in Trees, em: Comparative and Evolutionary Genomics of Angiosperm Trees. pp. 227–274. https://doi.org/10.1007/7397_2016_30

Brunoni, F., Rolli, E., Dramis, L., Incerti, M., Abarca, D., Pizarro, A., Diaz-Sala, C., Ricci, A., 2014. Adventitious rooting adjuvant activity of 1,3-di(benzo[d]oxazol-5-yl)urea and 1,3-di(benzo[d]oxazol-6-yl)urea: new insights and perspectives. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 118, 111–124. https://doi.org/10.1007/s11240-014-0466-8

Bu, D., Luo, H., Huo, P., Wang, Z., Zhang, S., He, Z., Wu, Y., Zhao, L., Liu, J., Guo, J., Fang, S., Cao, W., Yi, L., Zhao, Y., Kong, L., 2021. KOBAS-i: intelligent prioritization and exploratory visualization of biological functions for gene enrichment analysis. Nucleic Acids Research 49, W317–W325. https://doi.org/10.1093/nar/gkab447

Buah, J.N., 2014. Suitability of Cassava Starch as a Gelling Agent for the *in vitro* Culture of Banana Plantlets. American Journal of Food Technology 9, 340–349. https://doi.org/10.3923/ajft.2014.340.349

Bueno, P.M.C., Tofanelli, M.B.D., Vendrame, W.A., Biasi, L.A., 2021. Paclobutrazol as an alternative to improve propagation of Rubus brasiliensis Mart. Scientia Horticulturae 287, 110215. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110215

Busov, V., Meilan, R., Pearce, D.W., Rood, S.B., Ma, C., Tschaplinski, T.J., Strauss, S.H., 2006. Transgenic modification of gai or rgl1 causes dwarfing and alters gibberellins, root growth, and metabolite profiles in Populus. Planta 224, 288–299. https://doi.org/10.1007/s00425-005-0213-9

Cacciola, N.A., Cerrato, A., Capriotti, A.L., Cavaliere, C., D'Apolito, M., Montone, C.M., Piovesana, S., Squillaci, G., Peluso, G., Laganà, A., 2020. Untargeted Characterization of Chestnut (Castanea sativa Mill.) Shell Polyphenol Extract: A Valued Bioresource for Prostate Cancer Cell Growth Inhibition. Molecules 25, 2730. https://doi.org/10.3390/molecules25122730

Cai, K., Zhang, D., Li, X., Zhang, Q., Jiang, L., Li, Y., Song, R., Sun, S., Guo, R., Han, R., Hu, X., Zhou, X., Pei, X., Zhao, X., 2023. Exogenous phytohormone application and transcriptome analysis provides insights for adventitious root formation in Taxus cuspidata S. et Z. Plant Growth Regulation 100, 33–53. https://doi.org/10.1007/s10725-022-00934-6

Calamar, A., De Klerk, G.J., 2002. Effect of sucrose on adventitious root regeneration in apple. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 70, 207–212. https://doi.org/10.1023/A:1016356123367

Camisón, Á., Ángela Martín, M., Dorado, F.J., Moreno, G., Solla, A., 2020. Changes in carbohydrates induced by drought and waterlogging in Castanea sativa. Trees 34, 579–591. https://doi.org/10.1007/s00468-019-01939-x

Carbone, F., Moroni, S., Mattioli, W., Mazzocchi, F., Romagnoli, M., Portoghesi, L., 2020. Competitiveness and competitive advantages of chestnut timber laminated products. Annals of Forest Science 77, 51. https://doi.org/10.1007/s13595-020-00950-4

Carra, A., Del Signore, M.B., Sottile, F., Ricci, A., Carimi, F., 2012. Potential use of new

USC DE COMPOSTELA

diphenylurea derivatives in micropropagation of Capparis spinosa L. Plant Growth Regulation 66, 229–237. https://doi.org/10.1007/s10725-011-9645-3
Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R.P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inze, D., Sandberg, G., Casero, P.J., Bennett, M., Inzé, D., Sandberg, G., Casero, P.J., Bennett, M., 2001. Auxin Transport Promotes Arabidopsis Lateral Root Initiation. The Plant Cell 13, 843–852. https://doi.org/10.1105/tpc.13.4.843
Caso, O.H., 1992. Juvenilidad , rejuvenecimiento y propagación vegetativa de las especies leñosas. Agriscientia IX, 5–16.
Castaño-Santamaría, J., Barrio-Anta, M., Álvarez-Álvarez, P., 2013. Potential above ground biomass production and total tree carbon sequestration in the major forest species in NW Spain. International Forestry Review 15, 273–289. https://doi.org/10.1505/146554813807700083
Castedo-Dorado, F., Álvarez-Álvarez, P., Cuenca Valera, B., Lombardero, M.J., 2023a. Local-scale dispersal patterns and susceptibility to Dryocosmus kuriphilus in different Castanea species and hybrid clones: insights from a field trial. New Forests 54, 9–28. https://doi.org/10.1007/s11056-021-09893-8
Castedo-Dorado, F., Álvarez-Álvarez, P., Lombardero, M.J., 2023b. The impact of the Asian chestnut gall wasp (Dryocosmus kuriphilus) on chestnut tree growth may be mediated by site resources. Frontiers in Forests and Global Change 5. https://doi.org/10.3389/ffgc.2022.1095185
Castillo, M.-C., Forment, J., Gadea, J., Carrasco, J.L., Juarez, J., Navarro, L., Ancillo, G., 2013. Identification of transcription factors potentially involved in the juvenile to adult phase transition in Citrus. Annals of Botany 112, 1371–1381. https://doi.org/10.1093/aob/mct211
Castro-Camba, R., Sánchez, C., Vidal, N., Vielba, J.M., 2022a. Interactions of Gibberellins with Phytohormones and Their Role in Stress Responses. Horticulturae 8, 241. https://doi.org/10.3390/horticulturae8030241
Castro-Camba, R., Sánchez, C., Vidal, N., Vielba, J.M., 2022b. Plant Development and Crop Yield: The Role of Gibberellins. Plants 11, 2650. https://doi.org/10.3390/plants11192650
Cederholm, H.M., Iyer-Pascuzzi, A.S., Benfey, P.N., 2012. Patterning the primary root in Arabidopsis. Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology 1, 675–691. https://doi.org/10.1002/wdev.49
Chaari-Rkhis, A., Maalej, M., Ouled Messaoud, S., Drira, N., 2006. In vitro vegetative growth and flowering of olive tree in response to GA3 treatment. African Journal of Biotechnology 5, 2097–2302.
Chang, E., Guo, W., Dong, Y., Jia, Z., Zhao, X., Jiang, Z., Zhang, L., Zhang, J., Liu, J., 2023. Metabolic profiling reveals key metabolites regulating adventitious root formation in ancient Platycladus orientalis cuttings. Frontiers in Plant Science 14. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1192371
Chang, X.Y., Zhang, K., Yuan, Y., Ni, P., Ma, J., Liu, H., Yang, G., Bai, M., Gong, S., shun Yang, G., Bai, M., 2022. A simple, rapid, and quantifiable system for studying adventitious root formation in grapevine. Plant Growth Regulation 98, 117–126. https://doi.org/10.1007/s10725-022-00838-5
Chave, A., 2020. A Chave: Os nomes galegos das plantas e árbores. Xinzo de Limia (Ourense).
Chen, C., 2016. Cost analysis of plant micropropagation of Phalaenopsis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 126, 167–175. https://doi.org/10.1007/s11240-016-0987-4
Chen, K., Li, G., Bressan, R.A., Song, C., Zhu, J., Zhao, Y., 2020. Abscisic acid dynamics,

USC DE COMPOSTELA

signaling, and functions in plants. Journal of Integrative Plant Biology 62, 25–54. https://doi.org/10.1111/jipb.12899

Chen, P., Yang, R., Bartels, D., Dong, T., Duan, H., 2022. Roles of Abscisic Acid and Gibberellins in Stem/Root Tuber Development. International Journal of Molecular Sciences 23, 4955. https://doi.org/10.3390/ijms23094955

Chen, S.-Y., Kuo, S.-R., Chien, C.-T., 2008. Roles of gibberellins and abscisic acid in dormancy and germination of red bayberry (Myrica rubra) seeds. Tree Physiology 28, 1431–1439. https://doi.org/10.1093/treephys/28.9.1431

Chen, X., Xia, X., Guo, X., Zhou, Y., Shi, K., Zhou, J., Yu, J., 2016. Apoplastic H 2 O 2 plays a critical role in axillary bud outgrowth by altering auxin and cytokinin homeostasis in tomato plants. New Phytologist 211, 1266–1278. https://doi.org/10.1111/nph.14015

Chen, Y.-T., Shen, C.-H., Lin, W.-D., Chu, H.-A., Huang, B.-L., Kuo, C.-I., Yeh, K.-W., Huang, L.-C., Chang, I.-F., 2013. Small RNAs of Sequoia sempervirens during rejuvenation and phase change. Plant Biology 15, 27–36. https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00622.x

Choudhury, S.R., Roy, S., Sengupta, D.N., 2008. Characterization of transcriptional profiles of MA-ACS1 and MA-ACO1 genes in response to ethylene, auxin, wounding, cold and different photoperiods during ripening in banana fruit. Journal of Plant Physiology 165, 1865–1878. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.04.012

Clapa, D., Fira, A., Pacurar, I., 2010. *In vitro* propagation of Pinguicula vulgaris. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture 67, 330–335.

Clapa, D., Fira, A., Rusu, T., 2008. The use of Isubgol and Sequestrene 138 for the *in vitro* propagation of the highbush blueberry (Vaccinium corymbosum L.). Journal of Food, Agriculture and Environment 6, 145–147.

Colón-Guasp, W., Nell, T.A., Kane, M.E., Barrett, J.E., 1996. Effects of abscisic acid on ex vitro acclimatization of Aronia arbutifolia (L.) Pers. Journal of the American Society for Horticultural Science 121, 101–104. https://doi.org/10.21273/jashs.121.1.101

Compton, M.E., Preece, J.E., 1988. Response of Tobacco Callus to Shoot Tip Exudation from Five Species. HortScience 23, 208–210. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.23.1.208

Conedera, M., Barthold, F., Torriani, D., Pezzatti, G.B., 2010. Drought sensitivity of Castanea sativa: Case study of summer 2003 in the Southern Alps. Acta Horticulturae 297–302. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.866.36

Conedera, M., Krebs, P., Gehring, E., Wunder, J., Hülsmann, L., Abegg, M., Maringer, J., 2021. How future-proof is Sweet chestnut (Castanea sativa) in a global change context? Forest Ecology and Management 494, 119320. https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119320

Consello da Unión Europea, 2002. COUNCIL DIRECTIVE 2001/111/EC of 20 December 2001 relating to certain sugars intended for human consumption 5, 53–57.

Covelo, P., Vidal, N., Rico, S., Vielba, J.M., Reggiardo, M., Sánchez, C., 2019. Performance of culture lines established in vitro from a monumental birch tree.

Cribari-Neto, F., Zeileis, A., 2010. Beta Regression in R. Journal of Statistical Software 34. https://doi.org/10.18637/jss.v034.i02

Cunha, A.F.A., Rodrigues, P.H.D., Anghinoni, A.C., de Paiva, V.J., Pinheiro, D.G. da S., Campos, M.L., 2023. Mechanical wounding impacts the growth versus defense balance in tomato (Solanum lycopersicum). Plant Science 329, 111601. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111601

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

da Costa, C.T., de Almeida, M.R., Ruedell, C.M., Schwambach, J., Maraschin, F.S., Fett-Neto, A.G., 2013. When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. Frontiers in Plant Science 4, 133. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00133

Daguin, F., Letouze, R., 1986. Ammonium-induced vitrification in cultured tissues. Physiologia Plantarum 66, 94–98. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1986.tb01239.x

Damodaran, S., Strader, L.C., 2019. Indole 3-Butyric Acid Metabolism and Transport in Arabidopsis thaliana. Frontiers in Plant Science 10. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00851

Danecek, P., Bonfield, J.K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M.O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S.A., Davies, R.M., Li, H., 2021. Twelve years of SAMtools and BCFtools. GigaScience 10. https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008

David, L.C., Berquin, P., Kanno, Y., Seo, M., Daniel-Vedele, F., Ferrario-Méry, S., 2016. N availability modulates the role of NPF3.1, a gibberellin transporter, in GA-mediated phenotypes in Arabidopsis. Planta 244, 1315–1328. https://doi.org/10.1007/s00425-016-2588-1

Davière, J.M., Achard, P., 2013. Gibberellin signaling in plants. Development (Cambridge) 140, 1147–1151. https://doi.org/10.1242/dev.087650

de Almeida, M., de Almeida, C.V., Graner, E.M., Brondani, G.E., de Abreu-Tarazi, M.F., 2012. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. Plant Cell Reports 31, 1495–1515. https://doi.org/10.1007/s00299-012-1264-6

de Andrade, L.A., Santos, C.H.B., Frezarin, E.T., Sales, L.R., Rigobelo, E.C., 2023. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria for Sustainable Agricultural Production. Microorganisms 11, 1088. https://doi.org/10.3390/microorganisms11041088

de Cabo, R.C., González-Reyes, J.A., Córdoba, F., Navas, P., 1996. Rooting hastened in onions by ascorbate and ascorbate free radical. Journal of Plant Growth Regulation 15, 53–56. https://doi.org/10.1007/BF00192931

De Klerk, G.-J., Guan, H., Huisman, P., Marinova, S., 2011. Effects of phenolic compounds on adventitious root formation and oxidative decarboxylation of applied indoleacetic acid in Malus 'Jork 9'. Plant Growth Regulation 63, 175–185. https://doi.org/10.1007/s10725-010-9555-9

de Klerk, G.-J., van der Krieken, W., de Jong, J.C., 1999. Review the formation of adventitious roots: New concepts, new possibilities. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 35, 189–199. https://doi.org/10.1007/s11627-999-0076-z

de la Viña, G., Pliego-Alfaro, F., Driscoll, S.P., Mitchell, V.J., Parry, M.A., Lawlor, D.W., 1999. Effects of CO2 and sugars on photosynthesis and composition of avocado leaves grown in vitro. Plant Physiology and Biochemistry 37, 587–595. https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)80111-4

Deb, C.R., Pongener, A., 2022. Use of low cost agar alternative for in vitro propagation of commercially viable orchids is an attractive way for commercialization. South African Journal of Botany 150, 789–796. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.08.028

Demo, P., Kuria, P., Nyende, A.B., Kahangi, E.M., 2008. Table sugar as an alternative low cost medium component for *in vitro* micro-propagation of potato (*Solanum tuberosum L.*). African Journal of Biotechnology 7, 2578–2584.

Denaxa, N.-K., Roussos, P.A., Vemmos, S.N., 2020. Assigning a Role to the Endogenous Phenolic Compounds on Adventitious Root Formation of Olive Stem Cuttings. Journal of Plant Growth Regulation 39, 411–421. https://doi.org/10.1007/s00344-019-09991-0

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Denaxa, N.-K., Tsafouros, A., Roussos, P.A., 2022. Role of phenolic compounds in adventitious root formation, em: Environmental, Physiological and Chemical Controls of Adventitious Rooting in Cuttings. Elsevier, pp. 251–288. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90636-4.00013-1

Deng, S., Jang, I.-C., Su, L., Xu, J., Chua, N.-H., 2016. JMJ24 targets CHROMOMETHYLASE3 for proteasomal degradation in Arabidopsis. Genes & Development 30, 251–256. https://doi.org/10.1101/gad.274647.115

Deng, Y., Wang, C., Wang, N., Wei, L., Li, W., Yao, Y., Liao, W., 2019. Roles of Small-Molecule Compounds in Plant Adventitious Root Development. Biomolecules 9, 420. https://doi.org/10.3390/biom9090420

Deng, Y., Wang, C., Zhang, M., Wei, L., Liao, W., 2022. Identification of Key Genes during Ethylene-Induced Adventitious Root Development in Cucumber (Cucumis sativus L.). International Journal of Molecular Sciences 23, 12981. https://doi.org/10.3390/ijms232112981

Di Battista, F., Maccario, D., Beruto, M., Grauso, L., Lanzotti, V., Curir, P., Monroy, F., 2019. Metabolic changes associated to the unblocking of adventitious root formation in aged, rooting-recalcitrant cuttings of Eucalyptus gunnii Hook. f. (Myrtaceae). Plant Growth Regulation 89, 73–82. https://doi.org/10.1007/s10725-019-00515-0

Diamandis, S., 2018. Management of Chestnut Blight in Greece Using Hypovirulence and Silvicultural Interventions. Forests 9, 492. https://doi.org/10.3390/f9080492

Díaz-Manzano, F.E., Cabrera, J., Ripoll, J.-J., del Olmo, I., Andrés, M.F., Silva, A.C., Barcala, M., Sánchez, M., Ruíz-Ferrer, V., de Almeida-Engler, J., Yanofsky, M.F., Piñeiro, M., Jarillo, J.A., Fenoll, C., Escobar, C., 2018. A role for the gene regulatory module microRNA172/TARGET OF EARLY ACTIVATION TAGGED 1/FLOWERING LOCUS T (miRNA172/TOE1/FT) in the feeding sites induced by Meloidogyne javanica in Arabidopsis thaliana. New Phytologist 217, 813–827. https://doi.org/10.1111/nph.14839

Díaz-Sala, C., 2014. Direct reprogramming of adult somatic cells toward adventitious root formation in forest tree species: the effect of the juvenileâ€“adult transition. Frontiers in Plant Science 5, 310. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00310

Diaz-Sala, C., Rey, M., Rodriguez, R., 1994. Temporary modification of adult filbert proliferation capacity by sequential subcultures: Intensive pruning as a pre-treatment for in vitro reinvigoration. Journal of Horticultural Science 69, 1–678. https://doi.org/10.1080/14620316.1994.11516499

Diaz-Sala, C., Hutchison, K.W., Goldfarb, B., Greenwood, M.S., Diaz-Sala, C., Hutchison, K.W., Goldfarb, B., Greenwood, M.S., 1996. Maturation-related loss in rooting competence by loblolly pine stem cuttings: The role of auxin transport, metabolism and tissue sensitivity. Physiologia Plantarum 97, 481–490. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00507.x

Dimitrova, N., Berova, M., 2020. Optimisation of rooting and acclimatization of Pyrus communis L . with the biostimulator Charkor 20, 46–56.

Dob, A., Lakehal, A., Novak, O., Bellini, C., 2021. Jasmonate inhibits adventitious root initiation through repression of CKX1 and activation of RAP2.6L transcription factor in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany 72, 7107–7118. https://doi.org/10.1093/jxb/erab358

Dobisova, T., Hrdinova, V., Cuesta, C., Michlickova, S., Urbankova, I., Hejatkova, R., Zadnikova, P., Pernisova, M., Benkova, E., Hejatko, J., 2017. Light Controls Cytokinin Signaling via Transcriptional Regulation of Constitutively Active Sensor Histidine

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Kinase CKI1. Plant Physiology 174, 387–404. https://doi.org/10.1104/pp.16.01964
Dobránszki, J., Teixeira da Silva, J.A., 2010. Micropropagation of apple — A review. Biotechnology Advances 28, 462–488. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.008
Doran, P.M., 2009. Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: Incentives and limitations. Biotechnology and Bioengineering 103, 60–76. https://doi.org/10.1002/bit.22280
Driver, J.A., Kuniyuki, A.H., 1984. In Vitro Propagation of Paradox Walnut Rootstock. HortScience 19, 507–509. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.19.4.507
Druege, U., Baltruschat, H., Franken, P., 2007. Piriformospora indica promotes adventitious root formation in cuttings. Scientia Horticulturae 112, 422–426. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.01.018
Druege, U., Franken, P., Hajirezaei, M.R., 2016. Plant Hormone Homeostasis, Signaling, and Function during Adventitious Root Formation in Cuttings. Frontiers in Plant Science 7, 381. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00381
Druege, U., Franken, P., Lischewski, S., Ahkami, A.H., Zerche, S., Hause, B., Hajirezaei, M.R., 2014. Transcriptomic analysis reveals ethylene as stimulator and auxin as regulator of adventitious root formation in petunia cuttings. Frontiers in Plant Science 5. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00494
Druege, U., Hilo, A., Pérez-Pérez, J.M., Klopotek, Y., Acosta, M., Shahinnia, F., Zerche, S., Franken, P., Hajirezaei, M.R., 2019. Molecular and physiological control of adventitious rooting in cuttings: phytohormone action meets resource allocation. Annals of Botany 123, 929–949. https://doi.org/10.1093/aob/mcy234
Du, R., Niu, S., Liu, Y., Sun, X., Porth, I., El-Kassaby, Y.A., Li, W., 2017. The gibberellin GID1-DELLA signalling module exists in evolutionarily ancient conifers. Scientific Reports 7, 16637. https://doi.org/10.1038/s41598-017-11859-w
Dumschott, K., Schmidt, M.H.-W., Chawla, H.S., Snowdon, R., Usadel, B., 2020. Oxford Nanopore sequencing: new opportunities for plant genomics? Journal of Experimental Botany 71, 5313–5322. https://doi.org/10.1093/jxb/eraa263
Durán-Medina, Y., Díaz-Ramírez, D., Marsch-Martínez, N., 2017. Cytokinins on the Move. Frontiers in Plant Science 8. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00146
Ďurkovič, J., Lengyelová, A., Čaňová, I., Kurjak, D., Hladká, D., 2009. Photosynthetic performance and stomatal characteristics during ex vitro acclimatisation of true service tree (Sorbus domestica L.). The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 84, 223–227. https://doi.org/10.1080/14620316.2009.11512508
Duta-Cornescu, G., Constantin, N., Pojoga, D.-M., Nicuta, D., Simon-Gruita, A., 2023. Somaclonal Variation—Advantage or Disadvantage in Micropropagation of the Medicinal Plants. International Journal of Molecular Sciences 24, 838. https://doi.org/10.3390/ijms24010838
Dutta, I., Bhadra, J., Ghosh, P., Saha, B., Datta, S., 2013. An efficient and cost effective protocol for *in vitro* propagation of pineapple. Journal of Ornamental Plants 3, 229–234.
Eshed, Y., Riov, J., Atzmon, N., 1996. Rooting Oak Cuttings from Gibberellin-treated Stock Plants. HortScience 31, 872–873. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.31.5.872
Espunya, M.C., Diaz, M., Moreno-Romero, J., Martinez, M.C., 2006. Modification of intracellular levels of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase alters glutathione homeostasis and root development. Plant, Cell and Environment 29, 1002–1011. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01497.x
Essalimi, B., Esserti, S., Rifai, L.A., Koussa, T., Makroum, K., Belfaiza, M., Rifai, S., Venisse, J.S., Faize, L., Alburquerque, N., Burgos, L., Jadoumi, S. El, Faize, M., 2022.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Enhancement of plant growth, acclimatization, salt stress tolerance and verticillium wilt disease resistance using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) associated with plum trees (Prunus domestica). Scientia Horticulturae 291, 110621. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110621

Essl, F., Milasowszky, N., Dirnböck, T., 2011. Plant invasions in temperate forests: Resistance or ephemeral phenomenon? Basic and Applied Ecology 12, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.baae.2010.10.003

Estrella-Maldonado, H., Fuentes Ortíz, G., Chan León, A.C., Rodríguez Zapata, L.C., Talavera May, C., Espadas y Gil, F., Barredo Pool, F., Idrovo Espín, F.M., Santamaría, J.M., 2016. The papaya CpAUX1/LAX and CpPIN genes: structure, phylogeny and expression analysis related to root formation on in vitro plantlets. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 126, 187–204. https://doi.org/10.1007/s11240-016-0989-2

Eysholdt-Derzsó, E., Sauter, M., 2017. Root Bending Is Antagonistically Affected by Hypoxia and ERF-Mediated Transcription via Auxin Signaling. Plant Physiology 175, 412–423. https://doi.org/10.1104/pp.17.00555

Falasca, G., Zaghi, D., Possenti, M., Altamura, M.M., 2004. Adventitious root formation in Arabidopsis thaliana thin cell layers. Plant Cell Reports 23. https://doi.org/10.1007/s00299-004-0801-3

Fattorini, L., Hause, B., Gutierrez, L., Veloccia, A., Della Rovere, F., Piacentini, D., Falasca, G., Altamura, M.M., 2018. Jasmonate promotes auxin-induced adventitious rooting in dark-grown Arabidopsis thaliana seedlings and stem thin cell layers by a cross-talk with ethylene signalling and a modulation of xylogenesis. BMC Plant Biology 18, 182. https://doi.org/10.1186/s12870-018-1392-4

Fehér, A., 2019. Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? Frontiers in Plant Science 10. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536

Fernandes, P., Colavolpe, M.B., Serrazina, S., Costa, R.L., 2022. European and American chestnuts: An overview of the main threats and control efforts. Frontiers in Plant Science 13. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.951844

Ferreira, M. dos S., Rocha, A. de J., Nascimento, F. dos S., Oliveira, W.D. dos S., Soares, J.M. da S., Rebouças, T.A., Morais Lino, L.S., Haddad, F., Ferreira, C.F., Santos-Serejo, J.A. dos, Fernández, J.S., Amorim, E.P., 2023. The Role of Somaclonal Variation in Plant Genetic Improvement: A Systematic Review. Agronomy 13, 730. https://doi.org/10.3390/agronomy13030730

Feyissa, B.A., Amyot, L., Nasrollahi, V., Papadopoulos, Y., Kohalmi, S.E., Hannoufa, A., 2021. Involvement of the miR156/SPL module in flooding response in Medicago sativa. Scientific Reports 11, 3243. https://doi.org/10.1038/s41598-021-82450-7

Fonouni-Farde, C., Miassod, A., Laffont, C., Morin, H., Bendahmane, A., Diet, A., Frugier, F., 2019. Gibberellins negatively regulate the development of Medicago truncatula root system. Scientific Reports 9, 2335. https://doi.org/10.1038/s41598-019-38876-1

Ford, Y.-Y., Taylor, J.M., Blake, P.S., Marks, T.R., 2002. Gibberellin A 3 stimulates adventitious rooting of cuttings from cherry (Prunus avium). https://doi.org/10.1023/A:1020584627919

FOREST EUROPE, 2020. State of Europe's Forests.

Fox, J., Weisberg, S., 2019. An R Companion to Applied Regression, Third. ed. Sage, Thousand Oaks CA.

Franck, T., Kevers, C., Gaspar, T., Dommes, J., Deby, C., Greimers, R., Serteyn, D., Deby-Dupont, G., 2004. Hyperhydricity of Prunus avium shoots cultured on gelrite: a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

controlled stress response. Plant Physiology and Biochemistry 42, 519–527. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.05.003
Freitas, T.R., Santos, J.A., Silva, A.P., Fraga, H., 2021. Influence of Climate Change on Chestnut Trees: A Review. Plants 10, 1463. https://doi.org/10.3390/plants10071463
Fu, H., Wei, X., Chen, Q., Yong, S., Liu, Q., Dang, J., Wu, D., Liang, G., Guo, Q., 2023. Comparative transcriptome analysis of molecular mechanisms underlying adventitious root developments in Huangshan Bitter tea (Camellia gymnogyna Chang) under red light quality. Frontiers in Plant Science 14. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1154169
Fukaki, H., Nakao, Y., Okushima, Y., Theologis, A., Tasaka, M., 2005. Tissue-specific expression of stabilized SOLITARY-ROOT/IAA14 alters lateral root development in Arabidopsis. The Plant Journal 44, 382–395. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02537.x
Gaidamashvili, M., Benelli, C., 2021. Threatened Woody Plants of Georgia and Micropropagation as a Tool for In Vitro Conservation. Agronomy 11, 1082. https://doi.org/10.3390/agronomy11061082
Gallo, C.M., Paiva, R., Silva, L.C., Souza, A.C., Soares, A.L.C., Neto, A.P.C., 2015. INFLUENCE OF SILVER THIOSULFATE ETHYLENE INHIBITOR ON IN VITRO GROWTH OF VASCONCELLEA QUERCIFOLIA SHOOTS. Acta Horticulturae 565–568. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1083.75
Gao, C., Li, C., Li, Z., Liu, Y., Li, J., Guo, J., Mao, J., Fang, F., Wang, C., Deng, X., Zheng, Z., 2023. Comparative transcriptome profiling of susceptible and tolerant citrus species at early and late stage of infection by “Candidatus Liberibacter asiaticus”. Frontiers in Plant Science 14. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1191029
Gao, H., Xia, X., An, L., 2022. Critical roles of the activation of ethylene pathway genes mediated by DNA demethylation in Arabidopsis hyperhydricity. The Plant Genome 15. https://doi.org/10.1002/tpg2.20202
Gao, Y., Zhao, M., Wu, X.-H., Li, D., Borthakur, D., Ye, J.-H., Zheng, X.-Q., Lu, J.-L., 2019. Analysis of Differentially Expressed Genes in Tissues of Camellia sinensis during Dedifferentiation and Root Redifferentiation. Scientific Reports 9, 2935. https://doi.org/10.1038/s41598-019-39264-5
García-López, M.C., Vidoy, I., Jiménez-Ruiz, J., Muñoz-Mérida, A., Fernández-Ocaña, A., de la Rosa, R., Barroso, J.B., Navarro, F., Trelles, O., Beuzón, C.R., Barceló, A., Valpuesta, V., Luque, F., 2014. Genetic changes involved in the juvenile-to-adult transition in the shoot apex of Olea europaea L. occur years before the first flowering. Tree Genetics & Genomes 10, 585–603. https://doi.org/10.1007/s11295-014-0706-4
Gasch, P., Fundinger, M., Müller, J.T., Lee, T., Bailey-Serres, J., Mustroph, A., 2016. Redundant ERF-VII Transcription Factors Bind to an Evolutionarily Conserved cis -Motif to Regulate Hypoxia-Responsive Gene Expression in Arabidopsis. The Plant Cell 28, 160–180. https://doi.org/10.1105/tpc.15.00866
Gautheret, R.J., 1939. Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. CR Hebd Seances Acad Sc 208, 118–120.
Gehlot, A., Gupta, R., Arya, I., Arya, S., Tripathi, A., 2015. De novo adventitious root formations in mini-cuttings of Azadirachta indica in response to different rooting media and auxin treatments. iForest - Biogeosciences and Forestry 8, 558–564. https://doi.org/10.3832/ifor1189-007
Geisler, M.M., 2021. A Retro-Perspective on Auxin Transport. Frontiers in Plant Science 12. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.756968
Geiss, G., Gutierrez, L., Bellini, C., 2009. Adventitious Root Formation: New Insights and

USC DE COMPOSTELA

Perspectives, em: Root Development. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp. 127–156. https://doi.org/10.1002/9781444310023.ch5

Georget, F., Courtel, P., Garcia, E.M., Hidalgo, M., Alpizar, E., Breitler, J.-C., Bertrand, B., Etienne, H., 2017. Somatic embryogenesis-derived coffee plantlets can be efficiently propagated by horticultural rooted mini-cuttings: A boost for somatic embryogenesis. Scientia Horticulturae 216, 177–185. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.12.017

Ghazijahani, N., Hadavi, E., Son, M.S., Jeong, B.R., 2018. Foliar application of citric and malic acid to stock plants of rose alters the rooting of stem cuttings. Chemical and Biological Technologies in Agriculture 5, 11. https://doi.org/10.1186/s40538-018-0123-2

Gjamovski, V., Kiprijanovski, M., 2011. Influence of nine dwarfing apple rootstocks on vigour and productivity of apple cultivar 'Granny Smith'. Scientia Horticulturae 129, 742–746. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.05.032

Gomes, F., Simões, M., Lopes, M.L., Canhoto, J.M., 2010. Effect of plant growth regulators and genotype on the micropropagation of adult trees of Arbutus unedo L. (strawberry tree). New Biotechnology 27, 882–892. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.02.009

Gómez-Martínez, M., Swapna, T.S., Castillo-Reyes, F., Soriano-Melgar, L. de A.A., Ramírez-Godina, F., García-Osuna, H.T., Vera-Reyes, I., Flores-Gallegos, A.C., Rodríguez-Herrera, R., 2019. Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Applications, em: Advances in Food Bioproducts and Bioprocessing Technologies. CRC Press, Boca Raton, FL : CRC Press, Taylor & Francis Group, [2020] | Series: Contemporary food engineering, pp. 109–144. https://doi.org/10.1201/9780429331817-7

Gomi, K., Sasaki, A., Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Kitano, H., Matsuoka, M., 2004. GID2, an F-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice. Plant Journal 37, 626–634. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2003.01990.x

Gonçalves, J.C., Diogo, G., Coelho, M.T., Vidal, N., Amâncio, S., 2008. Quantitation of endogenous levels of IAA, IAAsp and IBA in micro-propagated shoots of hybrid chestnut pre-treated with IBA. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 44, 412–418. https://doi.org/10.1007/s11627-008-9151-0

Gou, J., Ma, C., Kadmiel, M., Gai, Y., Strauss, S., Jiang, X., Busov, V., 2011. Tissue-specific expression of Populus C19 GA 2-oxidases differentially regulate above- and below-ground biomass growth through control of bioactive GA concentrations. New Phytologist 192, 626–639. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03837.x

Gour, V., Kant, T., 2011. Efficacy of low cost gelling agents and carbon source alternatives during *in vitro* rooting of *Balanites aegyptiaca* and *Phyllanthus emblica* microshoots. Tree For Sci Biotechnol 5, 58–60.

Grace, N.H., 1945. Liberation of growth stimulating materials by rooting Salix cuttings. Canadian Journal of Research 23c, 85–93. https://doi.org/10.1139/cjr45c-006

Greenwood, M.S., Cui, X., Xu, F., 2001. Response to auxin changes during maturation-related loss of adventitious rooting competence in loblolly pine (Pinus taeda) stem cuttings. Physiol Plant 111, 373–380. https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1110315.x

Greenwood, M.S., Hutchison, K.W., 1993. Maturation as a Developmental Process, em: Clonal Forestry I. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 14–33. https://doi.org/10.1007/978-3-642-84175-0_3

Gresshoff, P.M., Doy, C.H., 1972. Development and differentiation of haploid Lycopersicon esculentum (tomato). Planta 107, 161–170. https://doi.org/10.1007/BF00387721

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Grimplet, J., Pimentel, D., Agudelo-Romero, P., Martinez-Zapater, J.M., Fortes, A.M., 2017. The LATERAL ORGAN BOUNDARIES Domain gene family in grapevine: genome-wide characterization and expression analyses during developmental processes and stress responses. Scientific Reports 7, 15968. https://doi.org/10.1038/s41598-017-16240-5

Gu, Y.-Q., Wildermuth, M.C., Chakravarthy, S., Loh, Y.-T., Yang, C., He, X., Han, Y., Martin, G.B., 2002. Tomato Transcription Factors Pti4, Pti5, and Pti6 Activate Defense Responses When Expressed in Arabidopsis. The Plant Cell 14, 817–831. https://doi.org/10.1105/tpc.000794

Guan, L., Li, Y., Huang, K., Cheng, Z.-M., 2020. Auxin regulation and MdPIN expression during adventitious root initiation in apple cuttings. Horticulture Research 7, 143. https://doi.org/10.1038/s41438-020-00364-3

Guan, L., Murphy, A.S., Peer, W.A., Gan, L., Li, Y., Cheng, Z.-M. (Max), 2015. Physiological and Molecular Regulation of Adventitious Root Formation. Critical Reviews in Plant Sciences 34, 506–521. https://doi.org/10.1080/07352689.2015.1090831

Guan, L., Tayengwa, R., Cheng, Z. (Max), Peer, W.A., Murphy, A.S., Zhao, M., 2019. Auxin regulates adventitious root formation in tomato cuttings. BMC Plant Biology 19, 435. https://doi.org/10.1186/s12870-019-2002-9

Guitián, J., Guitián, P., Magrach, A., Docampo, C., Domínguez, P., Guitián, L., 2012. Effect of management and spatial characteristics on plant species richness of Castanea sativa Mill. woodlots in the NW Iberian Peninsula. Journal of Forest Research 17, 98–104. https://doi.org/10.1007/s10310-011-0261-x

Guo, T., Li, X., 2023. Machine learning for predicting phenotype from genotype and environment. Current Opinion in Biotechnology 79, 102853. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102853

Haberlandt, G., 1902. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien. Math.-Naturwiss. Kl., Abt. J. 69–92.

