

PERSISTENCIA DEL PINO CANARIO TRAS UNA PERTURBACIÓN DE GRAN MAGNITUD (PERSPICAN)

VÍCTOR CHANO, JOSÉ CARLOS MIRANDA, CARMEN COLLADA,
LUIS GIL, ROSANA LÓPEZ, UNAI LÓPEZ DE HEREDIA,
PILAR PITA, ÁLVARO SOTO¹

RESUMEN

El pino canario (*Pinus canariensis*), especie endémica de las Islas Canarias, presenta dos situaciones muy dispares en los Parques Nacionales donde está presente. Así, mientras es la especie dominante en el PN de la Caldera de Taburiente, ocupa una posición marginal en el PN del Teide, aunque el Parque Natural de la Corona Forestal que lo circunda está asimismo dominado por esta especie.

Los pinares del archipiélago están sometidos a incendios recurrentes y, si bien el pino presenta una buena adaptación a los mismos, mediante la reproducción sexual y el rebrote, una excesiva frecuencia e intensidad de los incendios puede comprometer su futuro. Además, como las erupciones del s. XX o la de 2011 frente a El Hierro pusieron de manifiesto, no es descartable que un evento volcánico intenso pueda afectar en el futuro a las islas, incluyendo los Parques Nacionales, y arrasando las formaciones boscosas.

El proyecto PERSPiCAN (Persistencia del Pino CANario tras una perturbación de gran magnitud) exploró las excepcionales características de esta especie, que permiten la supervivencia y regeneración de sus masas tras este tipo de eventos y que pueden ser clave en el contexto del cambio climático. Se examinaron las bases moleculares que subyacen a su capacidad de cicatrización y rebrote, fundamentales para la supervivencia de los individuos. Se analizó también el comportamiento de distintas procedencias para responder al estrés por bajas temperaturas, uno de los principales factores limitantes en las localizaciones a mayor altitud.

Este proyecto contribuye a la puesta en valor de esta especie, a menudo despreciada precisamente por su abundancia y capacidad de regeneración. Los resultados son también relevantes para la elaboración de un plan de contingencia referido a la selección de material que pudiera ser necesario para facilitar la regeneración del pinar tras un evento catastrófico, sobre todo en su límite altitudinal.

Palabras clave: Pino canario, *Pinus canariensis*, Regeneración, Cicatrización, Rebrote, Estrés abiótico.

¹ GI Sistemas Naturales e Historia Forestal. Dpto Sistemas y Recursos Naturales. ETSI Montes, Forestal y del Medio Natural. Universidad Politécnica de Madrid. c/José Antonio Novais, 10 28040 Madrid
alvaro.soto.deviana@upm.es

PERSISTENCE OF CANARY ISLAND PINE AFTER A MAJOR DISTURBANCE (PERSPICAN)

ABSTRACT

The Canary Island pine (*Pinus canariensis*), a species endemic to the Canary Islands, presents two very different situations in the National Parks where it is present. Thus, while it is the dominant species in the Caldera de Taburiente National Park, it occupies a marginal position in the Teide National Park, although it is the dominant species in the surrounding Forest Crown Natural Park.

The pine forests of the archipelago are subjected to recurrent fires. Although this species is well adapted to wildfire, through sexual reproduction and resprouting, an excessive frequency and intensity of the fires may compromise the future of these forests. Furthermore, as the eruptions of the 20th century or the 2011 eruption close to El Hierro revealed, a future intense volcanic event affecting the islands, including the National Parks, and wiping out the forest formations cannot be ruled out.

The PERSPICAN project (PERSistence of the CANary Island Pine after a major disturbance) explored the exceptional characteristics of this species, which allow the survival and regeneration of its stands after catastrophic events and which may be key in the context of climate change. The molecular bases underlying its capacity for healing and resprout, which are fundamental for the survival of individuals, were examined, as well as the behavior of different provenances to respond to low temperatures, a main limiting factor at higher altitudes.

This project tries to highlight the importance of this species, often neglected precisely because of its abundance and regeneration capacity. The results are also relevant for the elaboration of a contingency plan in order to select adequate material that could be necessary to facilitate the regeneration of the pine forest after a catastrophic event, especially in its altitudinal limit.

Keywords: Canary Islands pine, *Pinus canariensis*, Regeneration, Healing, Resprout, Abiotic stress.

INTRODUCCIÓN

El pino canario (*Pinus canariensis* Chr. Sm. ex DC von Buch.) es la principal especie forestal del archipiélago canario además de ser uno de sus endemismos más notables. Este pino ocupa un amplio rango de ambientes, desde localidades áridas en el sur de Gran Canaria, donde convive con especies de matorral termo-esclerófilo, hasta laderas de orientación Nordeste sometidas a los vientos húmedos dominantes donde convive con el monteverde, e incluso las laderas del Teide, donde llega a los 2400 m de altitud. El pino canario llega a formar densas masas en las que se constituye como la principal especie de un ecosistema que alberga numerosos

endemismos vegetales y animales. Dentro de la Red de Parques Nacionales, el pino canario es la especie principal, determinante de la masa forestal del P. N. de la Caldera de Taburiente. Gracias a su potente sistema radical, el pino es capaz de arraigar en las laderas y puntos desprovistos de vegetación, ayudando a la consolidación de los suelos. Esto resulta trascendental en un ecosistema como el de Taburiente, que está sometido a una continua acción de desgaste de sus paredes, observable en los continuos derrumbes que arrastran materiales hasta el fondo de la Caldera. Su presencia en el P. N. del Teide se ve reducida a unos pocos ejemplares, si bien en los últimos tiempos se está produciendo una expansión desde las densas masas que forman parte de la zona de pre-Parque que constituye el

Parque Natural de la Corona Forestal. Las condiciones climáticas previstas para los próximos años facilitarían este proceso colonizador.

Por otra parte, las islas Canarias son la única región de España con vulcanismo activo donde ha habido erupciones volcánicas recientes y hay riesgo de que se produzcan más en el futuro, como bien se ha puesto de manifiesto con la erupción al sur de la isla de El Hierro en octubre de 2011 y el seísmo de magnitud 5.1 en diciembre de 2013. Tenerife, La Palma, Lanzarote y el Hierro han sufrido erupciones en los últimos siglos y son volcánicamente activas y tanto el P. N. del Teide como el P. N. de la Caldera de Taburiente son claros ejemplos del efecto del vulcanismo. El P. N. de El Teide está constituido por las coladas de las distintas erupciones de este volcán y que se extendieron por las dorsales del edificio Cañadas (ANCOCHEA *et al.* 1999). La última erupción del Teide fue hace 1240 años (CARRACEDO *et al.* 2003), pero hasta hace relativamente poco tiempo, siguió habiendo actividad volcánica en las cercanías del Parque Nacional (volcán Chinyero en la dorsal de Abeque en 1909). Por su parte, la Caldera de Taburiente es el resultado de una erupción extremadamente agresiva, cuyo colapso más reciente tuvo lugar hace *c.* 560.000 años (GUILLOU *et al.* 2001). En La Palma, el vulcanismo sigue activo en la zona sur, como atestigua la erupción en 1971 del volcán de Teneguía.

A la vista de los registros mencionados en el apartado anterior, no es descartable que en un futuro se produzca un evento catastrófico de naturaleza volcánica, quizá acompañado de un incendio incontrolable que deje en alguna de estas zonas un ambiente extraordinariamente xérico, sin cobertura vegetal y con un suelo extremadamente seco, sin capacidad de retención de agua, características que podrían verse acentuadas por el cambio climático. La rápida recuperación de los ecosistemas sería de máxima prioridad en tal caso, y evidentemente el pino canario jugaría un papel protagonista en la recolonización del ambiente hostil resultante.

El pino canario presenta dos estrategias de respuesta frente a estas circunstancias (CLIMENT *et al.*, 2004). Por un lado, y como otros pinos adaptados a incendios recurrentes, forma conos

serotinos, que permanecen cerrados en el árbol durante años, y sólo se abren tras haber alcanzado temperaturas muy altas, como pueda ocurrir en un incendio. Pero además presenta una característica muy singular entre las coníferas, sólo compartida entre las pináceas por otros pinos de ambientes volcánicos, como es la capacidad de rebrote desde el tronco, recuperando la copa y la capacidad fotosintética en poco tiempo. Esta capacidad de rebrote también está asociada a una capacidad de cicatrización muy superior al resto de pináceas, pudiendo cerrar heridas de gran tamaño como las que pueden causar los piroclastos desprendidos en una erupción. Rebrote y cicatrización, unidos a la protección ejercida por la gruesa corteza, dotan al pino canario de una excepcional capacidad de persistencia individual tras el traumatismo. Sin embargo, el consumo de reservas que implica puede comprometer por un tiempo prolongado la capacidad de resistencia frente a ulteriores estreses, como ilustra la elevada mortalidad por sequía en 2012 tras los devastadores incendios de 2007. Los escenarios previstos de cambio climático para los próximos años, con un aumento generalizado de las temperaturas, una mayor frecuencia e intensidad de las olas de calor, así como una mayor duración y severidad de los periodos de sequía (AEMET, 2021), favorecerán el desarrollo de estos incendios recurrentes, así como su intensidad.

El principal objetivo del proyecto PERSPICAN (Persistencia del pino canario tras una perturbación de gran magnitud) ha sido caracterizar la respuesta de los recursos genéticos del pino canario presentes en los Parques Nacionales del Teide y de la Caldera de Taburiente, frente a un eventual suceso catastrófico (erupción volcánica o incendio de gran magnitud e intensidad), centrándose tanto en la respuesta dirigida a la persistencia de los individuos mediante cicatrización y rebrote (analizando los patrones de expresión genética, control hormonal, consumo de reservas y los efectos de la herida y defoliación sobre la fisiología de la raíz, etc.) como en el comportamiento frente a las nuevas condiciones de estrés abiótico resultantes tras la perturbación, prestando especial atención a los individuos situados en localizaciones excepcionales por su altitud, que deben afrontar simultáneamente condiciones de sequía y frío extremos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Para los distintos experimentos se emplearon ejemplares de pino canario procedentes de semilla, establecidos en las instalaciones de la ETSI Montes, Forestal y del Medio Natural de la Universidad Politécnica de Madrid. Los piñones se germinaron en bandeja, sobre perlita, y las plántulas se transfirieron a contenedores cónicos de 650 ml. con un sustrato de turba:vermiculita 3:1 (v/v). Tras el primer año en invernadero, se trasladaron al exterior, en contenedores de 3 litros o se plantaron directamente en eras acondicionadas al efecto.

