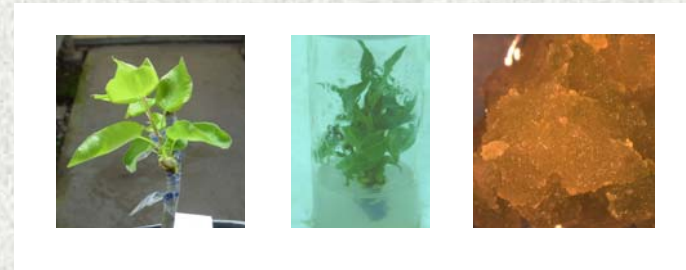


Tesis Doctoral

Caracterización Fisiológica y Bioquímica de
las Respuestas que Intervienen en la
Incompatibilidad de Injerto en
Albaricoquero
(*Prunus armeniaca L.*)



Ana Pina Sobrino
Unidad de Fruticultura, CITA
Universidad de Zaragoza

Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria
de Aragón (CITA).
Zaragoza.
Unidad de Fruticultura.



CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE LAS RESPUESTAS QUE INTERVIENEN EN LA INCOMPATIBILIDAD DE INJERTO EN ALBARICOQUERO (*Prunus armeniaca L.*).

Memoria presentada por Dña. Ana Adoración Pina Sobrino, Licenciada en Bioquímica, para optar al grado de Doctor en Ciencias

Zaragoza, Diciembre 2006.

Dña. M^a PILAR ERREA ABAD, Investigadora del Centro de Tecnología Agroalimentaria del Gobierno de Aragón

CERTIFICA

Que la Tesis Doctoral titulada “Caracterización Fisiológica y Bioquímica de las Respuestas que Intervienen en la Incompatibilidad de Injerto en Albaricoquero (*Prunus armeniaca L.*)”, ha sido realizada por la Licenciada en Bioquímica Dña Ana Adoración Pina Sobrino en la Unidad de Fruticultura del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria del Gobierno de Aragón bajo mi dirección y reúne las condiciones requeridas para optar al Grado de Doctor en Ciencias

Zaragoza, Diciembre de 2006

Fdo. M^a Pilar Errea Abad

A mis padres y hermanas

A mi sobrino Abel

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a la Dra Pilar Errea Abad por su esfuerzo y continúa dedicación en la dirección de esta tesis. Por su buena disposición en todo momento y por el tiempo invertido en mi formación.

A la Dra M^a Luisa Peleato de la Universidad de Zaragoza por sus valiosos y desinteresados consejos durante todos estos años de trabajo.

A las ayudas concedidas por el programa Europa de estancias de investigación, DGA (CONSI+D) y CAI, que han permitido llevar a cabo parte de este trabajo en el laboratorio dirigido por el Dr Schulz en Dinamarca.

I would like to gratefully acknowledge to Dr Alexander Schulz for his valuable support and guidance in part of my PhD. I consider it a privilege to have had the opportunity of learning about cell-to-cell communication in plants with his group during my stays in the department of Plant Biology at the Royal Veterinary and Agricultural University, KVL. I also wish to thank Helle Martens for helping suggestions in the confocal experiments and for stimulating discussions in my work. Finally, I would like to thank Gary Thompson for teaching me the RT-PCR and cloning technique during my first stay in Copenhague and all the people from the Department of Plant Biology.

A todo el personal de la unidad de fruticultura del CITA de los que he recibido ayuda, comprensión y apoyo.

Me gustaría agradecer a Pilar Tomey su excelente trabajo en el establecimiento y propagación del material vegetal in vitro utilizado en este trabajo. También a Rosa Fustero por su ayuda en la realización de los injertos en invernadero y a Teresa por contribuir a que el trabajo en el laboratorio sea más llevadero. Gracias chicas por vuestra ayuda.

A Javier Rodrigo por su amable colaboración en la parte de histología de este trabajo.

A Pilar Bergua por su excelente labor como secretaria y por facilitarnos siempre el papeleo administrativo.

También quisiera expresar un destacado agradecimiento a todos mis compañeros con los que he compartido la sala de becarios en algún momento durante la elaboración de esta tesis: a Javier Sanzol, Afif, Ana Wunsch, Manu, Ossama, Carmen, Jorge, Ariana, Maui y Engracia. Gracias por vuestro ánimo, paciencia y apoyo tanto personal como científico.

A Ana Garcés por su amistad y por los viajes que hemos compartido y que nos ha permitido desconectar a ambas en los momentos necesarios. También a Marisol, M^a José y Cristina Mallor, gracias por haber estado siempre dispuestas a ayudarme y aconsejarme.

A mis compañeros de bioquímica, en especial a Sergio, María Bernal, Loreto y como no a mi buen amigo Chechu.

A todos mis amigos, en especial a M^a Jesús y Sergio por su entusiasmo, incondicional apoyo y por estar siempre dispuestos a escucharme.

Finalmente, agradezco de todo corazón a mis padres, Esther y Miguel por haber estado siempre a mi lado y por motivarme a emprender todas las metas que me he propuesto. A mis hermanas, Susana y Sheila por su cariño y comprensión durante todo estos años. Y no podía olvidarme a mi sobrino Abel, que me ha hecho reír y ha sido motivo de continuas alegrías. También, a la memoria de mis abuelos que han constituido un pilar importante en mi educación.

A todos vosotros. GRACIAS!

ÍNDICE..... Pág.

RESUMEN 1

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El cultivo del albaricoquero-Problemática..... 3

Clasificación botánica.

Características botánicas

Requerimientos edafoclimáticos

Origen del cultivo

Situación actual de cultivo de albaricoquero

Patrones para albaricoquero

Injerto 11

Fundamentos del injerto

El desarrollo del injerto

Incompatibilidad de injerto 13

Tipos de incompatibilidad

Causas de incompatibilidad

Objetivos..... 22

2. CELL WALL CHANGES AND LOSS OF MEMBRANE INTEGRITY DURING GRAFT UNION DEVELOPMENT IN PRUNUS

Abstract 25

Introduction..... 25

Material and methods..... 27

Plant material

Light and fluorescence microscopy

Statistical analysis

Results..... 28

Graft union development

Staining for pectins in graft sections

Cellular death in graft unions

Discusión..... 35

3. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LA RESPUESTA CELULAR A LA UNIÓN EN COMBINACIONES ESTABLECIDAS IN VITRO

Resumen	39
Introducción	40
Material y métodos	41
Material vegetal	
Establecimiento de uniones	
Uniones de callo in vitro	
Uniones de tallo in vitro	
Histología	
Inclusión en parafina	
Inclusión en historesina	
Resultados	44
Fusión de callo in vitro	
Uniones herbáceas in vitro	
Desarrollo inicial de la unión	
Evaluación temprana de respuestas celulares a distintas tinciones	
Discusión	53
Respuesta inicial: proliferación de células de callo	
Diferenciación de callo a nuevo cambium	

4. QUANTITATIVE MEASUREMENTS OF CELL-TO-CELL TRANSPORT IN TREE CALLUS CULTURES

Summary	59
Introduction	60
Material and methods	61
Plant material	
Confocal microscopy	
Photobleaching	
Photoactivation	
Control experiment	
Quantification of image data	
Results and discussion	64
Differentiation of Prunus rootstock callus	
Measuring molecular mobility	
Photolysis of caged fluorescein (PAF) in callus	

5. TRANSPORTE PLASMODESMAL EN COMBINACIONES DE CALLO

Resumen	71
Introducción	72
Material y métodos	74
Material vegetal	
Establecimiento in vitro	
Observaciones microscópicas	
Resultados	75
- Análisis comparativo de la capacidad de transporte entre el cultivar Moniqui y el patrón MN2624	
- Conductividad plasmodesmal en combinaciones compatibles e incompatibles 5-10 días después del establecimiento de la unión	
Discusión	81

6. IDENTIFICATION AND GENE EXPRESSION CHANGES OF UDP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE RELATED TO GRAFT INCOMPATIBILITY IN APRICOT/ PLUM CALLUS COMBINATIONS

Abstract	85
Introduction	86
Material and methods	87
Plant material and grafting (Obtaining callus tissue of plum and apricot)	
Protein extraction	
SDS-PAGE	
Mass spectrometry	
RT-PCR and sequencing	
Results	90
- Differences in protein profile of compatible and incompatible combinations	
- Identification of the callus protein with estimated molecular weight of 55Kda	
- Sequencing and RT-PCR analysis	
Discussion	95
- Influence of grafting in protein profile of compatible and incompatible unions	
- UDP-glucose pyrophosphorylase	

7. DIFFERENTIAL INDUCTION OF PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE GENE EXPRESSION IN RESPONSE TO IN-VITRO CALLUS UNIONS OF PRUNUS SPP

Abstract	101
Introduction	102
Material and methods	103
Plant material and union establishment	
RNA extraction and amplication of poly (A) RNA by PCR	
Cloning and sequencing of cDNA	
Sequence data analysis	
Histochemical assay	
Results	106
Isolation and identification of cDNA clone	
Changes in PAL gene expression in in-vitro callus unions	
Discusión	111
8. Discusión general	117
- Mecanismos fisiológicos que actúan en la formación de la unión	
- Permeabilidad plasmodesmal	
- Aspectos bioquímicos asociados a la respuesta de (in)-compatibilidad de injerto	
9. Conclusiones	125
10. Bibliografía	129
11. Anexos	145
Accesiones al Gen Bank	

RESUMEN

Los cultivos frutales se establecen normalmente utilizando plantas que están constituidas por dos individuos: variedad que proporciona la parte aérea de la nueva planta y patrón, que constituye el sistema radicular y que se unen mediante el injerto para vivir en estrecha dependencia. Puede ocurrir que estos dos individuos, variedad y patrón, que forman la combinación de injerto, desarrollen bien o que de lo contrario manifiesten de maneras diversas sus desavenencias y den lugar a los casos de incompatibilidad, que se manifiestan en algunas especies por una rotura de los árboles injertados en el punto de unión, como es el caso de combinaciones albaricoquero/ciruelo. Con frecuencia esta manifestación ocurre tras varios años de crecimiento normal en vivero, lo que hace que los estudios de determinación de la incompatibilidad, aunque son abundantes y fiables, puedan demorarse varios años hasta obtener la respuesta correspondiente. Es por ello que se hace necesaria la búsqueda y aplicación de otros estudios que determinen este problema en una fase más temprana.

El objetivo general de esta tesis es profundizar sobre la respuesta de la compatibilidad de injerto en combinaciones de albaricoquero sobre ciruelo con el fin de lograr un método de diagnóstico precoz que permita agilizar los procesos de selección de patrones frutales. Para ello, el análisis se ha centrado en las primeras fases de desarrollo y se han aplicado técnicas tanto histológicas como moleculares.

En primer lugar, se ha observado la estructura y desarrollo de la unión mediante diversas respuestas histoquímicas de compuestos que influyen en la formación de un injerto conduciendo hacia una unión compatible o incompatible, tanto en combinaciones establecidas en invernadero como in-vitro, y se ha observado diferencias durante el primer mes de desarrollo en relación con una menor presencia de compuestos pécticos, una menor actividad meristemática de las células del nuevo cambium, así como una pérdida de integridad de la membrana celular a partir de la segunda semana en uniones incompatibles. Asimismo se ha observado un mayor contenido intercelular especialmente asociado a compuestos fenólicos que podría reflejar un potenciado metabolismo en las combinaciones incompatibles como consecuencia de situaciones de estrés provocadas entre las dos partes de la unión.

La evaluación de las primeras respuestas que se producen a nivel celular han incluido la comunicación intercelular en tejido de callo, aspecto que ha requerido la puesta a punto de métodos para medir conectividad plasmodesmal célula-célula en nuestro material vegetal. Estas técnicas han supuesto un avance importante para posteriormente llevar a cabo el estudio de conexiones simplásticas en combinaciones de distinto grado de compatibilidad. Estos estudios han permitido detectar una capacidad de transporte plasmodesmal y un límite de exclusión molecular diferentes entre las dos partes implicadas que constituyen una unión incompatible, así como diferencias en el transporte plasmodesmal célula-célula entre uniones compatibles e incompatibles durante la segunda semana sugiriendo que estas diferencias podrían afectar al intercambio de nutrientes y macromoléculas reguladoras entre patrón-variedad.

Finalmente, para completar el estudio de las respuestas iniciales de incompatibilidad se ha realizado una evaluación bioquímica a nivel molecular que ha mostrado diferencias en el perfil proteico entre uniones compatibles e incompatibles, identificándose la UDP-glucosa pirofosforilasa como una posible proteína candidata para desempeñar un papel importante en las respuestas de (in)-compatibilidad, la cual participa en el metabolismo de la sacarosa y síntesis de polisacáridos que constituyen la pared celular. Por otra parte, se ha detectado un aumento en la expresión de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) en uniones incompatibles que refleja una falta de adaptación entre las dos partes que forman la unión.

La evaluación de los distintos factores estudiados en este trabajo y la combinación de técnicas histoquímicas con herramientas de biología molecular permite disponer de una información de gran valor en relación al comportamiento del injerto en sus fases iniciales, que en frutales supone un importante avance para poder determinar la futura respuesta de compatibilidad de las combinaciones de injerto.

SUMMARY

Fruit trees are usually formed by a combination of two individuals: the scion that provides the aerial part and the rootstock which develops into the root system of the grafted plants. The stock and scion not always constitute a successful graft and show their disagreement in the term of incompatibility. Traditional studies have observed the incompatibility reaction when it has already taken place in the field and this is often manifested by the breakdown of the trees at the union area several years after grafting. It is often the case of apricot combinations grafted on plum rootstocks. Despite that there are reliable studies to determine the graft compatibility between stock and scion, the experimental knowledge about the graft partners behaviour can take a long time. For this reason, the early phases of graft development are an important point to find an alternative method of detection of graft compatibility.

The general aim of this thesis was to investigate the graft compatibility responses on apricot/plum combinations in order to search for an early detection method of graft incompatibility that allow to make more dynamic the rootstock breeding selection. To undertake this work, the analysis has been focused on the early phases of graft development and the approach is a combination of histological and molecular techniques.

Firstly, the anatomy of the union has been observed, in the greenhouse and in vitro, by examining several histochemical responses of compounds that have an influence on the graft formation leading to compatible/incompatible unions. The histochemical examination of the different unions during the first month after grafting have shown; a different pectic polysaccharide staining pattern, a reduced meristematic activity from the new cambium cells, and loss of membrane integrity from the second week, when comparing incompatible to compatible unions. Likewise, higher intercellular contents associated with phenolic compounds were found in incompatible unions. These observations could reflect an enhanced metabolism in the incompatible combinations as a consequence of a stress situation between graft and partner.

The evaluation of the early responses at the cellular level has been based on the intercellular communications from callus tissue. This aspect has required setting up a reliable method to measure plasmodesmal connectivity cell-to-cell in our plant material. These techniques have been considered powerful tools to perform the study of symplasmic connections in combinations with different degree of compatibility. These studies have detected differences regarding the mobile fraction and the size exclusion limit (SEL) between the two graft components that constitute an incompatible union. Furthermore, the comparison of plasmodesmal transport between adjacent cells has been noted to be different between compatible and incompatible combinations, especially at the second week after the establishment of the union. These results have suggested that the differences found might affect the passage of nutrients and macromolecules between the cytoplasm of neighbouring cells.

Finally, the research has been completed with biochemical studies that have revealed differences at the protein profile between both compatible incompatible unions. It has been identified the UDP-glucose pyrophosphorylase as a protein candidate to play an important role in the (in)-compatibility responses. This protein is involved in the sucrose metabolism and the biosynthesis of cell wall polysaccharides. It has also been found a higher PAL expression level in incompatible than compatible unions related to a lack of adaptation between both graft partners.

The evaluation of the factors reported in this work and the combination of histochemical with molecular biology techniques will offer a valuable information to predict in early stages of development whether or nor the components of the proposed scion-stock combinations are compatible. These studies are supposed to be a great advance in fruit trees in order to determine the future response of graft compatibility/incompatibility.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL.

EL CULTIVO DEL ALBARICOQUERO – PROBLEMÁTICA

Clasificación botánica.

El albaricoquero (*P.armeniaca L.*) pertenece al orden Rosales, familia Rosaceae, subfamilia Prunoideas (*Amygdaloideae*), género *Prunus*, subgénero *Prunophora* y sección *Armeniaca*. Análisis filogenéticos sugieren dos grupos dentro de las *Amygdaloideae*: uno que incluye los géneros *Prunus* y *Maddenia*, y otro formado por los géneros *Exochorda*, *Oemleria*, *Prinsepia* (Lee y Wen, 2001; Bortiri et al, 2002). El género *Prunus* posee unas 200 especies de árboles y arbustos, con una innumerable cantidad de variedades y cultivares muy distintos entre sí. La clasificación más ampliamente adoptada es la establecida por Rheder (1940) en la que el género *Prunus* se divide dentro de 5 subgéneros: *Prunophora* (= *Prunus*); *Admygdalus*; *Cerasus*; *Padus* y *Laurocerasus*. A su vez el subgénero *Prunus* se divide en tres secciones: *Prunus* (= *Euprunus*); *Prunocerasus* y *Armeniaca* (Shaw et al, 2004). Dentro del género *Prunus* se encuentran otras especies frutales de importancia como son el cerezo (*P.avium L.*; $2n=16$), el ciruelo, del que destacan el ciruelo japonés (*Prunus salicina Lindl.*) y el ciruelo europeo (*Prunus doméstica L.*; $2n=6x=48$), el melocotonero [*Prunus Persica (L.) Bastch.*; $2n=16$] y el almendro (*P. Dulcis*, $2n=16$). Dentro del subgénero *Prunophora* existen 6 especies: *P. Brigantina Vill* (nativo de los Alpes franceses); *P.armeniaca L.* (nativo de Asia y la región del Cáucaso); *P. Dasycarpa Ehrh* (nativo de *USSR*) (un híbrido natural entre *P. cerasifera* y *P. armeniaca*); *P. Mandshurica* (nativo de *Manchuria* y *Corea*); *P. Sibirica* (nativo del este de *Siberia*, *Manchuria* y *Norte de China*); y *P. Mume* (nativo de *Japón* y *China*), siendo esta última especie la forma más ornamental del albaricoquero, estando la mayor producción del mismo en *Japón*. Existen numerosas variedades locales de albaricoqueros en cada zona de cultivo, siendo las más importantes en España: *Búlida*, *Canino*, *Moniqui*, y *Paviot*. Otras variedades son: “*Mauricio*”, “*Galta Roja*”, “*Currot*” o “*Real Fino*”.

Características botánicas.

Se trata de un árbol caducifolio de tamaño mediano que en estado natural puede alcanzar hasta 6m de altura pero en plantaciones normales raramente llega a la altura máxima; la raíz es bastante pivotante, porte erguido y copa redondeada. Las hojas son alternas, lampiñas brillantes y rojizas en los brotes jóvenes. Están unidas a las ramitas por un largo peciolo rugoso y verdoso, aunque a veces también rojizo en la parte correspondiente al haz, teniendo el limbo de forma acorazonada y acuminada en el ápice, de entre 5-10 cm de longitud, con los bordes suavemente dentados y glabras por ambas caras. Flores hermafroditas casi sésiles de tonalidades blancas o ligeramente rosadas con el cáliz rojizo, solitarias o reunidas en grupos de 2-3, sésiles o con pedúnculo muy corto, es una planta histeranta, es decir, que a finales de invierno o comienzos de la primavera la floración (Fig. 1.1.a) precede a la emisión de las hojas (Fig. 1.1.b). Fruto en forma de drupa esférica u oval de 30-50 mm, más o menos comprimida lateralmente, dividida en dos partes a veces desiguales por un marcado surco ventral, semejante a un melocotón pero más pequeño. En función de las variedades la piel puede ser, de color blanco, amarillo, anaranjado y ligeramente rojizo pero siempre aterciopelada y tormentosa.

Requerimientos edafoclimáticos.

La mayor parte de su cultivo se localiza en zonas costeras de clima mediterráneo y en áreas semicontinentales templadas, con inviernos fríos y veranos cálidos y secos (Layne et al, 1996). Es difícil criar este árbol en suelos calcáreos, pedregosos o pobres y suele encontrarse en huertas y zonas de tierra rica. Debido a lo temprano de su floración, puede sufrir por las heladas tardías en las localidades frías y exige calor estival para la completa madurez de la fruta. Se da mejor en exposiciones aireadas y soleadas de las mesetas y colinas que en las llanuras. La mejor altitud para su cultivo es la de 200-500 metros. La permeabilidad del subsuelo tiene una gran importancia en este cultivo, pues todo estancamiento de agua es fatal para el albaricoquero. En tierras profundas toma un gran desarrollo y los frutos son de buena calidad. En laderas secas, los árboles se desarrollan menos, pero los frutos son más perfumados. Hoy en día es uno de los árboles más cultivados en toda Europa (Turquía, España, Italia, Grecia, Francia)

ya que se encuentran las condiciones de clima y suelos ideales para satisfacer sus exigencias y garantizar una producción constante.



Figura 1.1. Plantación de albaricoquero cultivar ‘Moniqui’ en estado de floración (a) y periodo vegetativo de la planta (b).

Origen del cultivo

Muchos botánicos señalan como lugar de origen China y Siberia, siendo introducido en Italia hacia el año 100 antes de cristo, en Inglaterra en el siglo XIII y en Norteamérica en 1970 (Westwood, 1982). Desde Asia central se expandió al área transcausiana y hacia el oeste a través de Irán (Goor and Nurock, 1968). Tal difusión puede haber ocurrido como parte del intercambio militar, económico y cultural que siguió a la penetración de Alexandro de Macedonia en Turkestán, como en el valle de Fergana durante el siglo cuarto B.C. La difusión hacia el oeste de Europa parece haber sucedido en dos pasos: Se encontraron en Grecia e Italia en el periodo posterior a la guerra Persa-Romana durante el siglo I BC, y algunos años más tarde sería cultivado en el resto de países del sur de Europa.

Los hallazgos más consistentes de ejemplares espontáneos, fueron hechos en China, en las montañas cercanas a Pekín, donde la presencia de árboles cultivados tenían un fruto de tamaño doble que el silvestre (Forte, 1992). En Turkestán se encuentra el albaricoquero espontáneo entre 1200-2200m; su habitat se encuentra también en el Himalaya, en Manchuria Meridional, en Mongolia Sud-oriental y en China del Norte.

Introducción general

También se encontraron albaricoqueros espontáneos en varias zonas del extremo oriente en altitudes de hasta 3000m o más.

En toda Europa el albaricoquero fue mejor conocido y mantenido en auténticas plantaciones en el periodo que va del 1600 al 1800, experimentándose en este año un progresivo y notable desarrollo en Francia Meridional (Pirineos orientales). En el 1700, fue llevado a América donde la mayoría de ellos se cultivan en California, siguiendo en importancia los estados de Washington y Utah.

Situación actual del cultivo del albaricoquero.

La producción mundial de albaricoquero en este último año ha sido de 2.8 millones de toneladas, de las cuales la mitad corresponden a los países del área mediterránea (Faostat, 2004). Turquía, Italia, Francia y España son los principales países europeos productores de albaricoquero. España supera a Italia y Francia en lo que se refiere a superficie destinada al albaricoquero, pero está por debajo en relación a la producción, lo cual indica en comparación una menor productividad de las plantaciones españolas.

Actualmente en España el cultivo de albaricoquero sigue teniendo una gran importancia, con una superficie cultivada de 17600 Ha (Faostat, 2004), pero con unos datos alarmantes en cuanto a eficiencia productiva. Así, una producción media anual que se aproxima a 122400t (Faostat, 2004), cuando la superficie efectiva en producción está en torno a las 20.000 ha, indica que hay serias dificultades productivas que es necesario subsanar si no se quiere ser desplazado por los competidores. Para subsanar las dificultades productivas existen programas de mejora genética del albaricoquero en España con dos grandes objetivos: aptitud para el cultivo y resistencia al virus de la sharka.

Patrones para albaricoquero.

Uno de los principales problemas que presenta el cultivo del albaricoquero es la difícil adaptación de su sistema radicular. La excesiva sensibilidad del franco de la especie a los problemas de asfixia de raíces, de podredumbre de cuello, de patógenos, la necesidad de rentabilizar las explotaciones, etc (Felipe, 1990) ha llevado a la necesidad de emplear patrones distintos que permitan una mejor adaptación a unas condiciones de

suelo que no siempre resultan favorables. La búsqueda y utilización de portainjertos alternativos requiere la elección de aquellos que se adapten a las condiciones del suelo, y que posean una buena afinidad con la variedad que se vaya a injertar sin plantear problemas de compatibilidad (Errea y Felipe 1998). El patrón determinará el control del crecimiento, la tolerancia a diversos suelos, compatibilidad del injerto, el aporte y balance de nutrientes, calidad de los frutos y eficiencia de la cosecha (Westwood, 1988). De los patrones que actualmente se usan para albaricoquero, es difícil encontrar alguno que cumpla con todas las condiciones ideales para ser un buen patrón, especialmente por los problemas de incompatibilidad que presentan la mayoría de los más utilizados. En albaricoquero, el comportamiento de las distintas variedades no es homogéneo y se dividen en dos categorías para este carácter (Errea, 2006). En el primer grupo se encuentran aquellas variedades de albaricoquero con tendencia compatible, donde las uniones con un amplio número de patrones son siempre igual de sólidas. En este caso, se clasifican como variedades poco exigentes, como pueden ser: *Bergeron, Luizet, Paviot, Royal, Polonais, Cafona etc.* En el segundo grupo se encuentran aquellas con tendencia incompatible, donde las uniones con bastantes patrones son mucho más frágiles. Se clasifican como variedades exigentes y entre ellas se encuentran: *Canino, Moniqui, Beliana, Feriana etc.* A este grupo pertenecen la mayoría de las variedades que se cultivan en España, de mayor interés agronómico y comercial. Actualmente, los patrones que se encuentran disponibles para albaricoquero se describen brevemente a continuación:

* **Albaricoquero franco (*P. armeniaca L.*)**. Los árboles injertados son vigorosos, longevos y productivos. Retrasa algo la maduración por lo que sólo es conveniente para las variedades tardías. El injerto sobre este patrón presenta cierta dificultad; ya que el crecimiento de la planta en los primeros años es muy lento haciendo que se retrase la entrada en producción. El patrón franco debe reservarse sólo para suelos sueltos, permeables y bien drenados. No se conocen incompatibilidades con variedades de albaricoquero (Felipe, 1989).

Manicot

Selección efectuada en el INRA de Francia a partir de semillas de Manicot. Como el franco de albaricoquero, es muy sensible a la asfixia radicular y se comporta bien en suelos filtrantes o semifiltrantes, tolerando bien los suelos calcáreos. Aporta homogeneidad y vigor a las variedades injertadas y posee un sistema radicular penetrante. Su productividad

Introducción general

es buena, mayor que la aportada por el albaricoquero franco, con una entrada en fructificación medianamente rápida, y un calibre bueno.

* **Ciruelos de crecimiento rápido.** Este grupo de patrones se caracteriza por su crecimiento vigoroso durante los primeros años de su vida, una generalizada facilidad de propagación, así como una más reducida polivalencia de compatibilidad de injerto comparada con las de los ciruelos de crecimiento lento (Felipe, 1989). Entre los más usados pueden citarse:

Mirobolán (*P. cerasifera Ehrh.*) Son patrones resistentes a la caliza y a la sequía que se comportan bien en suelos pobres, calcáreos y húmedos. Su uso sustitutivo del franco es debido a su alta polivalencia respecto al suelo, y sobre todo su resistencia a la asfixia en suelos poco permeables. Tienen mayor vigor que el Pollizo, pero retrasan la entrada en producción. Presentan incompatibilidad localizada con las variedades exigentes de albaricoquero. Los más utilizados son Mirobolán B-EM, Mirobolán INRA GF-31 y Mirobolán 29C.

Mariana (*P. cerasifera Ehrh. x P. munsoniana Wight & Hedr.*) Se adaptan bien a suelos húmedos y pesados y son resistentes a la asfixia radicular. Inducen buena productividad y presentan buena resistencia a *Verticillium* y *Armillaria*; así como incompatibilidad localizada con las variedades exigentes de albaricoquero y buena con las poco exigentes. Los más comunes son el Mariana 2624 y el Mariana GF 8-1.

Una especial consideración se hará al patrón Mariana 2624 por ser el patrón ensayado en esta tesis doctoral (Fig. 1.2). Es una selección procedente de California (EEUU) que presenta árboles muy vigorosos y se adapta bien a suelos húmedos y pesados. Propaga fácilmente por estaquilla leñosa y cultivo in-vitro. Tiene un sistema radicular bastante superficial y que serpea bastante. Es resistente a la asfixia radicular y de cuello y a los nemátodos *M. incógnita* y *M. javanica*, moderadamente resistente a *Armillaria*, *Agrobacterium* y *Phytophthora* pero muy susceptible al chancro bacteriano, susceptibilidad influenciada especialmente por la variedad injertada. Es algo sensible a *Verticillium*. Presenta mala compatibilidad con las variedades exigentes de albaricoquero (con Moniquí presentó un 100% de rotura a los 2 años) y buena con las pocos exigente (Errea y Felipe, 1993).



Figura 1.2. Ciruelo de crecimiento rápido “Mariana 2624” establecido en invernadero.

* **Ciruelos de crecimiento lento.** Los frutos de las variedades sobre ellas injertadas son de buena calidad y el desarrollo de los árboles no suele ser excesivo; con tendencia a inducir un vigor insuficiente, serpear y presentar una desigual compatibilidad con las variedades de otras especies (Felipe, 1989). Dentro de este grupo de ciruelos, se usan como patrones algunas selecciones: *Brompton* (*P. domestica* L.); *Torinel* (*P. domestica* L.); *Julior* (Ferdor) (*P. insititia* x *P. domestica*); *San Julián 655-2* (*P. insititia* L.); *Pollizo de Murcia* (*P. insititia*); *Montizo* (*P. insititia* L.).

* **Melocotonero (*P. pérsica* L. Batsch).** Los francos inducen buen vigor y productividad en los árboles injertados. Son sensibles a la asfixia radicular así como a la clorosis provocada por suelos calizos y con alto pH. En cuanto a albaricoquero, su compatibilidad es buena con las variedades poco exigentes pero localizada con las exigentes.

Otros patrones de esta especie utilizados son el *GF 305* (*P. persica*), que resiste bien la sequía y es menos sensible a la clorosis que los francos normales; el *Montclar* (*P. persica*), que confiere un gran vigor a la variedad injertada, superior al GF 305, así como mayor resistencia a la clorosis férrica; y el *Rubira* (*P. persica*), de escaso vigor (10 a 20% inferior a GF 305) y que se caracteriza por una entrada en producción más rápida.

Introducción general

* Híbridos.

Citation (*P. domestica* x *P. persica*). Manifiesta buena compatibilidad con algunas variedades, aunque no se conoce su comportamiento al injerto con muchas de ellas. De vigor mediano, es tolerante a la asfixia radicular, presenta una entrada en producción rápida y una buena productividad.

Ishtara (*P. cerasifera* x *P. salicina*) x (*P. cerasifera* x *P. persica*). Contrariamente al anterior, este híbrido es bastante sensible a la asfixia radicular y ligeramente a la clorosis, aunque está mejor adaptado que el anterior a los suelos filtrantes. Su vigor es semejante a Torinel, y su productividad buena, con una entrada en producción rápida y un ligero adelanto en la maduración.

Myran (*P. salicina* x *P. vulgaris*). Patrón obtenido en los años 50 en el INRA de Francia, su uso ha estado más extendido al melocotonero y almendro, y se plantea como alternativa para el cultivo del albaricoquero. Es muy vigoroso, se comporta bien en suelos ácidos y con riesgo de humedad. Tiene un potente sistema radicular que le proporciona un buen anclaje, y resiste muy bien los suelos húmedos y compactos (asfixiantes), su mayor inconveniente es su sensibilidad a clorosis.

Jaspi (*P. salicina* x *P. spinosa*). Selección clonal realizada por el INRA de Burdeos, proporciona un árbol de buen anclaje. Produce árboles vigorosos y presenta buena resistencia a asfixia radicular y a la caliza. Se muestra polivalente respecto a especies y variedades injertadas sobre él.

Hasta la actualidad, han sido escasos los trabajos que se han realizado referidos a mejora de patrones de albaricoquero (Layne *et al*, 1996). Los factores que más se han tenido en cuenta en la elección de un buen patrón han sido, no solo su adaptación a las condiciones del suelo, sino también que pudiera salvar los problemas de incompatibilidad al injerto con las variedades de interés comercial en la región. Por su parte los programas de mejora de variedades del albaricoquero se centran actualmente en la consecución de variedades autocompatibles y resistentes a la sharka, y esta renovación varietal y su adaptación a una determinada zona de cultivo pasa inevitablemente por la elección de un patrón adecuado.

INJERTO.

Fundamentos del injerto.

El injerto es la técnica de multiplicación más utilizada en fruticultura, tanto para la obtención de nuevas plantas como para propagar las variedades existentes. El árbol frutal comercial es en general la asociación de dos entes, el patrón y la variedad, a los que se hace vivir en simbiosis mediante el injerto (Fig. 1.3), formando una planta en la que proporcionan el sistema radicular y la parte aérea, respectivamente. Entre las dos partes debe existir una soldadura que permita a ambas vivir en estrecha dependencia., formando una unión satisfactoria, lo que tiene en cuenta tanto la conexión física en la unión del injerto como la armonía fisiológica de los sistemas genéticos. Estos dos individuos que integran el árbol frutal unas veces viven en armonía formando un ser especializado para la producción de frutos. Mientras que otras, manifiestan de maneras diversas sus desavenencias y se dice que entre ellos hay incompatibilidad o falta de afinidad. El problema de incompatibilidad asumió importancia en la fruticultura comercial con el aumento de la demanda de nuevas variedades y patrones. En general, son compatibles los cultivares y especies muy relacionados y también algunos géneros próximos, pero plantas más alejadas taxonómicamente manifiestan incompatibilidad casi siempre. (Westwood, 1993).



Figura 1. 3. Injerto de tres años del cultivar ‘Moniqui’ sobre el patrón Mariana 2624 en vivero.

El desarrollo del injerto.

La sucesión de etapas en la formación del injerto ha sido definida por varios autores tanto en plantas leñosa como herbáceas (Moore, 1981; Hartmann et al, 2002):

- Adhesión patrón-injerto y formación del callo. Establecimiento de contacto íntimo entre tejido del patrón y variedad, de forma que las regiones cambiales de ambos (con alta actividad meristemática), estén estrechamente unidas. Las células del *cambium* del patrón y del injerto producen células de parénquima que se entremezclan dando lugar a tejido calloso. Este tejido de callo rellena el espacio entre los dos componentes conectando el patrón y la variedad (Moore, 1983). Al mismo tiempo, plasmodesmos se forman de novo entre células originarias de la variedad y patrón (Kollmann y Glockmann, 1985; Kollmann et al, 1985).
- Diferenciación de las células del callo hacia nuevo cambium. Las células del nuevo callo formado se diferencian a células cambiales, tanto en el patrón como en la variedad. Esta diferenciación comienza desde el cambium original del patrón y la variedad, y se desarrolla a través del puente de callo hasta que se origina una conexión cambial continua entre las dos partes implicadas en el injerto (Hartmann et al, 2002.).
- Formación de nuevo tejido vascular. El nuevo cambium recién formado comienza a tener actividad meristemática propia y forma nuevos tejidos vasculares. De este modo, el nuevo xilema y floema formado, permiten establecer una conexión vascular continua entre patrón y variedad. Las diferentes etapas se representan en la Fig. 1.4.

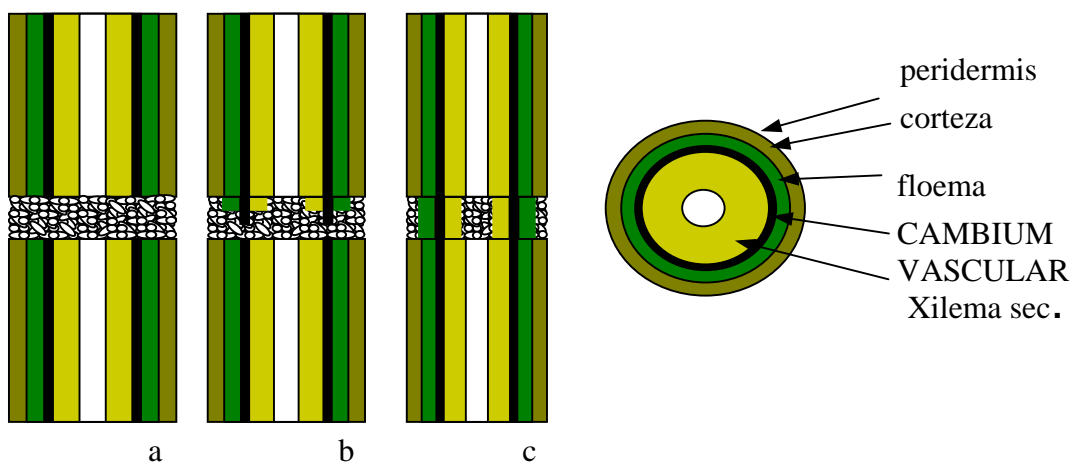


Figura 1.4. Representación esquemática de las distintas etapas en la formación de un injerto. a) adhesión patrón-variedad y formación de tejido de callo. b) formación de nuevo cambium. c) Diferenciación a nuevo xilema y floema.

INCOMPATIBILIDAD DE INJERTO

La incompatibilidad de injerto observada en algunas combinaciones patrón-variedad ha sido clasificada en distintos tipos o categorías (Herrero, 1951; Mosse, 1962); que se manifiestan con distintos síntomas y que probablemente están producidos por una causa distinta.

Tipos de incompatibilidad.

*** Incompatibilidad translocada.**

Está asociada a síntomas que se manifiestan en las hojas y alteraciones en el sistema radicular, apreciándose sus síntomas a una edad temprana del árbol frutal. En este tipo de incompatibilidad se observa una acumulación de almidón en la variedad y casi completa ausencia debajo de la zona de unión. Este síntoma puede ayudar a la detección del problema a veces incluso antes de que tengan lugar los otros síntomas. Asimismo, otro síntoma que se manifiesta es la degeneración en los tubos cribosos y células acompañantes del floema en la zona de injerto (Herrero, 1968). Es conveniente evitar este tipo de combinaciones ya que el uso de un intermediario no evita la incompatibilidad existente entre patrón y variedad. Actualmente, los análisis de valores SPAD correlacionados con la concentración de clorofila en las hojas han permitido evaluar este tipo de incompatibilidad en cultivares de melocotero sobre distintos patrones de *Prunus* en aquellos casos de incompatibilidad severa entre patrón-variedad (Zarrouk et al, 2006).

Este tipo de incompatibilidad se manifiesta pronto en el árbol, generalmente durante el primer año de crecimiento; y se presenta en combinaciones melocotonero sobre Mirobolán, Mariana y albaricoquero, no observándose síntomas de incompatibilidad durante los dos primeros años de crecimiento en sus combinaciones recíprocas (Herrero, 1955 a, b). También algunos cultivares de almendro sobre mariana (Kester et al, 1965; Felipe y Herrero, 1977) y sobre Mirobolán (Felipe y Herrero, 1977).

*** Incompatibilidad localizada.**

Las combinaciones que presentan este tipo de incompatibilidad se manifiestan en forma de desorganizaciones tanto morfológicas como fisiológicas localizadas en el punto de unión que acaban por romper la asociación patrón-variedad, como son: involuciones del tejido en la zona del cambium, discontinuidades en las conexiones de

Introducción general

floema y xilema, presencia de lagunas de tejido parenquimatoso interrumpiendo la conexión vascular entre patrón e injerto y discontinuidades en la corteza en el punto de unión (Hartmann et al, 2002; Ermel et al, 1999; Errea et al, 1994a; Errea y Felipe, 1993, 1992a). Todos estos defectos estructurales podrían conducir a disminuir la solidez de la unión y como consecuencia una ruptura de la misma por la acción de vientos fuertes o del forzado mecánico (Argles, 1937; Mosse, 1962). El principal problema que plantea este tipo de incompatibilidad es que puede tardar años en observarse externamente, después del crecimiento normal de las plantas establecidas en campo, con la consiguiente pérdida de tiempo, mano de obra, material vegetal y en definitiva medios que más tarde van a resultar infructuosos.

Al tipo de incompatibilidad en la unión corresponden las combinaciones Manzano/Membrillero, Albaricoquero/Mirobolán así como sus recíprocas (Herrero, 1955a). Este fenómeno también aparece con frecuencia en combinaciones peral/membrillero (Herrero y Tabuenca, 1962; Ermel et al, 1999). En estudios realizados con la variedad de albaricoquero “*Moniqui*” sobre diversos *Prunus* también se observaron muchas uniones con síntomas asociados a este tipo de incompatibilidad (Errea, 1991, Errea y Felipe, 1992a; 1993).

* **Incompatibilidad de origen viral.**

Numerosos estudios han determinado que los virus se transmiten por medios mecánicos, tales como la transmisión por la savia, y la transmisión por injerto. De esta forma, cierto número de incompatibilidades son inducidas por virus o micoplasmas. Ejemplos de estas incompatibilidades inducidas son el cerezo/*P. Mahaleb* infectado por el virus del “*buckskin*” (piel de carnero) y el peral/*P. Pyrifolia* afectado por el micoplasma del decaimiento “*Pear Decline*” (Westwood, 1993). Dentro de este tipo de incompatibilidad también entran a formar parte la incompatibilidad debida al virus del chlorotic leaf spot (CLSV) que se encuentra latente en numerosas variedades de albaricoquero (Bernhad, 1990) y que se pone de manifiesto cuando se dan las siguientes condiciones: Un patrón sano muy sensible al CLSV (por ejemplo albaricoquero silvestre de Provenza, tipo A843, francos de Manicot, etc) y variedades enfermas (por ejemplo Canino”, “Rouge du Roussillon”, etc...). Este tipo de incompatibilidad intraespecífica se manifiesta con una mortalidad importante en vivero. El tiempo implicado en la transferencia del patógeno y expresión de los síntomas de enfermedad, también como

una posible producción de metabolitos tóxicos durante el envejecimiento, retrasa el fracaso del injerto.

Aunque los tipos de incompatibilidad se clasifican en función de las manifestaciones externas que presentan unas determinadas combinaciones, es difícil distinguir diferencias entre los síntomas asociados a los distintos tipos, de tal manera que se comienza a cuestionar la terminología empleada actualmente (Hartmann et al, 2002).

Además, cabe mencionar que la aparición aislada o combinada de uno o más de los síntomas mencionados, no significa necesariamente que la combinación sea incompatible. Algunos de esos síntomas pueden resultar también de determinadas condiciones ambientales desfavorables, como falta de agua o de algún nutriente esencial, ataques de insectos o enfermedades, o técnicas de injerto no apropiadas. (Argles, 1937).

Causas de incompatibilidad.

Se han propuesto varias teorías intentando explicar el fenómeno de incompatibilidad, pero la bibliografía dada por algunos autores, es a veces contradictoria y sigue siendo hoy en día tema de estudio para muchos investigadores. La gran variedad de genotipos que pueden ser combinados mediante el injerto produce un amplio número de diferentes interacciones anatómicas, fisiológicas o bioquímicas; reflejando la diversidad de factores relacionados con la incompatibilidad la complejidad del problema. Algunas hipótesis han sido propuestas con el propósito de explicar este fenómeno.

*** Causas fisiológicas y anatómicas de la respuesta celular al injerto.**

En relación, con la causa de degeneración del floema en el patrón, Herrero (1951) apuntó la hipótesis de que fuera producida por un factor tóxico translocado desde la variedad de melocotonero a la zona de unión a través del floema, produciendo una reacción tóxica con el patrón Mirobolán. De esta forma, la necrosis intensa observada en el floema (Herrero, 1955a, b) es una consecuencia de la falta de translocación como se dedujo a la vista de los resultados obtenidos en árboles anillados (Herrero, 1956).

Asimismo, estudios de translocación en microinjertos han revelado cambios estructurales que tienen lugar ya en las fases iniciales (Espen et al, 2005, Schöning y

Introducción general

Kollmann, 1997, Gebhardt y Goldbach, 1988), y se ha visto que aparecen problemas de incompatibilidad ya a nivel celular, haciendo posible el estudio de su mecanismo en tejidos que aun no se han diferenciado (Jonard et al., 1990, Wang y Kollmann, 1996).