Hackett, W.P., 1985. Juvenility, Maturation, and Rejuvenation in Woody Plants, em: Horticultural Reviews. AVI Publishing Co., Hoboken, NJ, USA, pp. 109–155. https://doi.org/10.1002/9781118060735.ch3

Hafeez, M.B., Zahra, N., Zahra, K., Raza, A., Batool, A., Shaukat, K., Khan, S., 2021. Brassinosteroids: Molecular and physiological responses in plant growth and abiotic stresses. Plant Stress 2, 100029. https://doi.org/10.1016/j.stress.2021.100029

Haffner, V., Enjalric, F., Lardet, L., Carron, M., 1991. Maturation of woody plants: a review of metabolic and genomic aspects. Annales des Sciences Forestières 48, 615–630. https://doi.org/10.1051/forest:19910601

Hamann, A., 1998. Adventitious root formation in cuttings of loblolly pine (Pinus taeda L .): developmental sequence and effects of maturation. Trees 12, 175–180. https://doi.org/10.1007/PL00009707

Hammes, U.Z., Murphy, A.S., Schwechheimer, C., 2022. Auxin Transporters—A Biochemical View. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 14, a039875. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a039875

Han, S., Fang, L., Ren, X., Wang, W., Jiang, J., 2015. <scp>MPK</scp> 6 controls <scp>H</scp> $_2$ <scp>O</scp> $_2$ -induced root elongation by mediating <scp>C</scp> a $^{2+}$ influx across the plasma membrane of root cells in *<scp>A</scp> rabidopsis* seedlings. New Phytologist 205, 695–706. https://doi.org/10.1111/nph.12990

Han, X., An, Y., Zhou, Y., Liu, C., Yin, W., Xia, X., 2020a. Comparative transcriptome analyses define genes and gene modules differing between two Populus genotypes with contrasting stem growth rates. Biotechnology for Biofuels 13, 139.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

https://doi.org/10.1186/s13068-020-01758-0
Han, X., Kui, M., He, K., Yang, M., Du, J., Jiang, Y., Hu, Y., 2023. Jasmonate-regulated root growth inhibition and root hair elongation. Journal of Experimental Botany 74, 1176–1185. https://doi.org/10.1093/jxb/erac441
Han, Y.Q., Shi, Y., Gao, Y.M., Du, J.D., Feng, N.J., Zhang, Y.X., Zheng, D.F., 2020b. Treatment of Glycine max seeds with gibberellins alters root morphology, anatomy, and transcriptional networks. Biologia plantarum 64, 32–42. https://doi.org/10.32615/bp.2019.124
Hansen, J., 1989. Influence of cutting position and temperature during rooting on adventitious root formation and axillary bud break of Stephanotis floribunda. Scientia Horticulturae 40, 345–354. https://doi.org/10.1016/0304-4238(89)90108-8
Hao, D.-L., Zhou, J.-Y., Yang, S.-Y., Qi, W., Yang, K.-J., Su, Y.-H., 2020. Function and Regulation of Ammonium Transporters in Plants. International Journal of Molecular Sciences 21, 3557. https://doi.org/10.3390/ijms21103557
Hasenstein, K.H., Evans, M.L., 1988. Effects of Cations on Hormone Transport in Primary Roots of Zea mays. Plant Physiology 86, 890–894. https://doi.org/10.1104/pp.86.3.890
Hasnain, A., Naqvi, S.A.H., Ayesha, S.I., Khalid, F., Ellahi, M., Iqbal, S., Hassan, M.Z., Abbas, A., Adamski, R., Markowska, D., Baazeem, A., Mustafa, G., Moustafa, M., Hasan, M.E., Abdelhamid, M.M.A., 2022. Plants in vitro propagation with its applications in food, pharmaceuticals and cosmetic industries; current scenario and future approaches. Frontiers in Plant Science 13. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1009395
Hauvermale, A.L., Ariizumi, T., Steber, C.M., 2014. The roles of the GA receptors GID1a , GID1b , and GID1c in sly1 -independent GA signaling. Plant Signaling & Behavior 9, e28030. https://doi.org/10.4161/psb.28030
Hayat, F., Li, J., Iqbal, S., Peng, Y., Hong, L., Balal, R.M., Khan, M.N., Nawaz, M.A., Khan, U., Farhan, M.A., Li, C., Song, W., Tu, P., Chen, J., 2022. A Mini Review of Citrus Rootstocks and Their Role in High-Density Orchards. Plants 11, 2876. https://doi.org/10.3390/plants11212876
Hazrati, R., Zare, N., Asghari-Zakaria, R., Sheikhzadeh, P., Johari-Ahar, M., 2022. Factors affecting the growth, antioxidant potential, and secondary metabolites production in hazel callus cultures. AMB Express 12, 109. https://doi.org/10.1186/s13568-022-01449-z
He, C., Zeng, Y., Fu, Y., Wu, J., Liang, Q., 2020. Light quality affects the proliferation of in vitro cultured plantlets of Camellia oleifera Huajin. PeerJ 8, e10016. https://doi.org/10.7717/peerj.10016
Hejazi, Z., Ishimura, S., Honsho, C., Tetsumura, T., 2018. Effects of Planting Time, Irrigation System, Rooting Medium, and IBA Concentration on Cutting Propagation of the Persimmon Dwarfing Rootstock 'MKR1'. The Horticulture Journal 87, 184–192. https://doi.org/10.2503/hortj.OKD-125
Hempel, M., Хемпел, М., Хемпел, М., 1986. Some Economical Aspects of Commercial Micropropagation. Biotechnology & Bioindustry 1, 22–26. https://doi.org/10.1080/02052067.1986.10824247
Hepler, P.K., 2005. Calcium: A Central Regulator of Plant Growth and Development. The Plant Cell 17, 2142–2155. https://doi.org/10.1105/tpc.105.032508
Holmes, T.P., Aukema, J.E., Von Holle, B., Liebhold, A., Sills, E., 2009. Economic Impacts of Invasive Species in Forests. Annals of the New York Academy of Sciences 1162, 18–38. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04446.x

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Horst, W.J., Wang, Y., Eticha, D., 2010. The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: a review. Annals of Botany 106, 185–197. https://doi.org/10.1093/aob/mcq053

Hu, Liu, X., Xuan, W., Mei, H., Li, J., Chen, X., Zhao, Z., Zhao, Y., Jeyaraj, A., Periakaruppan, R., Li, X.-H., 2023. Genome-wide identification and characterization of PIN-FORMED (PIN) and PIN-LIKES (PILS) gene family reveals their role in adventitious root development in tea nodal cutting (Camellia Sinensis). International Journal of Biological Macromolecules 229, 791–802. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.230

Hu, W., Fagundez, S., Katin-Grazzini, L., Li, Y., Li, W., Chen, Y., Wang, X., Deng, Z., Xie, S., McAvoy, R.J., Li, Y., 2017. Endogenous auxin and its manipulation influence in vitro shoot organogenesis of citrus epicotyl explants. Horticulture Research 4, 17071. https://doi.org/10.1038/hortres.2017.71

Huang, Y., Chen, Y., Castro-Izaguirre, N., Baruffol, M., Brezzi, M., Lang, A., Li, Y., Härdtle, W., von Oheimb, G., Yang, X., Liu, X., Pei, K., Both, S., Yang, B., Eichenberg, D., Assmann, T., Bauhus, J., Behrens, T., Buscot, F., Chen, X.-Y., Chesters, D., Ding, B.-Y., Durka, W., Erfmeier, A., Fang, J., Fischer, M., Guo, L.-D., Guo, D., Gutknecht, J.L.M., He, J.-S., He, C.-L., Hector, A., Hönig, L., Hu, R.-Y., Klein, A.-M., Kühn, P., Liang, Y., Li, S., Michalski, S., Scherer-Lorenzen, M., Schmidt, K., Scholten, T., Schuldt, A., Shi, X., Tan, M.-Z., Tang, Z., Trogisch, S., Wang, Z., Welk, E., Wirth, C., Wubet, T., Xiang, W., Yu, M., Yu, X.-D., Zhang, J., Zhang, S., Zhang, N., Zhou, H.-Z., Zhu, C.-D., Zhu, L., Bruelheide, H., Ma, K., Niklaus, P.A., Schmid, B., 2018. Impacts of species richness on productivity in a large-scale subtropical forest experiment. Science 362, 80–83. https://doi.org/10.1126/science.aat6405

Hummel, I., 2002. Involvement of polyamines in root development at low temperature in the subantarctic cruciferous species Pringlea antiscorbutica. Journal of Experimental Botany 53, 1463–1473. https://doi.org/10.1093/jexbot/53.373.1463

Hussain, M.J., Abbas, Y., Nazli, N., Fatima, S., Drouet, S., Hano, C., Abbasi, B.H., 2022. Root Cultures, a Boon for the Production of Valuable Compounds: A Comparative Review. Plants 11, 439. https://doi.org/10.3390/plants11030439

Hussein, S., Agency, M.N., Pick, A., Ling, K., Ng, T.H., 2012. Adventitious roots induction of recalcitrant tropical woody plant , Eurycoma longifolia Adventitious roots induction of recalcitrant tropical woody plant , Eurycoma longifolia E . longifolia has a long history of medicinal usage in Asia . It is very popul.

Iacona, C., Muleo, R., 2010. Light quality affects in vitro adventitious rooting and ex vitro performance of cherry rootstock Colt. Scientia Horticulturae 125, 630–636. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.05.018

Ikeuchi, M., Iwase, A., Rymen, B., Lambolez, A., Kojima, M., Takebayashi, Y., Heyman, J., Watanabe, S., Seo, M., De Veylder, L., Sakakibara, H., Sugimoto, K., 2017. Wounding triggers callus formation via dynamic hormonal and transcriptional changes. Plant Physiology 175, 1158–1174. https://doi.org/10.1104/pp.17.01035

Ikeuchi, M., Sugimoto, K., Iwase, A., 2013. Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. The Plant Cell 25, 3159–3173. https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053

Illouz-Eliaz, N., Ramon, U., Shohat, H., Blum, S., Livne, S., Mendelson, D., Weiss, D., 2019. Multiple Gibberellin Receptors Contribute to Phenotypic Stability under Changing Environments. The Plant Cell 31, 1506–1519. https://doi.org/10.1105/tpc.19.00235

Instituto da Lingua Galega, Real Academia Galega, 2012. Normas ortográficas e morfolóxicas do idioma galego [23ed]. Editorial Galaxia.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Iqbal, N., Khan, N.A., Ferrante, A., Trivellini, A., Francini, A., Khan, M.I.R., 2017. Ethylene Role in Plant Growth, Development and Senescence: Interaction with Other Phytohormones. Frontiers in Plant Science 08. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00475

Ivanova, M., Novák, O., Strnad, M., Van Staden, J., 2006. Endogenous cytokinins in shoots of Aloe polyphylla cultured in vitro in relation to hyperhydricity, exogenous cytokinins and gelling agents. Plant Growth Regulation 50, 219–230. https://doi.org/10.1007/s10725-006-9139-x

Jacobs, D.F., Selig, M.F., Severeid, L.R., 2009. Aboveground carbon biomass of plantation-grown American chestnut (Castanea dentata) in absence of blight. Forest Ecology and Management 258, 288–294. https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.04.014

Jain, M., Olsen, H.E., Paten, B., Akeson, M., 2016. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. Genome Biology 17, 239. https://doi.org/10.1186/s13059-016-1103-0

Jain, R., Babbar, S.B., 2006. Xanthan gum: An economical substitute for agar in plant tissue culture media. Plant Cell Reports 25, 81–84. https://doi.org/10.1007/s00299-005-0039-8

Jain, R., Babbar, S.B., 2005. Guar gum and isubgol as cost-effective alternative gelling agents for *in vitro* multiplication of an orchid, *Dendrobium chrysotoxum*. Current Science 88, 292–295.

Jiang, F., Feng, Z., Liu, H., Zhu, J., 2015. Involvement of Plant Stem Cells or Stem Cell-Like Cells in Dedifferentiation. Frontiers in Plant Science 6. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01028

Jiang, H.-W., Liu, M.-J., Chen, I.-C., Huang, C.-H., Chao, L.-Y., Hsieh, H.-L., 2010. A Glutathione S -Transferase Regulated by Light and Hormones Participates in the Modulation of Arabidopsis Seedling Development. Plant Physiology 154, 1646–1658. https://doi.org/10.1104/pp.110.159152

Jin, X., Liao, W.-B., Yu, J.-H., Ren, P.-J., Dawuda, M.M., Wang, M., Niu, L.-J., Li, X.-P., Xu, X.-T., 2017. Nitric Oxide Is Involved in Ethylene-Induced Adventitious Rooting in Marigold. Canadian Journal of Plant Science CJPS-2016-0156. https://doi.org/10.1139/CJPS-2016-0156

Jing, H., Strader, L., 2019. Interplay of Auxin and Cytokinin in Lateral Root Development. International Journal of Molecular Sciences 20, 486. https://doi.org/10.3390/ijms20030486

Jung, T., Jung, M.H., Scanu, B., Seress, D., Kovács, G.M., Maia, C., Pérez-Sierra, A., Chang, T.-T., Chandelier, A., Heungens, K., Van Poucke, K., Abad-Campos, P., Léon, M., Cacciola, S.O., Bakonyi, J., 2017. Six new Phytophthora species from ITS Clade 7a including two sexually functional heterothallic hybrid species detected in natural ecosystems in Taiwan. Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi 38, 100–135. https://doi.org/10.3767/003158517X693615

Kamińska, M., 2021. Role and activity of jasmonates in plants under in vitro conditions. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 146, 425–447. https://doi.org/10.1007/s11240-021-02091-6

Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., 2022. <scp>KEGG</scp> mapping tools for uncovering hidden features in biological data. Protein Science 31, 47–53. https://doi.org/10.1002/pro.4172

Kataeva, N. V., Alexandrova, I.G., Butenko, R.G., Dragavtceva, E. V., 1991. Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 27, 149–154. https://doi.org/10.1007/BF00041283

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Kathiresan, K., Ravikumar, S., 1995. Vegetative propagation through air-layering in two species of mangroves. Aquatic Botany 50, 107–110. https://doi.org/10.1016/0304-3770(94)00447-T

Kenta, T., Edwards, J.E.M., Butlin, R.K., Burke, T., Quick, W.P., Urwin, P., Davey, M.P., 2016. Tissue Culture as a Source of Replicates in Nonmodel Plants: Variation in Cold Response in Arabidopsis lyrata ssp. petraea. G3 Genes|Genomes|Genetics 6, 3817–3823. https://doi.org/10.1534/g3.116.034314

Kepenek, K., Karoğlu, Z., 2011. The effects of paclobutrazol and daminozide on in vitro micropropagation of some apple (Malus domestica) cultivars and M9-rootstock. African Journal of Biotechnology 10, 4851–4859. https://doi.org/10.5897/AJB10.1456

Kevers, C., Hausman, J.F., Faivre-Rampant, O., Evers, D., Gaspar, T., 1997. Hormonal control of adventitious rooting: Progress and questions. Journal of Applied Botany 71, 71–79.

Khamushi, M., Dehestani-Ardakani, M., Zarei, A., Kamali Aliabad, K., 2019. An efficient protocol for micropropagation of old cypress of Abarkuh (Cupressus sempervirens var. horizontalis [Mill.]) under in vitro condition. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 138, 597–601. https://doi.org/10.1007/s11240-019-01645-z

Khan, N., Ahmed, M., Hafiz, I., Abbasi, N., Ejaz, S., Anjum, M., 2015. Optimizing the concentrations of plant growth regulators for in vitro shoot cultures, callus induction and shoot regeneration from calluses of grapes. OENO One 49, 37. https://doi.org/10.20870/oeno-one.2015.49.1.95

Kilkenn, A.J., Wallace, H.M., Walton, D.A., Adkins, M.F., Trueman, S.J., 2012. Improved Root Formation in Eucalypt Cuttings Following Combined Auxin and Anti-ethylene Treatments. Journal of Plant Sciences 7, 138–153. https://doi.org/10.3923/jps.2012.138.153

Kiskowski, M., Glimm, T., Moreno, N., Gamble, T., Chiari, Y., 2019. Isolating and quantifying the role of developmental noise in generating phenotypic variation. PLOS Computational Biology 15, e1006943. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006943

Kodym, A., Clarke, I., Aponte, C., Turner, S., Bunn, E., Delpratt, J., 2014. Large-scale micropropagation of the Australian key species Gahnia radula (Cyperaceae) and its return to revegetation sites. Australian Journal of Botany 62, 417. https://doi.org/10.1071/BT14091

Koike, I., Watanabe, S., Okazaki, K., Hayashi, K., Kasahara, H., Shimomura, K., Umehara, M., 2020. Endogenous auxin determines the pattern of adventitious shoot formation on internodal segments of ipecac. Planta 251, 73. https://doi.org/10.1007/s00425-020-03367-5

Kokane, S.B., Misra, P., Kokane, A.D., Gubyad, M.G., Warghane, A.J., Surwase, D., Reddy, M.K., Ghosh, D.K., 2021. Development of a real-time RT-PCR method for the detection of Citrus tristeza virus (CTV) and its implication in studying virus distribution in planta. 3 Biotech 11, 431. https://doi.org/10.1007/s13205-021-02976-5

Kolde, R., 2019. pheatmap: Pretty Heatmaps. R.

Koprivova, A., Mugford, S.T., Kopriva, S., 2010. Arabidopsis root growth dependence on glutathione is linked to auxin transport. Plant Cell Reports 29, 1157–1167. https://doi.org/10.1007/s00299-010-0902-0

Kora, D., Bhattacharjee, S., 2020. Redox gateway associated with adventitious root formation under stress and hormonal signalling in plants. Current Science 119, 462–472. https://doi.org/10.18520/cs/v119/i3/462-472

Kovaka, S., Zimin, A. V., Pertea, G.M., Razaghi, R., Salzberg, S.L., Pertea, M., 2019.

USC DE COMPOSTELA

Transcriptome assembly from long-read RNA-seq alignments with StringTie2. Genome Biology 20, 278. https://doi.org/10.1186/s13059-019-1910-1

Kovalchuk, I.Y., Mukhitdinova, Z., Turdiyev, T., Madiyeva, G., Akin, M., Eyduran, E., Reed, B.M., 2017. Modeling some mineral nutrient requirements for micropropagated wild apricot shoot cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 129, 325–335. https://doi.org/10.1007/s11240-017-1180-0

Kozlowski, T.T., 2002. Physiological ecology of natural regeneration of harvested and disturbed forest stands: implications for forest management. Forest Ecology and Management 158, 195–221. https://doi.org/10.1016/S0378-1127(00)00712-X

Krishna, H., Sairam, R.K., Singh, S.K., Patel, V.B., Sharma, R.R., Grover, M., Nain, L., Sachdev, A., 2008. Mango explant browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. Scientia Horticulturae 118, 132–138. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.05.040

Krishnamurthy, P., Mohanty, B., Wijaya, E., Lee, D.-Y., Lim, T.-M., Lin, Q., Xu, J., Loh, C.-S., Kumar, P.P., 2017. Transcriptomics analysis of salt stress tolerance in the roots of the mangrove Avicennia officinalis. Scientific Reports 7, 10031. https://doi.org/10.1038/s41598-017-10730-2

Krivmane, B., Ruņģe, K.S., Samsone, I., Ruņģis, D.E., 2023. Differentially Expressed Conserved Plant Vegetative Phase-Change-Related microRNAs in Mature and Rejuvenated Silver Birch In Vitro Propagated Tissues. Plants 12, 1993. https://doi.org/10.3390/plants12101993

Kudělková, M., Pavelková, R., Ondrušiková, E., 2017. Virus elimination in peach using chemotherapy. Acta Horticulturae 431–438. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1155.64

Kumar, A., Choudhary, A., Kaur, H., Sangeetha, K., Mehta, S., Husen, A., 2022. Physiological and environmental control of adventitious root formation in cuttings: An overview, em: Environmental, Physiological and Chemical Controls of Adventitious Rooting in Cuttings. Elsevier, pp. 1–24. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90636-4.00005-2

Kumari, A., Gogna, M., Mehta, S., Husen, A., 2022. Adventitious root formation in cuttings and effects of maturation, em: Environmental, Physiological and Chemical Controls of Adventitious Rooting in Cuttings. Elsevier, pp. 397–420. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90636-4.00015-5

Kurepa, J., Shull, T.E., Smalle, J.A., 2023. Friends in Arms: Flavonoids and the Auxin/Cytokinin Balance in Terrestrialization. Plants 12, 517. https://doi.org/10.3390/plants12030517

Kurepa, J., Smalle, J.A., 2022. Auxin/Cytokinin Antagonistic Control of the Shoot/Root Growth Ratio and Its Relevance for Adaptation to Drought and Nutrient Deficiency Stresses. International Journal of Molecular Sciences 23, 1933. https://doi.org/10.3390/ijms23041933

Kuria, P., Demo, P., Nyende, A.B., Kahangi, E.M., 2008. Cassava starch as an alternative cheap gelling agent for the *in vitro* micro-propagation of potato (*Solanum tuberosum L.*). African Journal of Biotechnology 7, 301–307.

Lakehal, A., Chaabouni, S., Cavel, E., Le Hir, R., Ranjan, A., Raneshan, Z., Novák, O., Păcurar, D.I., Perrone, I., Jobert, F., Gutierrez, L., Bakò, L., Bellini, C., 2019. A Molecular Framework for the Control of Adventitious Rooting by TIR1/AFB2-Aux/IAA-Dependent Auxin Signaling in Arabidopsis. Molecular Plant 12, 1499–1514. https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.09.001

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Laland, K., Matthews, B., Feldman, M.W., 2016. An introduction to niche construction theory. Evolutionary Ecology 30, 191–202. https://doi.org/10.1007/s10682-016-9821-z

Lanteri, M.L., Pagnussat, G.C., Lamattina, L., 2006. Calcium and calcium-dependent protein kinases are involved in nitric oxide- and auxin-induced adventitious root formation in cucumber. Journal of Experimental Botany 57, 1341–1351. https://doi.org/10.1093/jxb/erj109

Larskaya, I., Gorshkov, O., Mokshina, N., Trofimova, O., Mikshina, P., Klepikova, A., Gogoleva, N., Gorshkova, T., 2020. Stimulation of adventitious root formation by the oligosaccharin OSRG at the transcriptome level. Plant Signaling & Behavior 15, 1703503. https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1703503

Lauteri, M., Pliura, A., Monteverdi, M.C., Brugnoli, E., Villani, F., Eriksson, G., 2004. Genetic variation in carbon isotope discrimination in six European populations of Castanea sativa Mill. originating from contrasting localities. Journal of Evolutionary Biology 17, 1286–1296. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2004.00765.x

Lawson, J.D., Bridges, W.C., Adelberg, J.W., 2023. IBA Delivery Technique and Media Salts Affected In Vitro Rooting and Acclimatization of Eight Prunus Genotypes. Plants 12, 289. https://doi.org/10.3390/plants12020289

Lazare, S., Haberman, A., Yermiyahu, U., Erel, R., Simenski, E., Dag, A., 2020. Avocado rootstock influences scion leaf mineral content. Archives of Agronomy and Soil Science 66, 1399–1409. https://doi.org/10.1080/03650340.2019.1672163

Le Hir, R., Sorin, C., Chakraborti, D., Moritz, T., Schaller, H., Tellier, F., Robert, S., Morin, H., Bako, L., Bellini, C., 2013. ABCG9, ABCG11 and ABCG14 ABC transporters are required for vascular development in Arabidopsis. The Plant Journal 76, 811–824. https://doi.org/10.1111/tpj.12334

Lebedev, V., Arkaev, M., Dremova, M., Pozdniakov, I., Shestibratov, K., 2018. Effects of Growth Regulators and Gelling Agents on Ex Vitro Rooting of Raspberry. Plants 8, 3. https://doi.org/10.3390/plants8010003

Lee, H.-J., Ha, J.-H., Kim, S.-G., Choi, H.-K., Kim, Z.H., Han, Y.-J., Kim, J.-I., Oh, Y., Fragoso, V., Shin, K., Hyeon, T., Choi, H.-G., Oh, K.-H., Baldwin, I.T., Park, C.-M., 2016. Stem-piped light activates phytochrome B to trigger light responses in Arabidopsis thaliana roots. Science Signaling 9. https://doi.org/10.1126/scisignal.aaf6530

Lee, H.W., Cho, C., Kim, J., 2015. Lateral Organ Boundaries Domain16 and 18 Act Downstream of the AUXIN1 and LIKE-AUXIN3 Auxin Influx Carriers to Control Lateral Root Development in Arabidopsis. Plant Physiology 168, 1792–1806. https://doi.org/10.1104/pp.15.00578

Lee, H.W., Cho, C., Pandey, S.K., Park, Y., Kim, M.-J., Kim, J., 2019. LBD16 and LBD18 acting downstream of ARF7 and ARF19 are involved in adventitious root formation in Arabidopsis. BMC Plant Biology 19, 46. https://doi.org/10.1186/s12870-019-1659-4

Lee, J., Naing, A.H., Park, K. Il, Kim, C.K., 2023. Silver nitrate reduces hyperhydricity in shoots regenerated from the hypocotyl of snapdragon cv. Maryland Apple Blossom. Scientia Horticulturae 308, 111593. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111593

Lee, K., Park, O., Seo, P.J., 2018. JMJ30-mediated demethylation of H3K9me3 drives tissue identity changes to promote callus formation in Arabidopsis. The Plant Journal 95, 961–975. https://doi.org/10.1111/tpj.14002

Lemaire, L., Deleu, C., Le Deunff, E., 2013. Modulation of ethylene biosynthesis by ACC and AIB reveals a structural and functional relationship between the K15NO3 uptake rate and root absorbing surfaces. Journal of Experimental Botany 64, 2725–2737. https://doi.org/10.1093/jxb/ert124

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Lenth, R., 2023. _emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means_.
León, J., Costa-Broseta, Á., Castillo, M.C., 2020. RAP2.3 negatively regulates nitric oxide biosynthesis and related responses through a rheostat-like mechanism in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany 71, 3157–3171. https://doi.org/10.1093/jxb/eraa069
Levy, A., Szwerdszarf, D., Abu-Abied, M., Mordehaev, I., Yaniv, Y., Riov, J., Arazi, T., Sadot, E., 2014. Profiling microRNAs in Eucalyptus grandis reveals no mutual relationship between alterations in miR156 and miR172 expression and adventitious root induction during development. BMC Genomics 15, 524. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-524
Li, 2021. Molecular Bases for the Regulation of Adventitious Root Generation in Plants. Frontiers in Plant Science 12. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.614072
Li, H., 2018. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. Bioinformatics 34, 3094–3100. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty191
Li, H., Yao, L., Sun, L., Zhu, Z., 2020. ETHYLENE INSENSITIVE 3 suppresses plants de novo root regeneration from leaf explants and mediates age-regulated regeneration decline. Development. https://doi.org/10.1242/dev.179457
Li, J., Xu, H.-H., Liu, W.-C., Zhang, X.-W., Lu, Y.-T., 2015. Ethylene Inhibits Root Elongation during Alkaline Stress through AUXIN1 and Associated Changes in Auxin Accumulation. Plant Physiology 168, 1777–1791. https://doi.org/10.1104/pp.15.00523
Li, K., Liang, Y., Xing, L., Mao, J., Liu, Z., Dong, F., Meng, Y., Han, M., Zhao, C., Bao, L., Zhang, D., 2018. Transcriptome analysis reveals multiple hormones, wounding and sugar signaling pathways mediate adventitious root formation in apple rootstock. International Journal of Molecular Sciences 19. https://doi.org/10.3390/ijms19082201
Li, L., An, Q., Wang, Q.-M., Liu, W., Qi, X., Cui, J., Wang, Y., Ke, H., 2022. The mechanism of bud dehyperhydricity by the method of 'starvation drying combined with AgNO3' in Lycium ruthenicum. Tree Physiology 42, 1841–1857. https://doi.org/10.1093/treephys/tpac047
Li, N., Chang, Y., 2022. Effective Methods for Adventitious Root Regeneration on Weeping Fig Stems. Forests 13, 1165. https://doi.org/10.3390/f13081165
Li, Q., Xu, J., Li, H., Wang, S., Yan, X., Xin, Z., Jiang, Z., Wang, L., Jia, Z., 2013. Effects of Aspect on Clonal Reproduction and Biomass Allocation of Layering Modules of Nitraria tangutorum in Nebkha Dunes. PLoS ONE 8, e79927. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079927
Li, S., Zhou, L., Wu, S., Liu, L., Huang, M., Lin, S., Ding, G., 2019. Effects of LED light on Acacia melanoxylon bud proliferation in vitro and root growth ex vitro. Open Life Sciences 14, 349–357. https://doi.org/10.1515/biol-2019-0039
Li, S.W., Leng, Y., Shi, R.F., 2017. Transcriptomic profiling provides molecular insights into hydrogen peroxide-induced adventitious rooting in mung bean seedlings. BMC Genomics 18. https://doi.org/10.1186/s12864-017-3576-y
Li, X., Xu, X., Shen, F., Li, W., Qiu, C., Wu, T., Wang, Y., Xu, X., Han, Z., Zhang, X., 2021. γ-Aminobutyric Acid Participates in the Adult-Phase Adventitious Rooting Recalcitrance. Journal of Plant Growth Regulation 40, 1981–1991. https://doi.org/10.1007/s00344-020-10251-9
Li, Xie, Z.-Z., Hu, C.-G., Zhang, J.-Z., Li, S.-B., Xie, Z.-Z., Hu, C.-G., Zhang, J.-Z., Li, Xie, Z.-Z., Hu, C.-G., Zhang, J.-Z., Li, S.-B., Xie, Z.-Z., Hu, C.-G., Zhang, J.-Z., 2016. A Review of Auxin Response Factors (ARFs) in Plants. Frontiers in Plant Science 7, 47. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00047
Li, Z., Huang, R., 2011. The reciprocal regulation of abscisic acid and ethylene biosyntheses.

USC DE COMPOSTELA

Plant Signaling & Behavior 6, 1647–1650. https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17756
Liao, W.-B., Xiao, H.-L., Zhang, M.-L., 2010. Effect of Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide on Adventitious Root Development from Cuttings of Ground-Cover Chrysanthemum and Associated Biochemical Changes. Journal of Plant Growth Regulation 29, 338–348. https://doi.org/10.1007/s00344-010-9140-5
Liao, W.-B., Zhang, M.-L., Huang, G.-B., Yu, J.-H., 2012. Ca2+ and CaM are Involved in NO- and H2O2-Induced Adventitious Root Development in Marigold. Journal of Plant Growth Regulation 31, 253–264. https://doi.org/10.1007/s00344-011-9235-7
Liao, W., Xiao, H., Zhang, M., 2009. Role and relationship of nitric oxide and hydrogen peroxide in adventitious root development of marigold. Acta Physiologiae Plantarum 31, 1279–1289. https://doi.org/10.1007/s11738-009-0367-3
Lima, R.B., Salvador, V.H., dos Santos, W.D., Bubna, G.A., Finger-Teixeira, A., Soares, A.R., Marchiosi, R., Ferrarese, M. de L.L., Ferrarese-Filho, O., 2013. Enhanced Lignin Monomer Production Caused by Cinnamic Acid and Its Hydroxylated Derivatives Inhibits Soybean Root Growth. PLoS ONE 8, e80542. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080542
Limasset, P., Cornuet, P., 1949. Recherche du virus de la mosaique du tabac dans le méristèmes des plantes infectées. C.R. Ac. Sc. 228, 1971–1972.
Ling, W.T., Liew, F.C., Lim, W.Y., Subramaniam, S., Chew, B.L., 2018. Shoot Induction from Axillary Shoot Tip Explants of Fig (Ficus carica) cv. Japanese BTM 6. Tropical Life Sciences Research 29, 165–174. https://doi.org/10.21315/tlsr2018.29.2.11
Liu, B., Zhang, J., Wang, L., Li, J., Zheng, H., Chen, J., Lu, M., 2014a. A survey of Populus PIN-FORMED family genes reveals their diversified expression patterns. Journal of Experimental Botany 65, 2437–2448. https://doi.org/10.1093/jxb/eru129
Liu, B., Zhao, S., Li, P., Yin, Y., Niu, Q., Yan, J., Huang, D., 2021. Plant buffering against the high-light stress-induced accumulation of CsGA2ox8 transcripts via alternative splicing to finely tune gibberellin levels and maintain hypocotyl elongation. Horticulture Research 8, 2. https://doi.org/10.1038/s41438-020-00430-w
Liu, C.-J., 2012. Deciphering the Enigma of Lignification: Precursor Transport, Oxidation, and the Topochemistry of Lignin Assembly. Molecular Plant 5, 304–317. https://doi.org/10.1093/mp/ssr121
Liu, D., 2021. Root developmental responses to phosphorus nutrition. Journal of Integrative Plant Biology 63, 1065–1090. https://doi.org/10.1111/jipb.13090
Liu, H., Gao, Y., Song, X., Ma, Q., Zhang, J., Pei, D., 2018a. A novel rejuvenation approach to induce endohormones and improve rhizogenesis in mature Juglans tree. Plant Methods 14, 13. https://doi.org/10.1186/s13007-018-0280-0
Liu, R., Chen, Q., Dong, B., Yu, F., 2014b. Effects of vegetative propagule pressure on the establishment of an introduced clonal plant, Hydrocotyle vulgaris. Scientific Reports 4, 5507. https://doi.org/10.1038/srep05507
Liu, W., Yu, J., Ge, Y., Qin, P., Xu, L., 2018b. Pivotal role of LBD16 in root and root-like organ initiation. Cellular and Molecular Life Sciences 75, 3329–3338. https://doi.org/10.1007/s00018-018-2861-5
Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. Methods 25, 402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262
Ljung, K., Hull, A.K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J., Sandberg, G., 2005. Sites and Regulation of Auxin Biosynthesis in Arabidopsis Roots. The Plant Cell 17, 1090–1104. https://doi.org/10.1105/tpc.104.029272

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Lloyd, G., McCown, B., 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, kalmia latifolia, by use of shoot-tip culture. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 30, 421–427.

Lo, S.F., Yang, S.Y., Chen, K.T., Hsing, Y.I., Zeevaart, J.A.D., Chen, L.J., Yu, S.M., 2008. A novel class of gibberellin 2-oxidases control semidwarfism, tillering, and root development in rice. Plant Cell 20, 2603–2618. https://doi.org/10.1105/tpc.108.060913

Lombardero, M.J., Ayres, M.P., Álvarez-Álvarez, P., Castedo-Dorado, F., 2022. Defensive patterns of chestnut genotypes (Castanea spp.) against the gall wasp, Dryocosmus kuriphilus. Frontiers in Forests and Global Change 5. https://doi.org/10.3389/ffgc.2022.1046606

López-Villamor, A., Míguez-Soto, B., Fernández-López, J., 2017. Adventitious root formation in Castanea sp. semi-hard cuttings is under moderate genetic control caused mainly by non-additive genetic variance. Canadian Journal of Forest Research 47, 946–956. https://doi.org/10.1139/cjfr-2016-0397

Lopez Nicolas, J.I., Acosta, M., Sanchez-Bravo, J., 2004. Role of basipetal auxin transport and lateral auxin movement in rooting and growth of etiolated lupin hypocotyls. Physiologia Plantarum 121, 294–304. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2004.00323.x

Lotfi, M., Fernandez, K., Vermeir, P., Mars, M., Stefaan Werbrouck, 2019. In vitro mycorrhization of pear (Pyrus communis). Mycorrhiza 29, 607–614. https://doi.org/10.1007/s00572-019-00919-w

Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biology 15, 550. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8

Luo, J., Zhou, J.-J., Zhang, J.-Z., 2018. Aux/IAA Gene Family in Plants: Molecular Structure, Regulation, and Function. International Journal of Molecular Sciences 19, 259. https://doi.org/10.3390/ijms19010259

Lup, S.D., Tian, X., Xu, J., Pérez-Pérez, J.M., 2016. Wound signaling of regenerative cell reprogramming. Plant Science 250, 178–187. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.06.012

Lyu, J., Wu, Y., Jin, X., Tang, Z., Liao, W., Dawuda, M.M., Hu, L., Xie, J., Yu, J., Calderón-Urrea, A., 2021. Proteomic analysis reveals key proteins involved in ethylene-induced adventitious root development in cucumber (Cucumis sativus L.). PeerJ 9, e10887. https://doi.org/10.7717/peerj.10887

Ma, B., He, S.-J., Duan, K.-X., Yin, C.-C., Chen, H., Yang, C., Xiong, Q., Song, Q.-X., Lu, X., Chen, H.-W., Zhang, W.-K., Lu, T.-G., Chen, S.-Y., Zhang, J.-S., 2013. Identification of Rice Ethylene-Response Mutants and Characterization of MHZ7/OsEIN2 in Distinct Ethylene Response and Yield Trait Regulation. Molecular Plant 6, 1830–1848. https://doi.org/10.1093/mp/sst087

Ma, B., Yin, C.-C., He, S.-J., Lu, X., Zhang, W.-K., Lu, T.-G., Chen, S.-Y., Zhang, J.-S., 2014. Ethylene-Induced Inhibition of Root Growth Requires Abscisic Acid Function in Rice (Oryza sativa L.) Seedlings. PLoS Genetics 10, e1004701. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004701

Ma, J.-H., Yao, J.-L., Cohen, D., Morris, B., 1998. Ethylene inhibitors enhance in vitro root formation from apple shoot cultures. Plant Cell Reports 17, 211–214. https://doi.org/10.1007/s002990050380

Ma, J.-J., Chen, X., Song, Y.-T., Zhang, G.-F., Zhou, X.-Q., Que, S.-P., Mao, F., Pervaiz, T., Lin, J.-X., Li, Y., Li, W., Wu, H.X., Niu, S.-H., 2021. MADS-box transcription factors MADS11 and DAL1 interact to mediate the vegetative-to-reproductive transition in pine. Plant Physiology 187, 247–262. https://doi.org/10.1093/plphys/kiab250

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ma, X., Liang, X., Lv, S., Guan, T., Jiang, T., Cheng, Y., 2020. Histone deacetylase gene PtHDT902 modifies adventitious root formation and negatively regulates salt stress tolerance in poplar. Plant Science 290. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110301

Maharjan, P.M., Dilkes, B.P., Fujioka, S., Pěnčík, A., Ljung, K., Burow, M., Halkier, B.A., Choe, S., 2014. Arabidopsis gulliver1/superroot2-7 identifies a metabolic basis for auxin and brassinosteroid synergy. The Plant Journal 80, 797–808. https://doi.org/10.1111/tpj.12678

Maliro, M.F.A., Lameck, G., 2004. Potential of cassava flour as a gelling agent in media for plant tissue cultures. African Journal of Biotechnology 3, 244–247.

Mamun, N.H.A., Egertsdotter, U., Aidun, C.K., 2015. Bioreactor technology for clonal propagation of plants and metabolite production. Frontiers in Biology 10, 177–193. https://doi.org/10.1007/s11515-015-1355-1

Manganaris, G.A., Rasori, A., Bassi, D., Geuna, F., Ramina, A., Tonutti, P., Bonghi, C., 2011. Comparative transcript profiling of apricot (Prunus armeniaca L.) fruit development and on-tree ripening. Tree Genetics & Genomes 7, 609–616. https://doi.org/10.1007/s11295-010-0360-4

Manuela, D., Xu, M., 2020. Juvenile Leaves or Adult Leaves: Determinants for Vegetative Phase Change in Flowering Plants. International Journal of Molecular Sciences 21, 9753. https://doi.org/10.3390/ijms21249753

Mao, J., Zhang, D., Meng, Y., Li, K., Wang, H., Han, M., 2019. Inhibition of adventitious root development in apple rootstocks by cytokinin is based on its suppression of adventitious root primordia formation. Physiologia Plantarum 166, 663–676. https://doi.org/10.1111/ppl.12817

Mao, Y.-B., Liu, Y.-Q., Chen, D.-Y., Chen, F.-Y., Fang, X., Hong, G.-J., Wang, L.-J., Wang, J.-W., Chen, X.-Y., 2017. Jasmonate response decay and defense metabolite accumulation contributes to age-regulated dynamics of plant insect resistance. Nature Communications 8, 13925. https://doi.org/10.1038/ncomms13925

Marín-de La Rosa, N., Sotillo, B., Miskolczi, P., Gibbs, D.J., Vicente, J., Carbonero, P., Oñate-Sánchez, L., Holdsworth, M.J., Bhalerao, R., Alabadí, D., Blázquez, M.A., 2014. Large-scale identification of gibberellin-related transcription factors defines group VII ETHYLENE RESPONSE FACTORS as functional DELLA partners. Plant Physiology 166, 1022–1032. https://doi.org/10.1104/pp.114.244723

Marin, J.A., 2003. High survival rates during acclimatization of micropropagated fruit tree rootstocks by increasing exposures to low relative humidity. Acta Horticulturae 139–142. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.616.13

Marta-Pedroso, C., Laporta, L., Proença, V., Azevedo, J.C., Domingos, T., 2014. Changes in the ecosystem services provided by forests and their economic valuation: a review, em: Forest Landscapes and Global Change. Springer New York, New York, NY, pp. 107–137. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0953-7_5

Martin-Gordo, D.A., Cárdenas Gonzalez, O., Constantino Pacheco, J., 2012. Sustancias utilizadas como agente gelificante alternativas al agar en medios de cultivo para propagación in vitro. Revista de Investigación Agraria y Ambiental 3, 49. https://doi.org/10.22490/21456453.972

Martin, K., 2003. Rapid in vitro multiplication and ex vitro rooting of Rotula aquatica Lour., a rare rhoeophytic woody medicinal plant. Plant Cell Reports 21, 415–420. https://doi.org/10.1007/s00299-002-0547-8

Martín, M.A., Mattioni, C., Molina, J.R., Alvarez, J.B., Cherubini, M., Herrera, M.A., Villani, F., Martín, L.M., 2012. Landscape genetic structure of chestnut (Castanea sativa Mill.) in

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Spain. Tree Genetics & Genomes 8, 127–136. https://doi.org/10.1007/s11295-011-0427-x

Martínez, M.T., Corredoira, E., 2023. Efficient Procedure for Induction Somatic Embryogenesis in Holm Oak: Roles of Explant Type, Auxin Type, and Exposure Duration to Auxin. Forests 14, 430. https://doi.org/10.3390/f14020430

Martínez, S., Ramil, P., Chuvieco, E., 2010. Monitoring loss of biodiversity in cultural landscapes. New methodology based on satellite data. Landscape and Urban Planning 94, 127–140. https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2009.08.006

Martins, J., Pétriacq, P., Flandin, A., Gómez-Cadenas, A., Monteiro, P., Pinto, G., Canhoto, J., 2022. Genotype determines Arbutus unedo L. physiological and metabolomic responses to drought and recovery. Frontiers in Plant Science 13. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1011542

Massoumi, M., Krens, F.A., Visser, R.G.F., De Klerk, G.-J.M., 2017. Azacytidine and miR156 promote rooting in adult but not in juvenile Arabidopsis tissues. Journal of Plant Physiology 208, 52–60. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.10.010

Mauriat, M., Petterle, A., Bellini, C., Moritz, T., 2014. Gibberellins inhibit adventitious rooting in hybrid aspen and Arabidopsis by affecting auxin transport. Plant J 78, 372–384. https://doi.org/10.1111/tpj.12478

McClelland, M.T., Smith, M.A.L., 1990. Vessel Type, Closure, and Explant Orientation Influence in Vitro Performance of Five Woody Species. HortScience 25, 797–800. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.25.7.797

Mendes, A.F.S., Cidade, L.C., Otoni, W.C., Soares-Filho, W.S., Costa, M.G.C., 2011. Role of auxins, polyamines and ethylene in root formation and growth in sweet orange. Biologia plantarum 55, 375–378. https://doi.org/10.1007/s10535-011-0058-y

Meng, Y., Xing, L., Li, K., Wei, Y., Wang, H., Mao, J., Dong, F., Ma, D., Zhang, Z., Han, M., Zhao, C., Tahir, M.M., Zhang, D., 2019. Genome-wide identification, characterization and expression analysis of novel long non-coding RNAs that mediate IBA-induced adventitious root formation in apple rootstocks. Plant Growth Regulation 87, 287–302. https://doi.org/10.1007/s10725-018-0470-9

Mengesha, A., Ayenew, B., Gebremariam, E., Tadesse, T., 2012. Micro-Propagation of Vanilla planifolia Using Enset (Ensete ventricosum (Welw, cheesman)) Starch as a Gelling Agent. Current Research Journal of Biological Sciences 4, 519–525.

