



7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

**Gestión del monte: servicios
ambientales y bioeconomía**

26 - 30 junio 2017 | Plasencia
Cáceres, Extremadura

7CFE01-053

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales
Plasencia. Cáceres, Extremadura. 26-30 junio 2017
ISBN 978-84-941695-2-6

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Análisis transcriptómico de la formación de xilema traumático en *Pinus canariensis* Chr. Sm. ex D.C.

CHANO, V.¹, COLLADA, C.^{1,2} y SOTO, A.^{1,2}

¹ Grupo de Investigación en Genética, Fisiología e Historia Forestal. Dpto. Sistemas y Recursos Naturales. Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria s/n 28040 Madrid, Spain.

² Unidad Mixta de Genómica y Ecofisiología Forestal, INIA/UPM, Madrid, Spain.

Resumen

Diferentes agentes bióticos y abióticos pueden producir traumatismos en plantas, dejando expuestas las partes internas y facilitando la entrada de patógenos que podrían provocar infecciones. *Pinus canariensis*, especie forestal endémica del Archipiélago Canario, posee una gran capacidad de cicatrización y regeneración tisular, debido a su historia evolutiva en ambientes volcánicos. Analizamos la formación del xilema traumático hibridando un microarray con muestras recogidas a tres tiempos tras la realización de la herida (H1, H2 y H3), comparándolo con la formación de madera no traumática. Encontramos 1408 genes diferencialmente expresados en respuesta al traumatismo, agrupados en diferentes clústeres según sus perfiles de expresión. La mayoría de estos genes fueron inducidos durante H1, especialmente aquéllos relacionados con procesos de estrés y defensa. También encontramos factores de transcripción relacionados con la actividad meristemática inducidos especialmente en H2 y H3, cuando el xilema traumático se está formando. Genes inducidos durante el desarrollo de madera temprana no traumática, relacionados mayormente con la formación de la pared celular, fueron reprimidos durante H1 e inducidos en H3, sugiriendo que el árbol forma madera temprana, de rápido crecimiento, para cerrar la herida en el menor tiempo posible.

Palabras clave

xilema, traumatismo, cicatrización, *Pinus canariensis*, expresión genética

1. Introducción

La formación de madera en especies forestales puede verse afectada por diferentes factores a lo largo de sus usualmente largas vidas, como son la presión causada por el viento o la gravedad, o el daño traumático causado por inundaciones, herbivoría o fuegos forestales. Además de la pérdida directa de tejidos fotosintéticos y vasculares, las heridas abiertas facilitan la entrada de patógenos oportunistas, disparando un conjunto de respuestas anatómicas y fisiológicas que impiden o dificultan los posibles efectos causados por la herida y la consecuente infección. El cierre de la herida tras el daño producido es un proceso clave en la evolución de las plantas, y que implica la reacción del cambium vascular, respuesta de defensa, y la formación de xilema traumático.

Muchos de los estudios enfocados en la respuesta a traumatismos mecánicos han utilizado angiospermas como especies modelo, especialmente aquellos centrados en los aspectos moleculares del proceso de cicatrización y regeneración tisular (Sena et al., 2009; Sugimoto et al., 2010), su control hormonal (Asahina et al., 2011; Wan et al., 2006), o el proceso anatómico (Hamada et al., 2009; Pang et al., 2008; Stobbe, 2002; Zhang et al., 2011).

En el pino canario, los efectos del daño mecánico inducen respuestas anatómicas que conllevan la alteración y cambios de polaridad en las divisiones de las células cambiales, asociados a su posición relativa en la superficie y los márgenes de la herida (Chano et al., 2015), y que resulta en

la formación de un xilema traumático desordenado como consecuencia de la alteración del flujo hormonal (Kurczynska y Hejnowicz, 1991; Sachs y Cohen, 1982). y de la percepción de la posición de la herida y la nueva superficie libre del tallo (Chano et al., 2015).

Los estudios de expresión genética han revelado también diferencias a nivel molecular en la madera traumática respecto al patrón normal de madera temprana y tardía (Chano et al., 2017).