Actualmente, las líneas de investigación propuestas por distintos grupos abordan el estudio de los procesos que tienen lugar en la manifestación del problema de incompatibilidad, intentando llegar a las causas del problema, antes incluso de que tenga lugar otro síntoma de incompatibilidad. En combinaciones albaricoquero sobre ciruelo, no se observan diferencias en el desarrollo externo de la unión, pero sí en el desarrollo del callo inicial en el momento de diferenciación hacia conexiones vasculares (Errea et al. 1994a). El comportamiento de estas células determina la futura respuesta de injerto, puesto que una falta de diferenciación afecta al desarrollo de nuevo xilema y floema, causando discontinuidades en la unión. El contenido y naturaleza de las células implicadas en las primeras etapas de formación pueden jugar un papel muy importante en el desarrollo de las respuestas que llevan a la formación de uniones fuertes y satisfactorias (Errea et al., 2001; Errea y Rodrigo, 2003).

Estudios sobre compatibilidad en las fases iniciales de formación de injerto se han centrado en los últimos años en plantas herbáceas, detectándose una migración simplásmica de proteínas de exudado de floema (PP1, PP2) de patrón a variedad en Cucurbitáceas (Tiedemann R, 1989; Tiedemann y Carstens-behrens, 1994; Golecki et al.; 1998), cuya translocación está correlacionada con el establecimiento de puente de floema a través de la zona de unión, coincidiendo su síntesis con la diferenciación vascular de floema en esta especie (Dannenhoffer et al, 1997). Algunos autores han estudiado el intercambio de sustancias entre ambas partes de la unión mediante experimentos de translocación usando C-14-sacarosa y 5/6-carboxifluoresceína (CF), observando un incremento en el número de vasos conductores conectados en la unión de combinaciones compatibles *Lycopersicon* sobre *Solanum* (L/S) paralelo al porcentaje de transporte a través del injerto, indicando la funcionalidad de las mismas. Al mismo tiempo, el transporte de asimilados en uniones de menor grado de compatibilidad *Vicia* sobre *Helianthus* (V/H) fue significativamente menor, sugiriendo que la mayoría de las conexiones de floema son no funcionales (Schöning y Kollmann, 1997; Rachow-Brandt, 1992 a,b). La razón de esta discrepancia podría caracterizar cierto grado de incompatibilidad en V/H, de tal forma que tubos cribosos del floema son bloqueados

por callosa y p-proteínas debido a reacciones de incompatibilidad a nivel celular, provocando un bloqueo en la transferencia de solutos entre patrón y variedad, fenómeno que resulta en una acumulación de monosacáridos en combinaciones incompatibles (Kollmann y Glockmann, 1990; Rachow-Brandt y Kollmann, 1992 a, b). Estas investigaciones apoyan las realizadas por Schmid y Feucht (1981); los cuales sostienen que, aunque la rediferenciación vascular puede llevar a la formación de un injerto satisfactorio, aún después de que la continuidad vascular haya sido establecida, los vasos pueden colapsarse o lignificarse e impedir la translocación entre patrón y variedad. A pesar de estas observaciones, este no es el caso de plantas leñosas donde una modificación en el proceso de diferenciación del cambium y discontinuidades a nivel vascular en combinaciones incompatibles no impiden el desarrollo normal de la planta (Espen et al, 2005; Ermel, 1999; 1997; Errea et al, 1994a; Moing and Carde, 1988).

*** Comunicación celular patrón-variedad.**

En los últimos años se ha discutido la intervención de mecanismos de reconocimiento celular relacionados con el fenómeno de incompatibilidad. Estudios de microscopía electrónica han revelado la existencia de proyecciones celulares en las paredes de algunas células de callo (Jefree et al. 1989, Barnett y Weatherhead, 1988), que están compuestas por pectinas, proteínas, carbohidratos y ácidos grasos (Miller y Barnett, 1993). Yeoman et al (1978) propusieron que estas proyecciones podrían desempeñar un papel importante en las interacciones célula-célula durante el proceso de adhesión celular. Por otra parte, Jefree y Yeoman (1983) sugirieron que los fragmentos pécticos presentes en la pared celular podrían actuar como mensajeros químicos en la determinación de compatibilidad de injerto debido a su abundancia durante la adhesión del injerto. A su vez, la actividad biológica de estos compuestos se vería reflejada en el éxito de la fusión de tejidos en las dos partes implicadas en la unión (Miller y Barnett, 1993). En cambio, otros autores afirman que la adhesión celular no requiere contacto célula-célula, sino que se produce por la deposición y polimerización de material como respuesta a la herida (Moore, 1991; 1984a).

La existencia de otro posibles mecanismo de reconocimiento celular implicaría la presencia de ciertas proteínas específicas que serían sintetizadas como respuesta al

Introducción general

injerto (Yeoman, 1984) y que podrían migrar simplásticamente a través de la unión de injerto (Tiedemann y Carstens-behrens, 1994; Golecki et al, 1998). Cambios en el perfil proteico de injertos (*Cucumis/Cucurbita*) han sido detectados y se atribuyen a la migración simplástica de polipéptidos a través de la superficie de injerto via el floema (Tiedemann y Carstens-behrens, 1994). Así, parece haber un mecanismo celular de reconocimiento que produce la consiguiente compatibilidad-incompatibilidad (Hartmann et al, 2002).

Otras sustancias que deberían ser consideradas en el desarrollo de la unión compatible, son las auxinas, favoreciendo la diferenciación vascular (Aloni et al, 2006; Aloni, 1987, Sachs, 1981) y acelerando la formación de un injerto satisfactorio (Andrews y Marquez, 1993; Shimonura y Fujihara, 1977). No obstante, no podría ser tomada en cuenta como una molécula de reconocimiento específica “per se”, debido a su presencia e implicación en una gran variedad de procesos biológicos (Moore, 1982; 1984a).

Otro aspecto que se encuentra directamente relacionado con la unión celular son los plasmodesmos (Fig. 1.4), estructuras dinámicas que constituyen una ruta de comunicación celular simplástica entre células adyacentes permitiendo la difusión de pequeñas moléculas solubles, lípidos y el intercambio de macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos (Lucas, 1999; Ehlers and Kollmann, 2001; Cilia et al, 2004, Lucas et al, 2004). Estos canales pueden ser dilatados o cerrados por cambios en el citoplasma y por interacciones proteína-proteína, cambiando la cantidad de solutos que entra o abandona la célula. En uniones de injerto, cuando interconectan las células de callo de patrón y variedad, se establece un contacto celular directo entre plasmodesmos de células adyacentes a través del puente de callo que simplásticamente conecta patrón-variedad (Yang et al, 1993; Kollmann et al, 1985; Moore, 1982). Esto permite una cooperación funcional y una firme cohesión, potenciándose la comunicación intercelular célula-célula. De modo que esta ruta de comunicación puede ser importante en el reconocimiento celular y en respuestas de compatibilidad/incompatibilidad. Contrariamente, una cooperación insuficiente entre células adyacentes conduce a la formación de plasmodesmos discontinuos en plantas herbáceas (Kollmann y Glockmann, 1991; Ehlers y Kollmann, 2001; Pina y Errea, 2005).

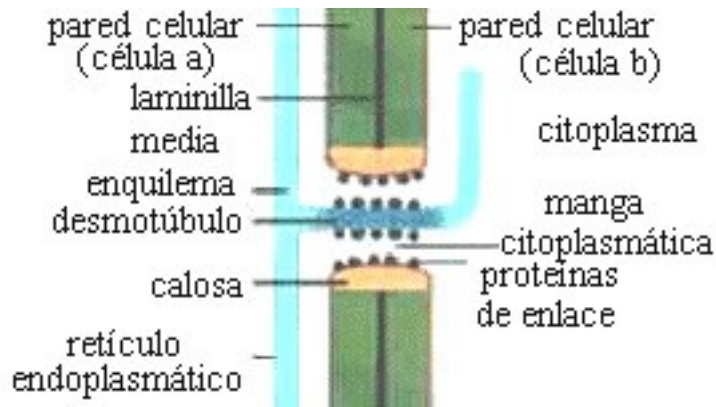


Figura 1.4. Diagrama esquemático de plasmodesmos entre dos células adyacentes (imagen tomada de <http://www.biologia.edu.ar>).

*** Cambios bioquímicos asociados a la compatibilidad de injerto.**

En combinaciones incompatibles de ciertos cultivares de peral sobre membrillero (Gur et al, 1968), se transporta al floema del peral un glucósido cianogénico, la prunasina. Los tejidos del peral descomponen la prunasina en la región del injerto mediante la acción enzimática de la B-glucosidasa, siendo el ácido cianhídrico uno de los productos de la descomposición. La presencia de ácido cianhídrico lleva a la falta de actividad cambial en la región de unión del injerto, resultando en marcadas alteraciones en el floema y xilema de esa región. Los tejidos vasculares son seriamente afectados por arriba y en la zona de unión, de tal forma que la conducción de agua y fotoasimilados se ven seriamente reducidos. Moore (1984b) también observó que el ácido cianhídrico induce necrosis celular en la interfase celular del injerto, impidiendo la morfogénesis que lleva al desarrollo de la unión. Además, cultivares de melocotonero que presentan incompatibilidad sobre patrones de almendro, contienen considerablemente niveles más altos de prunasina, que los que son compatibles con almendro (Gur y Blum, 1973). Por su parte, Moing et al (1987) en estudios realizados con melocotonero sobre ciruelo encontraron que más importante que los niveles de prunasina, es la cantidad presente de sorbitol, catequina e inositol en el floema; alterando una disminución en el flujo de estos el normal desarrollo del sistema radicular. La presencia de glucósidos cianogénicos en plantas leñosas está relativamente restringida a pocos géneros, por lo que esta reacción no puede ser considerada una causa universal de incompatibilidad de injerto (Hartmann et al, 2002).

Introducción general

Otros estudios realizados en combinaciones incompatibles de cerezo (*P. avium* sobre *P. cerasus*), han detectado la acumulación de un compuesto fenólico, la prunina, sobre la unión (Treutter y Feucht, 1991; Treutter et al, 1986) así como de polifenoles en la zona de unión que reflejaban una reducida compatibilidad entre patrón-variedad (Gebhardt y Feucht, 1982). En cultivos de callo de cerezo, se ha correlacionado altas concentraciones de prunina con una limitación tanto a nivel de proliferación como diferenciación celular (Feucht et al, 1988). El hecho que algunos de los polifenoles investigados inhiban el transporte de auxinas (Eckardt NA, 2006; Wasson et al, 2006; Stenlid, 1976), daría como resultado el raquítico crecimiento de injertos incompatibles dado su reducido contenido en auxina, el cual también afecta a la diferenciación de elementos vasculares como a la lignificación (Mattson et al, 2003).

Los compuestos fenólicos han sido estudiados por muchos investigadores debido a la amplia variedad de funciones que poseen (revisado por Treutter, 2005). Entre ellas cabe citar su implicación en los procesos de incompatibilidad de injerto (Errea, 1998); fundamentalmente por su participación en la ruta de síntesis de la lignina, cuya alteración podría provocar acumulaciones que afectarían negativamente al desarrollo de conexiones normalmente lignificadas (Buchloh, 1960). Dentro de los compuestos fenólicos se ha estudiado el grupo de los flavanoles, por su implicación en la diferenciación celular y en la falta de lignificación en uniones incompatibles (Feucht y Schmidt, 1979). La relación existente entre las acumulaciones de estos compuestos con los problemas de incompatibilidad que presentaban distintas combinaciones ha sido estudiada por varios investigadores en especies distintas (Usenik et al, 2006; Musacchi et al, 2000, Errea et al, 2000; 1994b, 1992b; Treutter y Feucht, 1991). Las diferencias tanto cuantitativas como cualitativas en el contenido fenólico de combinaciones de injerto puede resultar en disfunciones metabólicas entre las células pertenecientes tanto al patrón como a la variedad (Musacchi et al, 2000; Errea, 1998).

Algunos investigadores han determinado que las peroxidasas desempeñan un importante papel en el proceso de incompatibilidad debido a su implicación en el mecanismo de lignificación. Estas enzimas participan en la formación de las sustancias radicales previas a la lignina por oxidación de los alcoholes cinámicos (ej. alcohol coniferílico) y requieren H₂O₂ como cosustrato. El perfil de isoperoxidasas se ha desvelado como un patrón de referencia para la identificación de incompatibilidad

patrón-variedad, de tal forma que cuanto mayor es la similitud entre el perfil de isoperoxidasas del patrón respecto a la variedad, mayor posibilidad para el desarrollo de un injerto satisfactorio (Gulen et al, 2005, 2002; Santamour et al, 1986). Las diferencias en el perfil pueden conducir a una lignificación anormal de los tejidos en crecimiento, así como una carencia de conexiones vasculares, finalizando en la formación de una unión incompatible (Santamour, 1988). Fernández-García et al (2004) estudiando la formación del injerto en plantas de tomate observaron un incremento de actividad peroxidasa durante el transcurso de la unión asociado al desarrollo de nuevas conexiones vasculares.

La amplia variedad tanto de síntomas como de causas expuestas es considerable, y esto dificulta la búsqueda de un marcador universal de incompatibilidad de injerto en plantas; dependiendo la respuesta de incompatibilidad de las especies injertadas.

OBJETIVOS.

El objetivo general de esta tesis es profundizar en la respuesta de la compatibilidad de injerto en combinaciones de albaricoquero sobre ciruelo con el fin de adquirir un mayor conocimiento de los procesos fisiológicos y bioquímicos que intervienen en la incompatibilidad patrón-variedad que permitan agilizar los procesos de selección de patrones frutales. Para ello, el análisis se centrará en las primeras fases de desarrollo mediante la aplicación de técnicas tanto histológicas como moleculares. Este objetivo general se abordará a partir de los siguientes subobjetivos:

Objetivo 1. Determinación histoquímica de los procesos implicados en el desarrollo del injerto.

Caracterización de los mecanismos fisiológicos que intervienen en la compatibilidad de injerto mediante el uso de técnicas histoquímicas de microscopía óptica y de fluorescencia, observando la estructura y disposición de las células comparando uniones compatibles e incompatibles establecidas en invernadero e in-vitro.

Objetivo 2. Comunicación intercelular en uniones de injerto.

Determinación de la permeabilidad simplástica y cuantificación del transporte plasmodesmal mediante la utilización de microscopía láser confocal de barrido, en uniones de callo establecidas in-vitro en un estadio temprano de desarrollo.

Objetivo 3. Procesos bioquímicos asociados a la compatibilidad de injerto.

Este objetivo se llevará a cabo mediante la búsqueda y caracterización de proteínas que podrían estar asociadas a procesos de incompatibilidad. Se complementará con el estudio de la enzima PAL (fenilalanina amonio liasa), clave en la ruta biosintética fenilpropanoide analizando la relación existente con la presencia de compuestos fenólicos en las primeras fases del desarrollo del injerto.

La presente tesis esta dividida en tres partes principales: anatomía de la unión mediante observaciones microscópicas, comunicación intercelular en tejido de callo, y por último una evaluación bioquímica de la respuesta de incompatibilidad a nivel proteico. En la primera parte, se analizan diversas respuestas histoquímicas que influyen en la formación de un injerto conduciendo hacia unión compatible o incompatible en

injertos establecidos en invernadero (capítulo 2), estudiando posteriormente las respuestas que se producen in-vitro (capítulo 3). Para profundizar en las primeras respuestas que se producen a nivel celular, la puesta a punto de técnicas para medir conectividad plasmodesmal célula-célula (capítulo 4) suponen un avance importante para posteriormente llevar a cabo el estudio de conexiones simplásticas en combinaciones compatibles e incompatibles (capítulo 5). Finalmente, se han buscado diferencias entre el perfil proteico de combinaciones compatibles e incompatibles con la consiguiente identificación de una proteína que desempeña un papel importante en la biosíntesis de sustancias de gran relevancia para diversos procesos celulares (capítulo 6) y se ha realizado un análisis de expresión de la enzima fenilalanina amonio liasa, clave en la síntesis de flavonoides (capítulo 7).

Los resultados derivados de esta investigación permitirán aplicar los métodos desarrollados en esta tesis a otras combinaciones para una evaluación temprana de la compatibilidad de injerto a corto plazo, que contribuirá a una mayor eficacia y rapidez de los métodos de selección y mejora convencionales.

2. CELL WALL CHANGES AND LOSS OF MEMBRANE INTEGRITY DURING GRAFT UNION DEVELOPMENT IN PRUNUS

ABSTRACT

Grafts from grown apricot/plum and plum/plum combinations plants (*P. armeniaca* L. cv. Moniqui and *P. cerasifera* x *P. munsoniana* cv. Marianna 2624) were established in the greenhouse to study the course time of graft development, the pectic polysaccharide staining pattern and the cell viability responses in-vivo during one month after grafting in both compatible/incompatible unions.

Histological analysis with ruthenium red and hydroxylamine-FeCl₂ which stain unsterified and highly methyl-esterified pectins respectively, indicated that cambial cells from compatible and incompatible grafts differ significantly regardless to the pectic polysaccharide staining response. In addition, differences were found as for the cell viability profile during the first month after grafting. Therefore, it cannot be excluded the involvement of the cell death in the incompatibility process. Such observations could be used to study early symptoms of the incompatibility response.

Keywords: graft compatibility, pectin, cambial activity, cell viability.

INTRODUCTION

Plant grafting is a propagation technique whereby two portions of living plant are joined in such a manner so as to continue their development as a single plant. Graft compatibility with at least most commercial cultivars is essential in order to improve the crop profitability. However, lack of graft compatibility between species is showed up especially when working with *Prunus* rootstock (Hartmann et al, 2002, Errea et al, 1994a, Herrero, 1951). Despite the fact that the grafted trees grow for years without external symptoms in the field, the incompatibility may manifest with the breakdown of the trees at the graft union area several years after grafting. This makes difficult to introduce new *Prunus* rootstock, and thereby broad testing must be carried out and compatibilities determined; being the early phases of graft development an important point to find an alternative method of detection of graft compatibility.

Capítulo 2

The major grafting events defined during the development of the graft are adhesion of the grafted tissue together, formation of callus tissue composed of parenchyma cells and vascular differentiation across the graft interface. Being the production and interlocking of the parenchyma cells that form the callus tissue, one of the important steps in callus bridge formation between scion and rootstock in a successful graft (Hartmann et al, 2002). In addition the differentiation from these callus cell into new cambium is also an interesting key within graft reaction as it has been revealed by many authors (Errea et al, 1994a; Soumelidou et al, 1994). Despite that few studies have been addressed dealing with the changes in cambial activity during graft development, it has been found that cambial activity stop earlier in the rootstock than in the scion of an incompatible graft (Moing and Carde, 1988).

The mechanism of control of incompatibility process, still remain unclear in spite of the interest of many authors. Failure of grafts is usually attributed to several factors in herbaceous and woody plants such as the existence of an inherent system of cellular incompatibility; formation of discontinuous plasmodesmata; vascular tissue connections as well as the presence of growth regulators and peroxidases (see review by Pina and Errea, 2005; Hartmann et al, 2002; Andrews and Marquez, 1993).

It has been shown that plant cell wall architecture is not irreversibly fixed once cell division is completed but continues to undergo changes (McCann and Roberts, 1994). The cambial cell walls contain large amounts of cellulose and pectic polysaccharides. However, during growth and differentiation of vascular cambium, actively dividing cambial cells undergo changes in cell wall structure (Sadvidge et al, 2000). Thus, it has been reported a high pectin content in actively growing cambial cells from hybrid Aspen trees whereas cessation of cambial activity was characterized by a decrease in the amount of pectin. Hence, the pectin distribution can be considered as an interesting marker of the early steps of cambial differentiation (Ermel et al, 2000; Guglielmino et al, 1997). The new question that arise after the formation of the new cambium is whether it maintains its meristematic activity once formed at the same level through both compatible/incompatible unions. In the present work, two methods for pectin polysaccharides staining have been performed to investigate it.

On the other hand, it is widely known that plant cells can suffer two types of cell death: necrosis and apoptosis. Since loss of membrane integrity is a feature of necrotic

cell death, techniques using membrane impermeant-dyes such as propidium iodide (PI) to in-vivo conditions may help to look into the cell death in-vivo. For a long time, many efforts have been carried out to elucidate the molecular mechanism underlying the plant development during differentiation, which was associated to cell death occurring during some developmental processes and in response to environmental stimuli (for review see Fukuda, 2000). Nowadays, Espen and coworkers (2005) have reported that in pear/quince grafts could exist a relation between apoptosis cell death and incompatible response; which opens a new line of research in this topic.

Moniqui is known for its exigent character and for incompatibility problems occurring with numerous rootstocks, but the employment of other rootstocks than *P.armeniaca* is restricted due to graft incompatibility of the localized type (Errea et al, 2000, 2001). With the aim of gaining an insight into how the incompatibility mechanism is taking place and how the cell death may impact during the early stages of development, the pectic polysaccharide pattern have been observed in diverse cell types several days after grafting, as well as the cell death influence in the distinct graft combinations during the first month after grafting.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

One apricot cultivar, 'Moniqui', (*P.armeniaca* L.) was grafted on 'Marianna 2624' (*P. cerasifera* x *P. munsoniana*) rootstock as incompatible combination. The homograft "MN2624/MN2624" was included as compatible one. Ungrafted Marianna 2624' and 'Moniqui' plants were taken as control. Grafts were made by "chip" budding (Howard, 1977) and grown in a controlled environment with a temperature range between 18 °C and 22°C in a greenhouse. Grafts were collected 5, 10, 20, 30 days after grafting. Five grafts were established by union and day. At least, three grafts were observed per combination and sampling days.

Light and fluorescence microscopy

For each collection day, the graft union was detached by pulling apart the scion and rootstock. The different graft partners were divided in free-hand longitudinal and transversal sections (50µm thick) in order to look into pectin localization after staining

Capítulo 2

with red ruthenium (Jensen, 1962) and hydroxylamine–ferric chloride reaction (HA-FC) (Reeve, 1959). Furthermore, the contact surfaces were stained with a solution of 0.07% calcofluor in water for cellulose (Huges and McCully, 1975), and with propidium iodide that is excluded from viable cells, 5ug/ml in water for 5min. Some sections were stained with calcofluor and counterstained with propidium iodide. The excess was removed by washing samples with distilled water. This combination allowed us to distinguish between alive and dead cells at the same time under a Leitz Ortholux fluorescence microscopy with epifluorescence using a BP355-425 excited filter for calcofluor and BP530-560 for PI response.

Statistical analysis

For statistical analysis percentage data (cellular viability) were subjected to arcsine root square transformation. Prior to ANOVA, the data were tested to normality. The number of nuclei visualized by PI were counted in three microscopical sections under the bud for each graft and day. Three graft samples were measured at different days (5,10,20,30) after grafting and the ungrafted control values were subtracted to each original data in order to rule out the specimen preparation effects.

The experimental design to estimate significant difference on cellular viability between compatible and incompatible unions several days after grafting was an ANOVA simple with three independent repetitions. In the case of significant differences, LSD test was used for means separation (STATGRAPHIC, PLUS ver 5.1 program). Data are presented as mean \pm standard deviation and significant differences are given at $P < 0.01$, between sample measurements for compatible and incompatible unions.

RESULTS

Graft union development

The grafts were established by chip budding procedure and the development of the bud union was followed by sampling each combination at weekly intervals. In Fig. 2.1.(a,c) is shown the external appearance during the first month, where it could be noticed the same pattern behaviour for compatible and incompatible grafts. The contact internal surface was observed under fluorescence microscopy after staining with calcofluor in order to evaluate the developing of initial callus when both scion and

rootstock were grafted. These observations of developing grafts allowed us to distinguish three stages of development during the first month after grafting in both compatible and incompatible combinations.

Stage1: During the first week of budding, adhesion between stock-scion took place in both compatible and incompatible grafts. The earlier response was the development of callus cells that form homogeneous masses which stain strongly with the cellulose-binding-fluorochrome calcofluor (Fig. 2.1.d).

Stage2: callus cell division began to take place in an ordered way in compatible unions (Fig. 2.1.e) in comparison to incompatible one and those cells differentiated into new cambium cells through the callus bridge from the second week (Fig. 2.1.f). The new cambial cells formed from the callus link the cambia of the partners resulting in a single cambium encircling the graft partner.

Stage 3: the new cambium cells redifferentiate and divide into the early vascular connections. It could be observed that the vascular cambium cell division produced elongated cells which allow the substance transport between the two graft partners (Fig. 2.1.g). Mostly, the vascular connections were established between the second and third week in compatible union but it could barely be observed in incompatible combinations during the second week, indicating a light “delayed” in the vascular continuity establishment between the graft partners within incompatible combinations.

When the vascular connections were developed, these were functionals in both compatible and incompatible since transported disodium fluorescein between graft partners (data not shown).

Staining for pectins in graft sections

Because pectic substances are some of the more important chemical constituents of the cell wall we used two methods to examine basic biochemical changes in cell wall structure (specifically that of unsterified and methyl-esterified pectins) associated with graft responses during the early stages of development.

Fresh hand sections from both combinations compatible and incompatible were stained with ruthenium red (RR), a dye common used to stain unsterified pectins. During the callus proliferation brought about across the graft union within the first week, there was a lot of cellular activity at the graft interface and the primary plant callus cell walls were positively stained with RR indicating the presence of unsterified pectic polysaccharides (Fig. 2.2.a). Apparently, this dye showed the same qualitative

pectin pattern in the cell wall of callus cells in both compatible incompatible unions. Nonetheless, when the callus tissue began to differentiate into new cambial cells from the second week and further on, there were differences in the RR response of these new cambial cells. Thus, an uniform staining of the unsterified pectic polysaccharides was observed into cells remaining in stage 2 from the compatible detached fresh unions (Fig. 2.2.b) in comparison to a lacking of dye response in some areas of new cambial cells localized in the internal surface of incompatible grafts (Fig. 2.2.c). No clearly differences were detected within the cells derived from the new cambium and presenting the stage 3 by means of this staining.

RR stains the pectic substances red if they are present in fairly high concentrations, but failure to stain does not confirm the absence of pectin. To confirm the above results we have used a specific hydroxylamine-ferric chloride reaction (HA-FC) for histochemical localization of pectin that reacts with the methylated pectins to produce a brown stain. For increasing the color intensity of reaction all the sections were methylated so that the alkaline solution of hydroxylamine reacted with the methyl esters of pectin present in sections of the plant tissue, being a qualitative procedure. Within the two weeks after grafting, cells in stage 1 presented a positive HA reaction (Fig. 2.2.d) showing the presence of methyl-esterified pectic substances. The methylated sections showed the same pattern of staining in both compatible and incompatible grafts. Nevertheless, a gradual decrease in the relative amounts of esterified pectins measured by the intensity of the reaction was observed especially on the xylem side 30 DAG in compatible combinations (Fig. 2.2.e) by contrast to incompatible ones (Fig. 2.2.f).

Staining results for light microscopy are summarized in table 2.1. In every case, esterified and unsterified pectins were more intense in the early stages of graft development.

Cellular death in graft unions

The effect of cellular death on the graft compatibility (compatible/incompatible unions) several days after grafting was evaluated and expressed as the cellular viability. Likewise, differences were detected within graft unions (compatible or incompatible) during the time course of graft development (days). Incompatibility reaction reduced cellular viability by increasing the number of PI label cells and this reduction was significant from the third week in the scion (Fig. 2.3.a) and rootstock (Fig. 2.3.b), in

both compatible incompatible unions. In the combinations studied here, the most significant changes affecting the cellular death related to the graft incompatibility reaction were found in the scion from the graft partners. The cellular death effect was more pronounced in the scion from the incompatible union (**MO/MN**) than compatible one (**MN/MN**), with a viability reduction approximately of 50% at 30 days after grafting in the scion as can be noticed. Thus, the most striking cell death effect was produced during the third and four week in the scion from the incompatible union. In the stock from the incompatible combination the reduction was less strong at 30 DAG. The analysis of variance revealed a highly significant effect of the main factor compatibility from the third week (table 2.2).

Regarding to the cell viability profile within graft unions the most cell death activity was also recorded in the scion through both compatible/incompatible grafts. In addition to the callus cell division as a wounding response at the first week, it could also be observed that some callus cells remained in stage 1 during the second week after grafting (Fig. 2.4.a). Some of these cells had lost their membrane integrity in both graft partners of incompatible unions (Fig. 2.4.b). From the second week and subsequent days, a progressive masking of the calcofluor in the cell wall (Fig. 2.4.c) coincided with isolated zones where there was more cellular death (Fig. 2.4.d). Furthermore, It could be seen that the cells derived from the new cambial cells tended to suffer more death within the incompatible combinations during the third and four week (Fig 2.4.e,f).

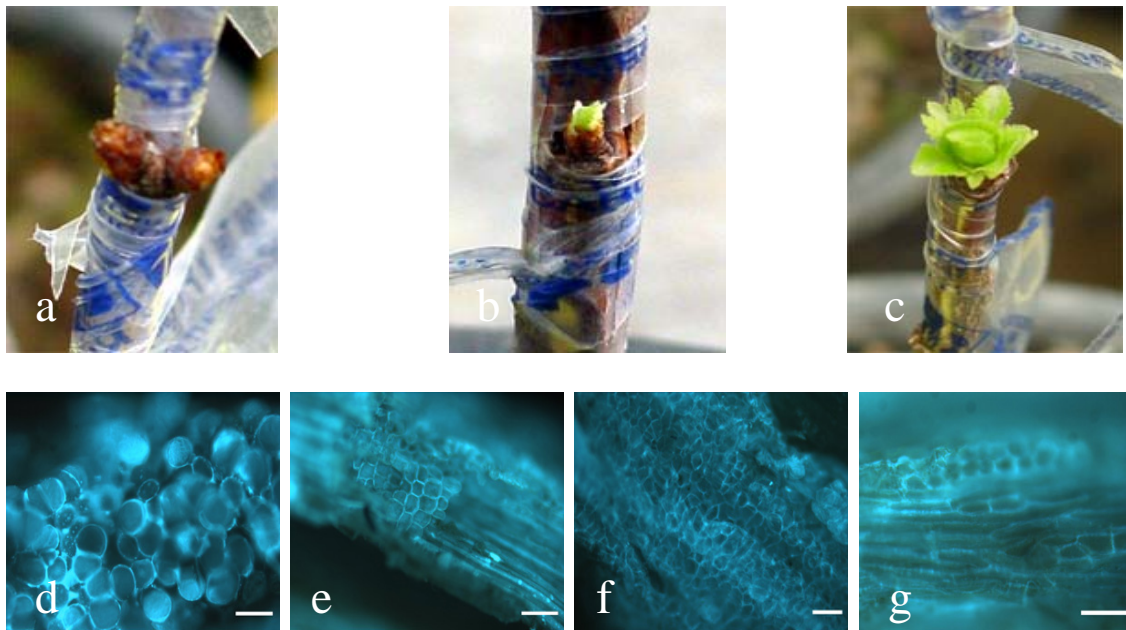


Figure 2.1. a-c) External graft development by chip budding during one month after grafting. d) Longitudinal section through a 1-week-old bud union of MO/MN detached fresh union stained with cellulose-binding-fluorochrome calcofluor white, showing callus cells in stage 1. Bar = 50 μ m. e) organized disposition of callus cells from a compatible graft union (MN/MN), 10 DAG. Bar = 50 μ m. f) new cambium differentiating from the callus tissue of a compatible homograft MN/MN in stage 2, 20 DAG. Bar = 100 μ m. g) vascular elements in stage 3 within a 30 day-old incompatible union MO/MN. Bar = 50 μ m.

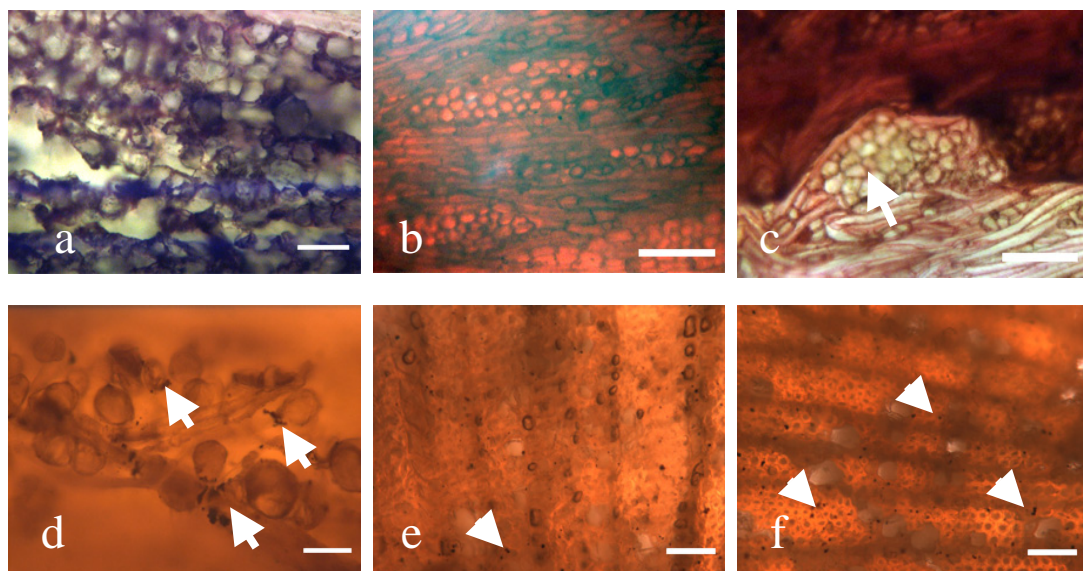


Figure 2.2. Ruthenium red (RR) staining and hydroxylamine reaction of graft sections viewed under light microscopy. a) RR staining on a detached fresh compatible graft showing callus cell responding to the dye, 5 DAG. Bar = 50 μ m. b) Uniform RR staining from new cambial cell walls in a compatible graft 30 DAG. Bar = 100 μ m. c) Internal surface of an incompatible graft at 30 DAG, showing an area where RR staining is lacked in the new cambial cell (white arrow). Bar = 100 μ m. d) Compatible

graft interface at 10DAG, showing hydroxylamine-FeCl₂ reaction with some of the methyl ester groups of pectins indicated by white arrow. Bar = 50 μm. **e-f)** HA-reaction in compatible and incompatible union at 30DAG respectively. Esterified pectins are showed with white arrow in both of them. Bar = 50 μm.

Table 2.1. Summary of the reactions of each cell type in compatible/incompatible grafts to ruthenium red and hydroxylamine-FeCl₂.

Compatibility	Cell type	Ruthenium red	Hydroxylamine.
Compatible	Callus cells.	++	++
	Cambial cells.	++	++
	Vacular connections.	+	-
Incompatible	Callus cells.	++	++
	Cambial cells.	+	+
	Vacular connections.	+	+

- weak or non staining; + moderate staining; ++ strong staining.

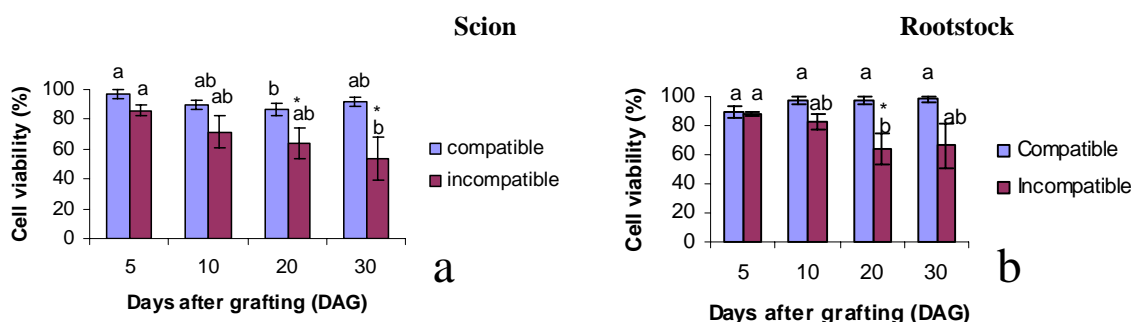


Figure 2.3. Loss of membrane integrity during graft development. Percentage of cellular viability several days after grafting in a compatible (MN/MN) and incompatible union MO/MN (mean ± standard desviation). Measurements taken in the scion (**a**) and in the stock (**b**) graft partner from both compatible/incompatible unions. Bars followed by the same letter within the same graft union are not stadistically different at P<0.01. * Denotes significant differences between compatible and incompatible combinations within the same day (LSD mean separation).

Table 2.2. Statistical significant differences in the response of compatible/incompatible combinations to the cell viability. Mean squares for Cell viability tested several days after grafting (DAG) in the scion and rootstock from the graft partners. The values are given within the same day. It has been applied the arcsin or angular transformation which is appropriated for percentages, where p means Cellular viability.

DAG (Scion)	$SIN^{-1}[SQRT(P)]$	F test	DAG (Rootstock)	$SIN^{-1}[SQRT(P)]$	F test
5	0.0915135 ^{NS}	10	5	0.0005607 ^{NS}	0.23
10	0.0856815 ^{NS}	8.87	10	0.121268 ^{NS}	11.28
20	0.107468 [*]	13.34	20	0.377003 [*]	26.45
30	0.327134 [*]	26.48	30	0.382537 ^{NS}	20.98

NS, * Non significant or significant at P<0.01.

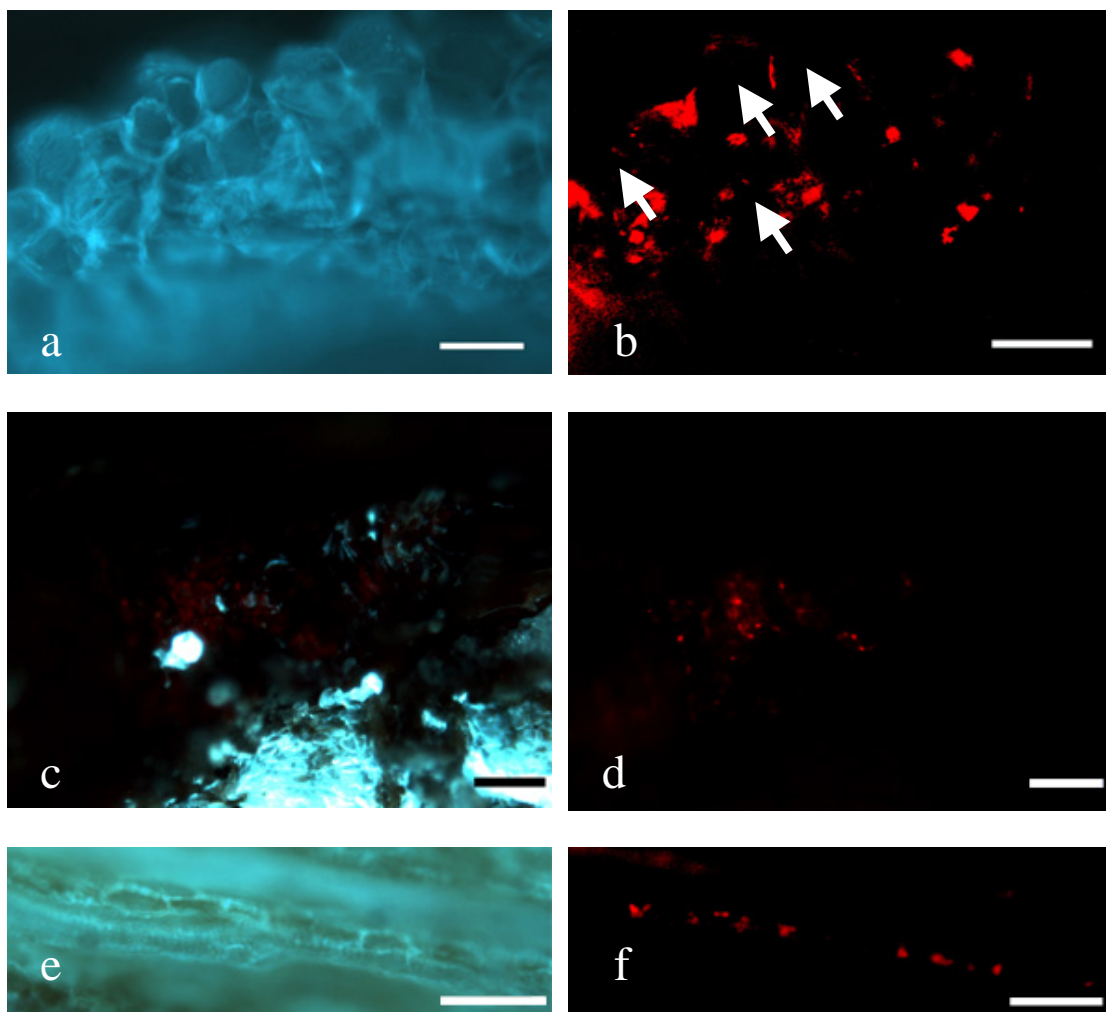


Figure 2.4. Calcofluor and propidium iodide labelling at the different developmental stages. **a)** longitudinal section showing the disorganized masses of callus stained with

cellulose at a two week-old incompatible union **MO/MN**. Bar = 50 μm . **b)** Same section stained with PI identifying some group of dead cells where the PI leaks into the cell and bound to DNA and RNA of crushed cells. Some alive callus cells are indicated with white arrows. Bar = 50 μm . **c)** Picture showing a 10 day-old rootstock of the heterograft (**MO/MN**). The section was stained with calcofluor and counterstained with PI showing a loss of cell viability (PI label cells). An area not responding to calcofluor viewed after excitation with a BP355-425 filter. Bar = 100 μm . **d)** Same section viewed after excitation with the PI excitation filter (BP530-560) to confirm the detection of nuclei and not tissue red autofluorescence. Bar = 100 μm . **e-f)** cell death in vascular elements from **MO/MN** incompatible combination at 30DAG excited with calcofluor and PI filter, respectively. Bar = 50 μm .

DISCUSSION

As part of our investigation into the underlying causes of localized incompatibility, we have reported the results of a histological study of apricot/plum and plum/plum grafts undertaken in order to obtain more information about the chronological sequence of graft formation regarding to presence of pectin polysaccharides and cellular death occurring during the graft development in the graft interface. Several authors have defined the sequence of structural events during the healing of the grafts in woody and herbaceous plants (for review see Pina and Errea, 2005; Hartmann et al. 2002; Andrew and Serrano-Marquez, 1993). In this work, the major events during the graft union development have been classified into three stages and the discussion is emphasized in the cell response during these distinct stages.

The first cellular events leading to the formation of a graft union and what we have defined as stage 1 is the adhesion and callus cell proliferation at the stock-scion graft interface due to a wounding response (reviewed by Moore, 1991). In these primary callus cell walls presented during the first week after grafting, we have observed a similar response between compatible and incompatible grafts for general localization of pectins in cell walls with RR dye. Cell-cell adhesion could be mediated either through the cellulose and associated crosslinking glycan network, or through the pectic polysaccharide network or through both. However, pectic polysaccharides are thought to be major contributors to cell adhesion and tissue cohesion (for review see Jarvis et al, 2003, Ridley et al, 2001). The presence of pectic material in the proliferating callus cells have been described in grafts as cementing substances due to their involvement in cell adhesion and the establishment of the first mechanical union between the graft partners (Jeffree and Yeoman, 1983; Miller and Barnett, 1993). The findings reported in

Capítulo 2

this study support what the cellular adhesion take places in both kind of grafts compatible and incompatible (Moore, 1984, 1991), although it could not be claimed that the cell adhesion is established at the same extent. In this sense, it seems that some form of adhesion of parenchymatous tissues is an early event in the formation of a graft union between the cut faces of compatible/incompatible grafts (Jefree and Yeoman, 1983).

Additionally, we included the propidium iodide (PI) dye with the aim of study the cell viability. It is a fluorescent nucleic and membrane impermeant acid dye, which it is generally excluded from viable cells. During the first week, PI fluorescence seemed to be associated to the cells being crushed when the graft partners are bound together. At the same time a lot of living proliferating callus cells are produced consisting with the wounding response.

During the second week, differences related to graft development could be observed between both compatible and incompatible combinations. Callus cells are mostly packed in an orderly and homogeneous disposition in compatible grafts whereas these are not well-organized in the incompatible one. In addition, the new vascular cambium is developed between scion and rootstock in the callus bridge area during the graft union formation in both of them. The differentiation of new cambium from the callus tissue have been also reported to occur at 7 days in apple grafts (Soumelidou et al, 1994), at 10 days in apricot grafts (Errea et al, 1994a) and from about 50 days after grafting in *Picea sitchensis* (Barnett and Weatherhead, 1988).

At the same time, observations at the microscopical level have revealed that the RR cambial cell staining pattern differ between compatible incompatible unions. A possible explanation about the less unsterified pectin response in the incompatible new cambial cells would be the cessation of cambial activity which is accompanied by a decrease of the degree of methylesterification (Willats et al, 2001; Ermel et al, 2001). Thus, a high unsterified pectin content seems to characterize actively dividing and elongating cells in the compatible unions, whereas a relatively decrease of the RR staining in the incompatible union could be related to the cessation of division. This cessation of cambial meristematic activity might explain the reduction of production and growth of cambial derivatives. Therefore, lower number of cells in stage 2 with the capacity to become into stage 3 in the incompatible grafts, would result in less vascular connections (Schoning and Kollmann, 1995; Espen et al, 2005).

