



TRABAJO FINAL DE MÁSTER

Identificación de nuevos potenciales reguladores del crecimiento secundario mediante transcriptómica comparada en *Arabidopsis thaliana*

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas
2017/2018

Fecha: 14 de enero de 2019

Autor: Mario Gutiérrez Martín

Directores: Javier Agustí Feliu | Francisco José Vera Sirera

RESUMEN

El crecimiento secundario es un proceso central en el desarrollo de las plantas que resulta en el engrosamiento de tallos y raíces. Desde un punto de vista biológico, el crecimiento secundario es de gran importancia porque proporciona el soporte mecánico y la estabilidad que las plantas necesitan para crecer y sostener sus propias estructuras. Por otra parte, desde un punto de vista productivo, el crecimiento secundario es una fuente directa de biomasa con aplicaciones biotecnológicas. Este proceso está regulado por un grupo de células meristemáticas, denominadas cambium, las cuales están localizadas cerca del cortex. Estos meristemos vasculares son los responsables del desarrollo del tejido vascular, produciendo xilema (hacia adentro) y floema (hacia afuera). La acumulación de anillos vasculares causa la aparición del crecimiento secundario. Si bien el conocimiento disponible sobre su control hormonal es extenso, actualmente desconocemos gran parte de su regulación genética. El trabajo aquí expuesto pretende aprovechar la variación natural presente en *Arabidopsis thaliana* para identificar nuevos potenciales genes reguladores del cambium mediante un análisis transcriptómico sobre 8 accesiones con distintos niveles de crecimiento secundario.

Palabras clave: Desarrollo vegetal, Crecimiento secundario, Vasculatura, Cambium, Variación natural, *Arabidopsis thaliana*

ABSTRACT

Secondary growth is a central process in the development of plants that results in the thickening of stems and roots. From a biological point of view, secondary growth is of great importance because it provides the mechanical support and stability that plants need. On the other hand, from a productive point of view, secondary growth is a direct source of biomass with biotechnological applications. This process is regulated by a group of meristematic cells called cambium which are located near of the cortex. They are responsible for the development of vascular tissue: xylem (inwards) and phloem (outwards). The accumulation of these vascular rings causes the appearance of secondary growth. While hormonal regulation of the cambium activity has been widely studied, currently, we do not have enough knowledge about genetic regulation of this process. The present work expects to identify new potential cambium regulatory genes through a transcriptomic approach with 8 accessions with different secondary growth levels using the natural variation present in *Arabidopsis thaliana*.

Keywords: Plant development, Secondary growth, Vasculature, Cambium, Natural variation, *Arabidopsis thaliana*

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	6
1. Crecimiento secundario: Sistema vascular	6
1.1. Crecimiento secundario en <i>Arabidopsis thaliana</i>	7
2. Control desarrollo vascular	8
2.1. Control hormonal	8
2.2. Control genético	9
3. Variación natural en <i>A. thaliana</i>	11
3.1. Abordajes para aprovechar la variación natural.....	11
OBJETIVOS	14
RESULTADOS	16
1. Comprobación de los fenotipos observados en el GWAS	16
2. Extracción RNA	18
3. Resultados RNAseq.....	18
4. Número de genes expresados diferencialmente	19
5. Sobrerrepresentación términos GO en genes expresados diferencialmente	20
6. Selección de potenciales nuevos reguladores de la actividad del cambium.....	22
6.1. <i>Estrategia A</i> – Selección genes por patrones de expresión en población	22
6.2. <i>Estrategia B</i> – Selección genes <i>upstream</i>	27
7. Caracterización genes seleccionados	30
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	38
MATERIAL Y MÉTODO	40
1. Material Vegetal	40
2. Condiciones Crecimiento.....	40
3. Análisis Histológico	41
4. Extracción RNA y Secuenciación.....	43
5. Mapeo Lecturas.....	44
6. Análisis Expresión Diferencial.....	44

7. Extracción RNA y qRT-PCR.....	45
REFERENCIAS	48
ANEXOS	54
Anexo 1. Número de lecturas obtenidas en la secuenciación de RNA.....	54
Anexo 2. Genes relevantes crecimiento secundario: <i>Estrategia A</i> – Selección genes por patrones de expresión en población	54
Anexo 3. Genes relevantes crecimiento secundario: <i>Estrategia B</i> – Selección genes upstream	55

INTRODUCCIÓN

1. Crecimiento secundario: Sistema vascular

En la mayoría de dicotiledóneas y gimnospermas, se distinguen dos procesos de crecimiento: el crecimiento primario, crecimiento longitudinal a través de los meristemos apicales de la raíz (RAM) y del tallo (SAM); y el crecimiento secundario, crecimiento radial promovido por las células meristemáticas del cambium.

Este crecimiento en grosor es resultado de la producción de tejido vascular promovida por el cambium, el cual es capaz de diferenciarse en floema (hacia afuera) y xilema (hacia adentro), provocando la aparición de corteza y madera, respectivamente, en las especies leñosas (**figura 1A**). Es este tejido vascular, junto con el cambium, el que constituirá el sistema vascular de las plantas.

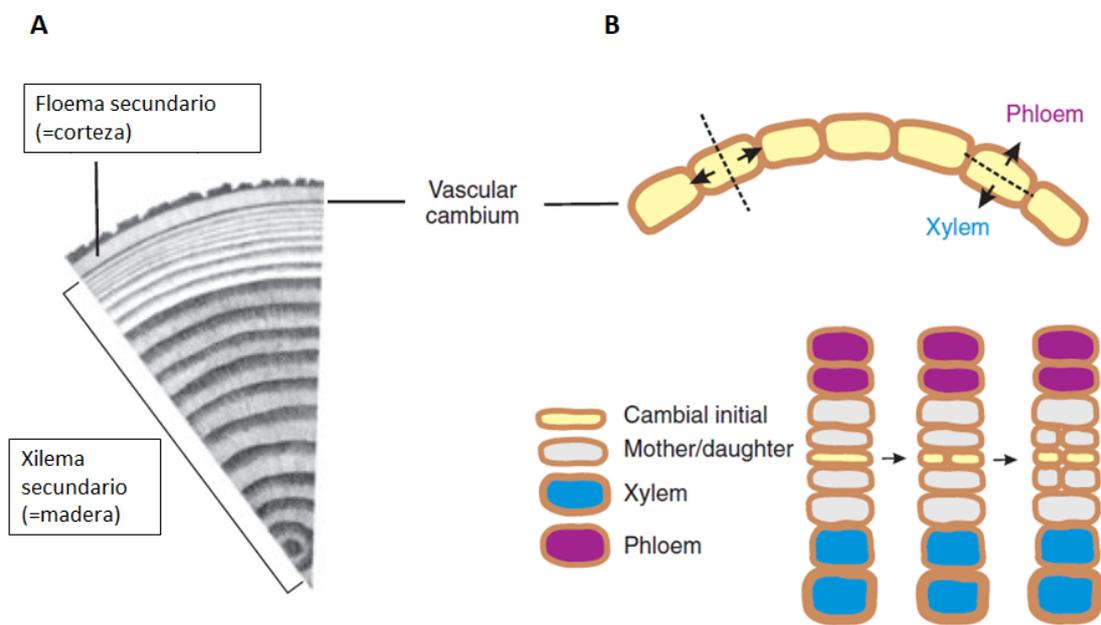


Figura 1. Esquema de la actividad cambial y la orientación celular en un tallo leñoso.

(A) En especies leñosas, la diferenciación del cambium en floema (hacia adentro) produce corteza, mientras que la diferenciación en xilema (hacia afuera) provoca la aparición de madera.

(B) Las divisiones anticlinales del cambium mantienen activo el crecimiento secundario, añadiendo nuevas células meristemáticas, mientras que las divisiones periclinales del cambium originan xilema y floema.

Adaptación de (Spicer and Groover et al., 2010)

Las células del xilema se caracterizan por presentar gruesas paredes secundarias, ricas en lignina, celulosa y hemicelulosa, siendo las principales responsables tanto de proporcionar soporte mecánico, como del transporte de savia bruta (agua, nutrientes y minerales) desde la raíz hasta el ápice del tallo. El floema, por su parte, se encarga del transporte de fotoasimilados y moléculas de señalización tanto de forma acropétala (a lo largo de un eje) como basipétala (en base a un eje) (Nieminen *et al.*, 2015).

El sistema vascular de plantas terrestres, por tanto, se caracteriza por ejercer dos funciones fundamentales: constituir la infraestructura necesaria para permitir el transporte a larga distancia por toda la planta y proporcionar el soporte mecánico y estabilidad que las plantas necesitan para crecer y ser capaces de sostener sus propias estructuras. Por otra parte, desde un punto de vista productivo, es

responsable del crecimiento secundario, fuente directa de biomasa de gran utilidad en el contexto de seguridad alimentaria y energética.

1.1. Crecimiento secundario en *Arabidopsis thaliana*

Es conocido que *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) posee cambium vascular (Busse and Evert, 1999). Del mismo modo, estudios previos han descrito la capacidad de *Arabidopsis thaliana* para desarrollar crecimiento secundario (Dolan *et al.*, 1993; Dolan and Roberts, 1995).

Pese a ser una planta herbácea, el xilema originado durante la segunda fase de su desarrollo se asemeja a la anatomía mostrada por la madera de un árbol leñoso, lo que convierte a esta especie en un modelo eficaz para el estudio del crecimiento secundario (Chaffey *et al.*, 2002). En resultados mostrados por Kubo *et al.* (2005) se comprueba como los genes *VND6* y *VND7* tienen implicación en la diferenciación de los vasos del xilema tanto en *Arabidopsis* como en la especie leñosa *Populus*.

En su desarrollo vascular se distinguen dos fases en función del tipo de crecimiento, primario o secundario, que se esté produciendo.

Desarrollo vascular durante el crecimiento primario

Como se ha comentado anteriormente, el crecimiento primario en plantas consiste en la elongación de la planta a través de los meristemos apicales de la raíz (RAM) y el tallo (SAM). Es a partir de estos meristemos primarios, de origen embrionario, como se originan los tejidos que constituyen la vasculatura primaria.

En el tallo primario, la disposición de la vasculatura toma forma de haces individuales, siguiendo un patrón, común en la mayoría de plantas vasculares, consistente en la disposición radial de floema primario (abaxial) y xilema primario (adaxial), entre los que se intercala el procambium (Ye *et al.*, 2002) (**figura 2A**). Esta estructura en forma de estela constituye el denominado cambium fascicular (Agusti y Greb, 2013).

Mientras, en la raíz, la vasculatura primaria se dispone en un patrón bisimétrico, formando el xilema primario un eje central envuelto por procambium y flanqueado por dos polos de floema primario (Nieminen *et al.*, 2015) (**figura 2F**).

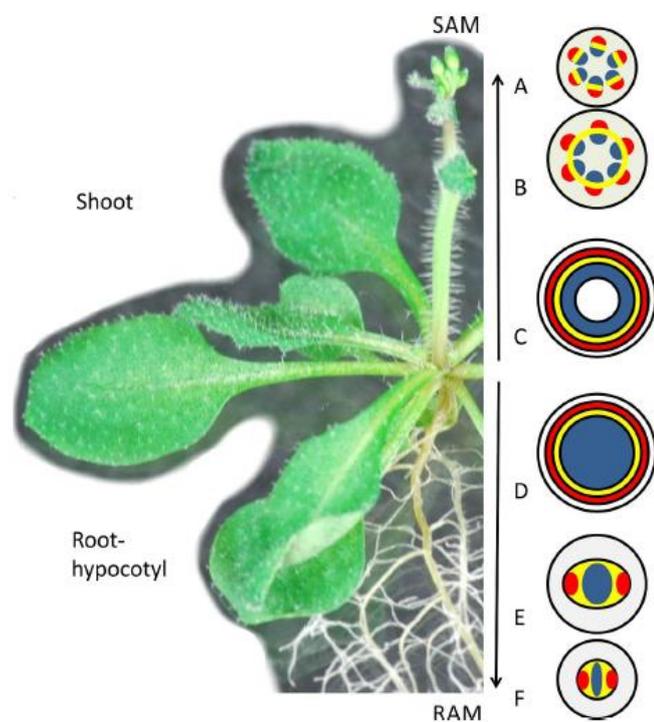


Figura 2. Esquema representativo de la organización vascular en tallo (A-C) y raíz (D-F) de *Arabidopsis thaliana*. (Nieminen *et al.*, 2015)

Desarrollo vascular durante el crecimiento secundario

En un determinado momento del ciclo de vida de la planta, ésta precisa de un sistema de transporte y/o soporte adecuados a sus necesidades. Para ello, la planta inicia un mecanismo de crecimiento radial, acumulando tejido vascular, lo que origina el engrosamiento del tallo y la raíz.

Las células procambiales, que se encontraban intercaladas con los tejidos vasculares primarios, comienzan una serie de divisiones paralelas al eje (periclinales) que resultan en la aparición de xilema secundario (hacia adentro), floema secundario (hacia afuera) y un meristemo secundario, denominado cambium vascular (Nieminen *et al.*, 2015). Es este cambium vascular el responsable del crecimiento lateral que se conoce como crecimiento secundario.

La disposición de este meristemo secundario varía de manera específica según el órgano: mientras que en el tallo se dispone en forma cilíndrica, en lo que se denomina cambium interfascicular (Agusti *et al.*, 2011b) (**figura 2C**); en la raíz, se dispone en forma de anillo continuo, ocupando el interior del eje (Dolan y Roberts, 1995) (**figura 2D**).

2. Control desarrollo vascular

El crecimiento secundario, resultado de la producción de tejido vascular, es un proceso complejo donde es necesario el mantenimiento de un equilibrio entre la proliferación y diferenciación celular del cambium. Por tanto, parece razonable que existan multitud de mecanismos de diverso origen que controlen estos procesos. A continuación se resumirán algunos de los más relevantes, tanto a nivel hormonal como a nivel genético.

2.1. Control hormonal

Auxinas

Las auxinas son una de las hormonas vegetales descritas con mayor implicación en el desarrollo del cambium y la formación de tejido secundario. Distintos estudios han evidenciado que esta fitohormona es esencial para el crecimiento secundario del tallo (Little *et al.*, 2002; Björklund *et al.*, 2007). Se ha demostrado su implicación en la iniciación y diferenciación en tejido vascular de las células del cambium (Baima *et al.*, 2001; Ko, Han *et al.*, 2004), así como en la maduración de células vasculares (Ye *et al.*, 2002). Además, se ha demostrado en *Populus* que la reducción en niveles de auxina en el cambium provoca una reducción en la división de células xilemáticas (Nilsson *et al.*, 2008).

Giberelinas

Resultados en mutantes de *A. thaliana* deficientes de producción o señalización en giberelinas indican el papel de esta hormona en la diferenciación, de manera indirecta, y expansión del xilema (Ragni *et al.*, 2011). En la especie leñosa *Populus*, la mayoría de formas bioactivas de esta hormona se han encontrado en las zonas de expansión de células xilemáticas en diferenciación, lo que sugiere la implicación de la giberelina en procesos iniciales de la formación de madera (Israelsson *et al.* 2005). Del mismo modo, altos niveles en la concentración de esta hormona en plantas transgénicas derivan en una alta tasa de crecimiento y elongación de las fibras xilemáticas (Eriksson *et al.* 2000; Biemelt *et al.* 2004).

Citoquininas

Se conoce la implicación de estas hormonas en la regulación de la proliferación del procambium y el mantenimiento de su identidad (Hejatko *et al.* 2009; Ursache *et al.*, 2013). El rol de las citoquininas en la actividad del cambium ha sido analizado en diversos estudios, demostrando su implicación como inductor del crecimiento secundario (Mähönen *et al.* 2006; Matsumoto-Kitano *et al.* 2008). Además, en árboles transgénicos de *Populus*, la disminución en la señalización por citoquininas resulta en una reducción en el número de divisiones celulares en el cambium vascular (Nieminen *et al.*, 2008).

Otras hormonas vegetales

Existen otras hormonas vegetales que, si bien no poseen la influencia sobre el cambium que presentaban las anteriormente citadas, tienen también relevancia en el desarrollo vascular.

Los brasinoesteroides han demostrado ser necesarios para la diferenciación del xilema (Hossain *et al.* 2012), así como para el mantenimiento del ratio xilema/floema (Kinoshita *et al.*, 2005). El etileno, por su parte, ha demostrado su implicación promoviendo el crecimiento del cambium en *Arabidopsis* y *Populus* (Love *et al.* 2009; EtcHELLS *et al.* 2012). Las estrigolactonas, hormonas inicialmente descritas como reguladoras de la ramificación (Gomez-Roldan *et al.*, 2008), han demostrado recientemente su relación en el desarrollo vascular del tallo y raíz (Agusti *et al.*, 2011a; Brewer *et al.*, 2013). Finalmente, el ácido jasmónico, hormona ampliamente estudiada en estrés biótico (Howe, 2004), está involucrado en la regulación de la actividad cambial en la inflorescencia del tallo de *Arabidopsis* (Sehr *et al.*, 2010).

Actuación sinérgica hormonal en la regulación del desarrollo vascular

Toda esta regulación no se ejerce únicamente de manera individual pues, a menudo, las hormonas actúan de forma sinérgica. Esta sinergia es resultado de efectos aditivos en respuestas, por vías independientes o comunes, y/o la regulación de los niveles de concentración entre hormonas (Ursache *et al.*, 2013).

Un caso concreto de este fenómeno sería la acción dual de auxinas y giberelinas. Se conoce que ambas tienen una clara influencia en el desarrollo vascular. No obstante, experimentos en los que se modificaba el ratio auxina:giberelina en plantas sin dominancia apical (decapitadas), resultó en que las plantas con un alto ratio de auxina mostraron inducción en el desarrollo de xilema, mientras que aquellas con un bajo ratio resultaron en el desarrollo de floema (Digby y Wareing 1966). Otro ejemplo de esta sinergia entre hormonas se encuentra en la función de las giberelinas en células procambiales, ya que éstas precisan de auxina para inducir el desarrollo procambial (Fukuda, 1997).