2. Objetivos

El objetivo de este trabajo es comprobar si el xilema traumático producido como respuesta a un daño mecánico tiene bases genéticas comunes a la formación de madera tardía a nivel transcriptómico, centradas en su papel como barrera que dificulta la expansión de patógenos oportunistas, o, por el contrario, se está produciendo un desarrollo similar a la formación de madera temprana, de menor densidad y bajo coste, debida a la limitación de recursos causada por el estrés. Para ello se ha inducido el proceso de cicatrización en *P. canariensis*, y analizado la expresión diferencial de genes implicados en defensa y regeneración tisular en respuesta al estrés biótico producido.

3. Metodología

Para el presente trabajo utilizamos árboles de 5 años crecidos en una parcela de estudio. Utilizando un bisturí estéril, se produjeron dos heridas rectangulares por árbol de 10 cm de altura y abarcando la mitad de la circunferencia del tronco en 30 árboles, eliminando corteza, floema y el cambium vascular.

Se emplearon diferentes árboles con daño mecánico con el fin de evaluar la expresión genética utilizando microarrays, recogiendo muestras del tejido de cicatrización en tres tiempos durante la respuesta al daño: H1 a los 7 días, H2 a los 75 días y H3 a los 93 días, que determinan las fases de respuesta inmediata, primera fase de cicatrización y segunda fase de cicatrización. En la fase H1 ningún árbol mostraba la formación de tejido calloso para cerrar la herida. Sin embargo, recogimos los tejidos adyacentes a la herida, incluyendo corteza, floema y cambium vascular, raspando las capas más nuevas del xilema con la ayuda de un bisturí estéril. En la fase H2 recogimos el tejido de regeneración formado alrededor de la herida, incluyendo de nuevo corteza, floema, cambium vascular y las capas más recientes del xilema. Del mismo modo, se recogieron las mismas capas de tejido de regeneración en la fase H3, cuando el callo formado era visiblemente más voluminoso. Para cada tiempo de muestreo se recogió también un control en una rama alejada de la herida, con objeto de comparar el xilema traumático con el formado en ausencia de traumatismo. Todas las muestras fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenada en el laboratorio a -80° C.

Se extrajo el ARN total de las muestras almacenadas utilizando la precipitación con CTAB-LiCl (Chang et al., 1993), y se purificó mediante el empleo de RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, CA, USA). La cuantificación del ARN se realizó con un Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, MA, USA), y su calidad se comprobó con un Experion Bioanalyzer (Bio-Rad, CA, USA).

Un set de aproximadamente 16500 contigs implicados en actividad meristemática en *P. canariensis*, obtenidos y anotados en un trabajo anterior (Chano et al., 2017), se empleó para el diseño de un microarray de 60K a dos colores. La hibridación se realizó siguiendo el protocolo del fabricante y las imágenes fueron tomadas con GenePix 4000B (Axon, CA, USA).

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se llevó a cabo utilizando el software R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2011) y el paquete Bioconductor (Gentleman et al.,

2004). Se consideraron genes diferencialmente expresados (DEGs) aquellos con valores de FC mayores de 2 (sobreexpresados) y menores de -2 (reprimidos), con un nivel de significación estadística ajustado por FDR menor de 0.05. Las réplicas técnicas fueron fusionadas por medias para obtener un único valor de expresión por contig. A partir de los genes diferencialmente expresados (DEGs) seleccionados, se generó una matriz de datos formada por los valores logarítmicos de los ratios entre medida experimental y control, incluyendo los tiempos muestreados y tres réplicas biológicas por cada tiempo. Esta matriz fue importada a R para realizar un clustering jerárquico con el método “complete-linkage”, y generar un heatmap mediante la función heatmap.2 del paquete gplots (Warnes et al., 2015).

4. Resultados

El análisis resultó en 1408 genes con expresión diferencial (DEGs) (Figura 1), distribuidos a lo largo del proceso estudiado como se muestra en el diagrama de Venn de la Figura 2. La respuesta inmediata H1 incluyó 837 DEGs, el grupo más numeroso, mientras que el menos numeroso fue la respuesta intermedia H2 con 336 DEGs. H3 incluyó 619 DEGs. Mostraron una expresión alterada durante los 3 tiempos estudiados. 69 DEGs Del mismo modo, 44 DEGs fueron comunes para H1 y H2, y 66 para H1 y H3, mientras que 136 coincidieron para H2 y H3.