Likewise, most of cells into stage 1 that had lost their membrane integrity were mainly viewed in masking cellulose areas in incompatible grafts during the second

week. These observations could be interpreted as that the unstaining material from incompatible unions corresponding to undifferentiated old parenchymatous callus tend to suffer a cellular death phenomenon (Errea et al, 1994).

During the third and four week after grafting, most of the cells are developed in stage 3 within compatible grafts and to lower extent in incompatible ones. The key events determining compatibility in herbaceous plants occur when vascular continuity is becoming established (Wang et al, 1996; Schoning and Kollmann, 1995, Jeffree and Yeoman, 1983). Nevertheless, it has been found once again that the establishment of vascular continuity between the stock and scion from incompatible grafts does not guarantee the ultimate success of a graft in woody plants according to many other authors (Espen et al, 2005; Ermel et al, 1997; Errea et al, 1994).

The most striking differences of the cells showing the stage 3 through both compatible/incompatible grafts have been seen with the hydroxylamine-FeCl₂ assays. This methodological approach was performed for specific methylated pectin localization since reacts with the methyl ester groups of pectins to produce a reddish-brown precipitate (Reeve, 1959). A decrease of methylation with the HA-reaction have been visualized on the xylem side in the compatible union regarding to the incompatible one from the third week, reinforcing the view from already completely differentiated xylem cells (Ermel et al, 2000; Sadvidge et al, 2000). Likewise, a decrease in the degree of methylation was also observed in other materials when the cells ceased to divide (Dolan et al, 1997; McCann et al, 1993). It could explain the early stages of differentiation of the vascular cells produced by the cambium in the compatible combinations that have reached before their maturity in comparison to the light delayed from the incompatible one accompanied by a greater methylation pectin degree on the xylem side. Therefore, one difference between compatible and incompatible unions might be from the meristematic cells that proliferate and then differentiate into two separate multicellular tissues: xylem and phloem. As it has been already reviewed the degree of methyl-esterification can greatly influence the pectic network and cell wall properties (see review by Willats et al, 2001). Nowadays, increasing evidences have provided that differences in pectin distribution can be considered as early markers of cell differentiation and development (McCartney and Knox, 2002; Ermel et al, 2000; Gluglielmino et al, 1997).

At this time, it has been also recorded the greater noticeable evidence from cell viability changes in the graft interface between compatible incompatible unions.

Capítulo 2

Therefore, the less cell viability observed during this period might be related to the vascular differentiation processes.

Recent studies have revealed that in plants tracheary element differentiation require programmed cell death (PCD) (for review see Fukuda, 2000). Despite that the PI is a good marker of disrupted plasma membrane integrity in in-vivo conditions, it does not permit to distinguish between necrotic and apoptotic cells that lose its membrane integrity at late stages from PCD. Therefore, the increasing evolution from the nuclear staining (DNA and RNA) during the incompatible graft development in comparison to the compatible one could be due to the two kind of cellular death above mentioned. Thus, our values differ from those recently reported by Espen et al (2005). According to these authors who examined other graft system, there were a decrease in the death cell in incompatible in-vitro micrograft from pear/quince graft combinations. However, this research utilized TUNEL technique which specifically detect programmed cell death (PCD) in embedded material. For this reason, a direct comparison with our research may not be considered. For further progress in this field there is a need to combine physiological and genetic approaches for solving open questions of cellular death during grafting development.

To conclude, the pectin polysaccharide response is different into the new cambial cells from compatible/incompatible grafts. In function to these results the pectic polysaccharide response can also be considered as an interesting marker of the early steps of cambial differentiation during graft development. All these observations also suggest a strict control of pectic enzymes during cell differentiation for the graft development processes, although more studies are needed. Furthermore, because significant differences have been found regarding to the cell viability, it may enable detection of the first incompatibility response. These observations contribute to our understanding of the early stages of graft development and, thereby facilitate the study of the compatible/incompatible diagnosis during the first month after grafting.

3. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LA RESPUESTA CELULAR A LA UNIÓN EN COMBINACIONES ESTABLECIDAS IN VITRO

RESUMEN

En este trabajo dos sistemas de injerto in vitro han sido usados para estudiar las respuestas iniciales durante los primeros estados del desarrollo de la unión de injerto. La fusión de callo in vitro y las uniones de tejido herbáceo in vitro de combinaciones compatibles e incompatibles de albaricoque / ciruelo fueron estudiadas en las dos primeras semanas después de la unión con el fin de evaluar los cambios histológicos asociados a reacciones de incompatibilidad, incluyendo las diferentes respuestas morfológicas y de tinción.

Los resultados observados demostraron que la primera respuesta de adhesión y proliferación de callo ocurre en ambos sistemas de injerto tanto para las combinaciones compatibles como incompatibles. Sin embargo, la formación de nuevo cambium desde el tejido de callo a través de la superficie de injerto parece estar retrasada en la combinación incompatible. La diferencia más destacada en relación con la intensidad de tinción de la pared celular se encontró a los 10 y 15 días después de establecerse la unión. Se observó una menor respuesta a la presencia de celulosa, carbohidratos y polisacáridos pécticos en las células parenquimatosas de la zona de unión de combinaciones incompatibles en comparación con las compatibles. Además, una mayor presencia de depósitos intracelulares permanecían en las células de callo de la unión incompatible a los 15 días asociadas a compuestos fenólicos.

Las observaciones llevadas a cabo en este trabajo sugieren diferencias en la composición de la pared celular de las células de callo, así como un potenciado metabolismo en las uniones incompatibles como consecuencia de situaciones de estrés provocadas entre las dos partes del injerto.

Palabras clave: uniones in-vitro, respuestas de injerto, callo e histología.

Abreviaciones: DAG: días después de la unión; RR: rojo de rutenio; Ca: callo; C: cambium, X: Xilema.

INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo de la unión del injerto tienen lugar una serie de etapas que se encuentran bien descritas en especies leñosas y herbáceas (Pina and Errea, 2005, Hartmann et al, 2002; McCully, 1983). La primera respuesta que se produce es la adhesión y formación de células de callo. En la superficie de unión de las dos partes que forman el injerto y desde la zona del cambium, que tiene amplia capacidad meristemática, comienzan a formarse células de parénquima que se entremezclan y enlazan, dando lugar a un tejido calloso que llena el espacio entre los dos componentes (Errea et al, 1994a). El puente de callo también se forma desde la región cambial, corteza, médula (Stoddard y McCully, 1979) o radios parenquimáticos del xilema (Barnett et al, 1988). Después de la formación del callo la actividad meristemática continúa durante el desarrollo de la unión, culminando con la formación de cambium vascular en la zona del puente de callo. Finalmente, la formación de conexiones con nuevo xilema y floema secundario desde el nuevo cambium, permite la conexión de ambas partes del injerto.

Durante la primera fase del desarrollo del injerto, se han discutido los primeros sucesos que participan en la adhesión de los tejidos parenquimatosos entre las superficies de contacto patrón-variedad. Algunos autores proponen que la presencia de proyecciones en las paredes celulares que se encuentran en la interfase del injerto podrían llevar a un mecanismo de reconocimiento celular (Jeffree y Yeoman, 1983, Yeoman et al, 1978). En injertos de *Picea Sitchensis*, la naturaleza de estas proyecciones en la pared celular del callo en formación sugieren su papel activo en el reconocimiento celular y la cohesión satisfactoria de los tejidos entre células de callo opuestas (Miller and Barnett, 1993). Sin embargo, estos trabajos no han presentado evidencias directas que muestren que las células son de las diferentes partes del injerto, siendo este modelo de reconocimiento celular cuestionado por Moore y colaboradores (1981a, b). Estos autores sugieren que la cohesión inicial entre patrón y variedad es producida como resultado de la deposición y posterior polimerización de los materiales presentes en la pared celular como respuesta a la herida. A pesar de estos estudios previos realizados en plantas herbáceas, existen pocos trabajos relacionados con las primeras etapas del desarrollo del injerto, y algunos autores han sugerido que los principales eventos que determinan la compatibilidad ocurren posteriormente cuando la continuidad vascular ya se ha establecido.

Estudios llevados a cabo en plantas leñosas han puesto de manifiesto que existe un diferente comportamiento celular producido durante las primeras fases del desarrollo del injerto (Errea et al, 1994a; 2001) y que el establecimiento de conexiones vasculares tiene lugar también en combinaciones incompatibles (Ermel et al, 1997; Espen et al, 2005). Estas investigaciones sugieren que se podría iniciar un posible diagnóstico que determinara antes del establecimiento de las conexiones vasculares la futura respuesta de compatibilidad en estas combinaciones de injerto..

El objetivo de este trabajo es profundizar en los conocimientos de los primeros estados de desarrollo del injerto basados fundamentalmente en la respuesta histoquímica de las uniones de combinaciones compatibles e incompatibles. Diferentes aspectos histoquímicos e histológicos han sido analizados en las dos primeras etapas de desarrollo descritas anteriormente. La adhesión de las dos partes que forman la combinación de injerto y la proliferación de células de callo así como su diferenciación a nuevo cambium han sido estudiadas a través de dos sistemas de unión establecidos in vitro, la fusión de callo y la unión de tejido herbáceo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal establecido in vitro fue el cultivar de albaricoquero ‘Moniqui’ (*Prunus armeniaca L.*) (MO) y el patrón ‘Mariana 2624’ (*P. cerasifera x P. munsoniana*) (MN), tomando como combinación compatible el homoinjerto (*MN / MN*) y como incompatible el heteroinjertos “*MO / MN*”. El tejido de callo in-vitro se obtuvo a partir de segmentos de tallo de unos 0.5 cm en condiciones asépticas. Los explantos fueron tratados 5 min con una disolución al 70% de etanol, después permanecieron durante 20 min y en agitación en una disolución 10% de lejía, finalizando con 3 aclarados del material en agua destilada estéril. Después de la siembra se procedió a la propagación en medio MS (Murashige and Skoog, 1962) (Fig. 3.1.a). La obtención de planta in-vitro (Fig. 3.1.b) se realizó mediante el establecimiento de brotes en medio MS suplementados con 0.7mg/l BAP y en presencia de 0.1mg/l GA₃. Los cultivos se mantuvieron en una cámara de cultivo a 22±2°C, 16h de fotoperiodo a 17 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Se realizaron subcultivos cada mes.

Establecimiento de las combinaciones

Uniones de callo in-vitro

Las diferentes uniones se realizaron colocando en una placa petri con medio de cultivo dos trozos de callo en posición vertical (Fig. 3.1.c). Las condiciones de cultivo se establecieron igual que para el tejido de callo. Las diferentes combinaciones compatibles/incompatibles se muestrearon 1, 3, 5, 7 y 10 días después del establecimiento de la unión. Se realizaron más de 5 uniones por combinación y día siempre manteniendo condiciones asépticas. El tejido de callo de los dos genotipos sometidos a la herida sirvieron como controles a los mismos días.

Uniones de tallo in-vitro

Las uniones se llevaron a cabo colocando dos fragmentos de tallo de 0.5-1cm de longitud en posición vertical en las mismas condiciones experimentales que los ensayos realizados con fusión de callos in-vitro. Las distintas combinaciones patrón-variedad se mantuvieron unidas durante dos semanas. Las observaciones histológicas se realizaron a 1, 5, 10 y 15 días después del establecimiento de las uniones compatibles o incompatibles.

Histología

Las muestras para los estudios histológicos se procesaron mediante dos procedimientos:

Inclusión en parafina

Para la observación del material por microscopia los dos componentes de la unión se separaron a los diferentes días (Fig. 3.1.d) y se siguió un proceso de fijación, inclusión, corte y tinción de las preparaciones obtenidas. El tejido de callo se fijo en FAA y se deshidrató en una serie de alcohol butílico terciario (TBA) (70, 85, 95 y 100 %), incluyéndose finalmente en parafina a 60°C (Leica histowax) (Johansen, 1940). Una vez incluido el material los bloques de parafina se cortaron en un microtomo de rotación Mod.1130/Biocut (Reichert-Jung, Alemania, Heidelberg) a 8µm y se montaron sobre los portaobjetos con pegamento Haupt y agua formolada 3%. Anterior a la tinción, los cortes fueron desparafinados en xileno durante 5 minutos, hidratados en una serie de alcoholes etílicos durante 2 min (100, 70 y 40%) y lavados en agua destilada.

Inclusión en historesina

Las uniones de tallo se separaron y cada muestra se fijó en una solución al 2.5% de glutaraldeído en tampón fosfato 0.03M pH 6.8 durante 24 horas en vacío (Sabatini et al, 1963). El material, una vez fijado, se lavó con el mismo tampón dos veces durante 15 min y se deshidrató en una serie de alcoholes etílicos (50, 70 y 96%). Después de la infiltración toda la noche en historesina: etanol (v:v), los especímenes se incluyeron en historesina 500-LK (Reichert-Jung, Germany, Heidelberg) y se seccionaron transversalmente en cortes a 2 μ m usando cuchillas de vidrio en un ultramicrotomo (Reichert-Jung Ultracut E).

Tinciones

Una vez obtenidos los cortes tanto en parafina como en historesina se procedió a su tinción para celulosa con una solución de calcofluor 0,07% en agua (Huges and McCully 1975) y para la localización general de las pectinas con una solución 0.02% de rojo de rutenio (Jensen, 1962). Además, los cortes transversales semifinos se tiñeron con azul de toluidina para el estudio de las estructuras celulares (Feder and O'Brien, 1968) y con PAS (periodic acid-Schiff) combinado con azul de toluidina (O'Brien and McCully, 1981) para carbohidratos y estructura general. Con el objetivo de detectar compuestos fenólicos las secciones de historesina se incubaron 30 segundos en una solución 1% Safranina (w/v) en 50% etanol, se lavaron en agua destilada y se tiñeron 2 min en 1% de azul de metileno. Las secciones teñidas con calcofluor se examinaron en un microscopio de fluorescencia Ortholux II (Leitz, Wetzal, Germany) bajo epiiluminación fluorescente con filtro D (filtro excitador BP355-425, filtro bloqueador LP466). Las observaciones no fluorescentes se hicieron en el mismo microscopio pero con luz normal transmitida. Las imágenes se tomaron con una cámara Leica DC 300 acoplada al microscopio.

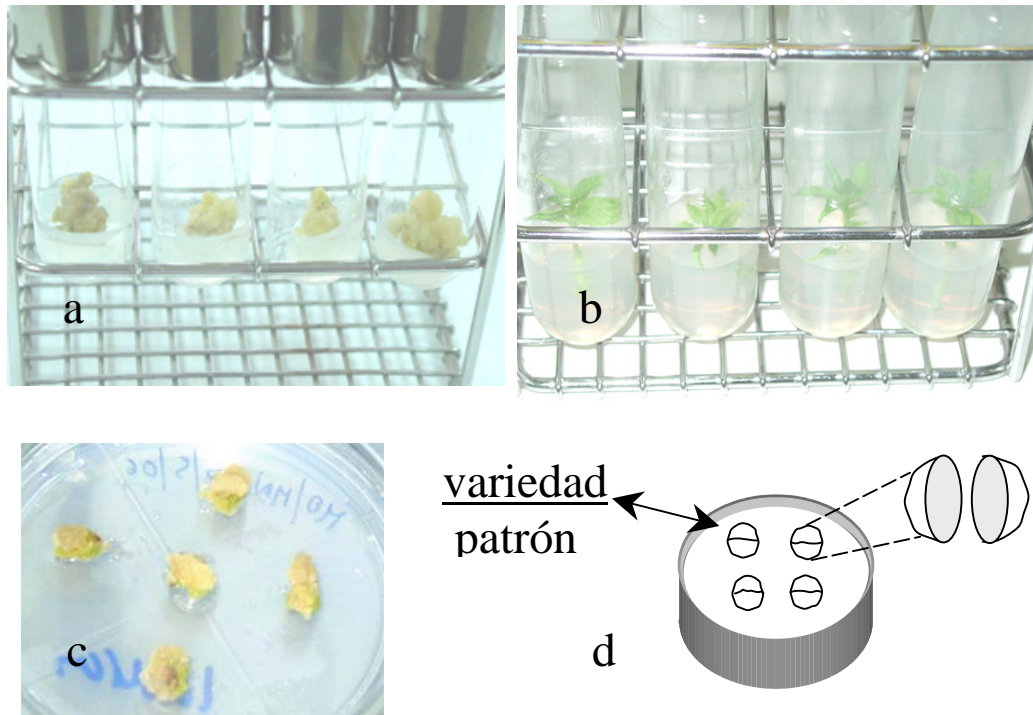


Figura 3.1. a-b) Cultivo de callo y planta establecida in-vitro del patrón. c) Uniones de callo mantenidas en posición vertical en el interior de una placa petri con medio de cultivo esterilizado. d) Representación esquemática de la separación de las uniones establecidas in-vitro para su posterior inclusión en parafina o historesina.

RESULTADOS

Se han caracterizado los estados iniciales de desarrollo de la unión en los dos sistemas de injerto in vitro durante las dos semanas después del establecimiento de la unión.

Fusión de callo in vitro

Con el fin de conocer el comportamiento de las células en la fusión de callos in vitro, la respuesta de la unión se examinó durante las dos semanas posteriores al establecimiento de dicha unión. En el desarrollo del ensayo se distinguió entre las células de la superficie de contacto y las capas celulares más alejadas de la zona de contacto. El tamaño celular de las dos áreas consideradas fue aparentemente diferente dentro de la misma combinación. En la zona de contacto el tamaño celular fue más pequeño, debido probablemente a una potenciada división celular y metabolismo en esta

zona. Así, las células de callo separadas de la superficie de injerto tenían un aspecto diferente con respecto a las células que crecían en contacto directo con las células opuestas, sin que dichas diferencias tuvieran ninguna relación con la respuesta de compatibilidad. Se observó pues una enorme variabilidad dentro de la misma combinación en función de la zona muestreada, hecho que se tuvo en cuenta a la hora de establecer comparaciones dentro de la misma área de la zona de injerto.

Durante la primera semana, las células de la zona de contacto comienzan rápidamente a dividirse y proliferar en la mayoría de las combinaciones (Fig. 3.2.a). Para observar la estructura y aspecto de las células, se aplicó la tinción de calcofluor que tiñe la celulosa de las paredes celulares, y se visualizó que las células de callo de la zona de contacto presentan una respuesta diferente en la segunda semana. Las células de la combinación compatible presentan un crecimiento más organizado y una pared celular más delgada (Fig. 3.2.b) que las células de las uniones incompatibles (Fig. 3.2.c). Así mismo se pudo observar una respuesta más débil a la tinción con calcofluor en la pared celular de algunos grupos de células de la unión incompatible en este mismo periodo de tiempo (Fig. 3.2.d). Durante la dos semanas posteriores al establecimiento de la unión estuvo presente una proliferación activa de las células de callo (Fig. 3.2.e).

Por otro lado, y con el fin de detectar la respuesta a la presencia de pectinas y su localización, se utilizó la tinción de rojo de rutenio (RR). Los resultados mostraron que en las células situadas en la zona de contacto de la unión, la tinción en las uniones compatibles, incompatibles y en los controles a la herida era mayor en todas ellas con respecto a la zona alejada de la zona de contacto.

El hecho más destacado fue observar que los polisacáridos pécticos aparecen en mayor cantidad en las paredes de algunas células de callo de combinaciones compatibles así como en el espacio extracelular, pero en menor cantidad en las combinaciones incompatibles (Fig. 3.3.a,b). Las mayores diferencias en la intensidad de respuesta a la tinción se detectaron en la segunda semana, con una mayor respuesta a la tinción en la pared celular de las combinaciones compatibles, indicando una mayor presencia cualitativa de polisacáridos pécticos en dichas paredes (Fig. 3.2.c,d). Los resultados se recogen en la table 3.1. Además, se comparó el grado de crecimiento en peso de las distintas combinaciones de callo utilizados durante las dos semanas de unión, pero no se vieron diferencias significativas relacionadas con la compatibilidad de injerto (datos no publicados).

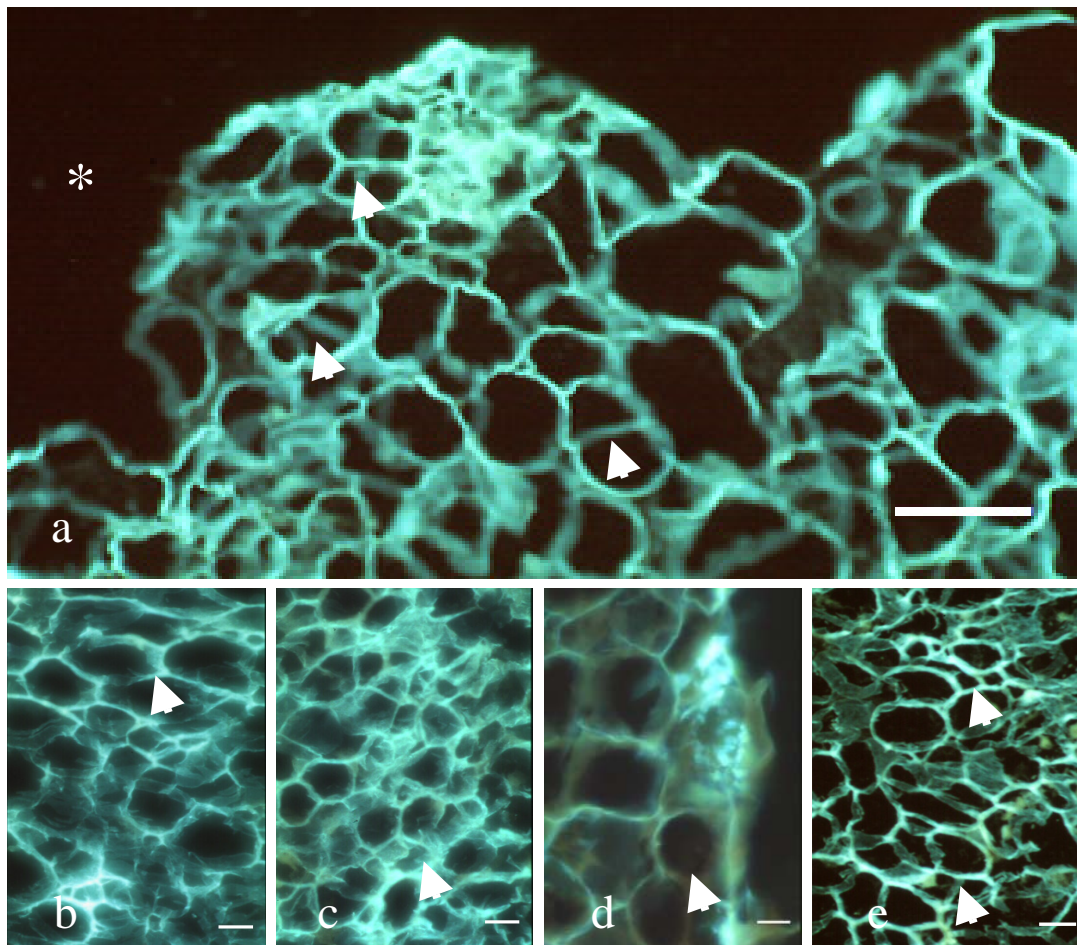


Figura 3.2. Respuesta al calcofluor de las células de callo correspondientes a la fusión de callos in vitro dos semanas después de realizada la unión. **a)** Células de callo de la combinación compatible 3 DAG. La zona de contacto se representa por un asterisco (*) y las flechas blancas indican división celular. Bar = 20 μm . **b-c)** Diferencias en el grosor de la pared celular de las células de callo en combinaciones compatibles e incompatibles respectivamente, 10 DAG. Bar = 50 μm . **d)** Algunas células se tiñen débilmente con calcofluor en la variedad de la combinación compatible los 10 días del injerto. Bar = 20 μm . **e)** Células de callo de la unión incompatible 10d mostrando células irregulares con divisiones (flecha blanca). Bar = 50 μm .

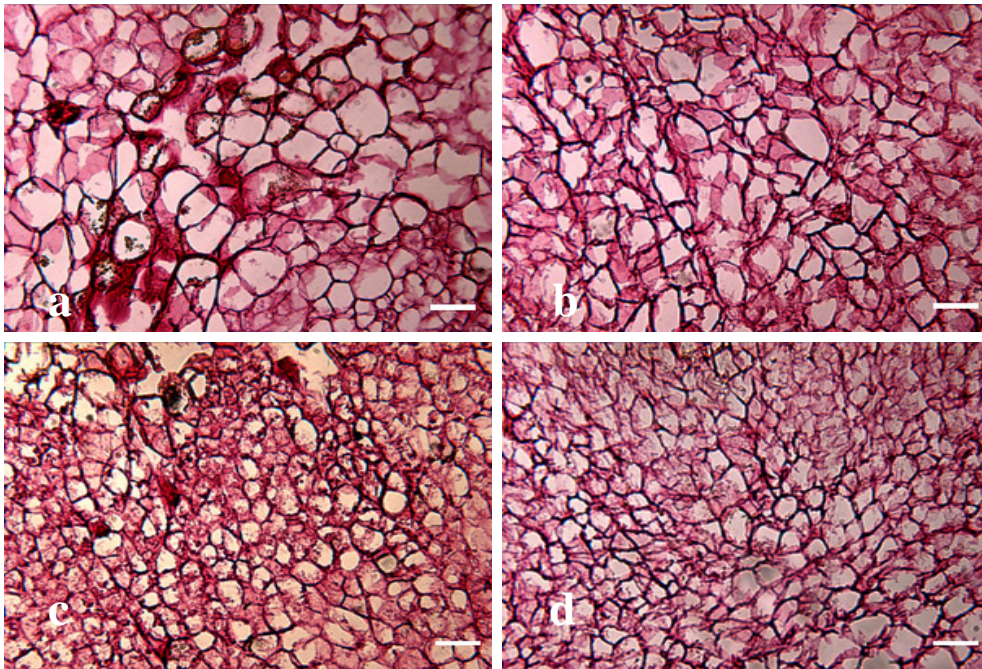


Figura 3.3. Polisacáridos pécticos de células localizadas en la zona de contacto. Tinción rojo de rutenio. **a)** Zona de unión entre los tejidos de callo de Mariana 2624 a los 7 días después del injerto, mostrando un alto contenido de material péctico entre células. Bar = 50 μ m. **b)** Disposición desorganizada de células y menor contenido péctico entre células de la interfase incompatible a 7 días. Bar = 50 μ m. **c-d)** Tinción RR en la pared celular (mayor presencia de pectinas) en la unión incompatible mientras que la compatible muestra una tinción mas débil (menos contenido péctico) a los 10 días en las células localizadas en la interfase de la unión. Bar = 50 μ m.

Tabla 3.1. Comparación de las respuestas histoquímicas entre combinaciones compatibles e incompatibles en la zona de unión en las dos semanas después de la unión in vitro de callos. - no diferencias, + diferencias moderadas, y ++ muchas diferencias.

	Especificidad	Primera semana	Segunda semana.
Calcofluor	Celulosa	-	++
Rojo de Rutenio	Polisacáridos pécticos	+	++

Uniones herbáceas in vitro

Desarrollo inicial de la unión

Se tomaron muestras de las uniones de tallo herbáceo de combinaciones compatibles e incompatibles creciendo in vitro durante los 15 días posteriores al establecimiento de la unión.

La primera respuesta que se observó fue la elevada proliferación celular y la activa división celular desde ambas partes de la combinaciones, patrón y variedad. Las células de la médula comienzan a dividirse y alargarse en respuesta a la herida. Así mismo, la región cambial (Fig. 3.4.a-b), las células parenquimáticas de la médula y células procedentes de radios parenquimáticos del xilema de ambas partes de la unión, demuestran estar implicadas en la formación del callo inicial. Las dos partes del injerto comienzan pues su unión a través de las células de callo, y la capa celular más cercana a la superficie de la herida es la primera en manifestar dichas divisiones. La respuesta fue similar en ambos tipos de combinaciones independientemente de su respuesta de compatibilidad.

A los 10 DAG, tiene lugar la diferenciación de parénquima de callo para formar el nuevo cambium tanto en el patrón como en la variedad de la combinación compatible (Fig. 3.4.c). Sin embargo, no se observó ninguna indicación de diferenciación de nuevo cambium en el callo de ninguna de las dos partes de la combinación incompatible (Fig. 3.4.d).

A los 15 DAG se observa que la división y proliferación celular se mantenía en una alta proporción en los dos tipos de uniones. Durante la formación de la unión entre ambas partes del injerto, ningún nuevo elemento de xilema y floema se observó claramente en estas fases iniciales. El análisis histoquímico con la tinción PAS combinada con azul de toluidina permitió observar por un lado el crecimiento y disposición desorganizada de las células de callo en la primera semana de la unión tanto en combinaciones herbáceas compatibles como incompatibles. La estructura del cambium mostró un perfil irregular en las uniones incompatibles a los 15 días. En esta fase de desarrollo las uniones compatibles (Fig. 3.4.e) exhibieron un menor contenido intercelular en las células de callo en comparación con las uniones incompatibles (Fig. 3.4.f).

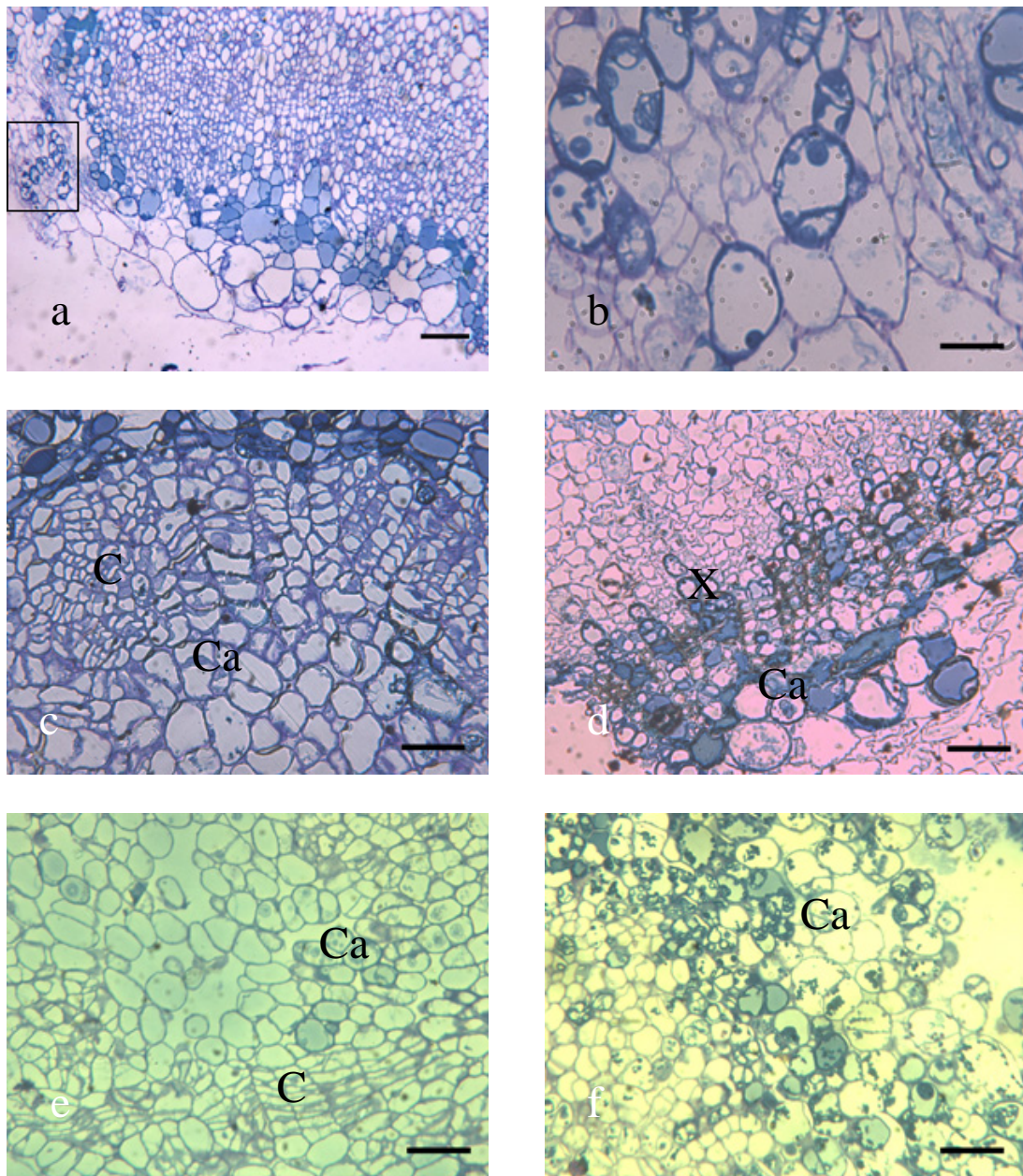


Figura 3.4. Desarrollo de uniones de tallo incluidas en historesina y cortadas a 2 μm . Secciones teñidas con azul de toluidina. a) Unión compatible que muestra la proliferación del callo a partir de la región cambial existente 5 DAG. Bar = 100 μm . b) Células de callo desarrolladas a partir del tejido cambial en mayor detalle. Bar = 100 μm . c) Diferenciación a nuevo cambium de las células de callo en la combinación compatible 10DAG. Bar = 50 μm . d) Agrupamiento de células de callo producidas a partir de radios parenquimáticos xilemáticos 10 DAG en la unión incompatible. Tinción PAS combinada con azul de toluidina. Bar = 50 μm . e) Unión compatible MN/MN 15 DAG, donde la mayoría de las células de callo no contienen depósitos intercelulares. Se observa también la diferenciación del callo a nuevo cambium. Bar = 50 μm . f) Unión incompatible MO/MN 15 DAG mostrando células de callo con un alto contenido intercelular (Ca: células de callo; C: cambium; X: xilema). Bar = 50 μm .

Evaluación temprana de respuestas celulares a distintas tinciones

Para profundizar en las respuestas a nivel celular, se han realizado diferentes pruebas histológicas determinando el comportamiento celular durante el desarrollo de las uniones, a los mismos días que el estudio estructural expuesto anteriormente. Los estudios previos basados en uniones de callos pusieron de manifiesto que los polisacáridos pécticos podrían desempeñar un papel importante en el desarrollo de la unión. Por esta razón, también se examinó en las uniones herbáceas la distribución de material péctico en distintas paredes celulares con rojo de rutenio (RR). El patrón de tinción presentó el mismo grado de intensidad en combinaciones compatibles e incompatibles durante la primera semana (Fig. 3.5.a), con una mayor intensidad en células de callo que de la médula. Además, este estudio histoquímico ha mostrado ausencia de tinción en las células lignificadas del xilema, confirmada la lignificación mediante la autofluorescencia de estas células. Esta ausencia de tinción en células xilemáticas se visualizó tanto en combinaciones compatibles como incompatibles.

En la segunda semana, las células seguían presentando una alta proliferación celular en la zona de la médula y en el puente de callo; así como una respuesta a la tinción de RR negativa de gran parte de los depósitos intercelulares (Fig. 3.5.b). Por otra parte, las células de callo en división y más alejadas de la zona de contacto mostraron en algunas áreas un patrón de tinción diferente entre combinaciones compatibles e incompatibles. En diferentes experimentos se observó que la intensidad de la reacción con RR es más fuerte en paredes celulares de la combinación compatible (Fig. 3.5.c), que en la combinación incompatible donde determinadas áreas responden débilmente a la tinción en esta segunda semana (Fig. 3.5.d). Sin embargo, se mantuvo el mismo patrón de tinción en las células cambiales preexistentes.

Los resultados obtenidos con otra tinción, Safranina - azul de metileno, pusieron de manifiesto una respuesta diferente entre combinaciones compatibles e incompatibles respecto a la presencia de contenidos fenólicos intercelulares. Las vacuolas presentaron una coloración marrón/rojiza en células jóvenes en proliferación así como en células más viejas en uniones incompatibles en comparación con las compatibles. En uniones compatibles, las células de callo próximas a la zona de contacto patrón-variedad presentaban un menor contenido intercelular que las más alejadas, las cuales exhibían el citoplasma densamente teñido (Fig. 3.6.a). Sin embargo, las células localizadas en la zona de unión incompatible, mostraban el citoplasma densamente teñido y una mayor

presencia de vacuolas (Fig 3.6.b). Otra diferencia encontrada con esta tinción entre los distintos tipos de uniones fue en relación a la afinidad de la tinción. Mientras que en uniones compatibles la tinción se observó en la pared celular o en todo el citoplasma celular (Fig. 3.6.c), en incompatibles la tinción presentó mayor afinidad por la vacuolas (Fig. 3.6.d). Asimismo, se visualizó un comportamiento celular diferente entre uniones compatibles e incompatibles en la segunda semana. En las combinaciones compatibles la tinción se observó en las células más viejas (Fig. 3.6.e) y en las incompatibles las células de la médula que no participan en procesos de diferenciación son desplazadas de la zona de contacto, de tal forma que dichas células dejarán de participar en el desarrollo de la unión (Fig. 3.6.f).

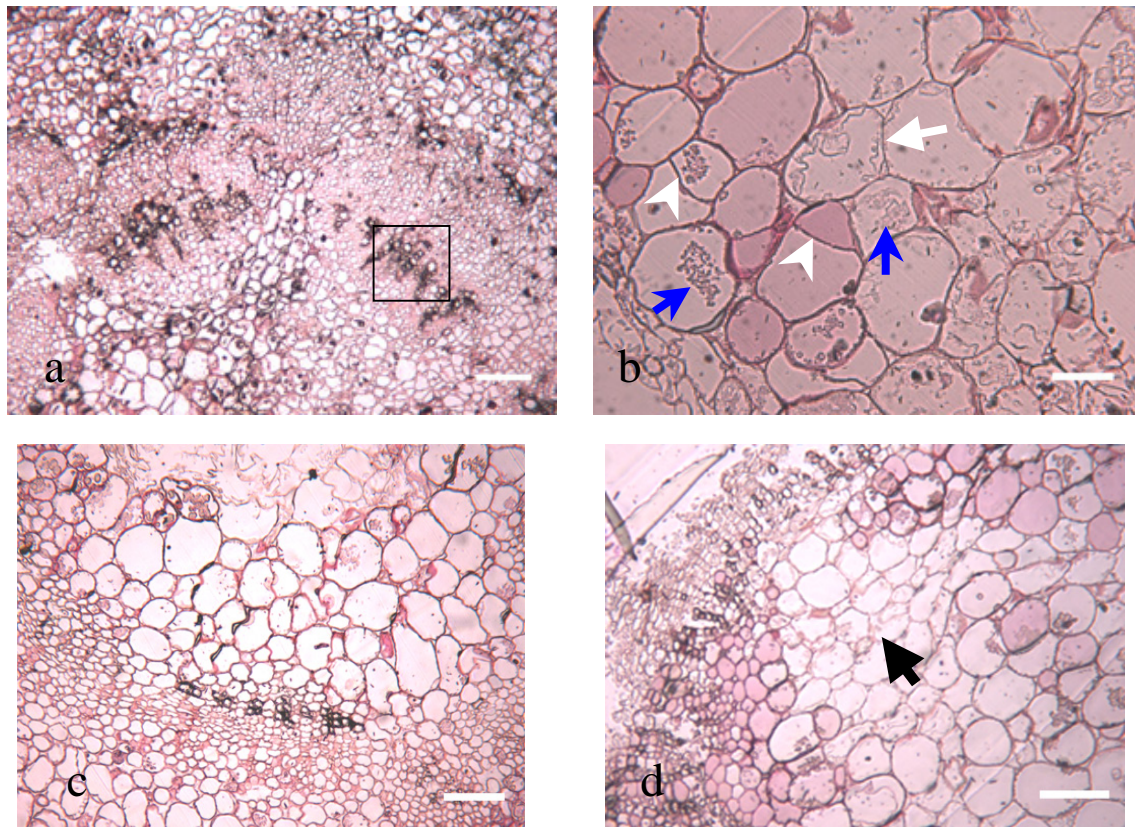


Figura 3.5. Imágenes obtenidas de secciones transversales teñidas mediante el procedimiento de tinción RR. **a)** Heteroinjerto incompatible *M. niqui* sobre Mariana 2624, 5 DAG. El cuadro negro indica células de xilema en las que está enmascarada la tinción para el test RR. Bar = 100 μ m. **b)** Región medular en el patrón del heteroinjerto incompatible, 15DAG. Depósitos intercelulares que no responden a la tinción (flechas azules); células en etapas de división y alargamiento (flechas blancas); pared celular con una respuesta muy débil a la tinción (flecha blanca alargada). Bar = 20 μ m. **c-d)** Fusión de tallos compatible (MN/MN) e incompatible (MO/MN) a 15 DAG. Las imágenes

enseñan una menor respuesta a la tinción de las células de callo alejadas de la zona de unión en uniones incompatibles que compatibles (flecha blanca). Bar = 100 μm

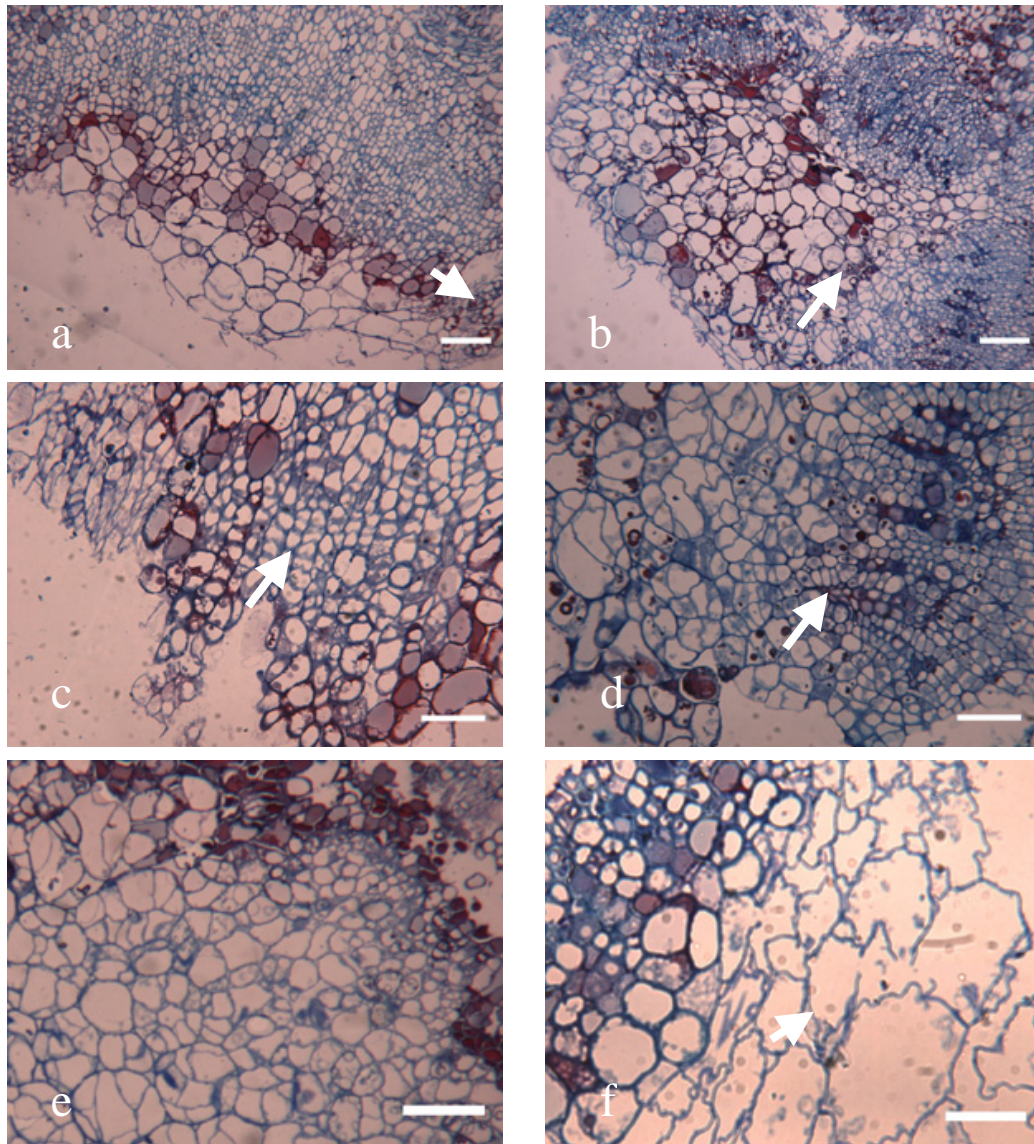


Figura 3.6. Sección transversal de uniones de tallo herbáceas teñidas con safranina combinada con azul de metileno. **a)** Células de callo presentes en el patrón de la combinación compatible, 5 DAG (flecha blanca). Bar = 100 μm . **b)** Patrón de la combinación incompatible, 5DAG. Se puede observar que las células de callo adjacentes al cambium preexistente contienen pequeñas vacuolas y presentan un patrón de crecimiento desorganizado (flecha blanca). Bar = 100 μm . **c-d)** Imágenes a y b tomadas con mayor detalle, respectivamente. El patrón de tinción es diferente entre uniones compatibles e incompatibles. En las compatibles la tinción aparece en la pared celular o en todo el citoplasma celular (c), mientras que en las incompatibles se observa la tinción en pequeñas vacuolas (d). Bar = 50 μm . **e)** Unión compatible MN/MN 10 DAG. Las células de callo viejas que han sufrido mayor estrés se tiñen fuertemente, mientras que las más jóvenes presentan un aspecto más saludable. Bar = 100 μm . **f)**

Algunas células de la médula que no se diferencian a células de callo se desprenden de la zona de unión en la combinación incompatibles MO/MN, 10 DAG. Bar = 100 μ m.