Meyer, J.B., Gallien, L., Prospero, S., 2015. Interaction between two invasive organisms on the European chestnut: does the chestnut blight fungus benefit from the presence of the gall wasp? FEMS Microbiology Ecology 91, fiv122. https://doi.org/10.1093/femsec/fiv122

Middleton, A.M., Úbeda-Tomás, S., Griffiths, J., Holman, T., Hedden, P., Thomas, S.G., Phillips, A.L., Holdsworth, M.J., Bennett, M.J., King, J.R., Owen, M.R., 2012. Mathematical modeling elucidates the role of transcriptional feedback in gibberellin signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences 109, 7571–7576. https://doi.org/10.1073/pnas.1113666109

Mignon, E., Werbrouck, S., 2018. Somatic Embryogenesis as Key Technology for Shaping the Rubber Tree of the Future. Frontiers in Plant Science 9. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01804

Minibayeva, F., Kolesnikov, O., Chasov, A., Beckett, R.P., Lüthje, S., Vylegzhanina, N., Buck, F., Böttger, M., 2009. Wound-induced apoplastic peroxidase activities: their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species. Plant, Cell & Environment 32, 497–508. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01944.x

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

MITECO, 2022. Anuario estadístico forestal 2020.
Mo, X.-X., Zhu, H., Zhang, Y.-J., Ferry Slik, J.W., Liu, J.-X., 2011. Traditional forest management has limited impact on plant diversity and composition in a tropical seasonal rainforest in SW China. Biological Conservation 144, 1832–1840. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2011.03.019
Monteuuis, O., Bon, M.C., 2000. Influence of auxins and darkness on in vitro rooting of micropropagated shoots from mature and juvenile Acacia mangium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 63, 173–177. https://doi.org/10.1023/A:1010611126950
Moore, B.M., Lee, Y.S., Wang, P., Azodi, C., Grotewold, E., Shiu, S.-H., 2022. Modeling temporal and hormonal regulation of plant transcriptional response to wounding. The Plant Cell 34, 867–888. https://doi.org/10.1093/plcell/koab287
Morel, G., Martin, C., 1952. Guérison de Dahlias atteints d'une maladie à virus. C.R. Acad. Sci., Paris, 235, 1324--1325.
Morelli, F., Python, A., Pezzatti, G.B., Moretti, M., 2019. Bird response to woody pastoral management of ancient chestnut orchards: A case study from the southern Alps. Forest Ecology and Management 453, 117560. https://doi.org/10.1016/j.foreco.2019.117560
Mori, Y., Miyahara, F., Tsutsumi, Y., Kondo, R., 2011. Effects of combinational treatment with ethephon and indole-3-butyric acid on adventitious rooting of Pinus thunbergii cuttings. Plant Growth Regulation 63, 271–278. https://doi.org/10.1007/s10725-010-9524-3
Muhr, M., Prüfer, N., Paulat, M., Teichmann, T., 2016. Knockdown of strigolactone biosynthesis genes in Populus affects BRANCHED 1 expression and shoot architecture. New Phytologist 212, 613–626. https://doi.org/10.1111/nph.14076
Müller, M., Munné-Bosch, S., 2015. Ethylene Response Factors: A Key Regulatory Hub in Hormone and Stress Signaling. Plant Physiology 169, 32–41. https://doi.org/10.1104/pp.15.00677
Mullins, A.M.G., Nair, Y., Sampet, P., 1979. Rejuvenation in vitro : Induction of Juvenile Characters in an Adult Clone of Vitis vinifera L . Annals of Botany 44, 623–627.
Murashige, T., Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum 15, 473–497. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
Nabi, R.B.S., Tayade, R., Hussain, A., Kulkarni, K.P., Imran, Q.M., Mun, B.-G., Yun, B.-W., 2019. Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. Environmental and Experimental Botany 161, 120–133. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.02.003
Nacheva, L.R., Gercheva, P.S., Zhivondov, A.T., Malchev, S.M., 2019. Improvement of the rooting of micropropagated Pistacia terebinthus L. Acta Horticulturae 143–148. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1259.23
Nakhooda, M., Watt, M.P., Mycock, D., 2011. Auxin stability and accumulation during in vitro shoot morphogenesis influences subsequent root induction and development in Eucalyptus grandis. Plant Growth Regulation 65, 263–271. https://doi.org/10.1007/s10725-011-9597-7
Negi, S., Ivanchenko, M.G., Muday, G.K., 2008. Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in Arabidopsis thaliana. The Plant Journal 55, 175–187. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03495.x
Negi, S., Sukumar, P., Liu, X., Cohen, J.D., Muday, G.K., 2010. Genetic dissection of the role of ethylene in regulating auxin-dependent lateral and adventitious root formation in tomato. The Plant Journal 61, 3–15. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04027.x

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Negishi, N., Nakahama, K., Urata, N., Kojima, M., Sakakibara, H., Kawaoka, A., 2014. Hormone level analysis on adventitious root formation in Eucalyptus globulus. New Forests 45, 577–587. https://doi.org/10.1007/s11056-014-9420-1

Nelson, C.D., 2022. Tree breeding, a necessary complement to genetic engineering. New Forests. https://doi.org/10.1007/s11056-022-09931-z

Neves, M., Correia, S., Canhoto, J., 2023. Ethylene Inhibition Reduces De Novo Shoot Organogenesis and Subsequent Plant Development from Leaf Explants of Solanum betaceum Cav. Plants 12, 1854. https://doi.org/10.3390/plants12091854

Nezami-Alanagh, E., Garoosi, G.-A., Landín, M., Gallego, P.P., 2019. Computer-based tools provide new insight into the key factors that cause physiological disorders of pistachio rootstocks cultured in vitro. Scientific Reports 9, 9740. https://doi.org/10.1038/s41598-019-46155-2

Nezami-Alanagh, E., Garoosi, G.-A., Landín, M., Gallego, P.P., 2018. Combining DOE With Neurofuzzy Logic for Healthy Mineral Nutrition of Pistachio Rootstocks in vitro Culture. Frontiers in Plant Science 9. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01474

Niu, L., Yu, J.J., Liao, W., Yu, J.J., Zhang, M., Dawuda, M.M., 2017. Calcium and Calmodulin Are Involved in Nitric Oxide-Induced Adventitious Rooting of Cucumber under Simulated Osmotic Stress. Frontiers in Plant Science 8. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01684

Niu, S., Li, Z., Yuan, H., Fang, P., Chen, X., Li, W., 2013. Proper gibberellin localization in vascular tissue is required to regulate adventitious root development in tobacco. Journal of Experimental Botany 64, 3411–3424. https://doi.org/10.1093/jxb/ert186

Nobécourt, P., 1939. Sur la perennité et l'augmentation de volume des cultures de tissues vegetaux. Compt. Rendus Soc. Biol. Lyon 130, 1270–1271.

Nordström, A., Tarkowski, P., Tarkowska, D., Norbaek, R., Åstot, C., Dolezal, K., Sandberg, G., 2004. Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in Arabidopsis thaliana : A factor of potential importance for auxin–cytokinin-regulated development. Proceedings of the National Academy of Sciences 101, 8039–8044. https://doi.org/10.1073/pnas.0402504101

Nowak, D.J., Van den Bosch, M., 2019. Les effets des arbres et de la forêt sur la qualité de l'air et la santé humaine dans et autour des zones urbaines. Santé Publique S1, 153–161. https://doi.org/10.3917/spub.190.0153

Oakes, A.D., Powell, W.A., Maynard, C.A., 2013. Doubling Acclimatization Survival of Micropropagated American Chestnuts with Darkness and Shortened Rooting Induction Time. Journal of Environmental Horticulture 31, 77–83. https://doi.org/10.24266/0738-2898.31.2.77

Ogle, D.H., Doll, J.C., Wheeler, A.P., Dinno, A., 2023. FSA: Simple Fisheries Stock Assessment Methods.

Okada, K., Ito, T., Fukazawa, J., Takahashi, Y., 2017. Gibberellin Induces an Increase in Cytosolic Ca 2+ via a DELLA-Independent Signaling Pathway. Plant Physiology 175, 1536–1542. https://doi.org/10.1104/pp.17.01433

Okao, M., Ogwal, L., Mutoni, G., Oyuko Alip, S., Okullo, J.B.L., Akais Okia, C., 2016. Effect of Mode of Auxin Application on Rooting and Bud Break of Shea Tree Vitellaria paradoxa Cuttings. American Journal of Plant Sciences 07, 2199–2208. https://doi.org/10.4236/ajps.2016.715194

Ortiz, J., Soto, J., Fuentes, A., Herrera, H., Meneses, C., Arriagada, C., 2019. The Endophytic Fungus Chaetomium cupreum Regulates Expression of Genes Involved in the Tolerance to Metals and Plant Growth Promotion in Eucalyptus globulus Roots. Microorganisms 7,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

490. https://doi.org/10.3390/microorganisms7110490
Osório, M.L., Osório, J., Gonçalves, S., David, M.M., Correia, M.J., Romano, A., 2012. Carob trees (Ceratonia siliqua L.) regenerated in vitro can acclimatize successfully to match the field performance of seed-derived plants. Trees 26, 1837–1846. https://doi.org/10.1007/s00468-012-0753-0
Ozel, C.A., Khawar, K.M., Arslan, O., 2008. A comparison of the gelling of isubgol, agar and gelrite on *in vitro* shoot regeneration and rooting of variety Samsun of tobacco (*Nicotiana tabacum L.*). Scientia Horticulturae 117, 174–181. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.03.022
Pacholczak, A., Petelewicz, P., Jagiełło-Kubiec, K., Ilczuk, A., 2015. The effect of two biopreparations on rhizogenesis in stem cuttings of Cotinus coggygria Scop. European Journal of Horticultural Science 80, 183–189. https://doi.org/10.17660/eJHS.2015/80.4.6
Pacurar, D.I., Perrone, I., Bellini, C., 2014. Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting. Physiologia Plantarum 151, 83–96. https://doi.org/10.1111/ppl.12171
Palhares Neto, L., de Souza, L.M., de Morais, M.B., de Albuquerque, C.C., Camara, T.R., Ulisses, C., 2018. Controlling hyperhydricity in micropropagated plants of Lippia grata Schauer (Verbenaceae), a native species of a dry seasonal tropical forest with pharmacological potential. Brazilian Journal of Botany 41, 529–538. https://doi.org/10.1007/s40415-018-0476-6
Pan, X., Yang, Z., Xu, L., 2021. Dual roles of jasmonate in adventitious rooting. Journal of Experimental Botany 72, 6808–6810. https://doi.org/10.1093/jxb/erab378
Pan, Y., Birdsey, R.A., Phillips, O.L., Jackson, R.B., 2013. The Structure, Distribution, and Biomass of the World's Forests. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 44, 593–622. https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110512-135914
Pant, B., 2013. Medicinal orchids and their uses: Tissue culture a potential alternative for conservation. African Journal of Plant Science 7, 448–467. https://doi.org/10.5897/AJPS2013.1031
Pant, M., Husen, A., 2022. Micropropagation in mature trees by manipulation of phase change, stress, and culture environment, em: Environmental, Physiological and Chemical Controls of Adventitious Rooting in Cuttings. Elsevier, pp. 421–437. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90636-4.00002-7
Papdi, C., Pérez-Salamó, I., Joseph, M.P., Giuntoli, B., Bögre, L., Koncz, C., Szabados, L., 2015. The low oxygen, oxidative and osmotic stress responses synergistically act through the ethylene response factor VII genes RAP2.12 , RAP2.2 and RAP2.3. The Plant Journal 82, 772–784. https://doi.org/10.1111/tpj.12848
Park, C.H., Roh, J., Youn, J.H., Son, S.H., Park, J.H., Kim, S.Y., Kim, T.W., Kim, S.K., 2018. Arabidopsis ACC oxidase 1 coordinated by multiple signals mediates ethylene biosynthesis and is involved in root development. Molecules and Cells 41, 923–932. https://doi.org/10.14348/molcells.2018.0092
Park, S.-H., Elhiti, M., Wang, H., Xu, A., Brown, D., Wang, A., 2017. Adventitious root formation of in vitro peach shoots is regulated by auxin and ethylene. Scientia Horticulturae 226, 250–260. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.053
Parlamento Europeo, Consello da Unión Europea, 2013. Regulation (EU) No 1308/2013 of 17 December 2013. Official Journas of the European Union 2008, 184.
Pasa, M. da S., Carvalho, G.L., Schuch, M.W., Schmitz, J.D., Torchelsen, M. de M., Nickel, G.K., Sommer, L.R., Lima, T.S., Camargo, S.S., 2012. Qualidade de luz e fitorreguladores na multiplicação e enraizamento in vitro da amoreira-preta «Xavante».

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ciência Rural 42, 1392–1396. https://doi.org/10.1590/S0103-84782012000800010
Pasqualetto, P.-L., Zimmerman, R.H., Fordham, I., 1988. The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 14, 31–40. https://doi.org/10.1007/BF00029573
Pasternak, T., Groot, E.P., Kazantsev, F. V., Teale, W., Omelyanchuk, N., Kovrizhnykh, V., Palme, K., Mironova, V. V., 2019. Salicylic Acid Affects Root Meristem Patterning via Auxin Distribution in a Concentration-Dependent Manner. Plant Physiology 180, 1725–1739. https://doi.org/10.1104/pp.19.00130
Patel, P., Sarswat, S.K., Modi, A., 2022. Strategies to overcome explant recalcitrance under in vitro conditions, em: Advances in Plant Tissue Culture. Elsevier, pp. 283–294. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90795-8.00003-5
Pavlopoulou, A., Kossida, S., 2007. Plant cytosine-5 DNA methyltransferases: Structure, function, and molecular evolution. Genomics 90, 530–541. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2007.06.011
Pei, L., Zhao, Y., Shi, X., Chen, R., Yan, J., Li, X., Jiang, Z., Wang, J., Shi, S., 2022. The Role of γ-Aminobutyric Acid (GABA) in the Occurrence of Adventitious Roots and Somatic Embryos in Woody Plants. Plants 11, 3512. https://doi.org/10.3390/plants11243512
Pérez-Tornero, O., Egea, J., Olmos, E., Burgos, L., 2001. Control of hyperhydricity in micropropagated apricot cultivars. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant 37, 250–254. https://doi.org/10.1007/s11627-001-0044-8
Perez, C., Rodriguez, R., Tames, R.S., 1985. In vitro filbert (Corylus avellana L.) micropropagation from shoot and cotyledonary node segments. Plant Cell Reports 4, 137–139. https://doi.org/10.1007/BF00571300
Pérez, F.J., Noriega, X., Rubio, S., 2021. Hydrogen Peroxide Increases during Endodormancy and Decreases during Budbreak in Grapevine (Vitis vinifera L.) Buds. Antioxidants 10, 873. https://doi.org/10.3390/antiox10060873
Perlerou, C., Diamandis, S., 2006. Identification and geographic distribution of vegetative compatibility types of Cryphonectria parasitica and occurrence of hypovirulence in Greece. Forest Pathology 36, 413–421. https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2006.00468.x
Permadi, N., Nurzaman, M., Alhasnawi, A.N., Doni, F., Julaeha, E., 2023. Managing Lethal Browning and Microbial Contamination in Musa spp. Tissue Culture: Synthesis and Perspectives. Horticulturae 9, 453. https://doi.org/10.3390/horticulturae9040453
Petrášek, J., Friml, J., 2009. Auxin transport routes in plant development. Development 136, 2675–2688. https://doi.org/10.1242/dev.030353
Picó, S., Ortiz-Marchena, M.I., Merini, W., Calonje, M., 2015. Deciphering the Role of POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX1 Variants in Regulating the Acquisition of Flowering Competence in Arabidopsis. Plant Physiology 168, 1286–1297. https://doi.org/10.1104/pp.15.00073
Pizarro, A., Díaz-Sala, C., 2020. Effect of polar auxin transport and gibberellins on xylem formation in pine cuttings under adventitious rooting conditions. Israel Journal of Plant Sciences 67, 27–39. https://doi.org/10.1163/22238980-20191120
Pliego-Alfaro, F., Murashige, T., 1987. Possible Rejuvenation of Adult Avocado by Graftage onto Juvenile Rootstocks in Vitro. HortScience 22, 1321–1324. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.22.6.1321
Podwyszyńska, M., Goszczyńska, D.M., 1998. Effect of inhibitors of ethylene biosynthesis and action, as well as calcium and magnesium on rose shoot rooting, shoot-tip necrosis

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

and leaf senescence in vitro. Acta Physiologiae Plantarum 20, 91–98. https://doi.org/10.1007/s11738-998-0049-6
Podwyszynska, M., Olszewski, T., 1995. Influence of gelling agents on shoot multiplication and the uptake of macroelements by in vitro culture of rose, cordyline and homalomena. Scientia Horticulturae 64, 77–84. https://doi.org/10.1016/0304-4238(95)00826-0
Poethig, R.S., 2013. Vegetative Phase Change and Shoot Maturation in Plants. pp. 125–152. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396968-2.00005-1
Poethig, R.S., 2010. The Past, Present, and Future of Vegetative Phase Change. Plant Physiology 154, 541–544. https://doi.org/10.1104/pp.110.161620
Polko, J.K., Kieber, J.J., 2019. 1-Aminocyclopropane 1-Carboxylic Acid and Its Emerging Role as an Ethylene-Independent Growth Regulator. Frontiers in Plant Science 10. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01602
Prada, M., Bravo, F., Berdasco, L., Canga, E., Martínez-Alonso, C., 2016. Carbon sequestration for different management alternatives in sweet chestnut coppice in northern Spain. Journal of Cleaner Production 135, 1161–1169. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.07.041
Qadri, R., Akram, M.T., Khan, I., Azam, M., Nisar, N., Ghani, M.A., Tanveer, M., Khan, M., 2018. Response of guava (Psidium guajava L.) softwood cuttings to paclobutrazol application in different rooting media. Bangladesh Journal of Botany 47, 361–367. https://doi.org/10.3329/bjb.v47i3.38653
Qi, N., Wang, N., Hou, X., Li, Y., Liao, W., 2022. Involvement of Calcium and Calmodulin in NO-Alleviated Salt Stress in Tomato Seedlings. Plants 11, 2479. https://doi.org/10.3390/plants11192479
Qin, H., He, L., Huang, R., 2019. The Coordination of Ethylene and Other Hormones in Primary Root Development. Frontiers in Plant Science 10. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00874
Qin, H., Pandey, B.K., Li, Y., Huang, G., Wang, J., Quan, R., Zhou, J., Zhou, Y., Miao, Y., Zhang, D., Bennett, M.J., Huang, R., 2022. Orchestration of ethylene and gibberellin signals determines primary root elongation in rice. The Plant cell 34, 1273–1288. https://doi.org/10.1093/plcell/koac008
Quak, F., 1957. Meristeemcultuur gecombineerd met warmtebehandeling voor het verkrijgen van virusvrije anjerplanten. T. Pl.-ziekten 63, 13–14. https://doi.org/10.1007/BF01987745
Quintáns Suárez, M., 1994. Anuario de tradicións galegas. Tambre, Oleiros.
R Core Team, 2021. R: A language and environment for statistical computing.
Raihan, T., Geneve, R.L., Perry, S.E., Rodriguez Lopez, C.M., 2021. The Regulation of Plant Vegetative Phase Transition and Rejuvenation: miRNAs, a Key Regulator. Epigenomes 5, 24. https://doi.org/10.3390/epigenomes5040024
Raina, R.J.-, Babbar, S.B., 2011. Evaluation of Blends of Alternative Gelling Agents with Agar and Development of Xanthagar, A Gelling Mix, Suitable for Plant Tissue Culture Media. Asian Journal of Biotechnology. https://doi.org/10.3923/ajbkr.2011.153.164
Ramírez-Carvajal, G.A., Morse, A.M., Dervinis, C., Davis, J.M., 2009. The Cytokinin Type-B Response Regulator PtRR13 Is a Negative Regulator of Adventitious Root Development in Populus. Plant Physiology 150, 759–771. https://doi.org/10.1104/pp.109.137505
Ramon, U., Weiss, D., Illouz-Eliaz, N., 2021. Underground gibberellin activity: differential gibberellin response in tomato shoots and roots. New Phytologist 229, 1196–1200. https://doi.org/10.1111/nph.16876

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ranghoo-Sanmukhiya, V.M., 2021. Somaclonal Variation and Methods Used for Its Detection, em: Propagation and Genetic Manipulation of Plants. Springer Singapore, Singapore, pp. 1–18. https://doi.org/10.1007/978-981-15-7736-9_1

Rasmussen, A., Beveridge, C.A., Geelen, D., 2012a. Inhibition of strigolactones promotes adventitious root formation. Plant Signaling & Behavior 7, 694–697. https://doi.org/10.4161/psb.20224

Rasmussen, A., Hosseini, S.A., Hajirezaei, M.-R., Druege, U., Geelen, D., 2015. Adventitious rooting declines with the vegetative to reproductive switch and involves a changed auxin homeostasis. Journal of Experimental Botany 66, 1437–1452. https://doi.org/10.1093/jxb/eru499

Rasmussen, A., Mason, M.G., De Cuyper, C., Brewer, P.B., Herold, S., Agusti, J., Geelen, D., Greb, T., Goormachtig, S., Beeckman, T., Beveridge, C.A., 2012b. Strigolactones Suppress Adventitious Rooting in Arabidopsis and Pea. Plant Physiology 158, 1976–1987. https://doi.org/10.1104/pp.111.187104

Rasool, A., Mansoor, S., Bhat, K.M., Hassan, G.I., Baba, T.R., Alyemeni, M.N., Alsahli, A.A., El-Serehy, H.A., Paray, B.A., Ahmad, P., 2020. Mechanisms Underlying Graft Union Formation and Rootstock Scion Interaction in Horticultural Plants. Frontiers in Plant Science 11. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.590847

Read, P.E., Bavougian, C.M., 2012. In Vitro Rejuvenation of Woody Species, em: Lambardi, M., Ozudogru, E., Jain, S. (Eds.), Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants. Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 383–395. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-074-8_30

Reed, B.M., Wada, S., DeNoma, J., Niedz, R.P., 2013. Mineral nutrition influences physiological responses of pear in vitro. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 49, 699–709. https://doi.org/10.1007/s11627-013-9556-2

Regni, L., Facchin, S.L., da Silva, D.F., Proietti, P., Silvestri, C., Micheli, M., 2023. Optimization of the In Vitro Proliferation of an Ancient Pear Tree Cultivar (‘Decana d’inverno’) through the Use of Neem Oil. Plants 12, 1593. https://doi.org/10.3390/plants12081593

Reinert, J., 1958. Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Carotten. Die Naturwissenschaften 45, 344–345. https://doi.org/10.1007/BF00640240

Ricci, A., Carra, A., Rolli, E., Bertoletti, C., Branca, C., 2003. N,N′-bis-(2,3-methylenedioxyphenyl)urea and N,N′ -bis-(3,4-methylenedioxyphenyl)urea interact with auxin in enhancing root formation of M26 apple (Malus pumila Mill.) stem slices. Plant Growth Regulation 40, 207–212. https://doi.org/10.1023/A:1025045213739

Ricci, A., Incerti, M., Rolli, E., Vicini, P., Morini, G., Comini, M., Branca, C., 2006. Diheteroarylurea derivatives as adventitious rooting adjuvants in mung bean shoots and M26 apple rootstock. Plant Growth Regulation 50, 201–209. https://doi.org/10.1007/s10725-006-9119-1

Ricci, A., Rolli, E., Brunoni, F., Dramis, L., Sacco, E., Fattorini, L., Ruffoni, B., Díaz-Sala, C., Altamura, M.M., 2016. 1,3-di(benzo[d]oxazol-5-yl)urea acts as either adventitious rooting adjuvant or xylogenesis enhancer in carob and pine microcuttings depending on the presence/absence of exogenous indole-3-butyric acid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 126, 411–427. https://doi.org/10.1007/s11240-016-1010-9

Ricci, A., Rolli, E., Dramis, L., Diaz-Sala, C., 2008. N,N′-bis-(2,3-Methylenedioxyphenyl)urea and N,N′-bis-(3,4-methylenedioxyphenyl)urea enhance adventitious rooting in Pinus radiata and affect expression of genes induced during adventitious rooting in the presence of exogenous auxin. Plant Science 175, 356–363.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.05.009
Riveiro, S.F., Cruz, Ó., Casal, M., Reyes, O., 2020. Fire and seed maturity drive the viability, dormancy, and germination of two invasive species: Acacia longifolia (Andrews) Willd. and Acacia mearnsii De Wild. Annals of Forest Science 77, 1–10. https://doi.org/10.1007/s13595-020-00965-x
Riveiro, S.F., García-Duro, J., Cruz, Ó., Casal, M., Reyes, O., 2019. Fire effects on germination response of the native species Daucus carota and the invasive alien species Helichrysum foetidum and Oenothera glazioviana. Global Ecology and Conservation 20, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00730
Rizza, A., Walia, A., Lanquar, V., Frommer, W.B., Jones, A.M., 2017. In vivo gibberellin gradients visualized in rapidly elongating tissues. Nature Plants 3, 803–813. https://doi.org/10.1038/s41477-017-0021-9
Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., Mesirov, J.P., 2011. Integrative genomics viewer. Nature Biotechnology 29, 24–26. https://doi.org/10.1038/nbt.1754
Roces-Díaz, J. V., Jiménez-Alfaro, B., Chytrý, M., Díaz-Varela, E.R., Álvarez-Álvarez, P., 2018. Glacial refugia and mid-Holocene expansion delineate the current distribution of Castanea sativa in Europe. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 491, 152–160. https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2017.12.004
Ronsisvalle, S., Lissandrello, E., Fuochi, V., Petronio Petronio, G., Straquadanio, C., Crascì, L., Panico, A., Milito, M., Cova, A.M., Tempera, G., Furneri, P.M., 2019. Antioxidant and antimicrobial properties of Casteanea sativa Miller chestnut honey produced on Mount Etna (Sicily). Natural Product Research 33, 843–850. https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1413568
Roussos, P.A., 2023. Adventitious Root Formation in Plants: The Implication of Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide. Antioxidants 12, 862. https://doi.org/10.3390/antiox12040862
Rout, G.R., 2006. Effect of Auxins on Adventitious Root Development from Single Node Cuttings of Camellia sinensis (L.) Kuntze and Associated Biochemical Changes. Plant Growth Regulation 48, 111–117. https://doi.org/10.1007/s10725-005-5665-1
Růžička, K., Ljung, K., Vanneste, S., Podhorská, R., Beeckman, T., Friml, J., Benková, E., 2007. Ethylene Regulates Root Growth through Effects on Auxin Biosynthesis and Transport-Dependent Auxin Distribution. The Plant Cell 19, 2197–2212. https://doi.org/10.1105/tpc.107.052126
Sáez, P.L., Bravo, L.A., Latsague, M.I., Sánchez, M.E., Ríos, D.G., 2012. Increased light intensity during in vitro culture improves water loss control and photosynthetic performance of Castanea sativa grown in ventilated vessels. Scientia Horticulturae 138, 7–16. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.02.005
Sáez, P.L., Bravo, L.A., Latsague, M.I., Toneatti, M.J., Sánchez-Olate, M., Ríos, D.G., 2013. Light energy management in micropropagated plants of Castanea sativa, effects of photoinhibition. Plant Science 201–202, 12–24. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.11.008
Sáez, P.L., Bravo, L.A., Sánchez-Olate, M., Bravo, P.B., Ríos, D.G., 2016. Effect of Photon Flux Density and Exogenous Sucrose on the Photosynthetic Performance during In Vitro Culture of Castanea sativa. American Journal of Plant Sciences 07, 2087–2105. https://doi.org/10.4236/ajps.2016.714187
Saglam, S., Cifici, C.Y., 2010. Effects of agar and isubgol on adventitous shoot regeneration of woad (Isatis tinctoria). International Journal of Agriculture and Biology 12, 281–285.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Sakakibara, H., 2021. Cytokinin biosynthesis and transport for systemic nitrogen signaling. The Plant Journal 105, 421–430. https://doi.org/10.1111/tpj.15011

Salari, H., Baninasab, B., Akbari, M., Rohani, M.A., 2017. Effect of Paclobutrazol on Adventitious Root Formation of IBA-Treated Cuttings of «Zard» and «Dakal» Olive (Olea europaea L.) Cultivars, Asian Journal of Applied Sciences. https://doi.org/https://doi.org/10.24203/AJAS.V5I4.4809

Salvador, V.H., Lima, R.B., dos Santos, W.D., Soares, A.R., Böhm, P.A.F., Marchiosi, R., Ferrarese, M. de L.L., Ferrarese-Filho, O., 2013. Cinnamic Acid Increases Lignin Production and Inhibits Soybean Root Growth. PLoS ONE 8, e69105. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069105

San José, M.C., Cernadas, M.J., Janeiro, L. V., 2021. Optimization of Micropropagation Protocols in Some Woody Plants Using Meta-topolin, em: Meta-topolin: A Growth Regulator for Plant Biotechnology and Agriculture. Springer Singapore, Singapore, pp. 221–240. https://doi.org/10.1007/978-981-15-9046-7_16

Sánchez, M., Ballester, A., Vieitez, A., 1997. Reinvigoration treatments for the micropropagation of mature chestnut trees. Annales des Sciences Forestières 54, 359–370. https://doi.org/10.1051/forest:19970404

Sanchez, M.C., Vieitez, A.M., 1991. In vitro morphogenetic competence of basal sprouts and crown branches of mature chestnut. Tree Physiology 8, 59–70. https://doi.org/10.1093/treephys/8.1.59

Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, J.C., Hutchison, C.A., Slocombe, P.M., Smith, M., 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage φX174 DNA. Nature 265, 687–695. https://doi.org/10.1038/265687a0

Santana Costa Souza, D.M., Fernandes, S.B., Oliveira Silva, E., Politi Duarte, V., Santos Gonçalves, D., de Carvalho, D., Leal Teixeira, G., Ebling Brondani, G., 2022. Effect of light intensity on in vitro introduction and multiplication of Eucalyptus grandis × Eucalyptus urophylla. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 58, 225–239. https://doi.org/10.1007/s11627-021-10237-6

Santos, C., Machado, H., Correia, I., Gomes, F., Gomes-Laranjo, J., Costa, R., 2015. Phenotyping Castanea hybrids for Phytophthora cinnamomi resistance. Plant Pathology 64, 901–910. https://doi.org/10.1111/ppa.12313

Saraswathi, M.S., Uma, S., Kannan, G., Selvasumathi, M., Mustaffa, M.M., Backiyarani, S., 2016. Cost-effective tissue culture media for large-scale propagation of three commercial banana (Musa spp.) varieties. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 91, 23–29. https://doi.org/10.1080/14620316.2015.1117227

Sarkar, S., Dey, A., Kumar, V., Batiha, G.E.-S., El-Esawi, M.A., Tomczyk, M., Ray, P., 2021. Fungal Endophyte: An Interactive Endosymbiont With the Capability of Modulating Host Physiology in Myriad Ways. Frontiers in Plant Science 12. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.701800

Sarropoulou, V., Dimassi-Theriou, K., Therios, I., 2016. Effect of the ethylene inhibitors silver nitrate, silver sulfate, and cobaltchloride on micropropagation and biochemical parameters in the cherryrootstocks CAB-6P and Gisela 6. Turkish Journal of Biology 40, 670–683. https://doi.org/10.3906/biy-1505-92

Sarrou, E., Therios, I., Dimassi-theriou, K., 2014. Melatonin and other factors that promote rooting and sprouting of shoot cuttings in Punica granatum cv. Wonderful. TURKISH JOURNAL OF BOTANY 38, 293–301. https://doi.org/10.3906/bot-1302-55

Sasaki, A., Itoh, H., Gomi, K., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Jeong, D.-H.H., An, G., Kitano, H., Ashikari, M., Matsuoka, M., 2003. Accumulation of

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Phosphorylated Repressor for Gibberellin Signaling in an F-box Mutant. Science 299, 1896–1898. https://doi.org/10.1126/science.1081077
Sassi, M., Lu, Y., Zhang, Y., Wang, J., Dhonukshe, P., Blilou, I., Dai, M., Li, J., Gong, X., Jaillais, Y., Yu, X., Traas, J., Ruberti, I., Wang, H., Scheres, B., Vernoux, T., Xu, J., 2012. COP1 mediates the coordination of root and shoot growth by light through modulation of PIN1- and PIN2-dependent auxin transport in Arabidopsis. Development 139, 3402–3412. https://doi.org/10.1242/dev.078212
Savatin, D. V., Gramegna, G., Modesti, V., Cervone, F., 2014. Wounding in the plant tissue: the defense of a dangerous passage. Frontiers in Plant Science 5. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00470
Schaller, G.E., 2012. Ethylene and the regulation of plant development. BMC Biology 10, 9. https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-9
Schaller, G.E., Bishopp, A., Kieber, J.J., 2015. The Yin-Yang of Hormones: Cytokinin and Auxin Interactions in Plant Development. The Plant Cell 27, 44–63. https://doi.org/10.1105/tpc.114.133595
Schiessl, K., Lilley, J.L.S., Lee, T., Tamvakis, I., Kohlen, W., Bailey, P.C., Thomas, A., Luptak, J., Ramakrishnan, K., Carpenter, M.D., Mysore, K.S., Wen, J., Ahnert, S., Grieneisen, V.A., Oldroyd, G.E.D., 2019. NODULE INCEPTION Recruits the Lateral Root Developmental Program for Symbiotic Nodule Organogenesis in Medicago truncatula. Current Biology 29, 3657-3668.e5. https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.09.005
Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nature Protocols 3, 1101–1108. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73
Scholz, S.S., Malabarba, J., Reichelt, M., Heyer, M., Ludewig, F., Mithöfer, A., 2017. Evidence for GABA-Induced Systemic GABA Accumulation in Arabidopsis upon Wounding. Frontiers in Plant Science 8. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00388
Schubarth, D., Santamarina, A., 1991. Cancioneiro Popular Galego, Fundación «Pedro Barrié de la Maza, Conde de Fenosa». https://doi.org/10.2307/847688
Schwambach, J., Fadanelli, C., Fett-Neto, A.G., 2005. Mineral nutrition and adventitious rooting in microcuttings of Eucalyptus globulus. Tree Physiology 25, 487–494. https://doi.org/10.1093/treephys/25.4.487
Scullion, J.J., Vogt, K.A., Drahota, B., Winkler-Schor, S., Lyons, M., 2019. Conserving the Last Great Forests: A Meta-Analysis Review of the Drivers of Intact Forest Loss and the Strategies and Policies to Save Them. Frontiers in Forests and Global Change 2. https://doi.org/10.3389/ffgc.2019.00062
Sebastiani, L., Tognetti, R., 2004. Growing season and hydrogen peroxide effects on root induction and development in Olea europaea L. (cvs 'Frantoio' and 'Gentile di Larino') cuttings. Scientia Horticulturae 100, 75–82. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2003.08.008
Sehrawat, S., Najafian, K., Jin, L., 2023. Predicting phenotypes from novel genomic markers using deep learning. Bioinformatics Advances 3. https://doi.org/10.1093/bioadv/vbad028
Seijo, F., Cespedes, B., Zavala, G., 2018. Traditional fire use impact in the aboveground carbon stock of the chestnut forests of Central Spain and its implications for prescribed burning. Science of The Total Environment 625, 1405–1414. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.079
Shang, X.-L., Xie, R.-R., Tian, H., Wang, Q.-L., Guo, F.-Q., 2016. Putative zeatin O -glucosyltransferase OscZOG1 regulates root and shoot development and formation of agronomic traits in rice. Journal of Integrative Plant Biology 58, 627–641. https://doi.org/10.1111/jipb.12444
Shanthi, K., Bachpai, V.K.W., Anisha, S., Ganesan, M., Anithaa, R.G., Subashini, V.,

USC DE COMPOSTELA

Chakravarthi, M., Sivakumar, V., Yasodha, R., 2015. Micropropagation of Eucalyptus camaldulensis for the production of rejuvenated stock plants for microcuttings propagation and genetic fidelity assessment. New Forests 46, 357–371. https://doi.org/10.1007/s11056-014-9465-1

Shukla, V., Lombardi, L., Iacopino, S., Pencik, A., Novak, O., Perata, P., Giuntoli, B., Licausi, F., 2019. Endogenous Hypoxia in Lateral Root Primordia Controls Root Architecture by Antagonizing Auxin Signaling in Arabidopsis. Molecular Plant 12, 538–551. https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.01.007

Siamak, S., Meon, S., Wahab, Z., Mahmood, 2010. Scalp Induction Rate Responses to Cytokinins on Proliferating Shoot-Tips of Banana Cultivars (Musa spp.). American Journal of Agricultural and Biological Sciences 5, 128–134. https://doi.org/10.3844/ajabssp.2010.128.134

Silva, M.K.F. da, Siqueira, D.P., de Carvalho, G.C.M.W., Silva, R. de D., Silva, R.M. da R., Barroso, D.G., 2022. Hydrogen peroxide enhanced indole-3-butyric acid effects on Cordia trichotoma adventitious rooting. Rhizosphere 22, 100533. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100533

Singh, A., Agarwal, P.K., 2016. Enhanced micropropagation protocol of ex vitro rooting of a commercially important crop plant Simmondsia chinensis (Link) Schneider. Journal of Forest Science 62, 107–115. https://doi.org/10.17221/80/2015-JFS

Singh, P., Patel, R.M., 2016. Factors affecting in vitro degree of browning and culture establishment of pomegranate. African Journal of Plant Science 10, 43–49. https://doi.org/10.5897/AJPS2013.1119

Singh, V., Sergeeva, L., Ligterink, W., Aloni, R., Zemach, H., Doron-Faigenboim, A., Yang, J., Zhang, P., Shabtai, S., Firon, N., 2019. Gibberellin Promotes Sweetpotato Root Vascular Lignification and Reduces Storage-Root Formation. Frontiers in Plant Science 10. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01320

Singha, S., Townsend, E.C., Oberly, G.H., 1990. Relationship between calcium and agar on vitrification and shoot-tip necrosis of quince (Cydonia oblonga Mill.) shoots in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 23, 135–142. https://doi.org/10.1007/BF00035834

Sivanesan, I., Park, S.W., 2014. The role of silicon in plant tissue culture. Frontiers in Plant Science 5. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00571

Smith, D.L., Kelly, K., Krikorian, A.D., 1989. Ethylene-associated phase change from juvenile to mature phenotype of daylily (Hemerocallis) in vitro. Physiologia Plantarum 76, 466–473. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1989.tb05464.x

Smulders, M.J.M.M., de Klerk, G.J., 2011. Epigenetics in plant tissue culture. Plant Growth Regulation 63, 137–146. https://doi.org/10.1007/s10725-010-9531-4

Song, M., Wang, R.R., Zhou, F., Wang, R.R., Zhang, S., Li, D., Song, J., Yang, S., Yang, Y., 2020. SPLs-mediated flowering regulation and hormone biosynthesis and signaling accompany juvenile-adult phase transition in Pyrus. Scientia Horticulturae 272, 109584. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109584

Sosnowski, J., Truba, M., Vasileva, V., 2023. The Impact of Auxin and Cytokinin on the Growth and Development of Selected Crops. Agriculture 13, 724. https://doi.org/10.3390/agriculture13030724

Souza-Alonso, P., González, L., 2017. Don't leave me behind: viability of vegetative propagules of the clonal invasive Carpobrotus edulis and implications for plant management. Biological Invasions 19, 2171–2183. https://doi.org/10.1007/s10530-017-1429-x

Spartz, A.K., Lee, S.H., Wenger, J.P., Gonzalez, N., Itoh, H., Inzé, D., Peer, W.A., Murphy,

USC DE COMPOSTELA

A.S., Overvoorde, P.J., Gray, W.M., 2012. The SAUR19 subfamily of SMALL AUXIN UP RNA genes promote cell expansion. The Plant Journal 70, 978–990. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04946.x

Spencer, V.M.R., Bentall, L., Harrison, C.J., 2023. Diverse branching forms regulated by a core auxin transport mechanism in plants. Development 150. https://doi.org/10.1242/dev.201209

Sriskanda, D., Liew, Y.X., Khor, S.P., Merican, F., Subramaniam, S., Chew, B.L., 2021. An efficient micropropagation protocol for Ficus carica cv. Golden Orphan suitable for mass propagation. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 38, 102225. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102225

Sriskandarajah, S., Mullins, M.., Nair, Y., 1982. Induction of adventitious rooting in vitro in difficult-to-propagate cultivars of apple. Plant Science Letters 24, 1–9. https://doi.org/10.1016/0304-4211(82)90002-5

Staswick, P.E., Serban, B., Rowe, M., Tiryaki, I., Maldonado, M.T., Maldonado, M.C., Suza, W., 2005. Characterization of an Arabidopsis Enzyme Family That Conjugates Amino Acids to Indole-3-Acetic Acid. The Plant Cell 17, 616–627. https://doi.org/10.1105/tpc.104.026690

Steffens, B., Rasmussen, A., 2016. The Physiology of Adventitious Roots. Plant Physiology 170, 603–617. https://doi.org/10.1104/pp.15.01360

Steward, F.C., Mapes, M.O., Mears, K., 1958. Growth and Organized Development of Cultured Cells. II. Organization in Cultures Grown from Freely Suspended Cells. American Journal of Botany 45, 705. https://doi.org/10.2307/2439728

Strader, L.C., Beisner, E.R., Bartel, B., 2009. Silver Ions Increase Auxin Efflux Independently of Effects on Ethylene Response. The Plant Cell 21, 3585–3590. https://doi.org/10.1105/tpc.108.065185

Su, L., Rahat, S., Ren, N., Kojima, M., Takebayashi, Y., Sakakibara, H., Wang, M., Chen, X., Qi, X., 2021. Cytokinin and auxin modulate cucumber parthenocarpy fruit development. Scientia Horticulturae 282, 110026. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110026

Su, Y.-H., Liu, Y.-B., Zhang, X.-S., 2011. Auxin–Cytokinin Interaction Regulates Meristem Development. Molecular Plant 4, 616–625. https://doi.org/10.1093/mp/ssr007

Suada, E.P., Jasim, B., Jimtha, C.J., Gayatri, G.P., Radhakrishnan, E.K., Remakanthan, A., 2015. Phytostimulatory and hardening period-reducing effects of plant-associated bacteria on micropropagated Musa acuminata cv. Grand Naine. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 51, 682–687. https://doi.org/10.1007/s11627-015-9721-x

Subdirección Xeral de Biodiversidade e de Recursos Cinexéticos e Piscícolas, 2021. Árbores e Formacións Senlleiras de Galicia. Xunta de Galicia.