Con objeto de analizar el desarrollo anatómico de la cicatrización, se realizaron heridas de tipo ventana a mitad de fuste en 12 plantas de 3 años, retirando la corteza, el cambium vascular y las capas más superficiales del xilema secundario. Las heridas tenían una altura de 4 cm y abarcaban la mitad de la circunferencia del tallo. Otras 12 plantas fueron completamente anilladas, retirando corteza y cambium en una altura de 2 cm.

Para el análisis de la expresión genética asociada a los procesos de cicatrización y rebrote inducidos por traumatismos en el fuste, se realizaron heridas similares en plantas de 5 años.

Para cada uno de estos análisis transcriptómicos se tomaron muestras de al menos tres individuos no relacionados en cada punto de muestreo. El material seleccionado se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C hasta la extracción del ARN.

Cuando las plantas contaban con 5 años, se realizó un experimento de defoliación completa, en algunos casos acompañada de la ejecución de heridas en el fuste, ocupando alrededor del 10% de la superficie total del mismo, durante dos años consecutivos, con objeto de comprobar el efecto producido por una perturbación recurrente sobre un árbol con las reservas ya reducidas, en comparación con plantas control, no heridas ni defoliadas.

La respuesta al frío se analizó en plantas de dos savias procedentes de:

- Arguineguín (Gran Canaria), correspondiente a la estación más xérica del área de distribución.
- PN El Teide (Tenerife).
- PN Caldera de Taburiente (La Palma).

Observaciones anatómicas

Se obtuvieron secciones de 20 μm de grosor de los tallos seleccionados empleando un micróscopo Leica SM2400 (Leica Biosystems, Nussloch, Alemania). Las secciones se trataron con hipoclorito sódico, se lavaron con agua destilada 2-3 veces y se tiñeron durante dos minutos con safranina 1% (v/v) y durante un minuto con azul alcian 1% (p/v), para su observación bajo luz visible, o bien se trataron con floroglucinol 1% (p/v) y HCl 35% para su observación bajo luz ultravioleta.

Análisis fisiológicos

Se registraron las variaciones diametrales diarias del tronco de los árboles heridos y/o defoliados mediante sensores de desplazamiento (LVDT). Se analizó el consumo de reservas durante la recuperación, estimando las variaciones de los carbohidratos no estructurales (siguiendo la metodología descrita por OLEKSYN *et al.* 2000). Además, tanto en las acículas como en las raíces y en sus respectivas fracciones solubles en agua, así como en exudados de floema, se analizó la composición isotópica del carbono (d^{13}C) mediante un espectrómetro de masas (Delta S, Finnigan MAT, Bremen, Alemania), para trazar el destino de los nuevos carbohidratos sintetizados tras el rebrote.

Para evaluar la respuesta al frío de las distintas procedencias se utilizaron plantas de dos savias en contenedor. Se evaluó la evapotranspiración gravimétricamente, como se describe en LÓPEZ *et al.* (2015), en distintos momentos de la temporada otoño-invierno, cuando se alcanzaron temperaturas por debajo de 0°C en varias ocasiones.

Se cuantificó el grado de ajuste osmótico construyendo curvas presión-volumen y se realizaron mediciones de intercambio gaseoso y fluorescencia de la clorofila con los equipos Li-6400

y Li-6400-40 (Li-Cor, Lincoln, NE, USA), como se describe en LÓPEZ *et al.* (2015).

Análisis transcriptómicos

Se extrajo ARN de las distintas muestras recogidas y conservadas a -80°C usando CTAB y precipitación con CILi siguiendo el método descrito por CHANG *et al.* (1993).

Para la construcción de genotecas se siguió el protocolo descrito en CHANO *et al.* (2017). Las genotecas se secuenciaron por pirosecuenciación empleando un sistema Roche 454 Genome Sequencer FLX Titanium (Roche/454 Life Sciences, CT, USA). Las lecturas obtenidas se ensamblaron usando el programa bioinformático Newbler v.2.5 (Roche/454 Life Sciences, CT, USA). Las secuencias se anotaron en función de las homologías obtenidas mediante el programa BlastX (ALTSCHUL *et al.* 1990) frente a la base de datos de *Viridiplantae* de RefSeq (NCBI).

El nivel de transcripción de los genes se evaluó mediante microarrays de uno y dos colores, diseñados específicamente para cada caso (Agilent Technologies, Palo alto, CA, USA). Los microarrays se hibridaron en el Servicio de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología.

Además, los perfiles de expresión obtenidos se validaron mediante PCR cuantitativa (qRT-PCR), realizada en un termociclador CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Biorad, USA), empleando el método delta-delta-CT corregido según la eficiencia de la PCR para cada gen (PFAFFL, 2001).

RESULTADOS

Funcionalidad del tallo y consumo de reservas en respuesta al traumatismo

Se simularon los daños producidos por eventos traumáticos recurrentes mediante la defoliación completa, acompañada o no por la realización de heridas en el fuste, en dos años consecutivos y se obtuvieron datos relativos a la funcionalidad del tallo a partir del registro continuado de las variaciones diametrales del tronco. En ambos años

de medición se encontraron amplias diferencias en crecimiento entre los controles y ambos grupos de árboles tratados a partir del día 43 tras el primer tratamiento (Figura 1). Sin embargo, tanto los árboles defoliados como los defoliados y heridos presentaron crecimientos similares. Las diferencias con el grupo de control se mantienen de forma constante en el resto del experimento, salvo en los periodos de parada vegetativa en los que no existe un crecimiento neto.

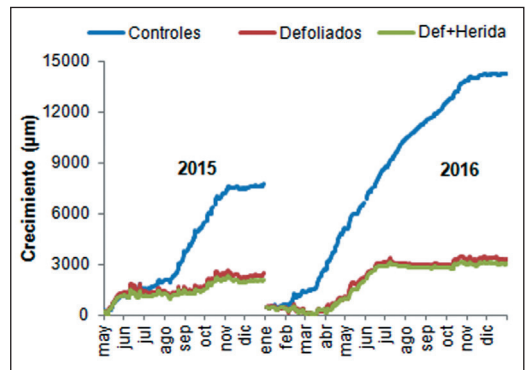


Figura 1. Incremento diametral medio acumulado por grupo durante 2015 y 2016.

Figure 1. Cumulative diametric increase per group during 2015 and 2016.

También se analizaron los valores de máxima contracción diaria, MDS (maximum daily shrinkage), que ofrece una aproximación de la deshidratación diaria debida a la transpiración. Como se esperaba, tras los tratamientos se observa una disminución drástica de dicha variación diaria. Esta diferencia entre los grupos tratados y los controles se manifiesta 2 y 3 días después del tratamiento y durante 59 y 78 días en el primer periodo y segundo periodo de tratamiento respectivamente (salvo por unos días en los que hubo precipitaciones intensas en el primer año) (Figura 2).

Se analizó asimismo el consumo de reservas producido por los procesos de cicatrización y rebrote. Para ello se muestrearon en momentos diferenciados de la recuperación acículas, xilema, floema y raíces, para estimar las variaciones de los carbohidratos no estructurales y de los isótopos estables del carbono ($d^{13}\text{C}$) en dichos tejidos

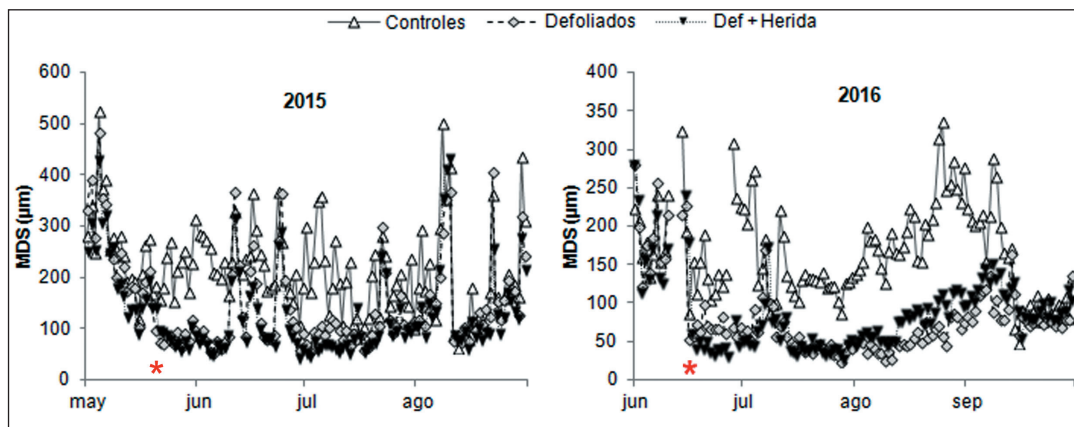


Figura 2. Valores medios de la máxima contracción diaria (MDS) durante el periodo anterior y posterior al tratamiento de defoliación y herida en 2015 y 2016. El asterisco rojo indica el momento de defoliación y/o herida.

Figure 2. Average values of maximum daily shrinkage (MDS) during the period before and after defoliation and wound treatment in 2015 and 2016. Red asterisk indicates the time of defoliation and/or wounding.

(Figura 3). Los valores de carbohidratos no estructurales muestran diferencias entre tratamientos y tejidos. En lo referente a azúcares solubles en agua, en general no existen diferencias entre los controles y los dos tratamientos. Este tipo de azúcares son los de rápida metabolización. Es en el almidón, un carbohidrato que no se metaboliza de una manera tan rápida y cumple funciones de almacén de reservas, donde se encuentran las mayores diferencias. Se constató que los árboles tratados llegaron a agotar las reservas de almidón de las que disponían en el floema del tronco, pero fueron capaces de recuperarlas durante el invierno siguiente. Sin embargo, no ocurrió lo mismo en las raíces. En este órgano, en los árboles tratados, el porcentaje de almidón cae por debajo de los valores de los árboles de control a partir del momento en que los árboles han generado una nueva masa foliar suficiente para recuperar la actividad fotosintética. A partir de dicho momento el almidón en raíces se sigue movilizandando y no llega a recuperar completamente los valores que presentan los árboles de control. Más aun, 3 de los 6 árboles que fueron tratados con una defoliación más traumatismo, agotaron sus reservas, y seguían agotadas al inicio del siguiente periodo vegetativo.

Los valores de isótopos estables de carbono en los diferentes tejidos, se modifican a partir del

primer muestreo tras el tratamiento. Las nuevas acículas surgidas a partir de los rebrotes son de morfología juvenil (inserción aislada), y parecen generar unos fotosintatos con un $d^{13}C$ menor que el de las acículas de morfología adulta (braquiblasto) de los árboles control. Esto genera que los exudados del floema e incluso la fracción soluble en agua de las raíces presenten también la influencia de estos fotosintatos, al tener estos últimos menor contenido de ^{13}C (Figura 4). También se puede apreciar que la nueva biomasa foliar está generada a partir de unos carbohidratos con menor $d^{13}C$, y por lo tanto en su mayor parte es producida por los nuevos fotosintatos, y no por las reservas almacenadas en las raíces, que tienen un mayor $d^{13}C$ (MIRANDA *et al.* 2020).