DISCUSIÓN

En este trabajo se han estudiado dos sistemas de unión in vitro para analizar las respuestas iniciales de las células en el momento en que se establece una unión de injerto mediante el uso de técnicas histoquímicas. El tejido de callo usado en la primera parte permite por un lado reducir la heterogeneidad de la planta usando células indiferenciadas, así como acercarnos a las primeras respuestas celulares que se producen en los injertos tradicionales al reproducir el mismo tipo de tejido que se forma como reacción al injerto. Por otro lado, la fusión de tejido herbáceo in vitro permite el estudio de la misma reacción inicial a través de tejidos mas diferenciados y evaluar los cambios químicos y estructurales de las primeras etapas después del establecimiento de la unión.

Las técnicas in vitro vienen desarrollándose desde hace varios años para el estudio de mecanismos implicados en el desarrollo del injerto, y permiten evitar los procesos externos que pueden influir en el establecimiento de una unión. Estudios previos han relacionado los sucesos que tienen lugar in vivo e in vitro (Schoning y Kollmann, 1997; Richardson et al 1996) y han demostrado que estos sistemas son muy eficaces para el estudio de las primeras reacciones celulares que tienen lugar en el desarrollo del injerto (Kollmann y Glockman, 1991; Espen et al, 2005).

Respuesta inicial: Proliferación de células de callo

A pesar de los diferentes trabajos realizados en el estudio de la formación de injerto, tanto en plantas leñosas como herbáceas y de las distintas interpretaciones para explicar las reacciones de compatibilidad-incompatibilidad, un hecho bien establecido en todos ellos es que el suceso inicial necesario para la formación de una unión satisfactoria es el desarrollo de células de callo por parte de los componentes del injerto (Barnett y Weatherhead, 1988; Moore, 1991, Hartmann et al, 2002). Este tejido indiferenciado actúa de puente de unión entre patrón y variedad permitiendo el transporte de nutrientes y agua entre los tejidos dañados durante el proceso de injertado hasta que tiene lugar la diferenciación a nuevo cambium y posterior desarrollo de xilema y floema, que son los que aseguran el correcto funcionamiento de la combinación.

Capítulo 3

En los dos sistemas de injerto usados en este trabajo, se ha visto esta proliferación de células de callo desde la primera semana de observaciones. La formación de estas células y su inicial adhesión no estuvo relacionada con una respuesta de compatibilidad ya que tenía lugar en ambos tipos de combinaciones. En ambas se observó que en esta adhesión estaban implicados tanto compuesto pécticos como carbohidratos. Algunos autores han relacionado esta repuesta inicial de formación de callo a una respuesta a la herida que no esta implicada en el mecanismo de compatibilidad (Moore y Walker, 1981 a, b).

En el estudio de la fusion de material herbáceo, la separación de las dos zonas de contacto desveló interesantes observaciones en relación con el patrón de diferenciación de células de callo desde la región medular y los radios parenquimáticos del xilema. Esta división ha sido ya mencionada tanto en estudios de plantas herbáceas como de plantas leñosas. (Gebhardt y Goldbach, 1988; Richardson et al, 1996; Asante y Barnett, 1997). La elevada capacidad de división de la región medular no es ocasional y se ha planteado que las células parenquimáticas tienen la capacidad, en diferentes grados, de proporcionar actividad meristemática (Esau, 1965). Así, la primera respuesta que se observa en el estudio de uniones herbáceas tiene lugar a lo largo de la región medular, los radios parenquimáticos del xilema y el cambiun existente en las dos partes del injerto.

Sin embargo, se ha observado una diferente respuesta de tinción de estas células a los distintos compuestos analizados en ambos tipos de combinaciones, compatibles e incompatibles. Aunque el desarrollo celular de las células de callo muestra una disposición desorganizada en ambos tipos de combinaciones y ambos sistemas utilizados durante la primera semana de observaciones, las diferencias fueron muy apreciables durante la segunda semana. En este tiempo, tanto el crecimiento celular como el aspecto de la pared celular era diferente entre combinaciones compatibles e incompatibles. Cuando se trata de heteroinjertos, se están estableciendo uniones entre dos genotipos diferentes que presentan diferencias inherentes en su metabolismo celular, lo que puede crear un bloqueo metabólico en las células que van a ser unidas (Feucht y Treutter, 1991). Estudios llevados a cabo en plantas herbáceas han mostrado que los plasmodesmos que se forman entre las células de las dos partes del injerto tienen lugar dentro de regiones concretas donde estas paredes presentan zonas más estrechas (Kollmann y Glockmann 1991; Yang et al, 1992; Yefree y Yeoman, 1983). La

observación de un mayor espesamiento de la pared celular en uniones incompatibles podría explicar la dificultad para llevar a cabo un contacto directo entre estas células.

En relación con la presencia de compuestos pécticos, se observaron diferencias cualitativas desde la primera semana del establecimiento de la unión entre la fusión de callo, y desde la segunda en el tejido herbáceo. Estas diferencias según el tipo de unión realizada parece estar vinculada con la influencia que las células adyacentes (tejidos diferenciados en el caso de las uniones herbáceas) pueden ejercer en la primera respuesta a la formación de callo. Como ha sido demostrado, las paredes celulares tienen entre sus componentes celulosa, hemicelulosa, pectinas y proteínas estructurales (ver revisión de Jarvis et al, 2003; Ridley et al, 2001). La función de los compuestos pécticos de la pared celular en el proceso de adhesión y en el desarrollo de la planta ha sido bien establecida mediante el análisis de mutantes en distintas especies vegetales (Shevell et al, 2000; Leboeuf et al, 2005). La diferente intensidad de respuesta a la tinción RR indica una menor presencia de pectinas en combinaciones incompatibles, que plantea la cuestión de si las células adyacentes no reciben correctamente las señales necesarias implicadas en la adhesión celular, y por ello podrían con el tiempo desencadenar la respuesta de incompatibilidad.

Por otro lado, la observación de una menor respuesta a la presencia de polisacáridos pécticos de la superficie celular de uniones incompatibles coincide con la menor respuesta a la tinción por calcofluor durante la segunda semana. Estos hechos podrían estar relacionados entre si, ya que estudios en los que se ha investigado la regeneración de paredes celulares han mostrado que es necesario la formación de una correcta matriz péctica para la posterior deposición de celulosa (Willats et al, 2001; Whitney et al, 1999; Creelman and Mullet, 1997). Al contrario que sucede en las combinaciones incompatibles, el alto contenido péctico en las paredes celulares de las compatibles podría ser responsable del desarrollo de resistencia a la rotura de la pared de las células parenquimáticas de callo, impartiendo de esta manera rigidez a la pared celular via puentes de calcio para formar pectatos de calcio (Jarvis et al, 2003). La presencia de pectinas en las paredes de células parenquimatosas ha sido también observada con abundancia en la unión de células en patata (Bush et al, 2001).

Diferencias en la superficie celular han sido descritas en el estudio de células de callo de uniones de injerto de diferentes especies (Jeffree y Yeoman, 1983; Barnett y Weatherhead, 1988), así como la presencia de sustancias extracelulares que conectan células adyacentes en proliferación. Estas sustancias probablemente representan material

péctico implicado en el establecimiento de la primera unión mecánica entre superficies celulares (Moore, 1983; Kollmann y Glockmann, 1991).

En este estudio, las secciones teñidas con RR mostraron repuesta positiva no sólo en la pared celular sino también en el espacio intercelular de las células de callo, especialmente en uniones compatibles, sugiriendo que las pectinas actúan como material cementante que une células adyacentes. Miller y Barnett (1993) mostraron que la adhesión entre células de callo en Sitka spruce se produce con la ayuda de proyecciones en la pared celular que consisten de una matriz homogénea formada de una mezcla de pectinas, carbohidratos y proteínas. Sin embargo otros autores han señalado que la adhesión inicial de las dos partes del injerto es debida a la deposición y posterior polimerización de los materiales celulares producidas en respuesta a la herida en el momento de efectuar el injerto (Moore y Walker; 1981a,b). Nuestros resultados indican que, independientemente de la primera respuesta a la herida, el grado de deposición de nuevo material podría producirse de diferente manera/grado en uniones compatibles e incompatibles.

Diferenciación de callo a nuevo cambium

Los primeros signos de diferenciación del callo ocurren a los 10 días después del injerto en la superficie de unión de las combinaciones herbáceas compatibles. La formación de nuevo cambium desde el tejido de callo se ha visto previamente en injertos de albaricoquero a los 10 días (Errea et al, 1994a); en comparación a injertos de peral donde la formación del neocambium parece empezar desde los cortes producidos en el cambium preexistente patrón-variedad (Ermet et al, 1997). Así mismo se ha visto que las nuevas células de cambium aparecen después de un periodo de formación de células de callo que varía según las especies. Existen evidencias que el contacto cambial ocurre entre 10 y 15 días en peral sobre membrillero (Ermel et al, 1997); 7 días en manzano (Soumelidou et al, 1994), 10 días en combinaciones de albaricoquero sobre ciruelo (Errea et al, 1994a); y 50 días en *Picea Sitchensis* (Barnett y Weatherhead, 1988). La falta de actividad cambial en algunas zonas de la unión del injerto, podría dar lugar a alteraciones en los nuevos floema y xylema que se van formando, provocando una discontinuidad en el cambium y la formación en su lugar de una línea de tejido parenquimatoso que interrumpe la conexión vascular (Hartmann et al., 2002).

Entre los 10 y 15 días después del establecimiento de la unión, un aumento de la actividad citoplasmática fue observado con la tinción de PAS/azul de Toluidina y

Safranina/azul de metileno, detectándose una pronunciada acumulación de material citoplasmático en las células localizadas en la superficie de contacto de las combinaciones incompatibles. Es conocido que la variación en el contenido de las células del parénquima está estrechamente relacionada con la actividad de dichas células (Esau, 1965, Salisbury y Ross, 1991). Estas tinciones detectan un alto contenido de depósitos intercelulares en las células de parénquima a lo largo de la superficie de contacto de las uniones incompatibles, mayor que en las compatibles, con una acumulación más pronunciada a los 15 días del establecimiento de la unión. Estas observaciones sugieren que las células en la combinación compatible recuperan su actividad metabólica antes que las de la unión incompatible, y que el entrecruzamiento de los distintos componentes en la pared celular se produce en un estado anterior. Por otro lado, la diferente respuesta a la tinción de Safranina/ Azul de metileno específica para paredes celulósicas y depósitos polifenólicos localizados en vacuolas (Gutmann, 1993) muestran que las células de callo indiferenciadas de uniones incompatibles acumulan gran cantidad de contenido fenólico. La presencia de estos compuestos ha estado asociada con una reducida compatibilidad entre los dos componentes que constituyen el injerto. Gebhardt y Feucht (1982) han mostrado que los dos componentes del injerto con un elevado índice de síntomas de estrés puede derivar en una acumulación de estos compuestos por encima de la zona de unión del injerto. Cuando se dan procesos de stress, provocados por ejemplo por una falta de adaptación de las dos partes que forman el injerto, el sistema celular se debilita haciendo que las membranas de las vacuolas donde se encuentran localizados estos fenoles pierdan su estructura interna debido a la oxidación de lipoides; se altera la permeabilidad del tonoplasto y los flavanoles salen desde la vacuola a la matriz citoplasmática y allí son oxidadas por peroxidasas y fenoloxidasas (Feucht y Treutter, 1989). Esto se traduce así mismo en una acumulación excesiva de estos compuestos en la interfase celular. En combinaciones de albaricoquero sobre determinados *Prunus* se ha observado la acumulación de algunos de ellos en la zona de la unión de injerto en relación con la incompatibilidad (Errea et al. 1992b) y también en el callo indiferenciado de combinaciones incompatibles en las primeras fases del injerto (Errea et al., 1994a). Esta acumulación ha sido propuesta para producir una reducción en el contenido de auxina, fenómeno que podría afectar a la diferenciación de floema y xilema así como a la lignificación (Errea, 1998; Buchloh, 1960). Los compuestos fenólicos están implicados en esta fase principalmente por su participación en la vía de síntesis de la lignina (Buchloh, 1960). Los procesos que están

Capítulo 3

implicados en la lignificación de las paredes celulares serían los principales responsables para la formación de una unión sólida y por tanto de la incompatibilidad de injerto (Buchloh, 1962; Feucht y Schmid, 1979). Se ha visto que los injertos bien desarrollados presentan una red de estos vasos entre los haces vasculares del injerto y el patrón, produciéndose la lignificación en el tejido regenerado hasta el establecimiento de un puente xilemático complejo, mientras que los injertos que no desarrollan bien lignifican en áreas aisladas de la médula pero sin conexión vascular (Gehardt y Goldbach, 1988). En cerezo también se ha demostrado una relación entre la presencia de ciertas cumarinas con la respuesta de incompatibilidad, ya que la ausencia de estos compuestos podría limitar la síntesis de lignina (Yu y Carlson, 1975).

Comparando los dos sistemas de unión *in vitro* mediante los test histoquímicos, se puede concluir que, para el estudio de las primeras fases de desarrollo celular en uniones de injerto, la fusión de callo *in vitro* es el método más simple de interpretación, con la ventaja de trabajar sobre un material más homogéneo que si se tratara de la planta entera. Así mismo, el hecho de encontrar diferencias entre combinaciones compatibles e incompatibles en tejidos indiferenciados podría indicar que la incompatibilidad albaricoquero/ciruelo no tiene que estar ligada necesariamente a ningún estado particular del desarrollo de las uniones.

En este trabajo podemos concluir que la fusión de callo y la unión de tejidos herbáceos son sistemas válidos para una detección temprana de la respuesta de compatibilidad en combinaciones de albaricoquero sobre ciruelo. A la vista de estos resultados, diferencias en relación con la intensidad de tinción de la pared celular en las células parenquimatosas en ambos sistemas de injerto, nos han permitido un mejor conocimiento de la reacción de compatibilidad en estas especies en los primeros 15 días después de la unión. Así mismo, las respuestas asociadas a la presencia de polisacáridos pécticos podría ser un aspecto relevante a la hora de desencadenar un injerto satisfactorio debido a su gran implicación en la polimerización de los materiales de la pared celular y como sustancias cementantes que intervienen en la adhesión inicial. Los diferentes test histoquímicos realizados nos han proporcionado una valiosa información para profundizar en los mecanismos que determinan la futura respuesta de compatibilidad.

4. QUANTITATIVE MEASUREMENTS OF CELL-TO-CELL TRANSPORT IN TREE CALLUS CULTURES

SUMMARY

We investigated the symplasmic movement of fluorescent tracers in *Prunus* callus using novel experimental and theoretical approaches. One factor that contributes to a successful fruit tree grafting is the establishment of symplasmic contacts between cells of the callus bridge in order to facilitate the transfer of compounds between scion and stock. Inadequate numbers of plasmodesmata, down-regulated cytoplasmic flux (small size exclusion limit, SEL) or closed plasmodesmata could be some of the possible explanations for the lack of grafting success at the cellular level in certain graft combinations. Dye-coupling analysis using symplasmic tracers and real-time imaging with confocal laser scanning microscopy were performed in plum (*Prunus cerasifera* x *P. munsoniana*, ‘Marianna 2624’) rootstock callus growing in vitro. In one set of experiments carboxyfluorescein-diacetate was esterloaded into the cytoplasm. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) of fluorescein in individual cells gave a measure for the plasmodesmal contact between the cells. The mobile fraction was 11.3% and the half-life of recovery 120s for the 376Da fluorescein indicating that the callus cells are supplied with functional plasmodesmata. Small populations of dividing cells were found to be strongly connected by plasmodesmata suggesting a symplasmically connectivity in the callus tissue which is subdivided in many smaller domains possibly as part of a coordinated development. With this paper we demonstrate that intercellular coupling in *Prunus* in vitro callus can be quantified by using bioimaging methods. We further describe a method to load callus cells with fluorescein in a caged form. Following photoactivation within single cells, the uncaged fluorescein could be traced as it was spreading from cell-to-cell revealing the existence of functional plasmodesmata.

Keywords: *Prunus*, grafting, symplasmic domains, plasmodesmata, photobleaching, photoactivation, size-exclusion limit

INTRODUCTION

Vegetative formation by grafting is an essential tool for fruit production. The key to grafting success for compatible graft partners is matching the cambium layer of the scion wood to the cambium layer of the rootstock. The speed of callus formation, temperature and cellular organization, especially vascular differentiation, are some of the factors known to affect grafting success (see review by Hartmann et al. 2002). Although most species in the genus *Prunus* e.g. almonds, nectarines, peaches and plums are easily grafted, inter-specific combinations show frequently graft incompatibilities. This is often the case in Apricot scions (*Prunus armeniaca*) cultivar 'Moniqui' grafted on a plum rootstocks (*Prunus cerasifera* x *P. munsoniana*) cultivar 'Marianna'. Abnormalities in cell structure appear in the union in spite of a seemingly good callus formation during the first stage. The incompatible grafts may grow without external symptoms for several years before breaking at the graft union interface. This type of incompatibility clearly demonstrates that the formation of callus and functional vascular tissue is not itself an indicator for the graft process (Errea et al. 1994; Hartmann et al. 2002; see review by Pina and Errea 2005). Therefore, knowledge of early structural, biochemical or other events associated with incompatibility would be useful to diagnose the future graft response (Ermel et al. 1999; Errea et al. 2001).

One hypothesis on the development of incompatibility is that (later) rejection is predetermined already at the initial step of callus contact. It appears that cell recognition and direct cellular communication between the callus from scion and stock is crucial for grafting success (Jefree and Yeoman, 1983; Kollmann et al. 1985). Plant cells communicate via plasmodesmata, which are channels in the plant cell wall allowing passage of solutes and macromolecules between the cytoplasm of neighboring cells. In order to establish symplasmic connections between the graft partners, de novo synthesis of plasmodesmata must occur in the graft interfaces (Ehlers and Kollmann 1996, 2001). A plasmodesma consists of a sleeve of plasmamembrane with a thin tube of appressed endoplasmic reticulum (ER) running through the center (Ghoshroy et al. 1997; Ding et al. 1999). The processes leading to formation of new continuous plasmodesmata involves both ER, Golgi and plasma membrane as well as the exact cooperation of both cell partners (Kollmann et al. 1985; see review by Pina and Errea 2005).

Growing evidence indicates a specific role for plasmodesmata in regulating symplasmic communication during development. Injection of fluorescent dyes into the

meristem cells have revealed transient symplasmic domains in shoot and root apices (Rinne and van der Schoot 1998). Whereas symplasmic domains are completely isolated from surrounding tissues by the closure of plasmodesmata, symplasmic fields retain a certain level of communication with surrounding tissues (Ormenese et al. 2002). This organization is thought to ensure the coordination of development at the whole plant level by allowing diffusion of signal molecules like transcription factors within the cells of a symplasmic field or domain (Gisel et al. 1999; Complainville and Crespi 2004).

The localized incompatibility experienced in some *Prunus* grafts may be related to down-regulation or closure of plasmodesmata or to an inadequate frequency of plasmodesmata in the callus. In-vitro growing *Prunus* callus often retain metabolic features of the intact plant like secondary metabolite production and is thus providing an interesting approach for the studies of physiological and cellular events in this genus.

With this paper we demonstrate that intercellular coupling in *Prunus* in-vitro callus can be quantified by using bioimaging methods. Insufficient coupling between callus cells is expected to be an early indicator of incompatibility reactions in grafting.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Callus tissue was grown from the plum rootstock 'Marianna 2624' (*P. cerasifera* x *P. munsoniana*). Stem fragments of each cultivar were cut into 0.5 cm segments under sterile conditions and placed in vitro with a modified Murashige and Skoog medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with indole-3-butyric acid (IBA, 0.5 μ M), 6-benzylaminopurine (BA, 0.5 μ M), 3% sucrose and 0.7% Difco-Bacto agar. Cultures were maintained in a growth chamber at 22 ± 2 °C and 16 h photoperiod provided by a cool white fluorescent tubes. Callus were subcultured every month. In vitro micropropagated plants used for the CFDA control experiments were obtained from buds, excised from actively growing trees in the field. They were grown in agar medium composed from MS medium supplemented with 0.7mg/l BAP and in presence of 0.1mg/l GA₃. In vitro plants were subcultured every month in the same medium.

Confocal microscopy

A confocal laser scanning microscope (Leica TCS SP2/MP, Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) equipped with an argon laser, UV-lasers and a two-photon laser was used in the experiment. Images of 512x512 or 1024x1024 pixels were captured with the 20x water immersion objective. The cells were incubated for 10 min with 2µg/ml 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide [DiOC₆₍₃₎] from (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) for imaging the ER and plasma membrane. A stock solution was prepared by dissolving 2mg of the fluorochrome in <5 µl DMSO and making up into a 2 mg/ml solution with distilled water. For labelling the cytoplasm, fluorescein was esterloaded into the cell with 0.001% 5(6)-CFDA [5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate], incubation time was 60 min. A stock solution was made by dissolving 10mg CFDA in 10 drops of acetone and making up to 10mg/ml solution with distilled water. Hand-sections of callus tissue were incubated in either DiOC or CFDA at room temperature and thoroughly rinsed in distilled water for removal of extracellular fluorochrome before being mounted in water under coverslip. The probes were excited with 488nm laser and emission was recorded at 505-525nm.

Photobleaching

The mobility of fluorescein-molecules was visualised and quantified using fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). The cells were loaded as described above. FRAP was performed within regions of interest (ROI) using rapid switching between low-intensity imaging (488 nm) and a high-intensity bleach mode (488nm) in 10 replicates. Cell-to-cell diffusion of dye was measured as follows. A pre-bleach image was collected using 20x water immersion objective lens (unidirectional scan, 25% laser intensity, zoom 4x, resolution 512x512, line average 2) in a focal plane in which the cytoplasm of several neighboring cells was in focus. A whole cell was selected, and its fluorescence was photobleached during approximately 20s (20 bidirectional scans, 100% laser intensity, zoom 16x, resolution 512x512, line average 2). The settings were quickly changed back to low intensity imaging and a series of post-bleaching scans were performed with the same settings as the pre-bleaching scans. The post-bleach fluorescence was sampled every 30s for 300s followed by sampling every 60s for 900s, altogether approx. 18min. Provided that the bleached cell is connected to its adjacent unbleached neighbors by permeable plasmodesmata, an increase in fluorescence intensity (excited by weak laser pulses) is observed and recorded in the bleached cell.

The FRAP curve gives us two independent parameters: the mobile fraction M (the degree in percent to which the final fluorescence approaches the prebleach value) and half-life $T_{1/2}$ (time at which fluorescence recovers by 50%). In some experiments a related technique, fluorescence loss in photobleaching (FLIP), was applied. In these cases the ROI was continuously bleached for 3 min, then imaged in a time-series in order to study symplasmic domains.

Photoactivation

CMNB-caged fluorescein (fluorescein bis-(5-carboxymethoxy-2-nitrobenzyl) ether, dipotassium salt) from Molecular Probes (Leiden, The Netherlands) was introduced into the callus section by incubation for 10 min in 50 μ M of the dye. Prior to uncaging, the sample was stained with propidium iodide (5 μ g/ml) for labelling of dead cells, and thereafter thoroughly rinsed in water. Following photoactivation by continuous illumination with a UV-laser (351/364 nm principal lines) within a region of interest, time lapse studies were done with 488 nm excitation and in three channels simultaneously, using the following emission wavelengths: channel 1: 500-560nm for uncaged fluorescein; channel 2 610-700 nm for propidium iodide, and channel 3 for a transmission, bright field image.

Control experiment

In FRAP experiments, in-vitro plant guard cells from leaves were used as controls to test that carboxyfluorescein was not leaking out of cells and into the medium. In photoactivation experiments, presence of any uncaged tracer in the intercellular space due to insufficient washing was tested by UV-radiation of ROIs between cells. Thereby contribution of apoplastic spread and uptake of the tracer in target cells could be excluded .

Quantification of image data

The half-life recovery curves were corrected for general fading caused by monitoring. Data were normalized to 100% before quantitation using Leica confocal software and Microsoft Excel. The $t_{1/2}$ values were calculated from the corrected recovery curves.

RESULTS AND DISCUSSION

Differentiation of *Prunus* rootstock callus

Prunus cerasifera x *P. munsoniana* cultivar 'Marianna' (MN2624) is a plum rootstock which tolerates heavy soils and poor drainage. Moreover, it has a high degree of compatibility with most *Prunus* cultivars (Westwood 1993) making it a very appropriate graft partner. It also shows excellent in-vitro propagation properties. Nowadays, the use of tissue culture growing in-vitro provides an interesting approach in the studies of physiological events in fruit trees (Richardson et al. 1996; Errea et al. 2001; Espen et al. 2005).

We studied in vitro grown callus from this plum rootstock using bioimaging, under the assumption that in vitro callus resembles grafting callus also at the cellular level. Our hypothesis was that features such as ability to form shared plasmodesmata, low size-exclusion limit of plasmodesmata or closed plasmodesmata in the callus could cause weak grafts. The aim was to investigate the symplasmic transport in 'Marianna'.

Prior to studying symplasmic connectivity with quantitative experiments we examined the callus tissue using fluorescent probes. The callus consists of an undifferentiated amorphous mass (Fig. 4.1.a) of loosely arranged, thin-walled parenchyma cells arising from the proliferating cells of the stem segment. There seems to be no predictable organization pattern, although localized centers of meristematic activity are present. In contrast to many other plant cell types, in which the vacuole(s) form large compartments, numerous tiny vacuoles are present in most callus cells as revealed by CFDA and confocal microscopy (Fig. 4.1.b). Carboxyfluorescein diacetate (CFDA) is taken up and split by endogenous esterases in living cells to release fluorescein which labels the cytoplasm with a bright green fluorescence. Living cells show no fluorescent signal in the vacuoles. The fluorochrome remains in the cytoplasm during observation (approx. 15 min) and the vacuoles remain unstained. However, following longer series some leakage of fluorescein could be noted. Chloroplasts, detected by autofluorescence, occupy the cytoplasm of most callus cells, except for the youngest, outermost cell layer (Fig. 4.1.c). The cells in the center remain undifferentiated (partly collapsed). Some cells grow large, occasionally develop large vacuoles, and divide more frequently (Fig. 4.1.d-g). Using DiOC staining all endomembranes such as ER and nuclear envelope as well as new cell plates are labelled (Fig. 4.1.h-k). Also visible is cytoplasmic streaming (movie 1). The ER is forming a

network as revealed when following its course through different focal planes (Fig.1h, see also movie 1). During grafting, plasmodesmata, are formed de novo across existing cell walls between opposing surfaces of stock and scion (Kollmann and Glockmann 1991; Yang et al, 1992). They pass through the whole cell wall interconnecting the protoplasts of adjacent stock-scion cells in the callus bridge (Kollmann and Glockmann, 1985). It has been suggested that a layer of ER close to the plasma membrane could be involved in regulating what goes in and out the cells (Salibusry and Ross, 1991). In callus cells, cortical ER is well developed and forms focal points at the plasma membrane where development of secondary plasmodesmata might start.

Measuring molecular mobility

Intercellular communication within the callus was studied by confocal microscopy using fluorescent dyes combined with quantitative FRAP (fluorescence recovery after photobleaching), FLIP (fluorescence loss in photobleaching) and PAF (photoactivation of fluorescence) (see review by Fricker et al. 2006). These techniques are non-invasive and enable observation of dynamic movement of fluorescently tagged molecules or structures within living cells (Hush et al. 1994; Ward and Brandizzi 2004; Weiss 2004).

In the FRAP-experiments, a significant fraction of the fluorescent molecules within one cell is irreversibly photobleached. If functional plasmodesmata are present, the fluorescence recovers giving evidence for redistribution of fluorescent molecules from the surrounding, non-bleached cells. The degree of plasmodesmal connectivity between cells can be quantified by comparing fluorescence intensity in the bleached cells before and after bleaching. By determining the percentage of the mobile fraction and the half-life of redistribution (half life of the accumulation of fluorescence in the bleached area), it is possible to compare connectivity in different tissues and species. Figure 4.2.a-d shows a FRAP analysis in a callus section. In comparison with other plant cell studies (Martens et al. 2006) the recovery in callus was in most cases considered slow and low ($M=11.3\%$, $t_{1/2}= 120s$, $N=10$). We observed no or little changes in the background signal i.e. no uptake of fluorescein from the apoplast. The photobleaching results indicate that plasmodesmata are present and functional in the callus periphery and that they allow at least 376Da molecules to pass. As control we used guard cells, which are symplasmically isolated structures. Photobleaching of fluorescein in guard cell pairs resulted in no recovery (not shown).

However, some fields of cells did not take part in diffusion of dye, presumably indicating the presence of symplasmic domains. Local intercellular communication plays an important role in the early establishment of the cell pattern in i.e. root and shoot apices, enabling cells to register their position and fate (Ghoshroy et al. 1997). In undifferentiated root cells of *Arabidopsis thaliana* the apical meristem and the elongation zone are symplasmically well connected, but gradually becomes isolated as they differentiate (Duckett et al. 1994). It is likely that also newly formed callus tissues contain subunits of symplasmically connected cells. FLIP analysis, performed qualitatively, gave a clear indication that symplasmic fields or domains are present in the *Prunus* callus. Two adjacent cells were photobleached every 6 seconds for 3 min using full laser power. Cells neighbouring the bleached cells did concomitantly loose fluorescence (Fig. 4.2.e-g), indicating that they were connected by functional plasmodesmata with the bleached cells. By 900s nearly all fluorescence had been depleted from these cells and from other cells within same domain, whereas cell fluorescence outside this region was unaffected. The results suggest a symplasmic continuity in the callus tissue which is subdivided in many smaller domains.

Photolysis of caged fluorescein (PAF) in callus

We tried a different approach, photolysis of caged fluorescein (PAF), to measure symplasmic connectivity and SEL within the rootstock callus. Conversion of caged compounds involves the local photolysis of caged molecules based on the ability to chemically “cage” the molecule of interest, and activate it by breaking the caging bonds with UV light, causing a local and rapid increase in concentration of the activated molecule (Blancaflor and Gilroy, 2000). By photoactivation of fluorescence (PAF) a fluorochrome can be released in single cells and its movement, if any, can be traced in time and space. The method has been used to measure diffusion coefficients and protein turnover in intact animal cells (Politz 1999) but has only recently been applied to plant science (Martens et al 2004, andre?).

The present data showed that PAF produced a fast rise in the target cell and a delayed response in the surrounding callus cells. The delayed response in the neighbors resulted from diffusion of uncaged fluorescein out of the target cell. Photoactivated (uncaged) fluorescein labelled the cells similarly to F even though the signal was less bright (Fig. 2 h-l). Propidium iodide (PI), which only enters dead cells and emits a red fluorescence, was used as a cell viability indicator. PI was suited as a nucleic acid

binding fluorescent dye to facilitate greatly the visualization of the cells that had lost its membrane integrity. Thus, the cell-to-cell transport could be followed only in alive cells.

In both techniques (FRAP and PAF) the evolution of fluorescence in the illuminated region was monitored to infer information as to whether plasmodesmata are functionals and the degree of plasmodesmal connectivity, being the techniques simple inverses of each other. In this study, it have been demonstrated that both of them are valuable tools for studies of cell-to-cell communication in *Prunus* callus tissue.

The problem of incompatibility in grafted *Prunus* trees could be related to low intercellular transport capacity in either rootstock and scion calli or between the two. In fact, before the scion can become dependent on the rootstock in grafts, cellular contact must be established to enable the formation of a symplastic and apoplastic transport system between graft partners. This is apparent that plasmodesmal connections are formed *de novo*, within the thinned regions of the cell walls between opposing surfaces of both partners (Yefree and Yeoman, 1983; Kollmann and Glockmann, 1985; 1991; Yang et al, 1992). In the graft, the *de novo* formation of plasmodesmata is a potential pathway of communication among cells in the graft bridge, which may be important in cell recognition and compatibility/incompatibility response (reviewed by Pina and Errea, 2005). The interesting question whether callus cell in compatible or incompatible grafts differ in their properties to establish symplasmic connections could be answered by means of the techniques used in the present work. Likewise, these studies open new lines of research in the early response of graft compatibility in fruit trees.

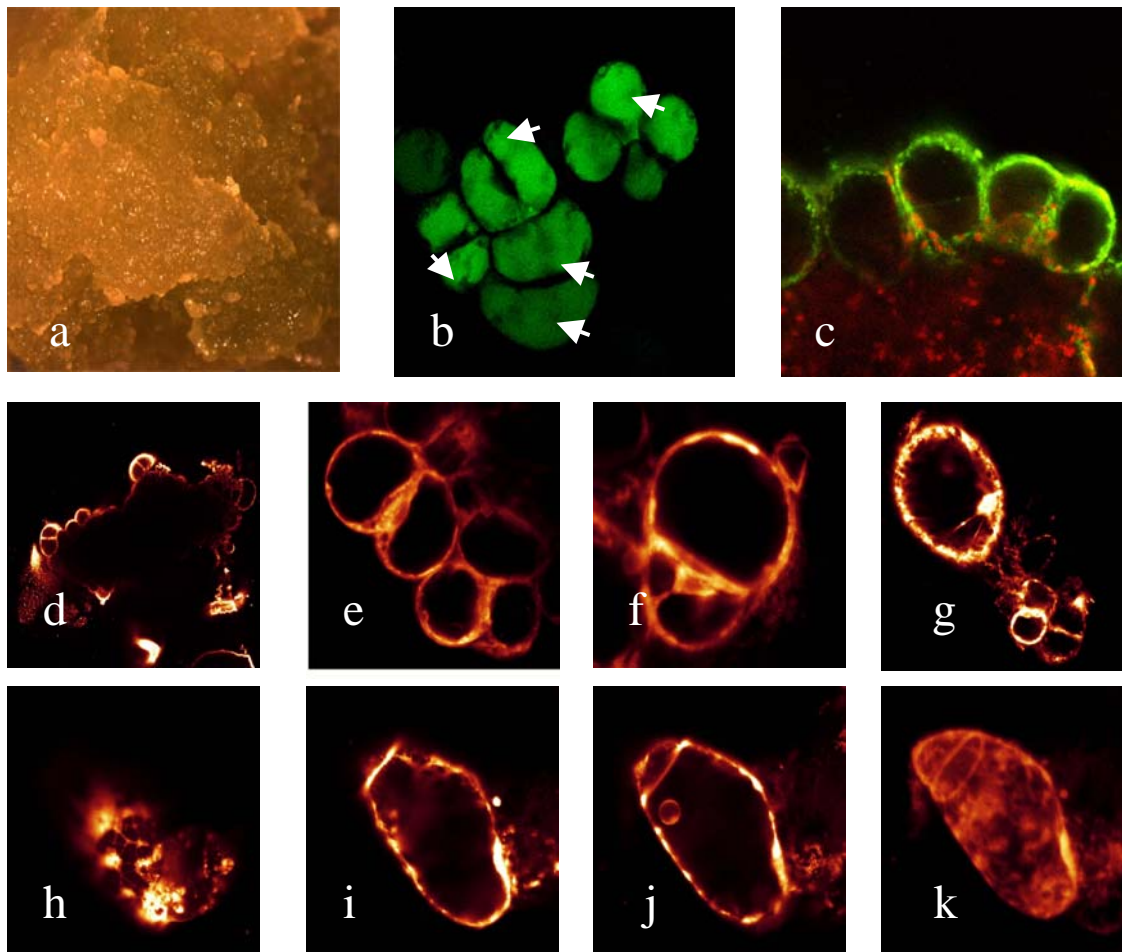


Figure 4.1. The dynamic cell structure of developing *Prunus* rootstock callus in-vitro. Aggregates of undifferentiated in-vitro grown callus (a). CFDA-stained callus (b) showing intense labelling in living cytoplasts and numerous tiny vacuoles (white arrows). DiOC-staining (shown in green) overlaid with red chlorophyll autofluorescence (c). d-k: DiOC-staining shown in glow scale. Dividing cells in the outermost callus layers (d). Developing callus cells showing strong fluorescence of endomembranes near newly formed cell walls (e). Unequal division resulting in different sized daughter cells (f). Large cell and small presumably degenerating cells (g). The image is part of a time-series showing the dynamic ER membrane (see supplemental movie 1). h-j: Images from 3D-stack of dividing callus cell (see supplemental movie 1). Elements of tubular and cisternal ER (h). Cell plate with tubular ER possibly associated with plasmodesmata desmotubuli (i). The nuclear enveloped is a part of the endomembrane system (j). A projection of the image stack (k).

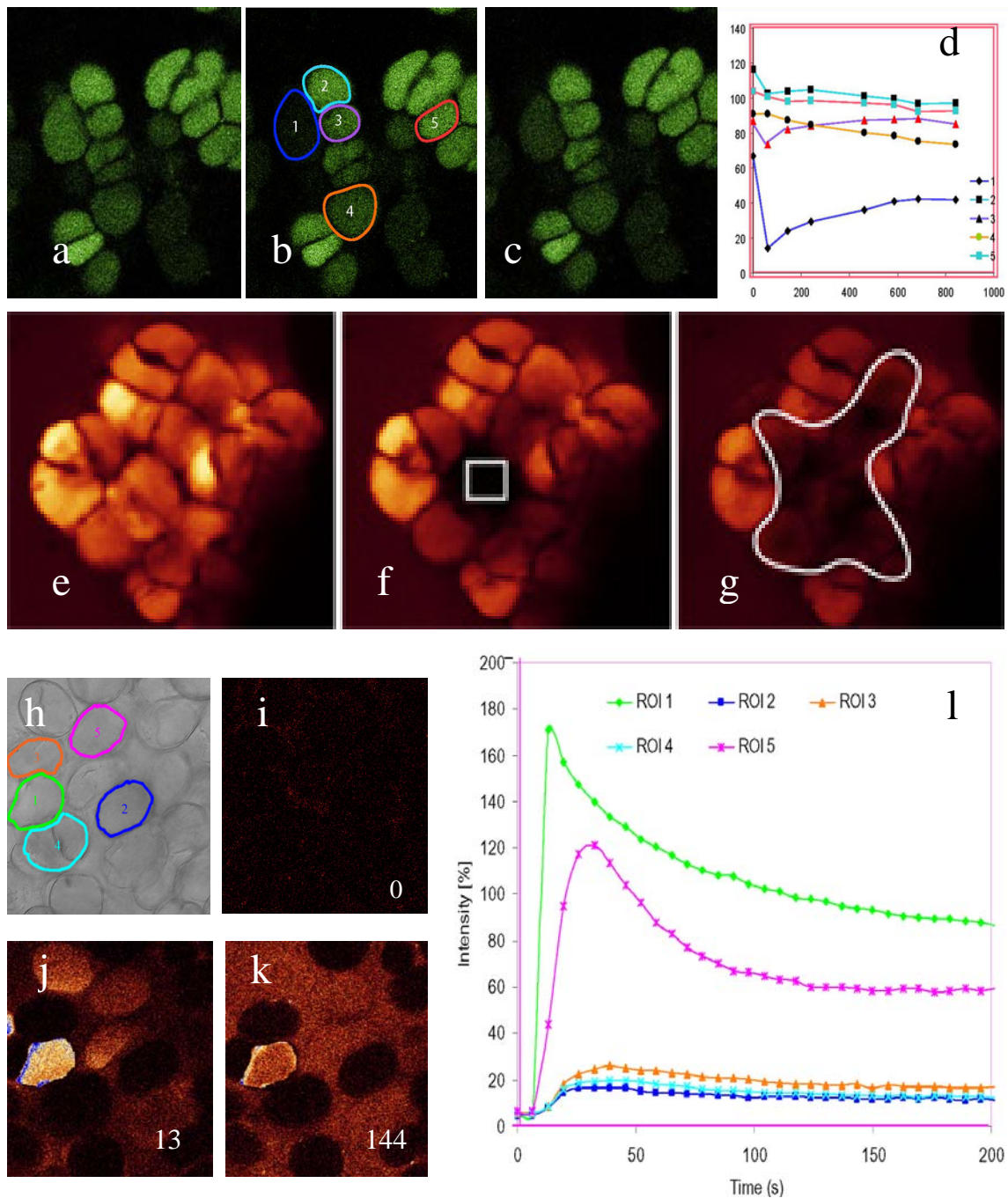


Figure 4.2. Cell-to-cell communication in *Prunus* rootstock callus in-vitro.

Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) of single callus cell (a-c). Before bleaching (a). Immediately after bleaching of cell 1 (b). Following 709 secs of low-radiation monitoring (c). Recovery curve showing intensity plotted versus time for bleached cell (blue) and intensity changes in other regions of interest (d). Fluorescence loss in photobleaching (FLIP) showing symplasmic continuity within callus cells (e-g). Before bleaching (e). The middle image represents the first image after repetitive photobleaching of the roi (f). Symplasmic continuity within callus cells (g).

Capítulo 4

Photoactivation of fluorescence (PAF) in single callus cell (h-l). Transmission image showing the target cell (roi 1) and its neighbors (roi 2-5) in a population (h). Images from the time course in seconds (i-k). Changes in fluorescence intensity over time in five regions of interest, indicating that the initial response is limited to the cell of the laser spot, while the neighboring cells lag behind and the more remote regions hardly response at all (l).

5. TRANSPORTE PLASMODESMAL EN COMBINACIONES DE CALLO

RESUMEN

Los plasmodesmos son canales citoplasmáticos en la pared celular que conectan el citoplasma de una célula de la planta con las adyacentes mediando y regulando el transporte célula-célula de macromoléculas, la intercomunicación celular, la diferenciación celular, y el desarrollo y crecimiento de la planta. En plantas herbáceas se ha observado que las células que no cooperan fisiológicamente forman plasmodesmos discontinuos y medios en la superficie de heteroinjertos incompatibles.

En tejido de callo del cultivar exigente de albaricoquero 'Moniqui' y el patrón ciruelo de crecimiento rápido 'Mariana2624' se ha determinado el grado de acoplamiento célula-célula aplicando la técnica FRAP, así como la técnica de fotoactivación "*caged fluoresceína*". Además, en combinaciones establecidas in vitro con este material se ha evaluado el transporte plasmodesmal que tiene lugar tanto en la unión compatible (*MN/MN*) como incompatible (*MO/MN*) durante dos semanas después del establecimiento de la unión.

Los resultados obtenidos en este estudio han puesto de manifiesto un menor tamaño del SEL y de la capacidad de transporte plasmodesmal en el cultivar exigente 'Moniqui' que en el patrón 'Mariana2624'. Estas diferencias sugieren que un factor que podría contribuir al comportamiento incompatible de la combinación "*MO/MN*" es la diferencia entre permeabilidad y capacidad de transporte simplástico entre los dos individuos. Asimismo, una reducción en la conductividad plasmodesmal se observó en las combinaciones incompatibles a los 10 días después de la unión en comparación a las compatibles. Esta reducción podría ser debida a una insuficiente cooperación celular entre las dos especies, albaricoquero y ciruelo.

Abreviaciones: CFDA, diacetato de carboxifluoresceína; FRAP, recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueamiento; PD, plasmodesmos; SEL, Límite de exclusión molecular.

INTRODUCCIÓN

El estudio de los plasmodesmos (PD) como vía de comunicación celular resulta de gran interés en los mecanismos de reconocimiento celular en la detección precoz de la incompatibilidad de injerto. Existen dos tipos de plasmodesmos en función del origen, primarios y secundarios (Robards y Lucas, 1990; Ehlers y Kollmann, 2001). Los primarios se forman durante el proceso de citocinesis en paredes en crecimiento mientras que los secundarios se desarrollan independientemente de citocinesis, “de novo” en paredes ya existentes (Lucas et al, 1993; Ding et al, 1999).