En la misma línea, se ha demostrado que durante el desarrollo vascular radicular, el transporte a larga distancia de citoquininas juega un papel fundamental en el transporte polar de auxina (Bishop *et al.*, 2011).

2.2. Control genético

El conocimiento sobre la regulación genética del crecimiento secundario en plantas no es muy extenso y los estudios aún están en etapas tempranas. El uso de *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo donde estudiar este control genético parece estar cambiando esta dinámica, proporcionando un sistema genéticamente tratable donde focalizar las investigaciones (Chaffey *et al.*, 2002).

2.2.1. Regulación transcripcional

El crecimiento secundario es un proceso dependiente de una extensa red de factores de transcripción que regulan diversos aspectos de la diferenciación celular y el desarrollo vascular (Groover y Robishon, 2006; Nagawa *et al.*, 2006; Demura y Fukuda, 2007).

Factores de transcripción HD-ZIP III

La familia génica HD-ZIP III, factores de transcripción regulados post-transcripcionalmente por miRNAs, se ha relacionado con la regulación de diversos procesos esenciales en el desarrollo de plantas como lo son la iniciación de meristemas o la determinación de la polaridad en órganos laterales (Talbert *et al.*, 1995; Ochando *et al.*, 2006; Bowman y Floyd, 2008). Estudios sobre mutantes para miembros de esta familia, *REVOLUTA (REV)*, *PHABULOSA (PHB)*, *PHAVOLUTA (PHV)*, *ATHB8* y *CORONA (CNA / ATHB15)*, relacionan a estos factores de transcripción con la diferenciación del cambium vascular y el establecimiento de patrones en los haces vasculares (Baima *et al.*, 2001; Emery *et al.*, 2003; Ohashi-Ito *et al.*, 2005; Ohashi-Ito y Fukuda, 2007). Schrader *et al.* (2004) demostraron que el ortólogo de *REV* en *Populus* desempeña un papel importante en el crecimiento secundario, expresándose en los tallos leñosos de la planta.

Reguladores formación pared celular secundaria

La formación de pared celular secundaria es un proceso fundamental en la diferenciación de células xilemáticas. Se conoce que este proceso está regulado por factores de transcripción de tipo MYB y NAC.

Miembros de la familia de factores de transcripción tipo MYB, como *MYB83*, *MYB46* y *MYB75*, han demostrado ser reguladores maestros de la biosíntesis de pared celular secundaria (Zhong *et al.*, 2007; McCarthy *et al.*, 2009; Bhargava *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2013).

Se conocen varios miembros de la familia NAC que juegan un papel fundamental en la diferenciación del xilema: *NST1*, *NST2* y *NST3* se han descrito como reguladores maestros de la biosíntesis de pared secundaria celular durante la formación de fibras xilemáticas (Zhong *et al.*, 2006; Mitsuda *et al.*, 2005; Mitsuda *et al.*, 2007); un rol similar se le atribuye a los factores de transcripción VND (VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN), cuyos miembros *VND1*, *VND2*, *VND3*, *VND4* y *VND5* tienen implicación en la formación de pared celular secundaria en vasculatura (Zhou *et al.*, 2014), mientras que *VND6* y *VND7* se han descrito como inductores de la transdiferenciación en vasos xilemáticos (Yamaguchi *et al.*, 2010).

2.2.2. Receptores tipo kinasa

Una de las vías de señalización molecular de mayor relevancia para el crecimiento secundario en *A. thaliana* es la constituida por el receptor tipo kinasa PXY y el péptido señal CLE41 (CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION-RELATED41). La interacción receptor-ligando entre estos dos elementos desencadena una cascada de señalización que resulta crucial en procesos como la diferenciación del xilema o la división de células vasculares y la orientación de las mismas (Etchells and Turner, 2010). Además, se conoce que los factores de transcripción WOX4 y WOX14 actúan aguas abajo de esta ruta de señalización de PXY, desencadenando procesos de desarrollo vascular independientes de cualquier rol en la organización vascular, como lo es la proliferación de células vasculares (Etchells *et al.*, 2013).

Alternativamente, se ha descubierto la implicación de dos receptores tipo kinasa, RUL1 y MOL1, que regulan el crecimiento secundario, induciéndolo e inhibiéndolo, respectivamente (Agustí *et al.*, 2011b).

2.2.3. Otros mecanismos de control genético

Especial mención merece *ACL5* y su implicación en el desarrollo vascular. Este gen codifica para una enzima fundamental en la síntesis de termoespermina, molécula implicada en la diferenciación del xilema (Muñiz *et al.*, 2008).

3. Variación natural en *A. thaliana*

Arabidopsis thaliana es una especie originaria de Eurasia cuya capacidad para propagarse y adaptarse a distintas condiciones ambientales del entorno le han servido para poblar gran parte del hemisferio norte (Koorneef *et al.*, 2004; Mitchell-Olds *et al.*, 2006). La adaptación a distintos entornos es resultado de la variación intraespecífica, observada para muchos de sus rasgos fenotípicos. Esta elevada diversidad genética y fenotípica presente en las poblaciones de *Arabidopsis*, las convierte en un modelo ideal para estudios genéticos de variación natural (Horton *et al.*, 2012).

La variación natural se presenta como una herramienta con potencial para caracterizar la variación de fenotipo entre las poblaciones y se puede utilizar como una sólida fuente de información para determinar la regulación genética de rasgos como el crecimiento secundario.

3.1. Abordajes para aprovechar la variación natural

Se conocen distintos abordajes para establecer una relación entre la variación natural y un rasgo fenotípico a caracterizar. A continuación se nombran algunos de los más importantes.

Genome-Wide Association Studies (GWAS)

En los últimos años, distintos estudios se han centrado en el análisis de esta variación intraespecífica, secuenciando el genoma de multitud de accesiones presentes en la naturaleza (Cao *et al.*, 2011; Alonso-Blanco *et al.*, 2016), generando una base sobre la que comenzar la investigación.

Las técnicas Genome-Wide Association Studies (GWAS) proponen un abordaje basado en el uso de datos generados a partir de la variación natural para unir estadísticamente polimorfismos de secuencia al fenotipo en un contexto de genoma amplio, identificando posibles genes candidatos responsables de la variación observada entre poblaciones (Atwell *et al.*, 2010).

Mediante el empleo de estas técnicas, el grupo de Javier Agustí ha logrado identificar una serie de genes catalogados como potenciales reguladores del crecimiento secundario. Estudios fenotípicos previos han demostrado que los mutantes para los genes identificados muestran una reducción significativa de su crecimiento secundario en comparación con el genotipo silvestre, lo que, a falta de mayor caracterización, sugiere su implicación en el crecimiento secundario.

Transcriptómica comparada

Los abordajes comentados anteriormente poseen el inconveniente de que, al trabajar con un número limitado de accesiones, el nivel de variación natural es limitado, por lo que no es capaz de detectar genes cuyos niveles de expresión cambian pero su variación es demasiado pequeña.

La transcriptómica comparada, basada en la secuenciación de RNA de distintas accesiones, puede solventar estos problemas, detectando genes cuyos niveles de expresión cambian dentro de la variabilidad fenotípica que presenta la población de estudio.

Resultados como los obtenidos por Kusunoki *et al.* (2017) demuestran el potencial de un abordaje transcriptómico sobre distintas accesiones de *Arabidopsis* para la identificación de genes que regulan procesos biológicos, lo que podría aplicarse de manera específica al crecimiento secundario.

El trabajo aquí expuesto propone aprovechar la variación natural de *Arabidopsis thaliana*, realizando un abordaje transcriptómico sobre distintas accesiones, para identificar nuevos reguladores del crecimiento secundario.

Desde un punto de vista biotecnológico, la comprensión de los mecanismos genéticos a través de los cuales las plantas controlan el desarrollo de cambium y la formación de tejido vascular permitiría mejorar la producción y la calidad de la madera a través de la ingeniería genética.

OBJETIVOS

Los objetivos propuestos para el trabajo son los siguientes:

- Identificar nuevos reguladores del cambium a través de un abordaje transcriptómico en distintas accesiones de *Arabidopsis thaliana*.
- Caracterizar estos nuevos genes reguladores del cambium.

RESULTADOS

La identificación de nuevos potenciales reguladores de la actividad del cambium, aprovechando la variación natural mediante transcriptómica comparada, requiere seleccionar una población suficientemente heterogénea cuyo fenotipo permita establecer una correlación entre crecimiento secundario y transcriptoma.

En el grupo de Javier Agustí se ha logrado identificar nuevos reguladores del cambium mediante técnicas genómicas avanzadas como estudios de genómica asociativa (GWAS) (Milhinhos *et al.*, 2018; bajo revisión). Este GWAS parte de una población de 165 accesiones de *Arabidopsis thaliana* presentes en la naturaleza y las cuales están clasificadas en función de su crecimiento secundario (área promedio del tejido vascular; μm^2). Es este fenotipado previo de distintas variedades de *A. thaliana* en el que se basará la selección de la población del estudio. Para ello, 9 accesiones fueron seleccionadas y divididas en 2 grupos: *Grupo A*, accesiones que presentan un elevado crecimiento secundario (7291; 7378; 7307; 7176); *Grupo B*, accesiones con un reducido crecimiento secundario (7244; 7330; 7300; 7353). De manera adicional, se seleccionó una accesión que constituiría un crecimiento secundario intermedio entre los dos grupos seleccionados (6064) y una accesión extra, el ecotipo silvestre Col-0, que servirá como referencia de un ecotipo con cambium normal.

Para evitar la influencia de las condiciones de crecimiento (ambiente) sobre el fenotipo de las accesiones, el crecimiento de éstas se sometió a un proceso de randomización (véase Material y Método – Randomización). El objetivo de estas pautas de crecimiento es minimizar el ambiente de la ecuación “*Fenotipo = Genotipo + Ambiente*” para que la relación entre genotipo y fenotipo mostrado sea la más estrecha posible.

El órgano empleado, tanto para la medición del crecimiento secundario de las distintas accesiones como para la obtención del RNA que se enviará a secuenciar, fue hipocótilo de plantas de 21 días. La elección de este órgano para el estudio responde a su ampliamente demostrado potencial como modelo para estudiar crecimiento secundario en *Arabidopsis thaliana* y su abundancia en tejido vascular pues, en el hipocótilo, este proceso biológico comienza en etapas tempranas y continua durante todo el ciclo de vida de la planta (Ragni y Hardtke, 2014).

1. Comprobación de los fenotipos observados en el GWAS

Dado que las condiciones ambientales de este estudio probablemente difieran de las propiciadas en el fenotipado para el GWAS, es preciso un nuevo fenotipado de las accesiones escogidas para comprobar si se ajustan a lo previamente establecido.

Para ello, las 10 accesiones que conforman la población de estudio se crecieron sobre placas verticales de medio MS durante 21 días. Pasados estos 21 días, los hipocótilos de las plántulas fueron seccionados y, mediante cortes histológicos, el tejido vascular (μm^2) de cada una de las accesiones fue medido.

La **figura 3** muestra el área promedio del tejido vascular de las distintas accesiones de este experimento junto con el área promedio mostrado en el fenotipado previo que se realizó para el estudio GWAS. A rasgos generales, se aprecian diferencias en el área promedio entre ambos fenotipados, el área de tejido vascular que presenta el fenotipado de este estudio es superior al documentado por Milhinhos *et al.*, (2018; Bajo revisión). No obstante, se observa una tendencia conservada en ambos fenotipados por la cual las accesiones con mayor crecimiento secundario se encuentran claramente diferenciadas de las de menor crecimiento secundario, por lo que podría afirmarse que el fenotipo se ajusta al previamente

establecido. Estas diferencias entre el área promedio de ambos fenotipados pueden deberse a diversos factores, tales como diferencias en el medio empleado para el crecimiento de las plantas (MS) o las condiciones ambientales a las que fueron sometidas (temperatura, exposición luz, humedad).

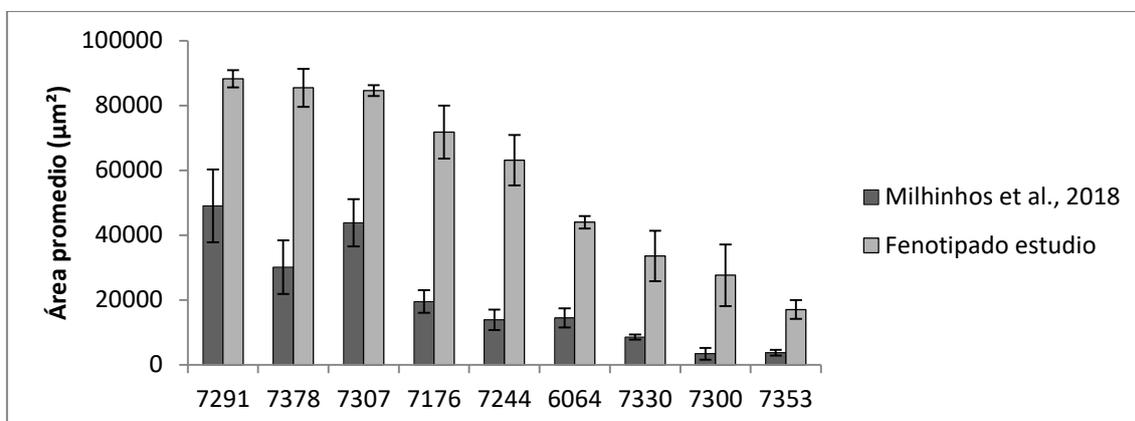


Figura 3. Comparación fenotipado accesiones realizado por Milhinhos et al. (2018) y el realizado en este estudio.

Los resultados del fenotipado de las accesiones de este estudio (figura 4) muestran dos grupos claramente diferenciados:

- Grupo A (7291; 7378; 7307; 7176): Mayor crecimiento secundario.
- Grupo B (6064; 7330; 7300; 7353): Menor crecimiento secundario.

Del mismo modo, se aprecia cómo una de las accesiones queda en un lugar intermedio entre estos dos grupos (7244), así como sucede con el ecotipo silvestre tomado como referencia, Col-0. Es esta situación de crecimiento secundario intermedio la que convierte a Col-0 el ecotipo idóneo para actuar como control para el posterior análisis del transcriptoma de las accesiones.

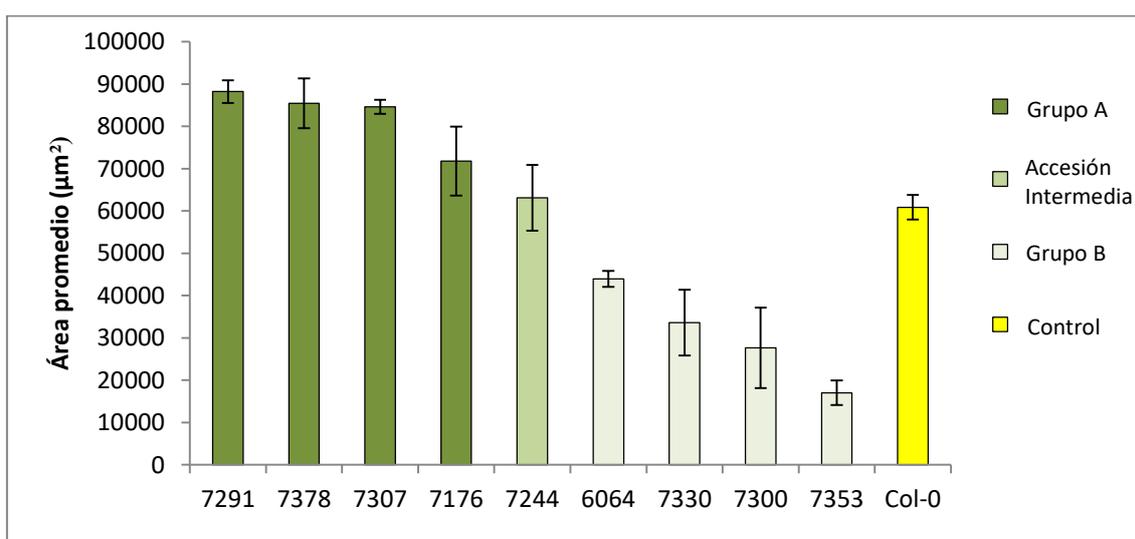


Figura 4. Área promedio tejido vascular accesiones. El grupo A lo conforman aquellas accesiones con mayor crecimiento secundario mientras que el grupo B aquellas accesiones con un crecimiento secundario reducido. La accesión 7244 y el ecotipo silvestre Col-0 presentan un fenotipo de crecimiento secundario intermedio entre los dos grupos.

2. Extracción RNA

Al igual que para el fenotipado, para la extracción del RNA se emplearon hipocótilos de plántulas de 21 días. En total, 16 hipocótilos por accesión fueron recogidos en 3 lotes de crecimiento distintos, que constituirán las 3 réplicas biológicas que se mandaron a secuenciar.

Los ng totales de RNA extraídos, así como otros parámetros de integridad del mismo, se muestran en la **tabla 1**. Las cantidades de RNA extraídas resultan suficiente para llevar a cabo la secuenciación del RNA (>500 ng).

Tabla 1. Integridad y ng totales de RNA. Los datos corresponden a las cantidades de RNA totales de cada una de las extracciones realizadas y réplica biológica de la cual proceden.

	Réplica biológica I			Réplica biológica II			Réplica biológica III		
	260/280	260/230	ng totales	260/280	260/230	ng totales	260/280	260/230	ng totales
7291	2.12	0.33	704.55	2.14	1.04	650.10	2.11	1.11	1069.20
7378	2.15	1.24	2069.10	2.05	0.96	1694.55	2.14	1.00	1143.45
7307	2.14	1.01	1278.75	2.14	0.40	803.55	2.12	0.94	1110.45
7176	2.12	1.07	1041.15	2.05	0.33	737.55	2.06	1.02	1432.20
7244	2.17	0.54	1574.10	2.20	0.22	844.80	2.18	1.24	1014.75
6064	1.47	1.29	1029.60	2.14	0.16	597.30	2.02	0.81	1031.25
7330	2.25	1.48	985.05	2.11	0.45	2232.45	1.92	0.75	998.25
7300	2.20	0.47	1285.35	1.96	1.56	1432.20	2.16	1.00	955.35
7353	2.06	1.57	1112.10	2.17	0.27	876.15	2.07	1.61	663.30
Col	2.14	1.86	4044.15	2.09	0.40	1625.25	2.10	1.75	3189.45

3. Resultados RNAseq

El número de lecturas procedentes de la secuenciación de RNA se muestra en la **tabla suplementaria 1** del Anexo 1.