Se evaluó la tasa fotosintética y la conductancia estomática de estas nuevas hojas, en comparación con las acículas adultas, insertas en braquiblastos (Figura 5). Tras la repetición del tratamiento en el segundo año, se realizaron las mediciones de respiración en tronco. Los resultados muestran una mayor respiración del grupo control, debido a su mayor actividad metabólica (Figura 6). A diferencia de los grupos tratados, los árboles control continúan creciendo a lo largo de todo el periodo vegetativo, teniendo un cambium más activo.

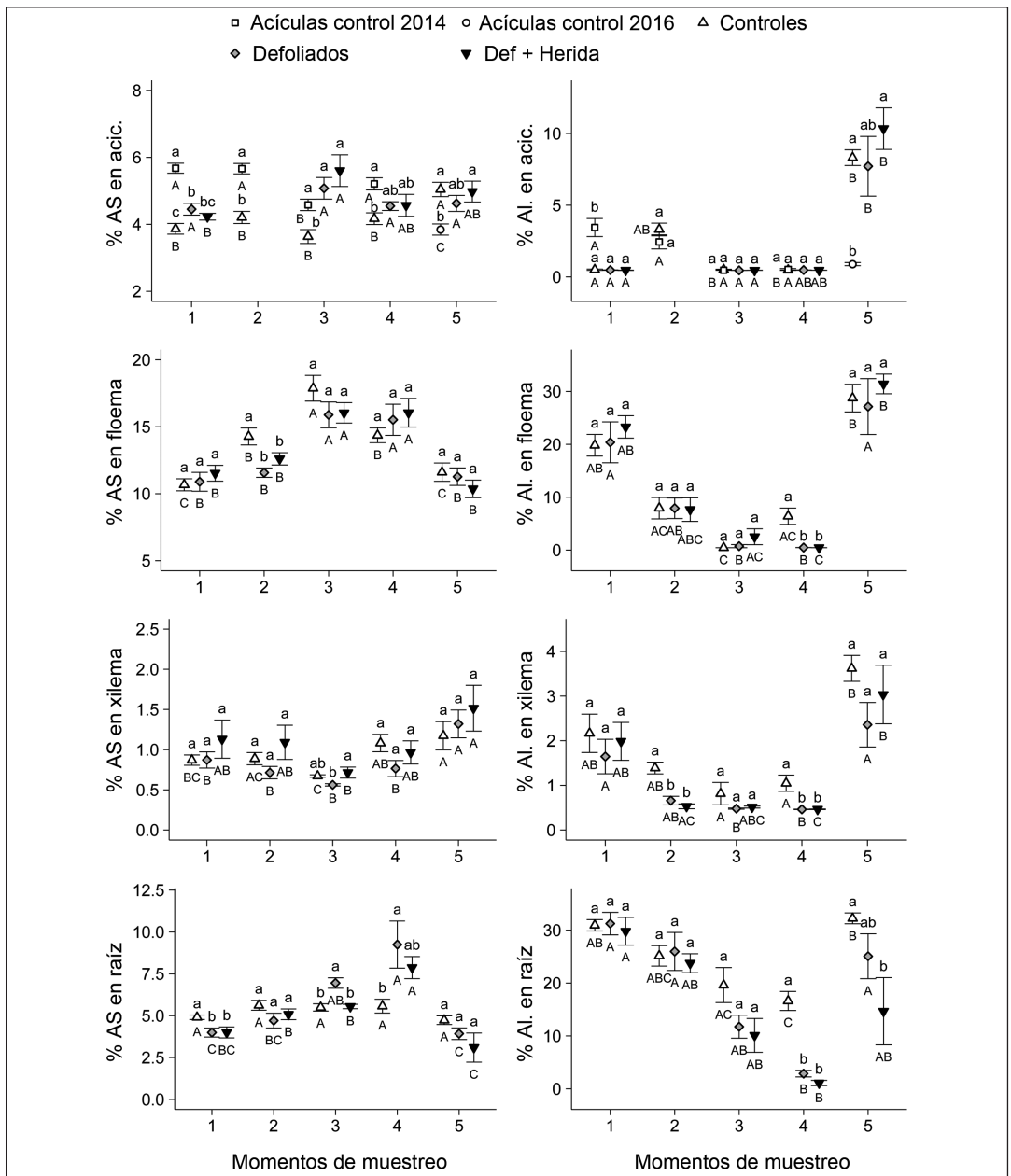


Figura 3. Valores de concentración medio de azúcares solubles (AS) y almidón (Al) en acículas floema y xilema de tronco y raíces en los 5 momentos de muestreo. 1: aplicación de tratamientos, 2: rebrote de yemas, 3: nuevos ramillos, 4: recuperación de crecimiento radial, 5: siguiente periodo vegetativo. Las letras minúsculas indican diferencias entre tratamientos en cada muestreo. Las letras mayúsculas indican las diferencias entre los distintos muestreos en cada tratamiento. Las barras verticales indican los errores estándar.

Figure 3. Mean soluble sugar (AS) and starch (Al) concentration in needles, stem phloem, stem xylem and roots on the 5 sampling times. 1: treatment application, 2: resprouting buds, 3: new shoots, 4: growth resumption, 5: next growing season. Lower case letters indicate differences between treatments in each sampling time. Capital letters indicate differences between sampling times in each treatment. Vertical bars indicate standard errors.

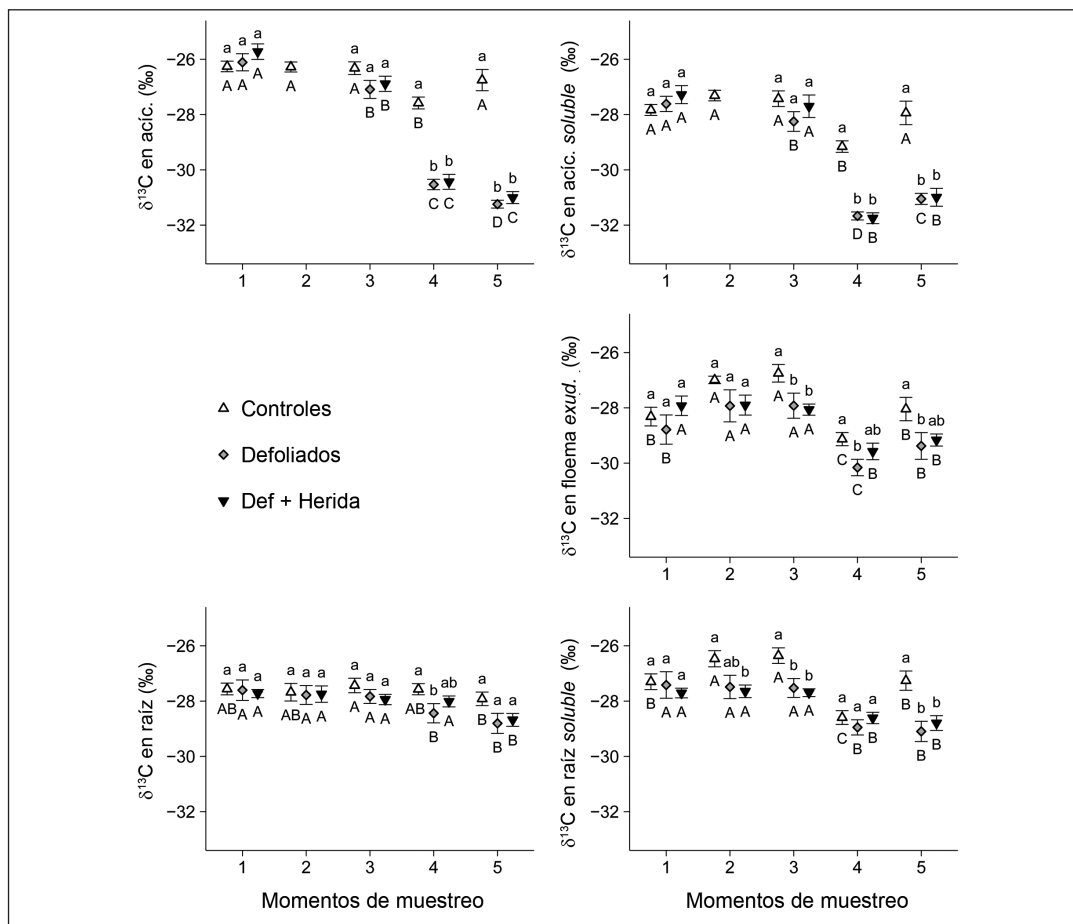


Figura 4. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ medio en acículas, fracción soluble de acículas, exudados de floema, raíces y fracción soluble en agua de raíces en los 5 momentos de muestreo. 1: aplicación de tratamientos, 2: rebrote de yemas, 3: nuevos ramillos, 4: recuperación de crecimiento radial, 5: siguiente periodo vegetativo. Las letras minúsculas indican diferencias entre tratamientos en cada muestreo. Las letras mayúsculas indican las diferencias entre los distintos muestreos en cada tratamiento. Las barras verticales indican los errores estándar.

Figure 4. Mean $\delta^{13}\text{C}$ values in needles, needle soluble fraction, stem phloem exudates, roots and root soluble fraction on the 5 sampling times. 1: treatment application, 2: resprouting buds, 3: new shoots, 4: growth resumption, 5: next growing season. Lower case letters indicate differences between treatments in each sampling time. Capital letters indicate differences between sampling times in each treatment. Vertical bars indicate standard errors.