Suebrasri, T., Harada, H., Jogloy, S., Ekprasert, J., Boonlue, S., 2020. Auxin-producing fungal endophytes promote growth of sunchoke. Rhizosphere 16, 100271. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100271

Sugimoto, K., Gordon, S.P., Meyerowitz, E.M., 2011. Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? Trends in Cell Biology 21, 212–218. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.12.004

Sun, P., Tian, Q.-Y., Chen, J., Zhang, W.-H., 2010. Aluminium-induced inhibition of root elongation in Arabidopsis is mediated by ethylene and auxin. Journal of Experimental Botany 61, 347–356. https://doi.org/10.1093/jxb/erp306

Swamy, M.K., Sudipta, K.M., Balasubramanya, S., Anuradha, M., 2010. Effect of Dfferent Carbon Sources on *in vitro* Morphogenetic Response of Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth). Journal of phytology 2, 11–17.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Swarup, K., Benková, E., Swarup, R., Casimiro, I., Péret, B., Yang, Y., Parry, G., Nielsen, E., De Smet, I., Vanneste, S., Levesque, M.P., Carrier, D., James, N., Calvo, V., Ljung, K., Kramer, E., Roberts, R., Graham, N., Marillonnet, S., Patel, K., Jones, J.D.G., Taylor, C.G., Schachtman, D.P., May, S., Sandberg, G., Benfey, P., Friml, J., Kerr, I., Beeckman, T., Laplaze, L., Bennett, M.J., 2008. The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. Nature Cell Biology 10, 946–954. https://doi.org/10.1038/ncb1754

Swinka, C., Hellmann, E., Zwack, P., Banda, R., Rashotte, A.M., Heyl, A., 2023. Cytokinin Response Factor 9 Represses Cytokinin Responses in Flower Development. International Journal of Molecular Sciences 24, 4380. https://doi.org/10.3390/ijms24054380

Tabart, J., Franck, T., Kevers, C., Dommes, J., 2015. Effect of polyamines and polyamine precursors on hyperhydricity in micropropagated apple shoots. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 120, 11–18. https://doi.org/10.1007/s11240-014-0568-3

Tahir, M.M., Chen, S., Ma, X., Li, S., Zhang, X., Shao, Y., Shalmani, A., Zhao, C., Bao, L., Zhang, D., 2021. Transcriptome analysis reveals the promotive effect of potassium by hormones and sugar signaling pathways during adventitious roots formation in the apple rootstock. Plant Physiology and Biochemistry 165, 123–136. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.05.015

Takáč, T., Obert, B., Rolčík, J., Šamaj, J., 2016. Improvement of adventitious root formation in flax using hydrogen peroxide. New Biotechnology 33, 728–734. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.02.008

Takahashi, F., Sato-Nara, K., Kobayashi, K., Suzuki, M., Suzuki, H., 2003. Sugar-induced adventitious roots in Arabidopsis seedlings. Journal of Plant Research 116, 83–91. https://doi.org/10.1007/s10265-002-0074-2

Tal, I., Zhang, Y., Jørgensen, M.E., Pisanty, O., Barbosa, I.C.R.R., Zourelidou, M., Regnault, T., Crocoll, C., Erik Olsen, C., Weinstain, R., Schwechheimer, C., Halkier, B.A., Nour-Eldin, H.H., Estelle, M., Shani, E., 2016. The Arabidopsis NPF3 protein is a GA transporter. Nature Communications 7, 11486. https://doi.org/10.1038/ncomms11486

Tan, H., Man, C., Xie, Y., Yan, J., Chu, J., Huang, J., 2019. A Crucial Role of GA-Regulated Flavonol Biosynthesis in Root Growth of Arabidopsis. Molecular Plant 12, 521–537. https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.12.021

Tan, R., Wang, L., Hong, N., Wang, G., 2010. Enhanced efficiency of virus eradication following thermotherapy of shoot-tip cultures of pear. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 101, 229–235. https://doi.org/10.1007/s11240-010-9681-0

Tang, N., Deng, W., Hu, G., Hu, N., Li, Z., 2015. Transcriptome Profiling Reveals the Regulatory Mechanism Underlying Pollination Dependent and Parthenocarpic Fruit Set Mainly Mediated by Auxin and Gibberellin. PLOS ONE 10, e0125355. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125355

Tang, W., Newton, R.J., 2005. Polyamines promote root elongation and growth by increasing root cell division in regenerated Virginia pine (Pinus virginiana Mill.) plantlets. Plant Cell Reports 24, 581–589. https://doi.org/10.1007/s00299-005-0021-5

Tang, W., Newton, R.J., Outhavong, V., 2004. Exogenously added polyamines recover browning tissues into normal callus cultures and improve plant regeneration in pine. Physiologia Plantarum 122, 386–395. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2004.00406.x

Tang, Y., Wang, L., Qu, Z., Huang, C., Zhao, T., Li, Y., Zhang, C., 2022. BSISTER transcription factors directly binds to the promoter of IAA19 and IAA29 genes to up-regulate gene expression and promote the root development. Plant Science 321, 111324. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111324

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Teale, W., Palme, K., 2018. Naphthylphthalamic acid and the mechanism of polar auxin transport. Journal of Experimental Botany 69, 303–312. https://doi.org/10.1093/jxb/erx323

Teale, W.D., Pasternak, T., Dal Bosco, C., Dovzhenko, A., Kratzat, K., Bildl, W., Schwörer, M., Falk, T., Ruperti, B., V Schaefer, J., Shahriari, M., Pilgermayer, L., Li, X., Lübben, F., Plückthun, A., Schulte, U., Palme, K., Schworer, M., Falk, T., Ruperti, B., Schaefer, J. V, Shahriari, M., Pilgermayer, L., Li, X., Lubben, F., Pluckthun, A., Schulte, U., Palme, K., 2021. Flavonol-mediated stabilization of PIN efflux complexes regulates polar auxin transport. The EMBO Journal 40, e104416. https://doi.org/10.15252/embj.2020104416

Tehranifar, A., Mahmoody Tabar, S., Selahvarzi, Y., Balandary, A., Kharrazi, M., 2014. Biochemical changes in barberries during adventitious root formation: the role of indole-3-butyric acid and hydrogen peroxide. Spanish Journal of Agricultural Research 12, 477. https://doi.org/10.5424/sjar/2014122-3889

Teixeira da Silva, J.A., Nezami-Alanagh, E., Barreal, M.E., Kher, M.M., Wicaksono, A., Gulyás, A., Hidvégi, N., Magyar-Tábori, K., Mendler-Drienyovszki, N., Márton, L., Landín, M., Gallego, P.P., Driver, J.A., Dobránszki, J., 2020. Shoot tip necrosis of in vitro plant cultures: a reappraisal of possible causes and solutions. Planta 252, 47. https://doi.org/10.1007/s00425-020-03449-4

Thakur, A., Kanwar, J.S., 2011. Effect of phase of medium, growth regulators and nutrient supplementations on in vitro shoot-tip necrosis in pear. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 39, 131–140. https://doi.org/10.1080/01140671.2011.559254

Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P.K., Puri, S., 2019. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants 12, 1–12. https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.11.004

Thomas, T.D., 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnology Advances 26, 618–631. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.08.003

Tian, Q., Xu, M., Wu, D., Wang, C., Wang, X., Che, Q., Li, Z., Xu, X., 2023. Integrated transgene and transcriptome reveal the molecular basis of MdWRKY87 positively regulate adventitious rooting in apple rootstock. Frontiers in Plant Science 14. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1136616

Tomiyama, H., Sato, M., Opio, P., Saito, T., Ohkawa, K., Ohara, H., Todoroki, Y., Kondo, S., 2020. Inhibition of Abscisic Acid 8′-Hydroxylase Affects Dehydration Tolerance and Root Formation in Cuttings of Grapes (Vitis labrusca L. × Vitis vinifera L. cv. Kyoho) Under Drought Stress Conditions. Journal of Plant Growth Regulation 39, 1577–1586. https://doi.org/10.1007/s00344-020-10171-8

Tonon, G., Kevers, C., Gaspar, T., 2001. Changes in polyamines, auxins and peroxidase activity during in vitro rooting of Fraxinus angustifolia shoots: an auxin-independent rooting model. Tree Physiology 21, 655–663. https://doi.org/10.1093/treephys/21.10.655

Trasar-Cepeda, C., Sánchez, C., Casalderrey, M., Bello, D., Vielba, J.M., Rico, S., Aldrey, A., Vidal, N., 2022. Effect of Soil Type and In Vitro Proliferation Conditions on Acclimation and Growth of Willow Shoots Micropropagated in Continuous Immersion Bioreactors. Plants 12, 132. https://doi.org/10.3390/plants12010132

Trindade, I., Schubert, D., Gaudin, V., 2017. Epigenetic Regulation of Phase Transitions in Arabidopsis thaliana, em: Rajewsky, N., Jurga, S., Barciszewski, J. (Eds.), Plant Epigenetics. RNA Technologies. Springer, Cham. pp. 359–383. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55520-1_18

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Trupiano, D., Yordanov, Y., Regan, S., Meilan, R., Tschaplinski, T., Scippa, G.S., Busov, V., 2013. Identification, characterization of an AP2/ERF transcription factor that promotes adventitious, lateral root formation in Populus. Planta 238, 271–282. https://doi.org/10.1007/s00425-013-1890-4

Tyagi, P., Singh, D., Mathur, S., Singh, A., Ranjan, R., 2022. Upcoming progress of transcriptomics studies on plants: An overview. Frontiers in Plant Science 13. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1030890

Tyagi, R.K., Agrawal, A., Mahalakshmi, C., Hussain, Z., Tyagi, H., 2007. Low-cost media for *in vitro* conservation of turmeric (*Curcuma longa L.*) and genetic stability assessment using RAPD markers. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant 43, 51–58. https://doi.org/10.1007/s11627-006-9000-y

Ueguchi-Tanaka, M., Hirano, K., Hasegawa, Y., Kitano, H., Matsuoka, M., 2008. Release of the Repressive Activity of Rice DELLA Protein SLR1 by Gibberellin Does Not Require SLR1 Degradation in the gid2 Mutant. The Plant Cell 20, 2437–2446. https://doi.org/10.1105/tpc.108.061648

Ullah, M.A., Uddin, M.I., Puteh, A.B., Haque, M.S., Islam, M.S., 2015. Alternative gelling agents for *in vitro* propagation of orchid (*Dendrobium sonia*). Journal of Animal and Plant Sciences 25, 792–797.

Uluisik, S., Seymour, G.B., 2020. Pectate lyases: Their role in plants and importance in fruit ripening. Food Chemistry 309, 125559. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125559

Vacek, S., Hejcmanová, P., Hejcman, M., 2012. Vegetative reproduction of Picea abies by artificial layering at the ecotone of the alpine timberline in the Giant (Krkonoše) Mountains, Czech Republic. Forest Ecology and Management 263, 199–207. https://doi.org/10.1016/j.foreco.2011.09.037

Vacek, Z., Vacek, S., Eşen, D., Yildiz, O., Král, J., Gallo, J., 2020. Effect of Invasive Rhododendron ponticum L. on Natural Regeneration and Structure of Fagus orientalis Lipsky Forests in the Black Sea Region. Forests 11, 603. https://doi.org/10.3390/f11050603

Vaičiukynė, M., Žiauka, J., Žūkienė, R., Vertelkaitė, L., Kuusienė, S., 2019. Abscisic acid promotes root system development in birch tissue culture: a comparison to aspen culture and conventional rooting-related growth regulators. Physiologia Plantarum 165, 114–122. https://doi.org/10.1111/ppl.12860

Valladares, S., Varas, E., Vielba, J.M., Vidal, N., Codesido, V., Castro, R., Sanchez, C., 2020. Expression of a Rap2.12 like-1 ERF gene during adventitious rooting of chestnut and oak microshoots. Israel Journal of Plant Sciences 67, 69–82. https://doi.org/10.1163/22238980-20191119

Valledor, L., Meijón, M., Hasbún, R., Jesús Cañal, M., Rodríguez, R., 2010. Variations in DNA methylation, acetylated histone H4, and methylated histone H3 during Pinus radiata needle maturation in relation to the loss of in vitro organogenic capability. Journal of Plant Physiology 167, 351–357. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.09.018

van Gelderen, K., Kang, C., Paalman, R., Keuskamp, D., Hayes, S., Pierik, R., 2018. Far-Red Light Detection in the Shoot Regulates Lateral Root Development through the HY5 Transcription Factor. The Plant Cell 30, 101–116. https://doi.org/10.1105/tpc.17.00771

Vandenbussche, F., Vaseva, I., Vissenberg, K., Van Der Straeten, D., 2012. Ethylene in vegetative development: a tale with a riddle. New Phytologist 194, 895–909. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04100.x

Vasar, V., 2003. Effect of ascorbic acid and citric acid on ex vitro rooting and acclimatization of Prunus avium L. microshoots. Acta Horticulturae 251–254.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.616.33
Vega, A., González, L., Fernández, I., González, P., 2019. Grading and mechanical characterization of small-diameter round chestnut (Castanea sativa Mill.) timber from thinning operations. Wood Material Science & Engineering 14, 81–87. https://doi.org/10.1080/17480272.2017.1387174
Velada, I., Cardoso, H., Porfirio, S., Peixe, A., 2020. Expression Profile of PIN-Formed Auxin Efflux Carrier Genes during IBA-Induced In Vitro Adventitious Rooting in Olea europaea L. Plants 9, 185. https://doi.org/10.3390/plants9020185
Veloccia, A., Fattorini, L., Della Rovere, F., Sofo, A., D'Angeli, S., Betti, C., Falasca, G., Altamura, M.M., 2016. Ethylene and auxin interaction in the control of adventitious rooting in Arabidopsis thaliana. Journal of Experimental Botany 67, 6445–6458. https://doi.org/10.1093/jxb/erw415
Vengadesan, G., Pijut, P.M., 2009. In vitro propagation of northern red oak (Quercus rubra L.). In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 45, 474–482. https://doi.org/10.1007/s11627-008-9182-6
Verkerk, P.J., Martinez de Arano, I., Palahí, M., 2018. The bio-economy as an opportunity to tackle wildfires in Mediterranean forest ecosystems. Forest Policy and Economics 86, 1–3. https://doi.org/10.1016/j.forpol.2017.10.016
Vidal, N., Arellano, G., San-Jose, M.C., Vieitez, A.M., Ballester, A., 2003. Developmental stages during the rooting of in-vitro-cultured Quercus robur shoots from material of juvenile and mature origin. Tree Physiology 23, 1247–1254. https://doi.org/10.1093/treephys/23.18.1247
Vidal, N., Sánchez, C., 2019. Use of bioreactor systems in the propagation of forest trees. Engineering in Life Sciences 19, 896–915. https://doi.org/10.1002/elsc.201900041
Vidoy-Mercado, I., Narváez, I., Palomo-Ríos, E., Litz, R.E., Barceló-Muñoz, A., Pliego-Alfaro, F., 2021. Reinvigoration/Rejuvenation Induced through Micrografting of Tree Species: Signaling through Graft Union. Plants 10, 1197. https://doi.org/10.3390/plants10061197
Vieitez, A.M., Sánchez, C., San-José, C., 1989. Prevention of shoot-tip necrosis in shoot cultures of chestnut and oak. Scientia Horticulturae 41, 151–159. https://doi.org/10.1016/0304-4238(89)90059-9
Vieitez, A.M., Sánchez, M.C., Amo-Marco, J.B., Ballester, A., 1994. Foreed flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature Quercus robur trees for micropropagation. Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC) 37, 287–295. https://doi.org/10.1007/BF00042342
Vieitez, A.M., Sänchez, M.C., García-Nimo, M.L., Ballester, A., 2007. Protocol for Micropropagation of Castanea Sativa, em: Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 299–312. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6352-7_28
Viéitez, F.J., Merkle, S.A., 2005. Castanea spp. chestnut., em: Biotechnology of fruit and nut crops. CAB International, UK, pp. 265–296. https://doi.org/10.1079/9780851996622.0265
Vielba, J.M., Rico, S., Sevgin, N., Castro-Camba, R., Covelo, P., Vidal, N., Sanchez, C., Sánchez, C., 2022. Transcriptomics Analysis Reveals a Putative Role for Hormone Signaling and MADS-Box Genes in Mature Chestnut Shoots Rooting Recalcitrance. Plants (Basel) 11, 3486. https://doi.org/10.3390/plants11243486
Vielba, J.M., Varas, E., Rico, S., Covelo, P., Sánchez, C., 2016. Auxin-mediated expression of a GH3 gene in relation to ontogenic state in Chestnut. Trees 30, 2237–2252.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

https://doi.org/10.1007/s00468-016-1449-7
Vielba, Vidal, N., San-José, M.C., Rico, S., Sánchez, C., José, M.C.S., Rico, S., Sánchez, C., 2020. Recent Advances in Adventitious Root Formation in Chestnut. Plants 9, 1543. https://doi.org/10.3390/plants9111543
Waite, H., Whitelaw-Weckert, M., Torley, P., 2015. Grapevine propagation: principles and methods for the production of high-quality grapevine planting material. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 43, 144–161. https://doi.org/10.1080/01140671.2014.978340
Wang, Bi, W., Bettoni, J.C., Zhang, D., Volk, G.M., Wang, Q., 2022a. Shoot tip cryotherapy for plant pathogen eradication. Plant Pathology 71, 1241–1254. https://doi.org/10.1111/ppa.13565
Wang, J.-W., Park, M.Y., Wang, L.-J., Koo, Y., Chen, X.-Y., Weigel, D., Poethig, R.S., 2011. MiRNA Control of Vegetative Phase Change in Trees. PLoS Genetics 7, e1002012. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002012
Wang, J., Jiang, L., Wu, R., 2017a. Plant grafting: how genetic exchange promotes vascular reconnection. New Phytologist 214, 56–65. https://doi.org/10.1111/nph.14383
Wang, L., Lu, W., Ran, L., Dou, L., Yao, S., Hu, J., Fan, D., Li, C., Luo, K., 2019. R2R3-<scp>MYB</scp> transcription factor <scp>MYB</scp> 6 promotes anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis but inhibits secondary cell wall formation in *Populus tomentosa*. The Plant Journal 99, 733–751. https://doi.org/10.1111/tpj.14364
Wang, L., Ruan, Y.-L., 2013. Regulation of cell division and expansion by sugar and auxin signaling. Frontiers in Plant Science 4. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00163
Wang, L., Yu, P., Lyu, J., Hu, Y., Han, C., Bai, M.-Y., Fan, M., 2021a. BZR1 Physically Interacts with SPL9 to Regulate the Vegetative Phase Change and Cell Elongation in Arabidopsis. International Journal of Molecular Sciences 22, 10415. https://doi.org/10.3390/ijms221910415
Wang, M., Li, P., Ma, Y., Nie, X., Grebe, M., Men, S., 2021b. Membrane Sterol Composition in Arabidopsis thaliana Affects Root Elongation via Auxin Biosynthesis. International Journal of Molecular Sciences 22, 437. https://doi.org/10.3390/ijms22010437
Wang, Pak, S., Yang, J., Wu, Y., Li, W., Feng, H., Yang, J., Wei, H., Li, C., 2022b. Two high hierarchical regulators, PuMYB40 and PuWRKY75, control the low phosphorus driven adventitious root formation in Populus ussuriensis. Plant Biotechnology Journal 20, 1561–1577. https://doi.org/10.1111/pbi.13833
Wang, X., Wu, J., Guan, M., Zhao, C., Geng, P., Zhao, Q., 2020. <scp> *Arabidopsis* </scp> MYB4 plays dual roles in flavonoid biosynthesis. The Plant Journal 101, 637–652. https://doi.org/10.1111/tpj.14570
Wang, Y., Zhao, J., Lu, W., Deng, D., 2017b. Gibberellin in plant height control: old player, new story. Plant Cell Reports. https://doi.org/10.1007/s00299-017-2104-5
Wang, Z., Li, Z., Wu, D., Tian, Q., Su, S., Cheng, C., Nie, J., Yuan, Y., Wang, Y., Xu, X., 2023. DNA methylation variation is crucial to restore adventitious rooting ability during in vitro shoot culture-induced rejuvenation in apple rootstock. The Plant Journal 114, 554–569. https://doi.org/10.1111/tpj.16153
Wang, Zhao, Y., Bollas, A., Wang, Y., Au, K.F., 2021c. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. Nature Biotechnology 39, 1348–1365. https://doi.org/10.1038/s41587-021-01108-x
Waters, M.T., Gutjahr, C., Bennett, T., Nelson, D.C., 2017. Strigolactone Signaling and Evolution. Annual Review of Plant Biology 68, 291–322. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-040925

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Watson, A., Ghosh, S., Williams, M.J., Cuddy, W.S., Simmonds, J., Rey, M.-D., Asyraf Md Hatta, M., Hinchliffe, A., Steed, A., Reynolds, D., Adamski, N.M., Breakspear, A., Korolev, A., Rayner, T., Dixon, L.E., Riaz, A., Martin, W., Ryan, M., Edwards, D., Batley, J., Raman, H., Carter, J., Rogers, C., Domoney, C., Moore, G., Harwood, W., Nicholson, P., Dieters, M.J., DeLacy, I.H., Zhou, J., Uauy, C., Boden, S.A., Park, R.F., Wulff, B.B.H., Hickey, L.T., 2018. Speed breeding is a powerful tool to accelerate crop research and breeding. Nature Plants 4, 23–29. https://doi.org/10.1038/s41477-017-0083-8

Wei, K., Ruan, L., Wang, L., Cheng, H., 2019. Auxin-Induced Adventitious Root Formation in Nodal Cuttings of Camellia sinensis. International Journal of Molecular Sciences 20, 4817. https://doi.org/10.3390/ijms20194817

Wei, Z., Li, J., 2016. Brassinosteroids Regulate Root Growth, Development, and Symbiosis. Molecular Plant 9, 86–100. https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.12.003

Welander, M., Snygg, J.O., 1987. Effect of Applied and Endogenous Auxin on Callus and Root Formation of In Vitro Shoots of the Apple. Annals of Botany 59, 439–443. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087332

Wen, S.-S., Chen, L., Tian, R.-N., 2020. Micropropagation of tree peony (Paeonia sect. Moutan): A review. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 141, 1–14. https://doi.org/10.1007/s11240-019-01747-8

Wendling, I., Trueman, S.J., Xavier, A., 2014. Maturation and related aspects in clonal forestry—part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. New Forests 45, 473–486. https://doi.org/10.1007/s11056-014-9415-y

Werner, S., Bartrina, I., Novák, O., Strnad, M., Werner, T., Schmülling, T., 2021a. The Cytokinin Status of the Epidermis Regulates Aspects of Vegetative and Reproductive Development in Arabidopsis thaliana. Frontiers in Plant Science 12. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.613488

Werner, S., Bartrina, I., Schmülling, T., 2021b. Cytokinin regulates vegetative phase change in Arabidopsis thaliana through the miR172/TOE1-TOE2 module. Nature Communications 12, 5816. https://doi.org/10.1038/s41467-021-26088-z

Werner, T., Nehnevajova, E., Köllmer, I., Novák, O., Strnad, M., Krämer, U., Schmülling, T., 2011. Root-Specific Reduction of Cytokinin Causes Enhanced Root Growth, Drought Tolerance, and Leaf Mineral Enrichment in Arabidopsis and Tobacco. The Plant Cell 22, 3905–3920. https://doi.org/10.1105/tpc.109.072694

Wick, R.R., Judd, L.M., Gorrie, C.L., Holt, K.E., 2017. Completing bacterial genome assemblies with multiplex MinION sequencing. Microbial Genomics 3. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000132

Wijerathna-Yapa, A., Hiti-Bandaralage, J., 2023. Tissue Culture—A Sustainable Approach to Explore Plant Stresses. Life 13, 780. https://doi.org/10.3390/life13030780

Woodward, A.J., Bennett, I.J., Pusswonge, S., 2006. The effect of nitrogen source and concentration, medium pH and buffering on in vitro shoot growth and rooting in Eucalyptus marginata. Scientia Horticulturae 110, 208–213. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.07.005

Wu, A.P., Gong, L., Chen, X., Wang, J.X., 2014a. Interactions between nitric oxide, gibberellic acid, and phosphorus regulate primary root growth in Arabidopsis. Biologia plantarum 58, 335–340. https://doi.org/10.1007/s10535-014-0408-7

Wu, H.., du Toit, E.., 2004. Reducing oxidative browning during in vitro establishment of Protea cynaroides. Scientia Horticulturae 100, 355–358. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2003.07.007

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Wu, J., Yamaguchi, N., Ito, T., 2019. Histone demethylases control root elongation in response to stress-signaling hormone abscisic acid. Plant Signaling & Behavior 14, 1604019. https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1604019

Wu, Q.-S., Ni, Q.-D., Que, Y.-C., Huang, W., 2014b. Calcium and Calmodulin Involve in Mycorrhizal and Root Development in Trifoliate Orange Colonized by Rhizophagus intraradices. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 42, 380–385. https://doi.org/10.15835/nbha4229635

Wu, X., Du, A., Zhang, S., Wang, W., Liang, J., Peng, F., Xiao, Y., 2021. Regulation of growth in peach roots by exogenous hydrogen sulfide based on RNA-Seq. Plant Physiology and Biochemistry 159, 179–192. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.12.018

Xiao, Y., Li, J., Zhang, Y., Zhang, X., Liu, H., Qin, Z., Chen, B., 2020. Transcriptome analysis identifies genes involved in the somatic embryogenesis of Eucalyptus. BMC Genomics 21, 1–13. https://doi.org/10.1186/s12864-020-07214-5

Xiao, Z., Ji, N., Zhang, X., Zhang, Y., Wang, Y., Wu, T., Xu, X., Han, Z., 2014. The lose of juvenility elicits adventitious rooting recalcitrance in apple rootstocks. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 119, 51–63. https://doi.org/10.1007/s11240-014-0513-5

Xie, T., Ji, J., Chen, W., Yue, J., Du, C., Sun, J., Chen, L., Jiang, Z., Shi, S., 2020. GABA negatively regulates adventitious root development in poplar. Journal of Experimental Botany 71, 1459–1474. https://doi.org/10.1093/jxb/erz520

Xu, G., Huang, J., Yang, Y., Yao, Y., 2016a. Transcriptome Analysis of Flower Sex Differentiation in Jatropha curcas L. Using RNA Sequencing. PLOS ONE 11, e0145613. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145613

Xu, M., Hu, T., Smith, M.R., Poethig, R.S., 2016b. Epigenetic Regulation of Vegetative Phase Change in Arabidopsis. The Plant Cell 28, 28–41. https://doi.org/10.1105/tpc.15.00854

Xu, M., Zhu, L., Shou, H., Wu, P., 2005. A PIN1 Family Gene, OsPIN1, involved in Auxin-dependent Adventitious Root Emergence and Tillering in Rice. Plant and Cell Physiology 46, 1674–1681. https://doi.org/10.1093/pcp/pci183

Xu, P., Zhao, P.-X., Cai, X.-T., Mao, J.-L., Miao, Z.-Q., Xiang, C.-B., 2020. Integration of Jasmonic Acid and Ethylene Into Auxin Signaling in Root Development. Frontiers in Plant Science 11. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00271

Xu, Q., Li, H., Liu, S., Huang, W., Xian, X., Li, Q., Long, Y., Chen, R., Sun, Z., Pan, Y., 2022. Gibberellin and spermidine synergistically regulate polyamine metabolism during the development of Rhododendron flowers. Plant Growth Regulation 96, 37–50. https://doi.org/10.1007/s10725-021-00756-y

Xu, X., Li, X., Hu, X., Wu, T., Wang, Y., Xu, X., Zhang, X., Han, Z., 2017. High miR156 Expression Is Required for Auxin-Induced Adventitious Root Formation via MxSPL26 Independent of PINs and ARFs in Malus xiaojinensis. Frontiers in Plant Science 8. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01059

Xu, Y., Zhang, L., Wu, G., 2018. Epigenetic Regulation of Juvenile-to-Adult Transition in Plants. Frontiers in Plant Science 9. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01048

Xue, H., Gao, X., He, P., Xiao, G., 2022. Origin, evolution, and molecular function of DELLA proteins in plants. The Crop Journal 10, 287–299. https://doi.org/10.1016/j.cj.2021.06.005

Xunta de Galicia, 2023. Nomenclator de Galicia [WWW Document]. URL https://www.xunta.gal/nomenclator/

Xunta de Galicia, 2021. 1ª Revisión do Plan Forestal de Galicia, 2021-2040. Cara a

USC DE COMPOSTELA

neutralidade carbónica.
Xunta de Galicia, Real Academia Galega, 2023. Toponimia de Galicia [WWW Document]. URL https://toponimia.xunta.gal/gl
Yang, C., Ma, B., He, S.-J., Xiong, Q., Duan, K.-X., Yin, C.-C., Chen, H., Lu, X., Chen, S.-Y., Zhang, J.-S., 2015a. MAOHUZI6/ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE2 Regulate Ethylene Response of Roots and Coleoptiles and Negatively Affect Salt Tolerance in Rice. Plant Physiology 169, 148–165. https://doi.org/10.1104/pp.15.00353
Yang, G., Chen, S., Wang, S., Liu, G., Li, H., Huang, H., Jiang, J., 2015b. BpGH3.5, an early auxin-response gene, regulates root elongation in Betula platyphylla × Betula pendula. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 120, 239–250. https://doi.org/10.1007/s11240-014-0599-9
Yang, L., Wen, K.-S., Ruan, X., Zhao, Y.-X., Wei, F., Wang, Q., 2018. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. Molecules 23, 762. https://doi.org/10.3390/molecules23040762
Yazdanpour, F., Khadivi, A., Etemadi-Khah, A., 2018. Phenotypic characterization of black raspberry to select the promising genotypes. Scientia Horticulturae 235, 95–105. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.071
Ye, B.-B., Shang, G.-D., Pan, Y., Xu, Z.-G., Zhou, C.-M., Mao, Y.-B., Bao, N., Sun, L., Xu, T., Wang, J.-W., 2020. AP2/ERF Transcription Factors Integrate Age and Wound Signals for Root Regeneration. The Plant Cell 32, 226–241. https://doi.org/10.1105/tpc.19.00378
Yoshida, T., Obata, T., Feil, R., Lunn, J.E., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Fernie, A.R., 2019. The Role of Abscisic Acid Signaling in Maintaining the Metabolic Balance Required for Arabidopsis Growth under Nonstress Conditions. The Plant Cell 31, 84–105. https://doi.org/10.1105/tpc.18.00766
Yu, J., Liu, W., Liu, J., Qin, P., Xu, L., 2017. Auxin Control of Root Organogenesis from Callus in Tissue Culture. Frontiers in Plant Science 8. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01385
Yu, S., Bekkering, C.S., Tian, L., 2021. Metabolic engineering in woody plants: challenges, advances, and opportunities. aBIOTECH 2, 299–313. https://doi.org/10.1007/s42994-021-00054-1
Yu, S., Cao, L., Zhou, C.-M., Zhang, T.-Q., Lian, H., Sun, Y., Wu, J., Huang, J., Wang, G., Wang, J.-W., 2013. Sugar is an endogenous cue for juvenile-to-adult phase transition in plants. eLife 2. https://doi.org/10.7554/eLife.00269
Yu, S., Galvão, V.C., Zhang, Y.-C., Horrer, D., Zhang, T.-Q., Hao, Y.-H., Feng, Y.-Q., Wang, S., Schmid, M., Wang, J.-W., 2012. Gibberellin Regulates the Arabidopsis Floral Transition through miR156-Targeted SQUAMOSA PROMOTER BINDING–LIKE Transcription Factors. The Plant Cell 24, 3320–3332. https://doi.org/10.1105/tpc.112.101014
Yu, S., Wang, J.-W., 2020. The Crosstalk between MicroRNAs and Gibberellin Signaling in Plants. Plant and Cell Physiology 61, 1880–1890. https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa079
Yun, F., Liu, H., Deng, Y., Hou, X., Liao, W., 2023. The Role of Light-Regulated Auxin Signaling in Root Development. International Journal of Molecular Sciences 24, 5253. https://doi.org/10.3390/ijms24065253
Yurkewich, J.I., Castaño, C., Colinas, C., 2017. Chestnut Red Stain: Identification of the fungi associated with the costly discolouration of Castanea sativa. Forest Pathology 47, e12335. https://doi.org/10.1111/efp.12335

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Zhai, S., Cai, W., Xiang, Z.-X., Chen, C.-Y., Lu, Y.-T., Yuan, T.-T., 2021. PIN3-mediated auxin transport contributes to blue light-induced adventitious root formation in Arabidopsis. Plant Science 312, 111044. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.111044

Zhang, J., Zhou, T., Zhang, C., Zheng, W., Li, J., Jiang, W., Xiao, C., Wei, D., Yang, C., Xu, R., Gong, A., Bi, Y., 2021a. Gibberellin disturbs the balance of endogenesis hormones and inhibits adventitious root development of Pseudostellaria heterophylla through regulating gene expression related to hormone synthesis. Saudi Journal of Biological Sciences 28, 135–147. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.022

Zhang, T.Q., Lian, H., Tang, H., Dolezal, K., Zhou, C.M., Yu, S., Chen, J.H., Chen, Q., Liu, H., Ljung, K., Wang, J.W., 2015. An Intrinsic MicroRNA Timer Regulates Progressive Decline in Shoot Regenerative Capacity in Plants. The Plant Cell 27, 349. https://doi.org/10.1105/TPC.114.135186

Zhang, Wang, L., Qi, B., Zhao, B., Ko, E.E., Riggan, N.D., Chin, K., Qiao, H., 2017. EIN2 mediates direct regulation of histone acetylation in the ethylene response. Proceedings of the National Academy of Sciences 114, 10274–10279. https://doi.org/10.1073/pnas.1707937114

Zhang, X., Khan, A., Zhou, R., Liu, Y., Zhang, B., Wang, Q., Zhang, Z., 2022. Grafting in cotton: A mechanistic approach for stress tolerance and sustainable development. Industrial Crops and Products 175, 114227. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114227

Zhang, X.P., Ma, C.X., Sun, L.R., Hao, F.S., 2020a. Roles and mechanisms of Ca 2+ in regulating primary root growth of plants. Plant Signaling & Behavior 15, 1748283. https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1748283

Zhang, Y., Li, Z., Ma, B., Hou, Q., Wan, X., 2020b. Phylogeny and Functions of LOB Domain Proteins in Plants. International Journal of Molecular Sciences 21, 2278. https://doi.org/10.3390/ijms21072278

Zhang, Z., Wang, H., Wang, Y., Xi, F., Wang, H., Kohnen, M. V., Gao, P., Wei, W., Chen, K., Liu, X., Gao, Y., Han, X., Hu, K., Zhang, H., Zhu, Q., Zheng, Y., Liu, B., Ahmad, A., Hsu, Y., Jacobsen, S.E., Gu, L., 2021b. Whole-genome characterization of chronological age-associated changes in methylome and circular RNAs in moso bamboo (Phyllostachys edulis) from vegetative to floral growth. The Plant Journal 106, 435–453. https://doi.org/10.1111/tpj.15174

Zhao, S., Zhao, X., Xu, X., Han, Z., Qiu, C., 2022a. Transcription Factor IAA27 Positively Regulates P Uptake through Promoted Adventitious Root Development in Apple Plants. International Journal of Molecular Sciences 23, 14029. https://doi.org/10.3390/ijms232214029

Zhao, Y., Chen, Y., Jiang, C., Lu, M.-Z., Zhang, J., 2022b. Exogenous hormones supplementation improve adventitious root formation in woody plants. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 10. https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1009531

Zhao, Y., Cheng, S., Song, Y., Huang, Y., Zhou, S., Liu, X., Zhou, D.-X., 2015. The Interaction between Rice ERF3 and WOX11 Promotes Crown Root Development by Regulating Gene Expression Involved in Cytokinin Signaling. The Plant Cell 27, 2469–2483. https://doi.org/10.1105/tpc.15.00227

Zhong, R., Cui, D., Ye, Z., 2019. Secondary cell wall biosynthesis. New Phytologist 221, 1703–1723. https://doi.org/10.1111/nph.15537

Zhou, B., Luo, Q., Shen, Y., Wei, L., Song, X., Liao, H., Ni, L., Shen, T., Du, X., Han, J., Jiang, M., Feng, S., Wu, G., 2023a. Coordinated regulation of vegetative phase change by brassinosteroids and the age pathway in Arabidopsis. Nature Communications 14,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2608. https://doi.org/10.1038/s41467-023-38207-z
Zhou, C., Zhang, L., Duan, J., Miki, B., Wu, K., 2005. HISTONE DEACETYLASE19 Is Involved in Jasmonic Acid and Ethylene Signaling of Pathogen Response in Arabidopsis. The Plant Cell 17, 1196–1204. https://doi.org/10.1105/tpc.104.028514
Zhou, J., Lee, C., Zhong, R., Ye, Z.-H., 2009. MYB58 and MYB63 Are Transcriptional Activators of the Lignin Biosynthetic Pathway during Secondary Cell Wall Formation in Arabidopsis. The Plant Cell 21, 248–266. https://doi.org/10.1105/tpc.108.063321
Zhou, Y., Pang, Z., Jia, H., Yuan, Z., Ming, R., 2023b. Responses of roots and rhizosphere of female papaya to the exogenous application of GA3. BMC Plant Biology 23, 35. https://doi.org/10.1186/s12870-022-04025-6
Zhou, Y., Tian, X., Yao, J., Zhang, Z., Wang, Y., Zhang, X., Li, W., Wu, T., Han, Z., Xu, X., Qiu, C., 2020. Morphological and photosynthetic responses differ among eight apple scion-rootstock combinations. Scientia Horticulturae 261, 108981. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108981
Zhou, Z., An, L., Sun, L., Gan, Y., 2012. ZFP5 encodes a functionally equivalent GIS protein to control trichome initiation. Plant Signaling & Behavior 7, 28–30. https://doi.org/10.4161/psb.7.1.18404
Zhu, T., Liu, B., Liu, N., Xu, J., Song, X., Li, S., Sui, S., 2022. Gibberellin-related genes regulate dwarfing mechanism in wintersweet. Frontiers in Plant Science 13. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1010896
Zhu, X., Chai, M., Li, Y., Sun, M., Zhang, J., Sun, G., Jiang, C., Shi, L., 2016. Global Transcriptome Profiling Analysis of Inhibitory Effects of Paclobutrazol on Leaf Growth in Lily (Lilium Longiflorum-Asiatic Hybrid). Frontiers in Plant Science 7. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00491
Žiauka, J., Kuusienė, S., 2010. Different inhibitors of the gibberellin biosynthesis pathway elicit varied responses during in vitro culture of aspen (Populus tremula L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 102, 221–228. https://doi.org/10.1007/s11240-010-9725-5
Zilkah, S., Zamiri, N., Ziv, M., 2006. Putrescine and hydrogen peroxide improve the rooting of «GF-677» rootstock in woody cuttings and tissue culture shoots. Acta Horticulturae 331–337. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.713.48

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Táboa S. 1. Descrición dos datos brutos obtidos dos experimentos de secuenciación, onde XB é o número de xigabytes e os PARES DE BASES é o número medio de pares de bases de cada lectura.