Para proceder al análisis del transcriptoma, los resultados del RNAseq se muestran como el FC entre los niveles de expresión de las distintas accesiones (7291; 7378; 7307; 7176; 7244; 6064; 7330; 7300; 7353) frente a Col-0.

Antes de continuar con el análisis de transcriptoma, es preciso validar los resultados del RNAseq. Para ello, se tomaron dos genes con patrones de expresión dentro de la población bastante diferenciados: *NST3*, gen muy expresado en accesiones con mayor crecimiento secundario (**figura 5A**); y AT1G30515, gen con un patrón de expresión contrario al anterior (**figura 5C**). Se diseñaron oligos específicos para estos genes y se procedió a la realización de una qRT PCR para los mismos, utilizando el mismo material vegetal que en el RNAseq pero de una réplica biológica independiente.

Los resultados de esta qRT PCR muestran cómo se conserva la tendencia en la expresión de estos genes en toda la población. Para el gen *NST3*, las accesiones con mayor crecimiento secundario (*Grupo A*) presentaron mayor expresión (**figura 5B**) mientras que para el gen AT1G30515, aquellas accesiones con menor crecimiento secundario presentan mayor expresión (**figura 5D**).

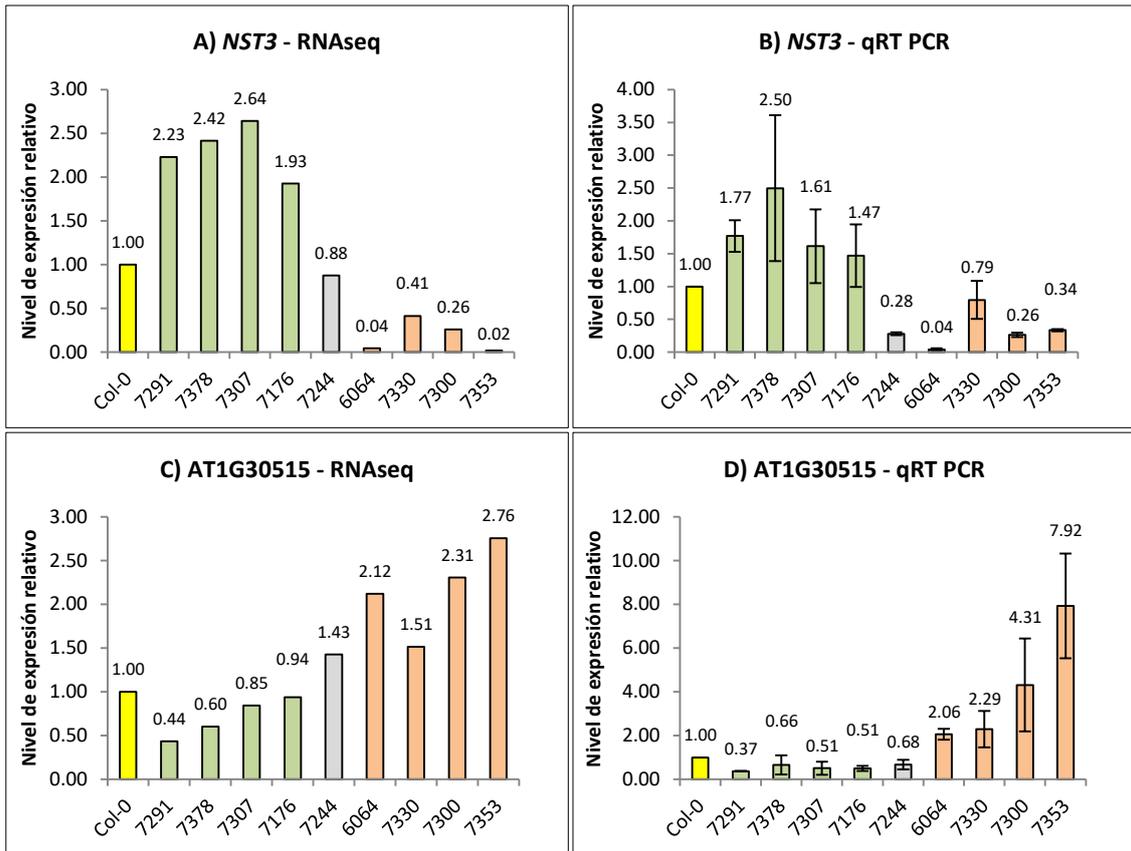


Figura 5. Niveles de expresión relativos para NST3 y AT1G30515 en la población. Los niveles de expresión mostrados corresponden al FC respecto a Col-0 (control). En color verde se encuentran representadas las accesiones del Grupo A. Las accesiones del Grupo B se encuentran representadas en color naranja. La accesión intermedia, 7244, se encuentra representada en color gris mientras que el control, Col-0, en color amarillo.

- (A) Niveles expresión NST3 procedentes de RNAseq
 (B) Niveles expresión NST3 procedentes de qRT-PCR
 (C) Niveles expresión AT1G30515 procedentes de RNAseq
 (D) Niveles expresión AT1G30515 procedentes de qRT-PCR

4. Número de genes expresados diferencialmente

El criterio establecido para determinar qué genes se están expresando diferencialmente frente al control en nuestra población dicta que aquellos genes cuyo FC sea inferior a 0.6 serán considerados como **genes regulados negativamente** (downregulated genes), mientras que aquellos con un FC superior a 1.5 serán considerados como **genes regulados positivamente** (upregulated genes)

Tabla 2. Número de genes expresados diferencialmente en la población.

Accesiones:	7291	7378	7307	7176	7244	6064	7330	7300	7353
Genes regulados positivamente	3338	2964	2711	2729	2912	2296	2188	2509	3058
Genes regulados negativamente	2614	2072	2009	1650	1428	2327	1519	1890	2053
Total	5952	5036	4720	4379	4340	4623	3707	4399	5111

Se observa una tendencia en la población por la cual a medida que el fenotipo de la accesión se aleja del mostrado por Col-0, crecimiento secundario intermedio, se aumenta el número de genes expresados diferencialmente (**figura 6**). Son aquellas accesiones que muestran un fenotipo situado en ambos extremos, 7291 y 7353, las que presentan mayor número de genes expresados diferencialmente, 5952 y 5111 respectivamente (**tabla 2**).

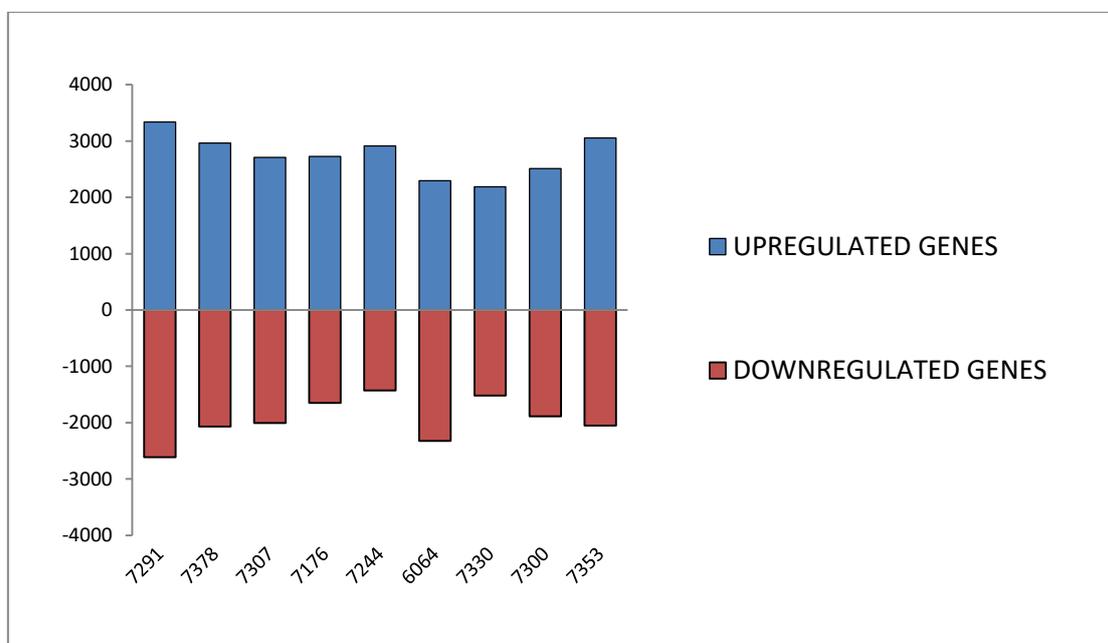


Figura 6. Número de genes expresados diferencialmente en la población de estudio. Se aprecia tendencia a un mayor número de genes expresados diferencialmente en aquellas accesiones con fenotipo más extremo.

5. Sobrerrepresentación términos GO en genes expresados diferencialmente

Para obtener información relevante acerca de los genes expresados diferencialmente, se realizó un enriquecimiento de términos GO para los genes regulados positivamente ($FC > 1.5$) y negativamente ($FC < 0.6$) para las accesiones que conforman los dos grupos diferenciados por su crecimiento secundario (*Grupo A*: 7291; 7378; 7307; 7307) (*Grupo B*: 6064; 7330; 7300; 7353). De esta forma, se podrá analizar el transcriptoma desde un punto de vista global, focalizando el estudio en aquellos términos GO más relevantes para cada uno de los grupos.

El análisis de este enriquecimiento en términos GO se centrará en aquellos términos cuya sobrerrepresentación muestre diferencias entre los dos grupos del estudio.

Términos GO – Procesos biológicos

La sobrerrepresentación de términos GO relativos a “Procesos Biológicos” para genes *upregulated* y *downregulated* muestran tendencias a tener en cuenta para la posterior discusión (**figura 7**).

Para genes regulados positivamente, se observa una sobrerrepresentación en el *Grupo A* para el término “Muerte celular programada” (GO:0012501). Por contra, aquellos términos GO relacionados con procesos hormonales (Regulación niveles hormonales, GO:0010817; Proceso biosintético hormonal, GO:0042446; Proceso metabólico hormonal, GO:0042445; y Proceso metabólico de auxina,

GO:0009850), se encuentran más sobrerrepresentados para el *Grupo B* (menor crecimiento secundario) que para el *Grupo A* (mayor crecimiento secundario)

En términos de fundamental relevancia para el crecimiento secundario (Desarrollo xilema, GO:0010089; Histogénesis floema o xilema, GO:0010087; o Biogénesis de pared celular secundaria, GO:0009834) se aprecia cómo para los genes regulados positivamente hay una evidente sobrerrepresentación de estos términos GO en el *Grupo A*, mientras que para los genes regulados negativamente se da el caso contrario, hay una sobrerrepresentación de estos términos GO para el *Grupo B*.

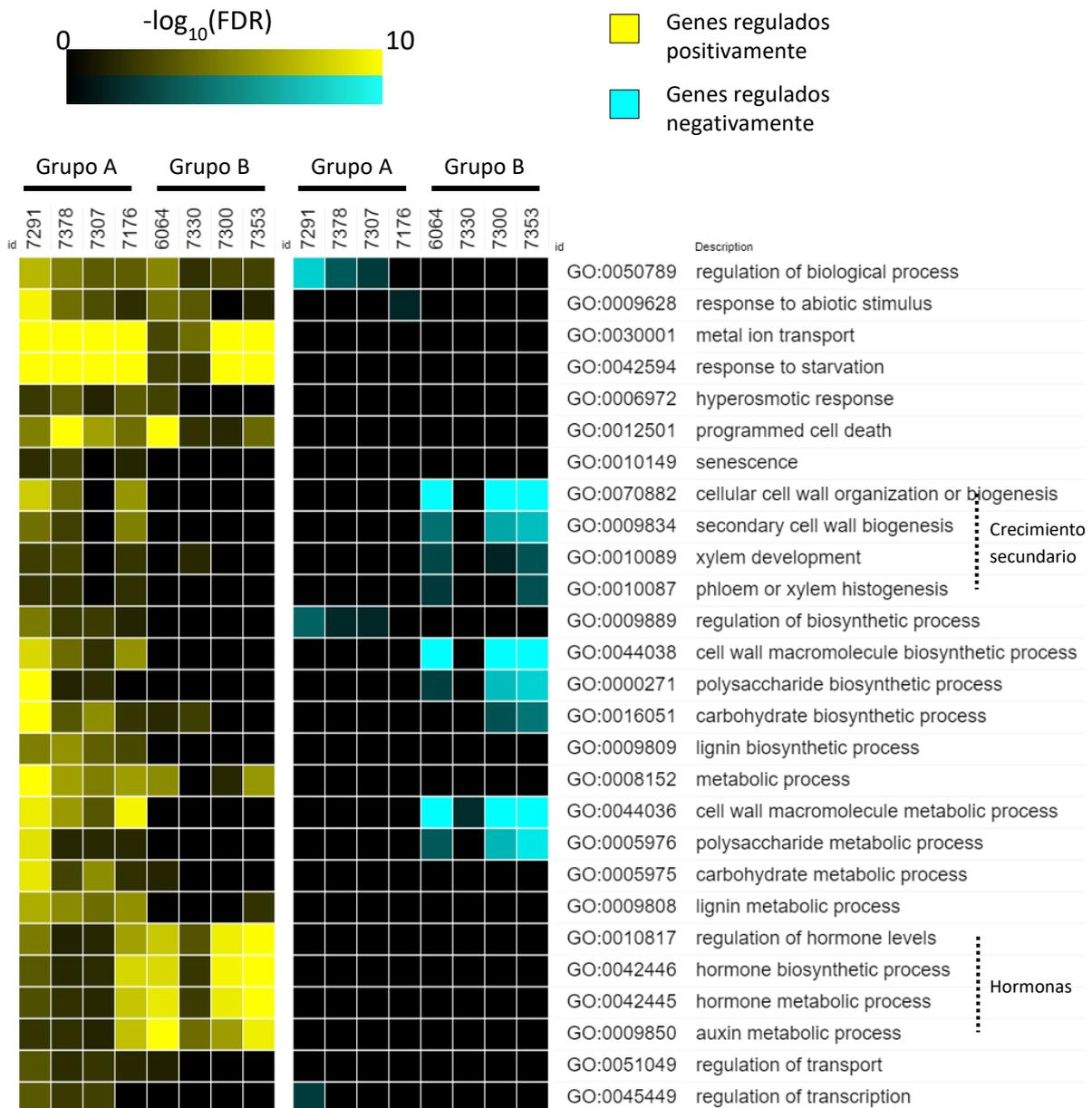


Figura 7. Representación de términos GO relativos a "Procesos biológicos" para genes regulados positivamente ($FC > 1.5$) y negativamente ($FC < 0.6$). Los términos GO representados presentan un $FDR < 0.05$.

Términos GO – Funciones moleculares

La sobrerrepresentación de términos GO relativos a “Funciones moleculares” para genes *upregulated* y *downregulated* se muestran en la **figura 8**.

Se aprecia un patrón en la sobrerrepresentación en los genes regulados positivamente, conservado en la mayoría de términos, consistente en una sobrerrepresentación de términos para el *Grupo A*. En el término “Actividad regulador transcripcional” (GO:0030528) se aprecia una sobrerrepresentación en toda la población para los genes regulados positivamente.

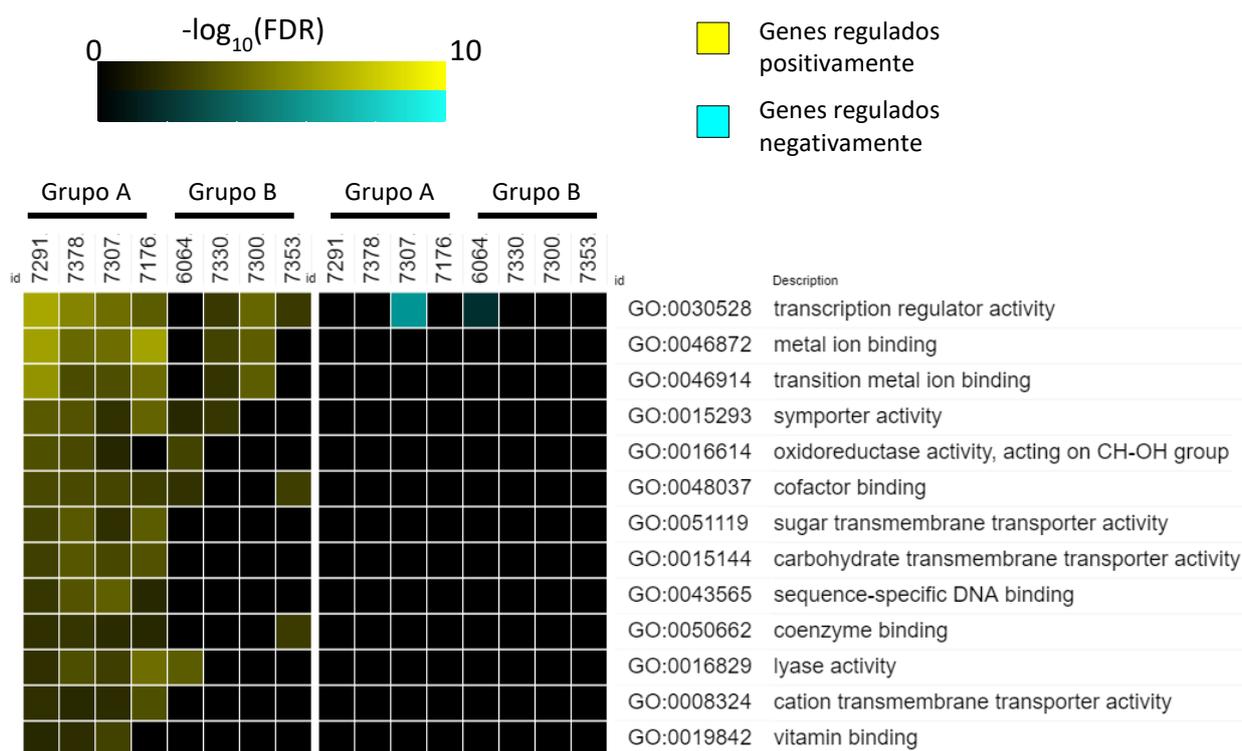


Figura 8. Representación de términos GO relativos a “Funciones moleculares” para genes regulados positivamente ($FC > 1.5$) y negativamente ($FC < 0.6$). Los términos GO representados presentan un $FDR < 0.05$.