En casos especiales como en cultivos celulares derivados de protoplastos (Monzer, 1991; Ehlers y Kollmann, 1996, 2000), en plantas quimeras, en la interfase parásito-huésped, durante el desarrollo vegetativo de la planta (Zhu et al, 1998; Van der Schoot y Rinne, 1999) y en superficies injertadas (Jeffree y Yeoman, 1983; Kollmann et al, 1985; Kollmann y Glockmann 1985, 1991, 1999), se forman plasmodesmos secundarios en lugares donde antes no existían o por modificación de plasmodesmos primarios. En plantas injertadas el establecimiento de un tipo de conexiones entre patrón-variedad, son basados en el intercambio de sustancias heterogéneas entre las dos partes, siendo algunas de ellas compuestos orgánicos los cuales son translocados en el simplasto. Con frecuencia se postuló la existencia de continuidad simplástica entre células en la superficie de injerto, aunque pruebas experimentales de confianza fueron difíciles de obtener debido a la dificultad en la localización del límite celular exacto entre las dos partes implicadas en la unión. Este problema fue vencido investigando heteroinjertos mediante el uso de marcadores específicos de especie (Kollmann y Glockmann, 1985; Kollmann et al, 1985) o en el caso de no disponer de diferencias estructurales específicas de especie por seccionamientos seriados (Monzer y Kollmann, 1986; Tiedemann, 1989). Usando las combinaciones de *Vicia Faba* injertada sobre *Helianthus annuus*, marcadores celulares fueron identificados en las células parenquimáticas como en los elementos cribosos. Mientras que *Vicia* contiene P-plástidos que almacenan almidón y proteínas cristalizadas, sus elementos cribosos presentan P-proteínas caracterizadas por una estructura filamentosa y tubular. Contrariamente, *Helianthus* tiene S-plástidos los cuales contienen únicamente almidón y sus elementos cribosos tienen P-proteínas dispersadas únicamente de forma tubular

(Kollmann y Glockmann, 1990). Así, existen marcadores de confianza que determinan si un elemento criboso pertenece al patrón o a la variedad en estas especies.

Durante el proceso de expansión y desarrollo del callo, las células se interdigitan, formando un tejido mezclado homogéneamente derivado tanto del patrón como de la variedad. Estas células pertenecientes a las dos partes de la unión se convierten interconectadas simplásticamente por PD “de novo” los cuales son formados secundariamente en las paredes de fusión (Kollmann y Glockmann, 1985; 1991, Yang et al, 1992). Un prerequisite para el establecimiento de PD secundarios en uniones de injerto es una pérdida y disminución local del espesor de la pared entre las células en contacto de las dos partes (Kollmann y Glockmann, 1991). La formación de estas conexiones citoplasmáticas continuas pueden ser difícilmente entendidas sin una cooperación en los procesos de adelgazamiento de la pared, aproximación y posicionamiento del RE en la membrana celular, destino del material procedente de vesículas del Golgi y la fusión de las membranas (Fig. 5.1). Debido a que estos procesos se inician antes de que ningún contacto simplástico célula-a-célula tenga lugar, el intercambio de señales informativas a través de la pared celular pueden estar implicados en la coordinación (Jeffrey y Yeoman, 1983; Kollmann y Glockmann, 1991, 1999).

A partir de la década de los ochenta, la existencia de un sistema inherente de compatibilidad a nivel celular ha sido cuestionada, por no ser demostrada de un modo fehaciente (Yeoman, 1984; Yeoman et al, 1978, Moore y Walker, 1981a,b; Moore, 1984a; Tiedemman, 1989; Hartman et al, 2002). En el presente trabajo se pretende evaluar el transporte simplástico que tiene lugar en combinaciones de compatibilidad conocida a través de la fusión de masas de callos a 5 y 10 días después del establecimiento de la unión.

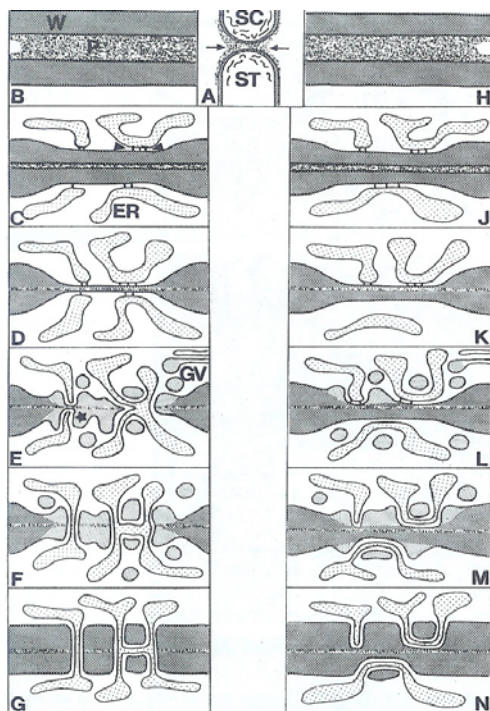


Figura 5.1. Formación de plasmodesmos secundarios en la superficie de injerto. a-b) aproximación de células de callo de patrón (st) y variedad (sc). C-G en sitios donde partes opuestas de las paredes sufren un adelgazamiento sincronizado (C-D), se forman plasmodesmos secundarios continuos gracias a la fusión de las membranas plasmáticas y ER de células opuestas de ambos individuos (E). Durante la reconstrucción de las paredes en contacto, plasmodesmos ramificados o simples son cercados por material de la pared derivado de vesículas del golgi (*E). I-N. La formación de plasmodesmos medios se produce en aquellas zonas donde paredes celulares opuestas disminuyen su espesor de forma no sincronizada (K-L). (Imágenes tomadas de Kollmann y Glockmann, 1991).

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Los estudios se han llevado a cabo usando tejido de callo in-vitro del cultivar de albaricoquero ‘Moniqui’ (*Prunus armeniaca* L.) y el patrón ‘Mariana 2624’ (*Prunus cerasifera* x *Prunus munsoniana*) en una combinación compatible (MN2624/MN2624) e incompatible (MO/MN2624), 5 y 10 días después del establecimiento de las uniones. Los genotipos sin unir fueron tomados como controles.

Establecimiento in vitro

La obtención de tejido de callo in vitro se hizo de la misma forma descrita en capítulos anteriores. Las diferentes uniones se realizaron colocando en una placa petri con medio de cultivo dos trozos de callo en posición vertical y se mantuvieron a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 16h a $17 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Se realizaron más de 5 uniones por combinación y día siempre manteniendo condiciones asépticas.

Observaciones microscópicas

Para la observación del material por microscopía confocal se procedió a la tinción in vivo con "caged fluoresceína"/ioduro de propidio en los ensayos de fotoactivación, y diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) en los experimentos de fotoblanqueo (FRAP), usando las mismas concentraciones y tiempos descritos en el capítulo 4. El análisis del transporte plasmodesmal en uniones compatibles e incompatibles se realizó mediante experimentos de fotoactivación. Todos parámetros de microscopía se mantuvieron en las mismas condiciones como en el capítulo anterior.

Análisis de los datos

Para el análisis detallado del movimiento de la sonda fotoactivable en combinaciones compatibles e incompatibles, todos los experimentos fueron estandarizados al 100% y distintas regiones de interés fueron seleccionadas para la medida del transporte plasmodesmal. Se calculó la media de intensidades en % para tres células adyacentes a la región de interés (ROI1) indicativo del transporte simplástico, y se ponderaron cinco experimentos independientes por día y combinación.

Se aplicó el análisis de la varianza (ANOVA) para determinar la existencia de diferencias significativas entre los genotipos estudiados y también para determinar el efecto de compatibilidad sobre el carácter estudiado (transporte plasmodesmal). Se utilizó el método LSD para la separación de medias ($p < 0.001$) con el programa Statgraphic Plus ver 5.1.

RESULTADOS

Análisis comparativo de la capacidad de transporte plasmodesmal entre el cultivar *Moniqui* y el patrón *MN2624*

PD son estructuras altamente dinámicas cuyo número, estructura y funcionamiento se ve modificado en función de la demanda funcional de la planta. Debido a que el ensayo se realizó con el cultivar de albaricoquero *Moniqui* y con el ciruelo de crecimiento rápido *Mariana2624*, la primera aproximación en este estudio fue valorar si los PD son funcionales y cuantificar la capacidad de transporte plasmodesmal en estos dos genotipos sin unir.

Con el objetivo de determinar la permeabilidad simplástica y cuantificar la capacidad de transporte plasmodesmal (fracción móvil) en ambos genotipos se

realizaron experimentos del tipo caged fluorescein y FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching). Los ensayos realizados con caged fluoresceína (Fig. 5.2) de peso molecular 826Da revelaron una buena comunicación intercelular en el patrón (Fig. 5.3.a-f) en comparación al cultivar donde no se detectó movimiento célula-a-célula de la sonda fluorescente activada (Fig. 5.3.g-l). Estos resultados nos indicaron que el tamaño del SEL en este cultivar era más pequeño que el tamaño molecular del canal en el patrón.

Asimismo, se valoró la funcionabilidad de las membranas celulares con yoduro de propidio visualizando las células muertas por tinción del núcleo roja en los estudios de fotoactivación y diacetato de carboxifluoresceína en los ensayos FRAP, corroborando la supervivencia de gran parte de las células después de la preparación de las muestras. (Fig. 5.3.b,h). Previamente a la cuantificación de la difusión plasmodesmal de otro fluorocromo de menor tamaño (CFDA), se determinó que el fotoblanqueamiento del fluoróforo en el área de interés (ROI1) era efectivo en todo momento, validando así los resultados que nos confirmaron un nivel de recuperación en el cultivar inapreciable (Fig. 5.4.a-e). De esta forma y continuando con esta línea de trabajo, el fluorocromo de menor tamaño (CFDA) nos permitió el conocimiento de la capacidad de transporte plasmodesmal. En 10 repeticiones para cada genotipo se determinó que la fracción móvil era cinco veces mayor en el patrón que en la variedad (Fig. 5.4.f) existiendo diferencias altamente significativas según el test LSD ($p < 0.001$). Asimismo, el tiempo de vida medio fue considerablemente más lento en el “cv” Moniqui (6.48 ± 3.17 min) que en el patrón. En conclusión, tanto el SEL como la capacidad de transporte plasmodesmal es mayor para el patrón que para la variedad.

Conductividad plasmodesmal en combinaciones compatibles e incompatibles 5-10 días después del establecimiento de la unión

El transporte plasmodesmal fue seguido con especial énfasis en células pertenecientes a la superficie de contacto patrón-variedad, 5 y 10 días después del establecimiento de la unión en una combinación compatible (*MN2624/MN2624*) e incompatible (*MO/MN2624*). Se observó la difusión de la sonda activa (“uncaged fluorescein”) entre células localizadas en la zona de unión de estas combinaciones pertenecientes únicamente al patrón debido al reducido tamaño de los plasmodesmos en la variedad.

Los resultados mostraron que las diferencias más significativas entre grupos (compatible/incompatible) se observan a los 10 días ($p < 0.001$) y dentro de la combinación incompatible entre la primera y la segunda semana después de la unión (Fig. 5.5). La tabla 5.1 representa que dado que los dos valores p son < 0.001 , los factores días y compatibilidad tienen un efecto significativo en el transporte plasmodesmal para un 99.9% de probabilidad. Puesto que la red simplástica tiende a ser variable, todos los ensayos se hicieron en las mismas condiciones experimentales tanto para los controles como para la fusión de callos: fotoperíodo, temperatura y estado nutricional.

El presente estudio mostró la presencia de conexiones simplásticas bien establecidas entre células vecinas en la zona de la unión de combinaciones compatibles durante las dos semanas posteriores a la unión. La mayor diferencia en cuanto a conductividad plasmodesmal fue observada 10 días después del establecimiento de la unión en combinaciones incompatibles. La molécula fluorescente difunde con dificultad via el simplasto entre células adyacentes, indicando una reducción en la capacidad de transporte simplástico en este tipo de combinaciones, de tal manera que impide una buena comunicación célula-a-célula; y este hecho podría afectar a un buen desarrollo de la unión.

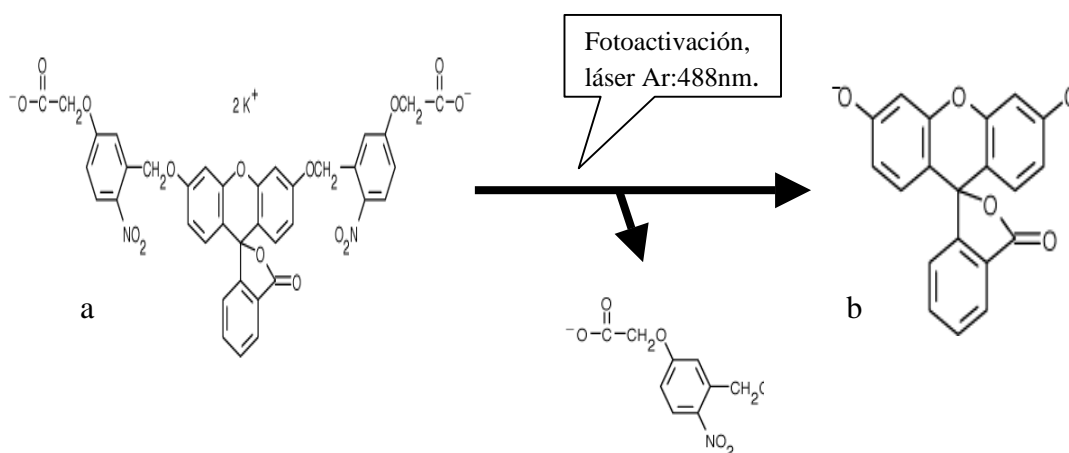


Figura 5.2. a) Estructura inactiva de la caged fluoresceína. b) La acción del láser la transforma en su estado activo fluorescente.

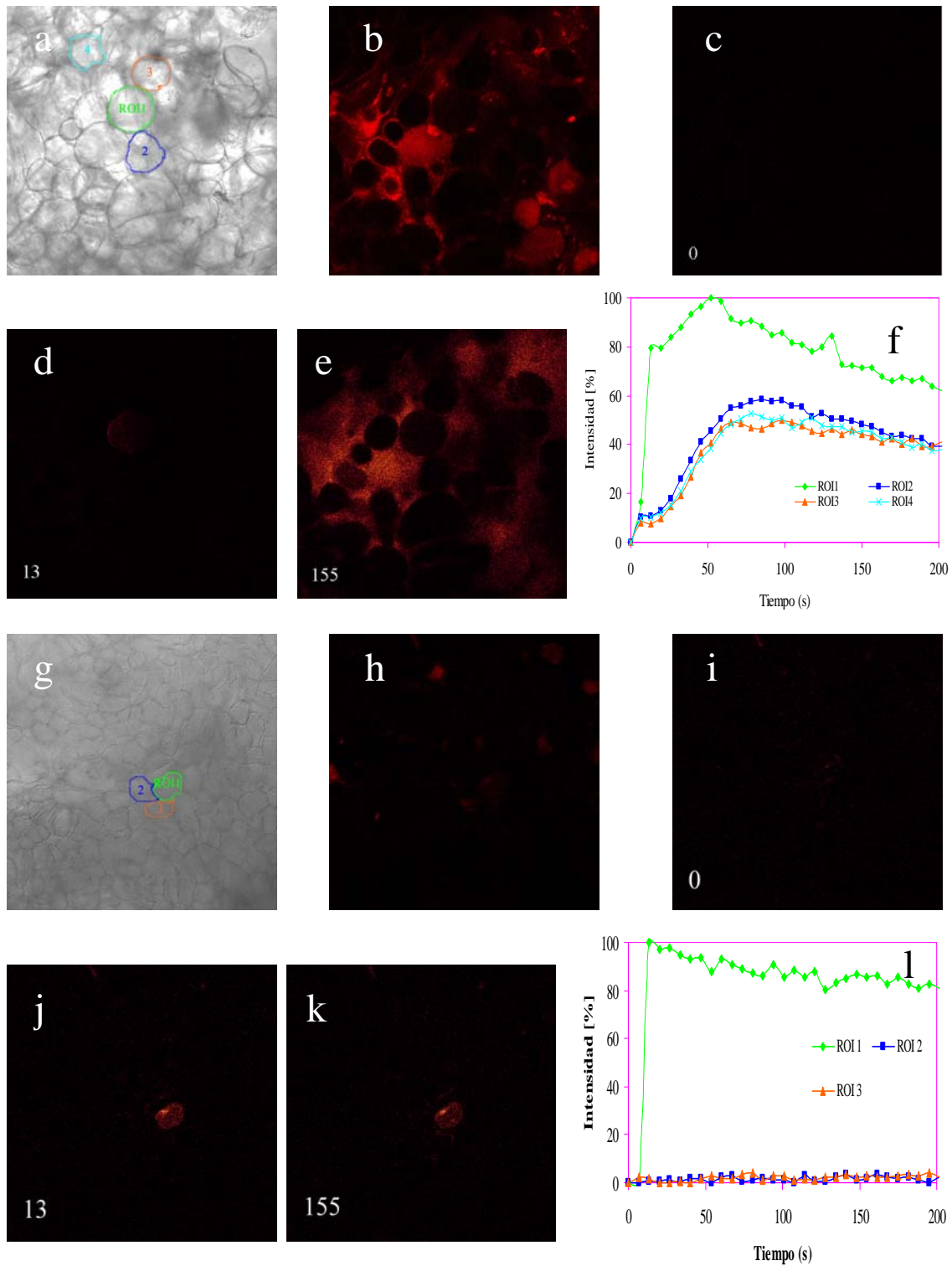


Figura 5.3. Experimentos de fotoactivación en tejido de callo sin unir: patrón *MN2624* (a-f) y el cultivar de albaricoquero ‘Moniqui’ (g-l). a) Imagen de transmisión donde la activación de la sonda se produce en la región de interés indicada en verde, pared celular de una célula individual. b) Sección óptica, la excitación de yoduro de propidio

permitió seleccionar las células vivas en los diferentes ensayos. **c-e)** Serie de imágenes confocales mostrando la difusión de la sonda activa fuera del ROI1 en función del tiempo y del espacio. **f)** Intensidad relativa de la forma activa (*uncaged fluorescein*) medida en la región de interés (ROI1) y en células adyacentes. **g)** Imagen de transmisión en el “cv” Moniqui. **h)** Excitación de yoduro de propidio. **i-l)** No se detecta movimiento de la sonda activa en células adyacentes. El background se muestra a tiempo 0.

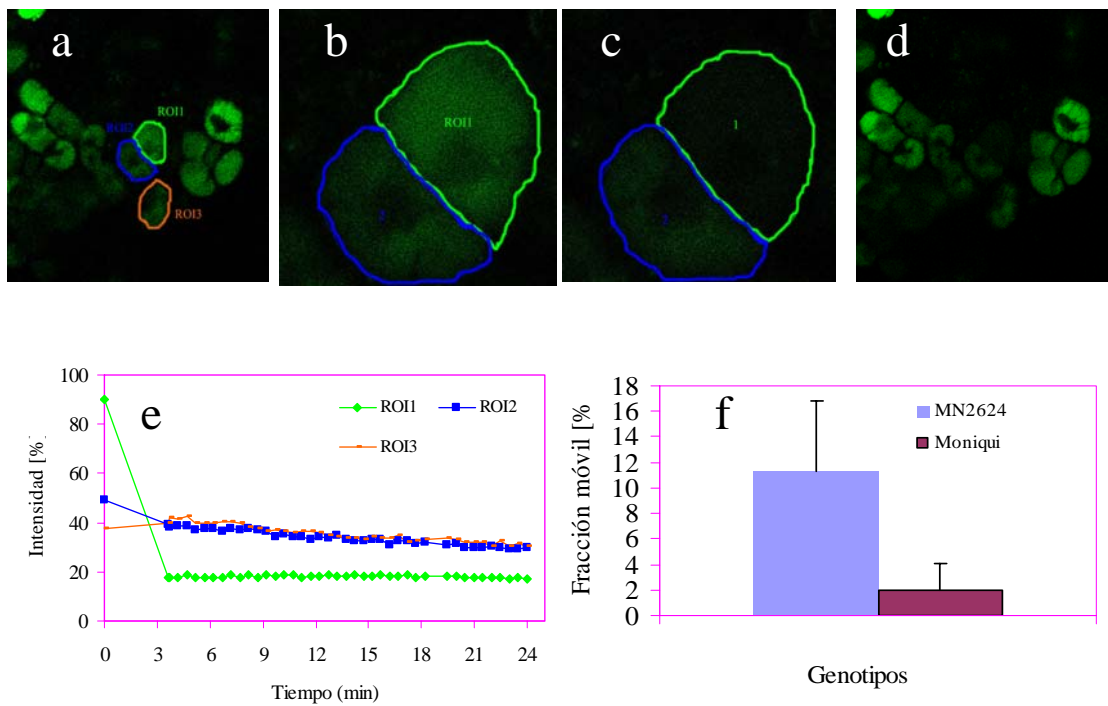


Figura 5.4. Cuantificación FRAP de CFDA en tejido de callo de “*Moniqui*”. **a-b)** Imágenes confocales antes de la fotodestrucción de la sonda (zoom4x y 16x, respectivamente). **c)** La imagen enseña como la fotodestrucción del fluorocromo CFDA se produce en el área de interés ROI1 (zoom16x). **d)** Imagen tomada ~15min después de la fotodestrucción del fluoróforo en el ROI1, no se observa recuperación de fluorescencia en la región de interés ROI1 (**e**). **f)** Representación gráfica de la capacidad de transporte plasmodesmal (fracción móvil) de los dos genotipos estudiados, se muestran como la media± SD de 10 repeticiones independientes. Diferencias estadísticamente significativas según el test LDS a $p < 0.001$.

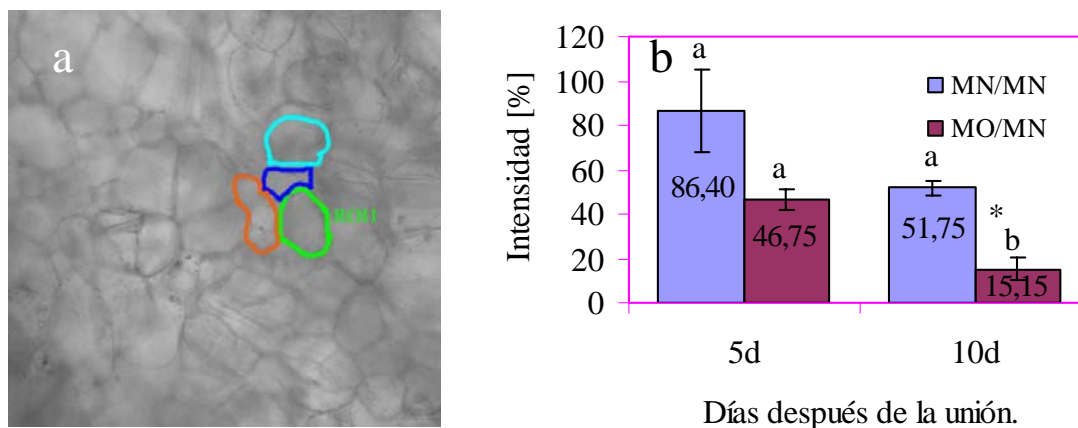


Figura 5.5. a) Imagen de transmisión de la combinación compatible MN/MN 5 días después de la unión, se visualizan tres células adyacentes a la región de interés. b) Los resultados de transporte plasmodesmal se muestran como la media \pm SD para 5 muestras independientes. La intensidad fue estandarizada al 100% en todos los ensayos. Letras diferentes indican diferencias significativas del transporte plasmodesmal entre días dentro de la misma combinación ($p < 0.001$). * Significa diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) entre compatibles e incompatibles al mismo día.

Tabla 5.1. Cuadrado medio para transporte plasmodesmal de combinaciones compatibles e incompatibles 5-10 días después del establecimiento de la unión; diferencias significativas según el test LDS a un nivel de significación del 0.001.

Fuente de variación	Gl	Cuadrado Medio	Cociente F	P-valor
Días (D).	1	3291.8	32.40***	0.0005
Compatibilidad (C).	1	4359.78	42.91***	0.0002
D x C	1	7.03801	0.07NS	0.7991
Residuos	8	101.605		

NS, ***, diferencias no significativas y diferencias estadísticamente significativas a un nivel $p < 0.001$, respectivamente.

DISCUSIÓN

Numerosas investigaciones se han llevado a cabo sobre los cambios anatómicos y ultraestructurales asociados con la incompatibilidad en el injerto mediante la fusión de masas de callos crecidas en contacto en el mismo medio de cultivo (Moore y Walker, 1983; Moore, 1984b; 1991; Errea et al, 2001). Las uniones con éxito de la fusión de callos indica que durante el proceso de formación de injerto no se requiere necesariamente de células altamente diferenciadas (Moore y Walker, 1983). La ruta simplástica en este tejido son canales plasmodesmales debido a la ausencia de elementos cribosos en este tipo de células. La formación de PD en injertos ha sido presentada entre especies herbáceas: heteroinjertos *Vicia/Helianthus* (Kollmann y Glockmann, 1985), *Lophophora/Trichocereus* (Monzer y Kollmann, 1986), y en autoinjertos de tomate (Jefree y Yeoman, 1983).

De especial importancia es caracterizar las propiedades funcionales de estos canales. En el material vegetal utilizado en este trabajo se ha estudiado si estos conductos citoplasmáticos son funcionales con ayuda de dos técnicas: fotoactivación y FRAP. Para el desarrollo de las mismas, los tejidos fueron incubados con sondas fluorescentes de distinto peso molecular con el fin de determinar la permeabilidad de difusión (SEL) de sus conexiones celulares, así como su capacidad de transporte.

Los experimentos descritos han puesto de manifiesto un mayor SEL en el patrón que en la variedad. Además de estas diferencias en el SEL, los PD de la variedad y del patrón difieren en su capacidad para el transporte de CFDA, indicando una menor capacidad de transporte de los PD en el cultivar “Moniqui” respecto al patrón “MN2642”. Dado que la combinación “Moniqui” sobre “MN2642” presenta un comportamiento incompatible; estas diferencias en el SEL y en la fracción móvil entre los dos genotipos podrían afectar al intercambio celular de nutrientes y macromoléculas entre las dos partes implicadas en la unión. Una variabilidad cualitativa y cuantitativa en la capacidad de transporte plasmodesmal, puede causar una organización simplástica compleja, estando relacionada con la cantidad y naturaleza de las moléculas que son transportadas a través de los PD de células específicas en diferentes estados de desarrollo (Ehlers y Kollmann, 2001). Como ha sido demostrado en estudios estructurales y funcionales en meristemos apicales del tallo y de la raíz, esta red plasmodesmal compleja es establecida en un estadio muy temprano durante el

Capítulo 5

desarrollo de cada órgano de la planta (Ducket et al, 1994; Gisel et al, 1999; Van der Schoot y Rinne, 1999; Rinne y Van der Schoot, 2003).

Generalmente, se acepta que en organismos multicelulares la comunicación intercelular tiene funciones vitales para la cooperación entre varias células, tejidos y órganos. En plantas injertadas las dos partes de origen homogéneo o heterogéneo interaccionan como una unidad funcional y estructural. La cooperación es establecida por conexiones simplásticas a corta distancia en la superficie de injerto (Kollmann y Glockman, 1990, Rachow-Brandt y Kollmann, 1992a), y a larga distancia en un sistema vascular más elaborado (Errea et al, 1994; Shöning y Kollmann, 1995; 1997; Espen et al, 2005). En este trabajo se ha observado una reducción en la conductividad plasmodesmal en una combinación incompatible durante la segunda semana después del establecimiento de la unión in-vitro, que podría ser explicada por una cooperación insuficiente de las dos partes implicadas en la unión. En plantas herbáceas se ha observado que el establecimiento con éxito de conexiones celulares secundarias continuas requieren una cooperación exacta entre células de la dos partes implicadas en el injerto (Kollmann et al, 1985; Kollmann y Glockmann, 1999). Una cooperación insuficiente entre patrón-variedad resulta en la formación de plasmodesmos discontinuos o medios. Este hecho, es apoyado por evidencias que indican la formación de esta clase de PD, predominantemente en la superficie de heteroinjertos incompatibles, entre diferentes tipos celulares y entre células en diferentes estados de diferenciación (Kollmann et al, 1985; Ehlers y Kollmann, 1996b). Otras investigaciones llevadas a cabo por Rachow-Brandt y Kollmann (1992b), detectaron un aumento de transferencia apoplástica en combinaciones asociadas con un alto grado de incompatibilidad entre *Vicia/Helianthus*. La potenciación del transporte apoplástico en nuestro material (uniones incompatibles) no puede ser descartada ya que la zona de unión presenta una gran actividad celular, la cual requiere el aporte de metabolitos y no existen conexiones simplásticas tipo poros cribosos en las células del tejido de callo. Asimismo, la reducción observada en el transporte simpástico plasmodesmal puede ser ocasionada por un inadecuado número de PD, un cierre de los mismos o distinta permeabilidad plasmodesmal en las uniones incompatibles.

Modificaciones temporales del funcionamiento plasmodesmal se han observado en respuesta a cambios medioambientales y alteraciones fisiológicas, lo cual conduce a un incremento o un descenso en el SEL (Ding et al, 1999; Schulz 1999; Crawford y Zambrysky, 2001). A pesar de que estas estructuras son muy lábiles y extremadamente

sensibles a cualquier manipulación, la mejora de las técnicas empleadas para investigaciones plasmodesmales presentadas en estos últimos capítulos han solventado este problema. En este contexto, las modificaciones funcionales se correlacionan parcialmente con alteraciones estructurales de la arquitectura plasmodesmal pero también pueden ser logradas por una inadecuada apertura plasmodesmal, que implicaría cambios en la configuración molecular de componentes plasmodesmales (Schulz, 1999). Una distinta permeabilidad fue demostrada entre plasmodesmos simples y ramificados en plantas transgénicas de tabaco, ilustrando que un descenso en el SEL tiene lugar durante la transición de hojas inmaduras (sumideros) a maduras (fuente), lo cual estaría correlacionado a alteraciones estructurales de los plasmodesmos en el tejido maduro (Oparka et al, 1999; Imlau et al, 1999). Supuestamente, la diversidad funcional de estos canales en las diferentes interfases celulares representan adaptaciones a las diversas tareas fisiológicas de los tipos celulares y tejidos; y refleja la complejidad de la organización simplástica de las plantas en estado maduro (Ding et al, 1999; Schulz, 1999). En este sentido, los PD primarios y secundarios de hojas jóvenes pueden ser caracterizados para transporte molecular no-específico. Estos tienen un alto SEL permitiendo la difusión sin impedimento de nutrientes y presumiblemente de pequeñas macromoléculas con carácter informativo de hasta 50Kda (Oparka et al, 1999), aunque no median el transporte selectivo de macromoléculas más grandes (Ding et al, 1992; Itaya et al, 1998; Waigmann et al, 1994). En hojas maduras, tanto los PD primarios como secundarios sufren modificaciones y presentan propiedades de transporte selectivo más avanzadas. Aunque debido a su bajo SEL, la difusión no específica es fuertemente restringida a pequeñas moléculas de alrededor de 1KDa (Wolf et al, 1989; Oparka et al, 1999). Los datos presentados en este capítulo revelan que se produce un cambio en la conductividad plasmodesmal en uniones incompatibles. Para comprobar si esta reducción en el transporte es debida a alteraciones en la estructura plasmodesmal, se requieren futuros estudios de microscopía electrónica.

En conclusión, el movimiento de nutrientes célula-a-célula en el patrón *Mariana2624* es facilitado por la existencia de buenas conexiones simplásticas que permiten el intercambio rápido y eficaz de sustancias a su través. Mientras que en el cultivar exigente *Moniquei*, debido al reducido SEL y capacidad de transporte plasmodesmal, la transferencia de nutrientes via el simplasto se ve reducida en gran medida. Además de estas diferencias en el SEL y capacidad de transporte plasmodesmal entre estos genotipos, se ha observado una reducción en la conductividad plasmodesmal

Capítulo 5

en el patrón de la combinación incompatible 10 días después de la unión. Estos resultados sugieren que estos parámetros podrían ser considerados para presentar cierta relevancia en la respuesta de compatibilidad/incompatibilidad entre combinaciones patrón-variedad con distinto tamaño de diámetro útil del canal y capacidad de transporte de los mismos.

6. IDENTIFICATION AND GENE EXPRESSION CHANGES OF UDP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE RELATED TO GRAFT INCOMPATIBILITY IN APRICOT/ PLUM CALLUS COMBINATIONS

ABSTRACT

Graft compatibility response is a complex mechanism with a wide range of different physiological, biochemical, and anatomical interactions. However, little is known about the biochemical basis for incompatibility and the molecular mechanism involved in this response. In the present paper, the influence of grafting on the protein pattern in the incompatible scion/rootstock combination of apricot (*Prunus armeniaca* L cv Moniqui) on plum (*Prunus cerasifera* x *Prunus munsoniana* cv Marianna 2624) and their homograft combinations using callus fusion in vitro was investigated. A decrease in a 55 kD protein band at the graft interface of the incompatible union was observed during the two weeks after grafting. Using SDS-PAGE combined with MALDI-TOF, this protein was identified as an UDP glucose pyrophosphorylase (UGPase) with a high homology to other higher plants. In addition, the UGPase mRNA transcript was also slightly visualized in the stock from the incompatible combination. These results suggested that this protein could be related to the graft compatibility/incompatibility response.

Keywords: graft compatibility of *Prunus spp*, in-vitro callus incompatibility response, protein profile, callus protein identification, UGPase expression pattern.

Abbreviations: DAG, days after grafting; DAW, days after wounding; MALDI-TOF, Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight; RT-PCR, reverse transcriptase-PCR; UGPase, UDP-Glucose pyrophosphorylase.

INTRODUCTION

Plant grafting is a widely used means of plant propagation and growth control that is of considerable importance in the adaptation of interesting cultivars in appropriated areas. The formation of a successful graft is a complex biochemical and structural process that includes an immediate wound response, callus formation, establishment of new vascular tissue, and formation of functional vascular system between both components of the graft. However, when divergent genotypes are grafted, they do not always constitute a successful graft and show their disagreement in the form of incompatibility. In the case of apricot combinations grafted on some *Prunus* rootstocks, this incompatibility is associated with mechanical weakness and breakage of the union due to morphological and physiological alterations in the process of grafting (Errea et al., 1994a; 2001). Whereas an increasing number of studies have led to the observation of these morphological and physiological changes between compatible and incompatible unions in herbaceous and woody plants (Ermel et al., 1999; Espen et al., 2005; Pina and Errea, 2005), there is limited information on the biochemical basis for incompatibility and the molecular mechanism involved. The question as to whether a successful graft union is determined by a mutual cellular recognition phenomenon has been discussed for a long time (Jefree et al, 1987; Moore, 1991; Hartmann et al, 2002). In this respect, different compatibility/incompatibility mechanisms have been proposed based on the interaction of cells of different species with special reference to the possibility that the phenomenon of cellular recognition exists between opposing plant cells during the initial cohesion of stock and scion (Yeoman et al, 1978; Jefree and Yeoman, 1983). However other authors have pointed out that the initial adhesion of graft partners is brought about by the deposition and subsequent polymerization of cell wall materials inherent to the wounding response associated with grafting (Moore and Walker; 1981a,b). Likewise, Miller and Barnett (1993) reported that the adhesion between cells of the scion and rootstock is performed by beadlike projections in the cell walls which may act as binding or cementing cells with an active role in cell recognition and the successful merging of tissues of the graft partners.

More recently, reports have focused on detecting some isozyme or protein markers to predict graft incompatibility using effective techniques before the appearance of visible incompatibility symptoms (Gülen et al., 2002, 2005a, 2005b). Convincing experimental evidences suggest that in the graft Cucumis/Cucurbita,

changes in protein banding may be due to polypeptides migrating symplastically across the graft union via the connecting phloem (Tiedemann and Carsens-Behrens, 1994) in such a way that translocation of signaling molecules, such as polypeptides in the phloem, could be significant in cell recognition and compatibility between the graft partners.

The behaviour of the callus cells formed in the first step of graft development determine the future response of the graft union, because the lack of differentiation of these cells in some areas of the graft union could affect the activity of the new xylem and phloem formed (Errea et al., 1994a; Hartmann et al., 2002). Here, the possibility of detecting differences in compatible and incompatible unions at an early stage of the graft response is explored by callus fusion in vitro. The use of tissue culture techniques may be an interesting approach to study compatibility–incompatibility phenomena provided a good correlation between in vivo and in vitro systems occurs. In this sense, previous studies have shown that in vitro graft systems match very closely to in vivo graft systems (Richardson et al., 1996; Errea et al., 2001; Espen et al., 2005) and that the strong interdigitation of callus cells observed in vitro is similar to that recorded in vivo.

The aim of the present study was to determine whether there are differences in the protein profile between compatible/incompatible apricot combinations due to the influence of grafting. The effects of wounding upon mechanism of incompatibility were also considered since the initial stages of the formation of both compatible and incompatible grafts are a wound response. A protein band differently expressed on compatible/incompatible unions was identified by means SDS-PAGE and MALDI-TOF combined technique. The analysis of the expression pattern was performed to gain more insight into the regulation of the graft development during the early stages of grafting.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and grafting (Obtaining callus tissue of plum and apricot).

Callus tissue of the apricot cultivar ‘Moniqui’ (*Prunus armeniaca L.*) (MO) and from the rootstock ‘Marianna 2624’ (*P. cerasifera x P. munsoniana*) (MN) were used to establish the compatible homografts (*MN / MN and MO / MO*) and the incompatible heterograft “*MO / MN*”. For callus obtention, stem fragments of each cultivar were cut into 0.5cm segments under sterile conditions and placed in vitro with a modified

Murashige and Skoog medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with indole-3-butyric acid (IBA, 0.5 μM), 6-benzylaminopurine (BA, 0.5 μM), 3% sucrose and 0,7% Difco-Bacto agar. Cultures were maintained in a growth chamber at 22 ± 2 °C and cool white fluorescent tubes provided a 16-h photoperiod of $17\text{-}\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Callus tissue were subcultured every month.

The graft combinations were established by placing two callus pieces upright on the agar layer under sterile conditions in the same culture medium and conditions as used for callus initiation. The compatible/incompatible combinations were sampled 5 and 10 DAG. Ungrafted and wounded genotypes served as control.

Protein extraction

The contacting surfaces of the two callus masses were prepared separately for protein extraction (Fig. 1). Callus tissues were frozen in liquid nitrogen and the frozen tissue was ground to a fine powder with a precooled mortar and pestle. Total protein was extracted with 100 mM tris-HCl pH 8.2, 5 mM EDTA, 2 mM PMSF, 1% SDS, and 2- β mercaptoethanol. The cellular debris was pelleted at 15000rpm for 10min, at 4°C, and the supernatant was collected. To ensure equal loading of samples, an aliquot of this crude protein extract was used for protein determination using the Bio-Rad protein assay based on the method of Bradford (1976) with bovine serum albumin (BSA) as standard.

SDS-PAGE

Total protein was separated by SDS-PAGE in 4% stacking gel and 15% resolving gel according to the procedure of Laemmli (1970). Experiments used 0.75-mm gels with dimensions of 8.3 x 7.3 cm (miniprotean II- System Bio-Rad). Each well of the gel was loaded with 24 μg total protein per lane and after electrophoresis, the gels were stained with Coomassie brilliant blue R-250 overnight. The SDS-PAGE analysis was performed three times with similar results.

Mass spectrometry

The callus proteins were collected from ungrafted calli *Marianna*, fractionated by SDS-PAGE in 15% polyacrilamide gels, and stained with Coomassie blue. The putative UGPase band (approximately 55 kD) was excised from the gel and washed several times with sterilized water. Peptide mass mapping by MALDI-TOF mass

spectrometry was performed by the CNB proteomic service (Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid) and peptide mass fingerprints were searched using the MASCOT search engine for this service (<http://www.matrixscience.com/>). Database queries were carried out from monoisotopic masses using the following parameters: peptide mass tolerance of ± 50 ppm; the maximum number of missed tryptic cleavages of 1; and fixed modifications carbamidomethyl (C).

RT- PCR and sequencing

All solutions were prepared using water treated with diethylpicrocarbonate (DEPC) to inactivate ribonucleases. Total RNA was extracted from various unions by using the method of Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. RNA was isolated from callus tissue of homografts and heterograft 5-10DAG, and from ungrafted *Monique* and *Marianna* control plants. Using 1 μ g mRNA, RT-PCR reactions were performed. Reverse transcription with total RNA from callus tissue was carried out using poly(dT) primer and Protoscript First Strand cDNA Synthesis kit (New England Biolabs) according to the manufacturer's instructions. Based on the amino acid sequence of UGPase *Pyrus pirifolia* (accession number ABO13353), a sense degenerated oligonucleotide primer was synthesized (5'-GAGNNAGTAYCCTCGYSTG-3'). The antisense primer was based on a conserved region near the C terminus of UGPase proteins and had the following sequence: 5'-GGNACATTVRYRCCAATWGC-3'. Partial c-DNA amplification was performed under the following conditions: 94°C for 3 min and then 34 cycles at 94°C for 45 s, 52°C for 1 min, and 72°C for 1.30 min. At the end of the 34 cycles, the reaction mixture was incubated for an additional 10 min at 72°C. RT-PCR products corresponding in size to the cDNA products were absent in control samples lacking RT (data not shown). The amplified RT-PCR products were electrophoresed by 1% agarose gel electrophoresis, and the band of the expected size (approximately 560pb in length) was isolated and subcloned into p-GEM T easy vector (Promega, Madison, WI, USA) prior to sequencing. PCR screening for the positive clones were carried out. Nucleotide sequence from RT-PCR clones was identified by NCBI BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Protein predictions were made using the expasy program (<http://www.expasy.org/>) and sequence alignment and analyses were performed with clustalW program (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). The intensities of the PCR products were measured with the Gel Doc2000 (Bio Rad Life Science group)

by using the Quantity One quantification software (version 4.4). The expression level of each gene was calculated after normalization to the level of the actin gene PCR product from the same sample. The actin gene was amplified by using the 5' primer (5'-CTTTAATGTGCCTGCCATG-3') and 3' primer (5'-TGATGGAGTTGTAGGTAGTC-3') designed from the sequence of *P. Persica* actin cDNA (Gene bank accession number AB046952). The RT-PCR results shown are from one experiment that was repeated at least three times with similar results. Sequences of data from this article have been deposited with the GenBank database libraries under the accession number DQ470013 and DQ479430.

RESULTS

Differences in protein profile of compatible and incompatible combinations

Initial focus was to evaluate the graft response at the protein level between scion and stock during two weeks after union. The SDS-PAGE analysis of proteins extracted from in-vitro calli control (ungrafted and wounded), compatible homografts and incompatible heterograft have revealed differences in the protein profile between compatible and incompatible in-vitro callus unions. The main distinction in protein band profile between wounding and grafting response occurs 10 days after grafting (DAG) in the stock from the incompatible heterograft (*MO/MN*). This incompatible union shows in vitro a protein pattern that differs from that of Marianna ungrafted control, wound, and homograft plants as soon as two weeks after grafting. During this early stage of graft union development, became visible a decrease in a 55 kD protein band content at the graft interface that was observed not to be a wound response (Fig. 6.1.a, lane 6). Nonetheless, a decrease of intensity in this protein band was not detected in the scion from the heterograft interface (*MO/MN*) (Fig. 6.1.b, lane 6). Regarding the wound response, a change was noticed in a 20 kD protein band at 5 days after wounding (DAW) in the scion (Fig. 6.1.b, lane 3), but not to the graft combinations and ungrafted control.

Identification of the callus protein with estimated molecular weight of 55 kD

For initial protein identification, combined assays using MALDI-TOF and SDS-PAGE were performed. The protein band with a predicted molecular weight of approximately 55 kD was excised from a Coomassie-Blue stained gel and subjected to

trypsin digestion and MALDI-TOF analysis which allowed rapid and sensitive initial screening of the peptide masses. The spectrum obtained from the tryptic fragments of the protein band was used to query the Mascot search database. Eight different peptides, covering 21% of the amino acid sequence of the protein, matched *Pyrus pyrifolia* UGPase (Table 6.1, Fig. 6.2) with a protein score of 79%; that indicates it is significant at $p < 0.05$. Other peptides sequences showed not similarity to any known protein. The predicted molecular mass of the UGPase from *Pyrus*, without post-translational modifications is in the range calculated from the SDS-gel 55 kD (Fig. 6.2).