LIÑA	TRATAMENTO	XB	LECTURAS	PARES DE BASES	% MAPEADO	Q SCORE
Rb	T0	2,1	3418512	512	76,3	9,3
Rb	W24	2,5	4134947	623	91,1	9,1
Rb	W48	2,4	4098873	601	84,3	9,2
Rb	W72	1,9	2835650	600	89,1	9,2
Rb	IBA24	2,5	4008395	648	78,3	9,4
Rb	IBA48	2,6	4350915	620	75,4	9,1
Rb	IBA72	2,2	4590144	580	77,8	8,7
Rb	IBAGA 24	3,6	5827935	687	87,2	9,3
Rb	IBAGA 48	3	4809122	713	81,8	9,1
Rb	IBAGA 72	2,8	5194825	598	79,3	8,2
Rb	PBZ 24	3,6	5998124	514	88,8	9,1
Rb	PBZ 48	3,5	5223626	600	83,2	9,7
Rb	PBZ 72	3,9	5719723	603	81,1	9,3
C	W	2,3	4824620	581	79,2	9,1
C	WIBA	3,1	5069656	563	81,4	8,8
C	STS	2,7	5251432	478	78,4	9,2
C	STSIBA	3	6779104	464	80,1	9,2

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

LISTAXE DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTACIÓN DO CONO DE XUVENILIDADE, ONDE AS ZONAS BAIXAS SON MÁIS XUVENÍS E SON MÁIS MADURAS CONFORME SE VAN ACHEGANDO Á COPA. 40
FIGURA 2. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DO PROCESO DE ENRAIZAMENTO DO CASTIÑEIRO, ONDE OS REBENTOS SE INCUBAN CO TRATAMENTO DURANTE CINCO DÍAS EN ESCURIDADE ANTES DE SEREN TRANSFERIDOS A MEDIO SEN HORMONAS E CONDICIÓNS NORMAIS DE LUZ. 61
FIGURA 3. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DO MATERIAL RECOLLIDO PARA AS ANÁLISES MOLECULARES. OS R ARRODEADOS INDICAN O PUNTO TEMPORAL NO QUE SE FIXERON AS RECOLLEITAS DOS TRATAMENTOS ESPECIFICADOS NOS CADROS..... 66
FIGURA 4. EXEMPLO DUN XEL DE AGAROSA NO QUE SE COMPROBARON OS CEBADORES RECIBIDOS. 72
FIGURA 5. REBENTOS MULTIPLICADOS DE CASTIÑEIRO E BIDUEIRO EN CM (A, E), M1 (B, F), M2 (C, G) E M3 (D, H) 80
FIGURA 6. LONXITUDE MEDIA DOS REBENTOS (EN CM) EN CASTIÑEIRO E BIDUEIRO DEPENDENDO DO MEDIO DE CULTIVO. AS LETRAS INDICAN DIFERENZAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (P-VALOR < 0,001) DENTRO DE CADA ESPECIE..... 81
FIGURA 7. PORCENTAXE DE ENRAIZAMENTO DE CASTIÑEIRO E BIDUEIRO EN FUNCIÓN DO MEDIO DE ENRAIZAMENTO. AS LETRAS INDICAN DIFERENZAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (P VALOR < 0,001) DENTRO DE CADA ESPECIE. ... 82
FIGURA 8. REBENTOS DE P2RB ENRAIZADOS EN CONDICIÓNS CRECENTES DE AUXINAS..... 83
FIGURA 9. PORCENTAXE DE ENRAIZAMENTO (ESQUERDA) E DE CALO (DEREITA) NOS REBENTOS DE P2RB E P2C. AS LETRAS INDICAN DIFERENCIAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (P-VALOR < 0,05). 84
FIGURA 10. PORCENTAXE DE REBENTOS NECROSADOS (ESCALA ESQUERDA) E DE REBENTOS QUE RETOMARON O CRECEMENTO (ESCALA DEREITA) DE P2C E P2RB. AS LETRAS INDICAN DIFERENCIAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (P-VALOR < 0,05). 84
FIGURA 11. ESQUERDA: REBENTO DE P2RB TRALA INHIBICIÓN DO TRANSPORTE POLAR DE AUXINAS. DEREITA: CINÉTICA DO ENRAIZAMENTO DE P2RB TRALO TRATAMENTO CON AIB, AIB + NPA 100 E AIB + NPA 200..... 85
FIGURA 12. REBENTOS DE P2RB ENRAIZADOS CON AIB (A), AIB + GA (B) E PBZ SEN AUXINAS (C)..... 86
FIGURA 13. TAXA DE ENRAIZAMENTO DE P2RB TRALOS TRATAMENTOS QUE AUMENTAN OU INHIBEN AS XIBERELINAS. AS LETRAS INDICAN DIFERENCIAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (P-VALOR < 0,05). 87
FIGURA 14. LONXITUDE DAS RAÍCES (A) E NÚMERO DE RAÍCES FORMADAS (B) EN P2RB TRALOS TRATAMENTOS QUE AUMENTAN OU INHIBEN AS XIBERELINAS. AS LETRAS INDICAN DIFERENCIAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (P-VALOR < 0,05). 88
FIGURA 15. REBENTOS DE P2RB (ARRIBA) E P2C (ABAIXO) AO SEREN ENRAIZADOS CON AIB, AIB + ACC E AIB + NITRATO DE PRATA. 88
FIGURA 16. PORCENTAXE DE ENRAIZAMENTO (I), NÚMERO DE RAÍCES (II) E LONXITUDE DAS RAÍCES, EN CM (III) DE REBENTOS DE P2RB E P2C. AS LETRAS INDICAN DIFERENZAS ESTATÍSTICAS DENTRO DE CADA LIÑA (P-VALOR < 0,05). 89
FIGURA 17. EXEMPLO DUN REBENTO DE P2RB ENRAIZADO CON H_2O_2 (ESQUERDA) E A PORCENTAXE DE ENRAIZAMENTO (DEREITA) DOS TRATAMENTOS CON H_2O_2 E H_2O_2 + AIB. AS LETRAS MAIÚSCULAS INDICAN DIFERENZAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE OS TRATAMENTOS E AS LETRAS MINÚSCULAS DIFERENZAS ESTATÍSTICAS DENTRO DE CADA PUNTO TEMPORAL..... 90
FIGURA 18. EXEMPLO DE REBENTO ENRAIZADO CON 3,4-MDPUS (ESQUERDA) E PORCENTAXE DE NECROSE (BARRAS) E RE-EMPRENDEMENTO DO CRECEMENTO (PUNTOS VERMELLOS) DOS REBENTOS DE P2C E SAÍNZA (GRÁFICA). AS LETRAS INDICAN DIFERENZAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS DENTRO DE CADA LIÑA (P < 0,05). 92
FIGURA 19. ESQUERDA: FOTO DUN REBENTO DE P2C ENRAIZADO CON CHARKOR E AIB. DEREITA: PORCENTAXE DE ENRAIZAMENTO DOS REBENTOS DE P2RB E P2C. AS LETRAS INDICAN DIFERENZAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS DENTRO DE CADA LIÑA (P-VALOR < 0,05). 93

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FIGURA 20. NÚMERO DE RAÍCES FORMADAS (ESQUERDA) E LONXITUDE DAS RAÍCES (DEREITA) EN P2RB E P2C TRALOS TRATAMENTOS CON AIB CON E SEN CHARKOR. AS LETRAS INDICAN DIFERENCIAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS EN CADA LIÑA (P-VALOR < 0,05). 93
FIGURA 21. NÚMERO DE XENES SOBRE-EXPRESADOS NO TRATAMENTO E NO CONTROL NOS EXPERIMENTOS DE TRANSCRITÓMICA REALIZADOS. 95
FIGURA 22. GRÁFICOS ASOCIADOS AOS RESULTADOS OBTIDOS DA COMPARACIÓN ENTRE O TEMPO 0 (T0) E OS TRATAMENTOS DE CORTE. A) GRÁFICO MA, B) GRÁFICO PCA, C) VOLCANO PLOT E D) MAPA DE CALOR COS 25 XENES CON MAIOR TAXA DE CAMBIO. 97
FIGURA 23. GRÁFICOS ASOCIADOS AOS RESULTADOS OBTIDOS DA COMPARACIÓN ENTRE O TRATAMENTO DE CORTE ANTES DO CAMBIO DE FASE (W48) E DESPOIS DO CAMBIO DE FASE (W). A) GRÁFICO MA, B) GRÁFICO PCA E C) VOLCANO PLOT. 98
FIGURA 24. GRÁFICOS ASOCIADOS AOS RESULTADOS OBTIDOS DA COMPARACIÓN ENTRE AS RESPOSTAS AO TRATAMENTOS DE CORTE EN P2RB E P2C. MAPA DE CALOR COS 25 XENES CON MAIOR TAXA DE CAMBIO ANTES (A) E DESPOIS (B) DO CAMBIO DE FASE. 99
FIGURA 25. GRÁFICOS ASOCIADOS AOS RESULTADOS OBTIDOS DA COMPARACIÓN ENTRE OS TRATAMENTOS DE CORTE E OS TRATAMENTOS CON AIB. A) GRÁFICO MA, B) GRÁFICO PCA, C) VOLCANO PLOT E D) MAPA DE CALOR COS 25 XENES CON MAIOR TAXA DE CAMBIO. 101
FIGURA 26. GRÁFICOS ASOCIADOS AOS RESULTADOS OBTIDOS DA COMPARACIÓN ENTRE OS TRATAMENTOS DE CORTE E OS TRATAMENTOS CON PBZ. A) GRÁFICO MA, B) GRÁFICO PCA, C) VOLCANO PLOT E D) MAPA DE CALOR COS 25 XENES CON MAIOR TAXA DE CAMBIO. 102
FIGURA 27. GRÁFICOS ASOCIADOS AOS RESULTADOS OBTIDOS DA COMPARACIÓN ENTRE OS TRATAMENTOS DE AIB CON E SEN PRE-TRATAMENTO DE STS. A) GRÁFICO MA, B) GRÁFICO PCA, C) VOLCANO PLOT E D) MAPA DE CALOR COS 25 XENES CON MAIOR TAXA DE CAMBIO. 102
FIGURA 28. GRÁFICOS ASOCIADOS AOS RESULTADOS OBTIDOS DA COMPARACIÓN ENTRE OS TRATAMENTOS DE AIB CON E SEN XIBERELINAS. A) GRÁFICO MA, B) GRÁFICO PCA, C) VOLCANO PLOT E D) MAPA DE CALOR COS 25 XENES CON MAIOR TAXA DE CAMBIO. 104
FIGURA 29. GRÁFICOS ASOCIADOS AOS RESULTADOS OBTIDOS DA COMPARACIÓN ENTRE OS TRATAMENTOS DE AIB E OS TRATAMENTOS CON PBZ. A) GRÁFICO MA, B) GRÁFICO PCA E C) VOLCANO PLOT. 105
FIGURA 30. GRÁFICOS ASOCIADOS AOS RESULTADOS OBTIDOS DA COMPARACIÓN ENTRE OS TRATAMENTOS DE CORTE E OS TRATAMENTOS CON PBZ. MAPA DE CALOR COS 25 XENES CON MAIOR TAXA DE CAMBIO NO TRATAMENTO DE PBZ CON RESPECTO AO AIB (A) E AIB CON RESPECTO AO PBZ (B). 106
FIGURA 31. MAPA DE CALOR COS 25 XENES CON MAIOR TAXA DE CAMBIO DO TRATAMENTO DE CORTE CON RESPECTO AO TRATAMENTO CON PBZ. 107
FIGURA 32. GRÁFICOS ASOCIADOS AOS RESULTADOS OBTIDOS DA COMPARACIÓN ENTRE OS TRATAMENTOS DE STS E O CONTROL, OS REBENTOS QUE SÓ SUFRIRON CORTE. A) GRÁFICO MA, B) GRÁFICO PCA, C) VOLCANO PLOT E D) MAPA DE CALOR COS 25 XENES CON MAIOR TAXA DE CAMBIO. 109
FIGURA 33. GRÁFICOS ASOCIADOS AOS RESULTADOS OBTIDOS DA COMPARACIÓN ENTRE OS TRATAMENTOS DE CORTE E OS TRATAMENTOS CON PBZ. A) GRÁFICO MA, B) GRÁFICO PCA, C) VOLCANO PLOT E D) MAPA DE CALOR COS 25 XENES CON MAIOR TAXA DE CAMBIO. 110
FIGURA 34. NÚMERO DE COUNTS OBTIDOS NOS EXPERIMENTOS DE TRANSCRITÓMICA EN FUNCIÓN DO REPLICADO E TRATAMENTO PARA OS XENES SELECCIONADOS. 111
FIGURA 35. LOGARITMO BINARIO DA TAXA DE CAMBIO NA EXPRESIÓN DO XENE CS22D (ESQUERDA) E CSLOB16 (DEREITA). AS LETRAS MAIÚSCULAS INDICAN DIFERENZAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS DO PUNTO TEMPORAL E AS MINÚSCULAS AS DIFERENZAS ENTRE OS TRATAMENTOS DENTRO DE CADA TEMPO. 112
FIGURA 36. LOGARITMO BINARIO DA TAXA DE CAMBIO NA EXPRESIÓN DO XENE CSGID1B (ESQUERDA) E CSGID2 (DEREITA). AS LETRAS MAIÚSCULAS INDICAN DIFERENZAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS DO PUNTO TEMPORAL E AS MINÚSCULAS AS DIFERENZAS ENTRE OS TRATAMENTOS DENTRO DE CADA TEMPO. 112
FIGURA 37. LOGARITMO BINARIO DA TAXA DE CAMBIO NA EXPRESIÓN DO XENE CSRAP2.3. AS LETRAS MAIÚSCULAS INDICAN DIFERENZAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS DO PUNTO TEMPORAL E AS MINÚSCULAS AS DIFERENZAS ENTRE OS TRATAMENTOS DENTRO DE CADA TEMPO. 113
FIGURA 38. NÚMERO DE COUNTS OBTIDOS NOS EXPERIMENTOS DE TRANSCRITÓMICA EN FUNCIÓN DO REPLICADO E TRATAMENTO PARA OS XENES SELECCIONADOS. 113

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FIGURA 39. LOGARITMO BINARIO DA TAXA DE CAMBIO NA EXPRESIÓN DO XENE CSACS-LIKE (A) E CSACO1-LIKE (B). AS LETRAS INDICAN DIFERENZAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE AS MOSTRAS (P-VALOR < 0,05). 114
FIGURA 40. LOGARITMO BINARIO DA TAXA DE CAMBIO NA EXPRESIÓN DO XENE CSEIN2 (A), CSERF3 (B) E CSRAP2.12 (C). AS LETRAS INDICAN DIFERENZAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE AS MOSTRAS (P-VALOR < 0,05). 115
FIGURA 41. LOGARITMO BINARIO DA TAXA DE CAMBIO NA EXPRESIÓN DO XENE CSPIN1 (A) E CSIAA29 (B). AS LETRAS INDICAN DIFERENZAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE AS MOSTRAS (P-VALOR < 0,05). 115
FIGURA 42. LOGARITMO BINARIO DA TAXA DE CAMBIO NA EXPRESIÓN DO XENE CSHDA14 (A) E CSJMJ30 (B). AS LETRAS INDICAN DIFERENZAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE AS MOSTRAS (P-VALOR < 0,05). 116
FIGURA 43. GRÁFICO DE CORRELACIÓN ENTRE AS TAXAS DE CAMBIO PREDITAS POLA TRANSCRITÓMICA E AS OBTIDAS NA QPCR. 116

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

LISTAXE DE TÁBOAS

TÁBOA 1. COMPOSICIÓN DOS MEDIOS DE CULTIVO. 60
TÁBOA 2. TRATAMENTOS DE ENRAIZAMENTO PARA A ANÁLISE DO EFECTO DAS XIBERELINAS. 63
TÁBOA 3. CEBADORES UTILIZADOS PARA AS QPCR. 71
TÁBOA 4. COMPOSICIÓN E PREZOS DOS MEDIOS DE CULTIVO. 79
TÁBOA 5. EFECTO DA FONTE DE CARBONO E DO AXENTE XELIFICANTE NA PROLIFERACIÓN DE REBENTOS. AS LETRAS INDICAN DIFERENZAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (P-VALOR < 0,001). 81
TÁBOA 6. EFECTO DA FONTE DE CARBONO E DO AXENTE XELIFICANTE NO ENRAIZAMENTO DE REBENTOS. AS LETRAS INDICAN DIFERENZAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (P-VALOR < 0,001). 82
TÁBOA 7. EFECTO DA CONCENTRACIÓN DE AIB NO ENRAIZAMENTO 84
TÁBOA 8. EFECTO FENOTÍPICO DA CONCENTRACIÓN DE INHIBICIÓN DO TRANSPORTE POLAR DE AUXINAS NO ENRAIZAMENTO (ESQUERDA). CINÉTICA DO ENRAIZAMENTO CON DIFERENTES CONCENTRACIÓNS DE NPA (DEREITA). AS LETRAS INDICAN DIFERENCIAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (P-VALOR < 0,05). 85
TÁBOA 9. EFECTO DAS XIBERELINAS NO ENRAIZAMENTO ADVENTICIO. LETRAS INDICAN DIFERENCIAS ESTATISTICAS. 87
TÁBOA 10. EFECTO DO ETILENO NO ENRAIZAMENTO ADVENTICIO. AS LETRAS INDICAN DIFERENZAS ESTATÍSTICAS (P-VALOR < 0,05) 89
TÁBOA 11. EFECTO DO H_2O_2 NO ENRAIZAMENTO DE P2RB. LETRAS INDICAN DIFERENZAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS 90
TÁBOA 12 EFECTO DA 3,4-MDPU NO ENRAIZAMENTO ADVENTICIO. LETRAS DIFERENTES INDICAN DIFERENZAS ESTATÍSTICAS. 91
TÁBOA 13. EFECTO DA DIMINUCIÓN DO CALCIO NO ENRAIZAMENTO ADVENTICIO DE P2C. LETRAS INDICAN DIFERENZAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS. 92
TÁBOA 14. EFECTOS DO CHARKOR NO ENRAIZAMENTO ADVENTICIO. AS LETRAS INDICAN DIFERENZAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (P-VALOR < 0,05). 93
TÁBOA 15. RESUMO DOS TRATAMENTOS E A LIÑA NA QUE SE APLICOU CADA UN. O "+" INDICA UNHA PROMOCIÓN DA VARIÁBEL ESTUDADA, O "-" UNHA INHIBICIÓN E O "0" UNHA FALTA DE CAMBIO NO PARÁMETRO. 94

TÁBOA S. 1. DESCRICIÓN DOS DATOS BRUTOS OBTIDOS DOS EXPERIMENTOS DE SECUENCIACIÓN 193

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RELACIÓN DE PUBLICACIÓNS

Neste apartado lístanse, na orde descrita: a relación de publicacións reproducidas total ou parcialmente no corpo da tese, as publicacións en revisión e preparación, o permiso explícito das revistas para a reprodución de contido e as aportacións a congresos derivadas da investigación da tese.

Publicacións reproducidas parcialmente no corpo da presente tese:

Effects of auxin and urea derivatives on adventitious rooting in chestnut and oak microshoots

Jesús M. Vielba[a], Nieves Vidal[a], Ada Ricci[b], Ricardo Castro[a], Purificación Covelo[a], M. Carmen San-Jose[c] and Conchi Sanchez[a]

a BEL Group, Department of Plant Physiology, Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas (IIAG-CSIC), Santiago de Compostela, Spain;
b Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità Ambientale. Unità di Biologia Evolutiva e Funzionale, Università de Parma, Parma, Italy;
c BMF Group, Department of Plant Physiology, Instituto de Investigaciones Agrobiologicas de Galicia, Avda de Vigo s/n, Santiago de Compostela, A Coruña, 15705, Spain

Israel Journal of Plant Sciences (**2020**). BRILL
ISSN: 2223-8980
JCR IF: 1. Quartile Q4. (Plant Science)
SJR index: 0.287. Quartile: Q3. (Plant Science)
http://dx.doi.org/10.1163/22238980-20191113

Contribución de Ricardo Castro: Realización dos enraizamentos e toma de datos.

Reducing costs, improving profits: A low-cost culture media for woody plants micropropagation

Ricardo Castro-Camba[a], Jesús Mª Vielba[a], Purificación Covelo[a], Nieves Vidal[a], Conchi Sánchez[a]

a Plant Production Department, Misión Biológica de Galicia, Spanish National Research Council, Santiago de Compostela, CP-15780, Spain

Journal of Forest Science (**2023**). Czech Academy of Agricultural Sciences
ISSN: 1212-4834
Factores de impacto (en 2022)
JCR IF: 1.1. Quartile Q3.
SJR index: 0.288. Quartile: Q2. (Forestry)
https://doi.org/10.17221/56/2023-JFS

Contribución de Ricardo Castro: Conceptualización, realización dos experimentos, toma de datos, análise estatística, visualización e escritura do manuscrito.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Información ORCID do autor e os demais coautores:
Ricardo Castro-Camba: 0000-0003-1525-935X
Jesús María Vielba: 0000-0003-1367-535X
Conchi Sánchez: 0000-0002-1304-0736
Nieves Vidal: 0000-0001-8046-3133
Purificación Covelo: 0000-0002-0358-6487
Ada Ricci: 0000-0003-1765-8709

Comunicacións a congresos derivadas da tese:

[2019] Vielba, J.[a]; Vidal, N.[a]; Ricci, A.[b]; Castro, R.[a]; Covelo, P.[a]; San-Jose, M. C.[c]; Sanchez, C.[a]. Efecto de la concentración de auxina y de la presencia de derivados de las difenilureas en el enraizamiento adventicio de brotes de castaño y roble.

XIII Reunión de la SECIVTV. 11-13 de setembro de 2019.

a BEL Group, Department of Plant Physiology, Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas (IIAG-CSIC), Santiago de Compostela, Spain;
b Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità Ambientale. Unità di Biologia Evolutiva e Funzionale, Università de Parma, Parma, Italy;
c BMF Group, Department of Plant Physiology, Instituto de Investigaciones Agrobiologicas de Galicia, Avda de Vigo s/n, Santiago de Compostela, A Coruña, 15705, Spain

[2021] Castro-Camba, R.[a]; Vielba, J.[a]; Covelo, P.[a]; Vidal, N.[a]; Sanchez, C.[a]. Effect of auxin and its polar transport inhibitor on adventitious rooting of chestnut microshoots.

11th Symposium of the International Society of Root Research. 24-28 de maio de 2021.

a BEL Group, Department of Plant Physiology, Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas (IIAG-CSIC), Santiago de Compostela, Spain;

[2021] Castro-Camba, R.[a]; Vielba, J.[a]; Vidal, N.[a]; Sanchez, C.[a]. Reducir costes, incrementar beneficios: desarrollo de un protocolo de bajo coste para la micropropagación de castaño.

XIV REUNIÓN SECIVTV. 8-10 de setembro de 2021.

a BEL Group, Department of Plant Physiology, Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas (IIAG-CSIC), Santiago de Compostela, Spain;

[2023] Vielba, J. M.[a], Vidal, N.[a], Rico, S.[a], Covelo, P.[a], Castro-Camba, R.[a], Cernadas, M. J.[a], Sánchez, C.[a]. Biotechnological approaches to overcome adventitious rooting recalcitrance in mature trees of Fagaceae species.

Copytree COST action. 17-18 de abril de 2023.

a Dept. of Plant Production, Misión Biológica de Galicia, Sede Santiago de Compostela, CSIC, Avda de Vigo s/n, 15705, Santiago de Compostela

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de: **rights** <rights@brill.com>
para: R C <ricardo.castro.mgb@gmail.com>, rights <rights@brill.com>
data: 27 de xul. de 2023, 20:15
asunto: (BJ) RE: Permission thesis
enviada por: brill.com
asinada por: brill.com

Dear Ricardo Castro,

Thank you for writing. You may freely reuse the requested article in your thesis, provided that you accompany it with a citation referring to the original publication with full bibliographical details.

Please let me know if you have further questions.

With best wishes,
Brian Johnson
Rights and Permissions Department

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de: **Mgr. Ilona Procházková** <jfs@cazv.cz>
para: R C <ricardo.castro.mgb@gmail.com>
data: 7 de ago. de 2023, 15:15
asunto: RE: Permission
enviada por: cazv.cz
asinada por: cazv.cz

Dear Ricardo,

As I have just informed you in a previous e-mail, your article has just been published as Online first.

Therefore, you can cite the Online first version of your article in your Thesis. I hope this helps.

Thank you for your cooperation.

Kind regards,

Ilona

Mgr. Ilona Procházková
Executive Editor (Journal of Forest Science)

Czech Academy of Agricultural Sciences
Slezská 100/7
120 00 Prague 2
Czech Republic
Tel.: + 420 227 010 355
jfs@cazv.cz
www.cazv.cz
www.agriculturejournals.cz

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

https://doi.org/10.17221/56/2023-JFS

Reducing costs, improving profits: A low-cost culture media for woody plants micropropagation

*Ricardo Castro-Camba, Jesús María Vielba, Purificación Covelo, Nieves Vidal, Conchi Sánchez**

Plant Production Department, Misión Biológica de Galicia, Spanish National Research Council, Santiago de Compostela, Spain

**Corresponding author: conchi@mbg.csic.es*

Citation: Castro-Camba R., Vielba J.M., Covelo P., Vidal N., Sánchez C. (2023): Reducing costs, improving profits: A low-cost culture media for woody plants micropropagation. J. For. Sci.

Abstract: Micropropagation has enormous potential in the forestry industry for the mass production of elite genotypes. A limiting factor that hinders a wider adoption of this technique is its high associated cost, dissuading small producers and laboratories from its use. Thus, it is important to develop low-cost protocols to increase the competitiveness of micropropagation. The goal of the present study was to elaborate a low-cost culture medium that would allow plant growth without diminishing plant quality and production. The replacement of laboratory sucrose with commercial sugar as a carbon source, and laboratory agar with locally produced agar as a gelling agent was tested. To validate the effects of the medium for woody species micropropagation, two relevant forest species, chestnut and birch, were used and several phenotypic characteristics were recorded. Our data indicated that the substitutions made in the media composition did not alter growth or rooting parameters. Substitution of laboratory sucrose and Bacto agar by table sugar and local commercial agar provides a valuable alternative for forest species micropropagation and for increasing their potential profitability.

Keywords: birch; carbon source; chestnut; gelling agent; microshoots; woody species

The European sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) is a woody plant species widely distributed across the Mediterranean basin since the Last Glacial Maximum, during which the three large Mediterranean peninsulas (Balkan, Italian, and Iberian), the Atlantic coast of France and Spain, and the southern coast of the Black Sea acted as refugia for this species (Roces-Díaz et al. 2018). Traditional management of chestnuts has been related to a higher plant species richness (Guitián et al. 2012) and to an increase in the number of bird species (Morelli et al. 2019), among other ecological parameters. In addition to contributing to mitigating climate change through carbon sequestration (Castaño-Santamaría et al. 2013), chestnut is also a highly profitable species (Martín et al. 2012). In fact, chestnut production has an increasing economic importance (Braga et al. 2015), with the main purpose of chestnut plantations being timber production (Carbone et al. 2020). However, fruit production is also a major traditional objective of chestnut cultivation, and new

Supported by Xunta de Galicia (Spain) through the projects IN607A and 'Contrato Programa' 2021 (AGI/CSIC I + D + I 2021, Ref-ACAM 20210200033).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

© The authors. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

https://doi.org/10.17221/56/2023-JFS

advances are allowing to obtain bioactive compounds from chestnut shells, burs and leaves (Vella et al. 2018). Therefore, sustained and low-cost mass propagation of elite or plus genotypes could provide significant advantages for the chestnut-related industry.

The European white birch (*Betula pubescens*) is a short-lived tree species broadly distributed in northern and eastern Europe (Beck et al. 2016). The wood of *B. pubescens* is a very cost-effective source of pulpwood and fuel wood (Hynynen et al. 2010), although birch plantations have also been used for high-quality timber production (Cameron 1996). White birch has a high migration potential facilitating its adaptation ability to climate change conditions (Truong et al. 2007). Due to its resiliency, high productivity, wood properties and relations with the environment, *B. pubescens* is an interesting species for the forest-based industry in the context of climate change (Dubois et al. 2020). Moreover, birch also provides ecological benefits. The introduction of birches into spruce monocultures has a positive effect on avian biodiversity (Felton et al. 2011). On the other hand, birch mycorrhization is a promising technique for soil phytoremediation due to its capacity to sequestrate Mn and Zn from contaminated soils (Fernández-Fuego et al. 2017).

The potential economic market of both species, besides their biological and ecological values, demands the adoption of cost-effective methods for the mass propagation of disease-resistance and highly productive trees. *In vitro* culture techniques provide alternative tools to conventional methods of vegetative propagation for large-scale production of plants as well as for *ex vitro* conservation and long-term preservation of valuable and endangered germplasm (Singh et al. 2014; Corredoira et al. 2017). Furthermore, *de novo* regeneration protocols can be developed *in vitro* for plant improvement by genetic transformation or genome editing (Maher et al. 2020; Che et al. 2022). Micropropagation allows the rapid production of a large number of genetically uniform plants from a chosen genotype throughout the year, in a short period of time and in a reduced space. This approach has been used for the large-scale production of forest trees (Giri et al. 2004). It has a clear potential in the management and quality of forestry plantations by the propagation of trees with desired traits, the so-called *plus* genotypes (Sedjo 2001).

One of the major limiting factors for the micropropagation of woody species is their recalcitrance to *in vitro* culture, particularly at the adult stage, which hampers the mass production of proven selected genotypes. In line with this, the age-related decline in adventitious rooting capacity is a major obstacle in the vegetative propagation of adult trees, preventing the regeneration of complete plants in rooting-recalcitrant species (Legué et al. 2014; Vielba et al. 2020). Therefore, the development of optimized protocols for multiplication and adventitious rooting is mandatory.

A detailed protocol for micropropagation of basal shoots from mature trees of European chestnut through proliferation of axillary buds in semisolid medium has been previously reported (Vieitez et al. 2007). However, morphogenetic responses are highly dependent on the chestnut species and genotypes (Vielba et al. 2020). For instance, in a recent report of the micropropagation of *C. sativa* Italian cultivars, the highest rooting rate was 35% (Pavese et al. 2022). Protocols for chestnut micropropagation in liquid medium by using temporary immersion systems (TIS) have been reported in chestnut species (Vidal et al. 2015; Cuenca et al. 2017; Gago et al. 2022). Systems of this sort reduce production costs by using agar-free and low-sucrose containing media, and have proven efficient for chestnut proliferation and rooting (Gago et al. 2022). However, the best rooting rates were achieved with the highest concentration of sucrose, regardless of the genotype. Furthermore, the implementation of TIS sometimes derives in a higher rate of explant hyperhydricity, besides the requirements for a more specific equipment needed for CO_2 enriched air supply. Micropropagation of birch species from juvenile and mature trees has been previously reported (Chalupa 1981; Welander 1993; Covelo et al. 2019). Micropropagated birch plantlets from mature trees were used in commercial production and tested in the field (Meier-Dinkel 1992; Jones et al. 1996; Viherä-Aarnio, Velling 2001), but for different reasons their commercial use ended unprofitable (Häggman et al. 2007).

Besides biological constraints, other economic reasons prevent the application of micropropagation techniques to a higher number of species. The high costs associated with *in vitro* culture techniques (Kodym, Zapata-Arias 2001), which include equipment, infrastructure, loss of plants during acclimatization to *ex vitro* conditions, etc.,

https://doi.org/10.17221/56/2023-JFS

discourage many companies and laboratories from using these methods to produce plants, particularly in developing countries. The main goal of commercial laboratories is to maximize benefits with minimal investment (at minimum cost). Therefore, a challenge for making profitable *in vitro* production of plants is to decrease their final cost, which will also improve the resilience of laboratories during economic recessions, when cuts in budgets are the rule in most countries (Pellens et al. 2018; Ahmad et al. 2022).

Although there are fixed expenses in micropropagation which are difficult to reduce, looking for more affordable consumable products could be an easy and fast strategy to improve the competitiveness of *in vitro* culture. Local available commercial agar (LC agar) and table/market sugar (commercial white sugar) can be used instead of Difco agar and laboratory sucrose (lab-sucrose), respectively, in order to validate their suitability as reagents in the semisolid media for proliferation and rooting of profitable woody species. Theoretically, commercial white sugar could be used as a carbon source without any negative effect on micropropagation since it has a content in pure sucrose equal to or higher than 99.5%, as defined by several European laws (Directive 2001/111/EC of the Council of the European Union of 20 December 2001; Regulation (EU) No. 1308/2013 of the European Parliament and of the Council of 17 December 2013). This replacement could reduce production costs, increasing the profitability of large-scale micropropagation and facilitating the use of *in vitro* culture techniques in companies and developing countries. Locally produced agar obtained from the waste of food industries, like those producing algae for human consumption, can lead to the harnessing of the complete product, reducing the generation of by-products, algae overexploitation and representing another source of profit for this industry. Moreover, the use of locally produced agar strengthens supply chains and allows more advantageous contracts with suppliers due to the lack of competitors.

In the present work, we have developed a low-cost culture medium which allows for chestnut and birch micropropagation and rooting without any loss in plant quality, making this technique more profitable for small to medium companies and developing countries, therefore improving economic, social and ecological benefits.

MATERIAL AND METHODS

Plant material and root induction. Stock shoot cultures of chestnut and birch were used in this study. Chestnut shoots were established *in vitro* from basal shoots of an 80-year-old field grown tree of chestnut *(Castanea sativa)* and cultured *in vitro* for more than 30 years. Chestnut shoots were routinely grown on GD medium (Gresshoff, Doy 1972) containing 0.075 mg·L^{-1} benzyladenine (BA), 7 g·L^{-1} Bacto agar and 30 g·L^{-1} purified sucrose (lab-sucrose). Healthy and well-formed shoots developed after a 4-week subculture cycle were either used for multiplication through the proliferation of axillary buds on fresh medium or for rooting experiments. For rooting experiments, the callus and basal leaves of shoots were removed and then shoots were placed for 5 days in root induction medium consisting of one-third strength GD macronutrients (1/3 GD), 30 g·L^{-1} sucrose, 7 g·L^{-1} Bacto agar, and 5 mg·L^{-1} indole-3-butyric acid (IBA). During this period, shoots were incubated in darkness at 24 °C, and at the end of the auxin induction period they were transferred to auxin-free medium (1/3 GD) under standard conditions for 25 days. In the case of birch (*Betula pubescens*), material derived from a monumental tree ('Piñoi') was used. Shoots were routinely cultured in MS (Murashige, Skoog 1962) medium with modified vitamins, supplemented with 10 mg·L^{-1} Fe-EDTA, 10 mg·L^{-1} ascorbic acid, 10 mg·L^{-1} citric acid, 1 mg·L^{-1} folic acid, 0.1 mg·L^{-1} naphthaleneacetic acid (NAA) and 0.4 mg·L^{-1} meta-topolin. At the end of the proliferation cycle, roots developed at the base of shoots, thus further auxin treatments for root induction were not performed in birch. In order to test the effects of the carbon source (sucrose or table sugar) and the gelling agent [Bacto agar or locally produced commercial (LC) agar], proliferation of shoots was performed in the culture medium containing (*i*) purified laboratory sucrose (lab-sucrose) purchased from Duchefa, and Bacto agar (CM medium); (*ii*) table/household sucrose and Bacto agar (M1 medium), (*iii*) lab-sucrose and LC agar (M2 medium), and (*iv*) table sucrose and LC agar (M3 medium). The composition of these media is shown in Table 1. The effects of the carbon source and gelling agent were also evaluated in the rooting media (RM) of chestnut. The agar and sucrose of the rooting media designated RM, R1, R2, and R3 correspond to those used in the MC, M1, M2, and M3 media, re-

https://doi.org/10.17221/56/2023-JFS

Table 1. Effect of the carbon source and gelling agent on the final cost of 1 L of media

Medium	Carbon source	Gelling agent	Cost (EUR)	Difference (%)
CM–RM	lab sucrose	Bacto agar	5.22	–
M1–R1	table sugar	Bacto agar	4.67	–10.54
M2–R2	lab sucrose	LC agar	1.50	–71.26
M3–R3	table sugar	LC agar	0.95	–81.80

LC – local commercial agar

spectively. The pH of the different media was adjusted to 5.6–5.7 and then autoclaved at 121 °C for 20 min.

Chestnut shoots of the clone P2 were cultured in test tubes (1 shoot per tube) with a subculture cycle of four weeks. For each treatment, there were 24 replicate tubes, and each experiment was repeated 6 times (144 shoots). Birch shoots were cultured in glass jars, seven explants per jar and with three replicates per treatment, and the experiment was repeated 3 times (63 shoots). They were subcultured every two months into fresh medium, leading to an 8-week proliferation cycle. In chestnut, rooting experiments were carried out in three glass jars with 6 explants per jar and treatment, and the experiment was repeated three times (6 explants × 3 jars × 3 repeats = 54 explants per treatment). The plants were kept in growth chambers at 25 °C and 80–90% relative humidity, under a 16-h photoperiod and with a light intensity of 90–100 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ provided by cool-white fluorescent lamps.

At the end of the 4 or 8 week proliferation cycle, the number of new shoots, the length of the longest shoot and the number of new leaves were recorded. In the rooting experiments, the following parameters were evaluated at the end of the rooting period: the percentage of rooted shoots, the average root number per rooted explant and the length of the longest root. Normality of the data was tested by Shapiro-Wilk test of normality. Homogeneity of variance was analysed by Bartlett's test, when normality of the data was proved, and Levene's test, when normality was not detected. Then, the data were analysed by ANOVA or Kruskal-Wallis test, depending on the normality. All statistical analysis were performed in R software (4.2.2, 2022).