6. Selección de potenciales nuevos reguladores de la actividad del cambium

Para la selección de genes candidatos de la regulación de la actividad cambial se procede al seguimiento de dos estrategias. La primera de ellas, *Estrategia A*, consistente en la selección de elementos partiendo de sus patrones de expresión en las distintas accesiones de la población; la segunda, *Estrategia B*, consistente en un análisis de elementos que pudieran estar actuando aguas arriba (upstream) y que, por tanto, pasarían desapercibidos en la primera de las estrategias.

6.1. Estrategia A – Selección genes por patrones de expresión en población

Como ya se ha comentado anteriormente, las accesiones se dividieron en dos grupos en función de su crecimiento secundario. Estando constituido el *Grupo A* por aquellas accesiones con mayor crecimiento

secundario (7291; 7378; 7307; 7176) mientras que el *Grupo B* por aquellas que menor crecimiento secundario presentan (6064; 7330; 7300; 7353). Son los patrones de expresión en base a estos dos grupos los que se contemplarán para la selección de los genes del transcriptoma (**figuras 9A y 9B**).

Para que las diferencias de expresión entre los dos grupos sean significativas, se seleccionarán aquellos genes que muestren una expresión diferencial ($FC < 0.6$; $FC > 1.5$) significativa ($FDR > 0.05$) en, al menos, 3 de las 4 accesiones que conformen uno de los grupos.

No obstante, también se estudiarán aquellos genes que presenten un patrón de expresión gradual en la población. Para estos patrones de gradación, en los cuales se establece una relación directa entre el fenotipo mostrado y el nivel de expresión, se contemplará la población de estudio completa, 9 accesiones (**figuras 9C y 9D**).

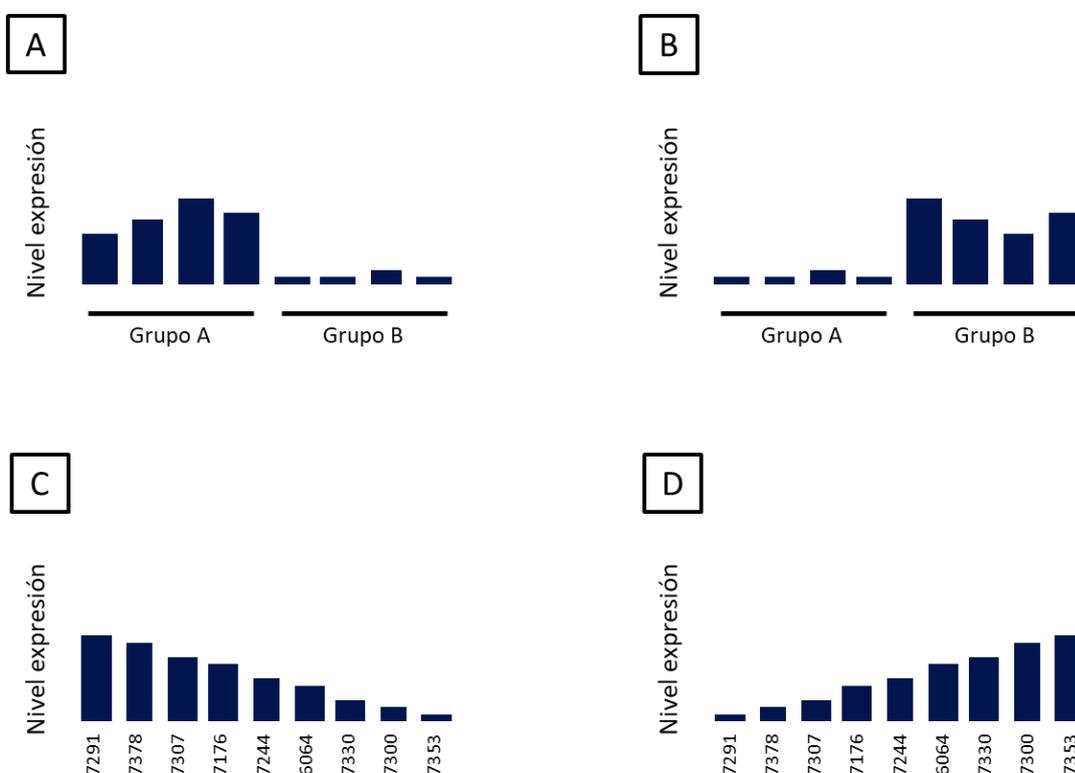


Figura 9. Esquema de los distintos patrones de expresión buscados en el transcriptoma (ejemplos).

(A) Mayor expresión en Grupo A que en Grupo B.

(B) Menor expresión en Grupo A que en Grupo B.

(C) Disminución expresión conforme disminuye el crecimiento secundario en la población (gradación positiva).

(D) Aumento expresión conforme disminuye el crecimiento secundario entre la población (gradación negativa)

Para lograr clasificar los genes del transcriptoma en función de sus patrones de expresión se acudió a la formación de clusters mediante la herramienta web Morpheus. Posteriormente, a partir de esos clusters, se fueron seleccionando de manera individual aquellos que mejor se amoldasen a los criterios de expresión previamente establecidos con la herramienta Microsoft Excel.

Una vez seleccionados los genes del transcriptoma en base a los patrones de expresión, se precisa acotar el número de genes para poder afinar más la selección.

Selección elementos relevantes en crecimiento secundario

En el control genético del crecimiento secundario, los factores de transcripción juegan un papel fundamental en la regulación transcripcional del mismo (Demura y Fukuda, 2007). Del mismo modo, el descubrimiento del par receptor-ligando PXY-CLE41, y la posterior inducción de WOX4 y WOX14, es uno de los sistemas que mayor impacto ha tenido en las recientes investigaciones sobre la regulación genética del cambium (EtcHELLS and Turner, 2010; EtcHELLS *et al.*, 2013).

En estas vías de señalización se pueden identificar una serie de elementos que, si bien son fundamentales para el desarrollo de cualquier proceso biológico, gozan de un papel clave en el crecimiento secundario: factores de transcripción, proteínas tipo kinasa y péptidos señal. Por tanto, se cribará el total de genes seleccionado anteriormente en búsqueda de estos elementos.

Los resultados para elementos identificados como factores de transcripción muestran un total de 29 genes; por otra parte, los resultados para elementos identificados como proteínas con actividad kinasa muestran un total de 11 genes; finalmente, para elementos identificados como péptidos señal, se encontró un único gen (**tabla 3**), AtCLE5, el cual, pese a tener expresión diferencial significativa en una accesión únicamente (7307), se seleccionó por ser el único péptido señal detectado.

Tabla 3. GeneID y nombre de los genes con actividad de factor de transcripción (GO:0003700), proteínas con actividad kinasa (GO:0004672) y péptidos señal (GO:0005102) seleccionados para los patrones de expresión establecidos en la población (7291; 7378; 7307; 7176; 7244; 6064; 7330; 7300; 7353). Los valores de expresión corresponden al FC respecto al control (Col-0). A la derecha de cada gen se muestra un minigráfico con el patrón de expresión en las 9 accesiones.

Actividad factor de transcripción											
Grupo A > Grupo B		7291	7378	7307	7176	7244	6064	7330	7300	7353	Minigráfico
AT2G45660	AGL20	6.34	3.12	2.45	1.48	0.71	0.03	1.09	0.51	0.13	
AT4G22680	AtMYB85	8.82	3.21	2.56	2.72	0.80	0.62	0.98	0.41	0.27	
AT5G17810	WOX12	77.09	218.96	118.89	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	27.04	
AT5G20240	PI	6.26	3.63	7.04	3.74	6.85	1.03	1.15	0.69	3.79	
AT1G32770	ANAC012	2.23	2.42	2.64	1.93	0.88	0.04	0.41	0.26	0.02	
AT2G45660	AGL20	6.34	3.12	2.45	1.48	0.71	0.03	1.09	0.51	0.13	
AT2G46770	ANAC043	2.19	2.08	1.93	2.21	1.15	0.05	0.67	0.38	0.02	
AT4G28500	ANAC073	3.11	1.93	2.07	1.70	0.83	0.47	0.77	0.35	0.18	
AT2G22800	HAT9	2.71	2.03	1.61	2.31	0.94	0.56	0.49	0.61	0.47	
AT5G26660	ATMYB86	3.00	2.60	2.46	2.42	2.15	0.10	0.67	0.58	0.25	
Grupo B > Grupo A		7291	7378	7307	7176	7244	6064	7330	7300	7353	Minigráfico
AT2G24340	AT2G24340	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	448.08	0.00	0.00	1049.44	
AT3G50890	AtHB28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	8.14	6.88	0.00	7.28	
AT5G27130	AGL39	0.00	0.00	0.00	0.00	15.07	17.02	34.21	0.00	42.22	
AT2G46970	PIL1	0.36	0.16	0.08	0.73	0.38	0.29	0.74	1.57	1.16	
AT3G24140	FMA	0.08	0.80	0.64	0.23	0.11	0.33	0.61	1.02	1.64	
AT3G46080	AT3G46080	0.11	0.37	0.10	0.20	0.20	0.59	0.43	0.29	1.21	
AT5G26950	AGL93	0.08	0.01	0.01	0.01	0.05	0.01	0.08	1.88	1.80	
Gradación (+)		7291	7378	7307	7176	7244	6064	7330	7300	7353	Minigráfico
AT1G17950	ATMYB52	5.25	3.12	2.92	2.54	1.38	0.62	1.14	0.51	0.58	
AT1G25250	AtIDD16	3.17	2.39	1.86	1.79	1.01	0.26	0.40	0.59	0.24	
AT1G28470	ANAC010	3.18	2.18	1.86	1.35	1.09	0.47	0.79	0.52	0.41	
AT2G23760	BLH4	3.63	2.10	1.85	1.86	1.09	0.39	0.86	0.68	0.57	
AT2G44745	AtWRKY12	3.42	2.35	2.52	1.64	1.59	0.43	1.19	0.67	0.32	
AT2G45660	AGL20	6.34	3.12	2.45	1.48	0.71	0.03	1.09	0.51	0.13	

AT3G61910	ANAC066	4.83	2.36	1.77	1.52	0.97	0.38	1.16	0.66	0.24	■
AT4G01680	AtMYB55	2.79	2.95	1.16	1.01	0.86	0.17	0.64	0.61	0.22	■
AT4G22680	AtMYB85	8.82	3.21	2.56	2.72	0.80	0.62	0.98	0.41	0.27	■
AT4G33450	ATMYB69	5.43	4.12	3.18	2.67	2.02	0.42	0.64	1.08	0.72	■
AT4G36870	BLH2	4.97	2.46	2.24	2.67	1.38	0.77	1.10	1.05	0.86	■
Gradación (-)		7291	7378	7307	7176	7244	6064	7330	7300	7353	Minigráfico
AT1G10480	ZFP5	0.39	0.51	0.42	0.75	0.78	1.04	1.05	1.22	1.43	■

Proteína actividad kinasa

Grupo A > Grupo B		7291	7378	7307	7176	7244	6064	7330	7300	7353	Minigráfico
AT4G21230	CRK27	6.05	1.78	4.21	3.22	3.58	0.27	1.48	0.40	3.80	■
AT4G23130	CRK5	9.39	6.46	6.39	5.85	0.00	0.00	0.00	0.00	5.82	■
AT4G23310	CRK23	0.00	13.51	14.04	0.00	18.01	0.00	0.00	0.00	0.00	■
Grupo B > Grupo A		7291	7378	7307	7176	7244	6064	7330	7300	7353	Minigráfico
AT1G05700	AT1G05700	0.00	0.00	0.00	3.65	0.00	3.39	4.74	0.00	3.37	■
AT1G07560	AT1G07560	0.00	0.00	0.00	5.94	18.53	9.54	0.00	5.03	26.24	■
AT1G65190	AT1G65190	0.00	0.00	0.00	1.62	0.00	0.00	9.35	2.49	1.47	■
AT4G00960	AT4G00960	0.00	0.00	0.00	2.25	0.00	5.90	2.34	7.33	0.00	■
Gradación (+)		7291	7378	7307	7176	7244	6064	7330	7300	7353	Minigráfico
AT4G03175	AT4G03175	2.06	2.44	1.82	1.23	0.66	0.11	0.33	0.23	0.03	■
AT5G39420	cdc2cAt	2.37	2.22	1.70	1.81	0.89	0.16	0.56	0.65	0.44	■
AT5G61560	AT5G61560	4.54	2.91	2.70	2.81	1.67	1.48	1.59	0.84	0.73	■
AT5G65530	AT5G65530	2.06	2.35	1.67	1.01	0.81	0.53	0.54	0.45	0.00	■

Péptido señal

Grupo A > Grupo B		7291	7378	7307	7176	7244	6064	7330	7300	7353	Minigráfico
AT2G31083	AtCLE5	0.00	0.00	93.55	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	■

Expresión espacial - Cambium

El número de genes seleccionados tras este cribado sigue siendo elevado, 41, por lo que se precisa establecer un nuevo criterio para acotar aún más esta selección.

Este nuevo criterio se basa en la expresión espacial de estos genes. Aquellos genes que muestren una expresión diferencial en las células del cambium tendrán más probabilidades de ser relevantes para el crecimiento secundario, pues son estas células meristemáticas las responsables de este proceso biológico (Nieminen *et al.*, 2015).

Empleando varios transcriptomas disponibles sobre expresión diferencial en el cambium en *A. thaliana* (Ko *et al.*, 2004; Zhao *et al.* 2005), se seleccionaron 10 genes que estaban presentes en él (**tabla 4**), descartando aquellos que no.

El array empleado en estos transcriptomas (GeneChip Arabidopsis ATH1 Genome Array; Affymetrix Inc) no contemplaba algunos de los genes previamente seleccionados, por lo que no se pudo comprobar su expresión en el cambium. Para solventar esto, aquellos genes no presentes en el array se sometieron a un estudio bibliográfico, comprobando en diferentes artículos si había evidencia de su expresión en la vasculatura u otros procesos biológicos y/u hormonales de relevancia en crecimiento secundario. De esta forma se logró recuperar para la selección dos genes que no estaban presentes en el array: *AtIDD16* y *WOX12*.

Mediante ensayos GUS, se ha demostrado que *AtIDD16* está altamente expresado en hipocótilo y vasculatura (Cui *et al.*, 2013). Del mismo modo, se ha comprobado que *WOX12*, junto con su homólogo *WOX11*, participa en organogénesis *de novo* de raíz, respondiendo a auxina alrededor del procambium para regular genes responsables de la transición celular de procambium de hoja a célula iniciadora de raíz (Liu *et al.*, 2014).

Finalmente, fueron seleccionados como potenciales nuevos reguladores del cambium 6 genes: 1 receptor tipo kinasa y 5 factores de transcripción. Sus patrones de expresión en la población se muestran en la **figura 10**.

Tabla 4. Genes seleccionados mediante Estrategia A – Selección genes por patrones de expresión en población. La información relativa a cada uno de ellos fue tomada de www.arabidopsis.org

GeneID	Nombre	Descripción
AT5G17810	WOX12 , WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN 12	Together with WOX11, WOX12 is involved in de novo root organogenesis.
AT2G22800	HAT9	Encodes homeobox protein HAT9.
AT1G17950	ATMYB52 , BW52, MYB DOMAIN PROTEIN 52, MYB52	Putative transcription factor: R2R3-MYB transcription family.
AT1G25250	ATIDD16 , IDD16, INDETERMINATE(ID)-DOMAIN 16	Encodes a transcription factor that, together with IDD14 and IDD15, regulates auxin biosynthesis and transport and thus aerial organ morphogenesis and gravitropic responses.
AT4G36870	BEL1-LIKE HOMEODOMAIN 2, BLH2	Plants doubly mutant for saw1/saw2 (blh2/blh4) have serrated leaves.
AT4G23130	CRK5 , CYSTEINE-RICH RLK (RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE) 5	Encodes a receptor-like protein kinase.

De manera adicional, mediante esta estrategia de selección por patrones de expresión en la población se lograron identificar 5 factores de transcripción, ya caracterizados, de gran relevancia para procesos relacionados con el crecimiento secundario (Anexo 2 – **Tablas suplementarias 2 y 3**).