Análisis anatómico del proceso de cicatrización

En el caso de las heridas de ventana, en las cuales la conexión floemática se mantiene a ambos lados de la herida, la cicatrización se produce fundamentalmente desde los bordes laterales. En ramas o fustes jóvenes, que aún conserven el córtex, la primera respuesta a la herida consiste en la suberización y lignificación de células del

parénquima cortical, por debajo del borde de la herida. Se trata de una barrera que dificulta la expansión de posibles organismos patógenos. A continuación, más al interior, se genera una peridermis traumática, a través del córtex, que conecta con la peridermis original y con el borde de la herida. En este borde se comienza a generar el tejido de cicatrización a través de la proliferación del cambium vascular. Las nume-

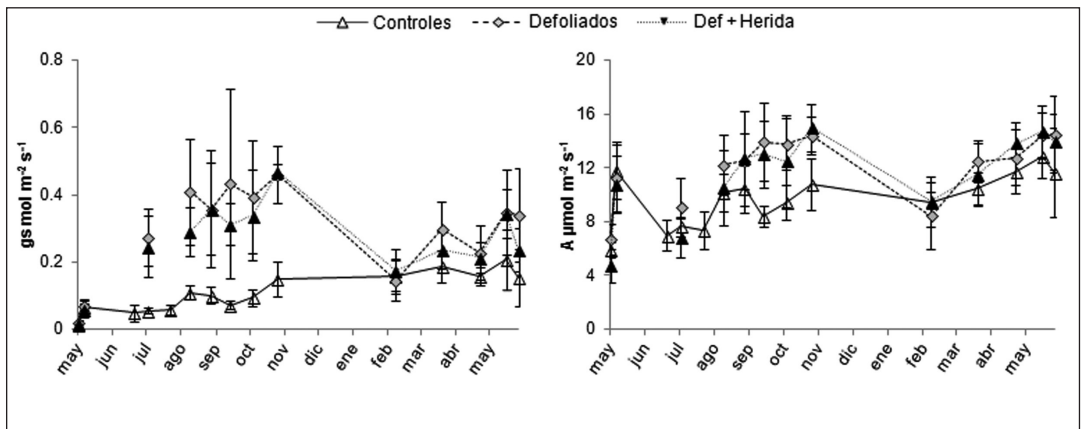


Figura 5. Valores medios de la conductancia estomática y la tasa fotosintética, tomadas en distintos momentos de la recuperación. Las barras verticales indican la desviación estándar.

Figura 5. Average values of the stomatal conductance and photosynthetic rate, taken at different times during recovery. Vertical bars indicate standard deviations.

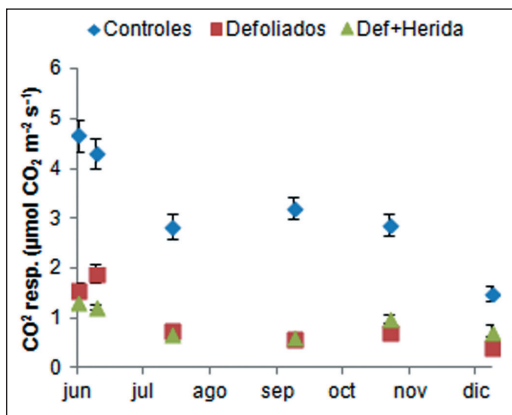


Figura 6. Valores medios de la respiración del tronco tomados tras el segundo tratamiento. Las barras verticales indican la desviación típica.

Figure 6. Mean values of stem respiration measured after the second treatment application. Vertical bars indicate standard deviation.

rosas divisiones anticlinales hacen que la línea cambial se curve hacia la superficie de la herida. La tasa de división anticlinal está negativamente relacionada con la distancia al borde de la herida. Simultáneamente, las primeras divisiones periclinales dan lugar a una proliferación centrífuga de tejido parenquimático, que desarrolla

en su extremo una peridermis; esta peridermis conecta con la peridermis traumática cortical antes mencionada. A continuación, el cambium vascular comienza a generar primero xilema y posteriormente floema, generando un borde de cicatrización que va creciendo directamente sobre la superficie de la herida, pero en su mayor parte sin conectar con ésta. El proceso de cierre de la herida puede prolongarse durante bastantes años, en función del tamaño de la herida y del estado fisiológico del árbol. En última instancia, ambos bordes contactan y se fusionan, volviéndose a cerrar la línea cambial. La parte ventral de este tejido cicatricial, en contacto con la superficie de la herida, presenta una gran proporción de células parenquimáticas (Figura 7). En el tejido cicatricial la orientación de las células (a menudo, malformadas) también se ve distorsionada (Figura 8). A diferencia de otros trabajos, incluso en coníferas, no hemos detectado crecimiento de tejido cicatricial a partir del floema ni de los radios (CHANO *et al.* 2015).

Por el contrario, en las heridas por anillado, en las que la conexión floemática se ve interrumpida entre ambos márgenes, inferior y superior, la cicatrización se produce principalmente desde el borde superior. En primera instancia, se aprecia cómo se hincha la parte superior, al verse inte-

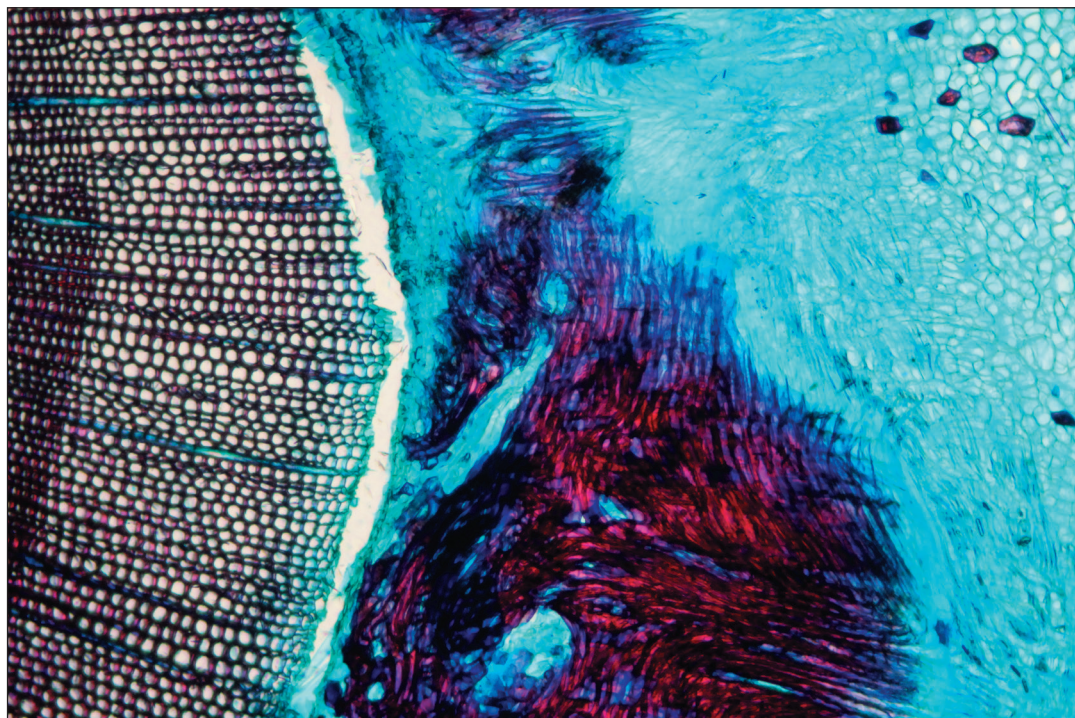


Figura 7. Corte transversal de una herida ya cerrada, mostrando gran cantidad de parénquima en el tejido cicatricial.

Figure 7. Cross section of a closed wound, showing a high proportion of parenchyma in the healing tissue.

rrumpido el flujo floemático. A continuación, se genera un callo en el borde superior, análogo al descrito para las heridas de ventana. Este callo avanza hacia el borde inferior de la herida, en el que no se produce ningún crecimiento; por el contrario, se aprecia una contracción radial en el mismo. En los árboles que mejor cicatrizan se forman sobre este callo una serie de protuberancias, que terminan desarrollando unas estructuras columnares, que son las que eventualmente llegan a contactar con el borde inferior, recuperando la conexión vascular. Más sorprendentemente, se ha observado que el parénquima axial asociado a canales resiníferos por debajo de la superficie de la herida inicia una proliferación, contribuyendo a crear estas columnas. Estas estructuras sirven además para anclar el tejido de cicatrización al conjunto del xilema (Figura 9). No se han observado estructuras similares en las heridas de ventana (CHANO *et al.* 2015).

Análisis transcriptómico de los procesos de cicatrización y rebrote

Para estudiar desde el punto de vista molecular la formación de la madera traumática, al no tratarse de una especie modelo, de la que hubiera suficiente información disponible en las bases de datos, se comenzó por analizar el perfil transcriptómico de la formación de madera constitutiva, en ausencia de traumatismos, durante un periodo de crecimiento. Se ensambló un transcriptoma de 44.849 contigs y 103.764 singletons, abarcando casi 26 Mpb. El análisis de los patrones de expresión permitió la identificación de genes característicos de la formación de la madera temprana y de la madera tardía, correspondiente ésta última al final del periodo de crecimiento, y caracterizada por células con menos luz, mayor grosor de la pared secundaria y por la mayor presencia de canales resiníferos (CHANO *et al.* 2017b).

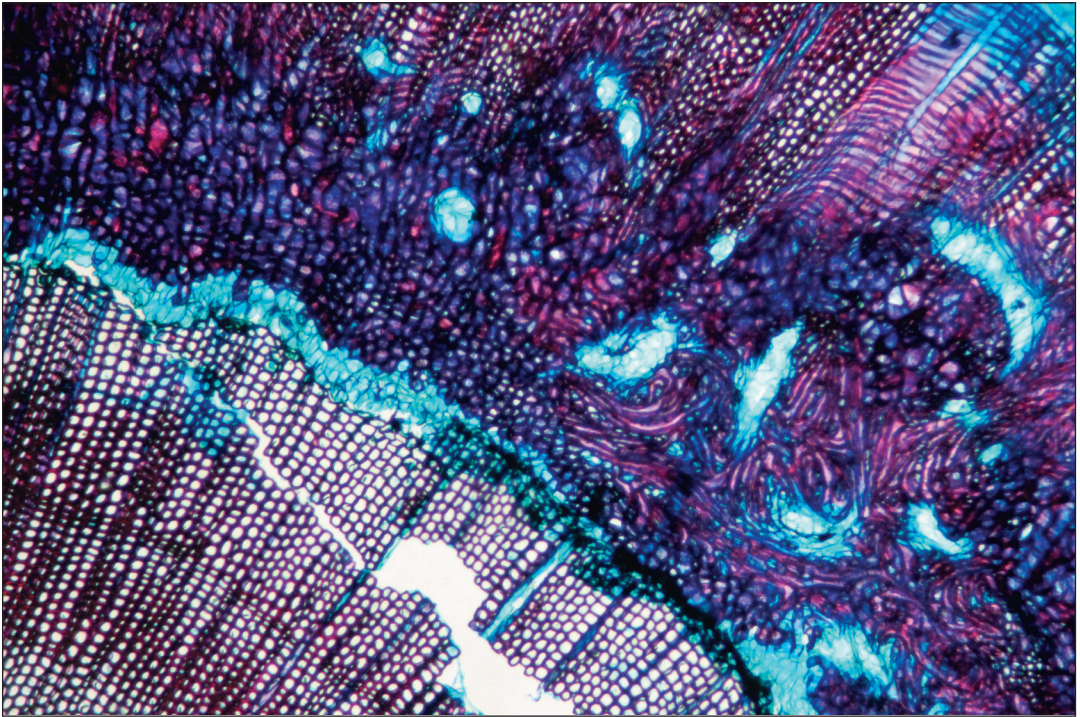


Figura 8. Corte transversal de tejido cicatricial, donde se aprecia la malformación y la distorsión en la orientación de las traqueidas.
Figure 8. Cross section of healing tissue. Please note the malformation and disorganization of xylem cells.