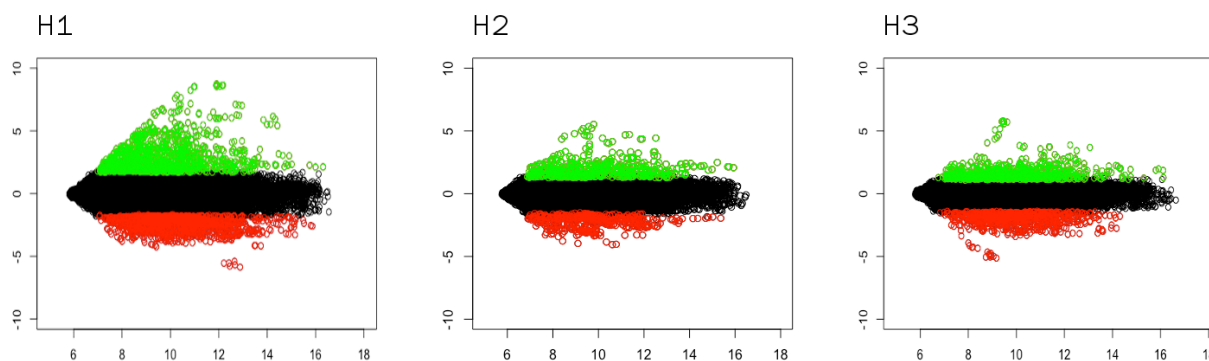


Figura 1. MA PLOTs que muestran la selección de sondas que presentaban valores de FC mayores a 2 (verdes) y menores a -2 (rojas), con un nivel de significación ajustado por FDR menor de 0.05. El eje de abscisas son valores logarítmicos de la señal de expresión (A), y el eje de ordenadas son los valores logarítmicos de Fold Change (M).

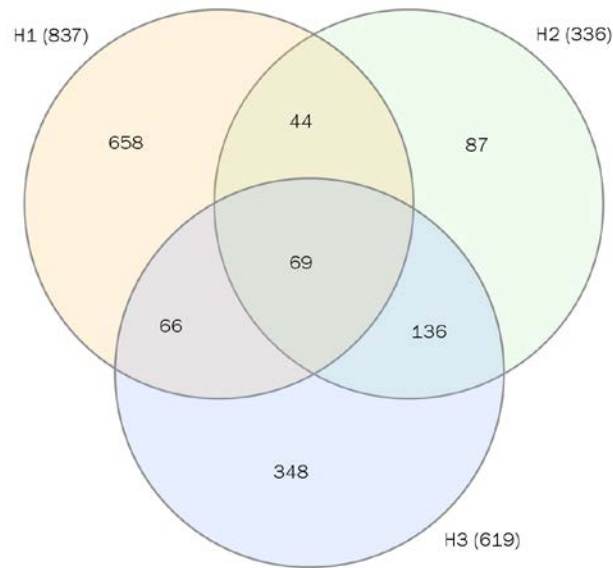


Figura 2. Diagrama de Venn que relaciona los DEGs encontrados en cada punto muestral (H1, H2 y H3)

Se establecieron 12 clústeres de DEGs en función de su patrón de expresión (Tabla 1, Figura 3).

Tabla 1. Número de DEGs incluidos en cada clúster.

Clúster	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
DEGs	9	285	111	62	7	4	190	212	319	14	5	200