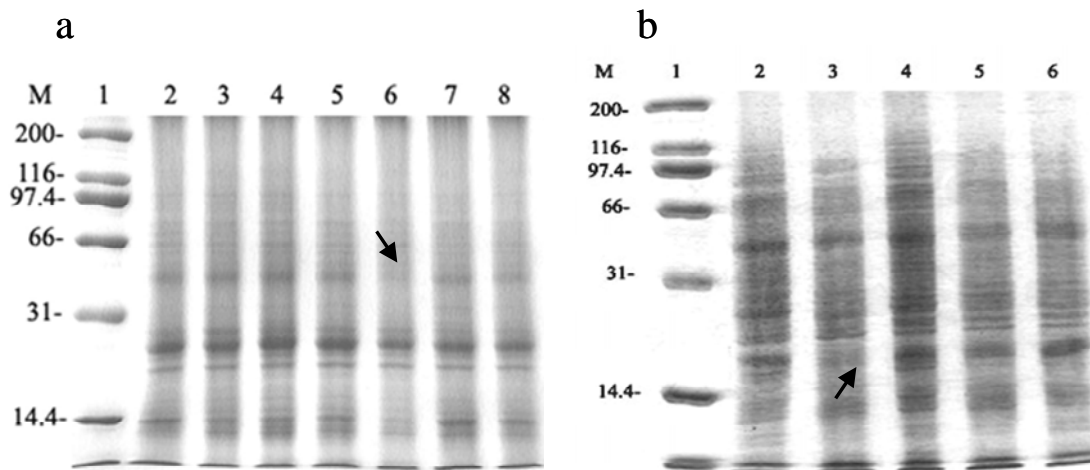


Figure 6.1. Protein profile from in-vitro callus combinations. **a)** Coomassie blue-stained SDS-polyacrylamide gel of total proteins isolated from callus tissue in vitro (24 μg each lane). Lane (1) molecular weight marker in kD; lane (2) ungrafted MN; lane (3) MN 5 days after wounding (DAW); lane (4) incompatible graft interface *MO/MN* 5 days after grafting (DAG); lane (5) MN 10 DAW; lane (6) incompatible graft interface *MO/MN* 10 DAG; lanes (7-8) homograft *MN/MN* 5-10 DAG, respectively. **b)** Lane (1) molecular weight marker in kD; lane (2) ungrafted moniqui; lane (3) *MO* 5 DAW; lane (4) incompatible graft interface *MO/MN* 5 DAG; lane (5) *MO* 10 DAW; lane (6) graft interface *MO/MN* 10 DAG.

Table 6.1: MALDI-TOF analysis of a 55 kD callus protein band.

OBSERVED	MR(EXPT)	MR(CALC)	PEPTIDE
1019.55	1018.55	1018.56	NGFINLVSR
1052.54	1051.53	1051.53	GGTLISYEGR
1296.68	1295.68	1295.71	LEIPDNAVIANK
1330.71	1329.70	1329.72	LVVEDFSPLPSK
1384.74	1383.73	1383.74	FFNHAIGINVPR
1771.82	1770.82	1770.84	DGWYPPGHGDVFP SLK
1780.96	1779.95	1779.98	LVEADALKMEIIPNP K
1818.88	1817.87	1817.88	SNVQIHTFNQSQYPR

01 MAAVATGNVD KLKSDVASLS QISENEK**NGFINLVSR**YVSGEEAQHVEWSK
51 IQTPTDEVVVPYDGLAPTPE DPEEIKKLLD KLVVLKLNNG LGTTMGCTGP
101 KSVIEVRNGLTFLDLIVIQI ENLNNKYGSCVPLLLMNSFN THDDTQKIVE
151 KYSK**SNVQIHTFNQSQYPR**LVVEDFSPLPSKGQTGKDGWYPPGHGDVFP
201 LKNSGKLDLLLSQGKEYVFI ANSDNLGAVVDLKILHHLIQ KKNEYCMEVT
251 PKTLADVKG**GGTLISYEGR**VQLLEIAQVPDQ HVNEFKSIEK FKIFNTNNLW
301 VNLNAIKR **LVEADALKMEII PNP**K EVDGVKVLQLETAAGAAIR**FFNHAIG**
351 **INVPR**SRFLPVKATSDLLLQSDLYTLQDG FVTRNSARKNPENPTIELGP
401 EFKKVGSYLS RFKSIPSILE LESLKVSGDVWFGAGVVLKKGKVTITAKSGV
451 KLEIPD**NAVI ANK**DINGPEDL

Figure 6.2. Protein identified using peptide maps generated from trypsin in-gel digestion. The approximately 55 kD protein is the UDP-glucose pyrophosphorylase (UDPGP) (UGPase). The protein was cut out from a 15% polyacrylamide gel, eluted and analyzed by mass spectrometry. Tryptic peptides matching UGPase from *Pyrus pyrifolia* are showed in bold. The peptide mass fingerprints were searched using the Mascot search engine. The peptides that were used to design the degenerated primers are indicated in bold letters and underlined.

Sequencing and RT-PCR analysis.

Possible effects of in-vitro callus unions on UGPase expression were tested by RT-PCR. To perform this study, a partial cDNA was cloned corresponding to the UGPase in the two genotypes and transcriptional analyses in control and graft combinations from different degree of compatibility were carried out. Forward and reverse degenerated primers were designed based on positions 155-169 and 344-355 corresponding to the 2nd and 7th peptide sequence, respectively, matching with the UGPase sequence from *P. Pyrifolia* (Fig. 6.2). As a result, a sequence of approximately 560pb was determined that predicted a partial protein sequence 187aa in length. Sequence alignment with other plants has been made with Clustal W (Fig. 6.3). At the amino acid sequence level, this internal sequence of the UGPase shares an extensive identity of 98% between MN2624 (gen bank accession n° DQ479430) and Moniqui (gen bank accession n° DQ470013). At the same time, the derived amino acid sequence of MN is highly conserved when compared with UGPase from other plants. For instance, there is a 96% homology with the corresponding protein from *P. Pyrifolia* (Kiyozumi et al. 1999), 89% with potato (Borovkov et al. 1997), 90% with barley (Eimert et al. 1996), and 87% with arabidopsis (partially expressed sequence Gen bank accession n° P57751). These high similarities would suggest that these enzymes have a common evolutionary origin.

Studies on potato tuber UGPase, identified five Lys residues (Lys²⁶³; Lys³⁵⁹; Lys³⁶⁷; Lys⁴⁰⁹; and Lys⁴¹⁰), which are critical for the catalysis and substrate binding to the enzyme (Katsube et al. 1991). *P. pyrifolia* UGPase has an identical positioning of the Lys residues (Lys²⁵⁸; Lys³²⁴; Lys³⁶²; Lys⁴⁰³; and Lys⁴⁰⁴) as the potato enzyme. Likewise, partial *Prunus* amino acid sequences also contain Lys that could participate in binding of the substrate.

The expression of the gene coding for the UGPase was detected in the ungrafted callus tissue and compatible combinations 5-10 DAG (*MO/MO* and *MN/MN*) by using RT-PCR analysis (Fig. 6.4). However, mRNA transcript was only slightly detectable in the stock from the incompatible combination (*MO/MN*) at 10DAG, whereas it was strongly detected in the scion (*MO/MN*) (Fig. 6.4, lanes 7 and 9 respectively). As mentioned previously, the cDNA fragments were cloned and sequenced, thus providing homologous probes for subsequent expression studies. A semi-quantitative measure of gene expression is provided by RT-PCR. Nevertheless, the marked differences observed

Capítulo 6

for the incompatible union in the stock at 10 DAG suggest that a differential expression could exist between compatible/incompatible unions at the transcriptional level, which would be reflected in the traductional level as well.

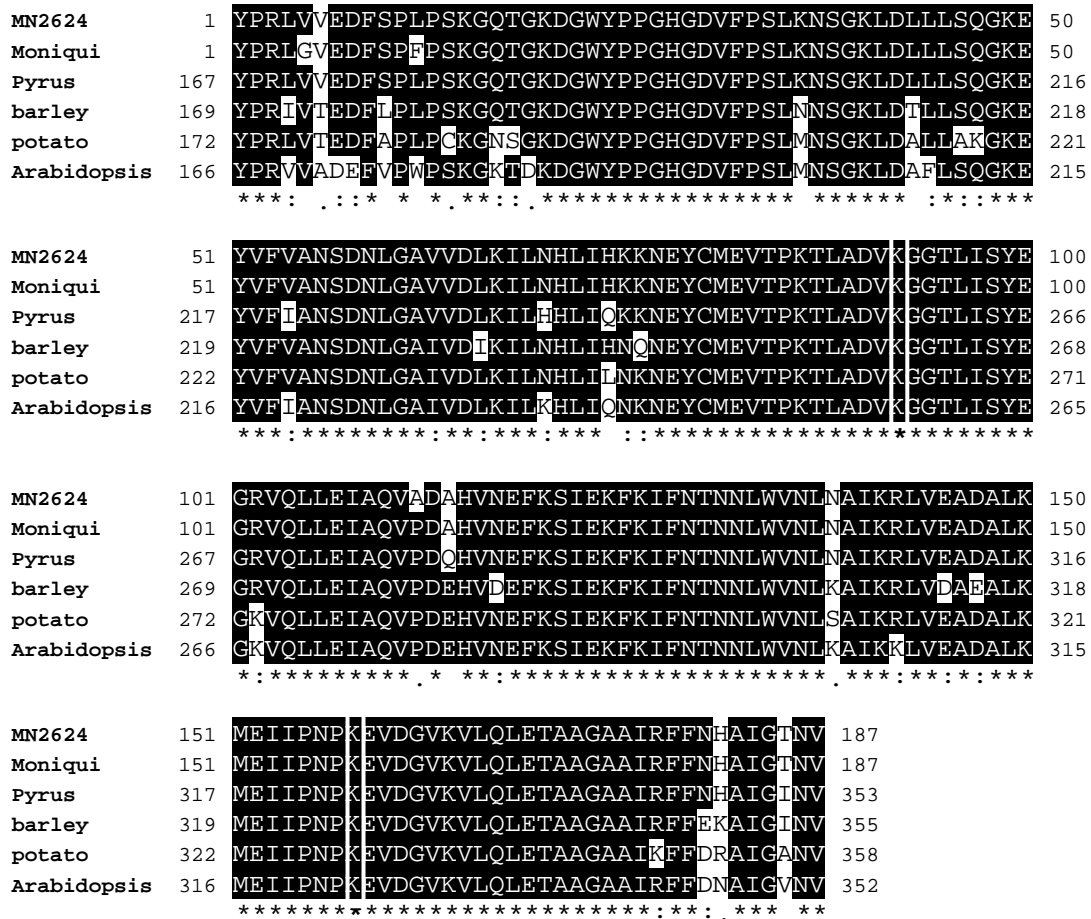


Figure 6.3. Sequence alignment of Moniqui and Marianna 2624 UGPase with other plants (access codes: *Pyrus pyrifolia* AB013353; *Solanum tuberosum*, AAB71613; *Barley*, Q43772; *Arabidopsis*, P57751). Identities and similarities were calculated based on clustal alignment of partial protein sequence. Lys residues assumed to be essential for catalysis and substrate binding are outlined by the white boxes at positions 258 and 324 from the partial amino acid sequence of *P. pyrifolia*. Identical amino acids are indicated by asterisks.

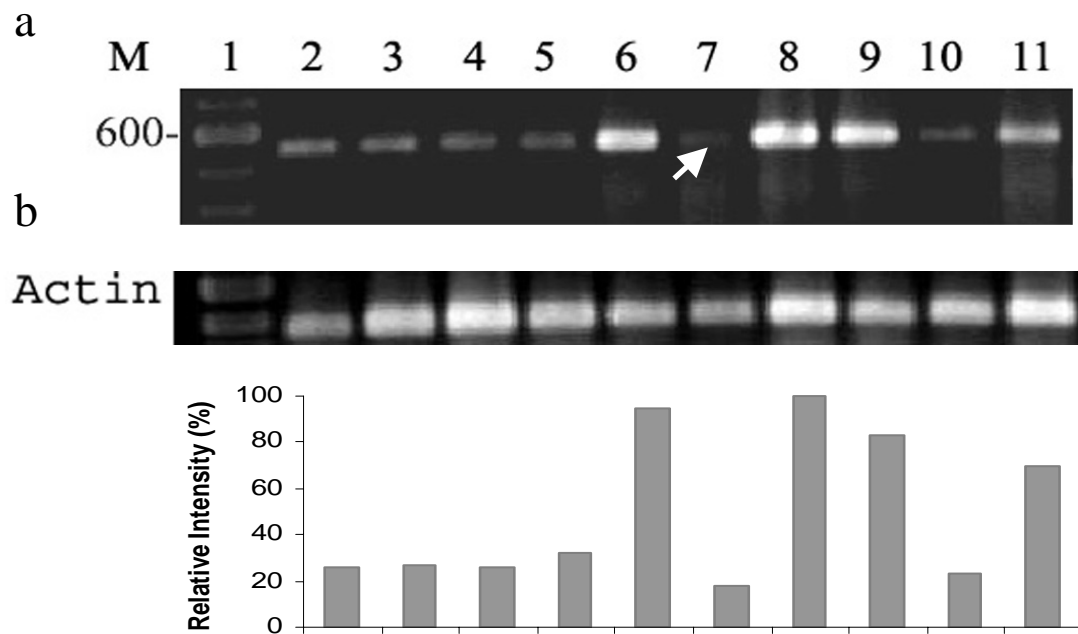


Figure 6.4. RT-PCR products generated from total RNA with 5′ and 3′ primers from the protein coding sequence of UGPase were separated by agarose gel electrophoresis. **(A)** Lane (1) M indicates molecular length markers, 100-pb DNA ladder. Lane (2) MN2624 ungrafted control. Lane (3) Moniqui ungrafted control; Lanes (4-5) RNA collected from the stock 5-10 DAG in the compatible union (*MN/MN*); RNA collected from the stock (*MO/MN*) (lanes 6-7) and from the scion (*MO/MN*) (lanes 8-9) at 5-10 DAG respectively; lanes 10-11: RNA collected from 5-10 DAG in the compatible union (*MO/MO*). **(B)** The actin RT-PCR product was used as an internal control in each reaction. Bottom panel: The intensities of RT-PCR products separated by agarose gel were measured by densitometry, as described in text. The intensities expressed are relative to the highest value, which was set to 100%.

DISCUSSION

Influence of grafting in protein profile of compatible and incompatible unions

The data presented here show that there are differences in the protein profile between compatible and incompatible in vitro callus unions. A number of detailed studies have been made of graft union formation with woody and herbaceous plants, and it is widely known that the first response at the early stages of union development is the formation of callus tissue at the graft interface (Errea et al. 1994, Hartmann et al. 2002, Tiedemann 1989). Once the callus is formed, the events that follow this initial

formation, when the callus cells first touch, seem to be essential for the critical event deciding the development of future vascular connections. The behaviour of these new callus cells is of particular importance, because the production of parenchymatic cells from callus tissue and their differentiation into vascular connections will determine the future response of the graft (Richardson et al. 1996, Schöning and Kollmann 1997). In this research, an in-vitro callus system has been performed to reproduce the responses in the graft union. As is pointed by Moore (1991), the responses in vitro of incompatible grafts mimicked those than occurred in vivo, and the in-vitro system has been previously described to study the graft interactions between both graft partners (Errea et al. 2001) suggesting that callus fusion in vitro may be an useful tool for studying graft compatibility/incompatibility.

The differences reported in this work in the protein profile have been directly related to the incompatible union as soon as two weeks after the union. Previous works have described a cell recognition mechanism in which opposing cells of graft partners touch (Jeffrey et al. 1987, Yeoman et al. 1978) on the assumption that graft-specific protein synthesis are produced as consequence of a mutual cellular recognition, but without bringing forward clear proofs about this hypothesis. In this study, the synthesis of new or more protein have not been detected in compatible unions regarding to the controls samples. Contrary to a mechanism of cellular recognition which might occur in successful graft unions, the callus formation and its initial adhesion can be a passive event that occurs as a response of wounding (Moore and Walker 1981a,b). This has been observed previously in *Prunus* graft combinations, but the development of these callus cells differ in compatible and incompatible combinations (Errea et al. 1994). The variation in the 55 kD protein band due to a wound response was ruled out by including wounded tissue control in the assay, confirming the differences in the protein profile related to an incompatible response.

Some differences related to cell arrangement, stain intensity of cellulose, and lipid and phenol content of the cells have been previously reported in the callus fusion of *Prunus* combinations growing in vitro, also at the second week after grafting (Errea et al. 2001). Likewise, differences on the cell wall surface have also been reported in callus cells at the graft union of different species (Barnett and Weatherhead 1988, Jeffrey and Yeoman 1983). The existence of a different protein pattern in incompatible *Prunus* unions could be related to the content and nature of the cells implicated in the first step of graft formation. This could play an important role in triggering the

responses that lead to the formation of a strong and successful union. The fact that the decrease in a 55 kD protein band content occurs at the stock graft interface from the incompatible heterograft *MO/MN* led us to think about the influence of the scion in the stock during the formation of the graft union.

Although cellular abnormalities have been observed in callus cells in herbaceous and woody plants, little is known about the biochemical responses associated to this cellular behaviour (see review by Pina and Errea 2005). Gülen et al. (2005b) found a 63 kD protein band that could be associated with pear/quince graft compatibility/incompatibility, but neither the nature of this protein nor its role has been described so far. Furthermore, Tiedemann and Carsens-Behrens (1994) studied the influence of grafting on the phloem protein pattern in *Cucurbitacea* providing some evidence to the hypothesis of migration of stock proteins into the scion via the connecting phloem of the graft union.

The differences found in the incompatible *Prunus* unions in the protein pattern could be associated with cellular abnormalities previously reported for the same combinations. The nature and the role of this protein is essential to understand its implications in the incompatibility mechanism.

UDP-glucose pyrophosphorylase

The identification of the protein has been carried out by SDS-PAGE and MALDI-TOF combined technique. This combined technique has become increasingly important for proteomics, because this provides high sensitivity for protein and peptide analysis and shows good tolerance toward salts, detergents, and other contaminants in the analyzed samples (Haebel and Kehr 2001, Kehr et al. 1999). It is more reliable than using fingerprints based on PAGE migration patterns. To date, a large number of phloem proteins have been identified using this technique (Walz et al. 2002, 2004). It has made this strategy an ideal tool for the direct analysis of callus proteins in response to the graft reaction, both methods being truly complementary.

This protein has been identified as UGPase. The molecular mass of UGPase was according to values previously obtained for UGPase from leaves of *A.Thaliana* (Ciereszko et al. 2001), barley (Eimert et al. 1996), and potato tubers (Katsube et al. 1990). The UGPase from *P.Pyrifolia* has a putative glycosilation motif at amino acid position 163-165 (NQS); a putative site for phosphorylation at amino acid residue Ser⁴¹⁴, providing sites in which post-translational modifications might take place adding

mass to the predicted polypeptidic chain. Actually, plant UGPases appear to be a suitable candidate for glycosilation due to the presence of a membrane-bound activity (Eimert et al. 1996, Kleczkowski 1994).

UGPases constitute a reversible enzymatic step for interconversions between starch and sucrose metabolites. It is responsible for the synthesis and metabolism of UDP-glucose, the major form of activated sugar and the major glucosyl donor for carbohydrates in higher plants (Kleczkowski et al. 2004). Thus, depending on metabolic/developmental conditions, UGPase can be involved either in the synthesis or degradation of sucrose *in vivo* due to a coupling to other reactions of sugar pathways (Nguyen-Quoc and Foyer 2001), such as SPS, Susy, and invertases. These enzymes are subject to a complex transcriptional regulation, underlying the importance of carbohydrate balance in growth and developmental processes. Some works have revealed a carbohydrate imbalance between scion and stock associated with a possible incompatibility reaction (Breen 1975, Moing et al. 1987).

Previous studies on *in vitro Prunus* combinations have revealed differences between compatible and incompatible combinations related to stain intensity of cellulose (Errea et al. 2001). The formation of interpolymer cross-links, as occurs between cellulose and hemicellulose via H-bonds, is necessary for the binding of juxtaposed cells between the stock and the scion (Fry 1986), and has been observed in projections of callus cells formed during grafting and in culture of Sitka spruce (Miler and Barnett 1993). As the UDP-glucose produced by UGPase can be used in the synthesis of cell wall polysaccharides, the decrease on the expression of the gene could explain the differences observed in the intensity of the cell wall staining between compatible/incompatible unions.

Regarding invertase activity, Rachow-Brandt and Kollmann (1992) presented concrete evidences in graft unions of *Vicia/Vicia* and *Vicia/Helianthus* for a high invertase activity, apoplastic ¹⁴C-label, and monosaccharide content (glucose and fructose) in comparison to graft unions of *Lycopersicon/Solanum* and *Helianthus/Helianthus*. Because of the importance of UGPase in the sucrose metabolism, the differences found at the protein level and mRNA transcripts between both compatible/incompatible combinations might contribute to the carbohydrate imbalance, which occur as a result of incompatibility rather than as the cause of it. Consequently, it can be suggested that this protein could carry out an important task during the graft development in *Prunus* combinations (apricot/plum). Additionally, as

previously suggested, the probability that this protein might be involved in graft process has been reinforced by the observation that the UGPase mRNA transcript was only slightly detected in the stock from an incompatible combination 10 DAG in comparison with compatible unions. Interestingly, the deduced partial amino acid sequence of plum and apricot UGPase was highly identical to that of other plants, such as *Pyrus pyrifolia*, potato, *Arabidopsis*, and barley.

The results presented here demonstrate the identification of a protein which might be related to graft compatibility/incompatibility response, but raise the question about the effect of the UGPase change at the cellular level, the cause of a lower occurrence of mRNA and whether changes in the enzyme amounts are correlated to the enzyme activity in the rootstock from incompatible combinations.

These findings allow the assumption that not only anatomical changes take place during graft formation but also molecular ones that might be involved in generating different behavior between both compatible/incompatible combinations. Despite in this research it has been shown that the main difference in the protein profile is associated to UGPase, it should be also considered that other proteins may change their levels during so complex (in-)compatibility process. Although UGPase might not be the only protein determining the graft incompatibility reaction, the above relationship is certainly intriguing. This work opens a new line of research using the UGPase as a suitable target for transcriptional and traductional regulation under grafting responses. Further experiments should be performed with other heterografts to make clear the contribution of this protein in the graft response and also to make clear whether its transcriptional or post-transcriptional regulation reflects the degree of compatibility between the graft partners.

7. DIFFERENTIAL INDUCTION OF PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE GENE EXPRESSION IN RESPONSE TO IN-VITRO CALLUS UNIONS OF PRUNUS SPP

ABSTRACT.

The phenylalanine ammonia-lyase (PAL) is a key enzyme in the synthesis of phenolic compounds which play a prominent role in graft union formation, including the marked effects of their accumulation in incompatibility response. The purpose of the study was to assess changes in the abundance of PAL mRNA during graft union development 5, 10, 15, 20 days after the establishment of in-vitro callus unions. An apricot cultivar (*P. armeniaca L. cv. Moniqui*) and plum (*Prunus munsoniana x P. cerasifera*) partial cDNA clones encoding the enzyme were isolated from in-vitro callus tissue and the deduced partial aminoacid sequence showed a high homology with PAL gene from other plants species. The induction of the PAL gene expression was examined and an increased level of PAL mRNA was noticed 5 days after grafting in both compatible and incompatible unions. Nevertheless, significant differences have been observed at the transcript level through both kinds of combinations from the second week. The results have showed up that the level of PAL transcription is maintained higher between graft partners of incompatible unions where take place a lack of adaptation of stock and scion, in such a manner that the level of scion-stock compatibility has a strong influence on the PAL expression pattern. In addition, cell walls of the callus cells were not stained by phloroglucinol-HCl indicating that polyphenols adhering to the cell wall are not the precursor to lignin in the callus tissue.

Keywords: flavonoid biosynthesis; graft incompatibility; in-vitro callus union; PAL expression pattern.

Abbreviations: DAG, Days after grafting; PAL, phenylalanine-ammonia lyase; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction.

INTRODUCTION

The phenylpropanoid pathway is certainly one of the most important metabolic pathway that leads to the synthesis of many important secondary metabolites such as lignins, flavanols, and anthocyanins. Products of this metabolic route have been reported to be involved in the response to stressing stimuli, such as wounding and in different mechanisms related to scion-rootstock relations in the early steps of the graft union development. The presence of flavanol related compounds is well known in many *Prunus* species (see review by Errea, 1998, Treutter et al, 1990). Initial studies have reported the accumulation of flavanols under stress situations resulting from grafting (Errea et al, 1994a, Musacchi et al, 2000) and their effect on tissue growth and metabolism. In fact, high levels of Prunin in callus cultures from *Prunus avium* affect the proliferation and differentiation of the cells inhibiting their growth (Feucht et al, 1988). Furthermore, it has been seen that the special grafting stress triggers the accumulation of some phenolic compounds above incompatible graft unions of cherry trees (Treutter and Feucht, 1991) which are experimentally known to limit auxin transport that can then affect to the induction of vascular and cell differentiation (Mattson et al, 2003; Sachs, 1981). These results suggested that the failure of vascular differentiation in incompatible graft systems might also be affected by the flavan content (Wang and Kollmann, 1996); acting oxidated molecules as toxic substances in the normal process of lignification at the junction scion-stock after a long time of the continuous stress (Errea, 1998).

A possible fate for the phenolic compounds may be their involvement in lignin synthesis and the strengthening of the cell wall. Thus, these compounds play a role in lignification which occurs in graft union formation (Hartmann et al, 2000). It has been postulated that the lignification of the cell wall could be the main event leading to the formation of a solid union, resulting in a compatible graft. In compatible pear-quince graft combinations, the amount of lignin in the cell walls at the graft union is comparable to adjacent cells outside the union. By contrast, adjoining cell walls in the graft union of incompatible combinations contain non lignin, and are interlocked by cellulose fibers.

In addition, in incompatible unions apricot/plum grafts, a large portion of the callus never differentiates and the union formed is mechanically weak (Errea et al, 1994b).

Likewise, it has been reported that mechanical wounding induces an increase in the synthesis and activity of PAL and other enzymes involved in phenylpropanoid metabolism such as polyphenol oxidases (PPO) and peroxidases (POD). It is widely known that genes encoding enzymes of this pathway are developmentally and tissue-specifically regulated and may be induced by environmental stresses such as nutrient deficiency, prolonged cold, exposure to intense UV light, and pathogen attack (for review see Anterola and Lewis, 2002). The first step towards the phenylpropanoid pathway is catalyzed by the enzyme L-phenylalanine ammonia lyase (PAL) that converts phenylalanine into trans-cinnamic acid. This is generally recognized as a marker of environmental stress in different plant species as well as a potential site for pathway regulation; during the development associated with the synthesis of flavanoid compounds and during xylogenesis with the cell wall polymer lignin (Sanchez-Ballesta et al, 2000; Rogers and Campbell, 2004). Several lines of evidences suggest that a reduced PAL activity is directly correlated with a lower levels of phenylpropanoid products in transgenic tobacco plants whereas gene expression and enzyme induction is correlated with phenylpropanoid accumulation (Elkind et al, 1990; Bate et al, 1994; Boudet et al, 2003). In this sense it could be hypothesized that the level of PAL transcription will be highest in this tissues where a lack of adaptation of stock and scion is produced to form a union, with the subsequent phenol accumulation.

Up to date, we have little understanding about the molecular events that occurs during graft formation in relation to the phenolic metabolism. Experiments reported in this study were done to analyse the effect of grafting on the phenylalanine-ammonia lyase pattern expression from in-vitro callus union established several days after the union. Since PAL expression is the entry-point in the phenylpropanoid pathway and it is involved in the regulation of phenolic biosynthesis, this study could contribute to a better knowledge of the biochemical graft process for an early detection of incompatibility reaction in fruit tree.

MATERIAL AND METHODS.

Plant material and union establishment

Callus tissue from apricot (*Prunus armeniaca L.*) cv. 'Moniqui' (MO) and 'Marianna 2624' an plum hybrid rootstock (*P. cerasifera x P. munsoniana*) (MN), were used to establish compatible (homografts, *MN / MN and MO / MO*) and incompatible (heterograft, *MO / MN*) grafting combinations. Callus tissue was obtained according to

Errea et al (2001). Tissue cultures were maintained in a growth chamber at constant temperature (22 ± 2 °C) and 16-h photoperiod cycle. Light was provided by cool white fluorescent tubes, $17\text{-}\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Callus tissue was subcultured every month.

The graft combinations were established by placing two callus pieces upright on the agar layer under sterile conditions in the same culture medium and conditions as used for callus initiation. The compatible/incompatible combinations were sampled 5, 10, 15, 20 DAG. Ungrafted genotypes served as control.

RNA extraction and amplification of poly (A) RNA by PCR.

For RNA extraction the two components in the callus unions were detached and frozen at -80°C . All solutions were prepared using water treated with diethylpircarbonate (DEPC) to inactivate ribonucleases. Total RNA was extracted from various unions by using the method of Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. RNA was isolated from callus tissue of homografts and heterograft 5, 10, 15, 20-day old unions, and from ungrafted *Moniqui* and *Marianna* control plants. Using $1\mu\text{g}$ mRNA, RT-PCR reactions were performed. Reverse transcription with total RNA from callus tissue was carried out using poly(dT) primer and Protoscript First Strand cDNA Synthesis kit (New England Biolabs) according to the manufacturer's instructions. Based on the amino acid sequence of PAL *Prunus Persica* available in Gen Bank (accession number AF206634) a sense degenerated oligonucleotide primer was synthesized $5'\text{-AGAGGGAGATCRACTCAG-}3'$. The downstream primer was also designed and synthesized on the basis of that sequence as $5'\text{-CCCAAYTCYTCCCTCAC-}3'$. For partial c-DNA amplification, the amplification program consisted of an initial denaturation at 94°C for 3 min, followed by 34 cycles at 94°C for 45 s; 52°C for 1 min, 72°C for 1.30 min; and a final extension of 72°C for 10 min. RT-PCR products corresponding in size to the cDNA products were absent in control samples lacking RT (data not shown). Control reactions were performed using the 5' primer ($5'\text{-CTTTAATGTGCCTGCCATG-}3'$) and 3' primer ($5'\text{-TGATGGAGTTGTAGGTAGTC-}3'$) designed from the sequence of *P. Persica* actin cDNA (Gene bank accession number AB046952). The RT-PCR results shown are from one experiment that was repeated at least three times with similar results.

Cloning and sequencing of cDNA.

The amplified RT-PCR products were electrophoresed in 1% agarose gel electrophoresis, and the band of the expected size was isolated and subcloned into p-GEM T easy vector (Promega, Madison, WI, USA). Positive clones were sequenced by the DNA sequencing service, CIB-CSIC (Madrid, Spain). For homology search, cDNA sequences were compared to the NCBI database using the BLAST software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/T>). Sequence data from this article have been deposited at the GenBank under accession numbers EF031063 (MoPAL) and EF031064 (MnPAL).

Sequence data analysis.

Nucleotide and deduced protein sequences were analyzed using the ExPasy software (<http://www.expasy.org/>). Homologous sequences to the Prunus-PAL were identified by BLAST at the NCBI web site and were aligned with other species using the CLUSTAL W (ver1.83) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Phylogenetic relationships among sequences were conducted with MEGA version 3.1 (Kumar, Tamura, Nei 2004) using the maximum parsimony method. The accession numbers of the PAL sequences used to construct the phylogenetic tree are: *Moniqui* (EF031063); *Marianna2624* (EF031064); *P. persica* (AF206634), *P. avium* (AF036948), *Pyrus* (DQ901399); *Raspberry* (AF237954, AF237955); *Arabidopsis PAL* (P35510, P45724, P45725 and AY303130); *Solanum tuberosum* (P31425, P31426); *Citrus limon* (Q42667, AJ238753, AJ238753); *Lycopersicon* (P35511, P26600); *Nicotiana* (P25872, P35513, P45733), *Populus kitakamiensis* (P45731, P45730, Q43052); *Pisum sativum* (Q01861, Q04593); *Oryza* (P14717, P53443) and *Zea mays* (AAL40137). The gymnosperm PAL sequence from *Pinus taeda* (accession no. P52577) was selected as the outgroup because gymnosperms are considered on the basis of both morphological characters and 18S RNA sequences (Chaw et al, 1997) to be ancestral to the angiosperm. To test the reliability of the tree a bootstraps analysis with 1000 replications was performed.

Histochemical assay.

To investigate the presence or lacking of lignin in the detached unions at different sampling dates the two graft partners from both compatible/incompatible unions were visualized using phloroglucionol/HCl (Weisner reaction, Gahan, 1984), where phloroglucionol in acidic conditions gives a red-pink product primarily by

reaction with the lignin cinnamaldehyde groups. Both graft partners were incubated for 3 min in 10% phloroglucinol (w/v) in 100% ethanol solution followed by incubation in HCl_{conc} and mounted in 50% glycerol. Squash sections were prepared following the same procedure and directly examined under a microscopy (Leica, Wetzlar, Germany) equipped with a digital imaging system through a CD300 camera (Leica mycosystems). Five replicates at the different time point were tested.

As positive control we used the hand-made stem sections from ungrafted Marianna 2624 stained with phloroglucinol (PH). These sections showed the xylem stained in pink. In addition, a stem as negative control treated only with PH but not with HCl showed an unstained pattern. The primary cell wall from ungrafted calli also served as a negative control.

In addition, developing callus unions at different sampling dates after grafting were detached and the two components in the graft were fixed in FAA (formalin-acetic acid-ethanol), dehydrated through a serie of graded ethanol – TBA (Tertiary-Butyl Alcohol) series (70, 85, 95 and 100%) and embedded in paraffin (Leica histowax) at 60°C (Johansen, 1940). The fixed samples were sectioned longitudinally with a rotatory microtome (Mod.1130/Biocut (Reichert-Jung, Germany, Heidelberg) at a thickness of 8 μm . After that, the sections were desparaffinized in xylene, rehydrated in a ethanol series for 2 min (100, 70 and 40%) and washed in distilled water. Unstained embedded sections of the specimens were examined for autofluorescence of phenolic compounds and viewed under a Leitz Ortholux II fluorescence microscope (Leitz, Wetzlar, Germany) with epifluorescence using a BP355-425 excited filter and a LP466 barrier filter. Images were captured from these sections with the Ortholux microscope equipped with a Leica DC300 camera.

RESULTS

The present work was performed as a step towards understanding in more detail throughout the early biochemical response of graft unions. Total RNA prepared from in-vitro callus unions was analyzed by RT-PCR in order to investigate the pattern of PAL gene expression in response to compatible and incompatible unions and to learn whether the accumulation of transcripts is linked to phenolic occurrence.

Isolation and identification of cDNA clone.

Partial PAL cDNA fragments induced in homografts from the apricot cultivar *Moniqui* and the plum rootstock *Marianna 2624* were cloned and their basic expression

profiles were analyzed during the first three weeks after the union. The RT-PCR product as a single band was in good agreement with the predicted size for the expected fragment; according to the degenerated primers designed from the PAL *Prunus Persica* sequence (accession number AF206634) and its identity was confirmed by sequencing. The cDNA fragments from MN and MO were identified based on nucleotide similarity as a PAL sequence that shared 98% and 81% sequence identity respectively, with a PAL previously isolated from *P. persica*.

Based on the amino acid sequences obtained from the partial cDNA clones, the partial amino acid sequences were compared with the available genomic sequences from the Gen Bank. It was noticed that there was a high homology with other characterized PAL genes; especially within the Rosaceae family (Fig. 7.1). The deduced amino acid sequences of MnPAL and MoPAL are 87% amino identical to each other, and represent part of the exon II region. The nucleotide sequence identity within the approximately 870-bp region was 80%. Whereas the partial amino acid sequence of MN is 98% identical to PAL from *P. persica* (AF206634); 92% identical to *Pyrus*; 87% identical to *P. avium* and 87% identical to the *Raspberry* RiPAL2 (AF237955); the MoPAL sequence shared a extensive identity with *P. avium* (98%) and with RiPAL2 (92%), and lowest sequence identity with PAL from *P. persica* (88%) and *Pyrus* (86%).

The comparison of the deduced amino acid sequences between MnPAL and MoPAL and the PAL gene family members from other species, revealed that the two sequences were more closely related to predicted amino acid sequences of PAL genes isolated from dicot plants species (between 80-98% identity) than those from monocot plants (share only 67%, 74% amino acid sequence identity), as expected.

To study the evolutionary relationship among PAL genes, sequences of a set of PAL gene family members from other plant species available in the Gen Bank database, including Mn and Mo, were analyzed using the maximum parsimony method. The phylogenetic tree had several interesting features with high bootstrap values placing dicot and monocot PALs in separated groups. Notably, the plant PALs have been subdivided into families, as do PAL gene family members characterized from *N. tabacum* and *Lycopersicon esculentum*. Among the dicot PALs, MoPAL and MnPAL formed a distinct subgroup. Whereas *Moniquei* strongly clustered with the cherry PAL sequence and raspberry RiPAL2, the only full-length PAL genes characterized from a Rosaceae species; *Marianna* cluster together with the partial amino acid PAL sequence

Capítulo 7

from *P. Persica*, *Pyrus* and *RiPAL1* (*Rubus PAL1*). Thus, the two amino acid sequences are more similar to other dicot PAL amino acid sequences (Fig. 7.2).

MN2624	22	GGNFQGTPIGVAMDNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLTGS	71
<i>P. persica</i>	84	GGNFQGTPIGVAMDNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLTGS	133
<i>Pyrus</i>	1	GGNFQGTPIGVAMDNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLTAS	50
<i>Moniqui</i>	22	GGNFQGTPIGVAMDNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSSG	71
<i>P. avium</i>	398	GGNFQGTPIGVAMDNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSSG	447
<i>Rubus</i>	411	GGNFQGTPIGVAMDNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSSG	460

MN2624	72	SNPSLDYGFGKAEIAMASYCSELQFLGNPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLI	121
<i>P. persica</i>	134	SNPSLDYGFGKAEIAMASYCSELQFLGNPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLI	183
<i>Pyrus</i>	51	SNPSLDYGFGKAEIAMASYCSELQFLGNPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLI	100
<i>Moniqui</i>	72	RNPNDYGFYKAEIAMASYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLI	121
<i>P. avium</i>	448	RNPNDYGFYKAEIAMASYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLI	497
<i>Rubus</i>	461	RDPSLDYGFGKAEIAMASYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLI	510
		* *****	
MN2624	122	SSRKTAEAVDILKLMSSSTYLVALCQAVDLRHLEENLKSTVKSTVSQVAKR	171
<i>P. persica</i>	184	SSRKTAEAVDVLKLMSSSTYLVALCQAVDLRHLEENLKSTVKSTVSQVAKR	233
<i>Pyrus</i>	101	SSRKTTEAVDILKLMSSSTFLVALCQAIDLRHLEENLKSTVKTTVSQVAKR	150
<i>Moniqui</i>	122	SSRKTAEAVDILKLMSSSTFLVALCQAIDLRHLEENLRNTVKNTVSQVAKR	171
<i>P. avium</i>	498	SSRKTAEAVDILKLMSSSTFLVALCQAIDLRHLEENLRNTVKNTVSQVAKR	547
<i>Rubus</i>	511	SSRKTAEAVDILKLMSSSTFLVALCQAIDLRHLEENLKSTVKNTVSQVAKR	560

MN2624	172	VLTGVGFNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREYVFAYVDDPCSATYPLMQKLRHV	221
<i>P. persica</i>	234	VLTGVGFNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREYVFAYIDDDPCSATYPLMQKLRHV	283
<i>Pyrus</i>	151	VLTGVGFNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREYVFAYIDDDPCSATYPLMQKLRHV	200
<i>Moniqui</i>	172	TLTTGVNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREYVFAYIDDDPCSATYPLMQKLRQV	221
<i>P. avium</i>	548	TLTTGVNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREYVFAYIDDDPCSATYPLMQKLRQV	597
<i>Rubus</i>	561	VLTGVNGELHPSRFCEKDLLMVEREYLFAYIDDDPCSATYPLMQRLRQV	610
		** * ** ***** * * * * *	
MN2624	222	LVEHALNNGEKEKSSSTSIFQKITAFEEELKTLKPKEVESARLEYDNGKS	271
<i>P. persica</i>	284	LVEHALNNGEKEKSSSTSIFQKITAFEEELKTLKPKEVESARLEYDNGKS	333
<i>Pyrus</i>	201	LVEHALSNGDKERSTSTSIFQKIATFEEELKTLKPKEVETTRAHEYNGKT	250
<i>Moniqui</i>	222	LVEHALTNGENEKNASTSIFQKITAFEEELKTLKPKEVDSARAALDSGSA	271
<i>P. avium</i>	598	LVEHALTNGENEKNASTSIFQKITAFEEELKTLKPKEVDSARAALDSGSA	647
<i>Rubus</i>	611	LVEHALTNGENEKNASTSIFQKITAFEEELKTILPKEVESARAAYESGNA	660
		***** * * * * *	
MN2624	272	ATPNRIKDCRSYPLYKFVR	290
<i>P. persica</i>	334	ATPNRIKDCRSYPLYKFVR	352
<i>Pyrus</i>	251	AIPNRIKECRSYPLYKFVR	269
<i>Moniqui</i>	272	GVPNRITECRSYPLYKFVR	290
<i>P. avium</i>	648	GVPNRITECRSYPLYKFVR	666
<i>Rubus</i>	661	AIPNRIVECRSYPLYKFVR	679
		**** *****	

Figure 7.1. Comparison of deduced amino acid sequences of PAL within the Rosaceae family by Clustal-W multialignment. Accession numbers: Marianna2624 (EF031064), Moniqui (EF031063), *P. persica* (AF206634), *P. avium* (AF036948); *Pyrus* (DQ901399); *Rubus PAL2* (AF237955) Identical aminoacid residues among the different PALs are indicated by an asterisk.

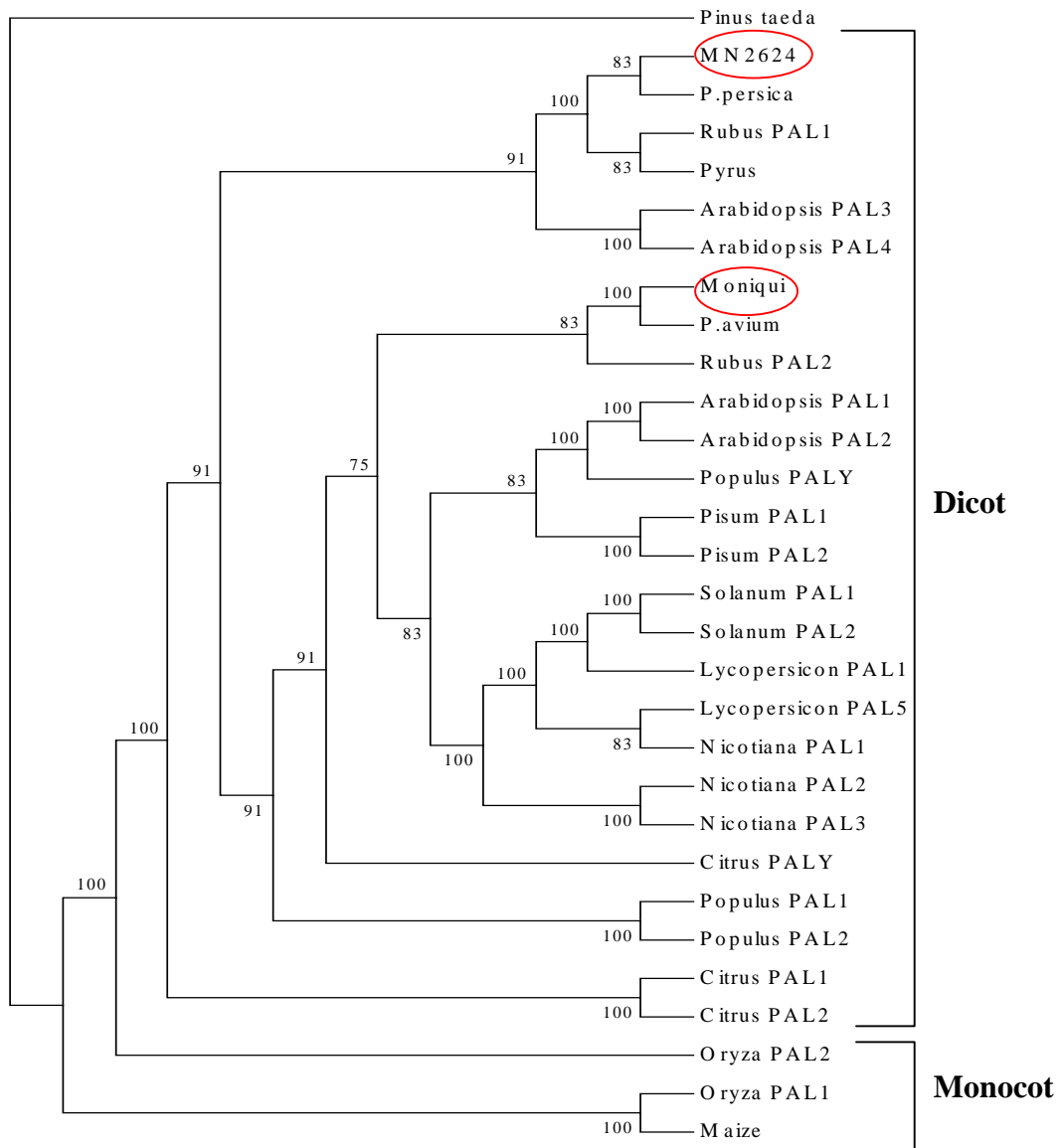


Figure 7.2. A phylogenetic tree showing the relationships among PALs. The partial aminoacid sequences were aligned and the phylogenetic tree was constructed using the program MEGA version 3.1. Bootstrap values (based on 1000 replicates) are shown. Accession numbers are described in material and methods. The *P. taeda* PAL sequence (accession no. P52577) was used to root the tree.