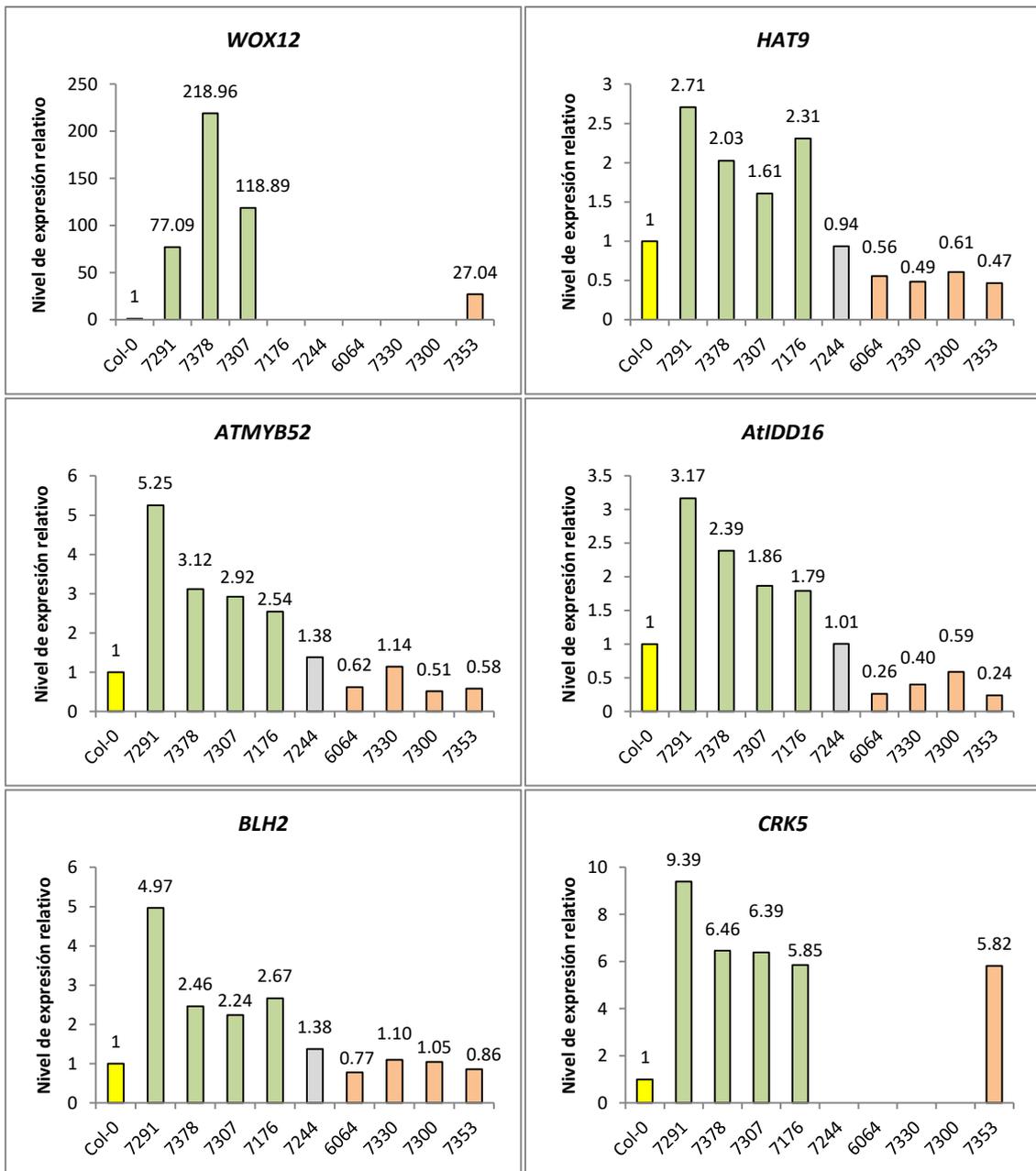


Figura 10. Niveles de expresión relativos para cada gen seleccionado en la población. Los niveles de expresión mostrados corresponden al FC respecto a Col-0 (control). En color verde se encuentran representadas las accesiones del Grupo A. Las accesiones del Grupo B se encuentran representadas en color naranja. La accesión intermedia, 7244, se encuentra representada en color gris mientras que el control, Col-0, en color amarillo.

6.2. Estrategia B – Selección genes *upstream*

La anterior estrategia (*Estrategia A* – Selección genes por patrones de expresión en población) imposibilita captar genes que estén actuando *upstream* en el transcriptoma, pues éstos no necesariamente presentan un patrón de expresión con el que establecer una correlación con el fenotipo de las accesiones. Es decir, sus niveles de expresión no tienen por qué tener una correlación con el crecimiento secundario mostrado. No obstante, es en los genes bajo su regulación transcripcional (targets) donde podría residir la información necesaria para identificarlos.

El diseño de esta nueva estrategia se basa en elaborar **redes de coexpresión**, consistentes en genes seleccionados en base a sus patrones de expresión (**figura 11A**) más genes que coexpresen con ellos (**figura 11B**), para hallar factores de transcripción que respondan ante motivos de unión comunes dentro de la red (**figura 11C**). Por tanto, se parte de una gran masa de genes para llegar, en base a características comunes de estos genes, a un número reducido de genes que se podrían catalogar como potenciales reguladores del cambium.

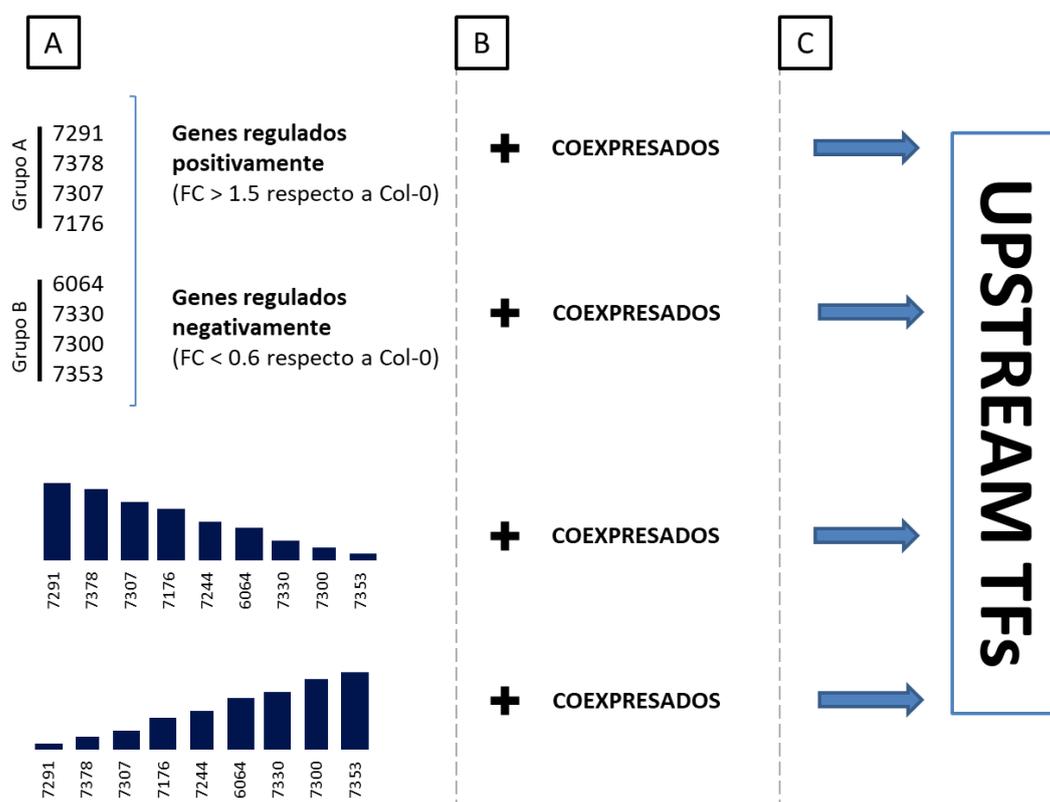


Figura 11. Esquema flujo trabajo para Estrategia B – Selección genes upstream.

(A) Selección genes en base a patrones de expresión.

(B) Elaboración redes de coexpresión.

(C) Búsqueda de factores de transcripción comunes a la red de coexpresión.

Listas de genes en función de patrones de expresión

La elaboración de las listas de genes de las que se partirá en esta estrategia se atiene a los siguientes criterios de selección:

- i. Selección genes regulados positivamente (FC > 1.5) y genes regulados negativamente (FC < 0.6) para cada una de las accesiones que forman parte de los grupos en los que se clasificó la población (*Grupo A*; *Grupo B*).
- ii. Selección genes que presenten un patrón de expresión gradual, tanto positiva como negativa, en la población completa (7291; 7378; 7307; 7176; 7244; 6064; 7330; 7300; 7353).

Redes de coexpresión

Para adicionar genes que podrían haber pasado desapercibidos en el paso anterior y que podrían añadir información valiosa para la búsqueda de elementos upstream, se elaboraron redes de coexpresión.

Para ello se acude a la herramienta ATTED-II, la cual permite introducir un input de genes para generar un output consistente en los genes previamente introducidos junto con una lista de aquellos que suelen coexpresar con ellos, basados en bibliografía y bases de datos existentes (Obayashi *et al.*, 2017).

Factores de transcripción

Para identificar los factores de transcripción a través de los motivos de unión a DNA de las redes de coexpresión elaboradas anteriormente, se acudió a TF2Network.

Esta herramienta permite identificar factores de transcripción comunes para genes que compartan un PWM en sus regiones no codificadoras (Kulkarni *et al.*, 2018). De esta forma, es capaz de elaborar redes de regulación génica (gene regulatory network; GRN) a partir de un input de genes (redes de coexpresión).

De un modo similar a lo acontecido en la *Estrategia A*, el número de factores de transcripción identificados es muy elevado, por lo que se procedió a cribarlos por expresión espacial con los criterios citados previamente.

El resultado final es un total de 6 factores de transcripción (**tabla 5**): *ANAC098* y *OBP4* se identificaron en redes de coexpresión de genes regulados positivamente ($FC > 1.5$) para el *Grupo A*. *TINY2* y *LBD4*, por su parte, se identificaron en redes de coexpresión de genes regulados positivamente ($FC > 1.5$) para el *Grupo B*. Finalmente, se identificó *ANAC096* en redes de coexpresión para genes con gradación positiva, mientras que *ATCBF3* se identificó en redes de coexpresión para genes con gradación negativa.

Al igual que sucedía en el apartado anterior, mediante esta estrategia se lograron identificar 16 factores de transcripción de relevancia para procesos relacionados con el crecimiento secundario (Anexo 3 – **Tabla suplementaria 4**).

Tabla 5. Genes seleccionados mediante Estrategia B – Selección genes upstream. La información relativa a cada uno de ellos fue tomada de www.arabidopsis.org

GeneID	Nombre	Descripción
AT5G11590	TINY2	Encodes a member of the DREB subfamily A-4 of ERF/AP2 transcription factor family. The protein contains one AP2 domain.
AT1G31320	LBD4 , LOB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 4	LOB domain-containing protein 4
AT5G53950	ANAC098 , ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 98, CUC2, CUP-SHAPED COTYLEDON 2	Transcriptional activator of the NAC gene family, with CUC1 redundantly required for embryonic apical meristem formation, cotyledon separation and expression of STM.
AT5G60850	ATDOF5.4, OBF BINDING PROTEIN 4, OBP4	Encodes a zinc finger protein
AT5G46590	ANAC096 , NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 96	NAC domain containing protein 96
AT4G25480	ATCBF3 , C-REPEAT BINDING FACTOR 3, CBF3	This gene is involved in response to low temperature and abscisic acid.

7. Caracterización genes seleccionados

Una vez seleccionados los genes potenciales reguladores de la actividad del cambium, se procede su caracterización.

Para ello, se realiza un análisis de la expresión diferencial en distintos tejidos de *A. thaliana*.

Es conocido que el nivel de crecimiento secundario tiene una manifestación gradual desde el hipocótilo hacia los tejidos superiores, siendo este órgano el que mayor nivel de crecimiento secundario presenta (**figura 12**) (Ragni y Hardtke, 2014). Esto es debido a que, en el hipocótilo, el crecimiento primario (elongación) se detiene pocos días después de la germinación, iniciándose de forma simultánea el crecimiento secundario del mismo, el cual continúa a lo largo del ciclo de vida de la planta (Ragni *et al.* 2011).

En la caracterización de los genes candidatos se estudiará la expresión de los mismos en estos tres tejidos: hipocótilo, base y el primer entrenudo. De este modo se tratará de dilucidar su implicación en el crecimiento secundario relacionando la expresión del gen con la manifestación del proceso biológico.

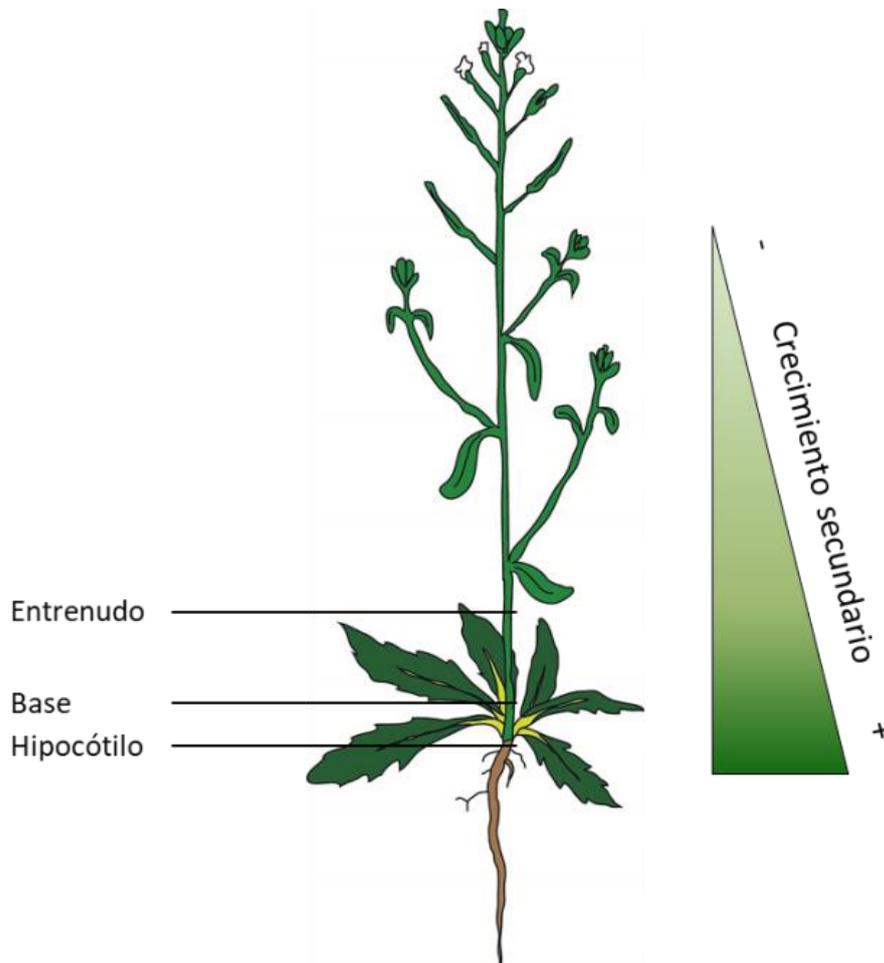


Figura 12. Nivel crecimiento secundario en los distintos tejidos de *Arabidopsis thaliana*.

Los patrones de expresión esperados se muestran en la **figura 13**.

Este análisis de la expresión diferencial en tejidos se realizó mediante qRT PCR empleando tejido vegetal del ecotipo silvestre Col-0 en edad adulta (20 cm de altura).

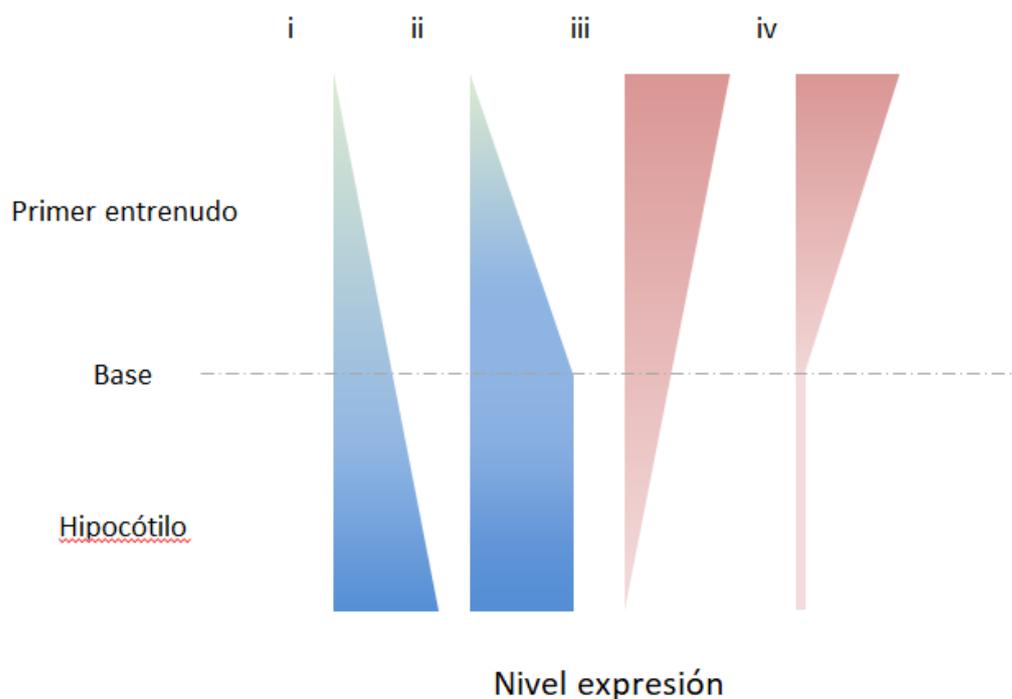


Figura 13. Patrones de expresión esperados en el análisis de expresión diferencial en hipocótilo, base y entrenudo.

(i) Expresión gradual positiva: expresión aumenta conforme aumentan los niveles de crecimiento secundario.

(ii) Alta expresión en tejidos con mayor crecimiento secundario.

(iii) Expresión gradual negativa: expresión disminuye conforme aumentan los niveles de crecimiento secundario.

(iv) Baja expresión en tejidos con mayor crecimiento secundario.

Solo se obtuvieron resultados para los genes *HAT9*, *CRK5* y *LBD4*. La falta de resultados para los demás genes se debió a problemas técnicos que no se pudieron solventar por falta de tiempo.

Los resultados se muestran representados en la **figura 14**. El factor de transcripción *HAT9* presenta una alta expresión en el hipocótilo que va disminuyendo de manera gradual en los sucesivos tejidos. Algo similar ocurre con el receptor tipo kinasa *CRK5*, el cual presenta una alta expresión en el entrenudo que va disminuyendo de manera gradual hasta el hipocótilo, tejido donde presenta la menor expresión. El factor de transcripción *LBD4* no presenta un patrón de expresión concreto.