RESULTS

Culture media cost and potential savings. Total price per litre of each medium was calculated using the average price of different trading houses (Table 1). In the case of Bacto agar, the average cost was EUR 266.92 for a 454 g container according to the prices of Midland scientific, Bacto, Fischer Scientific and VWR. Locally available commercial agar cost was EUR 11.40 for a 200 g container. On the other hand, the average cost of sucrose was EUR 19.16 per 1 kg according to the prices of Duchefa, Bacto and Fischer Scientific. Locally available table sugar cost EUR 0.67 per kg. Both elements were the most expensive compounds of the culture medium. Furthermore, potential savings with the substitution of CM with any other of the three tested media were estimated. The final cost of media prepared with any of the alternative compounds tested in the present study was markedly reduced comparing with the standard media, with the greatest savings occurring when Bacto agar was replaced by LC agar. In M3, the medium in which Bacto agar as well as lab-sucrose were replaced by the locally available substitutes, the potential savings of total cost of the medium were almost 82% (Table 1).

Calculations were performed only considering carbon source and gelling agent for two reasons: other compounds are not replaceable in culture media composition and their cost can be considered as negligible (less than EUR 0.05 per L).

Effect of the carbon source and gelling agent on the proliferation of shoots. The suitability of LC agar as a gelling agent and table sugar as a carbon source for chestnut micropropagation was tested in this investigation. To assess the shoot performance at the end of the proliferation cycle, several parameters were evaluated, including the number of shoots, the length of the longest shoot and the number of new developed leaves. No significant differences ($P \leq 0.001$) were detected for any of the evaluated parameters between the different treatments. Average shoot number ranged from 1.89 ± 0.06 (CM medium) to 1.95 ± 0.36 (M2 medium; Figure 1A), whereas average shoot length ranged from 3.07 ± 0.49 cm (CM medium) to 3.11 ± 0.22 cm (M3; Figure 1B). Regarding the

https://doi.org/10.17221/56/2023-JFS

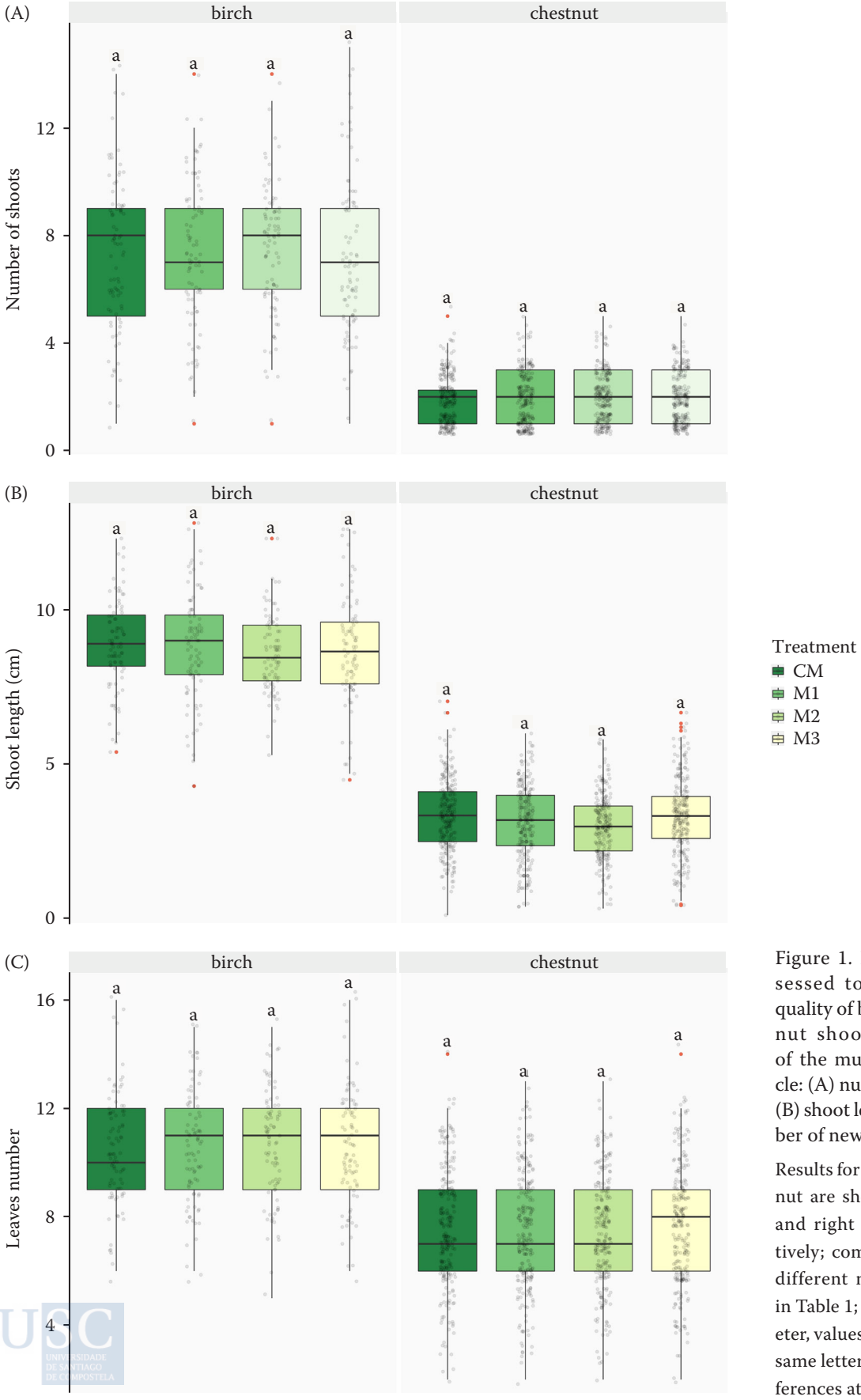


Figure 1. Parameters assessed to evaluate the quality of birch and chestnut shoots at the end of the multiplication cycle: (A) number of shoots; (B) shoot length; (C) number of new shoots

Results for birch and chestnut are shown on the left and right panels, respectively; composition of the different media is shown in Table 1; for each parameter, values followed by the same letter indicate no differences at $P \leq 0.001$

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

https://doi.org/10.17221/56/2023-JFS

average number of leaves, the data were also consistent through all the treatments, with the lowest number of leaves recorded in M2 (7.46 ± 0.31) and the highest number observed in M3 (7.65 ± 0.22; Figure 1C). In summary, CM provided the lowest number of shoots as well as the lowest size of tallest shoot, and M3 the highest number of leaves, although not statistical differences between the treatments were found.

Birch cultures were not affected by the carbon source and/or gelling agent used in culture media (Figure 1) since not statistically significant differences ($P \leq 0.001$) were detected for any of the evaluated parameters among treatments. Although the lowest number of shoots (7.19 ± 0.31) was achieved in the M3 medium, and the longest shoot (8.89 ± 0.36) was produced in the regular medium supplemented with lab agar and lab sucrose (CM), the greatest number of shoots (7.47 ± 0.25) and number of leaves (10.71 ± 0.33), were obtained in M2 and M3 medium, respectively (Figure 1A–C).

These results reinforce the hypothesis that the culture medium composition could be modified to reduce costs without any negative impact on the new shoots, maintaining their growth ability. Moreover, the overall phenotype of both chestnut and birch microshoots was not affected by the treatments, as they showed equal characteristics even when grown in different media (Figure 2).

Effect of the carbon source and gelling agent on adventitious rooting. The use of table sugar and LC agar instead of laboratory sucrose and agar in the chestnut rooting medium was investigated. Rooting percentage, the number of roots and the length of the longest root were used as parameters to determine the effect of the treatments on rooting rates (Figure 3).

Chestnut rooting rates were kept stable for all the tested treatments without significant differences ($P \leq 0.001$) for any of the evaluated parameters (Figure 3). The rooting percentage of chestnut varied between 95.83 ± 0.61 (RM and R2 medium) and 97.91 ± 0.53 (R1 and R3 medium; Figure 3A), whereas the average root number ranged from 4.14 ± 0.26 (R2 medium) to 4.33 ± 0.2 (R3 medium; Figure 3B). The longest root length varied from 4.23 ± 0.34 cm (R2 medium) to 4.55 ± 0.57 cm (R1 medium; Figure 3C). Based on the rooting



Figure 2. Shoots of chestnut (top) and birch (bottom) grown on a proliferation medium supplemented with: (A, E) laboratory sucrose and Bacto agar (CM); (B, F) table sugar and Bacto agar (M1); (C, G) laboratory sucrose and locally produced commercial agar (M2); (D, H) table sugar and locally produced commercial agar (M3)

https://doi.org/10.17221/56/2023-JFS

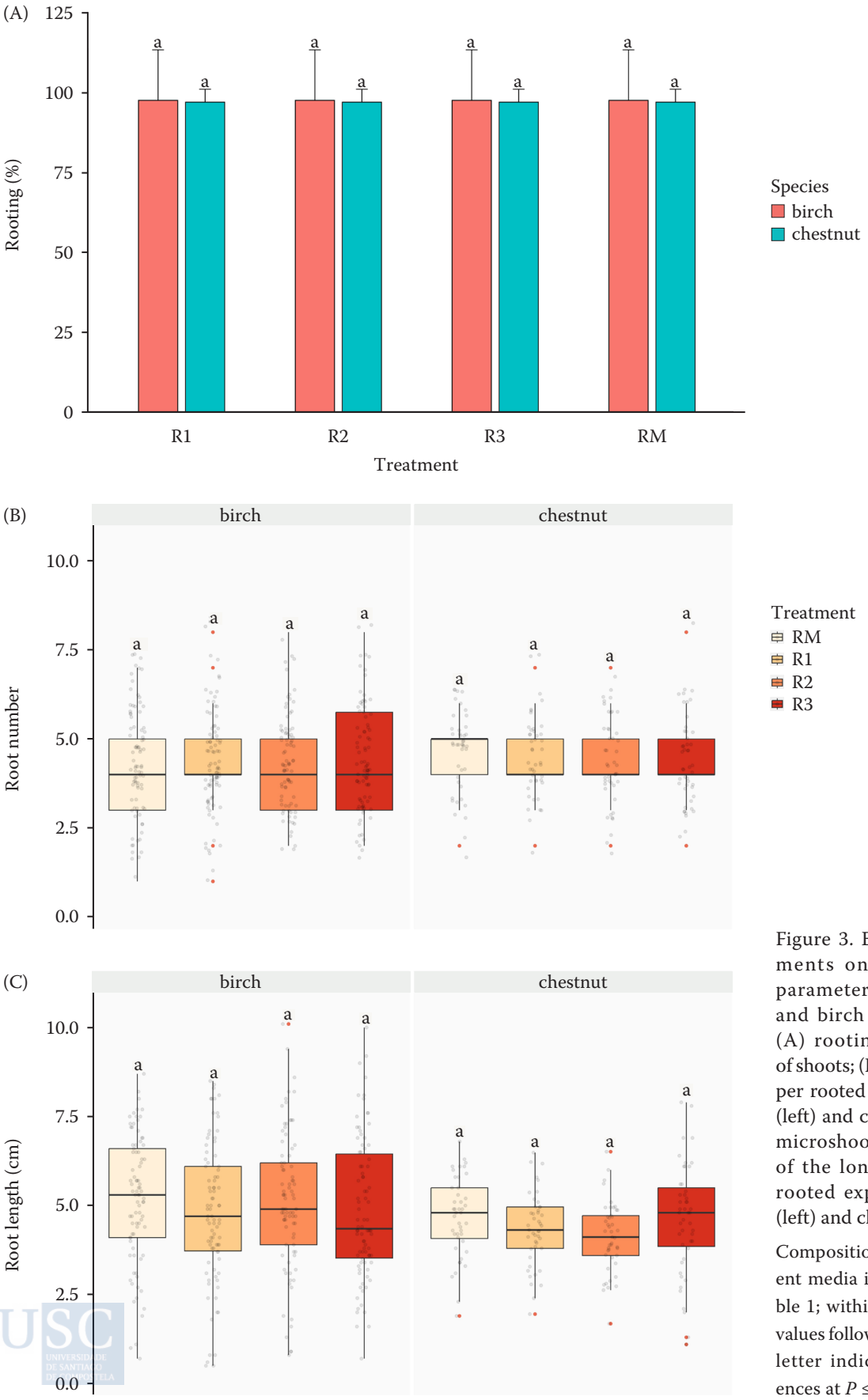


Figure 3. Effect of treatments on the rooting parameters of chestnut and birch microshoots: (A) rooting percentage of shoots; (B) root number per rooted shoot in birch (left) and chestnut (right) microshoots; (C) length of the longest root per rooted explant in birch (left) and chestnut (right)

Composition of the different media is shown in Table 1; within each species, values followed by the same letter indicate no differences at $P \leq 0.001$

https://doi.org/10.17221/56/2023-JFS

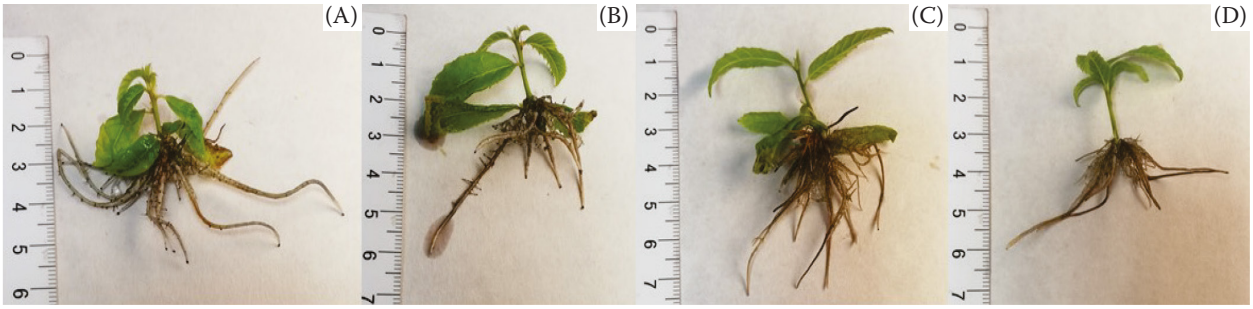


Figure 4. Rooted chestnut shoots on a medium supplemented with: (A) laboratory sucrose and Bacto agar (RM); (B) table sugar and Bacto agar (R1); (C) laboratory sucrose and locally produced commercial agar (R2); (D) table sugar and locally produced commercial agar (R3)

percentage and the root number, the medium supplemented with table sugar and LC agar provided the best results, whereas the longest root length was found in the medium containing table sugar and Bacto agar.

Birch rooting performance was evaluated at the end of the multiplication cycle, as these shoots develop adventitious roots spontaneously, probably due to the presence of NAA in the proliferation medium. Rooting percentages ranged from 96.59 ± 1.6 (CM and M2 media) to 97.91 ± 0.53 (M1 and M3 media; Figure 3A). The average root number varied between 4.19 ± 0.16 (M2 medium) and 4.33 ± 0.17 (M3 medium; Figure 3B). The values of the longest root length fluctuated between 4.69 ± 0.22 cm in M1 medium and 5.01 ± 0.31 cm in CM medium (Figure 3C). As shown in Figure 3, there are no statistically significant differences for any of the variables analysed ($P < 0.001$) in the tested rooting media.

Therefore, these results indicate that both laboratory-grade sucrose and agar could be substituted with table sugar and LC agar without any decrease in rooting percentage. As shown for chestnut (Figure 4) and birch (Figure 2E–H), the root system architecture was not affected by the different treatments.

DISCUSSION

Improving protocols for multiplication and rooting of *in vitro* cultured plants is a key step in research and micropropagation to produce low-cost plants on a large scale without compromising proliferation rates and plant quality, therefore increasing the profitability of mass production. To achieve this objective, we focused on the most expensive compounds of culture medium for which lower-cost substitutes are readily available in local markets: carbon source and gelling agent. Previous studies have shown a cost reduction that varied between 58.57%, when the laboratory agar was substituted by Isubgol and sucrose was substituted by market sugar (Agrawal et al. 2010), and 86.40% when Sago was used as gelling agent (Saraswathi et al. 2016). In our study, replacing LC sucrose with table sugar and using LC agar as gelling agent lead to significant cost savings (82%), thus achieving values close to the best alternatives previously published.

The substitution of laboratory sucrose as carbon source by commercial sugar had been previously reported in liquid medium in pineapple (Dutta et al. 2013), as well as in semi-solid media in crops like *Pogostemon cablin* (Swamy et al. 2010) and *Solanum tuberosum* (Kuria et al. 2008). However, our study is the first report on micropropagation of chestnut and birch that evaluates the effect of this switch on shoot proliferation and rooting rates. We found similar results to those obtained in previous studies in non-woody species (Demo et al. 2008; Swamy et al. 2010), with no substantial changes neither in micropropagation nor in rooting rates, maintaining explants quality and root architecture. Moreover, results found for rooting parameters in the woody species *Balanites aegyptica* and *Phyllantus emblica* (Gour, Kant 2011) also support our findings, showing that no major phenotypical effect is found when using commercial sugar.

In contrast to the easily replaceable carbon source, finding a gelling agent substitute is a more difficult task. However, there are multiple substances, particularly starch, which can be suitable substitutes for laboratory agar (Gordo et al. 2012). In our study, LC agar was used, instead of other more common substitutes such as guar gum or Isubgol, due to its low cost and availability. Moreover, in comparison

https://doi.org/10.17221/56/2023-JFS

to other potential substitutes, LC agar has a similar composition to laboratory agar, as it is also derived from the same class of algae (Rhodophyta). Studies performed in species like *Solanum tuberosum* (Kuria et al. 2008) or *Vanilla planifolia* (Mengesha et al. 2012), in which cassava and enset starch were used as gelling agents, or in *Dendrobium chrysotoxum* (Jain, Babbar 2005), *Isatis tinctorial* (Saglam, Cifici 2010) and *Nicotiana tabacum* (Ozel et al. 2008), where laboratory agar was substituted by Isubgol, showed that the presence of these compounds in the culture medium increased the number of shoots compared to the use of laboratory agar. Similar results were achieved in some woody plant species such as *Vaccinium corymbosum* (Clapa et al. 2008) or *Crataeva nurvala* (Jain, Babbar 2006), growing in culture media containing as gelling agents Isubgol and guar gum, respectively. While agar is mainly composed of a mixture of agarose and agaropectin, Isubgol shows the presence of other different polysaccharides, including D-xylose, aldobiuronic acid and L-arabinose (Babbar, Jain 1998). Whether this is the reason for the differences found when using Isubgol requires further research. However, other parameters, including the number of opened leaves, were analysed regarding to the gelling agent, without remarkable changes in response to the culture media (Agrawal et al. 2010; Ullah et al. 2015). On the other hand, other studies performed in *Faidherbia albida* and *Uapaca kirkiana* (Maliro, Lameck 2004) or in banana (Buah 2014; Saraswathi et al. 2016) have noted the positive effect of alternative gelling agents, such as cassava flour and sago, when they were combined with laboratory agar. In contrast, our results did not show any significant differences in any of the analysed parameters during the proliferation phase, thus confirming previous results in woody and non-woody species (Babbar, Jain 1998; Jain, Babbar 2006; Clapa et al. 2010; Raina, Babbar 2011).

In the present work, rooting ability and rooting rates of chestnut and birch were not affected by the presence of table sugar and/or LC agar in the culture medium. Similar findings were reported in non-woody species such as *Nicotiana tabacum* (Ozel et al. 2008), or woody species like *Syzygium cuminii* (Babbar, Jain 1998) or banana (Saraswathi et al. 2016). On the other hand, a positive effect of enset agar on the rooting percentage was observed in *Vainilla planifolia* (Mengesha et al. 2012). A beneficial effect of using low-cost compounds on the root length has been reported in *Curcuma longa* (Tyagi et al. 2007) as well as in woody plant species (Babbar et al. 2005), whereas the negative effect of using Isubgol on root length has also been reported (Ullah et al. 2015). In contrast, our results are consistent with earlier studies showing that root length can be maintained in a lower-cost culture medium (Ozel et al. 2008; Raina, Babbar 2011). Regarding the root number, a detrimental effect of table sugar on the micropropagation of *Solanum tuberosum* has been reported by Demo (Demo et al. 2008). On the other hand, an increase of the number of roots was observed in *Curcuma longa* when agar was complemented with cassava starch (Buah 2014) or completely substituted by Isubgol (Agrawal et al. 2008). In the chestnut and birch experiments, the root system was not affected by the presence of LC agar or table sugar in the culture media, in agreement with the results previously obtained in other species like *Nicotiana tabacum* (Ozel et al. 2008), *Curcuma longa* (Jain, Babbar 2006) or banana (Agrawal et al. 2010), therefore suggesting that the low-cost substitutes provide a valuable resource for the development of micropropagation protocols.

In conclusion, the substitution of sucrose and laboratory agar with white sugar and locally produced commercial agar allows for a 82% reduction in culture medium cost without any damages neither to the quality of the shoots nor to the root system development of chestnut and birch. The results obtained imply significant savings, which can lead to the improvement of the *in vitro* culture of chestnut and birch competitiveness and making the micropropagation of chestnut genotypes *plus* an actual profitable business. Thus, the expansion of micropropagation techniques in chestnut and birch can be used to support the present and future demand of these woody plant species with improved selected clones.

REFERENCES

Agrawal A., Mahalakshmi C., Tyagi R.K. (2008): Use of commercial sugar, isabgol and ordinary water in culture medium for conservation of *Curcuma longa* L. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 17: 85–89.

Agrawal A., Sanayaima R., Tandon R., Tyagi R.K. (2010): Cost-effective *in vitro* conservation of banana using alternatives of gelling agent (isabgol) and carbon source (market sugar). Acta Physiologiae Plantarum, 32: 703–711.

https://doi.org/10.17221/56/2023-JFS

Ahmad M., Haq Z.U., Iqbal J., Khan S. (2022): Dating the business cycles: Research and development (R&D) expenditures and new knowledge creation in OECD economies over the business cycles. Journal of the Knowledge Economy: 1–45.

Babbar S.B., Jain N. (1998): 'Isubgol' as an alternative gelling agent in plant tissue culture media. Plant Cell Reports, 17: 318–322.

Babbar S.B., Jain R., Walia N. (2005): Guar gum as a gelling agent for plant tissue culture media. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant, 41: 258–261.

Beck P., Caudullo G., de Rigo D., Tinner W. (2016): *Betula pendula*, *Betula pubescens* and other birches in Europe: Distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayanz J., de Rigo D., Caudullo G., Houston Durrant T., Mauri A. (eds): European Atlas of Forest Tree Species. Luxembourg: Publication Office of the European Union: 70–73.

Braga N., Rodrigues F., Oliveira P.P.M.B. (2015): Castanea sativa by-products: A review on added value and sustainable application. Natural Product Research, 29: 1–18.

Buah J.N. (2014): Suitability of cassava starch as a gelling agent for the *in vitro* culture of banana plantlets. American Journal of Food Technology, 9: 340–349.

Cameron A. (1996): Managing birch woodlands for the production of quality timber. Forestry, 69: 357–371.

Carbone F., Moroni S., Mattioli W., Mazzocchi F., Romagnoli M., Portoghesi L. (2020): Competitiveness and competitive advantages of chestnut timber laminated products. Annals of Forest Science, 77: 51.

Castaño-Santamaría J., Barrio-Anta M., Álvarez-Álvarez P. (2013): Potential above ground biomass production and total tree carbon sequestration in the major forest species in NW Spain. International Forestry Review, 15: 273–289.

Chalupa V. (1981): *In vitro* propagation of birch (*Betula verrucosa* Ehrh). Biologia Plantarum, 23: 472–474.

Che P., Wu E., Simon M.K., Anand A., Lowe K., Gao H., Sigmund A.L., Yang M., Albertsen M.C., Gordon-Kamm W., Jones T.J. (2022): Wuschel2 enables highly efficient CRISPR/Cas-targeted genome editing during rapid *de novo* shoot regeneration in sorghum. Communications Biology, 5: 344.

Clapa D., Fira A., Rusu T. (2008): The use of Isubgol and Sequestrene 138 for the *in vitro* propagation of the highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). Journal of Food, Agriculture and Environment, 6: 145–147.

Clapa D., Fira A., Pacurar I. (2010): *In vitro* propagation of *Pinguicula vulgaris*. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Horticulture, 67: 330–335.

Corredoira E., Martínez M., Cernadas M., San José M. (2017): Application of biotechnology in the conservation of the genus *Castanea*. Forests, 8: 394.

Covelo P., Vidal N., Rico S., Vielba J.M., Reggiardo M., Sánchez C. (2019): Performance of culture lines established *in vitro* from a monumental birch tree. In: Bonga J.M., Park Y.S., Trontin J.F. (eds): Proceedings of the 5th International Conference on the IUFRO Unit 2.09.02 on 'Clonal Trees in the Bioeconomy Age: Opportunities and Challenges', Coimbra, Sept 10–15, 2018: 25–33.

Cuenca B., Sánchez C., Aldrey A., Bogo B., Blanco B., Correa B., Vidal N. (2017): Micropropagation of axillary shoots of hybrid chestnut (*Castanea sativa* × *C. crenata*) in liquid medium in a continuous immersion system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 131: 307–320.

Demo P., Kuria P., Nyende A.B., Kahangi E.M. (2008): Table sugar as an alternative low cost medium component for *in vitro* micro-propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). African Journal of Biotechnology, 7: 2578–2584.

Dubois H., Verkasalo E., Claessens H. (2020): Potential of birch (*Betula pendula* Roth and *B. pubescens* Ehrh.) for forestry and forest-based industry sector within the changing climatic and socio-economic context of western Europe. Forests, 11: 336.

Dutta I., Bhadra J., Ghosh P., Saha B., Datta S. (2013). An efficient and cost effective protocol for *in vitro* propagation of pineapple. Journal of Ornamental Plants, 3: 229–234.

Felton A., Andersson E., Ventorp D., Lindbladh M. (2011). A comparison of avian diversity in spruce monocultures and spruce-birch polycultures in southern Sweden. Silva Fennica, 45: 1143–1150.

Fernández-Fuego D., Bertrand A., González A. (2017): Metal accumulation and detoxification mechanisms in mycorrhizal *Betula pubescens*. Environmental Pollution, 231: 1153–1162.

Gago D., Bernal M.Á., Sánchez C., Aldrey A., Cuenca B., Christie C.B., Vidal N. (2022): Effect of sucrose on growth and stress status of *Castanea sativa* x *C. crenata* shoots cultured in liquid medium. Plants, 11: 965.

Giri C.C., Shyamkumar B., Anjaneyulu C. (2004): Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: An overview. Trees, 18: 115–135.

Gordo D.A.M., Gonzalez O.C., Pacheco J.C. (2012): Sustancias utilizadas como agente gelificante alternativas al agar en medios de cultivo para propagación *in vitro*. Revista de Investigación Agraria y Ambiental, 3: 49. (in Spanish)

Gour V.S., Kant T. (2011): Efficacy of low cost gelling agents and carbon source alternatives during *in vitro* rooting of *Balanites aegyptiaca* and *Phyllanthus emblica* microshoots. Tree and Forestry Science and Biotechnology, 5: 58–60.

Gresshoff P.M., Doy C.H. (1972): Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). Planta, 107: 161–170.

Guitián J., Guitián P., Magrach A., Docampo C., Domínguez P., Guitián L. (2012): Effect of management and spatial charac-

https://doi.org/10.17221/56/2023-JFS

teristics on plant species richness of *Castanea sativa* Mill. woodlots in the NW Iberian Peninsula. Journal of Forest Research, 17: 98–104.

Häggman H., Sutela S., Welander M. (2007): Micropropagation of *Betula pendula* Roth including genetically modified material. In: Jain S.M., Häggman H. (eds): Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Dordrecht, Springer: 153–162.

Hynynen J., Niemistö P., Viherä-Aarnio A., Brunner A., Hein S., Velling P. (2010): Silviculture of birch (*Betula pendula* Roth and *Betula pubescens* Ehrh.) in northern Europe. Forestry, 83: 103–119.

Jain R., Babbar S.B. (2005): Guar gum and isubgol as cost-effective alternative gelling agents for *in vitro* multiplication of an orchid, *Dendrobium chrysotoxum*. Current Science, 88: 292–295.

Jain R., Babbar S.B. (2006): Xanthan gum: An economical substitute for agar in plant tissue culture media. Plant Cell Reports, 25: 81–84.

Jones O.P., Welander M., Waller B.J., Ridout M.S. (1996): Micropropagation of adult birch trees: Production and field performance. Tree Physiology, 16: 521–525.

Kodym A., Zapata-Arias F.J. (2001): Low-cost alternatives for the micropropagation of banana. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 66: 67–71.

Kuria P., Demo P., Nyende A.B., Kahangi E.M. (2008): Cassava starch as an alternative cheap gelling agent for the *in vitro* micro-propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). African Journal of Biotechnology, 7: 301–307.

Legué V., Rigal A., Bhalerao R.P. (2014): Adventitious root formation in tree species: Involvement of transcription factors. Physiologia Plantarum, 151: 192–198.

Maher M.F., Nasti R.A., Vollbrecht M., Starker C.G., Clark M.D., Voytas D.F. (2020): Plant gene editing through *de novo* induction of meristems. Nature Biotechnology, 38: 84–89.

Maliro M.F.A., Lameck G. (2004): Potential of cassava flour as a gelling agent in media for plant tissue cultures. African Journal of Biotechnology, 3: 244–247.

Martín M.A., Mattioni C., Molina J.R., Alvarez J.B., Cherubini M., Herrera M.A., Villani F., Martín L.M. (2012): Landscape genetic structure of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Spain. Tree Genetics & Genomes, 8: 127–136.

Meier-Dinkel A. (1992): Micropropagation of Birches (*Betula* spp.). In: Bajaj Y.P.S. (ed.): High-Tech and Micropropagation II. Berlin, Heidelberg, Springer: 40–81.

Mengesha A., Ayenew B., Gebremariam E., Tadesse T. (2012): Micro-propagation of *Vanilla planifolia* using enset (*Ensete ventricosum* (Welw, cheesman)) starch as a gelling agent. Current Research Journal of Biological Sciences, 4: 519–525.

Morelli F., Python A., Pezzatti G.B., Moretti M. (2019): Bird response to woody pastoral management of ancient chestnut orchards: A case study from the southern Alps. Forest Ecology and Management, 453: 117560.

Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473–497.

Ozel C.A., Khawar K.M., Arslan O. (2008): A comparison of the gelling of isubgol, agar and gelrite on *in vitro* shoot regeneration and rooting of variety Samsun of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Scientia Horticulturae, 117: 174–181.

Pavese V., Ruffa P., Abbà S., Costa R.L., Corredoira E., Silvestri C., Torello Marinoni D., Botta R. (2022): An *in vitro* protocol for propagating *Castanea sativa* Italian cultivars. Plants, 11: 3308.

Pellens M., Peters B., Hud M., Rammer C., Licht G. (2018): Public investment in R&D in reaction to economic crises – A longitudinal study for OECD countries. ZEW-Centre for European Economic Research Discussion, 18-005. Available at: https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=3122254

Raina R.J., Babbar S.B. (2011): Evaluation of blends of alternative gelling agents with agar and development of xanthagar, a gelling mix, suitable for plant tissue culture media. Asian Journal of Biotechnology, 3: 153–164.

Roces-Díaz J.V., Jiménez-Alfaro B., Chytrý M., Díaz-Varela E.R., Álvarez-Álvarez P. (2018): Glacial refugia and mid-Holocene expansion delineate the current distribution of *Castanea sativa* in Europe. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology, 491: 152–160.

Saglam S., Cifici C.Y. (2010): Effects of agar and isubgol on adventitous shoot regeneration of woad (*Isatis tinctoria*). International Journal of Agriculture and Biology, 12: 281–285.

Saraswathi M.S., Uma S., Kannan G., Selvasumathi M., Mustaffa M.M., Backiyarani S. (2016): Cost-effective tissue culture media for large-scale propagation of three commercial banana (*Musa* spp.) varieties. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 91: 23–29.

Sedjo R. (2001): Biotechnology's potential contribution to global wood supply and forest conservation. RFF Working Paper Series. Discussion paper 01–51. Washington D.C., Resources for the Future: 33.

Singh M., Sonkusale S., Niratker C., Shukla P. (2014): Micropropagation of *Shorea robusta*: An economically important woody plant. Journal of Forest Science, 60: 70–74.

Swamy M.K., Sudipta K.M., Balasubramanya S., Anuradha M. (2010): Effect of different carbon sources on *in vitro* morphogenetic response of patchouli (*Pogostemon cablin* Benth). Journal of Phytology, 2: 11–17.

Truong C., Palmé A.E., Felber F. (2007): Recent invasion of the mountain birch *Betula pubescens* ssp. *tortuosa* above the treeline due to climate change: Genetic and ecological study in northern Sweden. Journal of Evolutionary Biology, 20: 369–380.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

https://doi.org/10.17221/56/2023-JFS

Tyagi R.K., Agrawal A., Mahalakshmi C., Hussain Z., Tyagi H. (2007): Low-cost media for *in vitro* conservation of turmeric (*Curcuma longa* L.) and genetic stability assessment using RAPD markers. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant, 43: 51–58.

Ullah M.A., Uddin M.I., Puteh A.B., Haque M.S., Islam M.S. (2015): Alternative gelling agents for *in vitro* propagation of orchid (*Dendrobium sonia*). Journal of Animal & Plant Sciences, 25: 792–797.

Vella F.M., Laratta B., La Cara F., Morana A. (2018): Recovery of bioactive molecules from chestnut (*Castanea sativa* Mill.) by-products through extraction by different solvents. Natural Product Research, 32: 1022–1032.

Vidal N., Blanco B., Cuenca B. (2015): A temporary immersion system for micropropagation of axillary shoots of hybrid chestnut. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 123: 229–243.

Vieitez A.M., Sänchez M.C., García-Nimo M.L., Ballester A. (2007): Protocol for micropropagation of *Castanea sativa*. In: Jain S.M., Häggman H. (eds): Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Dordrecht, Springer: 299–312.

Vielba J.M., Vidal N., San José M.C., Rico S., Sánchez C. (2020): Recent advances in adventitious root formation in chestnut. Plants, 9: 1543.

Viherä-Aarnio A., Velling P. (2001): Micropropagated silver birches (*Betula pendula*) in the field – Performance and clonal differences. Silva Fennica, 35: 385–401.

Welander M. (1993): Micropropagation of birch. In: Ahuja M.R. (ed.): Vol. 41: Micropropagation of Woody Plants. Forestry Sciences, Dordrecht, Springer: 223–246.

Received: May 15, 2023
Accepted: July 7, 2023
Published online: August 7, 2023

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ISRAEL JOURNAL OF PLANT SCIENCES, 2020
http://dx.doi.org/10.1163/22238980-20191113

BRILL

Effects of auxin and urea derivatives on adventitious rooting in chestnut and oak microshoots

Jesús M. Vielba[a], Nieves Vidal[a], Ada Ricci[b], Ricardo Castro[a], Purificación Covelo[a], M. Carmen San-Jose[a] and Conchi Sanchez[c]

[a]Department of Plant Physiology, Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas (IIAG-CSIC), Santiago de Compostela, Spain; [b]Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità Ambientale. Unità di Biologia Evolutiva e Funzionale, Università de Parma, Parma, Italy; [c]Department of Plant Physiology, Instituto de Investigaciones Agrobiologicas de Galicia, Avda de Vigo s/n, Santiago de Compostela, A Coruña, 15705, Spain

ABSTRACT

The present study investigated how auxin concentration and the method of application affected the formation of adventitious roots in microshoots of chestnut (*Castanea sativa*) and oak (*Quercus robur*). The activity of two urea derivatives (2, 3-MDPU and 3, 4-MDPU) was also evaluated. Microshoots were derived from basal sprouts of two mature chestnut trees (P1 and P2) and one adult oak genotype (Sainza). In chestnut, rooting percentage was positively affected by auxin in a dose-dependent manner, particularly in shoots treated with the hormone for 24 h. The effect of auxin on rooting also differed depending on the application method. In shoots treated for 24 h, the highest concentration of auxin produced the healthiest rooted plantlets, in terms of the root system and shoot quality. By contrast, in shoots treated by the basal quick-dip method, the shoot quality was best at the lowest auxin concentration. The effect of urea derivatives on the root system depended on the species as well as on the auxin concentration and application period. Use of the MDPUs improved the root system architecture of auxin-treated shoots by promoting lateral root development and triggering the synchronous initiation of root primordia at the base of the shoot. Shoot quality was also improved by MDPUs, which promoted resumption of growth and reduced shoot-tip necrosis.

ARTICLE HISTORY
Received 1 July 2019
Accepted 13 November 2019

KEYWORDS
Adventitious rooting; auxin; root system; shoot tip necrosis; shoot quality; Urea derivatives

Introduction

Adventitious rooting (AR) is a complex post-embryogenic process in which roots arise from plant tissues other than the primary root. It is affected by several factors, including the type of explant or tissue, genotype, maturation stage, hormonal balance and nutritional status (Geiss et al. 2009). AR is of a considerable economic importance in the ornamental and forest industries because of the lack of rooting response or/and because poor rooting systems impede the survival of the plants and hinder large-scale propagation of the selected material. In the case of forest tree species, the maturation-related decline in AR competence is a limiting step in the clonal propagation of selected genotypes as their many characteristics or desirable traits are only expressed during the mature phase (Pijut et al. 2011).

In *Quercus robur* L (oak) and *Castanea sativa* (chestnut), efforts have been made over the years to improve the micropropogation and rooting ability of selected mature trees. Successful micropropagation of these species has been achieved by using juvenile-like material, i.e. epicormic shoots, basal and stump sprouts (Vieitez et al. 1985; San-José et al. 1988; Chalupa 1988; Vieitez et al. 1994; Gonçalves et al. 1998; Vidal et al. 2003; Vieitez et al. 2007). By contrast, the rooting ability of crown-derived shoots is very low in both species (Sánchez and Vieitez 1991; Vieitez et al. 1994; Sánchez et al. 1996). Rejuvenation treatments (such as partial etiolation, layering or grafting) improve the reactivity of crown-derived explants of chestnut; however, the rooting ability of rejuvenated shoots remains low (Ballester et al. 1989; Sánchez et al. 1997a). The positive effect on AR in chestnut cuttings after girdling and

CONTACT Conchi Sanchez conchi@iiag.csic.es

© Koninklijke Brill NV, Leiden, 2019

Downloaded from Brill.com11/14/2020 01:15:24PM
via University of Gothenburg

layering was associated with histological changes in the shoot zones from which roots are formed, as reported by Biricolti et al. (1994).

A basal cut and application of exogenous auxin are essential to induce AR in difficult-to-root species (De Almeida et al. 2015; Steffens and Rasmussen 2016; Gonin et al. 2019). Indole-3-butyric acid (IBA) is the most effective and frequently used auxin for inducing AR in cuttings of many species. In chestnut and oak, IBA induces the dedifferentiation of specific cells adjacent to vascular bundles, which undergo a reprogramming process, acquire a new fate and eventually re-enter the cell cycle under a new genetic program. In rooting competent microshoots, these cell types will give rise to root primordia, while in recalcitrant tissues only callus-like structures will be generated (Ballester et al. 2009). Analysis of the endogenous indole-3-acetic acid (AIA) content during early stages of AR in chestnut shoots revealed high AIA levels in auxin-treated shoots as a consequence of the IBA treatment (Gonçalves et al. 2000, 2008). However, the endogenous AIA content of rooting-competent and non-competent shoots of chestnut and oak treated with IBA was not correlated with the maturation-related decline in AR (Ballester et al. 1999; Vidal et al. 2003). In chestnut, the differential response is at least partly a consequence of differences in auxin homeostasis in the tissues; these differences depend on the ontogenetic state and imply differential expression of auxin-responsive genes (Vielba et al. 2011, 2016).