Changes in PAL gene expression in in-vitro callus unions.

To examine the effect of grafting on PAL transcripts in function to different level of scion-stock compatibility, equal amounts of total RNA from homografts and heterografts during three weeks were subjected to RT-PCR. In both compatible and incompatible combinations the induction of PAL mRNA was detected as soon as 5DAG. Nonetheless, basal levels of PAL expression were not detected in the ungrafted control, being the level of PAL transcript present barely detectable in this kind of tissue (Fig. 7.3.a). By 10 day-old compatible combinations it has been observed a slight transcript level in the union MN/MN whereas the transcript was strongly accumulated in the homograft MO/MO at the same day. By contrast maintaining the compatible unions at latter days (15, 20) induced a slow and even undetectable accumulation of the PAL transcript in comparison to both graft partners in the incompatible heterograft (MO/MN) (Fig. 7.3.b). Thus, PAL mRNA persist clearly only in tissue from incompatible callus unions MO/MN during the three weeks after the union. Moreover, it was noticed that the PAL mRNA accumulation varied in the incompatible combination MO/MN during the course time of the union with the maximum by day 20. These results demonstrate that PAL is expressed in both compatible/incompatible unions at 5 days after the establishment of the union and that the degree of compatibility had a clear effect on transcript accumulation from the second week.

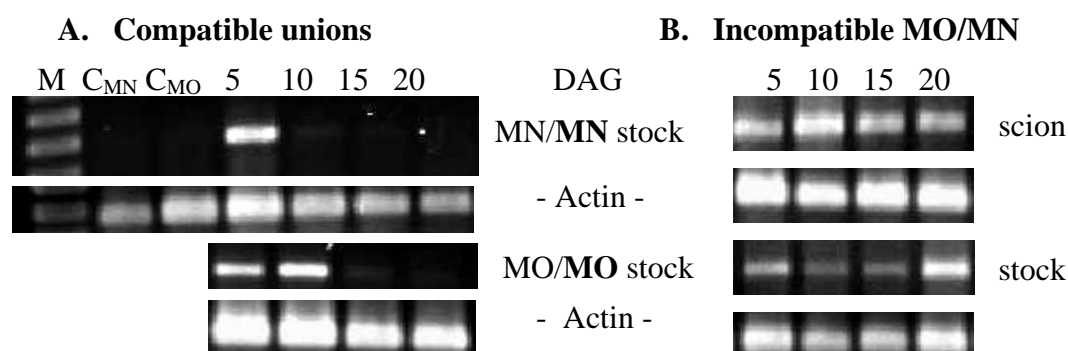


Figure 7.3. PAL mRNA profile analyzed by RT-PCR from compatible and incompatible unions. **A.** PAL transcript levels in the ungrafted control from the plum rootstock Marianna 2624 and the apricot cultivar Moniqui. It can be noticed the PAL gene expression in the compatible homografts MN/MN and MO/MO 5, 10, 15 and 20 days after the establishment of the union (DAG). It has also been shown the actin control at the same sampling days. **B.** Differential PAL expression in the scion of the incompatible union MO/MN and in the stock MO/MN at 5, 10, 15, 20 day-old unions.

On the other hand, when these *in vitro* callus unions were stained with phloroglucinol, a specific staining for lignin detection, no differences were detected between both compatible and incompatible combinations during the course time of the experiment. No reaction was detected in the negative control whereas staining was localized as a pink colour in the xylem of ungrafted stem positive control (Fig. 6.4.a). Likewise, the external observations indicated that not lignification was induced in both graft partners of compatible/incompatible unions during the three weeks after grafting (Fig. 7.4.b). Squash specimens were prepared to look into in more detail but not lignifying cells were found neither in incompatible (Fig. 7.4.c) nor in compatible unions (Fig. 7.4.d-e). In addition, it was observed yellow autofluorescence which was located in the cell wall from both compatible incompatible unions from the first week (Fig. 7.4.f), which is emphasized to be due to wall bound phenols. A brighter autofluorescence have been visualized in cell layers adjacent to the graft interface in the incompatible combinations regarding to the compatible ones from the first to subsequent weeks in agreement with the PAL expression (Fig. 4.g-i). These results suggest that the phenylpropanoid pathway is addressed in this kind of tissue to the phenolic compound shynthesis (Fig. 7.5). Further, it has also been seen a higher phenolic compounds accumulation in the cell wall and intarcellular deposits in the vacuole from callus cells during the course time of grafting in incompatible stem unions regarding to the compatible one (data not shown).

DISCUSSION

The phenylpropanoid pathway is a metabolic route that leads to the synthesis of thousands of plant natural products such as flavonoids and lignin. The present work has demonstrated the existence of changes in the PAL gene expression pattern in response to *in-vitro* callus unions of different degree of compatibility.

PAL is a gene family ubiquitous among higher plants and genes encoding this protein are already known for several plant species (Kumar and Ellis, 2001). Generation of transgenic plants with altered levels of the enzyme PAL have allowed a direct evaluation of the impact of specific perturbation in PAL levels on phenylpropanoid accumulation. In this sense, severe and small supression of PAL activity in tobacco transgenic plants resulted in drastically reduced product accumulation (Bate et al, 1994), whereas an increased PAL activity enhaced high levels of phenylpropanoid products

(Liu et al, 2006). These results indicated that PAL is a key step in the regulation of overall flux into flavonoid biosynthesis.

During the evolution of PAL genes it seems to be that the gen duplication events have been an important theme (Kumar and Ellis, 2001; Kao et al, 2002). Wanner et al (1995) have proposed that the *A. thaliana* PAL 3 sequence may be more closely related to an ancestral gene present prior to the divergence of monocots and dicots, that is considered to have taken place between 200 and 100 million years ago. Events that occurred later in the evolution of angiosperms resulted in PAL genes within a single species that cluster together, rather than with PAL genes from other species. Because the *Marianna2624*, *P. Persica* and *Pyrus* sequences cluster together in the phylogeny, they may have evolved to encode the same PAL isoform that could play the same metabolic roles. Since they both are closely phylogenetically they could be regulated by the same developmental control mechanisms. It would be the same case between *Moniqui* and *P. avium*. Nonetheless, it is not known whether our PAL fragments represented the same gene isolated from *Marianna* and *Moniqui* within the gene PAL family. In the phylogenetic tree it could also be observed according with other studies that frequently PAL genes cluster into families.

The pattern of PAL gene expression have shown up that the basal level for control non-grafted tissue are undetectable, whereas grafting induced a significant increase in the PAL expression five days after grafting both in compatible and incompatible unions. These high transcript levels could be explained due to the wound-induced response inherent to the graft development. Given the necessity of PAL activity in wounding response it must be active at least in the first step of grafting. Many studies have supported that physical wounding triggers a pronounced change in both PAL mRNA and activity in different plant species (Macheix et al, 1986, Diallinas and Kanellis, 1994; Campos-Vargas et al, 2005). Likewise, the beginning of the most dramatic rise in PAL mRNA was coincident with the detection of the first symptoms of grafting phenolic accumulation within the cell wall and in the vacuoles from callus cells (Errea et al, 2001). The accumulation of phenolic compounds has also been reported in incompatible grafts several years after grafting (Salvatierra et al, 1999).

The transient low or non induction of the PAL gene expression from 5 days to the latter on from the compatible union MN/MN could be part of a rapid adaptive response of the tissue to the compatible graft partners. Interestingly, a rapid and sustained accumulation of PAL transcript occurred throughout the three weeks of

duration of the experiment in the incompatible unions, despite any external symptoms of incompatibility were obvious. This suggest that PAL in these unions may be taking part of the mechanism that allows the cells to adapt to the new grafting conditions, since the higher is the incompatibility degree the most stress is influencing the graft partners which is then reflected in the PAL transcript abundance. Because of the qualitative differences in the PAL expression profile due to the compatibility degree, it could be assumed that this enzyme might be responsible for bad union formation between the graft partners during the initial stages. In the same manner, a lack of adaptation of the two graft partners trigger accumulation of flavanols in graft systems (Errea, 1998; Treutter and Feucht, 1991). To determinate of the exact role played by the PAL in supporting accumulation of specific phenylpropanoid products in grafts would require detailed metabolite profiling.

The histochemical analysis carried out to analysis whether there was lignin synthesis in the distinct combinations showed not positive reaction throughout the assay. Despite that the union assemblage between the cells of the rootstock and scion took place, the differentiation of the parenchymatous cells to xylem vessels was not observed with the weisner reaction which detect hydroxycinnamyl aldehyde units contained in lignin that are assembled during the early stages of xylem cell wall lignification. Thus, the induction of PAL mRNA is due to the flavonoid synthesis and not to the monolignol production in the xylem (for review see Anterola and Lewis, 2000; Rogers and Campbell, 2004). Likewise, the induction of PAL expression by the effect of the T^a were ruled out by providing always the same range experimental temperature conditions and a maintained photoperiod regime (Sanchez-Ballesta et al, 2000; Campos-Vargas et al, 2005). In spite of this progress, a great deal remains to be learned about the precise mechanism and how other genes in the phenylpropanoide pathway are coordinated during graft union development. Currently, there is any information on changes in PAL gene expression induced by grafting, and this work provides the first reported evidence that PAL genes are transcriptionally activated by grafting in callus unions during the first phases of grafting union development. The characterization of the PAL gene, in addition to the phenylpropanoid genes downstream from PAL, will be of value in improving our understanding of the functioning of this metabolic in the response to grafting.

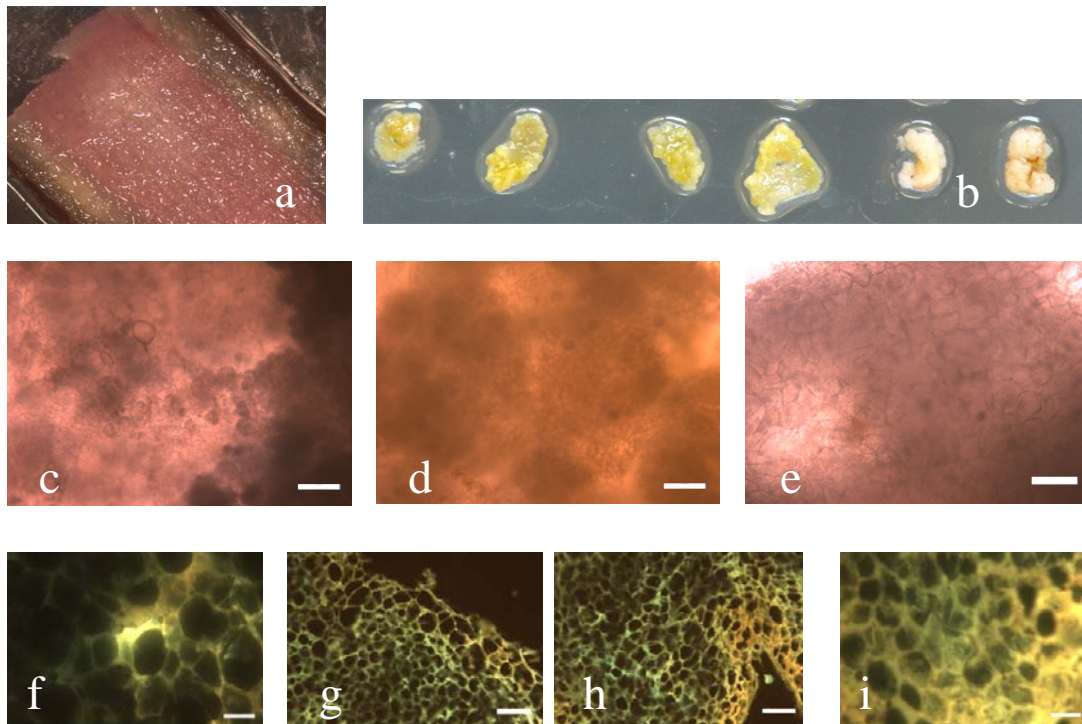


Figure 7.4. Response to phloroglucinol-HCl staining and autofluorescence from in-vitro callus unions. **a)** Positive reaction in the xylem of ungrafted stem positive control. **b)** stock from the homograft MN/MN at 15, 20 DAG; incompatible union MO/MN 15, 20 DAG, compatible union MO/MO at 15, 20 DAG showing negative weisner reaction. **c-e)** Bright field light microscopy of squash preparations of detached callus unions stained with phloroglucinol-HCl showing absence of lignin deposition. **c-d)** stock from 15 day-old incompatible and compatible unions respectively. Bar= 100µm. **e)** inset d in more detail. Bar= 50 µm **f)** Autofluorescence from callus cells at the graft interface of a 5 day-old incompatible union due to wall bound phenols. Bar= 20 µm. **g-i)** Differences in the intensity of autofluorescence have been observed in cell walls at the graft interface between compatible and incompatible unions, respectively, 10 DAG. Bar= 50 µm. **i)** detail of fig 4-h inset. Bar= 20 µm.

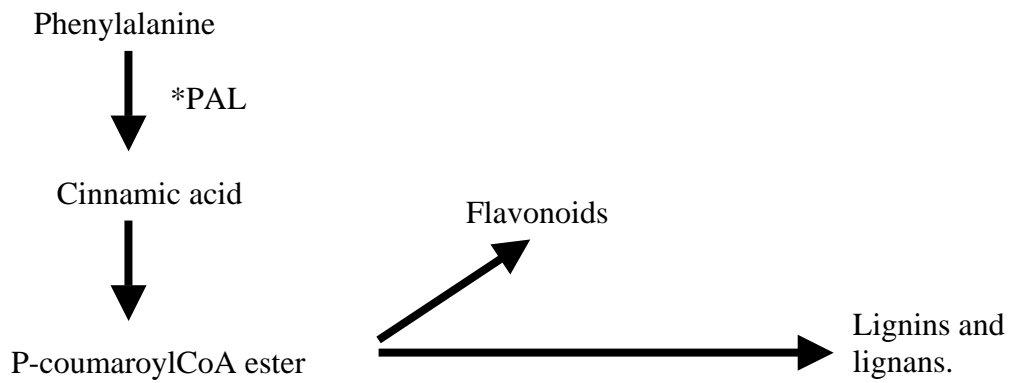


Figure 7.5. Phenylpropanoid metabolism in vascular plants. The enzyme phenylalanine ammonia lyase (PAL) catalyzes the first step and converts phenylalanine into trans-cinnamic acid. The pathway is addressed to the synthesis of flavonoid products during in-vitro callus union development.

8. DISCUSIÓN GENERAL.

En los programas de selección de nuevos patrones y variedades, el estudio de la compatibilidad de injerto con las variedades de mayor interés comercial es un criterio de selección indispensable, sin embargo los estudios tradicionales sobre la compatibilidad de injerto han abordado el problema una vez que éste se ha producido, y con frecuencia esta manifestación ocurre tras varios años de crecimiento normal en vivero, lo que hace que los estudios de determinación de la incompatibilidad, aunque son abundantes y fiables, puedan demorarse varios años hasta obtener la respuesta correspondiente. Es por ello que el trabajo realizado en esta tesis doctoral se ha centrado en la búsqueda y aplicación de otros estudios que puedan llegar a la detección de este problema en una fase más temprana.

Los resultados presentados en este trabajo resaltan la importancia de diferentes factores fisiológicos y bioquímicos que contribuyen a explicar los mecanismos por los cuales se desencadena un comportamiento incompatible patrón-variedad. Estos factores se centran en primer lugar en la fisiología del desarrollo del injerto en una fase temprana, seguido del estudio más en profundidad de los factores que afectan a la respuesta celular, para, una vez conocidos los estados iniciales del desarrollo, profundizar en los mecanismos bioquímicos que contribuyen a desencadenar estos procesos.

Mecanismos fisiológicos que actúan en la formación de la unión.

El trabajo se inició con una evaluación del desarrollo de la unión mediante la observación de injertos realizados en invernadero, donde se pudo comprobar la secuencia de sucesos que tiene lugar en las primeras fases del desarrollo. Coincidiendo con estudios previos, las observaciones internas de la unión mostraron que como primera respuesta al injerto todas las combinaciones desarrollaban masas de callo tanto desde el patrón como desde la variedad, en reacción a la herida provocada en el mecanismo de injerto (Ermel et al, 1997; Errea et al, 1994a; Moore y Walker, 1991). Sin embargo, y tal como ya han apuntado otros autores, es la evolución de este callo y como tiene lugar su desarrollo hasta una conexión vascular lo que nos ha permitido establecer diferencias entre las combinaciones compatibles e incompatibles. Las primeras evaluaciones se centraron fundamentalmente en el nuevo cambium formado desde el callo y su diferenciación hacia conexiones vasculares, y se observaron

Discusión general

diferencias en la respuesta de las células de nuevo cambium a la presencia de pectinas mediante la tinción de rojo de rutenio, mostrando una menor afinidad a la tinción zonas aisladas de las uniones incompatibles a partir de la segunda semana. Estas observaciones se asociaron a una diferente actividad meristemática del nuevo cambium entre combinaciones compatibles e incompatibles, lo que podría derivar a su vez en una menor formación de conexiones vasculares patrón-variedad en uniones incompatibles. Estudios realizados en otras especies muestran una correlación entre contenido péctico de la pared celular del cambium y la tendencia hacia la formación de nuevos elementos vasculares (Ermel et al, 2000). Por tanto, las células del nuevo cambium pueden diferenciar hacia nuevas conexiones o cesar su actividad respondiendo de distinta manera a la tinción. En base a estos resultados, podría cuestionarse si efectivamente, las diferencias a nivel de polisacárido péctico estarían relacionadas con la ruta de síntesis de las pectinas. La interpretación de los resultados de metilación observados en nuestro material vegetal se hizo en relación a los procesos de formación de las nuevas conexiones vasculares (Ermel et al, 2000; Sadvidge et al, 2000), de tal forma que en uniones que presentan el mismo tiempo de desarrollo del injerto las conexiones vasculares estarían completamente formadas en compatibles lo que se traduce en un menor grado de metilación, mientras que en incompatibles estas conexiones estarían en un estado de formación menos desarrollado por lo que muestran un mayor grado de metilación.

Por otra parte, los resultados del análisis de viabilidad celular se interpretaron en función de los tres estados fisiológicos de desarrollo del injerto. Un reducido número de células de callo perdieron la integridad de su membrana celular a consecuencia de la respuesta a la herida durante la primera semana que sigue a la realización del injerto. El seguimiento de la tendencia de la viabilidad durante las semanas posteriores puso de manifiesto una menor viabilidad celular en aquellas áreas de tejido parenquimatoso que no diferenciaba hacia nuevos elementos vasculares en uniones incompatibles, apareciendo las diferencias más significativas entre la 3 y 4 semanas después del establecimiento del injerto. A su vez, el efecto más pronunciado de pérdida de viabilidad fue observado en la variedad.

Posteriormente el estudio se centró en la respuesta de las células de callo mediante la aplicación de técnicas de cultivo in-vitro. Estas técnicas han sido ampliamente desarrolladas en el estudio de la respuesta al injerto especialmente en plantas herbáceas, ya que permitían obviar los inconvenientes derivados de las

condiciones climáticas, el efecto del estado de la yema en el momento del injerto y la época del injerto (Hartmann y Kester, 2002, Schoning and Kollmann, 1997; Richardson et al 1996). En este trabajo, el examen histoquímico de las uniones in-vitro revelaron que, aunque el desarrollo celular de las células de callo muestra una disposición desorganizada en ambos tipos de combinaciones y ambos sistemas utilizados durante la primera semana de observaciones, las diferencias fueron muy apreciables durante la segunda semana. En este tiempo, tanto el crecimiento celular como el aspecto de la pared celular era diferente entre combinaciones compatibles e incompatibles. Asimismo, y al igual que se observó en los injertos de invernadero con el nuevo cambium, se detectaron diferencias en la respuesta de las células de callo a la tinción de rojo de rutenio, siendo mas abundante la respuesta en uniones compatibles que incompatibles. Estos resultados podrían interpretarse como una mayor presencia de polisacáridos pécticos en la pared celular de células desarrolladas, los cuales ayudarían a una mejor cohesión entre células adyacentes. La presencia de proyecciones en la pared celular durante la formación del injerto formadas entre otros compuestos por pectinas ha sido descrita por varios autores en plantas herbáceas (Jeffree and Yeoman, 1983, Miller and Barnett, 1993); sugiriendo que estas sustancias desempeñarían un papel importante como moléculas de adhesión patrón-variedad y de reconocimiento celular. Por otro lado, la aplicación de diversas tinciones a estas combinaciones desarrolladas in vitro, ha permitido el conocimiento de diversos compuestos asociados con las primeras respuestas celulares a la unión. Se observó un alto contenido de depósitos intercelulares asociados en gran parte a compuestos fenólicos presentes en las combinaciones incompatibles fundamentalmente a las 2 semanas después de establecida la unión, momento en el que tienen lugar los procesos de diferenciación celular. Estas acumulaciones afectan al metabolismo de las células, estando directamente relacionados con los procesos de diferenciación y posterior lignificación en la formación de la unión.

Permeabilidad plasmodesmal

Una de las líneas de investigación llevadas a cabo en esta tesis fue el estudio de plasmodesmos. Estas estructuras dinámicas constituyen una ruta de comunicación celular simplástica entre células adyacentes y permiten la difusión de pequeñas moléculas solubles, lípidos y el intercambio de macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos. A pesar de que la mayoría de averiguaciones sobre la arquitectura plasmodesmal han sido adquiridas por investigaciones realizadas mediante

Discusión general

experimentos de microinyección (Ding et al 1999, 1992; Itaya et al, 2002), algunos autores han presentado evidencias en los últimos años sobre el uso de fluorocromos fotoactivables en el estudio plasmodesmal (Martens et al, 2004). La utilización de estas sondas fluorescentes fotoactivables se está consolidando como uno de los métodos no invasivos para llevar a cabo estudios sobre conectividad plasmodesmal

En este trabajo se ha realizado por primera vez en plantas leñosas un estudio de permeabilidad plasmodesmal en el género *Prunus*. Por una parte se validó la técnica de fotoactivación mediante el uso del marcador simplástico (*caged fluorescein*) en cultivos de callo in-vitro del ciruelo 'Mariana2624' y se corroboró la existencia de plasmodesmos funcionales mediante experimentos del tipo FRAP en esta especie del género *Prunus*.

Del análisis de medida del límite de exclusión molecular (SEL), se deduce que el diámetro útil del canal en la variedad exigente 'Moniqui', es menor que en el patrón 'Mariana2624' lo que podría afectar al intercambio intercelular de nutrientes y macromoléculas entre las dos partes del injerto. Cuando las células cooperan estrechamente se produce la formación secundaria de plasmodesmos continuos. Sin embargo, células que no cooperan fisiológicamente forman plasmodesmos discontinuos y medios en la superficie de heteroinjertos incompatibles (Kollmann et al, 1985, Kollmann and Glockmann, 1991; Ehlers y Kollmann, 2001). En este sentido, la comparación del transporte plasmodesmal entre las uniones compatibles e incompatibles puso de manifiesto una menor conductividad plasmodesmal en células contiguas de las combinaciones incompatibles especialmente tras la segunda semana después del establecimiento de la unión revelando una insuficiente cooperación entre las dos especies, ciruelo y albaricoquero. Estos resultados, podrían ser debidos a que los plasmodesmos llegan a alcanzar una densidad más elevada en las compatibles que incompatibles estableciéndose un mejor contacto y cooperatividad entre las células adyacentes. Asimismo, se observó el aislamiento de dominios simplásticos de células adyacentes en el tejido de callo, condición indispensable para el transcurso del desarrollo funcional y morfogénico y que algunos autores correlacionan a que los plasmodesmos quedan comprimidos y cerrados (Ehlers y Kollmann, 1999). A pesar del sellamiento de los poros, las células contiguas pueden sobrevivir sin alteraciones. Resulta interesante el hecho de que estas estructuras no sean formaciones estáticas, sino que tienen un alto grado de dinamismo y pueden amoldar rápidamente su frecuencia,

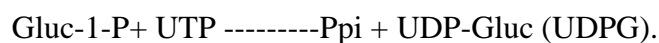
estando su permeabilidad sujeta a las variaciones que dependen del desarrollo (revisión por Chen y Kim, 2006; Schulz, 1999).

Considerando todo lo anteriormente expuesto, las diferencias en el límite de exclusión molecular entre las dos partes implicadas en la unión, podría afectar al transporte de nutrientes y macromoléculas reguladoras célula a célula a través de los plasmodesmos entre patrón-variedad, y por tanto a los mecanismos de la comunicación celular. Además, el descubrimiento de menor porcentaje de transporte plasmodesmal entre células contiguas en el patrón de la unión incompatible podría desempeñar un papel importante entre los factores desencadenantes de la unión no satisfactoria.

La utilidad y aplicabilidad del método desarrollado en las primeras fases del desarrollo de la unión puede abordar métodos precisos para establecer si existen relaciones de incompatibilidad de determinadas variedades de interés comercial.

Aspectos bioquímicos asociados a la respuesta de (in)-compatibilidad de injerto.

La mayoría de los estudios realizados hasta el momento se han centrado en el análisis de los procesos anatómicos e histoquímicos de la compatibilidad de injerto, pero poco es sabido sobre los mecanismos bioquímicos que influyen en la manifestación del problema de incompatibilidad. En este trabajo una de las principales diferencias observadas mediante el análisis proteico de uniones compatibles e incompatibles fue la tinción más tenue de una banda proteica de 55 Kda en la unión incompatible de 10 días, que fue identificada como una UDP-glucosa pirofosforilasa (UGPasa), enzima que cataliza la reacción fácilmente reversible de síntesis de la UDP-glucosa:



Dependiendo de las condiciones metabólicas, esta enzima puede estar implicada en la síntesis o degradación de sacarosa in-vivo, mediante el acoplamiento a otras enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis de la sacarosa. Por otro lado, la UDPG es un precursor directo o indirecto en la síntesis de celulosa, sustancias pécticas, hemicelulosas, glicolípidos y otras moléculas glicosiladas que intervienen en la biosíntesis de compuestos en la pared celular (Kleczkowski, 1994, Kleczkowski et al, 2004). El transcrito así como la proteína fueron detectados en los controles, uniones compatibles e incompatibles durante las dos semanas después del establecimiento de la unión, hecho que podría deberse a que la enzima está involucrada en la formación de la

Discusión general

pared celular primaria durante la proliferación celular producida en estados tempranos de desarrollo, así como en el completo desarrollo del tejido mediante la biosíntesis de sacarosa y rotura de sacarosa en tejidos fuentes y sumideros, respectivamente (Coleman et al, 2006). Sin embargo, como hemos mencionado anteriormente, se observó una disminución en una banda proteica de 55Kda asociada a la UGPasa en el patrón de la combinación incompatible 10 días después de la unión. A pesar de que la principal diferencia fue detectada en los primeros días cuando todavía existe una situación de estrés provocada como respuesta a la herida, se demostró que el mecanismo desencadenante del cambio entre uniones compatibles e incompatibles no era provocado por reacción a la herida, usando como controles en el estudio los distintos genotipos sometidos a la herida. Por tanto, estos resultados sugirieron la implicación de esta proteína en los mecanismos de compatibilidad/incompatibilidad.

La proteína identificada presentó una alta homología con la secuencia previamente descrita en peral (Kiyozumi et al, 1999), especie que manifiesta un tipo de incompatibilidad semejante al albaricoquero. Asimismo, la posibilidad de que esta proteína estuviera implicada en el proceso de incompatibilidad fue reforzada ya que se detectaron bajos niveles del transcrito en el patrón de la combinación incompatible a los 10 días en comparación a las uniones compatibles. Por tanto, la regulación de la expresión génica de la enzima estuvo influenciada en función del grado de compatibilidad entre patrón-variedad.

La UGPasa desempeña un papel importante en la acumulación de azúcares, con potencial para restringir el flujo de carbono hacia la formación de sacarosa en tejidos sumideros (Borokov et al, 1996), mientras que en tejidos fuentes actúa en combinación con la sacarosa fosfato sintasa (SPS) en la síntesis de sacarosa. En plantas mutantes de *Arabidopsis* se observó que la expresión de la enzima depende de la interacción de señales derivadas de la disponibilidad de fósforo, sacarosa y temperatura (Ciereszko et al, 2001 a, b). Bajo estas condiciones un incremento en el nivel de transcritos fue correlacionado con el contenido y actividad de la UGPasa. Los estudios que han analizado el efecto de la UGPasa sobre el contenido de azúcar soluble son controvertidos. Por una parte, en plantas transgénicas de patata en las que la expresión del gen es bloqueada un 96% por el RNA antisentido, no causó efecto en el contenido de azúcares (Zrenner et al, 1993). Sin embargo, una reducción del 30% en *Arabidopsis* resultó en un descenso del contenido en azúcares (Johnansson, 2003). Asimismo, plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan el gen revelaron un aumento en el

contenido de glucosa y fructosa, y no se observaron cambios en la concentración de sacarosa (Coleman et al, 2006).

La importancia de la regulación del metabolismo de los azúcares en la compatibilidad de injerto también fue considerada clave en especies herbáceas. Rachow-Brandt et al (1992b) pusieron de manifiesto que sistemas en los que existe un bajo grado de compatibilidad entre las dos partes implicadas en el injerto debido a dificultades en la formación de conexiones vasculares entre patrón y variedad, presentan un mayor transporte apoplástico, contenido de monosacáridos en la zona de unión y mayor actividad invertasa.

Los resultados obtenidos en esta tesis parecen indicar que la UGPasa estaría implicada en la reacción de incompatibilidad, lo que supone la primera proteína identificada en este proceso complejo de (in)-compatibilidad de injerto antes de la aparición de los síntomas de incompatibilidad. Sin embargo, futuras investigaciones son necesarias para entender el efecto de dichos cambios a nivel celular, y su aplicabilidad a otras especies.

Por otra parte, uno de los principales compuestos considerados como indicadores de incompatibilidad son los flavanoides (Musacchi et al, 2000; Errea et al, 2000), de tal forma que algunos autores han revelado que existe una relación entre la acumulación de estos compuestos y el grado de compatibilidad entre las dos partes implicadas en la unión (Errea et al, 2001; Treutter et al, 1991, 1986). En este sentido, es conocido que una de las enzimas claves de la ruta fenilpropanoide es la fenilalanina amonía liasa (PAL). Los resultados obtenidos en esta tesis sobre la regulación de la enzima PAL, sugieren que la situación de estrés continuada producida por una falta de adaptación entre las dos partes que constituyen el injerto, desencadena el aumento de expresión especialmente desde la segunda semana en la combinación incompatible. Asimismo, esta sobreexpresión indica una alteración en el metabolismo de la planta debido a la unión entre genotipos de diferente especie. A su vez, esto se ve reflejado en una mayor presencia de contenido fenólico en el interior de vacuolas y pared celular de uniones incompatibles. Del mismo modo, se ha desvelado en este estudio un alto grado de homología de la PAL del género *Prunus* con especies de distinto género.

La utilización de estas herramientas de biología molecular y su extensión a este problema agronómico permitirá profundizar en los mecanismos bioquímicos que determinan el futuro comportamiento al injerto desde una perspectiva en donde hasta el

Discusión general

momento son escasos los trabajos realizados, pero que suponen un considerable avance en el estudio de la determinación de la compatibilidad en un estado temprano.

9. CONCLUSIONES.

1. Mediante el análisis microscópico de las combinaciones establecidas en invernadero se ha observado que las paredes de las células de callo presentaron una diferente respuesta a la tinción de la celulosa y pectinas en función del grado de compatibilidad. Las células del nuevo cambium han mostrado una menor actividad meristemática en combinaciones incompatibles que compatibles que se refleja en una menor diferenciación hacia conexiones vasculares.

2. Del estudio de viabilidad celular se deduce una pérdida de integridad de la membrana celular a partir de la segunda semana en zonas de células parenquimatosas de uniones incompatibles, que se intensifica entre la tercera y cuarta semana después del injerto en comparación con las combinaciones compatibles.

3. El examen histoquímico de las uniones in-vitro ha puesto de manifiesto diferencias entre combinaciones compatibles e incompatibles basadas en una diferente intensidad de reacción ante la presencia de pectinas y celulosa, de la misma forma que los injertos establecidos en invernadero. Asimismo, se ha observado un mayor contenido intercelular en células de callo de uniones incompatibles indicando en la mayoría de los casos la presencia de fenoles. Este fenómeno podría reflejar una alteración en el metabolismo de este tipo de uniones debido a la situación de estrés continua en un intento de adaptación entre los dos genotipos.

4. Los resultados obtenidos referentes a las uniones de tallo han puesto de manifiesto que tanto la células parenquimáticas de la médula o del xilema, así como la región cambial preexistente estuvieron implicadas en la formación del callo como respuesta a la herida y se observó un cierto retraso hacia la formación de conexiones vasculares en las uniones incompatibles.

Conclusiones

5. En el estudio de la comunicación intercelular en especies leñosas el acoplamiento entre las sondas fotoactivables y la microscopía confocal han demostrado ser herramientas adecuadas para el estudio de conectividad plasmodesmal y presentan ventajas frente a otros métodos de investigación de la comunicación celular: evitan manipulaciones experimentales del tipo microinyección y permiten el control fisiológico de los mismos, así como una cuantificación de la medida del contacto plasmodesmal célula-célula.

6. En el patrón Mariana 2624 ensayado los plasmodesmos son funcionales y pequeñas poblaciones de células en división estuvieron fuertemente conectadas. La formación de dominios simplásticos es considerado requisito indispensable como parte del desarrollo morfo genético coordinado del callo.

7. Los datos obtenidos referentes a la capacidad de transporte y el límite de exclusión molecular han puesto de manifiesto una mayor fracción móvil (Mf) y SEL en el patrón que en el cultivar de albaricoquero, de tal forma que en la combinación incompatible formada por ambos podría verse afectada la comunicación intercelular patrón-variedad a nivel de intercambio de nutrientes y macromoléculas reguladoras.

8. La determinación del transporte plasmodesmal entre combinaciones compatibles e incompatibles puso de manifiesto una reducción en la conductividad plasmodesmal de las células de callo del patrón de la combinación incompatible, bajo las mismas condiciones de fotoperiodo, temperatura y estado nutricional. Las diferencias más significativas se observaron diez días después del establecimiento de la unión in-vitro.

9. El uso de técnicas disponibles de biología molecular ha permitido encontrar diferencias en el perfil proteico entre uniones compatibles e incompatibles establecidas in-vitro. De las diferencias detectadas entre ambos tipos de uniones y descartadas para ser una respuesta a la herida, la UDP-glucosa pirofosforilasa fue identificada por MALDI-TOF y se observó un fuerte regulación transcripcional que implicaría un desequilibrio a nivel del metabolismo de los carbohidratos dada su participación en la ruta de biosíntesis/degradación de la sacarosa.

10. El clonaje del cDNA parcial que codifica para esta proteína mostró un alto grado de homología con otras especies, especialmente con *Pyrus pirifolia*, especie que manifiesta un tipo de incompatibilidad semejante al albaricoquero.

11. El estudio del nivel de expresión de la fenilalanina amonía liasa (PAL) mostró variaciones en la abundancia del transcrito durante el desarrollo de la unión. En la primera semana el perfil de expresión se mantuvo similar entre combinaciones compatibles e incompatibles, mientras que la carencia de adaptación entre patrón-variedad de combinaciones incompatibles se vio reflejada a través del estímulo de la expresión durante las primeras tres semanas en comparación a las compatibles.

12. El aumento en la expresión de la enzima estuvo correlacionado con una mayor intensidad de autofluorescencia asociada a fenoles tanto en la pared celular como en el interior de vacuolas de las células parenquimáticas. Por otro lado, el análisis filogenético a partir de las secuencias parciales aminoacídicas, estableció la distinción entre monocotiledóneas y dicotiledóneas, y se desveló un alto grado de homología de la PAL del género *Prunus* con especies de distinto género.

10. Bibliografía.

- Aloni R. 1987. Differentiation of vascular tissues. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 38: 179-204.
- Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich CI. 2006. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: Regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals of Botany* 97(5): 883-893.
- Andrew PK, Serrano-Marquez CS. 1993. Graft incompatibility. *Hortic. Review.* 15: 183-231.
- Anterola AM, Lewis NG. 2002. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry* 61(3): 221-294.
- Argles, GK. 1937. A review of the literature on stock-scion incompatibility in fruit trees, with particular reference to pome and stone fruits. *Tech. Comm. Pomolo. Imp. Bureau of Fruit Production.* 9.
- Asante AK, Barnett JR. 1997. Graf union formation in mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of horticultural science* 72 (5): 781-790.
- Barnett JR, Weatherhead I. 1988. Graft formation in Sitka spruce: A scanning electron microscopy study. *Ann Bot* 61: 581-587.
- Bate NJ, Orr J, Ni WT, Meromi A, Nadlerhassar T, Doerner PW, Dixon RA, Lamb, CJ, Elkind, Y. 1994. Quantitative Relationship between Phenylalanine Ammonia-Lyase Levels and Phenylpropanoid Accumulation in Transgenic Tobacco Identifies a Rate-Determining Step in Natural Product Synthesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(16): 7608-7612.
- Bernhard R. 1990. La selección de los patrones para el albaricoquero y el ciruelo. En: estado actual de los patrones frutales. XXII Jornadas AIDA.
- Blancaflor EB, Gilroy S. 2000. Plant cell biology in the new millennium: New tools and new insights. *American Journal of Botany.* 87: 1547-1560.
- Borovkov AY, McClean PE, Sowokinos JR, Ruud SH, Secor GA. 1996. Effect of expression of UDP-glucose pyrophosphorylase ribozyme and antisense RNAs on the enzyme activity and carbohydrate composition of field-grown transgenic potato plants. *Journal of plant physiology* 147 (6): 664-652.
- Borovkov AY, McClean PE, Secor GA. 1997. Organization and transcription of the gene encoding potato UDP-glucose pyrophosphorylase. *Gene* 186: 293-297.

Bibliografia

- Bortiri E, Oh SH, Gao FY, Potter D. 2002. The phylogenetic utility of nucleotide sequences of sorbitol 6-phosphate dehydrogenase in *Prunus* (Rosaceae). *American Journal of Botany* 89(10): 1697-1708.
- Boudet AM, Kajita S, Grima-Pettenati J, Goffier D. 2003. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends in plant science* 8(12): 576-581.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Breen PJ. 1975. Effect of peach/plum graft incompatibility on seasonal carbohydrate changes. *J Amer Soc Hort Sci* 100: 253-259.
- Buchloh G. 1960. The lignification in stock-scion junctions and its relation to compatibility. In: Pidham, J.B. Ed. *Phenolics in plants in health and disease*. Pergamon Press.
- Bush MS, Marry M, Huxham IM, Jarvis MC, McCann MC. 2001. Developmental regulation of pectic epitopes during potato tuberisation. *Planta* 213 (6): 869-880.
- Campos-Vargas R, Nonogaki H, Suslow T, Saltveit ME. 2005. Heat shock treatments delay the increase in wound-induced phenylalanine ammonia-lyase activity by altering its expression, not its induction in Romaine lettuce (*Lactuca sativa*) tissue. *Physiologia Plantarum* 123(1): 82-91.
- Chaw SM, Zharkikh A, Sung HM, Lau TC, Li WH. 1997. Molecular phylogeny of extant gymnosperms and seed plant evolution: Analysis of nuclear 18S rRNA sequences. *Molecular biology and evolution* 14 (1): 56-68.
- Chen XY, Kim JY. 2006. Transport of macromolecules through plasmodesmata and the phloem. *Physiologia Plantarum* 126 (4): 560-571.
- Ciereszko, I., H. Johansson, Kleczkowski, L. A. 2001a. Sucrose and light regulation of a cold-inducible UDP-glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent and abscisic acid-insensitive pathway in *Arabidopsis*. *Biochemical Journal* 354: 67-72.
- Ciereszko I, Johansson H, Hurry V, Kleczkowski LA. 2001b. Phosphate status affects the gene expression, protein content and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase in wild-type and pho mutants of *Arabidopsis*. *Planta* 212: 598-605.
- Cilia ML, Jackson D. 2004. Plasmodesmata form and function. *Current Opinion in Cell Biology* 16(5): 500-506.
- Coleman HD, Ellis DD, Gilbert M, Mansfield SD. 2006. Up-regulation of sucrose synthase and UDP-glucose pyrophosphorylase impacts plant growth and metabolism. *Plant Biotechnology Journal* 4(1): 87-101.

- Complainville A, Crespi M. 2004. Role of plasmodesmata regulation in plant development. *Advances in botanical research incorporating advances in plant pathology*. 41: 195-243.
- Crawford KM, Zambryski PC. 2001. Non-targeted and targeted protein movement through plasmodesmata in leaves in different developmental and physiological states. *Plant Physiology* 125(4): 1802-1812.
- Creelman RA, Mullet JE. 1997. Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: Nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. *Plant Cell* 9(7): 1211-1223.
- Dannenhoffer JM, Schulz A, Skaggs MI, Bostwick DE, Thompson GA. 1997. Expression of the phloem lectin is developmentally linked to vascular differentiation in cucurbits. *Planta* 201, 405-414.
- Diallinas G, Kanellis AK. 1994. A Phenylalanine Ammonia-Lyase Gene from Melon Fruit - Cdna Cloning, Sequence and Expression in Response to Development and Wounding. *Plant Molecular Biology* 26(1): 473-479.
- Ding B, Haudenschild JS, Hull RJ, Wolf S, Beachy RN, Lucas WJ. 1992. Secondary Plasmodesmata Are Specific Sites of Localization of the Tobacco Mosaic-Virus Movement Protein in Transgenic Tobacco Plants. *Plant Cell* 4(8): 915-928.
- Ding B, Itaya A, Woo YM. 1999. Plasmodesmata and cell-to-cell communication in plants. *Int. Rev. Cytol.* 190: 251-316.
- Dolan L, Linstead P, Roberts K. 1997. Developmental regulation of pectic polysaccharides in the root meristem of Arabidopsis. *Journal of experimental botany*, 48 (308): 713-720.
- Duckett CM, Oparka KJ, Prior DAM, Dolan L, Roberts K. 1994. Dye-Coupling in the root epidermis of Arabidopsis is progressively reduced during development. *Development*. 120: 3247-3255.
- Eckardt NA. 2006. The role of flavonoids in root nodule development and auxin transport in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 18(7): 1539-1540.
- Ehlers K, Kollmann R. 1996. Formation of branched plasmodesmata in regenerating *Solanum nigrum*-protoplasts. *Planta*. 199: 126-138.
- Ehlers K, Binding H, Kollmann R. 1999. The formation of symplasmic domains by plugging of plasmodesmata: a general event in plant morphogenesis? *Protoplasma* 209(3-4): 181-192.
- Ehlers K, Kollmann R. 2001. Primary and secondary plasmodesmata: structure, origin, and functioning. *Protoplasma*. 216: 1-30.
- Eimert K, Villand P, Kilian A, Kleczkowski LA. 1996. Cloning and characterization of several cDNAs for UDP-glucose pyrophosphorylase from barley (*Hordeum vulgare*) tissues. *Gene* 170: 227-232.