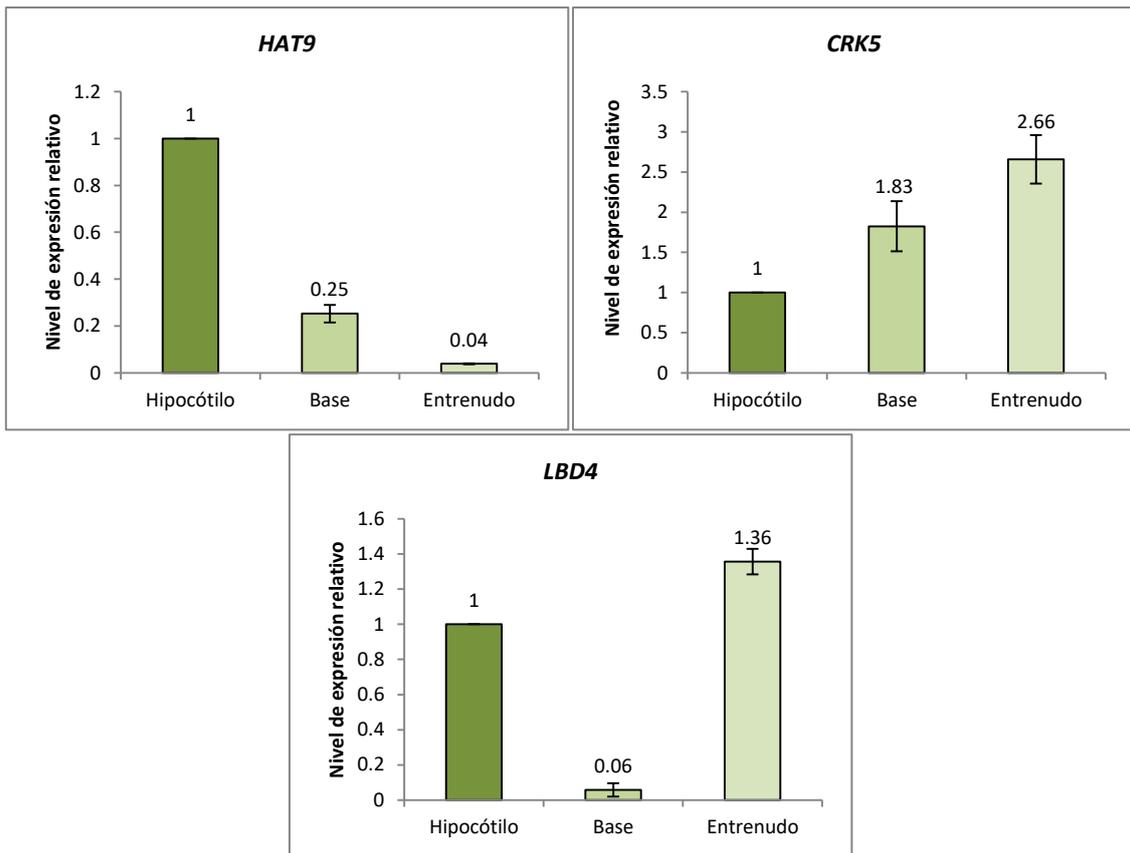


Figura 14. Niveles de expresión relativos en hipocótilo, base y entrenudo para los genes *HAT9*, *CRK5* y *LBD4*

DISCUSIÓN

El experimento llevado a cabo resulta adecuado para realizar la secuenciación de RNA

Los resultados relativos al re-fenotipado de las accesiones, sumado a los niveles de expresión de RNA obtenidos, indican que la selección de la población y las condiciones experimentales llevadas a cabo se ajustan a los requisitos establecidos para llevar a cabo una secuenciación de RNA.

La tendencia mostrada en el RNAseq para genes con patrones de expresión en la población completamente opuestos (*NST3*, expresión alta en *Grupo A* y baja en *Grupo B*; *AT1G30515*, expresión baja en *Grupo A* y alta en *Grupo B*) se conserva en la qRT-PCR realizada para los mismos. Estos resultados sugieren la validez de los niveles de expresión mostrados en transcriptoma.

La expresión diferencial aumenta al alejarse del fenotipo control (Col-0)

En los resultados relativos al número de genes expresados diferencialmente en la población se aprecia cómo, a medida que las accesiones de la población se alejan del fenotipo de la accesión de referencia (Col-0), aumenta la expresión diferencial. Son las dos accesiones con fenotipo más extremo, las que más se alejan del fenotipo de referencia, 7291 y 7353, las que mayor número de genes expresados diferencialmente presentan.

De estos resultados puede extraerse una correlación entre variabilidad de fenotipo y expresión diferencial que sugiere que la selección de las accesiones de la población es adecuada. Del mismo modo, esta correlación sugiere que son estos genes expresados diferencialmente los que podrían estar incidiendo en el crecimiento secundario mostrado por las accesiones.

Sobrerrepresentación términos GO en la población

En la sobrerrepresentación de términos GO para genes regulados positivamente ($FC > 1.5$) se obtuvo una sobrerrepresentación en el *Grupo A* para el término GO "Programmed cell death". La muerte celular programada (Programmed cell death; PCD), consistente en un suicidio celular regulado genéticamente, juega un papel fundamental en el crecimiento secundario. Este fenómeno, que se manifiesta en los haces vasculares, es necesario para la diferenciación de las traqueidas (Kuriyama and Fukuda, 2002). La existencia de factores de transcripción que regulan directamente genes involucrados en PCD y la formación de pared secundaria durante la diferenciación de células xilemáticas, como VND6 (Ohashi-Ito *et al.*, 2010), sugiere la presencia de elementos de regulación similares en el transcriptoma que podrían definirse como potenciales genes reguladores del cambium.

Por otro lado, se obtuvo una sobrerrepresentación en términos relacionados con procesos hormonales generales (Regulación niveles hormonales, GO:0010817; Proceso biosintético hormonal, GO:0042446; Proceso metabólico hormonal, GO:0042445) en genes regulados positivamente para el *Grupo B*. Las hormonas vegetales juegan un papel crucial en el crecimiento secundario, ejerciendo de reguladoras en la actividad cambial. De manera más específica, esta tendencia también se conserva en el término "Proceso metabólico de auxina" (GO:0009850). Las auxinas son fitohormonas de gran relevancia en el crecimiento secundario, pues regulan procesos como la expansión celular (Mockaitis and Estelle, 2004) o la diferenciación vascular (Reinhardt *et al.*, 2003). La sobrerrepresentación de estos términos en el grupo de menor crecimiento secundario (*Grupo B*) sugiere que puedan estar implicadas en la inhibición del mismo.

Especial mención merece la sobrerrepresentación de términos GO relacionados con el crecimiento secundario (Desarrollo xilema, GO:0010089; Histogénesis floema o xilema, GO:0010087; o Biogénesis de pared celular secundaria, GO:0009834). La clasificación de las accesiones en dos grupos se realizó en función de su crecimiento secundario, por lo que parece normal que aquellas accesiones con mayor crecimiento secundario (Grupo A) presenten una regulación positiva para estos genes mientras que las de menor crecimiento secundario (Grupo B) presenten una regulación negativa para los mismos.

Esto plantea dos ideas:

- i. Diversos estudios evidencian la existencia de genes cuya expresión está directamente relacionada con los niveles de crecimiento secundario en plantas. La sobreexpresión de *WOX4*, factor de transcripción que promueve la diferenciación vascular del cambium, en plántulas de *Solanum lycopersicum* genera un aumento de tejido vascular respecto al silvestre (Ji *et al.*, 2010). Por el contrario, en mutantes de pérdida de función para el mismo gen en *Arabidopsis thaliana*, se aprecia una disminución del tejido vascular (Etchells *et al.*, 2013). Se extrae, por tanto, una correlación entre nivel de expresión y crecimiento secundario que podría estar presente en más genes sin caracterizar.
- ii. Se conoce la existencia de elementos encargados de regular transcripcionalmente el crecimiento secundario. Es el caso de los factores de transcripción HD ZIP III, cuya implicación en el desarrollo vascular ha sido ampliamente demostrada (Zhou *et al.*, 2007; Ohashi-Ito *et al.*, 2005). Las diferencias entre grupos para la sobrerrepresentación de estos términos GO podría deberse, por tanto, a una regulación transcripcional por factores de transcripción que actúen de manera similar.

Genes relacionados con crecimiento secundario respaldan las estrategias diseñadas

Siguiendo la *Estrategia A* (Selección genes por patrones de expresión en población) se identificaron genes implicados en la formación de pared celular, fundamental en la diferenciación de tejido vascular, con una sobreexpresión significativa para el grupo de mayor crecimiento secundario (*Grupo A*) (Anexo 1). En la misma línea, la selección de elementos mediante la *Estrategia B* (Selección genes upstream) resultó en la identificación, no sólo de genes relacionados con la formación de pared celular secundaria, sino también de factores de transcripción que regulan directamente la diferenciación en tejido vascular (Anexo 2).

La identificación de estos elementos mediante el seguimiento de las citadas estrategias sugiere el potencial de las mismas para identificar genes no descritos que también tengan implicación en el crecimiento secundario.

Genes candidatos como reguladores del cambium

Los factores de transcripción *WOX12*, *HAT9*, *ATMYB52*, *ATIDD16* y *BLH2*, así como el receptor tipo kinasa *CRK5*, presentan una mayor expresión en las accesiones que mayor crecimiento secundario presentan. De aquí se extrae una correlación positiva entre el nivel de expresión y el fenotipo resultante que se podría traducir como la actuación de estos genes como **reguladores positivos del crecimiento secundario**.

Se ha demostrado la implicación de miembros de la familia WUSCHEL-related homeobox, *WOX4* y *WOX14*, en la inducción de la proliferación de células vasculares mediante la interacción con el par receptor-ligando PXY-CLE41 (Etchells *et al.*, 2013). Estos estudios plantean que otros miembros de la familia génica, como *WOX12*, pudieran tener un comportamiento similar en el crecimiento secundario.

Los resultados obtenidos por Newman y Campbell (2000) sugieren la implicación de miembros pertenecientes a la familia de factores de transcripción MYB en la regulación transcripcional de la formación de xilema. Adicionalmente, se ha demostrado que *ATMYB52* se encuentra regulado positivamente en xilema e interviene en la lignificación de la pared celular secundaria (Oh *et al.*, 2003; Cassan-Wang *et al.*, 2013). Estos resultados sugieren la participación de *ATMYB52* en procesos relacionados con la formación de xilema y, por tanto, concuerdan con la hipótesis de que pueda ejercer como regulador positivo del crecimiento secundario.

ATIDD16 ha demostrado su implicación en gravitropismo y morfogénesis promoviendo la biosíntesis y transporte de auxinas (Cui *et al.*, 2013). Dada la importancia de esta hormona en el crecimiento secundario (Mockaitis and Estelle, 2004; Reinhardt *et al.*, 2003), los resultados sugieren su actuación como potencial regulador del crecimiento secundario.

Anteriores estudios sobre regulación transcripcional del crecimiento secundario muestran cómo *BLH2* se encuentra regulado positivamente en el xilema (Oh *et al.*, 2003), lo que concuerda con los resultados obtenidos y, por tanto, lo postula como un potencial inductor del crecimiento secundario.

CRK5 se ha caracterizado como regulador del crecimiento y desarrollo en respuestas de aclimatación, demostrando su implicación en la muerte celular (Burdial *et al.*, 2015). Sin embargo, su expresión en distintos tejidos de *Arabidopsis* muestra altos niveles de expresión en los tejidos con menor crecimiento secundario, resultado que no concuerda con la posibilidad de que ejerza como regulador positivo del crecimiento secundario.

Para *HAT9* no se ha encontrado bibliografía relevante para relacionarlo con procesos del crecimiento secundario. No obstante, este gen presenta mayores niveles de expresión en tejidos donde los niveles de crecimiento secundario son mayores, lo que concuerda con la hipótesis de que pueda ejercer de regulador positivo para el crecimiento secundario.

Los factores de transcripción ANAC098 y OBP4 fueron identificados como reguladores en redes de coexpresión confeccionadas con genes regulados positivamente (FC > 1.5) para las accesiones con mayor nivel de crecimiento secundario (*Grupo A*). El factor de transcripción ANAC096, por su parte, fue identificado en una red de coexpresión con genes que presentaban gradación positiva en la población, es decir, la expresión de estos aumentaba de manera progresiva a medida que aumentaba el crecimiento secundario de las accesiones de la población. Esta condición los sitúa como posibles **reguladores transcripcionales positivos del crecimiento secundario**, sugiriendo su actuación como inductores de la expresión de genes que fomenten el crecimiento secundario.

ANAC098 y *ANAC096* pertenecen a la familia NAC. Familia génica de factores de transcripción cuya relevancia en el crecimiento secundario ha sido ampliamente descrita (Zhong *et al.*, 2006; Mitsuda *et al.*, 2007; Yamaguchi *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2010; Hussey *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2014; Zhong *et al.*, 2015), por lo que estos miembros de la familia podrían tener un rol similar en el crecimiento secundario.

OBP4 ha sido caracterizado como un regulador negativo de la proliferación celular y expansión (Xu *et al.*, 2016), resultados que no concuerdan con la hipótesis de que este gen sea un regulador transcripcional que induzca el crecimiento secundario.

TINY2 y **LBD4** fueron identificados como reguladores en redes de coexpresión confeccionadas con genes regulados positivamente ($FC > 1.5$) para las accesiones con menor nivel de crecimiento secundario (*Grupo B*). Mientras, **ATCBF3** fue identificado en una red de coexpresión con genes que presentaban gradación negativa en la población, es decir, la expresión de estos aumentaba de manera progresiva a medida que disminuía el crecimiento secundario de las accesiones de la población. Al contrario que los factores de transcripción presentados anteriormente, esta condición los sitúa como posibles **reguladores transcripcionales negativos del crecimiento secundario**, sugiriendo su actuación como inductores de la expresión de genes que inhiban el crecimiento secundario.

Tomados en conjunto, estos resultados reflejan la importancia de diseñar una estrategia que permita acotar un transcriptoma completo a una lista de 12 genes que, basados en su naturaleza, tienen opciones de ser reguladores del cambium en *Arabidopsis thaliana*.

Futuros experimentos

La caracterización de estos 12 genes candidatos aún se encuentra en una fase muy temprana, por lo que se precisan profundos análisis que permitan validar su implicación en la regulación del cambium así como su funcionalidad. Estos análisis deberán personalizarse en función de la naturaleza de los genes. Así, en genes que codifican para un factor de transcripción, los ensayos deberían focalizarse en sus dianas, mientras que, si codifican para un receptor, habrían de centrarse en sus ligandos.

En primer lugar, es fundamental finalizar el análisis de expresión en tejidos con distinto crecimiento secundario, algo que solo se pudo comprobar en 3 de los 12 genes seleccionados. Los resultados permitirán cribar aún más la lista de genes, seleccionando aquellos cuya expresión permita establecer una correlación con el nivel de crecimiento secundario.

Para los elementos upstream seleccionados podría plantearse una búsqueda de SNPs a través del genoma de las accesiones. Esto podría revelar la existencia de series alélicas que expliquen la regulación transcripcional que se produce en la población.

La obtención de líneas transgénicas para los genes seleccionados revelaría la implicación de los mismos en el crecimiento secundario. Se contemplaría la generación de mutantes de pérdida de función, así como de sobreexpresión, en los cuales debería observarse alteraciones en el desarrollo vascular en comparación con el fenotipo silvestre. Estas alteraciones fenotípicas podrían estudiarse mediante ensayos histológicos como los realizados en este trabajo (medición área tejido vascular).

Para averiguar si existe una relación entre los genes candidatos y otros reguladores ya conocidos del crecimiento secundario, se estudiarían los niveles de expresión de los genes candidatos en fondos mutantes para dichos reguladores. Esto permitiría situarlos en las vías de señalización de los mismos: *upstream*, *downstream* o vía independiente.

Mediante hibridación *in situ* se podría observar si estos genes se están expresando en tejidos vasculares. Del mismo modo, mediante marcaje con proteína de fluorescencia (GFP, por ejemplo) o ensayo con Glucuronidasa (GUS) se podría ver dónde actúan las proteínas para las que codifican.

Desde un punto de vista biotecnológico, una vez demostrada la implicación de estos genes en el crecimiento secundario en *Arabidopsis*, se podría trasladar el ensayo a especies leñosas como *Populus* con ortólogos de dichos genes. De este modo, se podría estudiar la aplicación de estos genes en especies productoras de madera con interés comercial.

CONCLUSIONES

Del trabajo aquí expuesto se puede extraer la siguiente conclusión:

- Utilizando una estrategia que combina variación natural y transcriptómica comparada entre accesiones se han identificado 12 genes que, potencialmente, son reguladores del cambium.

1. Material Vegetal

Las accesiones de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) utilizadas en este estudio (7291, Pa-2; 7378, Uk-1; 7307, Pn-0; 7176, Is-1; 7244, Mnz-0; 7330, Sapporo-0; 7300, Pla-0; 7353, Tha-1) proceden de distintas regiones del planeta (tabla 6).

Tabla 6. Accesiones de la población de estudio.

ID	Name	Lon	Lat	Country	Collector
7291	Pa-2	13.22	38.07	Italia	Albert Kranz
7378	Uk-1	7.767	48.033	Alemania	Albert Kranz
7307	Pn-0	-2.966	48.065	Francia	Albert Kranz
7176	Is-1	7.5	50.5	Alemania	Albert Kranz
7244	Mnz-0	8.267	50.001	Alemania	Albert Kranz
6064	Nyl-2	18.276	62.951	Suecia	Magnus Nordborg
7330	Sapporo-0	141.346	43.055	Japón	Yoshie Hanzawa
7300	Pla-0	2.25	41.5	España	Albert Kranz
7353	Tha-1	4.3	52.08	Países Bajos	Maarten Koornneef

El ecotipo silvestre Col-0 procede del laboratorio 2.07 del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV), donde es muy utilizado en las distintas líneas de investigación del grupo de Javier Agustí.

2. Condiciones Crecimiento

Crecimiento en medio MS

Las semillas fueron esterilizadas mediante el procedimiento de gas cloro (Lindsey *et al.*, 2017) durante 8 horas. El medio utilizado para sembrar las semillas fue MS basal (Sigma-Aldrich) al 8% de agar. Se siembran 4 semillas por accesión en placas cuadradas con 45 mL de MS basal en 3 grupos y 4 semillas por placa, como muestra la figura 15A.