Root development is frequently associated with a callus-like structure originated from cells at the cutting site and that undergo cell division in response to wounding. Moreover, under the same IBA treatment cuttings from mature tissues form callus rather than roots. A balance between the formation of ARs and callus is required because an inverse relationship between the presence of callus formation and rooting has been reported in chestnut (Osterc et al. 2006; Dantas et al. 2016) and other species (Abu-Zabra et al. 2012). Callus formation may also interfere in the establishment of the vascular connection between the root and the stem.

In addition to being affected by auxin, the maturation stage and other factors that regulate rooting, AR competence is a quantitative trait (Riemenschneider 1993) and is thus highly genotype-dependent. Genotypic differences in the rooting ability as well as in the rooting response of shoots to a particular inductive treatment have been reported in chestnut and oak (Dantas et al. 2016; Osterc et al. 2006; Sánchez et al. 1996; Sánchez et al. 1997b).

The standard IBA treatments used in our laboratory to induce AR yield acceptable rooting percentages in juvenile-like microshoots. However, a relatively large number of the plantlets have an unhealthy, fragile appearance and exhibit symptoms of shoot tip necrosis (Vieitez et al. 1986; Sánchez et al. 1996). In addition, the basal dip treatment leads to the formation of many roots along the stem rather than at the base of chestnut microshoots, thus producing a weak root system because the aerial roots are unable to come in contact with the culture medium. Optimization of different factors involved in inductive rooting treatments, such as the auxin concentration and mode of application, is therefore key to achieving high rooting percentages and healthy plantlets with a well-developed root system. These plantlets will be more suitable for *ex vitro* acclimation as they will have a better chance of surviving under *ex vitro* conditions. In addition, the effect of other compounds that may help to improve the root system and plantlet quality should be tested in order to develop efficient protocols for plant production.

The potential role of urea derivatives on micropropagation has been assessed in several species. Shoot proliferation and shoot regeneration have been improved by the use of thidiazuron (TDZ) and N-phenyl-N′-[6-(2-chlorobenzothiazol)-yl] urea (PBU) in many species (Caglar et al. 2005; Huang et al. 2010; Singh and Dwivedi 2014; Patial et al. 2017) as well as during the induction of somatic embryogenesis and plant regeneration (Khan et al. 2006; Ghosh et al. 2018). PBU has frequently been used in eucalyptus to induce adventitious shoots (Huang et al. 2010; Gosh et al. 2018). In addition, *N,N´*-bis-(2,3-methylenedioxyphenyl)urea (2,3-MDPU) and *N-N´*-bis-(3,4-methylenedioxyphenyl) urea (3,4-MDPU) have been used to induce AR or as adjuvants (Ricci and Bertoletti 2009). Despite their chemical similarity to urea derivatives displaying cytokinin-like activity, these compounds do not show any cytokinin-like or auxin-like activity, although the rooting response was improved in several species, such as apple, pine and caper (Ricci et al. 2001, 2003, 2008; Carra et al. 2012). Both compounds enhanced AR in apple microshoots and *Capparis spinosa* nodal explants (Ricci et al. 2001; Carra et al. 2012). Use of these compounds in combination with exogenous auxin improved AR in apple stem slices and in *Pinus*

Downloaded from Brill.com11/14/2020 01:15:24PM
via University of Gothenburg

radiata rooting-competent tissues, even at exogenous auxin concentrations that were sub-optimal for *P. radiata* (Ricci et al. 2003, 2008). Although the mode of action of these compounds remains unknown, it has been suggested that they may interact with auxin (endogenous or exogenous) thus improving the rooting response (Ricci and Bertoletti 2009). Furthermore, in *Citrus* species, these compounds increased the induction of somatic embryogenesis in a species-specific manner (Carra et al. 2006). The positive effects of these compounds on morphogenetic competence suggest that they may indeed modulate the activity of the principal hormones (auxin and cytokinin, respectively) involved in the processes, although the lack of a general effect on the tested species and genotypes makes it difficult to determine the underlying mechanism. Different urea derivatives have direct and indirect effects on endogenous cytokinin metabolism (reviewed in Ricci and Bertoletti 2009).

The objectives of the present study were (1) to determine the best auxin treatment for inducing adventitious rooting in chestnut and oak microshoots and (2) to study the effect of the application of 2,3- and 3,4-MDPU in combination with auxin during adventitious rooting. The findings showed that the MDPUs had a slightly positive effect on the rooting response of microshoots at suboptimal IBA concentrations. Furthermore, the quality of the rooted shoots was improved by the MDPUs. Nonetheless, the success of the MDPU treatment depended on the auxin concentration and method of application and species, in a compound-specific manner. Aspects related to the mode of action of MDPUs are discussed.

Material and methods

Microshoots derived from basal sprouts of two mature *C. sativa* trees (P1 and P2) and one monumental *Q. robur* tree (Sainza) were used in this study. A detailed description of protocols for *in vitro* establishment and proliferation of these shoot cultures is given elsewhere (Sánchez and Vieitez 1991; Vieitez et al. 1994; Vidal et al. 2003).

Rooting

For rooting experiments, 2-3 cm long microshoots were harvested at the end of the proliferation cycle. The callus and basal leaves were removed and the microshoots were placed in 300 mL glass jars containing 50 mL of basal rooting medium (BRM) consisting of GD medium (Gresshoff and Doy 1972) with macronutrients reduced to one third (GD 1/3) and supplemented with 7 g/l of either Difco agar (chestnut) or Vitro agar (oak). All experiments and treatments were performed in three replicate jars, with six microshoots in each (i.e. 18 microshoots per treatment). All experiments were repeated at least twice.

For induction of AR, several treatments with different auxin concentrations and combinations of auxin, MDPUs and application periods were tested. Indole-3-butyric acid (AIB) was the auxin used to induce AR. In chestnut microshoots, the following auxin inductive treatments were performed prior to transfer to BRM: a) "basal quick dip treatment", which consisted of dipping the basal end of shoots in a solution of 2450 (low auxin dip) or 4900 (high auxin dip) μM IBA solution for 1 min; b) "24-h treatment" carried out by incubating the shoots in BRM supplemented with 50, 75 or 125 μM IBA for 24 h and c) "5-day treatment", which consisted of incubating the shoots for 5 days in 25 μM IBA under dark conditions before transfer to BRM and light conditions. P1 shoots were subjected to the high auxin dip treatment (4900 μM) and to the 24 h-IBA treatment. P2 shoots were subjected to the quick dip treatment (2450 and 4900 μM), to the 24-h treatment with 75 μM IBA and to the 5-day treatment. Clones P1 and P2 have previously shown similar rooting responses (Sánchez and Vieitez 1991). In oak microshoots, root induction was performed by the 24-h treatment with 50, 75 or 125 μM IBA. The "basal quick dip treatment" was not applied to oak, because preliminary experiments showed a low rooting frequency (18%) and unhealthy appearance of the microshoots in response to the treatment (data not shown).

The effect of the MDPUs was evaluated as follows: a) P1 and P2 shoots subjected to quick dip treatment were transferred to BRM supplemented with 0, 0.1, 1 or 10 μM MDPU (2,3-MDPU or 3,4-MDPU) for 24 h or for one month; b) the 24-h auxin treatment was conducted in clone P1 (50, 75 and 125 μM IBA) in the presence of 0, 0.1, 1 or 10 μM MDPUs (2,3-MDPU or 3,4-MDPU) and clone P2 (75 μM IBA) in the presence of 0, 0.1, 1, or 10 μM 3,4-MDPU; and c) the 5-day treatment (25 μM IBA) was conducted in clone P2 in the presence of 0, 0.1, 1 or 10 μM 3,4-MDPU. The effect of the MDPUs on oak microshoots was evaluated as described for chestnut and the 24-h treatment.

Downloaded from Brill.com11/14/2020 01:15:24PM
via University of Gothenburg

At the end of the auxin and auxin plus MDPU treatments, the treated shoots were transferred to BRM for one month or for 25 days, the latter in the case of the 5-day treatment.

Histological analysis

For histological examination, basal segments (0.5 cm) were collected from the shoots treated with 2450 or 4900 µM IBA for 1 min and supplemented with 0, 0.1, 1 or 10 µM 3,4-MDPU for 24 h. Samples were collected after treatment for 5 days. Four samples were obtained for treatment, and the entire experiment was repeated twice. Histological analysis was performed following the protocol described by Ballester at al. (1999). Briefly, explants were fixed in a mixture of formalin, glacial acetic acid and 50% ethanol [1:1:18 (v/v/v)], dehydrated through a graded n-butanol series and embedded in paraffin wax. Tissues were sectioned (10 µm) on a Reichert-Jung rotatory microtome. Sections were double-stained with safranin-fast green (Jensen 1962). The stained sections were mounted with Euckit®, and images were captured with an Olympus DP71 digital camera fitted to a Nikon-FXA microscope.

Data collection and statistical analysis

At the end of the rooting period (1 month), the percentage of rooted shoots, the root number and the length of the longest root were determined. The quality of rooted shoots was assessed by the presence of shoot tip necrosis, resumption of shoot growth, basal callus formation and lateral root development. The data presented correspond to 36-54 explants per treatment. The data were analyzed by Levene´s test (to verify the homogeneity of variance) and the Shapiro-Wilk test of normality. The data were then subjected to analysis of variance (ANOVA) followed by comparison of group means (Tukey-b test), or to the Kruskal-Wallis test (when the data were not normally distributed). Statistical analyses were performed using SPSS 25.0 (IBM).

Table 1. Effect of the IBA concentration and application period on the rooting parameters of shoot cultures derived from three mature trees. Values are means ± standard error from at least three replicates.

Species / Clone	IBA		Rooting (%)	Number of Roots	Longest Root Length (mm)
	µM	Time			
A	50	24 h	30.5 ± 5.3^{c}	2.2 ± 0.4^{c}	29.0 ± 3.1^{b}
	75	24 h	72.3 ± 7.2^{b}	3.5± 0.6^{bc}	34.9 ± 2.1^{ab}
	125	24 h	94.4 ± 2.3^{a}	5.4 ± 0.6^{ab}	39.8 ± 1.6^{a}
Chestnut / P1	4900	60 s	89.2 ± 2,3^{ab}	6.6 ± 0.7^{a}	26.2 ± 2.0^{b}
B	25	120 h	94.4 ± 5.6^{a}	5.4 ± 0.2^{b}	41.2 ± 0.4^{a}
	75	24 h	69.5 ± 2.8^{b}	3.0 ± 0.6^{c}	26.0 ± 4.0^{b}
	2450	60 s	81.4 ± 1.9^{ab}	3.9 ± 0.6^{bc}	34.5 ± 2.4^{ab}
Chestnut / P2	4900	60 s	89.9 ± 1.7^{ab}	7.9 ± 0.6^{a}	29.5 ± 0.6^{b}
C	50	24 h	64.8 ± 13.4^{a}	2.5 ± 0.3^{a}	48.2 ± 3.3^{a}
	75	24 h	68.1 ± 7.6^{a}	2.6 ± 0.1^{a}	39.5 ± 6.6^{a}
Oak / Saínza	125	24 h	80.5 ± 2.8^{a}	3.0 ± 0.2^{a}	38.7 ± 4.1^{a}

[1]For each variable and clone, the values indicated by the same letter are not significantly different (Tukey-b test).

Results

Effect of IBA treatments on the rooting response

In order to ascertain the optimal auxin treatment, different concentrations of auxin and periods of application were tested. Within each clone and for the same application period, auxin concentrations were positively correlated with rooting frequency and the number of roots (Table 1). Indeed, in chestnut (P1) microshoots subjected to 24-h IBA treatments, the rooting percentage increased significantly as the IBA concentration increased from 50 to 125 µM IBA (Table 1A). Although not statistically significant, the rooting percentage also increased with the IBA concentration in oak shoots (Table 1C). Maximum rooting percentages (94.% for clone P1 and 80.5% for oak) were produced in shoots treated with 125 µM IBA (Table 1). Moreover, in clone P1 increasing the concentration of IBA from 50 to 125 µM not only increased the rooting frequency (from 30.5% to 94.4%) and mean root number (from 2.2 to 5.4) ($p \leq 0.001$) but also increased the length of the longest root (from 29.0 to 39.8 mm) (Table 1, Fig. 1A). By contrast, the auxin concentration did not significantly affect those parameters in oak. However, the highest rooting percentages and the number of roots were achieved with the 125 µM IBA treatment.

In clone P1, similar rooting percentages were achieved with the high auxin dip (4900 µM IBA) and the 24-h (125 µM IBA) treatments (Table 1). The high auxin dip treatment produced the greatest number of roots in both chestnut clones (6.6 in P1 and 7.9 in P2; Table 1). In clone P2, the number of roots decreased significantly ($p \leq 0.05$) as the concentration of the auxin dip decreased (Table 1B, Fig. 1B). The basal dip treatment stimulated callus formation at the basal end of the shoot and also development of adventitious roots from the lower half of the shoot rather than from the callus itself (Figs. 1B, 8A). Formation of ARs further from the basal callus was also promoted by the high

Downloaded from Brill.com11/14/2020 01:15:24PM
via University of Gothenburg

auxin dip (4900 µM IBA; Fig. 1B). Moreover, the latter treatment caused a high level of shoot tip necrosis, probably due to the supra-optimal levels of auxin. The response of P1 shoots to the quick auxin dip was similar to that previously described in P2 shoots (data not shown).

In clone P2 the best rooting responses, in terms of rooting percentage, root length and lateral root development, were obtained with the 5–day IBA treatment (25 µM) (Table 1, Fig. 1C). The root number achieved with this treatment (5.4) was significantly higher ($p \leq 0.05$) than that obtained in shoots treated for 24 h with 75 µM IBA (3.0). In terms of shoot and root quality, the 24-h and 5-day IBA treatments with 125 µM and 25 µM, respectively, produced better results than the basal quick dip with high IBA concentrations (Fig. 1A, C).

Effect of MDPUs on adventitious rooting of chestnut and oak microshoots

The effects of 2,3- and 3,4-MDPU were first tested in chestnut shoots subjected to the 24-h auxin treatment. P1 shoots were treated with 50, 75 or 125 µM IBA for 24 h in the presence of 0, 0.1, 1 and 10 µM 2,3-MDPU and 3,4-MDPU. The effect of 3,4-MDPU was evaluated in P2 shoots treated with 75 µM IBA. Although rooting parameters were not significantly

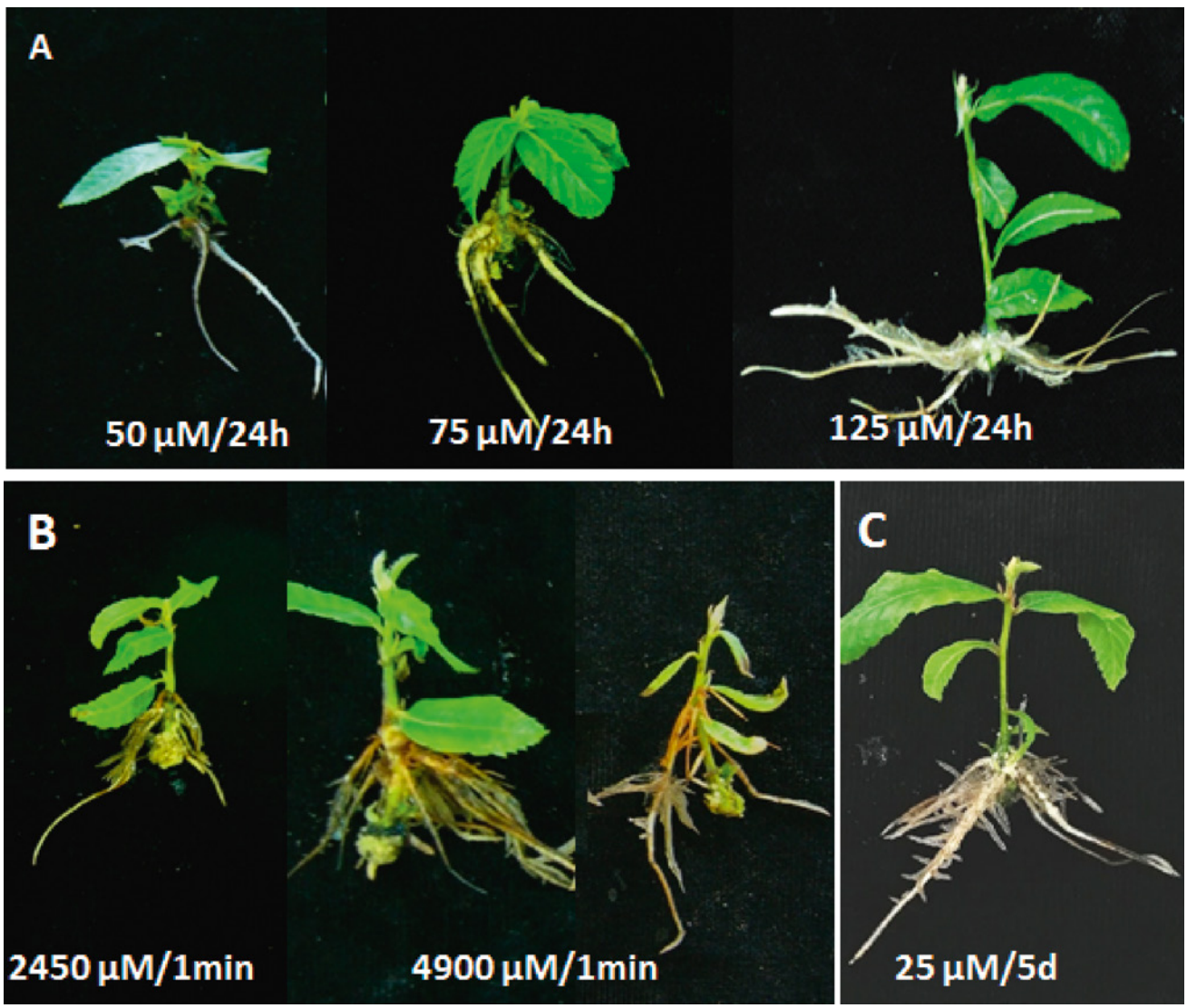


Figure 1. Root system of chestnut shoots subjected to different IBA treatments. (A) P1 shoots treated with 50, 75 and 125 µM IBA for 24 h; (B) P2 shoots treated with 2450 or 4900 µM IBA for 1 min; (C) P2 shoots treated with 25 µM IBA for 5 days. Shoots were transferred to basal rooting medium after the auxin induction treatment for (A and B) 1 month or (C) 25 days.

Downloaded from Brill.com11/14/2020 01:15:24PM
via University of Gothenburg

affected by the presence of MDPUs, the rooting percentage increased two-fold in the presence of 0.1 µM 2,3-MDPU at suboptimal concentration of IBA (Fig. 2A). Moreover, this compound slightly improved lateral root development in an auxin concentration-dependent manner (Fig. 3). As the concentration of exogenous auxin was increased (to 125 µM), the concentration of 2,3-MDPU required to improve the root system decreased (Fig. 3C).

Treatment of shoots with IBA plus 3,4-MDPU exerted a strong positive effect on promoting lateral roots in shoots (Figs. 4 and 5), although the rooting frequency was not significantly affected ($p \geq 0.7$) at the auxin concentrations tested (Fig. 2B). In addition, the quality of shoots in rooted plantlets was greatly improved in shoots subjected to the 5-day IBA treatment plus 3,4-MDPU (Fig. 5). Shoot tip necrosis was reduced as the concentration of the MDPU increased, whereas resumption of new growth increased gradually and significantly in response to the presence of 3,4-MDPU (Table 2 and Fig. 5). Furthermore, the presence of 3,4-MDPU promoted initiation of roots at the base of the shoot. Callus formation was observed in 83.3% of rooted plantlets in the 5-day IBA treatment, but in only 38.8% of rooted plantlets when the auxin inductive treatment was performed in the presence of all concentrations of 3,4-MDPU tested. On the other hand, a rooting frequency of 100% was achieved in the presence 3,4-MDPU.

The effect of the MDPUs on AR was also evaluated in oak shoots subjected to the 24-h auxin treatments. MDPU did not significantly affect the rooting percentage in IBA treatments (p values ranged from ≤ 0.11 to 0.83), the number of roots (p values ranged from ≤ 0.12 to 0.51) or the length of the longest root (p values ranged from ≤ 0.1 to 0.98). Regarding each specific IBA treatment, the greatest increase in rooting frequency was observed when roots were induced in the presence of 75 µM IBA plus 0.1 µM of 3,4-MDPU (86.9 %) relative to the IBA treatment alone (68.1%). On the other hand, no such increase was not observed in the presence of 2,3-MDPU.

The most notable effect of MDPUs on oak rooting was the improvement in plantlet quality. In line with the above results described in chestnut, shoots treated with IBA plus MDPUs were healthier than those treated with IBA alone. Regardless of the compound, the presence of MDPUs during the auxin induction period promoted the growth of the shoot apex at all concentrations tested (Fig. 6, Table 3). Plantlets rooted in the presence of MDPUs were taller due to resumption of shoot growth, which was clearly detected by the normal green color in contrast to the pale green appearance of the initial explant.

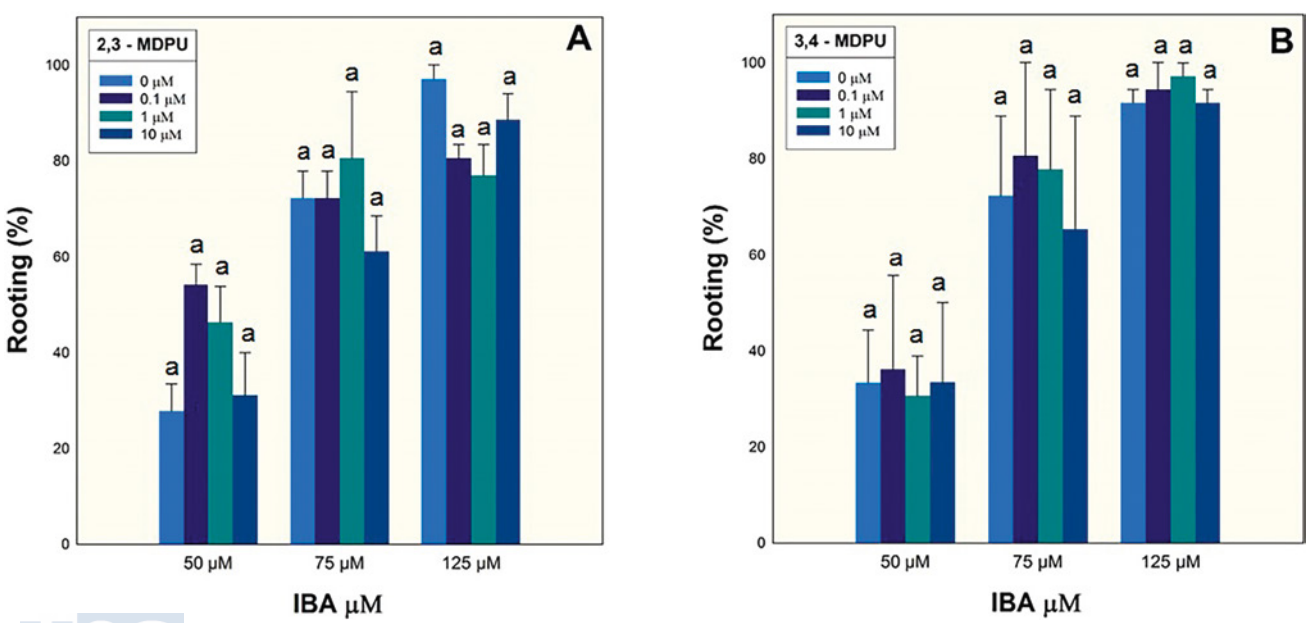


Figure 2. Effect of the presence of MDPU on the rooting percentage of P1 chestnut shoots. Shoots were treated with 50, 75 and 125 µM IBA in the presence of 0, 0.1, 1 and 10 µM of either (A) 2,3-MDPU or (B) 3,4-MDPU for 24 h, and subsequently transferred to basal rooting medium for 1 month. For each auxin treatment, different letters indicate significant differences (Kruskal Wallis test).

Downloaded from Brill.com11/14/2020 01:15:24PM
via University of Gothenburg

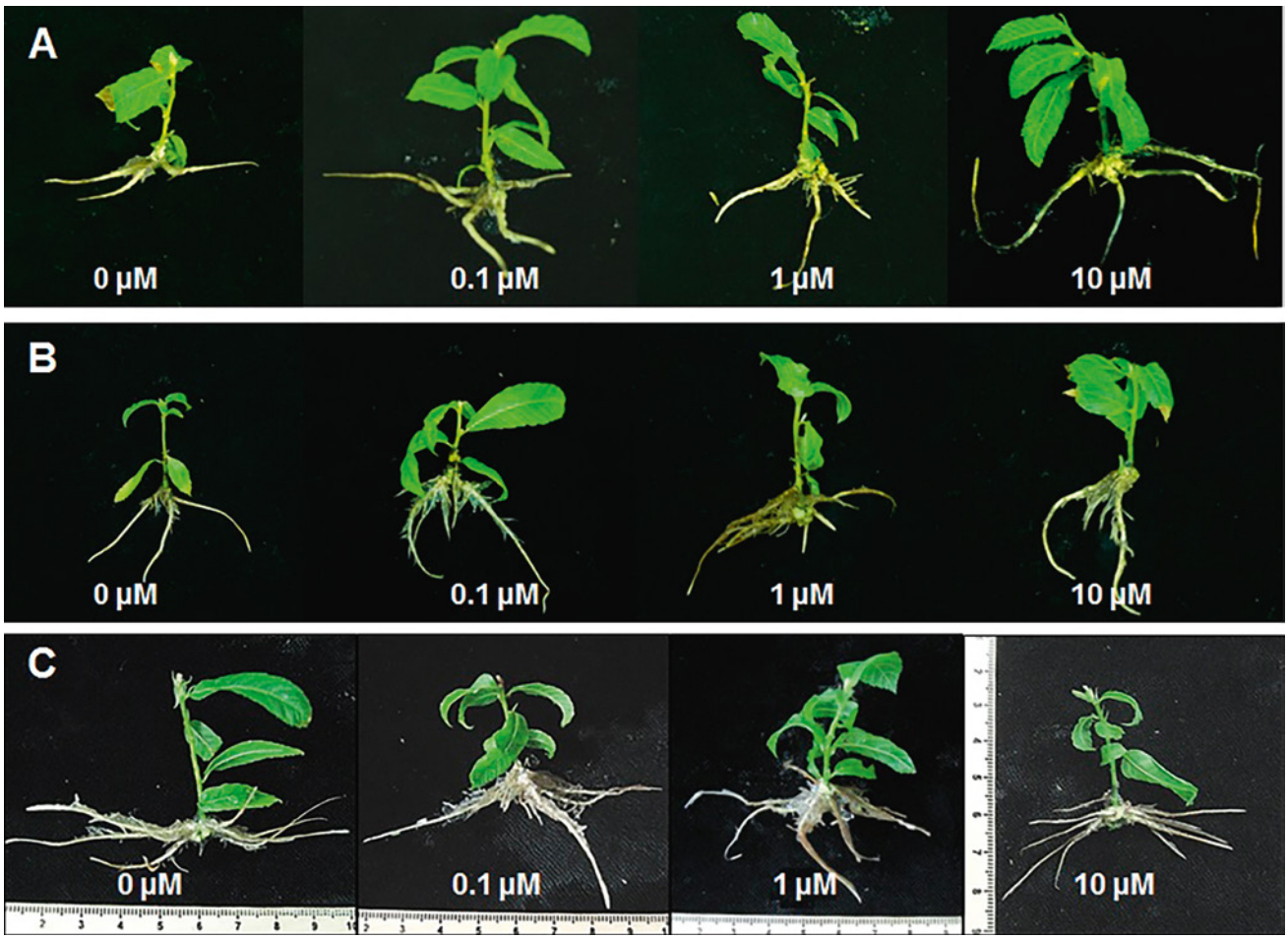


Figure 3. Shoots of P1 chestnut treated with IBA at (A) 50 µM (B) 75 µM or (C) 125 µM for 24 h in the presence of 0, 0.1, 1 or 10 µM of 2,3-MDPU. After treatment, shoots were transferred to basal rooting medium for 1 month.

Table 2. Effect of the presence of 3,4-MDPU during the auxin induction period on the quality of rooted shoots. Shoots of clone P2 were treated with 25 µM IBA plus 3,4-MDPU for 5 days in darkness and then transferred to basal rooting medium under light conditions. Values are means ± standard error.

3,4-MDPU (µM)	Shoot Tip Necrosis (%)	Shoot Growth Resumption (%)
0 µM	88.9 ± 11.1[a]	4.2 ± 4.2[c]
0.1 µM	63.9 ± 5.6[a]	56.6 ± 0.5[b]
1 µM	72.2 ± 7.4[a]	53.5 ± 10.8[b]
10 µM	55.6 ± 20.0[a]	85.8 ± 8.7[a]

[1] For each variable, the values indicated by the same letter are not significantly different (Tukey-b test).

Table 3. Effect of the presence of 3,4-MDPU during the auxin induction period on the quality of rooted shoots. Shoots of oak were treated with 75 µM IBA plus 3,4-MDPU for 24 h and then transferred to basal rooting medium. Values are means ± standard error.

3,4-MDPU (µM)	Shoot Tip Necrosis (%)	Shoot Growth Resumption (%)
0 µM	46.8 ± 1.9[a]	10.0 ± 1.1[c]
0.1 µM	30.7 ± 2.1[b]	30.7 ± 2.6[b]
1 µM	15.5 ± 3.8[c]	51.7 ± 4.4[a]
10 µM	8.3 ± 3.8[c]	67.2 ± 5.1[a]

[1]For each variable, the values indicated by the same letter are not significantly different (Tukey-b test).

The effect on AR of the presence of the MDPUs and the period application was also explored in chestnut microshoots subjected to the quick dip treatment. Auxin-treated shoots (P1 and P2) were incubated for 24 h or one month in BRM supplemented or not with MDPUs. Regardless of the treatment, rooting percentage was not significantly affected by the presence of MDPUs (Fig. 7), although slight differences were observed depending on which MDPU compound was used. Continuous exposure of shoots to 2,3-MDPU promoted initiation of roots at the shoot base and lateral root development (Fig. 8). These beneficial effects, particularly the increase in the number and length of the lateral roots, were also observed in shoots treated with 3,4-MDPU for only 24 h (Fig. 9). In general, the low auxin dip (2450 µM; Fig. 9A) produced healthier shoots but fewer roots than the high auxin dip (4900 µM; Fig. 9B). As previously described for the 24 h-IBA

Downloaded from Brill.com11/14/2020 01:15:24PM
via University of Gothenburg



Figure 4. Shoots of (A-D) clone P1 and (E-H) clone P2 treated with 75 µM IBA for 24 h in the presence of 0, 0.1, 1 or 10 µM of 3,4-MDPU. After treatment, shoots were transferred to basal rooting medium for 1 month.

treatments, the shoot quality of rooted shoots was always improved by the presence of MDPUs.

Figure 10 shows the results of the histological study carried out to evaluate at the cellular level the effect of the presence of 3,4-MDPU on the initiation of adventitious roots. Root formation in chestnut occurred as previously described by Ballester et al. (1999). First cell divisions leading to the root primordia took place in the cambium and the adjacent phloem cells. On day 5, meristemoids and root primordia were observed in shoots treated with IBA as well as in shoots treated with IBA plus 3,4-MDPU. However, in root initials cell division appeared to occur earlier in the presence of 3,4-MDPU, as more advanced and larger root primordia were observed relative to control sections (Fig. 10A-D). Examination of serial sections taken at the same distance from the basal callus (1000-1200 µm above the base of the shoot) revealed that the number of root primordia visible in sections from IBA treated shoots was about half (Fig. 10A) that observed in shoots treated with the highest concentration of 3,4-MDPU (Fig. 10C). 3,4-MDPU therefore promotes

Downloaded from Brill.com11/14/2020 01:15:24PM
via University of Gothenburg

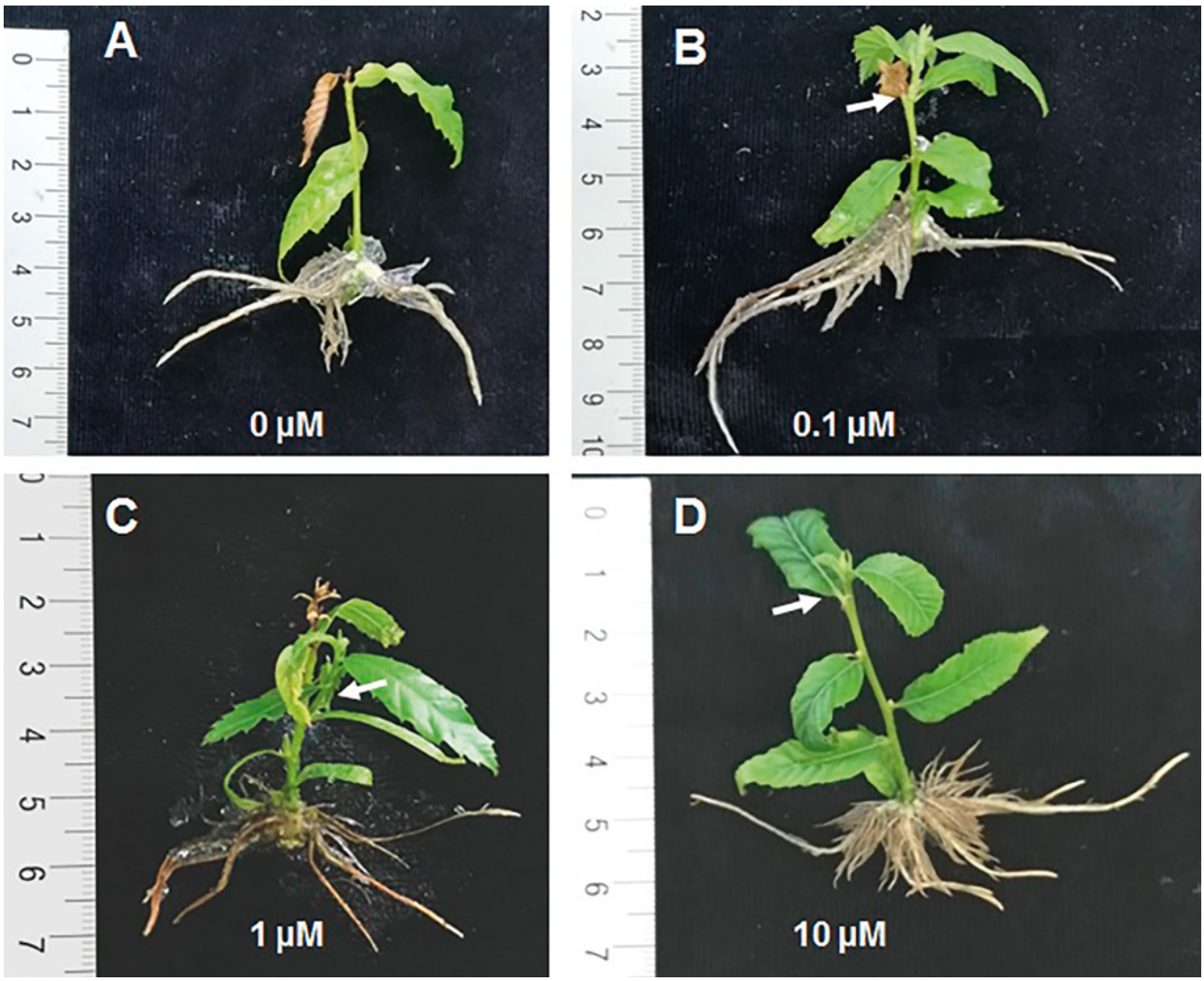


Figure 5. Root development of P2 shoots treated with 25 µM IBA in the presence of (A) 0 µM, (B) 0.1 µM, (C) 1 µM and (D) 10 µM 3,4-MDPU for 5 days. Shoots were then transferred to basal rooting medium for 25 days.

more synchronous rooting, which takes place at the basal part of the shoot. Root primordia initiated at the basal end of the shoot were only observed in sections of shoots treated with IBA plus 3,4-MDPU. The activity of MDPUs in initiating roots at the shoot base was also evident when shoots were rooted in the continuous presence of 2,3-MDPU (Fig. 8). The root system architecture thus appears to be modulated by the presence of MDPUs.

Discussion

The rooting stage is the main bottleneck in the clonal propagation of selected genotypes, either by cuttings or by *in vitro* culture, particularly in tree species recalcitrant to forming roots. Establishing the optimal conditions for inducing ARs is an important step in propagation methods and research protocols. In addition, a significant loss of plants produced by tissue culture occurs at the acclimatization stage. Therefore, to obtain high survival rates during acclimatization it is essential to produce a number of vigorous plantlets with a well-developed root system.

In order to improve the rooting responses in chestnut and oak microshoots, in terms of rooting percentage, root system and plant quality, we first analyzed the effect of auxin concentration and application method. High rooting percentages were achieved in the two species by modulating these factors (Table 1). Two common strategies are used to

Downloaded from Brill.com11/14/2020 01:15:24PM
via University of Gothenburg

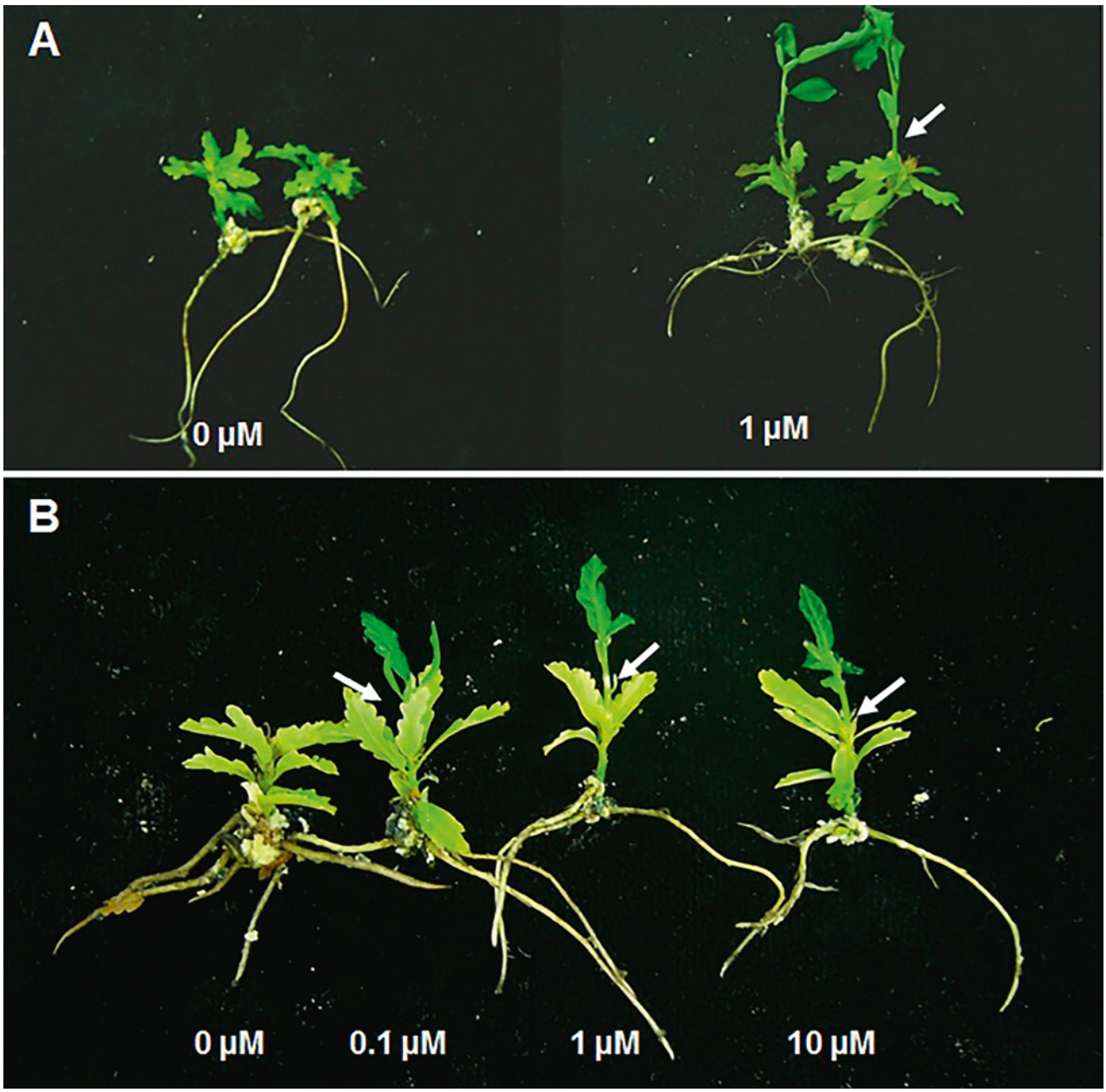


Figure 6. Shoots of oak treated with 75 µM IBA for 24 h in the presence of the indicated concentrations of (A) 2,3-MDPU or (B) 3,4-MDPU. Shoots were then transferred to basal rooting medium for one month. The white arrows indicate the new growth.

induce AR in microshoots: a high auxin concentration for a few seconds (5-60 s), and a lower concentration for a longer period (few hours to several days). In chestnut, rooting percentages in juvenile-like P2 shoots achieved using the auxin dip treatment were similar to those previously reported by Sánchez and Vieitez (1991) for the same treatment, indicating a very stable feature in this clone through almost three decades of *in vitro* culture. Basal dip treatments with two concentrations of IBA have been used for rooting different genotypes of American chestnut microcuttings (Xing et al. 1997). These authors concluded that the concentration of IBA should be optimized for each genotype.

