

## PROCESOS MOLECULARES DE LA FORMACIÓN DE LA MADERA

Raúl Herrera, Marcelo Garcés y Luis Cancino

*Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca (Chile)*

Los procesos de desarrollo celular los constituyen intrincadas relaciones que, dado el avance de las nuevas técnicas moleculares, hemos ido conociendo con cierto detalle, pero cuya sincronía todavía estamos lejos de desentrañar.

Los árboles son organismos de larga vida que presentan mucha variabilidad genética. El tiempo involucrado en el crecimiento y los efectos del medio ambiente son bastante elevados para la mayoría de los rasgos económicos importantes. Así, en estas especies, el proceso de cultivo y selección es muy lento, haciendo que los programas de mejoramiento forestal sean una parte importante de la silvicultura intensiva. Si bien se ha avanzado en refinar técnicas de selección, aún existen varias limitaciones en el momento de aplicarlas, las cuales incluyen el tiempo que se necesita para alcanzar la madurez sexual y el tiempo requerido para evaluar el desarrollo del crecimiento.

Es crucial, entonces, conocer cómo se produce la formación de la madera para definir los elementos biológicos con los cuales fundamentar un proceso de selección. La formación de la madera es un proceso complejo en el que las células del xilema y del cambium participan activamente en la síntesis de los metabolitos que forman parte de ella. Más aún, son estas células las que responden cuando el tronco pierde la verticalidad por efecto de algún tipo de agresiones (viento, nieve). El proceso en sí es una condición celular única, donde tienen lugar varias etapas sincronizadas finamente y que incluyen: 1) división celular, 2) expansión y elongación de la célula, 3) exudación de metabolitos y formación de pared secundaria y 4) muerte celular.

Una mirada a un corte transversal del tronco de un árbol nos presenta, al menos, 6 tipos distintos de madera: 1) la madera temprana, formada durante la primavera, 2) la madera tardía, formada durante el verano, 3) la madera juvenil, formada durante los primeros estados de desarrollo, 4) la madera adulta, formada durante el crecimiento después de alcanzar madurez sexual, 5) la madera de reacción y 6) la madera de compresión, ambas formadas en respuesta a la pérdida de la verticalidad del fuste. Cada una posee características propias y bien definidas y se detecta que el proceso es más lento durante la formación de madera tardía, que incluye una mayor acumulación de lignina (Plomion y cols 2001; Plant Phys 127:1513-1523).

Con una mirada hacia el interior de los componentes moleculares se puede apreciar que la pared celular está compuesta de múltiples capas que se fabrican

coordinadamente durante la diferenciación en cada etapa descrita. La primera en ser formada es la lámina media, luego, la pared celular primaria, que está compuesta de muchas capas de microfibrillas dispuestas sin orden. Cuando la célula alcanza su tamaño definitivo, se forma la pared secundaria, dentro de la pared primaria. Esta nueva pared es la más importante en términos de fuerza mecánica. La pared secundaria está subdividida en tres capas diferentes: S1, S2 y S3 y cada una de estas capas, compuestas de microfibrillas de celulosa, alineadas de manera paralela, que cambian de capa a capa (Timell, 1986; en *Compression wood in gymnosperms*. Springer-Verlag). Las hemicelulosas y la lignina también están presentes en cada una de estas capas. Estas tres capas S se pueden modificar durante la maduración celular, cambiando la cantidad de lignina y celulosa en la pared secundaria, lo que otorga unas características particulares al tipo de madera de que se trate.

En un análisis anatómico y estructural, que compare madera temprana y madera tardía, se observa que las traqueidas son cortas, la pared delgada, poseen mayor ángulo de microfibrilla, gran contenido de celulosa y bajo contenido de lignina. A su vez, entre la madera juvenil y la madura, encontramos que las traqueidas son más cortas, poseen un gran lumen, presentan la pared delgada, mayor ángulo de microfibrilla, baja densidad y más madera de compresión (más lignina y menos contenido de celulosa). Así, el anillo de crecimiento en el tronco delata las fluctuaciones ambientales que se manifiestan en cada temporada. El cambio en la formación de madera más lignificada (madera tardía, madera dura) está marcada por un gran incremento en la gravedad específica de ésta, la cual, a su vez, está asociada con un aumento en el grosor de la pared celular e implica una mayor calidad de la pulpa. De esta manera, los cambios ambientales y las fluctuaciones en la formación de madera temprana y tardía redundan en las cualidades de productos para la industria papelera que incrementan la densidad de madera o cambian los patrones de lignina, cuyo contenido es muy costoso en la extracción de celulosa. Desde una perspectiva molecular, este proceso de múltiples pasos involucra la expresión de un número de genes estructurales, coordinados por factores de transcripción, principalmente involucrados en la biosíntesis de polisacáridos (entre el 40 y el 50% de la madera es celulosa, el 45% es hemicelulosa y el resto pectinas), lignina (entre el 25 y el 35%) y proteínas de la pared celular. Un gran número de ellos determina la composición de la pared celular y la forma que tienen las

células. Los antecedentes que apoyan estas conclusiones se han obtenido por análisis bioquímicos clásicos, la aplicación de herramientas génicas (Le Provost y cols 2003; *Planta* 217: 820-830), el estudio de perfiles de expresión proteica (Plomion y cols 2000; *Plant Physiol* 123: 959-969) y el análisis de una gran colección de mutantes de *Arabidopsis thaliana* (Fagard y cols 2000; *Plant Physiol Biochem* 38: 15-25).