Una vez sembradas las semillas, éstas se someten a un proceso de vernalización en el cual las placas se mantienen a 4°C y oscuridad durante 7 días (Sung and Amasino, 2005). De esta forma, sincronizamos, en la medida de lo posible, los procesos de desarrollo y crecimiento de cada una de las accesiones. Pasados estos 7 días vernalizando, las placas se disponen de manera vertical sobre un soporte y son sacadas a luz bajo condiciones de día largo (16h luz /8h oscuridad a 21-23°C y humedad relativa de 50-80%) para que germinen y crezcan durante 21 días. Se plantaron 16 semillas por lote de cada accesión y ecotipo silvestre (Col-0).

Randomización

Las placas dispuestas en vertical se someten a un proceso de randomización: Cada tres días las placas se cambian de posición con las más próximas, como muestra la **figura 15B**. Dado que permanecen 21 días en crecimiento, se realizarán 7 movimientos por experimento.

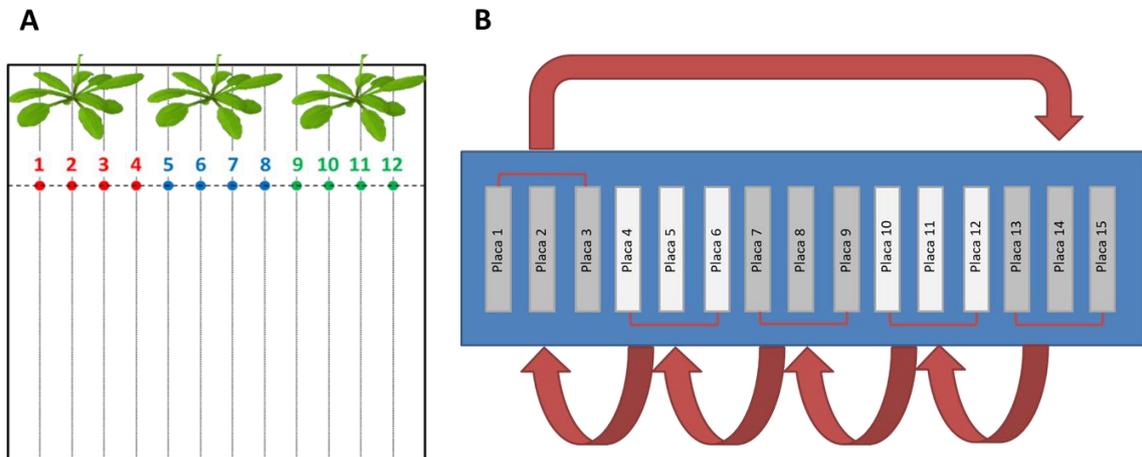


Figura 15. (A) Disposición de las semillas en placa. Cada color indica una accesión distinta. (B) Esquema de randomización. Las flechas rojas indican la translocación de las placas en grupos de tres.

Crecimiento en tierra

Para el crecimiento en tierra del ecotipo silvestre Col-0, las semillas se colocaron en agarosa al 0.1% y permanecieron vernalizando durante 48 horas en condiciones de oscuridad y 4°C. Pasado el proceso de vernalización, se cultivaron 24 alveolos de tierra y perlita, sembrando una media de 4 semillas por alveolo para garantizar la germinación de, al menos, una semilla por maceta, cardando las plántulas restantes que hubieran germinado. Las plantas se cultivaron en fitotrón en un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 23°C hasta que alcanzaron una edad adulta de unos 20 cm de tamaño.

3. Análisis Histológico.

Tejido vegetal

Para llevar a cabo la medición del crecimiento secundario, se empleó hipocótilo de plantas de 21 días creciendo sobre MS en vertical. 12 hipocótilos por accesión fueron extraídos mediante el uso de una cuchilla. Éstos son introducidos en etanol 70% y almacenados a 4°C hasta su posterior utilización.

Inclusión en parafina

El tejido empleado es sometido a un pretratamiento con FAE (50% etanol, 5% ácido acético glacial, 3.7% formaldehído y 31.3% agua destilada) al vacío durante 4 horas. Pasado este tiempo, las muestras se introducen en etanol 70% durante 1 hora seguido de un tratamiento de etanol 90% durante 2 horas en el cual el etanol se cambia pasada una hora. Posteriormente las muestras se tratan con etanol 95% con eosina durante 1 hora, seguidamente éstas se pasan a etanol 95% durante 1 hora para, acto seguido, permanecer en etanol absoluto durante 1 hora. Finalmente, las muestras se someten a tres

tratamientos con el disolvente histológico Histo-Clear (National Diagnostics) durante 1 hora para, seguidamente, sumergirlas en parafina durante 3 horas al vacío.

Para lograr cortes transversales de los hipocótilos, las muestras se disponen de manera vertical en la parafina, orientándolos hasta que ésta se enfríe y se puedan extraer los bloques de parafina para procesar su corte en el micrótopo.

Cortes histológicos

Los bloques de parafina se someten a una disección por micrótopo, obteniéndose una media de 20 secciones transversales de las muestras a 10 μm de grosor. Estas secciones se colocan en un portaobjetos sobre una placa calefactora (30°C) que permitirá la fijación de los cortes al mismo.

Tinción azul de Toluidina

Para eliminar los restos de parafina de las muestras fijadas, éstas son tratadas con Histo-Clear (National Diagnostics) durante 10 minutos. Posteriormente, se realizan varios lavados con agua miliQ para retirar este disolvente histológico y, acto seguido, introducir las muestras en una secuencia de diluciones de etanol (10 minutos etanol absoluto; 5 minutos etanol 90%; 5 minutos etanol 70%; 5 minutos etanol 50%, 5 minutos etanol 30%) que finalizarán con un lavado de las muestras en agua miliQ durante 10 minutos.

La tinción de muestras se realizó mediante un tratamiento con disolución de azul de toluidina al 0.02% (Mitra and Loqué, 2014) durante 1 minuto para, posteriormente, lavarlas con agua miliQ y retirar el azul de toluidina sobrante. Una vez realizado esto, las muestras se disponen sobre una superficie y se dejan secar.

Una vez realizada la tinción y las muestras se encuentren completamente secas, se procede al montaje de las mismas. Se colocan 2-3 gotas del medio de montaje M-GLAS® (Sigma-Aldrich) e inmediatamente se coloca un cubreobjetos. Las muestras se dejan solidificar durante 1 hora.

Microscopio y configuración

Para la visualización de las muestras se realizaron capturas fotográficas de cada una de las muestras mediante microscopía (Leica DVM5000 HD). Cada una de las capturas fue tomada en formato *.tif* con una escala de 200 μm para su posterior medición por software.

Software medición

El software empleado para la medición del tejido vascular de las muestras fue ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Software gratuito que permite medir secciones de una imagen estableciendo una escala previamente. Para medir únicamente el tejido vascular de las muestras, se seleccionó el área (μm^2) del tejido más central de los hipocótilos, el cual mostraba un patrón visual distinto del resto (**figura 16**). Para la presentación de estos resultados se utilizó la herramienta Microsoft Excel.

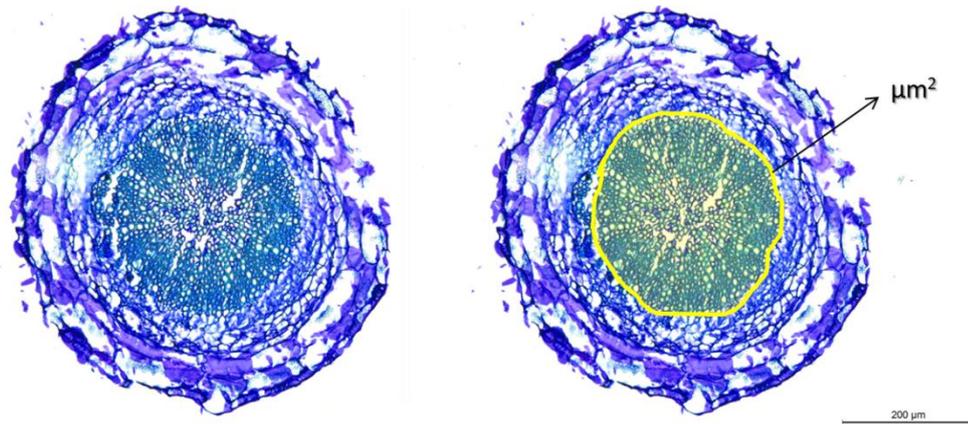


Figura 16. Medición tejido vascular con ImageJ. El área en color amarillo es utilizada por el software para generar el área del tejido vascular

4. Extracción RNA y Secuenciación

Tejido utilizado

Del mismo modo que para el análisis histológico, el tejido empleado para la extracción de RNA fue hipocótilo de plantas de 21 días creciendo en medio MS, seccionado con una hoja de cuchilla afilada. Aquellas plantas que presentasen un crecimiento y desarrollo anormal respecto a su población (accesión), son descartadas. Para cada experimento, se realizó un pool de 16 hipocótilos de cada accesión, constituyendo el tejido biológico donde se aplicará la extracción de RNA. Estos hipocótilos fueron almacenados en nitrógeno líquido para posteriormente almacenarse a -80°C , evitando así la degradación del RNA (Fleige and Pfaffl, 2006).

Kit extracción

El tejido almacenado a -80°C se trituró con un émbolo sobre un tubo de 1.5 mL, añadiéndose previamente 100 μL de β -Mercaptoetanol para evitar que en proceso de triturado de las muestras se degrade el RNA, fruto de la descongelación de las mismas. Una vez la muestra se encuentre homogénea y bien triturada, se añaden 250 μL adicionales de β -Mercaptoetanol y se procede a la extracción de RNA. Para ello, se utilizó el kit de extracción RNeasy Micro Kit (Qiagen), siguiendo el protocolo para tejido del propio producto. Entre las especificaciones del fabricante, este kit está indicado para obtener altos rendimientos de RNA de alta calidad con escaso material de partida, haciéndolo idóneo para aplicaciones de secuenciación de RNA.

Para retirar el DNA de las muestras, se realizó una digestión por DNAsa en columna, incluida en el protocolo de extracción. El RNA de todas las muestras cuantificó mediante NanoDrop (ThermoFischer).

Secuenciación RNA

Para la secuenciación de RNA, se emplearon 3 muestras de RNA para cada accesión (10x3), siendo cada una de éstas una réplica biológica del experimento. En total, 30 muestras con un volumen de 16.5 μL y 750 ng de RNA total se mandaron a secuenciar, obteniéndose alrededor de 13 millones de lecturas por muestra. La preparación de bibliotecas y secuenciación se realizó en colaboración con la sección de Genómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia (UV).

5. Mapeo Lecturas

El mapeo de las lecturas se llevó a cabo en colaboración con Ivan Lebovka, bioinformático del Servicio de Bioinformática del IBMCP.

6. Análisis Expresión Diferencial

El análisis del transcriptoma se realizó utilizando el ecotipo Col-0 como referencia. Del mismo modo que el mapeo de las lecturas, este tratamiento de los datos en bruto procedentes del RNAseq se llevó a cabo en colaboración con Ivan Lebovka (IBMCP).

Los datos relativos a la expresión diferencial de las accesiones, para cada uno de los genes, corresponden al FC de los niveles de expresión de las accesiones dividido entre Col-0. Aquellos genes con un FC superior a 1.5 se considerarán como genes regulados positivamente y aquellos con un FC inferior a 0.6 como genes regulados negativamente.

Para la identificación de niveles de expresión diferencial como significativos, se acudió al cálculo del FDR de los mismos. Se considerarán significativos aquellos niveles de expresión con un FDR superior a 0.05.

Clasificación genes por patrones de expresión

La clasificación de los genes en función de su comportamiento en la población se realizó a través del software Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>), introduciendo el transcriptoma de las 9 accesiones y configurando la herramienta “Hierarchical Clustering” con los parámetros “Metric: One minus Pearson correlation” y “Linkage method – Average”.

El curado final de los genes pertenecientes a los distintos patrones de expresión se realizó mediante la herramienta Microsoft Excel.

Selección elementos del transcriptoma

La selección de aquellos genes clasificados como factores de transcripción, receptores tipo quinasa o péptidos señal se realizó con la herramienta Gene Ontology (GO) Annotations (<https://www.arabidopsis.org/tools/bulk/go/index.jsp>), seleccionando aquellos genes que presentaran cualquiera de los siguientes términos GO: DNA-binding transcription factor activity (GO:0003700); protein kinase activity (GO:0004672); signaling receptor binding (GO:0005102).

Enriquecimiento términos GO

El enriquecimiento de términos GO para genes regulados positivamente y negativamente en cada una de las accesiones se realizó mediante la herramienta web AgriGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>) (Du *et al.*, 2010; Tian *et al.*, 2017). Se introdujeron un total de 16 listas de genes: 2 listas, genes regulados positivamente y negativamente, por cada una de las 8 accesiones. Únicamente se mostraron términos GO significativos (FDR<0.05) para las listas de genes introducidas. Para eliminar aquellos GO redundantes se accedió a la herramienta ReviGO (Supek *et al.*, 2011), incorporada en el propio software de AgriGO.

Heatmap

La elaboración de los heatmaps para los términos GO de genes regulados positivamente y negativamente en cada una de las accesiones de los dos grupos (Grupo A; Grupo B) se llevó a cabo mediante la herramienta Morpheus. Los valores representados corresponden al $-\log_{10}(\text{FDR})$ de cada término en cada accesión, por lo que están representados en función de su significancia.

Coexpresión

La obtención de las redes de coexpresión se realizó mediante la herramienta NetworkDrawer de la web ATTED-II (http://atted.jp/top_draw.shtml#NetworkDrawer) introduciendo como input el GeneID de los genes. Los parámetros seleccionados para la confección de estas redes fueron los siguientes:

- “Coexpression options - Add a few genes”. Añade genes que coexpresan, al menos, con dos genes del input.
- “Protein-Protein Interactions - [Add a few genes]”. Añade genes que presentan interacciones proteína-proteína, al menos, con dos genes del input.

TF upstream

La identificación de factores de transcripción, en base a motivos de unión a DNA comunes en los genes del input, se realizó mediante la herramienta web TF2Network (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/TF2Network/>) (Kulkarni *et al.*, 2017) utilizando como input las redes de coexpresión obtenidas con ATTED-II.

Expresión espacial genes seleccionados

La expresión espacial de los genes seleccionados en base a bibliografía se realizó elaborando una base de datos con los genes expresados en cambium según varios transcriptomas (Ko *et al.*, 2004; Zhao *et al.* 2005). Cada uno de estos genes se enfrentó a esta base de datos mediante la herramienta Microsoft Excel para comprobar su expresión en el cambium.

7. Extracción RNA y qRT-PCR

Tejido utilizado

Para la validación del RNAseq se tomó material vegetal idéntico al empleado para la secuenciación de RNA.

Por otro lado, para el estudio de la expresión en distintos tejidos de los genes seleccionados del transcriptoma, se emplearon distintos tejidos del ecotipo silvestre tomado como referencia (Col-0) crecido sobre tierra y en edad adulta (20 cm de altura). Mediante el uso de una cuchilla afilada se seccionó el hipocótilo, base y entrenudo de cada una de las plantas. El tejido extraído se introdujo inmediatamente en nitrógeno líquido para posteriormente almacenarlo a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cada réplica biológica consistió en 16 plantas y sus tejidos seccionados correspondientes.

Kit extracción

El machacado de los tejidos recogidos se realizó empleando un mortero en presencia de nitrógeno líquido. El nitrógeno permite que el tejido permanezca congelado en el proceso, facilitando el machacado e impidiendo que se inicie la degradación del RNA. Una vez se obtiene la muestra completamente triturada y homogénea (aspecto de polvo), se comienza la extracción.

La extracción de RNA se realizó con el kit de extracción NucleoSpin RNA plant (Macherey-Nagel). El protocolo seguido para la extracción fue el indicado por el fabricante, exceptuando el tratamiento con DNasa. Este tratamiento se realizó sobre el RNA extraído mediante el kit TURBO™ DNase (Invitrogen), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

Obtención cDNA

La obtención de cDNA a partir del RNA extraído se realizó utilizando el kit PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis kit (Takara) y un termociclador con un programa de temperaturas diseñado específicamente para el tratamiento. Para establecer las distintas temperaturas del protocolo sobre las muestras, se empleó un programa de termociclador diseñado específicamente para el kit. En total, un volumen de 80 µl de cDNA por muestra fue obtenido.

PCR cuantitativa a tiempo real

Se realizaron dos experimentos de qRT PCR: uno para la validación del RNAseq, con los genes NST3 y AT1G30515; y otro para la caracterización de los genes seleccionados CRK5, HAT9 y LBD4. Para estandarizar los resultados, se empleó ACT8 como gen constitutivo (*housekeeping gene*). Todos los oligos empleados se muestran en la **tabla 6**. Para la realización de cada experimento, se emplearon 3 réplicas técnicas por muestra de cDNA para cada una de las 2 réplicas biológicas obtenidas, procedentes de lotes de crecimiento distintos.

Para el cálculo del ddCt con el que se mostraron los niveles de expresión en las accesiones se utilizó el cDNA de Col-0 como referencia.

Estas reacciones se llevaron a cabo empleando el kit PowerUp SYBR Green Master Mix (ThermoFisher) y el instrumento Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR System (ThermoFisher). Los resultados obtenidos se procesaron mediante el software 7500 Fast Software v2.0.6 (ThermoFisher) y herramientas de Microsoft Excel.