A continuación, se comparó la expresión génica en tres momentos del proceso de cicatrización (H1, H2 y H3; 1, 11 y 13 semanas desde la realización de la herida, respectivamente) con la observada en la xilogénesis no traumática. Se identificaron 1408 genes con expresión diferencial (DEGs) respecto a la xilogénesis constitutiva. El patrón de expresión de estos 1408 DEGs puede agruparse en 12 clústeres (Figura 10) (CHANO *et al.*, 2017a).

De manera general, se identifican grupos de genes fuertemente inducidos de manera inmediata, descendiendo a continuación su expresión o incluso siendo reprimidos en H2 y H3. Por el contrario, otros genes son inicialmente reprimidos en H1, recuperando sus niveles normales de expresión o incluso siendo sobreexpresados en H2 y H3, frente a la madera no traumática. Entre los inducidos en H1 destaca la presencia de genes re-

lacionados con la respuesta frente al estrés oxidativo (que se produce por la infección producida por patógenos oportunistas que acceden a través de la herida abierta) y con estrategias defensivas que implican enzimas hidrolíticas que atacan la pared celular de estos patógenos. Además, entre los genes inducidos se encontraron algunos relacionados con la síntesis de etileno, implicado en la respuesta al daño mecánico en plantas, así como genes implicados en la señalización del ácido jasmónico, que desempeña un papel fundamental en la respuesta a la herida. Simultáneamente, durante la fase H1 se observa 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. Por el contrario, durante las fases H2 y H3 se observa la sobreexpresión de genes relacionados con la formación de la madera temprana. En este sentido merece la pena destacar la inducción du-



Figura 9. Estructuras columnares que eventualmente permiten la reconexión floemática en las heridas por anillado.

Figura 9. Column-like structures, which eventually allow phloem reconnection after girdling.

rante la formación de la madera traumática de determinados genes implicados en la formación de la matriz de celulosas y hemicelulosas de la pared celular en la madera temprana, mientras que otros genes implicados en el mismo proceso en la madera tardía se ven reprimidos durante la formación de la madera traumática. Del mismo modo, el gen codificante de la CCoAOMT, fundamental en la síntesis de la lignina, se ve también reprimido durante la formación de la madera traumática, en comparación con la madera constitutiva. La alteración en la expresión de estos genes posiblemente contribuya a los cambios en los rasgos anatómicos y estructurales observados en la madera traumática (CHANO *et al.*, 2017a).

También se llevó a cabo el análisis transcriptómico del rebrote producido en respuesta al traumatismo y su comparación con el proceso de elongación de la yema apical. Según nuestras

observaciones, el rebrote en respuesta a traumatismos se produce a partir de las yemas axilares presentes en los braquiblastos de acículas adultas o, en su caso, en la axila de las acículas juveniles. De manera análoga al análisis transcriptómico de la cicatrización, se recogió material (corteza, incluyendo las cicatrices foliares y llegando hasta la zona cambial) una semana después de realizar heridas de ventana en el tronco de los árboles (R1), así como al cabo de 8 semanas (R2, cuando se empezaba a ver la emergencia del rebrote a partir de dichas yemas) y de 11 semanas (R3, cuando la elongación de los rebrotes ya era evidente). Se identificaron un total de 1164 DEGs. Estos genes se agruparon, en función de su patrón de expresión durante en rebrote, en 7 clusters (Figura 11). Además, dada la analogía de los procesos, se realizó también un análisis transcriptómico de la elongación de los brotes anuales, a partir de las yemas apicales del tallo y se compararon ambos procesos (Figura 12).

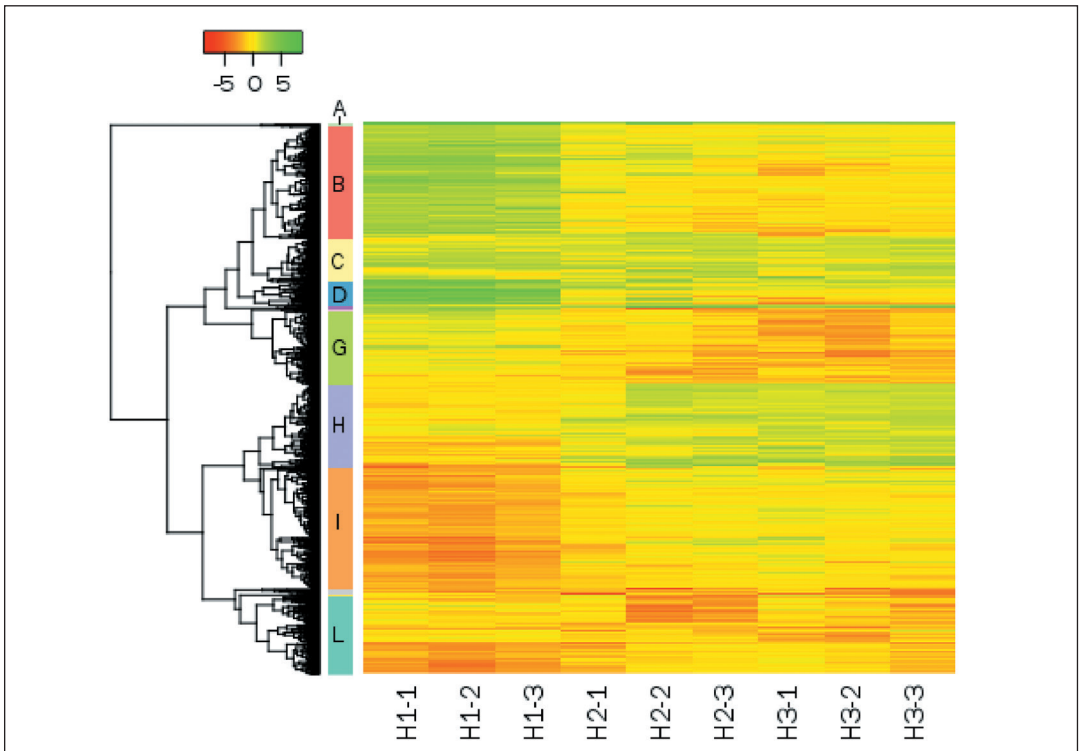


Figura 10. Agrupamiento de los genes diferencialmente expresados (DEGs) en 12 clústeres en función de su patrón de expresión durante la cicatrización. El color verde indica sobreexpresión, mientras que el rojo indica represión, en comparación con la formación de madera no traumática.

Figure 10. Grouping of differentially expressed genes (DEGs) in 12 clusters according to their expression patterns during healing. Green color indicates overexpression, while red indicates repression, compared to non-traumatic wood formation.

Se identificaron dos etapas clave durante el proceso de rebrote en respuesta a traumatismos. La primera, que comprende a las muestras recogidas en R1, corresponde con la respuesta inmediata de la planta al estrés producido por la herida, y con efectos en el crecimiento estacional. Esta primera fase es equivalente a la primera etapa descrita durante el proceso de cicatrización. Por su parte, la segunda etapa del proceso de rebrote corresponde a los tiempos R2 y R3, y estaría relacionada con la apertura de la yema axilar y su posterior elongación. Entre los genes encontrados en esta segunda fase, destacan aquellos que también fueron diferencialmente expresados durante el crecimiento anual desde el ápice (CHANO *et al.*, 2020). Por el contrario, también se identificaron algunos genes sobreex-

presados diferencialmente durante el proceso de rebrote y no detectados durante el crecimiento apical estacional, entre los que cabe mencionar algunos factores de transcripción de las familias TIFY, NAC-2, y HD-Zip I.

Respuesta a frío

Se mantuvieron plantas de cada procedencia en invernadero, con temperatura y riego controlados, y en exterior, lo que permitió analizar la respuesta de las distintas procedencias al frío. Se evaluó la evapotranspiración en distintos momentos de la temporada otoño-invierno, mostrando, como era de esperar, valores muy superiores en las plantas mantenidas en el in-

vernadero (Tabla 1). Es de destacar que la menor reducción en la transpiración, comparando las plantas mantenidas en el exterior frente a las mantenidas en invernadero, corresponde a las familias procedentes del Teide mientras que las tres familias de Arguineguín muestran los mayores descensos.

Se construyeron además curvas presión-volumen, lo que permitió evaluar el grado de ajuste osmótico de cada familia/procedencia frente

al estrés hídrico inducido por el frío y la helada (Figura 13). En la mayoría de las procedencias, los valores medidos en plantas de invernadero tienden a situarse por encima de los medidos en planta cultivada al exterior. Esto indica que, a igualdad de déficit hídrico en el tejido, el potencial hídrico es mayor en plantas cultivadas en el invernadero (los valores de potencial hídrico en hojas son negativos). Un mayor potencial hídrico refleja agua más débilmente ligada a los tejidos y en general mejor estado hídrico de las plantas.