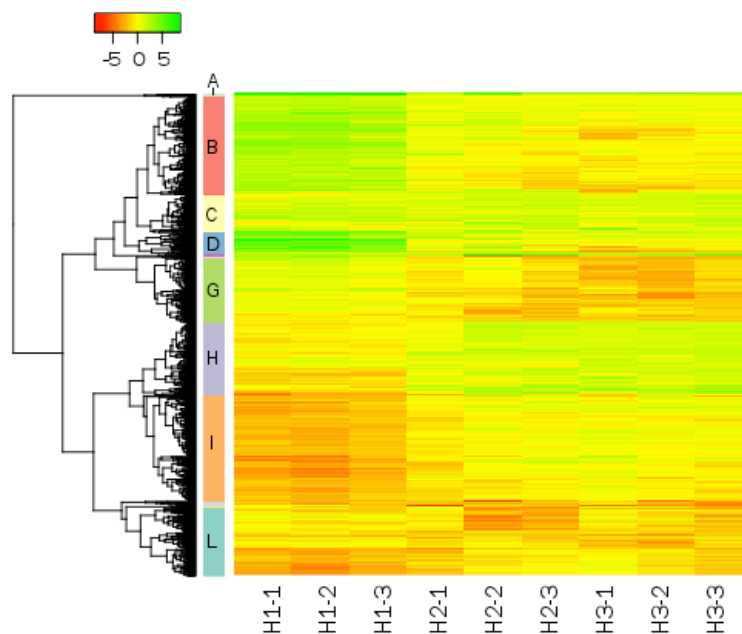


Figura 3. Heatmap obtenido tras el clústering jerárquico, con 12 clústeres (A-L) según las diferentes tendencias de expresión de los DEGs seleccionados

De manera general, las principales tendencias observadas en el heatmap presentado en la Figura 3 muestran genes con una fuerte inducción en el clúster A para H1, y a un nivel menor H2 y H3, así como otros genes sobreexpresados en H1 en los clústeres B, D y E, y en H2 y H3 en los

clústeres C y H. Por otro lado, los clústeres H, I y L incluyen genes reprimidos durante H1, mientras que los genes reprimidos durante H2/H3 se distribuyeron entre los clústeres B, G y L, principalmente. Además, muchos de estos DEGs involucrados en la respuesta al daño en *P. canariensis* están implicados en los procesos de formación de madera temprana y tardía durante el crecimiento vegetativo de la especie (Chano et al., 2017). Desde una perspectiva amplia, se ha observado que muchos de los genes sobreexpresados diferencialmente durante H1, e incluso reprimidos durante H2 y H3, presentaron picos de expresión en verano durante la formación de madera tardía, mientras que contrariamente los genes relacionados con el desarrollo de madera temprana en esta especie se reprimen durante H1, y se inducen durante las fases H2 y H3.

5. Discusión

Las fases H1 y H3 implican la participación de un gran número de genes (837 y 619 DEGs, respectivamente), sobre todo en comparación con H2 (336 DEGs), sugiriendo dos procesos claramente separados. Además, el bajo número de DEGs compartidos por H1 con H2 o H3, y el alto número de DEGs comunes entre H2 y H3, indica que el punto intermedio H2 es más parecido a H3 que a H1. Los estudios de expresión genética llevados a cabo posteriormente indican que estos dos procesos están relacionados con la respuesta de defensa, en el caso de H1, y los procesos de cicatrización y regeneración tisular, para H2 y H3.

Como era de esperar, la mayoría de los procesos de defensa y estrés inducidos en H1 corresponden a procesos de estrés oxidativo (Diehn et al., 1993; Mohan et al., 1993), o la inducción de estrategias defensivas que implican enzimas hidrolíticas que atacan la pared celular de patógenos oportunistas. Además, se encontraron genes inducidos implicados en la síntesis de etileno, implicado en la respuesta al daño mecánico en plantas (Saltveit and Dilley, 1978), así como genes implicados en la señalización del ácido jasmónico, conocido por disparar una compleja respuesta que activa la expresión de genes inducidos por heridas localmente (Rojo et al., 1999). La Figura 4 muestra cuatro diagramas de Venn que relaciona los 1408 DEGs encontrados en el presente trabajo, divididos en sobreexpresados y reprimidos para las fases H1, H2 y H3, con aquellos genes implicados en la formación de madera temprana (1448 DEGs) y tardía (1705 DEGs) en el pino canario. De los 352 DEGs relacionados con el desarrollo de madera temprana, 234 mostraron represión durante la respuesta a heridas. Por esto, se sugiere que la fase H1 se caracteriza por la represión de genes implicados en la formación de madera temprana, aun teniendo en cuenta que la muestra representativa de H1 se tomó en primavera.