In our study there were no differences in rooting frequency in the two clones of chestnut in response to the same IBA treatment (dipping or 24 h/75 µM, Table I A-B). These data are consistent with previous results achieved during the induction of ARs in both clones (Sánchez and Vieitez 1991). Donor trees (80 years old) of clones P1 and P2 were derived from seeds and located in the same natural population, at a short distance

Downloaded from Brill.com11/14/2020 01:15:24PM
via University of Gothenburg

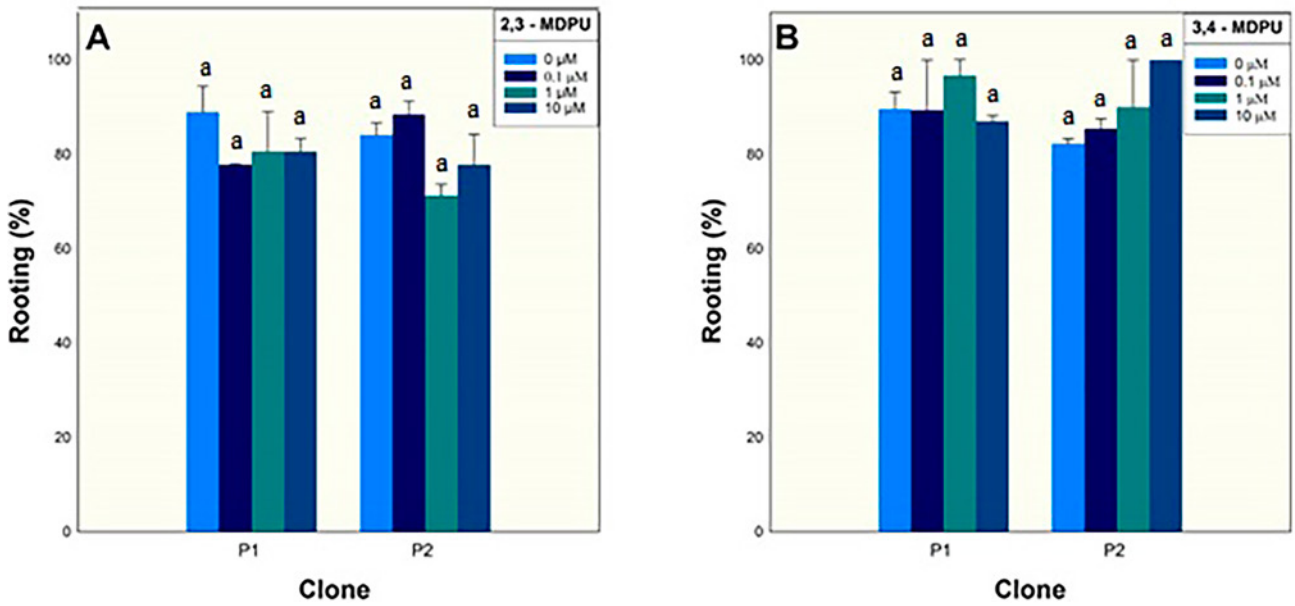


Figure 7. Effect of the presence of MDPU on the rooting percentage in P1 and P2 chestnut shoots dipped in 4900 µM IBA for 1 min and then placed in basal rooting medium containing (A) 2,3-MDPU or (B) 3,4-MDPU for 1 month. For each clone, different letters indicate significant differences (Kruskal Wallis test).

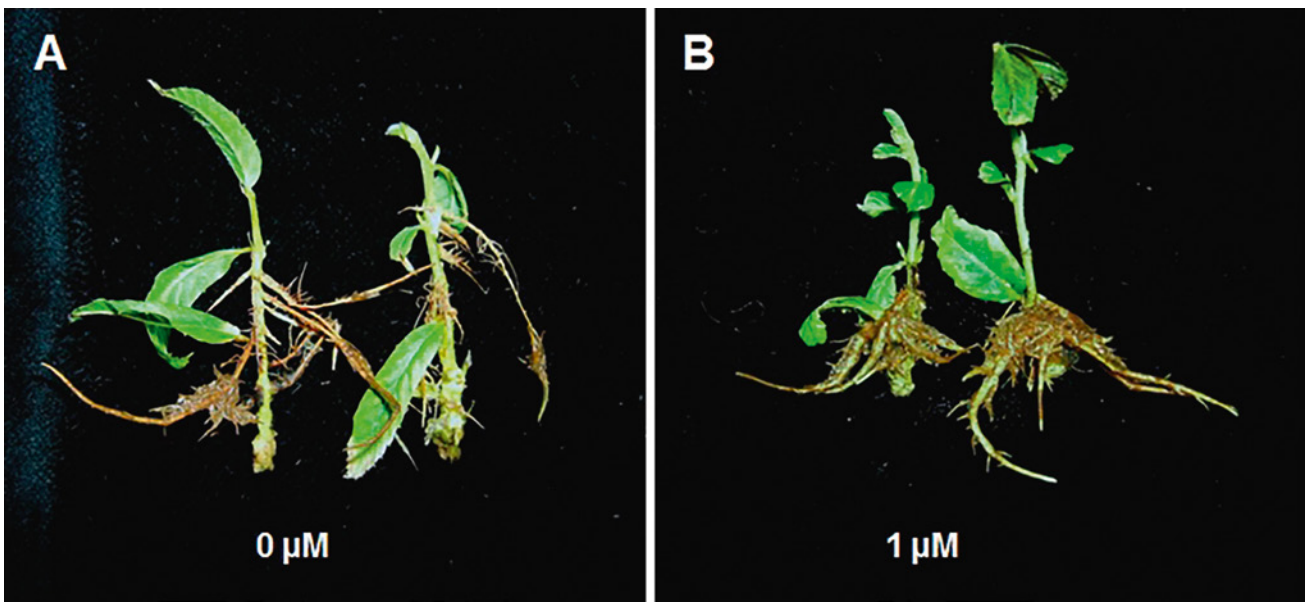


Figure 8. Effect of the continuous presence of 2,3-MDPU in the rooting medium on the root system architecture of chestnut shoots. Microshoots were treated with 4900 µM IBA for 1 min and then placed in basal rooting medium supplemented with (A) 0 µM or (B) 1 µM of MDPU for 1 month.

from each other (6 m). The similar rooting responses of microshoots initiated from these trees suggest a close genotypic relationship, at least for the rooting competence trait. By contrast, the rooting responses of several clones of chestnut reported by Sánchez et al. (1997b) were lower than obtained in clones P1 and P2 for the same treatment. These differences are probably a consequence of the genotype effect on the rooting ability (Bonga 1987). The effect of the genotype on rooting performance of microshoots has previously been documented in oak and american chestnut (Vieitez et al. 1994; Xing et al. 1997).

Several studies have shown that excess auxin can have a detrimental effect on the rooting frequency or the number of roots obtained. For instance, the application of 15 µM IBA for 3 days was the best treatment

Downloaded from Brill.com11/14/2020 01:15:24PM
via University of Gothenburg



Figure 9. Root development in chestnut shoots treated with (A) 2450 µM or (B) 4900 µM IBA and placed in rooting medium supplemented with the indicated concentrations of 3,4-MDPU for 24 h. Shoots were then transferred to basal rooting medium for 1 month. The white arrows indicate adventitious roots that developed along the stem.

for root induction in peach, whereas higher concentrations of hormone and longer exposure times produced a lower rooting percentage and induced the formation of more callus (Park et al. 2017). Indeed, long exposure to hormones can have a negative effect, as auxins inhibit the initiation phase of the rooting process (De Klerk et al. 1999). In peach, cuttings failed to root at IBA concentrations higher than 1250 µM, which may have been a consequence of the duration of the application period (Tworkosky and Takeda 2007). Basal dipping of persimmon cuttings with 10 mM produced the highest rooting frequency, whereas number of roots increased with increasing IBA concentrations up to 25 mM (Hejazi et al. 2018). Similarly, the number of roots was increased by increasing the IBA concentration in the quick auxin dip method, but this treatment reduced the longest root length (Table 1B).

High auxin concentration may be detrimental to plantlet quality, by promoting root formation along the stem and shoot tip necrosis. In chestnut, shoot tip necrosis has been reduced by the localized application of cytokinin during the rooting period or by including the cytokinin in the rooting medium (Vieitez et al.

Downloaded from Brill.com11/14/2020 01:15:24PM
via University of Gothenburg

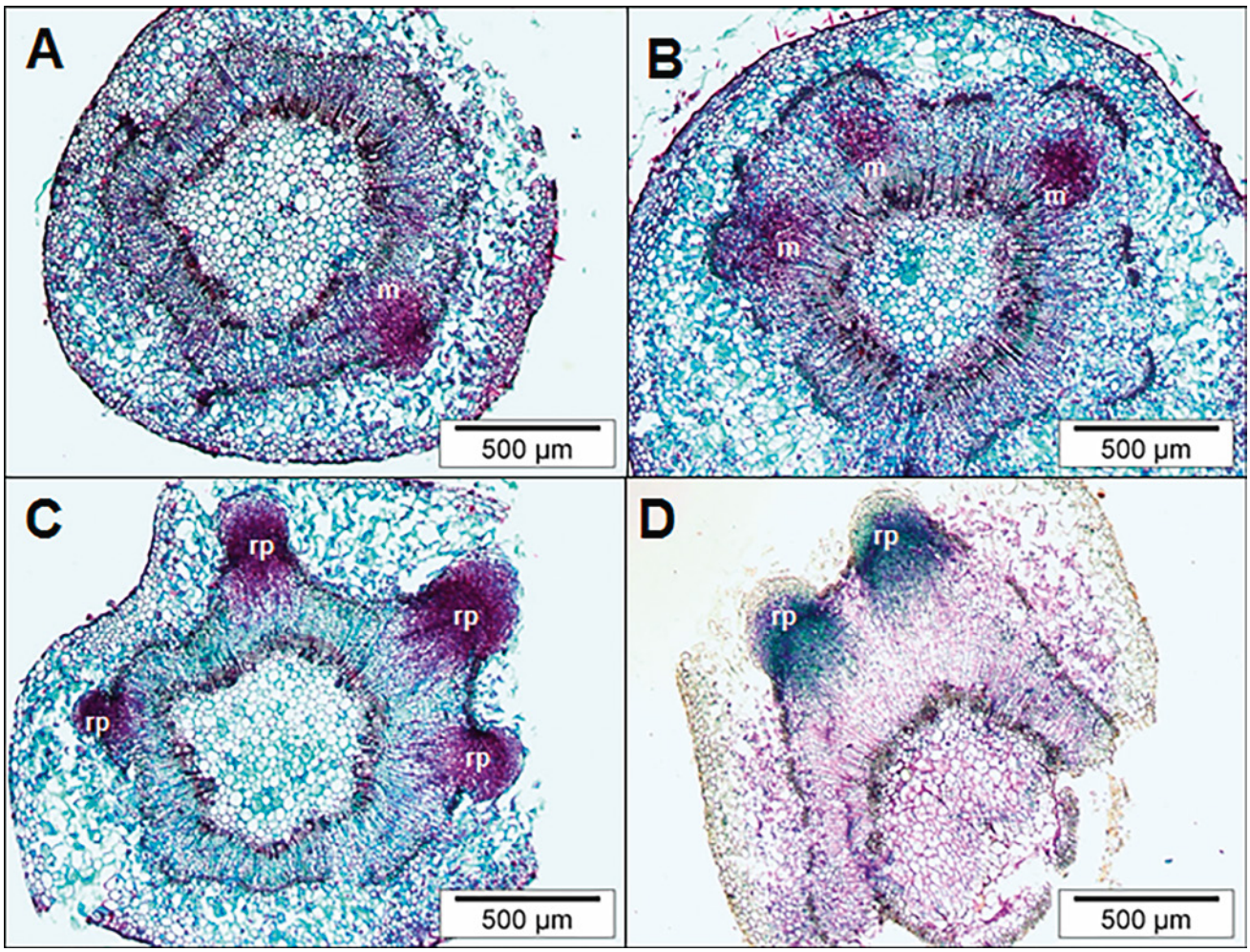


Figure 10. Root meristem development in chestnut microshoots treated with 4900 µM IBA for 1 min and subsequently transferred to basal rooting medium with (A) 0 µM, (B) 1 µM or (C, D) 10 µM 3,4-MDPU. Transverse sections were obtained on day 5 after root inductive treatment and (A, B, C) 1000-1200 µm further away from the basal end of the shoot or (D) at the basal end of the shoots. m, meristemoid; rp, root primordium.

1989; Xing et al. 1997). Moreover, the addition of ascorbic acid to the rooting medium improved the quality of rooted plantlets and reduced shoot tip necrosis (Lê 2001). In chestnut, the method of auxin application seems to be important for obtaining healthy plantlets that survive after transfer to soil. Relatively low IBA concentrations for an extended application period (5 days) produced the best results in terms of rooting percentage and plantlet quality. For the 24-h IBA treatment, rooting parameters were positively affected by auxin in a dose-dependent manner in chestnut, but not in oak (Table 1), indicating a species-dependent effect of IBA concentration on AR. A positive effect of auxin concentration on AR was also observed in red oak (Sánchez et al. 1996). On the other hand, the highest rooting percentage induced in oak by 125 µM IBA was similar to that reported by Vidal et al. (2003) for the same clone and treatment. The rooting ability of the oak clone has therefore been kept stable for almost two decades of *in vitro* culture.

On the basis of our results, and regardless of the application method, rooting percentage generally increased with increasing IBA concentration (Table 1). Similarly, a strong relationship has been observed between the concentration of auxin and rooting frequency in cuttings of *Azadiratcha indica* (Gehlot et al. 2014). However, the auxin application method is also important because it affected the rooting response and the quality of the rooted plantlets. Nonetheless, a balance must be established between the improvement in rooting frequency and the health status of the microshoots. The use of sub-optimal IBA treatments provided us with the opportunity to examine the putative effects of MDPUs on rooting.

AR is a developmental program divided into three major phases, i.e. induction, initiation and expression,

Downloaded from Brill.com11/14/2020 01:15:24PM
via University of Gothenburg

each of which has specific hormonal requirements (De Klerk et al. 1999; Bellini et al. 2014; reviewed in Geiss et al. 2009). Nonetheless, in recalcitrant forest species an additional dedifferentiation step (sometimes called activation) is generally included at the early steps of the rooting process. This involves a switch in the identity of initial cells, which become capable of responding to exogenous stimuli in a root developmental pathway (Abarca and Díaz-Sala 2009). Although auxins are known to be master regulators of this process, several hormones influence the process through their own activity and their interactions with auxin, generating a complex hormonal crosstalk that impacts homeostasis and signalling of the hormones involved (Lakehal and Bellini 2019). Cytokinin, a known inhibitor of AR and lateral root development (Steffens and Rasmussen 2016; Jing and Strader 2019), interacts at many levels with auxin depending on the tissue and context in which they are located (Chandler and Werr 2015).

Urea derivatives have been described as rooting adjuvants as they enhance adventitious root formation in mung bean shoots and apple microshoots (Ricci et al. 2006). Root formation on stem slices of apple was enhanced when roots were induced in the presence of 2,3-MDPU and 3,4-MDPU in combination with suboptimal IBA concentrations (Ricci et al. 2003). The effect of MDPUs on AR in oak and chestnut was thus tested in combination with different auxin concentrations.

In our experimental systems, these compounds did not enhance the rooting percentage in shoots treated with IBA alone, but improved the general appearance of rooted shoots. Furthermore, MDPUs promoted the initiation of ARs at the cutting site, particularly in shoots treated by basal dipping in IBA. Auxin-responsive cells are generally located in the cambial and vascular tissues and are capable of generating root primordia at the shoot base as well as along the shoot stem (Fig. 1B). The presence of ARs in the upper part of the IBA-treated shoots indicates that the auxin stimulus has reached those cells. On the other hand, the effect of MDPUs promoting the initiation of ARs at the base of IBA-treated microshoots (Fig. 8 and 9) suggests that their activity is linked to the auxin transport machinery and the auxin/cytokinin interaction. It is possible that MDPUs act by modulating exogenous auxin transport, but without perturbing the basipetal transport of endogenous auxin from the leaves and buds towards the base of the stem. The putative role of other urea derivatives during AR has been related to the auxin gradients or auxin distribution in specific cells from which root primordia originate, preventing callus formation (Brunoni et al. 2014). However, the effect of urea derivatives on rooting seems to be highly dependent on the dose of the compound as well as the concentration of auxin.

The presence of MDPUs reduced the symptoms of shoot tip necrosis and promoted resumption of growth, the latter particularly in the oak shoots (Table 3, Figs. 5 and 6). In apple, shoot tip necrosis has been associated with low levels of endogenous hormones (Kataeva et al. 1991). Moreover, the incidence of shoot tip necrosis seems to be related to the transport and inner distribution of cytokinins (Bairu et al. 2011). Urea derivatives may therefore influence auxin/cytokinin crosstalk through their transport machineries, enabling auxin to reach maximum levels at the root initial cells and at the same time facilitating cytokinin transport towards the apex by a transport system that is not yet completely defined (Durán-Medina et al. 2017). In fact, callus-like structures generated during *in vitro* rooting are considered cytokinin sinks (Viéitez et al. 1989).

In the present study, the effect of the urea derivatives varied according to the urea derivative, the auxin concentration and the tree species considered. Different auxins applied for different lengths of time can have drastically different effects on the *in vitro* rooting performance of the explants. For instance, Tereso et al. (2008) reported contrasting results for rooting percentages produced in response to different auxins and different exposure times in almond shoots. As observed in Arabidopsis hypocotyls, changes in the auxin concentration also affect callus formation (Da Costa et al. 2018). The auxin responsive machinery has the potential to confer quantitatively different responses to varying auxin concentrations and to different auxins (Weijers and Wagner 2016). Our results showed that the effects of auxin concentration on rooting responses were modulated differently by the two MDPUs depending on the treatments.

Overall the results showed that MDPUs improved the quality of rooted plantlets, promoted development of the lateral root system and may prevent formation of basal callus (Figs. 5, 6 and 9). Regardless of the application period (24 h, 5 days or one month), MDPU treatments induced the formation of a greater number of lateral roots on adventitious roots in chestnut microshoots (Figs. 4, 5 and 8). The presence of more lateral roots indicates improved auxin transport

Downloaded from Brill.com11/14/2020 01:15:24PM
via University of Gothenburg

in the new generated roots, again indicating the putative effect of MDPUs on auxin transport. An improved root system with many lateral roots and without callus formation was reported during AR of *Capparis spinosa* microcuttings in the presence of auxin and 2,3-MDPU and 3,4-MDPU (Carra et al. 2012). In chestnut, callus formation at the shoot base was reduced at high concentrations (1-10 µM) of MDPUs, but the effect was dependent on the auxin concentration. Although callus formation was negatively correlated with rooting percentage in chestnut and other species (Dantas et al. 2016), in the experimental system used here the presence of callus did not have a detrimental effect on rooting percentage.

In chestnut microshoots, MDPUs induced early cell divisions in root initials in IBA-treated shoots, during the first 24 h when first cell divisions occurred in response to auxin (Ballester et al. 1999; Vidal et al. 2003). Inhibition of callus formation on the shoots treated with MDPUs probably takes place within the same time frame. Callus formation is a common response to wounding in plant tissues, and it often occurs simultaneously to AR (Steffens and Rasmussen 2016). Moreover, in Arabidopsis, the initial stages of callus formation recapitulate the same steps as lateral root formation (reviewed in Sugimoto et al. 2011). Thus, it appears that auxin induction triggers both developmental programs but that MDPU activity promotes the AR program to displace the callus program, probably by restricting the auxin response within specific cells. Ricci et al. (2016) reported the dual morphogenetic role (adventitious root formation or xylogenesis) of urea derivatives, depending on the presence of auxin (Ricci et al. 2016). In addition, MDPUs induce localized areas of cell divisions in IBA-treated pine cuttings (Ricci et al. 2008), which is consistent with the observations in chestnut microshoots (Fig. 10).

In conclusion, *in vitro* rooting of chestnut and oak microshoots was optimized by treating the shoots with 25 µM IBA for 5 days or with 125 µM IBA for 24 h, respectively. Urea derivative treatments improved the rooting response in chestnut and oak microshoots in different ways that depended on the auxin treatment and the tree species. Major effects were the improved quality of the root system due to the synchronous initiation of root primordia at the shoot base and a more developed lateral root system. Resumption of growth of the oak microshoots indicated the positive effect of MDPUs on the overall health status of the plantlets. We believe that the mode of action of these urea derivatives is related to the auxin transport machinery and probably to improved endogenous cytokinin homeostasis in the shoots.

Acknowledgments

This work was partially funded by the Xunta de Galicia through the Contrato Programa 2016-2018 and the project IN607A 2017/6.

References

Abarca, D., Díaz-Sala, C. (2009). Reprogramming adult cells during organ regeneration in forest species. *Plant Signal. Behav*. 4(8): 793–795. DOI: 10.4161/psb.4.8.9238.

Abu-Zabra, T.R., Hasan, M.K., Hasan, H.S. (2012). Effect of different auxin concentrations on Virginia Creeper (*Parthenocissus quinquefolia*) rooting. World Appl. Sci. J. 16: 07–10.

Bairu, M.W., Novák, O., Doležal, K., van Staden, J. (2011). Changes in endogenous cytokinin profiles in micropropagated *Harpagophytum procumbens* in relation to shoot-tip necrosis and cytokinin treatments. *Plant Growth Regul.* 63: 105–114. DOI: 10.1007/s10725-010-9558-6.

Ballester, A., Sanchez, M.C., Vieitez, A. (1989). Etiolation as a pretreatment for in vitro establishment and multiplication of mature chestnut. *Physiol. Plant*.77: 395–400.

Ballester, A., San-José, M.C., Vidal, N., Fernández-Lorenzo, J.L., Vieitez, A.M. (1999). Anatomical and biochemical events during *in vitro* rooting of microcuttings from juvenile and mature phases of chestnut. *Ann. Bot.* 83: 619–629. DOI: 10.1006/anbo.1999.0865.

Ballester, A., Vidal, N., Vieitez, A.M. (2009). Developmental stages during in vitro rooting of harwood trees from material with jvenile and mature characteristics. In: A. Niemi and K. And Scagel, C., eds., *Adventitious root formation of forest trees and horticultural plants-from genes to applications*. Kerala: Research Signpost, pp. 277–296.

Bellini, C., Pacurar, D., I. Perrone (2014). Adventitious Roots and Lateral Roots: Similarities and Differences. *Annual Review of Plant Biology*. 65(1): 639–666. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050213-035645.

Biricolti, S., Fabbri, A., Ferrini, F., Pisani, P.L. (1994) Adventitious rooting in chestnut: and anatomical investigation. *Sci. Hortic*. 59:197–205.

Bonga, J.M. (1987). Clonal propagation of mature trees: problems and possible solutions. In: J.M. Bonga and D.J. Durzan, eds., *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, pp. 249–271. DOI: 10.1007/978-94-017-0994-1_15.

Brunoni, F., Rolli, E., Dramis, L., Incerti, M., Abarca, D., Pizarro, A., Diaz-Sala, C., Ricci, A. (2014). Adventitious rooting adjuvant activity of 1,3-di(benzo[d]oxazol-5-yl)urea and 1,3-di(benzo[d]oxazol-6-yl)urea: New insights and

Downloaded from Brill.com11/14/2020 01:15:24PM
via University of Gothenburg

perspectives. *Plant Cell. Tissue Organ Cult*. 118: 111–124. DOI: 10.1007/s11240-014-0466-8.

Caglar G., Caglar, S., Erguin, O. Yarim, M. (2005). The influence of growth regulators on shoot proliferation and rooting of in vitro propagated ccaper. *J. Envirom. Biol.* 26:479–485.

Carra, A., De Pasquale, F., Ricci, A., Carimi, F. (2006). Diphenylurea derivatives induce somatic embryogenesis in *Citrus*. *Plant Cell. Tissue Organ Cult*. 87: 41–48. DOI: 10.1007/s11240-006-9132-0.

Carra, A., Del Signore, M.B., Sottile, F., Ricci, A., Carimi, F. (2012). Potential use of new diphenylurea derivatives in micropropagation of *Capparis spinosa* L. *Plant Growth Regul.* 66: 229–237. DOI: 10.1007/s10725-011-9645-3.

Chalupa, V. (1988). Large scale micropropagation of *Quercus robur* L. using adenine-type cytokinins and thidiazuron to stimulate shoot proliferation. *Biol. Plant*. 30: 414–421. DOI: 10.1007/BF02890509.

Chandler, J.W., Werr, W. (2015). Cytokinin-auxin crosstalk in cell type specification. *Trends Plant Sci.* 20(5): 291–300. DOI: 10.1016/j.tplants.2015.02.003.

Da Costa, C.T., Gaeta, M.L., Ernesto, D.A., *et al.* (2018). Comparative adventitious root development in pre-etiolated and flooded Arabidopsis hypocotyls exposed to different auxins. *Plant Physiol. Biochem*. 127:161–168. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.03.022.

Dantas, Â.K., Majada, J., Dantas, F.K., Delatorre, C., Granda, V., Vallejo, P., Feito, I. (2016). Rooting of Minicuttings of *Castanea sativa* Mill. Hybrid clones. *Revista Árvore, Viçosa-MG*, 40: 465–475. DOI: 10.1590/0100-67622016000300010.

De Almeida, M.R., Bastiani, D., Gaeta, M.L., Mariath, J.E.A., De Costa, F., Retallick, J., *et al.* (2015). Comparative transcriptional analysis provides insights into the molecular basis of adventitious rooting recalcitrance in *Eucalyptus*. *Plant Sci.* 239: 155–165. DOI: 10.1016/j.plantsci.2015.07.022.

De Klerk, G.J., Van der Krieken, W., de Jong, J.C. (1999). The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 35: 189–199. DOI: 10.1007/s11627-999-0076-z.

Duran-Medina, Y., Diaz-Ramirez, D., Marsch-Martinez, N. (2017). Cytokinins on the Move. *Front. Plant Sci.* 8: 146. DOI: 10.3389/fpls.2017.00146.

Gehlot, A., Gupta, R.K., Arya, I.D., Arya, S., Tripathi, A. (2014). De novo Adventitious Root Formations (ARF) in mini-cuttings of *Azadirachta indica* in response to different rooting media and auxin treatments. *iForest* 8: 558–564. DOI: 10.3832/ifor1189-007.

Geiss, G., Gutierrez, L., Bellini, C. (2009). Adventitious Root Formation: New Insights and Perspectives. In: Beeckman, T., ed., *Annual Plant Reviews – Root Development*. Wiley-Blackwell, 37: 127–156. DOI: 10.1002/9781119312994.apr0400.

Ghosh, A., Igamberdiev, A.U., Debnath, S.C. (2018). Thidiazuron-induced somatic embryogenesis and changes of antioxidant properties in tissue cultures of half-high blueberry plants. *Sci. Rep.* 8:16978. DOI: 10.1038/s41598-018-35233-6.

Gresshoff, P.M., Doy, C.H. (1972). Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*. *Planta* 107: 161–170. DOI: 10.1007/BF00387721.

Gonçalves, J.C., Diogo, G., Amancio, S. (1998). In vitro propagation of chestnut (*Castanea sativa* x *C. crenata*): Effects of rooting treatments on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during adventitious root formation. *Sci. Hortic.* 72: 265–275.

Gonçalves, J.C., Diogo, G., Coelho, M.T., N. Vidal, Amâncio, S. (2000). Adventitious rooting in microshoots of chestnut hybrid (*Castanea sativa* x *C. crenata*) in the presence of indole-3-butyric acid: The role of changes in endogenous indole-3-acetic acid, indole-3-acetylaspartic acid and indole-3-butyric acid levels. In: *Book of Abstracts: Third Symposium on Adventitious Root Formation*. The Netherlands: Veldhoven, pp. 1–8.

Gonçalves, J.C., Diogo, G., Coelho, M.T., N. Vidal, Amâncio, S. (2008). Quantitation of endogenous levels of IAA, IAAsp and IBA in micro-propagated shoots of hybrid chestnut pretreated with IBA. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 44:412–418. DOI 10.1007/s11627-008-9151-0.

Gonin, M., Bergougnoux, V., Nguyen, T.D., Gantet, P., A. Champion (2019). What Makes Adventitious Roots?. *Plants* 8:240. DOI:10.3390/plants8070240.

Hejazi, Z., Ishimura, S., Honsho, C., T. Tetsumura (2018). Effect of planting time, irrigation system, rooting media and IBA concentration on cutting propagation of the persimmon dwarfing rootstock 'MKR1'**.** *Hort. J.* 87(2): 184–192. DOI: 10.2503/hortj.OKD-125.

Huang, Z.C., F.H. Zengh, X.Y. Lu (2010) Efficient regeneration of *Eucalyptus urophylla* from seedling-derived hypocotyls. *Biol. Plant*. 54 (1): 131–134.

Jensen, W.A. (1962). Botanical histochemistry: principles and practice. W.H. Freeman, San Francisco, CA (USA) 408 p.

Jing, H., Strader, L.C. (2019). Interplay of auxin and cytokinin in lateral root development. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 486. DOI: 10.3390/ijŠms20030486.

Kataeva, N.V., Alexandrova, I.G:, Butenko, R.G., Dragavtceva, E.V. (1991). Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 27: 149–154.

Khan, H., Siddique, I., Anis, M. (2006). Thidiazuron induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Capsicum anuum*. *Biol. Plant*. 50: 789–792. DOI: 10.1007/s10535-006-0133-y.

Lakehal, A., Bellini, C. (2019). Control of adventitious root formation: insights into synergistic and antagonistic hormonal interactions. *Physiol. Plant.* 165: 90–100. DOI: 10.1111/ppl.12823.

Lê C. (2001). Factors inflencing *in vitro* rooting of chestnut. *For. Snow Landsc. Res*. 76 (3): 468–471.

Osterc, G., Štefančič, M., Solar, A., A. Štampar (2006). The effect of severance date and rooting ability of chestnut cuttings in associated changes in phenoliccontent during adventitious root formation. *Phyton*, 46: 285–294.

Park, S.H., Elhiti, M., Wang, H., Xu, A., Brown, D., Wang, A. (2017). Adventitious root formation of *in vitro* peach shoots is regulated by auxin and ethylene. *Sci. Hortic.* 226: 250–260. DOI: 10.1016/j.scienta.2017.08.053.

Patial, V., M. Sharma, Bhattacharya, A. (2017) Potential of thidiazuron in improved micropropagation of *Picrorhiza*

Downloaded from Brill.com11/14/2020 01:15:24PM
via University of Gothenburg

kurroa– an endangered medicinal herb of alpine Himalaya, Plant Biosystems – *An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 151:4, 729–736, DOI: 10.1080/11263504.2016.1219417.

Ricci, A., Bertoletti, C. (2009). Urea derivatives on the move: cytokinin-like activity and adventitious rooting enhancement dependent on chemical structure. *Plant Biology* 11: 262–272. DOI: 10.1111/j.1438-8677.2008.00165.x.

Ricci, A., Carra, A., Rolli, E., Bertoletti, C., Branca, C. (2003). N,N′-bis-(2,3-methylenedioxyphenyl)urea and N,N′-bis-(3,4-methylenedioxyphenyl)urea interact with auxin in enhancing root formation of M26 apple (*Malus pumila* Mill.) stem slices. *Plant Growth Regul.* 40: 207–212. DOI: 10.1023/A:1025045213739.

Ricci, A., Carra, A., Torelli, A., Maggiali, C.A., Morini, G., Branca, C. (2001). Cytokinin-like activity of N,N′-diphenylureas. N,N′-bis-(2,3-methylenedioxyphenyl)urea and N,N′-bis-(3,4-methylenedioxyphenyl)urea enhance adventitious root formation in apple rootstock M26 (*Malus pumila* Mill.). *Plant Sci.* 160: 1055–1065. DOI: 10.1016/S0168-9452(01)00359-4.

Ricci, A., Rolli, E., Dramis, L., Diaz-Sala, C. (2008). N,N′-bis-(2, 3 Methylenedioxyphenyl)urea and N,N-′bis-(3,4methylenedioxyphenyl)urea enhance adventitious rooting in *Pinus radiata* and affect expression of genes induced during adventitious rooting in the presence of exogenous auxin. *Plant Sci.* 175(3): 356–363. DOI: 10.1016/j.plantsci.2008.05.009.

Ricci, A., Rolli, E., Brunoni, F., Dramis, L., Sacco, E., Fattorini, L. et al. (2016). 1,3-di(benzo[d]oxazol-5-yl)urea acts as either adventitious rooting adjuvant or xylogenesis enhancer in carob and pine microcuttings depending on the presence/absence of exogenous indole-3-butyric acid. *Plant Cell Tiss. Organ Cult*. (2016) 126:411–427. DOI 10.1007/s11240-016-1010-9.

Riemenschneider, D.E. (1993) Genomic manipulation of plant materials or adventitious rooting research. In: T.D. Davis and B.E. Haissig eds., *Biology of adventitious root formation*. New York: Plenum, pp. 61–76.

San-José, M.C., Ballester, A., Vieitez, A.M. (1988). Factors affecting *in vitro* propagation of *Quercus robur* L. *Tree Physiol.* 4: 281–290. DOI: 10.1093/treephys/4.3.281.

Sánchez, M.C., Ballester, A., Vieitez, A. (1997a). Reinvigoration treatments for the micropropagation of mature chestnut trees. *Ann. Sci. For*. 54: 359–370.

Sánchez, M.C., San-José, M.C., Ballester, A., Vieitez, A.M. (1996). Requirements for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Q. rubra* shoots derived from mature trees. *Tree Physiol.* 16: 673–680. DOI: 10.1093/treephys/16.8.673.

Sánchez, M.C., San-José, M.C., Ferro, E., Ballester, A., Vieitez, A.M. (1997b). Improving micropropagation conditions for adult-phase shoots of chestnut. *J. Hortic. Sci.* 72: 433–443. DOI: 10.1080/14620316.1997.11515531.

Sánchez, M.C., Vieitez, A.M. (1991). *In vitro* morphogenetic competence of basal sprouts and crown branches of mature chestnut. *Tree Physiol.* 8: 59–70. DOI: 10.1093/treephys/8.1.59.

Steffens, B., Rasmussen, A. (2016). The Physiology of Adventitious Roots. *Plant Physiol.* 170: 603–617. DOI: 10.1104/pp.15.01360.

Singh, P., Dwivedi, P. (2014). Two-stage culture procedure using thidiazuron for efficient micropropagation of S*tevia rebaudiana*, an anti-diabetic medicinal herb. *Biotech*. 4 (4):431–437. DOI:10.1007/s13205-013-0172-y.

Sugimoto, K., Gordon, S.P., E.M. Meyerowitz (2011). Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends Cell Biol*. 21: 212–218. DOI: 10.1016/j.tcb.2010.12.004.

Tereso, S., Miguel, C.M., Mascarenhas, M., Roque, A., Trindade, H., Maroco, J., Oliveira, M.M. (2008). Improved *in vitro* rooting of *Prunus dulcis* Mill. Cultivars. *Biol. Plant* 52: 437–444. DOI: 10.1007/s10535-008-0088-2.

Tworkoski, T., Takeda, F. (2007). Rooting response of shoot cuttings from three peach growth habits. *Sci. Hortic.* 115: 98–100. DOI: 10.1016/j.scienta.2007.08.004.

Vidal, N., Arellano, G., San-José, M.C., Vieitez, A., Ballester, A. (2003). Developmental stages during the rooting of *in-vitro*-cultured *Quercus robur* shoots from material of juvenile and mature origin. *Tree Physiol*. 23: 1247–1254. DOI: 10.1093/treephys/23.18.1247.

Vieitez, A.M., San-José, M.C., Vieitez, E. (1985). *In vitro* plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur* L. *J Hort Sci* 60: 99–106. DOI: 10.1080/14620316.1985.11515607.

Vieitez, A.M., Sánchez, M.C., J.B. Amo-Marco, Ballester, A. (1994). Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 37: 287–295. DOI: 10.1007/BF00042342.

Vieitez, A.M., Sánchez, M.C., García-Nimo, M.L., Ballester, A. (2007). Protocol for micropropagation of *Castanea sativa.* In: *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Jain, S.M. and Hägmann, H. (eds). Springer, Dordrecht. 299–312. DOI: 10.1007/978-1-4020-6352-7_28.

Vieitez, A.M., Sánchez, C., San-José, M.C. (1989). Prevention of shoot-tip necrosis in shootcultures of chestnut and oak. *Sci. Hortic.* 41: 151–159. DOI: 10.1016/0304-4238(89)90059-9.

Vielba, J.M., Díaz-Sala, C., Ferro, E., Rico, S., Lamprecht, M., Abarca, D., Ballester, A., Sánchez, C. (2011). *CsSCL1* is differentially regulated upon maturation in chestnut microshoots and is specifically expressed in rooting-competent cells. *Tree Physiol.* 31(10): 1152–1160. DOI: 10.1093/treephys/tpr086.

Vielba, J.M., Varas, E., Rico, S., Covelo, P., Sánchez, C. (2016). Auxin-mediated expression of a *GH3* gene in relation to ontogenic state in Chestnut. *Trees - Struct. Funct.* 30(6): 2237–2252. DOI: 10.1007/s00468-016-1449-7.

Weijers, D., Wagner, D. (2016). Transcriptional Responses to the Auxin Hormone. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67: 539–574. DOI: 10.1146/annurev-arplant-043015-112122.

Xing, Z., M.F. Satchwell, Powel, W.A., C.A. Maynard (1997). Micropropagation of American chestnut: increasing rooting rate and preventing shoot-tip necrosis. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 33:43–48.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Downloaded from Brill.com11/14/2020 01:15:24PM
via University of Gothenburg

Pode loitarse contra o declive dos soutos coa micropropagación de exemplares seleccionados, pero para iso cómpre supera-lo estado de recalcitrancia ao enraizamento que desenvolve o castiñeiro durante o cambio de fase. Elaborouse un protocolo abaratado de micropropagación, analizouse o efecto de diversas hormonas (auxinas, xiberelinas e etileno) e compostos (NPA, PBZ, $AgNO_3$, STS, H_2O_2, 3,4-MDPU, EGTA e Charkor) no enraizamento e leváronse a cabo experimentos de transcritómica que identificaron xenes implicados na adquisición da competencia para este proceso. Os resultados indican que as xiberelinas inhiben o enraizamento adventicio en material xuvenil mentres que o etileno é o responsábel desta inhibición no material adulto e, en ambos casos, actúan mediante a interacción co transporte e sinalización das auxinas.