La pérdida de la rectitud de fuste desencadena una serie de cambios bioquímicos en la pared celular, caracterizados por el estrés de tensión (angiospermas) o compresión (gimnospermas) en la periferia del tronco. En respuesta a estos estímulos, el patrón de crecimiento de los árboles estresados se puede modificar con la formación asimétrica, respecto de la madera normal. El estrés llega a ser manifiesto en una disección del tallo, en el que el tejido externo es más corto que el largo original del internodo disectado y el interno es más alargado.

La madera de compresión se caracteriza por varias anomalías en términos químicos, anatómicos, ultraestructurales, físicos y propiedades mecánicas. Se han observado cambios en la forma de las traqueidas (más cortas longitudinalmente y redondas transversalmente). La pared celular está más lignificada (principalmente con residuos de p-hidroxifenil-guaiacilo), lo cual aumenta la fuerza compresiva de la madera. En la compresión también se observan, entre las microfibrillas, fisuras o cavidades que se llenan, entre otras, de moléculas como 1,3-glucanos, que tienen un gran potencial para embeber agua e hincharse. También se ha observado en la madera de compresión una médula excéntrica, gran densidad y un mayor ángulo de la microfibrilla de celulosa (30 a 50° comparado a lo normal), bajo contenido de celulosa y una coloración café-rojizo. Por su parte, entre madera opuesta y madera normal, se observan anillos de crecimiento muy angostos, poca madera tardía, traqueidas más largas, reorganización de las traqueidas (regular en la madera temprana, a menudo irregular en la madera tardía), una capa S3 más gruesa y mayor variabilidad en el ángulo de microfibrilla. Todas estas características fenotípicas reflejan la elevada complejidad del proceso de formación de la madera y permiten inferir que las diferencias químicas, anatómicas y estructurales serían el resultado de la expresión diferencial de genes/proteínas en el xilema.

Desde una perspectiva molecular, queda claro entonces que en cada uno de los procesos hay expresión diferencial de los genes que facilitan la formación de cada una de las estructuras y exudados. ¿Cuáles son los genes que participan del proceso? ¿Cómo identificar la secuencia de participación de dichos genes? ¿Cómo se produce la respuesta al estrés de torsión?

La biología molecular proporciona varias técnicas para el reconocimiento de los productos de expresión. Los métodos de análisis de intermediarios de la expresión (transcritos), como *differential display*, cDNA-AFLP, SAGE, hibridación sustractiva, macro- y micromatrices (*microarray*), pueden informar sobre los genes que se expresan diferencialmente (Dunwell y cols 2001; *Biol. Research* 34:153-164). Estas técnicas, están basadas en la síntesis de un DNA complementario (cDNA), el cual es una copia del RNA mensajero (mRNA), que contiene la información de las proteínas expresadas en un momento determinado y son responsables de la respuesta celular para un proceso específico dado un tejido en particular. La identificación formal del gen se obtiene por la secuenciación de ellos. Así, estas secuencias de transcritos de expresión (EST) se pueden usar para conocer la función y la organización del genoma. La purificación de RNA en distintos tiempos de tratamiento permite determinar el orden del patrón de expresión.

Como se ha descrito, la mayoría de las respuestas de compresión de la madera ocurren en el tejido del xilema. Para el efecto, se han construido genotecas de expresión de los genes expresados diferencialmente en xilema de coníferas (*Pinus taeda*, *Pinus pinaster*), los cuales se han depositado en las bases de datos públicas. Del mismo modo, se han clonado y analizado los genes expresados diferencialmente en la madera de tensión, tanto para eucaliptos como para álamo (chopo).

En ambas especies se han realizado estudios de expresión masiva (micromatrices), que han permitido el estudio simultáneo de 350 genes involucrados en la formación de madera en el pino (Egertsdotter y cols 2004; *Plant Biol.* 6:654-663) y 2 995 genes de álamo (Hertzberg y cols 2001; *Plant J.* 25: 585-591). En ambos casos se observó que hay expresión de los genes involucrados en la síntesis de celulosa y hemicelulosa en todo el periodo de crecimiento. Del mismo modo, estos estudios transcripcionales confirman las observaciones fenotípicas en relación a que los genes involucrados en la división celular, la elongación, la expansión y la síntesis de pectina se expresan preferentemente al inicio de la temporada, mientras que aquéllos involucrados en la síntesis de la lignina lo son en la temporada de verano, que se corresponde con la madera tardía. Los genes se expresan de manera secuencial y coordinada, facilitando la formación de la madera y permitiendo la respuesta celular en los procesos en los que se pierde la verticalidad de fuste. Esta respuesta ayuda a restituir el crecimiento vertical del ápice del tronco en lo que conocemos como respuesta gravitrópica.