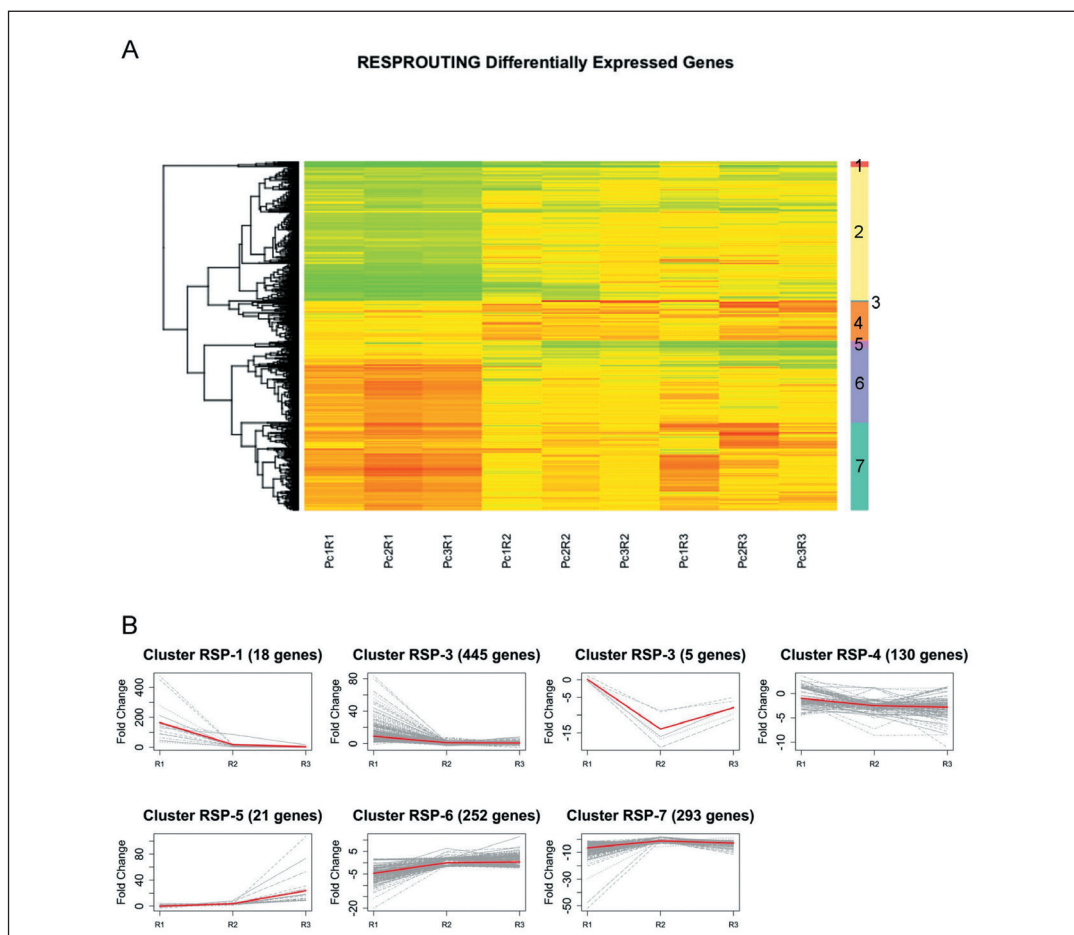


Figura 11. Agrupación en función de su patrón de expresión de los genes diferencialmente expresados (DEG) durante el proceso de rebrote en respuesta a traumatismo.

Figure 11. Grouping of differentially expressed genes (DEG) according to their expression patterns during the wound-induced resprouting process.

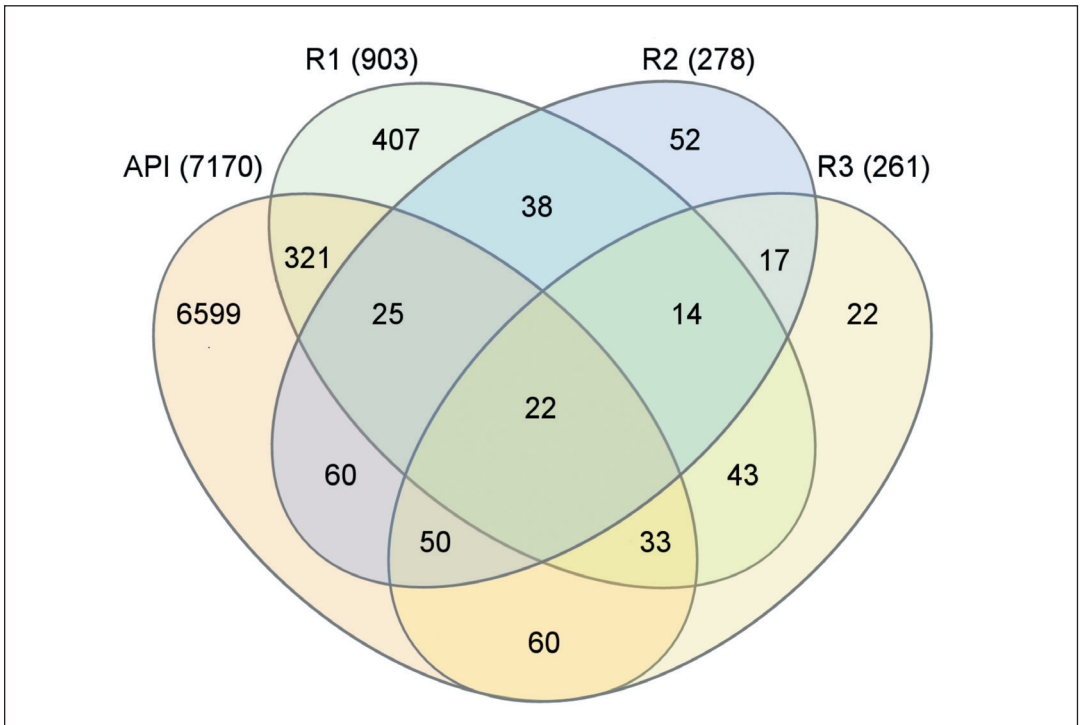


Figura 12. Diagrama de Venn de los genes diferencialmente expresados (DEG) en el proceso de rebrote traumático (R1, R2 y R3) y durante la elongación del brote terminal (API).

Figure 12. Venn diagram of the differentially expressed genes (DEG) in the process of traumatic resprouting (R1, R2 and R3) and during terminal bud elongation (API).

	27-noviembre		20-diciembre		18-enero		8-febrero	
	Ext	Inv	Ext	Inv	Ext	Inv	Ext	Inv
Teide	54.7±6.6	121.9±2.9	27.4±3.9	111.1±6.7	18.6±7.8	94.8±5.1	29.1±1.8	123.3±9.6
Tabur.	57.4±7.7	86.7±14.4	26.5±2.2	61.3±11.9	21.3±6.0	68.9±10.1	34.5±2.1	99.9±16.5
Arg-P1	38.8±10.1	76.8±16.6	23.6±8.1	61.8±9.2	8.0±5.6	82.8±11.1	24.4±3.5	148.9±8.5
Arg-P2	33.8±6.7	82.0±5.1	18.0±3.2	63.0±6.5	5.1±1.7	81.5±3.6	20.8±2.2	91.1±13.7

Tabla 1. Valores medios ± errores típicos de la transpiración ($\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$) en plantas de *P. canariensis* de las procedencias Teide, Caldera de Taburiente y Arguineguín (familias P1 y P2) cultivadas en el exterior y en invernadero.

Table 1. Transpiration (mean value ± standard error, $\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$) in *P. canariensis* seedlings from Teide, Caldera de Taburiente and Arguineguin (half-siblings P1 and P2), grown outdoors and in greenhouse.

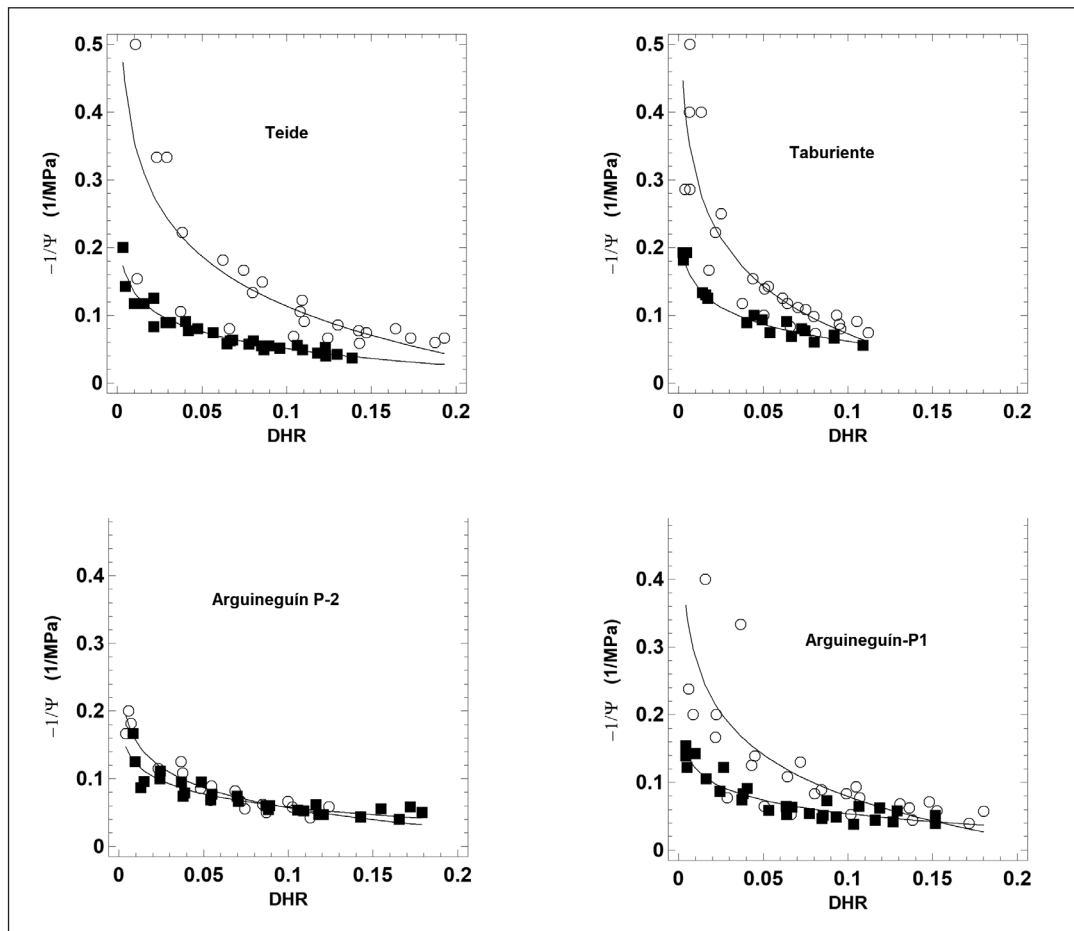


Figura 13. Curvas presión-volumen obtenidas como la relación del déficit hídrico relativo (DHR) expresado en gramos de agua que faltan al tejido para llegar a saturación respecto al agua contenida a saturación y la inversa del potencial hídrico en valor absoluto medido en bar^{-1} .

Figure 13. Pressure-volume curves obtained as the ratio of relative water deficit (DHR) expressed in grams of water missing from the tissue to reach saturation with respect to the water contained at saturation and the inverse of the water potential in absolute value measured in bar^{-1} .

Calculamos los valores de potencial osmótico correspondientes a la situación de déficit de saturación cero (plena turgencia) para planta cultivada al exterior y en invernadero (Tabla 2). El grado de ajuste osmótico medio para cada procedencia se calcula como la diferencia entre ambos valores y refleja una respuesta activa de la planta a una situación de estrés, consistente en la acumulación de solutos. Como cabía espe-

rar, a la vista de las curvas presión volumen, el mayor grado de ajuste se encontró en la población del Teide. También se calculó el contenido hídrico respecto al peso seco en acículas. Las plantas cultivadas en el exterior presentaron menores valores de contenido hídrico en acículas. La menor reducción porcentual respecto a los valores control se observó en el Teide (15.7%) (Tabla 2).