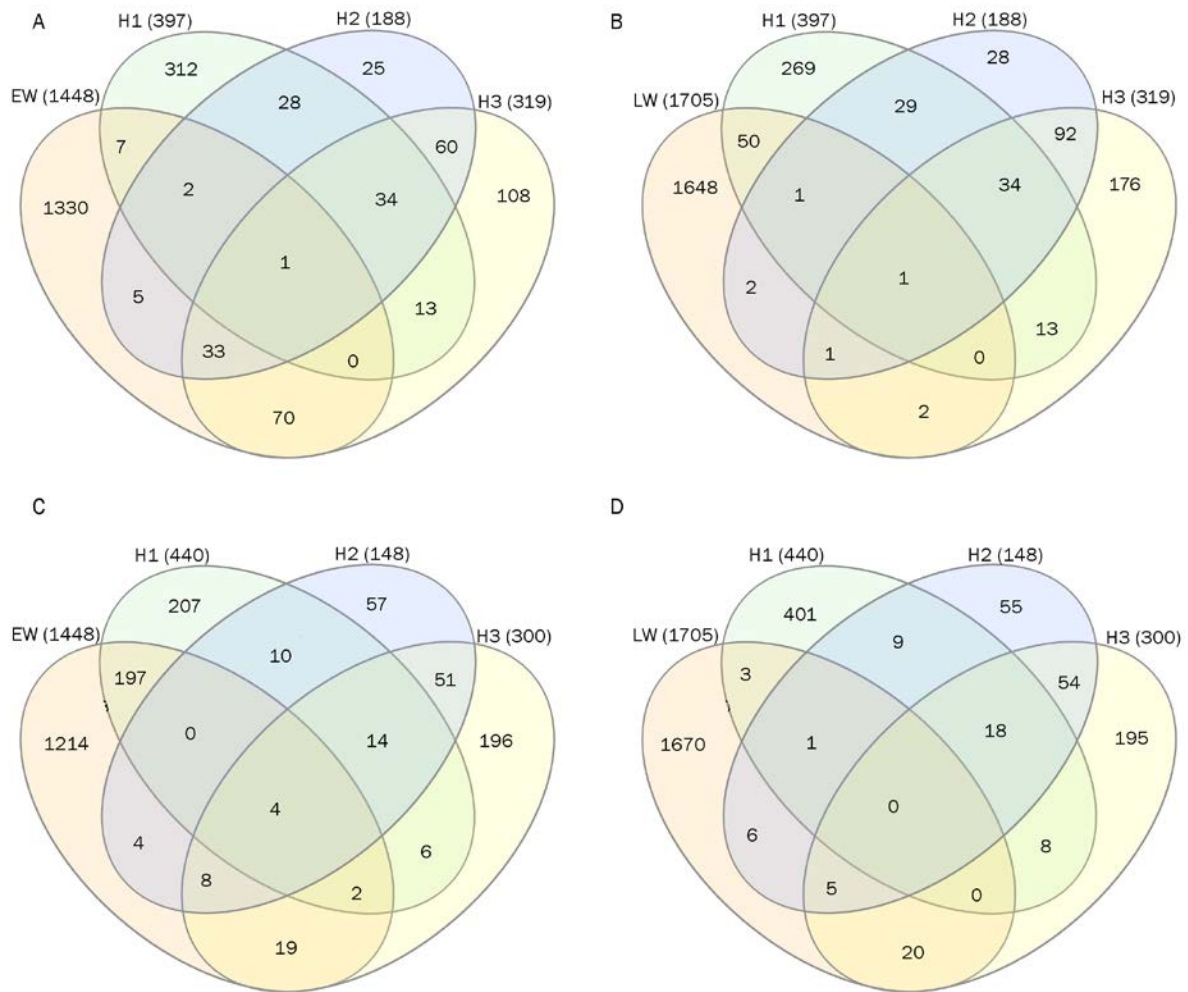


Figura 4. Cuatro diagramas de Venn que relacionan los DEGs sobreexpresados durante la respuesta al daño con DEGs de madera temprana (A) y tardía (B), y DEGs reprimidos durante la respuesta al daño con DEGs de madera temprana (C) y tardía (D).