Bibliografía

- Elkind Y, Edwards R, Mavandad M, Hedrick A, Ribak O, Dixon A, Lamb J. 1990. Abnormal plant development and down-regulation of phenylpropanoid biosynthesis in transgenic tobacco containing a heterologous phenylalanine ammonia-lyase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci*, vol 87: 9057-9061
- Ermel FF, Poessel JL, Faurobert M, Catesson AM. 1997. Early scion/stock junction in compatible and incompatible pear/pear and pear/quince grafts: A histocytological study. *Annals of Botany* 79(5): 505-515.
- Ermel FF, Kervella J, Catesson AM, Poessel JL. 1999. Localized graft incompatibility in pear/quince (*Pyrus communis*/*Cydonia oblonga*) combinations: multivariate analysis of histological data from 5-month-old grafts. *Tree Physiol* 19: 645-654.
- Ermel FF, Follet-Gueye ML, Cibert C, Vian B, Morvan C, Catesson AM, Goldberg R. 2000. Differential localization of arabinan and galactan side chains of rhamnogalacturonan 1 in cambial derivatives. *Planta* 210(5): 732-740.
- Errea P. 1991. Compatibilidad de injerto en albaricoquero (*P. armeniaca*). Anatomía y bioquímica de uniones compatibles e incompatibles. Tesis doctoral. Universidad de Navarra. 1991. 233 pg.
- Errea P, Felipe A. 1992a. Comportamiento del albaricoquero 'Moniquí' injertado sobre diversos patrones. *ITEA*, 88(3): 183-192
- Errea P, Treutter D, Feucht W. 1992b. Specificity of individual flavan 3-ols interfering with the grafting stress of apricots. *Angewandte Botanik*, 66: 21-24
- Errea P, Felipe A. 1993 Compatibilidad de injerto en albaricoquero (*Prunus armeniaca*). *Investigación Agraria. Producción y Protección Vegetal*, 8(1): 67-77
- Errea P, Felipe A, Herrero M. 1994a. Graft establishment between compatible and incompatible *Prunus* spp. *Journal of Experimental Botany* 45 (272), 393-401.
- Errea P, Treutter D, Feucht W. 1994b. Characterization of flavanol-type polyphenols in apricot cultivar and rootstocks. *Advances in Horticultural Sciences*, 3: 165-169
- Errea P. 1998. Implications of phenolic compounds in graft incompatibility in fruit tree species. *Scientia Horticulturae* 74, 195-205
- Errea P, Felipe A. 1998. Situación actual de los patrones de albaricoquero. *Fruticultura Profesional*, nº 96: 12-18.
- Errea P, Gutmann M, Feucht W. 2000. Physiological implications of flavan-3-ols in apricot-rootstock combinations. *Advances in Horticultural Science* 14/3 (126-134).
- Errea P, Garay L, Marin JA. 2001. Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca*) using in vitro techniques. *Physiol Plantarum* 112: 135-141.
- Errea P, Rodrigo J. 2003 Respuesta de las células de callo a la tinción con calcofluor mediante el análisis de imagen en uniones compatibles e incompatibles de

- Prunus establecidas in vitro. IX Congreso Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Pontevedra, Mayo 2003.
- Errea P, 2006. I portinnesti dell' albicocco: situazione attuale e possibilità d'impiego di altre specie e ibridi. *Frutticoltura*-n. 6: 30-33.
- Espen L, Cocucci M, Sacchi GA. 2005. Differentiation and functional connection of vascular elements in compatible and incompatible pear/quince internode micrografts. *Tree Physiol* 25:1419–1425.
- Esau K, 1965. Parenchyma. In: *Plant anatomy, second printing, printed in the United States of America*.
- FAOSTAT. <http://faostat.fao.org/>
- Feder N, O'Brien TP. 1968. Plant Microtechnique - Some Principles and New Methods. *American Journal of Botany* 55(1): 123-&.
- Felipe A, Herrero J. 1977. Ensayos para el cultivo de almendro en regadío. *Anales INIA, Producción vegetal* 7: 113-124.
- Felipe A. 1989. Patrones para frutales de pepita y hueso. Ediciones Técnicas Europeas S.A. Barcelona, España.
- Felipe AJ. 1990. Patrones para albaricoquero, ciruelo y cerezo. *Fruticultura profesional* 30: 3-8.
- Fernandez-Garcia N, Carvajal M, Olmos E. Graft union formation in tomato plants: peroxidase and catalase involvement. *Ann Bot*; 93(1):53-60.
- Feucht W, Schmid, PPS. 1979. Phenolic-compounds in the phloem of prunus trees, section. *Scientia Horticulturae* 10 (4): 387-394.
- Feucht W, Treutter D, Schmid PPS. 1988. Inhibition of Growth and Xylogenesis and Promotion of Vacuolation in Prunus Callus by the Flavanone Prunin. *Plant Cell Reports* 7(3): 189-192.
- Forte, V. El albaricoquero. 1992. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Fricker M, Runions J, Moore I. 2006. Quantitative fluorescence microscopy: From art to science. *Annu Rev Plant Biol.* 57: 79-107.
- Fry SC. 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu Rev Plant Physiol* 37: 165-186.
- Fukuda, H. 2000. Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Molecular Biology* 44(3): 245-253.
- Gahan PB. 1984. *Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction*. Experimental botany, vol.18: London, Academic Press.

Bibliografia

- Gebhardt K, Feucht W. 1982. Polyphenol Changes at the Union of *Prunus-Avium* *Prunus-Cerasus* Grafts. *Journal of Horticultural Science* 57(3): 253-258.
- Gebhardt K, Goldbach H. 1988. Establishment, graft union characteristics and growth of *Prunus* micrografts. *Physiologia Plantarum* 72(1), 153-159.
- Gisel A, Barella S, Hempel FD, Zambryski PC. 1999. Temporal and spatial regulation of symplastic trafficking during development in *Arabidopsis thaliana* apices *Development*. 126: 1879-1889.
- Ghoshroy S, Lartey R, Sheng J, Citovsky V. 1997. Transport of proteins and nucleic acids through plasmodesmata. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 48: 27-50.
- Golecki B, Schulz A, Carstens-Behrens U, Kollmann R. 1998. Evidence for graft transmission of structural phloem proteins or their precursors in heterografts of *Cucurbitaceae*. *Planta* 206, 630-640.
- Goor A, Nurock M. 1968. The peach, the apricot, the plum and the pear. En *Fruits of the holey land*. Jerusalem: Israel Universities Press. pp. 202-227.
- Guglielmino N, Liberman M, Jauneau, A, Vian B, Catesson AM, Goldberg R. 1997. Pectin immunolocalization and calcium visualization in differentiating derivatives from poplar cambium. *Protoplasma* 199(3-4): 151-160.
- Gulen H, Arora R, Kuden A, Krebs SL, Postman J. 2002. Peroxidase isozyme profiles in compatible and incompatible pear-quince graft combinations. *J Am Soc Hort Sci* 127: 152-157
- Gulen H, Celik M, Polat M, Eris A. 2005a. Cambial isoperoxidases related to graft compatibility in pear-quince graft combinations. *Turk. J. Agric. For* 29: 83-89
- Gulen H, Kuden A, Postman J, Arora R. 2005b. Total protein content and SDS-PAGE in pear scions grafted on quince A and pear seedling rootstocks. *Turk. J. Agric. For* 29: 91-96.
- Gur A, Samish RM, Lifshitz E. 1968. Role of Cyanogenic Glycoside of Quince in Incompatibility between Pear Cultivars and Quince Rootstocks. *Horticultural Research* 8(2): 113-&.
- Gur A, Blum A. 1973. Role of Cyanogenic Glycoside in Incompatibility between Peach Scions and Almond Rootstocks. *Horticultural Research* 13(1): 1-10.
- Gutmann M. 1993. Lokalisierung von Polyphenolen in Blättern interspezifischer Pfropfkombinationen. Untersuchungen über den Einfluß von Inkompatibilität bei *Prunus avium* L. auf *Prunus cerasus* L. Technischen Universtität München.
- Haebel S, Kehr J. 2001. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry peptide mass fingerprints and post source decay: a tool for the

- identification and analysis of phloem proteins from *Cucurbita maxima* Duch. separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Planta* 213: 586-593.
- Hartmann HT, Kester DE, Davies, FT, Geneve, RL. 2002. eds, *Plant Propagation. Principles and practices*, ed 7, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, pp 411-460 ISBN 0-13-679235-9
- Herrero J. 1951. Studies of compatible and incompatible graft combinations with special reference to hardy fruit trees. *J. Hort. Sci.* 26 (3): 186-237.
- Herrero J. 1955a. Incompatibilidad entre patrón e injerto. I. Comportamiento de algunas combinaciones recíprocas. *Anales de la Estación Experimental de Aula Dei (Zaragoza)* 4: 149-166.
- Herrero J. 1955b. Incompatibilidad entre patrón e injerto. II. Efecto de un intermediario en la incompatibilidad entre melocotonero y mirobolán. *Anales de la Estación Experimental de Aula Dei (Zaragoza)* 4: 167-172.
- Herrero J. 1956. Incompatibilidad entre patrón-variedad. III. Comparación de síntomas producidos por incompatibilidad y por el anillado del tronco. *Anales de la Estación Experimental de Aula Dei (Zaragoza)* 4: 262-264.
- Herrero J, Tabuenca MC. 1962. Compatibilidad entre patrón e injerto. VI. observaciones en uniones de peral sobre membrillero. *Anales de la Estación Experimental de Aula Dei (Zaragoza)* 7: 64-78.
- Herrero J. 1968. Manifestations physiques et histologiques de l'incompatibilité. En: *table Ronde sur les problemes d'incompatibilité lors du greffage de plants ligneux*, pp 7-24. Gembloux.
- Howard BH. 1977. Chip budding fruit and ornamental trees. *Proceedings of International Plant Propagation Society* 27, 357-366.
- Huges J, McCully ME. 1975. The use of an optical brightener in the study of plant structure. *Stain Technol* 50:319.
- Hush JW, Wadsworth P, Callaham DA, Hepler PK. 1994. Quantification of microtubule dynamics in living plant cells using fluorescence recovery after photobleaching. *J Cell Sci.* 107: 775-784.
- Itaya A, Woo YM, Masuta C, Bao YM, Nelson RS, Ding B. 1998. Developmental regulation of intercellular protein trafficking through plasmodesmata in tobacco leaf epidermis. *Plant Physiology* 118(2): 373-385.
- Itaya A, Ma FS, Qi YJ, Matsuda Y, Zhu YL, Liang GQ, Ding B. 2002. Plasmodesma-mediated selective protein traffic between "symplasmically isolated" cells probed by a viral movement protein. *Plant Cell* 14(9): 2071-2083.

Bibliografia

- Jarvis MC, Briggs SPH, Knox JP. 2003. Intercellular adhesion and cell separation in plants. *Plant Cell and Environment* 26(7): 977-989.
- Jefree CE, Yeoman MM. 1983. Development of intercellular connections between opposing cells in a graft union. *New Phytol* 93: 491-509.
- Jefree CE, Yeoman MM, Parkinson M, Holden MA. 1987. The chemical basis of cell to cell contact and its possible role in differentiation. *British Plant Growth Regulator Group, Monograph 16. Advances in the chemical Manipulation of Plant Tissue cultures*, 73-86.
- Jefree CE, Gordon F, Yeoman MM. 1989. Pectinaceous beads and pectinase on callus cell surfaces in graft unions and in culture. In: Osborne DJ, Jackson MB (eds) *Cell separation in plants. NATO ASI Series Vol H35*, Springer-Verlag, Berlin, pp 287-299.
- Jensen WA. 1962. Pectic substances. In *botanical histochemistry: Principles and practice* San Francisco: W.H. Freeman, pp.201-202.
- Johansen, DA. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill: New York, New York, Estados Unidos.
- Johanson, H. 2003. Gene regulation of UDP-glucose synthesis and metabolism in plants. Ph-D thesis. Umea: Umea University.
- Jonard R, Luckman D, Schall F, Villanur P. 1990. Early testing of graft incompatibilities in apricot and lemon trees using in vitro techniques. *Scientia Horticulturae*, 43: 117-128
- Kao YY, Harding SA, Tsai CJ. 2002. Differential expression of two distinct phenylalanine ammonia-lyase genes in condensed tannin-accumulating and lignifying cells of quaking aspen. *Plant Physiology* 130(2): 796-807.
- Katsube T, Kazuta Y, Mori H, Nakano K, Tanizawa K, Fukui T. 1990. Udp-Glucose Pyrophosphorylase from Potato-Tuber - Cdna Cloning and Sequencing. *J Biochem* 108: 321-326
- KatsubeT, KazutaY, Tanizawa K, Fukui T. 1991. Expression in Escherichia-Coli of Udp-Glucose Pyrophosphorylase Cdna from Potato-Tuber and Functional Assessment of the five Lysyl Residues Located at the Substrate-Binding Site. *Biochemistry* 30: 8546-8551
- Kehr J, Haebel S, Blechschmidt-Schneider S, Willmitzer L, Steup M, Fisahn J. 1999. Analysis of phloem protein patterns from different organs of *Cucurbita maxima* Duch. by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectroscopy combined with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Planta* 207: 612-619
- Kester DE, Hansen C, Panetsos. 1965. Effect of scion and interstock variety on incompatibility of almond on Mariana 2624 rootstocks. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci*, 86: 169-177.

- Kiyozumi D, Ishimizu T, Nakanishi T, Sakiyama F, Norioka S. 1999. Cloning and nucleotide sequencing of a cDNA encoding UDP-glucose pyrophosphorylase of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) (Accession number n° AB013353) (PGR99-006). *Plant Physiol* 119: 363
- Kleczkowski LA. 1994. Glucose Activation and Metabolism through Udp-Glucose Pyrophosphorylase in Plants. *Phytochemistry* 37: 1507-1515
- Kleczkowski LA, Geisler M, Ciereszko I, Johansson H. 2004. UDP-Glucose pyrophosphorylase. An old protein with new tricks. *Plant Physiol* 134: 912-918
- Kollmann R, Glockmann C. 1985. Studies on Graft Unions. I. Plasmodesmata between Cells of Plants Belonging to Different Unrelated Taxa. *Protoplasma*. 124: 224-235.
- Kollmann R, Yang S, Glockmann C. 1985. Studies on graft unions II. Continuous and half plasmodesmata in different regions of the graft interface. *Protoplasma*. 126: 19-29.
- Kollmann R, Glockmann C. 1990. Sieve elements of graft unions. In: The sieve element -Comparative structure, induction and development (H-D Behnke and R.D Sjolund, eds), 219-237; Springer Verlag: Berlin Heidelberg New York.
- Kollmann R, Glockmann C. 1991. Studies on graft unions. III. On the mechanism of secondary formation of plasmodesmata at the graft interface. *Protoplasma* 165: 71-85.
- Kollmann R, Glockmann, C. 1999. Multimorphology and nomenclature of plasmodesmata in higher plants. In: van Bel, A.J.E., van Kesteren W.J.P. (Eds) *Plasmodesmata: structure, function, role in cell communication*. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokio, 149-172.
- Kumar A, Ellis BE. 2001. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry. Structure, expression, and evolution. *Plant Physiology* 127(1): 230-239.
- Kumar K, Tamura, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Layne REC, Bailey CH, Hough F. 1996. Apricots. En Janick, J. y Moore N. (Ed). *Fruit Breeding, vol 1: Tree and Tropical fruits*. John Wiley & Sons: New York, EEUU. pp. 79-109.
- Leboeuf E, Guillon F, Thoiron S, Lahaye M. 2005. Biochemical and immunohistochemical analysis of pectic polysaccharides in the cell walls of *Arabidopsis* mutant QUASIMODO 1 suspension-cultured cells: implications for cell adhesion. *Journal of experimental botany* 56 (422): 3171-3182

Bibliografia

- Lee S, Wen J. 2001. A phylogenetic analysis of *Prunus* and the Amygdaloideae (Rosaceae) using ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *American journal of botany* 88 (1): 150-160.
- Liu RR, Xu SH, Li JL, Hu YL, Lin ZP. 2006. Expression profile of a PAL gene from *Astragalus membranaceus* var. *Mongholicus* and its crucial role in flux into flavonoid biosynthesis. *Plant cell reports* 25 (7): 705-710.
- Logemann E, Parniske M, Hahlbrock, K. 1995. Modes of Expression and Common Structural Features of the Complete Phenylalanine Ammonia-Lyase Gene Family in Parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(13): 5905-5909.
- Lucas WJ, Ding B, Van der Schoot C. 1993. Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. *New Phytol.* 125, 435-476.
- Lucas WJ. 1999. Plasmodesmata and the cell-to-cell transport of proteins and nucleoprotein complexes. *Journal of Experimental Botany* 50: 979-987.
- Lucas WJ, Lee JY. 2004. Plant cell biology - Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5(9): 712-726.
- Macheix JJ, Fleuriet A, Quessada PP. 1986. Involvement of phenols and peroxidases in wound healing and grafting. In: Greppin H, Penel C, Gaspar T (eds). *Molecular and physiological aspects of plant peroxidases*. Université de Genève. Genève. pp. 267-286.
- Martens HJ, Hansen M, Schulz A. 2004. Caged probes: a novel tool in studying symplasmic transport in plant tissues. *Protoplasma*. 223: 63-66.
- Martens HJ, Roberts AG, Oparka K, Schulz A. 2006. Quantification of plasmodesmatal ER coupling between sieve elements and companion cells using fluorescence redistribution after photobleaching (FRAP). *Plant Physiology* 142 (2): 471-480.
- Mattsson J, Ckurshumova W, Berleth T. 2003. Auxin signaling in *Arabidopsis* leaf vascular development. *Plant Physiology* 131(3): 1327-1339.
- McCann MC, Stacey NJ, Wilson R, Roberts K. 1993. Orientation of macromolecules in the walls of elongating carrot cells. *Journal of cell science* 106: 1347-1356.
- McCann MC, Roberts K. 1994. Changes in Cell-Wall Architecture During Cell Elongation. *Journal of Experimental Botany* 45(280): 1683-1691.
- McCartney L, Knox JP. Regulation of pectic polysaccharide domains in relation to cell development and cell properties in the pea testa. 2002. *Journal of experimental botany*, 53 (369): 707-713.
- McCully ME. 1983. Structural aspect of graft development. In R. Moore. Ed. *Vegetative compatibility responses in plants*. Waco. Tex.: Baylor Univ. Press.

- Miller H, Barnett JR. 1993. The structure and composition of Bead-like projections on Sitka spruce callus cells formed during grafting and in culture. *Ann Bot* 72: 441-448
- Moing A, Salesses G, Saglio PH. 1987. Growth and the Composition and Transport of Carbohydrate in Compatible and Incompatible Peach Plum Grafts. *Tree Physiol* 3: 345-353.
- Moing A, Carde JP. 1988. Growth, Cambial Activity and Phloem Structure in Compatible and Incompatible Peach Plum Grafts. *Tree Physiology* 4(4): 347-359.
- Monzer J, Kollmann R. 1986. Vascular Connections in the Heterograft *Lophophora-Williamsii* Coult on *Trichocereus-Spachianus* Ricc. *Journal of Plant Physiology* 123(4): 359-372.
- Monzer J. Ultrastructure of secondary plasmodesmata formation in regenerating *Solanum-Nigrum*- protoplast cultures. *Protoplasma*, 165 (1-3): 86-95 1991
- Moore R, Walker DB. 1981a. Studies on vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. I. A structural study of a compatible autograph in *Sedum telephoides* (Crassulaceae). *Am J Bot* 68: 820-830
- Moore R, Walker DB. 1981b. Studies on vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. II. A structural study of an incompatible heterograft between *Sedum telephoides* (Crassulaceae) and *Solanum pennelli* (Solanaceae). *Am J Bot* 68: 831-842.
- Moore R, Walker DB. 1983. Studies of vegetative compatibility-incompatibility in higher-plants. 6. Grafting of *Sedum* and *Solanum* callus-tissue invitro. *Protoplasma*, 115 (2-3): 114-121.
- Moore R. 1981. Graft Compatibility and Incompatibility in Higher-Plants. *Develop. Compar. Immunol.* 5(3): 377-389.
- Moore R. 1982. Studies of Vegetative Compatibility-Incompatibility in Higher-Plants. 5. A Morphometric Analysis of the Development of a Compatible and an Incompatible Graft. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 60(12): 2780-2787.
- Moore R. 1983. Physiological aspects of graft formation. En: R. Moore (ed.). *Vegetative compatibility responses in plants*. pp. 89-105. Baylor University Press. Waco, Tex.
- Moore R. 1984a. A Model for Graft Compatibility-Incompatibility in Higher-Plants. *American Journal of Botany* 71(5): 752-758.
- Moore R. 1984b. Ultrastructural Aspects of Graft Incompatibility between Pear and Quince Invitro. *Annals of Botany* 53(3): 447-451.

Bibliografia

- Moore R. 1991. Graft compatibilities in vitro. In YPS Bajaj, ed, *Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol 17 High-Tech and Micropropagation I*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg pp. 71-84.
- Mosse B. 1962. Graft incompatibility in fruit trees. *Technical Communication of the Commonwealth Bureau of Horticultural Plant Crops* 28, 1-36.
- Murashige T, Skoog G. 1962. A revised medium for the rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15: 473-479.
- Musacchi S, Pagliuca G, Kindt M, Piretti MV, Sansavini S. 2000. Flavonoids as markers for pear-quince graft incompatibility. *Journal of Applied Botany-Angewandte Botanik* 74(5-6): 206-211.
- Nguyen-Quoc B, Foyer CH. 2001. A role for 'futile cycles' involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. *J Exp Bot* 52: 881-889.
- O'Brien, T, McCully ME. 1981. *The study of plant structure. Principles and methods.* Termarcarphi PTY., Melbourne, Australia.
- Oparka KJ, Roberts AG, Boevink P, Santa Cruz S, Roberts L, Pradel KS, Imlau A, Kotlizky G, Sauer N, Epel, B. 1999. Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell* 97(6): 743-754.
- Ormenese S, Havelange A, Bernier G, van der Schoot C. 2002. The shoot apical meristem of *Sinapis alba* L. expands its central symplasmic field during the floral transition. *Planta*. 215: 67-78
- Pina A, Errea P. 2005. A review of new advances in mechanism of graft compatibility-incompatibility. *Sci Hort* 106: 1-11
- Politz JC. 1999. Use of caged fluorochromes to track macromolecular movement in living cells. *Trends in cell biology*. 9: 284-287.
- Rachow-Brandt G, Kollmann R. 1992a. Studies on Graft Unions. IV. Assimilate Transport and Sieve Element Restitution in Homografts and Heterografts. *Journal of Plant Physiology* 139(5): 579-583.
- Rachow-Brandt G, Kollmann R. 1992b. Studies on Graft Unions. V. Unloading of assimilates in Homografts and Heterografts. *J Plant Physiol* 139: 584-589.
- Reeve RM. 1959. A Specific Hydroxylamine-Ferric Chloride Reaction for Histochemical Localization of Pectin. *Stain Technology* 34(4): 209-211.
- Rehder A. 1940. *Manual of cultivated trees and shrubs hardy in North America*. 2nd ed. MacMillan, New York, New York. USA.

- Richardson FVM, tSaoir SM, Harvey BMR. 1996. A study of the graft union in in vitro micrografted apple. *Plant Growth Regul* 20: 17-23.
- Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen DA. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57(6): 929-967.
- Rinne PLH, van der Schoot C. 1998. Symplasmic fields in the tunica of the shoot apical meristem coordinate morphogenetic events. *Development*. 125: 1477-1485.
- Rinne PLH, van der Schoot C. 2003. Plasmodesmata at the crossroads between development, dormancy, and defense. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 81(12): 1182-1197.
- Robards AW, Lucas WJ. 1990. Plasmodesmata. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41: 369-419.
- Rogers LA, Campbell MM. 2004. The genetic control of lignin deposition during plant growth and development. *New Phytologist* 164(1): 17-30.
- Sabatini DD, Bensch K, Barnett RJ. 1963. Cytochemistry and electron microscopy th presentation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell. Biol.* 17: 19-58.
- Sachs T. 1981. The control of the patterned differentiation of vascular tissue. *Adv. Bot. Res.* 9: 151- 262.
- Salisbury F.B, Ross CW. 1991. In: *Plant Physiology*, 4th Edn. Wadsworth Publishing Company. Belmont California. A division of Wadsworth, Inc.
- Salvatierra A, Hiroshi G, Iwahori S. 1999. Histochemical observations and HPLC analysis of phenolic compounds at the graft union of dwarf peach trees grafted onto *Prunus tomentosa*. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 68: 724-733.
- Sanchez-Ballesta MT, Lafuente MT, Zacarias, LGranell, A. 2000. Involvement of phenylalanine ammonia-lyase in the response of Fortune mandarin fruits to cold temperature. *Physiologia Plantarum* 108(4): 382-389.
- Santamour FS, McArdle AJ, Jaynes RA. 1986. Cambial isoperoxidase patterns in castanea. *J. Environ. Hort.* 4(1): 14-16.
- Santamour FS. 1988. Graft incompatibility related to cambial peroxidase isoenzymes in Chinese chestnut. *J. Environ. Hort.* 6(2): 33-39.
- Savidge R, Barnett J, Napier R. 2000. *Cell and Molecular Biology of Wood Formation*. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford.
- Schmid PPS, Feucht W. 1981. Differentiation of sieve tubes in compatible and incompatible prunus graftings. *Scientia Horticulturae* 15 (4): 349-354.

Bibliografia

- Schöning U, Kollmann R. 1995. The function of phloem connections in regenerating in vitro-grafts. *Bot. Acta* 108, 56-62.
- Schöning U, Kollmann R. 1997. Phloem translocation in regenerating in vitro-heterografts of different compatibility. *J. Exp. Bot.* 48: 289-295.
- Schulz A. 1999. Physiological control of plasmodesmal gating. In: van Bel, A.J.E., van Kesteren, W.J.P., (Eds). *Plasmodesmata: Structure, function, role in cell communication*, 173-204, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Shaw J, Small RL. 2004. Addressing the "hardest puzzle in American pomology": Phylogeny of *Prunus* sect. *Prunocerasus* (Rosaceae) based on seven noncoding chloroplast DNA regions. *American journal of botany* 91 (6): 985-996.
- Shevell DE, Kunkel T, Chua NH. 2000. Cell wall alterations in the *Arabidopsis* emb30 mutant. *Plant Cell* 12 (11): 2047-2059.
- Shimomura T, Fujihara K. 1977. Physiological study of graft union formation in Cactus. II. Role of auxin on vascular connection between stock and scion. I. *Ipn Soc. Hort. Sci.*, 45: 397-406.
- Soumelidou K, Battey NH, John P, Barnett JR. 1994. The Anatomy of the Developing Bud Union and Its Relationship to Dwarfing in Apple. *Annals of Botany* 74(6): 605-611.
- Stenlid G. 1976. Effects of Flavonoids on Polar Transport of Auxins. *Physiologia Plantarum* 38 (4): 262-266.
- Stoddard FL, Mc Cully ME. 1979. Histology of the development of the graft union in pea roots. *Can. J. Bot.* 57, 1486-1501.
- Tiedemann R. 1989. Graft union development and symplastic phloem contact in the heterograft *Cucumis sativus* on *Cucurbita ficifolia*. *J. Plant Physiol.* 134, 427-440.
- Tiedemann R, Carsens-Behrens U. 1994. Influence of Grafting on the Phloem Protein-Patterns in Cucurbitaceae.1. Additional Phloem Exudate Proteins in *Cucumis-Sativus* Grafted on 2 *Cucurbita* Species. *J Plant Physiol* 143: 189-194
- Treutter D, Feucht W, Schmid PPS. 1986. Polyphenols of the Phloem in Relation to Incompatibility of Interspecific *Prunus* Graftings (*Prunus-Avium* L, *Prunus-Cerasus* L).1. Flavanones and Flavanols above the Graft Union. *Gartenbauwissenschaft* 51(2): 77-84.
- Treutter D, Schmid PPS, Feucht W. 1990. Wall-bound phenols and peroxidase-activity in shoots of *Prunus*. 1. Isolation and identification of phenolic-acids. *Gartenbauwissenschaft* 55(2): 69-72.
- Treutter D, Feucht W. 1991. Accumulation of Phenolic-Compounds above the Graft Union of Cherry Trees. *Gartenbauwissenschaft* 56(3): 134-137.

- Treutter D. 2005. Significance of flavanoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant biology* 7 (6): 581-591.
- Usenik V, Krska B, Vican M, Stampar F. 2006. Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca* L.) using phenol analyses. *Scientia Horticulturae* 109(4): 332-338.
- Van der Schoot C, Rinne P. 1999. Networks for shoot design. *Trends in plant science*, 4(1): 31-37.
- Waigmann E, Zambryski P. 1994. Plasmodesmata - Gateways for Rapid Information-Transfer. *Current Biology* 4(8): 713-716.
- Walz C, Giavalisco P, Schad M, Juenger M, Klose J, Kehr J. 2004. Proteomics of curcubit phloem exudate reveals a network of defence proteins. *Phytochemistry* 65:1795-804.
- Walz C, Juenger M, Schad M, Kehr J. 2002. Evidence for the presence and activity of a complete antioxidant defence system in mature sieve tubes. *Plant J* 31:189-97.
- Wang Y, Kollmann, R., 1996. Vascular differentiation in the graft union of in vitro-grafts with different compatibility. Structural and functional aspects. *J. Plant Physiol.* 147, 521-33.
- Wanner LA, Li GQ, Ware D, Somssich IE, Davis KR. 1995. The Phenylalanine Ammonia-Lyase Gene Family in *Arabidopsis-Thaliana*. *Plant Molecular Biology* 27(2): 327-338.
- Ward TH, Brandizzi F. 2004. Dynamics of proteins in Golgi membranes: comparisons between mammalian and plant cells highlighted by photobleaching techniques. *Cellular and molecular life sciences*. 61: 172-185.
- Wasson, AP, Pellerone FI, Mathesius U. 2006. Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia. *Plant Cell* 18 (7): 1617-1629.
- Weiss M. 2004. Title: Challenges and artifacts in quantitative photobleaching experiments. *Traffic*. 5: 66
- Westwood NH. 1982. *Fruticultura de zonas templadas*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. ISBN. 84-7114-111-6.
- Westwood MN. 1993. *Temperature-Zone. Pomology, physiology and culture*. Timber Press, Inc. ISBN 0-88192-253-6.
- Whitney SEC, Gothard MGE, Mitchell JT, Gidley MJ. 1999. Roles of cellulose and xyloglucan in determining the mechanical properties of primary plant cell walls. *Plant physiology* 121 (2): 657-663.
- Willats WGT, McCartney L, Mackie W, Knox JP. 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology* 47(1-2): 9-27.

Bibliografia

- Wolf S, Deom CM, Beachy RN, Lucas WJ. 1989. Movement Protein of Tobacco Mosaic-Virus Modifies Plasmodesmatal Size Exclusion Limit. *Science* 246(4928): 377-379.
- Yang SJ, Xiang GS, Zhang SQ, Lou CH. 1992. Electrical-resistance as a measure of graft union. *Journal of plant physiology*. 141: 98-104.
- Yeoman MM, Kilpatrick DC, Miedzybrodzka MB, Gould AR. 1978. Cellular interactions during graft formation in plants, a recognition phenomenon? *Symposia of the Society for Experimental Biology XXXII* pp139-160.
- Yeoman MM. 1984. Cellular recognition systems in grafting. *Cellular interactions, Encyclopedia of Plant Physiology*, 453-472.
- Yu K, Carlson, RF. 1975. Gas-liquid chromatography determinations of phenolic acids and coumarins in mazzard and mahaleb cherry seedlings. *Hortscience* 10: 301-403.
- Zarrouk O, Gogorcena Y, Moreno MA, Pinochet J. 2006. Graft compatibility between peach cultivars and *Prunus* rootstocks. *Hortscience* 41 (6): 1389-1394
- Zhu T, Lucas WJ, Rost TL. 1998. Directional cell-to-cell communication in the *Arabidopsis* root apical meristem - I. An ultrastructural and functional analysis. *Protoplasma* 203(1-2): 35-47.
- Zrenner R, Willmitzer L, Sonnewald U. 1993. Analysis of the Expression of Potato Uridinediphosphate-Glucose Pyrophosphorylase and Its Inhibition by Antisense Rna. *Planta* 190(2): 247-252.

11. ANEXOS

ANEXO 1

Accesión del GenBank DQ470013, secuencia parcial de la UDP-glucosa pirofosforilasa en albaricoquero.

LOCUS DQ470013 564 bp mRNA linear PLN 01-SEP-2006
 DEFINITION Prunus armeniaca UDP-glucose pyrophosphorylase mRNA, partial cds.
 ACCESSION DQ470013
 VERSION DQ470013.1 GI:94471816
 KEYWORDS .
 SOURCE Prunus armeniaca (apricot)
 ORGANISM Prunus armeniaca
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae; Amygdaloideae; Prunus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 564)
 AUTHORS Pina,A. and Errea,P.
 TITLE Cloning of a partial cDNA encoding UDP-glucose pyrophosphorylase from apricot callus tissue
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 564)
 AUTHORS Pina,A. and Errea,P.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (31-MAR-2006) Unidad de Fruticultura, Centro de Investigacion y Tecnologia Agroalimentaria de Aragon, CITA-DGA, Apdo 727, Zaragoza 50080, Spain
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..564
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="mRNA"
 /cultivar="Moniqui"
 /db_xref="taxon:36596"
 /tissue_type="in-vitro callus tissue"
 CDS <1..>564
 /codon_start=1
 /product="UDP-glucose pyrophosphorylase"
 /protein_id="ABF21124.1"
 /db_xref="GI:94471817"

/translation="YPRLGVEDFSPFPKSGQTGKDGWYPPGHGDVFPKNSGKLDLL
 LSQKKEYVVFVANSNDNLGAVVDLKIHLNHLIHKKNEYCMEVTPKTLADVKGGTL
 ISYEGRVQLLEIAQVPDAHVNEFKSIEKFKIFNTNNLWVNLNAIKRLVEADA
 LKMEIIPNPKEVDGVKVLQLETAAGAAIRFFNHAIGTNVP"

ORIGIN

```

1 tatcctcgtc tgggtgttga agatthtttcg ccatttccat ccaaaggaca gactggcaag
61 gatggatggg atcctcctgg ccatgggtgat gtgttcccat ccctaaagaa cagtggcaaa
121 cttgatctgt tattgtcaca gggtaaggag tatgtgtttg ttgctaactc ggacaacttg
181 ggtgctgttg ttgatttgaa aattctaaat catttgatcc acaaaaagaa cgaatactgc
241 atggagggtga caccaaaaac attggcagat gtgaaggggtg gcactctgat ctcttatgag
301 ggaaggggtc agctcctgga aattgctcaa gtccctgatg cacatgtcaa tgaattcaag
361 tccatcgaga agttcaaaaat tttcaacaca aataatttgt ggggtgaactt gaatgcaatt
421 aaaaggctcg tggaaagctga tgcacttaag atggaaatta tcccaaacc aaaggaagtg
481 gatggagtca aagttctcca gctagaaact gcggctgggtg cagcaatcag gttctttaat
541 catgcaattg gcaactaatgt ccca
//

```

ANEXO 2

Accesión del GenBank DQ479430, secuencia parcial de la UDP-glucosa pirofosforilasa en ciruelo.

```

LOCUS      DQ479430          563 bp      mRNA      linear      PLN 01-SEP-2006
DEFINITION Prunus cerasifera x Prunus munsoniana cultivar Marianna
2624 UDP-glucose pyrophosphorylase mRNA, partial cds.
ACCESSION  DQ479430
VERSION    DQ479430.1  GI:94429095
KEYWORDS   .
SOURCE     Prunus cerasifera x Prunus munsoniana
  ORGANISM Prunus cerasifera x Prunus munsoniana
  Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
  Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
  rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae; Amygdaloideae; Prunus.
REFERENCE  1 (bases 1 to 563)
  AUTHORS  Pina,A. and Errea,P.
  TITLE    Cloning of a partial cDNA corresponding to UDP-glucose
  pyrophosphorylase in the plum rootstock 'MN2624'
  JOURNAL  Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 563)
  AUTHORS  Pina,A. and Errea,P.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (05-APR-2006) Unidad de Fruticultura, Centro de
  Investigacion y Tecnologia Agroalimentaria de Aragon,
CITA-DGA,Apdo 727, Zaragoza 50080, Spain
FEATURES   Location/Qualifiers
  source    1..563
            /organism="Prunus cerasifera x Prunus munsoniana"
            /mol_type="mRNA"
            /cultivar="Marianna 2624"
            /db_xref="taxon:381902"
            /tissue_type="in-vitro callus tissue"
            /note="plum rootstock"
  CDS       <1..>563
            /codon_start=1
            /product="UDP-glucose pyrophosphorylase"
            /protein_id="ABF18967.1"
            /db_xref="GI:94429096"

  /translation="YPRLVVEDFSPLPSKQGTGKDGWYPPGHGDVFPKNSGKLDLL
LSQGKEYVVFVANSNDLGA VVDLKI LNHLIHKNEYCMEVTPKTLADVKG GTL
ISYEGRVQLLEIAQVADAHVNEFKSIEKFKIFNTNNLWVNLNAIKRLVEADALK
MEIIPNPKEVDGVKVLQLETAAGAAIRFFNHAIGTNV"

ORIGIN
  1  tatcctcgcc tggttggtga agatttttcg ccccttccat ccaaaggaca gactggcaag
  61  gatggatggt atcctcctgg ccacggatgat gtgttcccat ccctaaagaa cagtggcaaa
 121  cttgatctgt tattgtcaca gggtaaggag tatgtgtttg ttgctaactc ggacaacttg
 181  ggcgctggtg ttgattttaa aatttctaat catttgatcc acaaaaagaa cgaatactgc
 241  atggagggtg caccgaaaac attggcagat gtgaagggtg gcactctgat ctcttatgag
 301  ggaagggttc agctcctgga aattgctcaa gttgctgat cacatgtcaa tgaattcaag
 361  tccatagaga agttcaaaaat tttcaacaca aataatttgt ggggtgaactt gaatgcaatt
 421  aaaaggctcg tggagctga tgcacttaag atggaaatta tcccaaacc aaaggaagtg
 481  gatggagtca aagttcttca gctagaaact gcggctggtg cagcaatcag gttctttaat
 541  catgctattg gcaccaatgt aca
  //

```


ANEXO 3

Accesión del GenBank EF031063, secuencia parcial de la Fenilalanina amonio liasa (PAL) en albaricoquero.

LOCUS EF031063 870 bp mRNA linear PLN 05-NOV-2006
 DEFINITION *Prunus armeniaca* phenylalanine ammonia-lyase mRNA, partial cds.
 ACCESSION EF031063
 VERSION EF031063.1 GI:117067268
 KEYWORDS .
 SOURCE *Prunus armeniaca* (apricot)
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae; Amygdaloideae; *Prunus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 870)
 AUTHORS Pina,A. and Errea,P.
 TITLE Differential induction of PAL transcripts in response to in-vitro callus unions of *Prunus* spp.
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 870)
 AUTHORS Pina,A. and Errea,P.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (29-SEP-2006) Unidad de Fruticultura, Centro de Investigacion y Tecnologia Agroalimentaria de Aragon, Apdo 727, Zaragoza 50080, Spain
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..870
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="mRNA"
 /cultivar="Moniqui"
 /db_xref="taxon:36596"
 /tissue_type="callus"
 CDS <1..>870
 /note="PAL"
 /codon_start=1
 /product="phenylalanine ammonia-lyase"
 /protein_id="ABK32083.1"
 /db_xref="GI:117067269"

/translation="REINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAI
 GKLMFAQFSELVNDFFYNGLPSNLSGGRNPNDLYGFKGAEIAMASYCSELQFLANPVT
 NHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVDILKLMSSTFVLVALCQAIDLRHLEENLRNT
 VKNTVSQVAKRTLTTGVNGLHPSRFCEKDLLKVVVDREYVFAYIDDPCHATYPLMQKL
 RQVLVEHALTNGENEKNASTSIFQKTVAFEEELKVLLPKVEVDSARAALDSGSAGVPCR
 ITECRSYPLYKFVR"

ORIGIN

1 agggagatca actcagtcaa tgacaaccct ttgattgatg tgtcaaggaa caaggccttg
 61 catggtggca acttccaggg gaccccgatt ggtgtctcta tggacaatac tcgtttggct
 121 attgcagcca ttgggaagct catgtttgct caattttctg agcttgtaaa tgacttttac
 181 aacaatggat tgccatcaaa tctgtctgga ggcaggaacc caaatttgga ttatggcttc
 241 aagggggctg agattgccat ggcattctat tgttctgagc ttcagtttct cgcgaccctg
 301 gtcactaacc atgtccagag tgcagagcag cacaaccaag acgtgaactc tttgggggtg
 361 atctcttcaa gaaagacagc tgaagctggt gatattctga agctcatgct ttccacattt
 421 ttgggtggcac tttgccaagc cattgatttg aggcatcttg aggagaactt gaggaacaca
 481 gttaagaaca cagttagcca agttgctaag agaactttga cgactgggggt taatggagag
 541 ctccaccat caagattctg tgagaaggat ttgcttaaag tggtcgatag ggaatattg
 601 ttcgcctaca tcgacgaccc ctgcagtgcc attaccat tgatgcaaaa actaaggcaa

Anexos

```
661 gtgctggttg agcatgcttt gacaaatggt gagaatgaaa agaatgcaag cacttcaatc
721 ttccaaaaga ctgttgcttt tgaggaagag ctgaaggtgc ttttgcttaa agaggtggat
781 agtgcaaggg ctgcattgga tagtggaagt gctggagttc caaacaggat tacggaatgc
841 aggtcttatc cgttgtacaa atttgtgagg
//
```

ANEXO 4

Accesión del GenBank EF031064, secuencia parcial de la Fenilalanina amonio liasa (PAL) en ciruelo.

```
LOCUS          EF031064          870 bp      mRNA      linear      PLN 05-NOV-2006
DEFINITION    Prunus cerasifera x Prunus munsoniana phenylalanine
ammonia-lyase mRNA, partial cds.
ACCESSION    EF031064
VERSION      EF031064.1      GI:117067270
KEYWORDS      .
SOURCE       Prunus cerasifera x Prunus munsoniana
  ORGANISM   Prunus cerasifera x Prunus munsoniana
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae; Amygdaloideae; Prunus.
REFERENCE    1 (bases 1 to 870)
  AUTHORS    Pina,A. and Errea,P.
  TITLE      Differential induction of PAL transcripts in response to in-
vitro callus unions of Prunus spp.
  JOURNAL    Unpublished
REFERENCE    2 (bases 1 to 870)
  AUTHORS    Pina,A. and Errea,P.
  TITLE      Direct Submission
  JOURNAL    Submitted (29-SEP-2006) Unidad de Fruticultura, Centro de
Investigacion y Tecnologia Agroalimentaria de Aragon, Apdo 727,
Zaragoza 50080, Spain
FEATURES     Location/Qualifiers
   source          1..870
                   /organism="Prunus cerasifera x Prunus munsoniana"
                   /mol_type="mRNA"
                   /cultivar="Marianna 2624"
                   /db_xref="taxon:381902"
                   /tissue_type="callus"
   CDS             <1..>870
                   /note="PAL"
                   /codon_start=1
                   /product="phenylalanine ammonia-lyase"
                   /protein_id="ABK32084.1"
                   /db_xref="GI:117067271"

/translation="REIDSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVAMDNTRLAIAAI
GKLMFAQFSELVNDVFYNNGLPSNLTGSSNPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQFLGNPVT
NHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVDILKLMSSTYLVALCQAVDLRHLEENLKST
VKSTVSVQAKRVLTVGFNGLHPSRFCEKDLLKVVVDREYVFAYVDDPCSATYPLMQKL
RHVLVEHALNNGEKEKSSSTSIFQKITAFEDELKTL LLPKEVESARLEYDNGKSATPNR
IKDCRSYPLYKFVR"
```

ORIGIN

```
1 agggagatcg actcagtgaa tgataaccca ttgattgatg tctcaaggaa caaggcttta
61 catgggtggaa atttccaagg gacccaatt ggtggtgcca tggataacac cagattagcc
121 attgctgcta ttggcaaact catgtttgcc caattctctg agcttgtcaa tgacttctac
181 aacaatgggt tgccttcaaa tctcacagga agcagcaatc caagcttggga ttatgggttc
241 aaaggtgctg aaattgcaat ggcattctac tgctcagagc tccagttcct tggcaaccct
301 gtcaccaacc atgtccaaag tgcagagcaa cacaaccaag atgtcaactc cttgggattg
361 atttcttcta gaaagacagc tgaggctgtg gacatattga agctcatgtc atccacatac
421 ttagttgcat tgtgccaagc tgttgatctg agacatttgg aggagaactt gaagagcaca
481 gtgaagagca ctgtcagtca agtggccaag agagtcctaa cagtgggctt caatgggtggg
541 cttcaccctt ctaggttctg tgagaaagac ttgctcaagg tggttgaccg cgagtacgtt
601 ttcgcttatg tcgatgaccc ctgcagtgtc acctatccat tgatgcagaa actgaggcat
661 gttctagtgt agcacgcatt gaacaatggt gagaaggaaa agagttcaag cacttcaatc
721 ttccaaaaga ttacagcttt tgaagatgag cttaagaccc tcttgcccaa agaagttgaa
781 agtgccaggc ttgaatatga taatggaaaa tcagcaaccc caaacagaat caaagattgc
841 aggtcttacc cactatacaa gtttgtgagg
```

//