	Potencial osmótico (bar)		Contenido hídrico (g g ⁻¹)	
	Exterior	Invernadero	Exterior	Invernadero
Teide	-12.8±0.6	-7.3±1.1	1.49±0.03	1.77±0.07
Taburiente	-8.1±0.3	-5.7±0.4	1.37±0.05	1.67±0.05
Arguineguín-P1	-12.8±1.2	-8.5±0.8	1.32±0.04	1.73±0.04
Arguineguín-P2	-11.2±0.6	-10.8±0.9	1.45±0.04	1.76±0.05

Tabla 2. Valores medios ± errores típicos del potencial osmótico y el contenido hídrico respecto a peso seco medido en planta de *P. canariensis* de las procedencias Teide, Caldera de Taburiente y Arguineguín (familias P1 y P2) cultivadas en el exterior y en invernadero.

Table 2. Osmotic potential and water content referred to dry weight (mean value ± standard error), in seedlings of *P. canariensis* from Teide, Caldera de Taburiente and Arguineguín (half-siblings P1 and P2) grown outdoors and in greenhouse.

En cuanto al efecto de la helada sobre la capacidad fotosintética de las plantas de distintas procedencias, nuestro estudio mostró que todas las plantas cultivadas en el exterior mostraron fotoinhibición en las cuatro mediciones realizadas, independientemente de la procedencia (Tabla 3). En ninguna de las mediciones realizadas encontramos que la procedencia

Teide, a priori más resistente a las bajas temperaturas, destacase sobre las otras por su capacidad de mantener mayores valores de Fv/Fm en el exterior. En la medición de 21 de diciembre, los menores valores se midieron en las tres familias de la procedencia Arguineguín, lo que sugiere una menor capacidad de aclimatación que en el resto.

	3-diciembre		21-diciembre		19-enero		8-febrero	
	Ext	Inv	Ext	Inv	Ext	Inv	Ext	Inv
Teide	0.67 ±0.033	-	0.70 ±0.073	0.87 ±0.004	0.74 ±0.023	0.86 ±0.0015	0.60 ±0.059	0.84 ±0.010
Tabur.	0.73 ±0.031	-	0.79 ±0.197	0.87 ±0.0194	0.74 ±0.020	0.88 ±0.021	0.65 ±0.071	0.85 ±0.011
Arg-P1	0.70 ±0.028	-	0.69 ±0.065	0.88 ±0.005	0.78 ±0.025	0.88 ±0.002	0.56 ±0.061	0.86 ±0.006
Arg-P2	0.700 ±0.029	-	0.64 ±0.102	0.87 ±0.004	0.74 ±0.012	0.86 ±0.003	0.69 ±0.036	0.84 ±0.015

Tabla 3. Valores medios ± errores típicos del cociente fluorescencia variable/fluorescencia máxima (Fv/Fm) medido en acículas aclimatadas a la oscuridad de plantas de *P. canariensis* de las procedencias Teide, Caldera de Taburiente y Arguineguín (familias P1 y P2) cultivadas en el exterior y en invernadero.

Table 3. Variable fluorescence/máximum fluorescence ratio (Fv/Fm) (mean value ± standard error) measured in dark-acclimated needles of *P. canariensis* seedlings from Teide, Caldera de Taburiente and Arguineguín (half-siblings P1 and P2), grown outdoors and in greenhouse.

DISCUSIÓN

Los trabajos realizados en el marco del proyecto PersPiCan han permitido evaluar el coste metabólico que supone para el árbol la recuperación tras un evento traumático, que resulte en una defoliación masiva y/o en la formación de heridas importantes en el fuste, que afecten al xilema y que incluso comprometan la conexión floemática.

En este sentido, la defoliación supone una alteración en la dinámica del fuste en términos hidráulicos, estimada a través de las variaciones diametrales diarias, que se minimizan en los árboles defoliados. La duración de estas etapas en las que el MDS es mínimo en los grupos de árboles tratados, es dependiente de la generación de unos nuevos brotes y una nueva biomasa foliar. En el momento en el que se forman suficiente tejido fotosintetizador, las contracciones diarias crecen por la creciente transpiración, y ofrecen valores semejantes a los del grupo control. Sin embargo, llaman la atención los valores de dichas contracciones diarias, durante el periodo de ausencia de biomasa foliar. Éstas no son nulas como cabría esperar, sino que los árboles conservan una mínima oscilación diaria. Esta oscilación podría responder a la propia deshidratación de los tejidos del tronco de los árboles por evaporación, creando un gradiente de humedad que consigue la rehidratación de estos tejidos por la noche. Otra posibilidad es que al estar localizados los sensores de desplazamiento en la base de los árboles, parte de la oscilación que captan pueda deberse a procesos propios del sistema radical que influyan en las partes más bajas del tronco. Es posible que efectos como las presiones positivas de las raíces, generen variaciones en el diámetro basal.

La recuperación de la biomasa foliar y la cicatrización de las heridas, junto con la inducción de la síntesis de resina provocada por éstas, supone un consumo adicional de reservas muy importante. Generalmente, los pinos utilizan las acículas de años anteriores como órgano de almacenamiento de estas reservas, pero el pino canario, adaptado a sufrir perturbaciones severas en la parte aérea, almacena reservas en

las raíces, un órgano menos expuesto a estas perturbaciones. Esta característica permite a los árboles recuperarse incluso de defoliaciones completas, empleando estas reservas para la formación de rebrotes, hasta que éstos son capaces de producir nuevos fotoasimilados en cantidad suficiente. Una vez la nueva copa se vuelve autosuficiente, invierte los nuevos fotoasimilados primero en generar aún más tejido fotosintético y después en recuperar el crecimiento radial y el nivel de reservas de carbono a estados previos a la perturbación. El trazado de estos nuevos fotoasimilados ha sido posible realizarlo por las importantes diferencias apreciadas en la actividad fotosintética de los rebrotes, frente a las acículas de los árboles no dañados. Se ha apreciado una menor proporción de ^{13}C en los fotoasimilados provenientes de los rebrotes, que encaja con las mediciones de intercambio gaseoso. A pesar de que la tasa fotosintética es similar entre rebrotes y acículas adultas, la conductancia estomática es significativamente mayor en las acículas juveniles producidas en el rebrote de los árboles tratados. Esta mayor conductancia estomática, genera una mayor concentración intercelular de CO_2 en relación con su concentración ambiental. Por lo tanto, se genera una mayor cantidad de CO_2 de la que puede aprovechar la hoja de inserción aislada, que no ve incrementada su tasa fotosintética, favoreciendo una mayor discriminación frente al ^{13}C , dando lugar a $d^{13}\text{C}$ más bajos (como efectivamente se ha observado). Esto implica también un mayor consumo de agua por unidad de carbohidratos producidos, suponiendo una menor eficiencia en el uso del agua por parte de los rebrotes.

Estos resultados relacionados con el consumo de reservas son coherentes con lo observado desde el punto de vista anatómico y molecular en un seguimiento detallado del proceso de cicatrización, tanto de heridas denominadas “de ventana” como de anillado completo en el fuste.

El análisis anatómico de la cicatrización de las heridas sufridas por el fuste, como las que podría causar el impacto de piroclastos, mostró que no se produce cicatrización desde la superficie de la herida, como sí se ha descrito en angiospermas (PANG *et al.*, 2008, STOBBE *et al.*,

2002; ZHANG *et al.*, 2011). Por el contrario, la cicatrización se produce desde el borde lateral de la herida, a partir del cambium vascular. En el caso de las heridas de anillado completo, la cicatrización se inicia desde el borde superior de la herida. No obstante, en estos casos se produce también una proliferación a partir del parénquima axial asociado a los canales resiníferos, inmediatamente bajo la superficie de la herida. Nuestro trabajo ha puesto de manifiesto que las células de la región cambial perciben la posición de la superficie del órgano, en un proceso en el que pueden intervenir señales mecánicas (presión ejercida por las células colindantes), además de señales hormonales. En el borde de cicatrización y en las estructuras columnares, la herida provoca que la superficie exterior pueda ser percibida en distintas posiciones, generándose un tejido cicatricial anómalo, donde las direcciones radiales y tangenciales pueden cambiar entre grupos de células contiguas. El xilema resultante será, por tanto, altamente ineficiente desde el punto de vista hidráulico, de modo que, aunque la herida se haya cerrado, hasta que no se vuelva a recuperar la polaridad normal, el sistema hidráulico de la planta se puede ver comprometido.

Para analizar la alteración de los patrones de expresión genética inducida por traumatismos en la región cambial, fue preciso comenzar por una caracterización de los patrones de transcripción durante el periodo anual de crecimiento en ausencia de traumatismo. La mayor parte de los genes que presentan variación en sus niveles de transcripción durante este periodo (DEG, *differentially expressed genes*) se pueden agrupar en dos patrones de expresión principales. La mayor parte de los DEG presentan una sobreexpresión durante los meses primaverales, coincidiendo con la mayor tasa de división del cambium vascular, seguido por un marcado descenso durante los meses de verano y en muchos casos un ligero repunte al inicio del otoño. Otro importante grupo de DEG presenta un patrón opuesto, alcanzando la mayor acumulación de transcritos durante el verano. Estos patrones se corresponden con las pautas de crecimiento del meristema lateral, con un máximo primaveral, una parada o al menos una marcada reducción en la tasa de

división durante el verano, y una nueva reactivación durante el otoño (CHANO *et al.*, 2017b). Este patrón es característico de los ambientes mediterráneos, donde se ha descrito el policiclismo frecuente en especies como *Pinus pinaster* o *Pinus halepensis*.

En la respuesta a la herida se pueden distinguir dos fases: de manera inmediata, se interrumpe el proceso de xilogénesis en las regiones cercanas a la herida, donde se sobreexpresan genes de defensa, ante la eventual entrada de patógenos; a continuación, se inicia la formación de madera traumática. Esta madera carece de traqueidas con paredes secundarias engrosadas y fuertemente lignificadas; por el contrario, comparte patrones de expresión genética y características anatómicas con la madera temprana. Estos resultados sugieren que el árbol prima el rápido cierre de la herida con una madera quizá menos eficiente pero metabólicamente menos costosa (CHANO *et al.*, 2017a).

Otra de las características más relevantes del pino canario frente al traumatismo es la producción de un abundante rebrote, capaz de regenerar la masa foliar perdida en un incendio. Se analizaron también las diferencias a nivel transcripcional entre el crecimiento apical estacional, en ausencia de traumatismo, y el rebrote inducido. La mayor parte de los genes cuya expresión difiere entre ambos corresponden, como era esperable, a DEGs identificados en R1 y presumiblemente implicados en procesos defensivos y de respuesta a estrés, en su inmensa mayoría comunes a los detectados para el primer tiempo del análisis de la cicatrización (H1). Por su parte, se identificaron factores de transcripción en R2 y R3 con una implicación más directa en la formación y elongación del rebrote. Muchos de estos genes son también compartidos con el crecimiento constitutivo a partir de las yemas apicales. No obstante, nuestro estudio ha permitido identificar por primera vez una serie de genes posiblemente específicos del proceso de rebrote en coníferas, como un factor de transcripción de la familia NAC2, dos miembros de la familia TIFY o una secuencia homóloga de ATHB13, del grupo HD-ZIP I, así como otros genes sin homologías descritas hasta la fecha, como Contig24637 o Ppnisotig07889.