Desde otro punto de vista, genes relacionados con respuesta a estrés y procesos de defensa mostraron sobreexpresión en H1 y represión en H3. Muchos de estos genes también se expresan de manera constitutiva en la formación de madera tardía, como se ha descrito para *Cryptomeria japonica* (Mishima et al., 2014). Por otro lado, tan sólo 118 DEGs relacionados con la madera temprana en el pino canario mostraron sobreexpresión durante todo el proceso de respuesta analizado, y 111 de ellos fueron inducidos durante las fases H2 y H3, simultáneamente a la formación de madera tardía en las zonas alejadas de la herida. La alteración en la expresión de estos genes posiblemente contribuya a los cambios en los rasgos anatómicos y estructurales observados en la madera traumática.

Observamos por tanto dos fases en la respuesta a la herida. En primera instancia se interrumpe la formación de madera y se expresan sobreexpresan genes relacionados con procesos de defensa y respuesta a estrés. En una segunda fase, se produce un tejido de cicatrización en el que se observa la expresión de genes relacionados con la formación de madera temprana y la represión de genes específicos de madera tardía. La formación de madera temprana supone un menor coste metabólico

en comparación con la madera tardía, que presenta paredes secundarias más gruesas y fuertemente lignificadas, así como canales resiníferos y actúa como una defensa preventiva frente a posibles daños e infecciones durante la parada invernal. De este modo, nuestros resultados sugieren que el árbol responde al traumatismo desplegando una respuesta defensiva inmediata frente a posibles patógenos y, posteriormente, tratando de cerrar la herida lo más rápidamente posible, con un xilema traumático de rápida formación, en detrimento del desarrollo de una madera tardía de crecimiento más lento y metabólicamente costosa

6. Conclusiones

Pinus canariensis muestra una notable efectividad durante la cicatrización después de sufrir un daño mecánico (Chano et al., 2015). Además, las dinámicas moleculares durante este proceso han desplegado una serie de rutas de señalización involucrando defensa local, respuesta a estrés, y actividad meristemática implicada en la formación de xilema. Una semana después de producirse el daño mecánico se detecta la inducción de procesos de defensa y respuesta a estrés, implicando genes relacionados con la respuesta a estrés oxidativo y patogénesis. DEGs relacionados con el desarrollo de madera temprana fueron reprimidos en H1, y en algunos casos inducidos en H2 y H3, durante la formación del xilema traumático. Por el contrario, genes relacionados con procesos de defensa, fueron inducidos durante H1. Nuestros resultados sugieren que, tras la respuesta inmediata a la herida, con la expresión de genes de defensa, el árbol destina sus recursos a la formación de un xilema traumático de crecimiento rápido para cerrar la herida, sin llegar a formar madera tardía.

7. Agradecimientos

Este trabajo ha sido respaldado por los proyectos AGL2009-10606 (MINECO), SPIP2014-01093 (Agencia Española de Parques Nacionales, MAGRAMA), y FP7-KBBE-2011-5 289841. VC ha tenido una beca predoctoral por el MINECO.

8. Bibliografía

- Asahina, M., Azuma, K., Pitaksaringkarn, W., Yamazaki, T., Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M., et al. (2011). Spatially selective hormonal control of RAP2.6L and ANAC071 transcription factors involved in tissue reunion in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 16128–16132. doi:10.1073/pnas.1110443108.
- Chang, S., Puryear, J., and Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Report.* 11, 113–116. doi:10.1007/BF02670468.
- Chano, V., López, R., Pita, P., Collada, C., and Soto, Á. (2015). Proliferation of axial parenchymatic xylem cells is a key step in wound closure of girdled stems in *Pinus canariensis*. *BMC Plant Biol.* 15, 64. doi:10.1186/s12870-015-0447-z.
- Chano, V., López de Heredia, U., Collada, C., and Soto, A. (2017). Transcriptomic analysis of

secondary xylem formation during the growing season in *Pinus canariensis*.

Diehn, S. H., Burkhart, W., and Graham, J. S. (1993). Purification and partial amino acid sequence of a wound-inducible, developmentally regulated anionic peroxidase from soybean leaves. *Biochem Biophys Res Commun* 195, 928–934. doi:10.1006/bbrc.1993.2133.

Gentleman, R. C., Carey, V. J., Bates, D. M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., et al. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 5, R80. doi:10.1186/gb-2004-5-10-r80.

Hamada, K., Ogata, T., Fujiwara, S., and Hasegawa, K. (2009). Healing process of the wounds of the branches of the Japanese persimmon that were caused by girdling, scoring, and strangulation. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 120, 276–281. doi:10.1016/j.scienta.2008.11.014.

Kurczynska, E., and Hejnowicz, Z. (1991). Differentiation of circular vessels in isolated segments of *Fraxinus excelsior*. *Physiol Plant* 83, 275–80.

Mishima, K., Fujiwara, T., Iki, T., Kuroda, K., Yamashita, K., Tamura, M., et al. (2014). Transcriptome sequencing and profiling of expressed genes in cambial zone and differentiating xylem of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*). *BMC Genomics* 15, 219. doi:10.1186/1471-2164-15-219.

Mohan, R., Vijayan, P., and Kolattukudy, P. E. (1993). Developmental and tissue-specific expression of a tomato anionic peroxidase (*tap1*) gene by a minimal promoter, with wound and pathogen induction by an additional 5'-flanking region. *Plant Mol. Biol.* 22, 475–90.

Pang, Y., Zhang, J., Cao, J., Yin, S. Y., He, X. Q., and Cui, K. M. (2008). Phloem transdifferentiation from immature xylem cells during bark regeneration after girdling in *Eucommia ulmoides* Oliv. *J. Exp. Bot.* 59, 1341–1351. doi:10.1093/jxb/ern041.

R Foundation for Statistical Computing, Vienna, A. I. 3-900051-07-0 (2011). R Development Core Team. *R A Lang. Environ. Stat. Comput.* 55, 275–286. Available at: <http://www.r-project.org/>.

Rojo, E., León, J., and Sánchez-Serrano, J. J. (1999). Cross-talk between wound signalling pathways determines local versus systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 20, 135–142. doi:10.1046/j.1365-313x.1999.00570.x.

Sachs, T., and Cohen, D. (1982). Circular vessels and the control of vascular differentiation in plants. *Differentiation* 21, 22–26.

Saltveit, M. E., and Dilley, D. R. (1978). Rapidly Induced Wound Ethylene from Excised Segments of Etiolated *Pisum sativum* L., cv. Alaska: I. Characterization of the Response. *Plant Physiol.* 61, 447–50. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1091887&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Sena, G., Wang, X., Liu, H.-Y., Hofhuis, H., and Birnbaum, K. D. (2009). Organ regeneration

does not require a functional stem cell niche in plants. *Nature* 457, 1150–3. doi:10.1038/nature07597.

Stobbe, H. (2002). Developmental Stages and Fine Structure of Surface Callus Formed after Debarking of Living Lime Trees (*Tilia sp.*). *Ann. Bot.* 89, 773–782. doi:10.1093/aob/mcf137.

Sugimoto, K., Jiao, Y., and Meyerowitz, E. M. (2010). *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Dev. Cell* 18, 463–71. doi:10.1016/j.devcel.2010.02.004.

Wan, X., Landhäuser, S. M., Lieffers, V. J., and Zwiazek, J. J. (2006). Signals controlling root suckering and adventitious shoot formation in aspen (*Populus tremuloides*). *Tree Physiol.* 26, 681–687.

Warnes, G. R., Bolker, B., Bonebakker, L., Gentleman, R., Liaw, W. H. A., Lumley, T., et al. (2015). gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data. *R Packag. version 2.17.0.*, 2015. doi:10.1111/j.0022-3646.1997.00569.x.

Zhang, J., Gao, G., Chen, J. J., Taylor, G., Cui, K. M., and He, X. Q. (2011). Molecular features of secondary vascular tissue regeneration after bark girdling in *Populus*. *New Phytol.* 192, 869–884. doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03855.x.