Por último, se estudió en plántulas de distintas procedencias la respuesta al estrés por bajas temperaturas, uno de los factores ambientales más limitantes a altitudes elevadas. Cuando la temperatura ambiente cae por debajo de los 0°C cabe esperar una respuesta por parte de las plantas para minimizar la posibilidad de formación de hielo en sus tejidos. Esto se puede conseguir incrementando la presencia de solutos, que actuarían como anticongelantes. El aumento de solutos tiende a reducir el potencial hídrico. En este sentido, son de destacar las diferencias en el grado de ajuste osmótico entre las procedencias del Teide y de la Caldera de Taburiente, siendo el de la primera dos veces mayor. Las dos familias de la procedencia Arguineguín muestran comportamientos marcadamente distintos, lo que pone de manifiesto la variabilidad intraprocedencias ya documentada en otros estudios para otro tipo de caracteres (LÓPEZ DE HEREDIA *et al.*, 2014; LÓPEZ *et al.*, 2016).

Por otra parte, la medición de la fluorescencia de la clorofila en hojas preaclimatadas a oscuridad se utiliza para poner de manifiesto la existencia de factores de estrés que provocan fotoinhibición, es decir, una incapacidad de las hojas para utilizar la energía luminosa en la fotosíntesis. En general, se acepta que valores del parámetro F_v/F_m inferiores a 0.8 indican fotoinhibición. Numerosos estudios han documentado la existencia de fotoinhibición en plantas que crecen en condiciones de bajas temperaturas. En conjunto, los resultados obtenidos muestran diferentes estrategias de respuesta a las bajas temperaturas en el pino canario. En todos los casos las plantas sufrieron fotoinhibición con temperaturas mínimas en el entorno de 0°C o inferiores. Los valores del parámetro fluorescencia de la clorofila medidos el 9 de febrero, tras una nevada intensa mostrarían una mayor vulnerabilidad de las plantas; que habrían empezado a reducir sus niveles de resistencia a finales de enero, tras un mes con temperaturas mínimas en el entorno de los 0°C. Este resultado sugiere escasa adaptación a las heladas tardías (incluso a las "poco" tardías). La variabilidad inter- e intra- procedencias ofrece la posibilidad de selección y adaptación al frío, que puede ser necesaria para romper el límite altitudinal de su actual distribución en las islas.

CONCLUSIONES

Los trabajos realizados en el marco de este proyecto han arrojado las siguientes conclusiones:

- 1.- El pino canario es una especie singular, no sólo como endemismo insular y especie arbórea principal de los PN del Teide y de la Caldera de Taburiente. Además de su valor ecológico y productivo, desde el punto de vista científico es una valiosa especie modelo para el estudio de determinados procesos en coníferas. En función de todas estas características, debe ser valorada y apreciada por la sociedad.
- 2.- La cicatrización y el rebrote mostrados por el pino canario tras daños severos como los que pueden causar incendios, erupciones volcánicas, etc. suponen un elevado consumo de las reservas acumuladas por el árbol fundamentalmente en el parénquima axial presente en el xilema secundario.
- 3.- La notable capacidad de recuperación del pino canario le permite reponer esas reservas en un plazo corto de tiempo. No obstante, la recurrencia de estos eventos sin haber recuperado esas reservas puede suponer la muerte del arbolado. Por este motivo es importante extremar la prevención en zonas incendiadas en años anteriores, aun habiendo recuperado el arbolado su follaje y habiendo desaparecido parte de la carga de combustible en el monte.
- 4.- Los procesos de cicatrización y de rebrote suponen una reordenación del patrón transcriptómico de la región cambial. La madera traumática presenta abundante parénquima axial y menores niveles de lignificación, sin desarrollar en sus primeros años madera tardía bien diferenciada. Este tejido permite un cierre de la herida relativamente rápido, aunque no es una barrera tan efectiva como la madera tardía constitutiva, si bien también presenta numerosos canales resinosos.
- 5.- Nuestro trabajo muestra que las células cambiales en división perciben la posición de la superficie libre, lo que contribuye a determinar la polaridad de las divisiones y la diferenciación de xilema y floema. De este modo, la madera traumática presenta traqueidas malformadas y con

orientaciones anómalas, que se traducen en una menor eficiencia hidráulica de este tejido.

6.- Las poblaciones que habitan a mayores cotas presentan adaptaciones específicas frente al frío/sequía que deben afrontar en ese ambiente. Estas adaptaciones se muestran en una mayor capacidad de ajuste osmótico, que contribuye a mantener el contenido hídrico.

7.- No obstante, no se aprecian diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad al frío del aparato fotosintético, excepto en las poblaciones de ambientes más cálidos, que sí son significativamente más sensibles.

8.- La variabilidad inter- e intrapoblacional detectada sugiere que sí es posible la selección de material más adaptado a estas condiciones, en caso de ser necesario facilitar o contribuir a la regeneración del pinar, sobre todo en su límite altitudinal.

AGRADECIMIENTOS

Los trabajos aquí expuestos fueron financiados por los proyectos “Persistencia del pino canario tras una perturbación de gran magnitud (PersPiCan)” SPIP2014-01093 (Organismo Autónomo de Parques Nacionales, Ministerio de Agricultura), “Adaptaciones del pino canario (*Pinus canariensis*) al vulcanismo (VulCan)” AGL2009-10606 (Ministerio de Ciencia e Innovación), “ProCoGen—Promoting a functional and comparative understanding of the conifer genome- implementing applied aspects for more productive and adapted forests” FP7-KBBE-2011-5 (Seventh Framework Programme of the European Commission), “Trees 4 Future” 284181 (Seventh Framework Programme of the European Commission) y la Beca de Formación de Profesorado Universitario AP-2012-1782 (Ministerio de Educación, Cultura y Deporte).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEMET. 2021. Proyecciones climáticas para el siglo XXI. Agencia Española de Meteorología. Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. www.aemet.es/es/serviciosclimaticos/cambio_climat
- ALTSCHUL, S., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E., LIPMAN, D. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410
- ANCOCHEA, E., HUERTAS, M. J., CANTAGREL, J. M., COELLO, J., FUSTER, J. M., ARNAUD N., IBARROLA, E. 1999. Evolution of the Cañadas edifice and its implications for the origin of the Cañadas Caldera (Tenerife, Canary Islands). *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 88, 177-199
- CARRACEDO, J. C., PATERNE, M., GUILLOU, H., PÉREZ-TORRADO, F. J., PARIS, R., RODRÍGUEZ-BADIOLA, E., HANSEN, A. (2003) Dataciones radiométricas (¹⁴C y K/Ar) del Teide y el rift noroeste, Tenerife, Islas Canarias. *Estudios Geológicos* 59: 15-29.
- CHANG, S., PURYEAR, J., CAIRNEY, J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* 11: 113-116
- CHANO, V., COLLADA, C., SOTO, Á. 2017a. Transcriptomic analysis of wound xylem formation in *Pinus canariensis*. *BMC Plant Biology* 17:234
- CHANO, V., LÓPEZ, R., PITA, P., COLLADA, C., SOTO, Á. 2015. Proliferation of axial parenchymatic xylem cells is a key step in wound closure of girdled stems in *Pinus canariensis*. *BMC Plant Biology* 15:64.
- CHANO, V., LÓPEZ DE HEREDIA, U., COLLADA C., SOTO, Á. 2017b. Transcriptomic analysis of juvenile wood formation during the growing season in *Pinus canariensis*. *Holzforschung* 71: 919-937
- CHANO, V., SOBRINO-PLATA, J., COLLADA, C., SOTO, Á. 2021. Wood development regulators involved in apical growth in *Pinus canariensis*. *Plant Biology* 23(3): 438-444
- CLIMENT, J., TAPIAS, R., PARDOS, J. A., GIL, L. (2004). Forest adaptations in the Canary Islands pine (*Pinus canariensis*) *Plant Ecology* 171: 185-196
- GUILLOU, H., CARRACEDO, J. C., DUNCAN, R. A. 2001. K/Ar 40Ar-39Ar ages and magnetostratigraphy of Brunhes and Matuyama lava sequences from La Palma Island. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 106, 175-194
- LÓPEZ, R., BROSSA, R., GIL, L., PITA, P. 2015. Stem girdling evidences a trade-off between cambial activity and sprouting and dramatically reduces plant transpiration due to feedback inhibition of photosynthesis and hormone signaling. *Frontiers in Plant Science* 6: 285
- LÓPEZ, R., CANO, F. J., CHOAT, B., COCHARD, H., GIL, L. 2016. Plasticity in vulnerability to cavitation of *Pinus canariensis* occurs only at the driest end of an aridity gradient. *Frontiers in Plant Science* 7: 769
- LÓPEZ DE HEREDIA, U., LÓPEZ, R., COLLADA, C., EMERSON, B. C., GIL, L. 2014. Signatures of volcanism and aridity in the evolution of an insular pine (*Pinus canariensis* Chr. Sm. Ex DC in Buch). *Heredity* 113: 240-249
- MIRANDA, J. C., RODRÍGUEZ-CALCERRADA, J., PITA, P., SAURER, M., OLEKSYN, J., GIL, L. 2020 Carbohydrate dynamics in a resprouting species after severe aboveground perturbations. *European Journal of Forest Research* 139: 841-852
- OLEKSYN, J., ZYTKOWIAK, R., KAROLEWSKI, P., REICH, P. B., TJOELKER, M. G. 2000. Genetic and environmental control of seasonal carbohydrate dynamics in trees of diverse *Pinus sylvestris* populations. *Tree Physiology* 20: 837-847
- PANG, Y., ZHANG, J., CAO, J., YIN, S. Y., HE, X. Q., CUI, K. M. 2008. Phloem transdifferentiation from immature xylem cells during bark regeneration after girdling in *Eucommia ulmoides* Oliv. *Journal of Experimental Botany* 59 (6): 1341-1351
- PFÄFFL, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29:e45
- STOBBE, H., SCHMITT, U., ECKSTEIN, D., DUJESIEFKEN, D. 2002. Developmental stages and fine structure of surface callus formed after debarking of living lime trees (*Tilia* sp.). *Annals of Botany* 89 (6): 773-782.
- ZHANG, J., GAO, G., CHEN, J. J., TAYLOR, G., CUI, K. M., HE, X. Q. 2011. Molecular features of secondary vascular tissue regeneration after bark girdling in *Populus*. *New Phytologist* 192 (4): 869-884.