Tabla 6. Oligos empleados para la validación del RNAseq y la caracterización de genes seleccionados

Gen	Columna1	Secuencia (5' --> 3')	Uso
NST3	Forward:	CCTGACTCCAAGCAAACCTCG	qRT PCR
NST3	Reverse:	TCCCATCGCTGCATCATAGT	qRT PCR
AT1G30515	Forward:	ACGTCATTCTTTGGACCACC	qRT PCR
AT1G30515	Reverse:	CAGAAGCGACCATCAAAGCC	qRT PCR
CRK5	Forward:	TTGTTGTGCCAGTCGCTATCTCAGT	qRT PCR
CRK5	Reverse:	ACCCTGCAGTTGTGATGTCATCCTC	qRT PCR
HAT9	Forward:	CTCAGCCCTTTTACATGCACA	qRT PCR
HAT9	Reverse:	CAACAAGCTGCAGATGGGTT	qRT PCR
LBD4	Forward:	AGATGTGTTGCAAGCTCAGC	qRT PCR
LBD4	Reverse:	CATGCCCTTGTTCCTGTG	qRT PCR
ACT8	Forward:	AGTGGTCGTACAACCGGTATT	qRT PCR
ACT8	Reverse:	GAGGATAGCATGTGGAAGTGA	qRT PCR

REFERENCIAS

- Agustí, J., & Greb, T. (2013). Going with the wind—Adaptive dynamics of plant secondary meristems. *Mechanisms of development*, 130(1), 34-44.
- Agustí, J., Herold, S., Schwarz, M., Sanchez, P., Ljung, K., Dun, E. A., ... & Greb, T. (2011a). Strigolactone signaling is required for auxin-dependent stimulation of secondary growth in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(50), 20242-20247.
- Agustí, J., Lichtenberger, R., Schwarz, M., Nehlin, L., & Greb, T. (2011b). Characterization of transcriptome remodeling during cambium formation identifies MOL1 and RUL1 as opposing regulators of secondary growth. *PLoS Genetics*, 7(2), e1001312.
- Aloni, R. (1979). Role of auxin and gibberellin in differentiation of primary phloem fibers. *Plant Physiology*, 63(4), 609-614.
- Aloni, R. (2001). Foliar and axial aspects of vascular differentiation: hypotheses and evidence. *Journal of plant growth regulation*, 20(1), 22-34.
- Alonso-Blanco, C., Andrade, J., Becker, C., Bemm, F., Bergelson, J., Borgwardt, K. M., ... & Ecker, J. R. (2016). 1,135 genomes reveal the global pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 166(2), 481-491.
- Baima, S., Possenti, M., Matteucci, A., Wisman, E., Altamura, M. M., Ruberti, I., & Morelli, G. (2001). The *Arabidopsis* ATHB-8 HD-zip protein acts as a differentiation-promoting transcription factor of the vascular meristems. *Plant Physiology*, 126(2), 643-655.
- Bennett, T., van den Toorn, A., Sanchez-Perez, G. F., Campilho, A., Willemsen, V., Snel, B., & Scheres, B. (2010). SOMBRERO, BEARSKIN1, and BEARSKIN2 regulate root cap maturation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 22(3), 640-654.
- Bhargava, A., Mansfield, S. D., Hall, H. C., Douglas, C. J., & Ellis, B. E. (2010). MYB75 functions in regulation of secondary cell wall formation in the *Arabidopsis* inflorescence stem. *Plant Physiology*, pp-110.
- Biemelt S, Tschiersch H, Sonnewald U (2004). Impact of altered gibberellin metabolism on biomass accumulation, lignin biosynthesis, and photosynthesis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol* 135: 254–265
- Bishopp, A., Help, H., El-Showk, S., Weijers, D., Scheres, B., Friml, J., ... & Helariutta, Y. (2011). A mutually inhibitory interaction between auxin and cytokinin specifies vascular pattern in roots. *Current Biology*, 21(11), 917-926.
- Björklund, S., Antti, H., Uddestrand, I., Moritz, T., & Sundberg, B. (2007). Cross-talk between gibberellin and auxin in development of *Populus* wood: gibberellin stimulates polar auxin transport and has a common transcriptome with auxin. *The Plant Journal*, 52(3), 499-511.
- Bowman JL, Floyd SK (2008) Patterning and polarity in seed plant shoots. *Annu Rev Plant Biol* 59: 67–88
- Brewer, P. B., Koltai, H., & Beveridge, C. A. (2013). Diverse roles of strigolactones in plant development. *Molecular plant*, 6(1), 18-28.
- Busse, J. S., & Evert, R. F. (1999). Vascular differentiation and transition in the seedling of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 160(2), 241-251.
- Cao, J., Schneeberger, K., Ossowski, S., Günther, T., Bender, S., Fitz, J., ... & Wang, X. (2011). Whole-genome sequencing of multiple *Arabidopsis thaliana* populations. *Nature genetics*, 43(10), 956.
- Cassan-Wang, H., Goué, N., SAIDI, M. N., Legay, S., Sivadon, P., Goffner, D., & Grima-Pettenati, J. (2013). Identification of novel transcription factors regulating secondary cell wall formation in *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science*, 4, 189.
- Chaffey, N., Cholewa, E., Regan, S., & Sundberg, B. (2002). Secondary xylem development in *Arabidopsis*: a model for wood formation. *Physiologia plantarum*, 114(4), 594-600.

- Cui, D., Zhao, J., Jing, Y., Fan, M., Liu, J., Wang, Z., ... & Hu, Y. (2013). The Arabidopsis IDD14, IDD15, and IDD16 cooperatively regulate lateral organ morphogenesis and gravitropism by promoting auxin biosynthesis and transport. *PLoS Genetics*, 9(9), e1003759.
- Demura, T., & Fukuda, H. (2007). Transcriptional regulation in wood formation. *Trends in plant science*, 12(2), 64-70.
- Digby, J., & Wareing, P. F. (1966). The effect of applied growth hormones on cambial division and the differentiation of the cambial derivatives. *Annals of Botany*, 30(3), 539-548.
- Dolan, L., & Roberts, K. (1995). Secondary thickening in roots of *Arabidopsis thaliana*: anatomy and cell surface changes. *New Phytologist*, 131(1), 121-128.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., & Scheres, B. (1993). Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development*, 119(1), 71-84.
- Du, Q., & Wang, H. (2015). The role of HD-ZIP III transcription factors and miR165/166 in vascular development and secondary cell wall formation. *Plant signaling & behavior*, 10(10), e1078955.
- Du, Z., Zhou, X., Ling, Y., Zhang, Z., & Su, Z. (2010). agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic acids research*, 38(suppl_2), W64-W70.
- Emery, J. F., Floyd, S. K., Alvarez, J., Eshed, Y., Hawker, N. P., Izhaki, A., ... & Bowman, J. L. (2003). Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Current Biology*, 13(20), 1768-1774.
- Eriksson ME, Israelsson M, Olsson O, Moritz T (2000). Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. *Nat Biotechnol* 18: 784–788
- Etchells, J. P., & Turner, S. R. (2010). The PXY-CLE41 receptor ligand pair defines a multifunctional pathway that controls the rate and orientation of vascular cell division. *Development*, 137(5), 767-774.
- Etchells, J. P., Provost, C. M., & Turner, S. R. (2012). Plant vascular cell division is maintained by an interaction between PXY and ethylene signalling. *PLoS Genetics*, 8(11), e1002997.
- Etchells, J. P., Provost, C. M., Mishra, L., & Turner, S. R. (2013). WOX4 and WOX14 act downstream of the PXY receptor kinase to regulate plant vascular proliferation independently of any role in vascular organisation. *Development*, dev-091314.
- Fleige, S., & Pfaffl, M. W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular aspects of medicine*, 27(2-3), 126-139.
- Fukuda, H. (1997). Tracheary element differentiation. *The Plant Cell*, 9(7), 1147.
- Gomez-Roldan V., Fermas S., Brewer P., Puech-Pagès V., A. Dun E., Pillot JP., Letisse F, Matusova R., Danoun S., Portais JC., Bouwmeester H., Bécard G., Beveridge CA., Rameau C. and Rochange SF. (2008). "Strigolactone inhibition of shoot branching" *Nature*. 455, 189–194
- Groover, A., & Robischon, M. (2006). Developmental mechanisms regulating secondary growth in woody plants. *Current opinion in plant biology*, 9(1), 55-58.
- Horton, M. W., Hancock, A. M., Huang, Y. S., Toomajian, C., Atwell, S., Auton, A., ... & Nordborg, M. (2012). Genome-wide patterns of genetic variation in worldwide *Arabidopsis thaliana* accessions from the RegMap panel. *Nature genetics*, 44(2), 212.
- Hossain, Z., McGarvey, B., Amyot, L., Gruber, M., Jung, J., & Hannoufa, A. (2012). DIMINUTO 1 affects the lignin profile and secondary cell wall formation in *Arabidopsis*. *Planta*, 235(3), 485-498.
- Howe GA (2004) Jasmonates. In: Davies PJ (ed) *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 610–634
- Hussey, S. G., Mizrachi, E., Spokevicius, A. V., Bossinger, G., Berger, D. K., & Myburg, A. A. (2011). SND2, a NAC transcription factor gene, regulates genes involved in secondary cell wall development in *Arabidopsis* fibres and increases fibre cell area in *Eucalyptus*. *BMC plant biology*, 11(1), 173.

- Israelsson, M., Sundberg, B., & Moritz, T. (2005). Tissue-specific localization of gibberellins and expression of gibberellin-biosynthetic and signaling genes in wood-forming tissues in aspen. *The Plant Journal*, 44(3), 494-504.
- Ji, J., Strable, J., Shimizu, R., Koenig, D., Sinha, N., & Scanlon, M. J. (2010). WOX4 promotes procambial development. *Plant physiology*, 152(3), 1346-1356.
- Kim, J., Jung, J. H., Reyes, J. L., Kim, Y. S., Kim, S. Y., Chung, K. S., ... & Chua, N. H. (2005). microRNA-directed cleavage of ATHB15 mRNA regulates vascular development in Arabidopsis inflorescence stems. *The Plant Journal*, 42(1), 84-94.
- Kim, W. C., Kim, J. Y., Ko, J. H., Kim, J., & Han, K. H. (2013). Transcription factor MYB46 is an obligate component of the transcriptional regulatory complex for functional expression of secondary wall-associated cellulose synthases in Arabidopsis thaliana. *Journal of plant physiology*, 170(15), 1374-1378.
- Kinoshita, T., Cano-Delgado, A., Seto, H., Hiranuma, S., Fujioka, S., Yoshida, S., & Chory, J. (2005). Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature*, 433(7022), 167.
- Ko, J. H., & Han, K. H. (2004). Arabidopsis whole-transcriptome profiling defines the features of coordinated regulations that occur during secondary growth. *Plant molecular biology*, 55(3), 433-453.
- Ko, J. H., Han, K. H., Park, S., & Yang, J. (2004). Plant body weight-induced secondary growth in Arabidopsis and its transcription phenotype revealed by whole-transcriptome profiling. *Plant Physiology*, 135(2), 1069-1083.
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., & Vreugdenhil, D. (2004). Naturally occurring genetic variation in Arabidopsis thaliana. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 141-172.
- Kubo, M., Udagawa, M., Nishikubo, N., Horiguchi, G., Yamaguchi, M., Ito, J., ... & Demura, T. (2005). Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes & development*, 19(16), 1855-1860.
- Kulkarni, S. R., Vanechoutte, D., Van de Velde, J., & Vandepoele, K. (2017). TF2Network: predicting transcription factor regulators and gene regulatory networks in Arabidopsis using publicly available binding site information. *Nucleic acids research*, 46(6), e31-e31.
- Kuriyama, H., and Fukuda, H. (2002). Developmental programmed cell death in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 568–573.
- Kusunoki, K., Nakano, Y., Tanaka, K., Sakata, Y., Koyama, H., & Kobayashi, Y. (2017). Transcriptomic variation among six Arabidopsis thaliana accessions identified several novel genes controlling aluminium tolerance. *Plant, cell & environment*, 40(2), 249-263.
- Lindsey III, B. E., Rivero, L., Calhoun, C. S., Grotewold, E., & Brkljacic, J. (2017). Standardized Method for High-throughput Sterilization of Arabidopsis Seeds. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (128).
- Little, C. A., MacDonald, J. E., & Olsson, O. (2002). Involvement of indole-3-acetic acid in fascicular and interfascicular cambial growth and interfascicular extraxylary fiber differentiation in Arabidopsis thaliana inflorescence stems. *International Journal of Plant Sciences*, 163(4), 519-529.
- Liu, J., Sheng, L., Xu, Y., Li, J., Yang, Z., Huang, H., & Xu, L. (2014). WOX11 and 12 are involved in the first-step cell fate transition during de novo root organogenesis in Arabidopsis. *The Plant Cell*, tpc-114.
- Love, J., Björklund, S., Vahala, J., Hertzberg, M., Kangasjärvi, J., & Sundberg, B. (2009). Ethylene is an endogenous stimulator of cell division in the cambial meristem of Populus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(14), 5984-5989.
- Lucas, W. J., Groover, A., Lichtenberger, R., Furuta, K., Yadav, S. R., Helariutta, Y., ... & Patrick, J. W. (2013). The plant vascular system: evolution, development and functions F. *Journal of integrative plant biology*, 55(4), 294-388.

- Mähönen AP, Higuchi M, Törmäkangas K, Miyawaki K, Pischke MS, Sussman MR, Helariutta Y, Kakimoto T (2006). Cytokinins regulate a bidirectional phosphorelay network in Arabidopsis. *Curr Biol* 16: 1116–1122
- Matsumoto-Kitano M, Kusumoto T, Tarkowski P, Kinoshita-Tsujimura K, Václavíková K, Miyawaki K, Kakimoto T (2008). Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 20027–20031
- McCarthy, R. L., Zhong, R., & Ye, Z. H. (2009). MYB83 is a direct target of SND1 and acts redundantly with MYB46 in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 50(11), 1950-1964.
- Mitchell-Olds, T., & Schmitt, J. (2006). Genetic mechanisms and evolutionary significance of natural variation in Arabidopsis. *Nature*, 441(7096), 947. Horton, M. W., Hancock, A. M., Huang, Y. S., Toomajian, C., Atwell, S., Auton, A., ... & Nordborg, M. (2012). Genome-wide patterns of genetic variation in worldwide Arabidopsis thaliana accessions from the RegMap panel. *Nature genetics*, 44(2), 212.
- Mitra, P. P., & Loqué, D. (2014). Histochemical staining of Arabidopsis thaliana secondary cell wall elements. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (87).
- Mitsuda, N., Iwase, A., Yamamoto, H., Yoshida, M., Seki, M., Shinozaki, K., & Ohme-Takagi, M. (2007). NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19(1), 270-280.
- Mockaitis, K., & Estelle, M. (2008). Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annual review of cell and developmental biology*, 24, 55-80.
- Muñiz, L., Minguet, E. G., Singh, S. K., Pesquet, E., Vera-Sirera, F., Moreau-Courtois, C. L., ... & Tuominen, H. (2008). ACAULIS5 controls Arabidopsis xylem specification through the prevention of premature cell death. *Development*, 135(15), 2573-2582.
- Nagawa, S., Sawa, S., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., & Fukuda, H. (2006). Gene trapping in Arabidopsis reveals genes involved in vascular development. *Plant and cell physiology*, 47(10), 1394-1405.
- Newman, L. J., & Campbell, M. M. (2000). MYB proteins and xylem differentiation. *Cell and molecular biology of wood formation*. Oxford, UK: Bios Scientific Publishers Ltd, 437-444.
- Nieminen, K., Blomster, T., Helariutta, Y., & Mähönen, A. P. (2015). Vascular cambium development. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 13.
- Nieminen, K., Immanen, J., Laxell, M., Kauppinen, L., Tarkowski, P., Dolezal, K., ... & Bhalerao, R. (2008). Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pnas-0805617106.
- Obayashi, T., Aoki, Y., Tadaka, S., Kagaya, Y., & Kinoshita, K. (2017). ATTED-II in 2018: a plant coexpression database based on investigation of the statistical property of the mutual rank index. *Plant and Cell Physiology*, 59(1), e3-e3.
- Ochoaño, I., Jover-Gil, S., Ripoll, J. J., Candela, H., Vera, A., Ponce, M. R., ... & Micol, J. L. (2006). Mutations in the microRNA complementarity site of the INCURVATA4 gene perturb meristem function and adaxialize lateral organs in Arabidopsis. *Plant physiology*, 141(2), 607-619.
- Oh, S., Park, S., & Han, K. H. (2003). Transcriptional regulation of secondary growth in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany*, 54(393), 2709-2722.
- Ohashi-Ito, K., & Fukuda, H. (2003). HD-Zip III homeobox genes that include a novel member, ZeHB-13 (Zinnia)/ATHB-15 (Arabidopsis), are involved in procambium and xylem cell differentiation. *Plant and Cell Physiology*, 44(12), 1350-1358.
- Ohashi-Ito, K., Kubo, M., Demura, T., & Fukuda, H. (2005). Class III homeodomain leucine-zipper proteins regulate xylem cell differentiation. *Plant and Cell Physiology*, 46(10), 1646-1656.
- Prigge MJ, Otsuga D, Alonso JM, Ecker JR, Drews GN, Clark SE (2005) Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in Arabidopsis development. *Plant Cell* 17: 61–76

- Ragni, L., & Hardtke, C. S. (2014). Small but thick enough—the Arabidopsis hypocotyl as a model to study secondary growth. *Physiologia plantarum*, 151(2), 164-171.
- Ragni, L., Nieminen, K., Pacheco-Villalobos, D., Sibout, R., Schwechheimer, C., & Hardtke, C. S. (2011). Mobile gibberellin directly stimulates Arabidopsis hypocotyl xylem expansion. *The Plant Cell*, tpc-111.
- Reinhardt, D. (2003). Vascular patterning: more than just auxin?. *Current Biology*, 13(12), R485-R487.
- Romano, J. M., Dubos, C., Prouse, M. B., Wilkins, O., Hong, H., Poole, M., ... & Mansfield, S. D. (2012). AtMYB61, an R2R3-MYB transcription factor, functions as a pleiotropic regulator via a small gene network. *New Phytologist*, 195(4), 774-786.
- Schrader, J., Baba, K., May, S. T., Palme, K., Bennett, M., Bhalerao, R. P., & Sandberg, G. (2003). Polar auxin transport in the wood-forming tissues of hybrid aspen is under simultaneous control of developmental and environmental signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(17), 10096-10101.
- Sehr, E. M., Agusti, J., Lehner, R., Farmer, E. E., Schwarz, M., & Greb, T. (2010). Analysis of secondary growth in the Arabidopsis shoot reveals a positive role of jasmonate signalling in cambium formation. *The Plant Journal*, 63(5), 811-822.
- Spicer, R., & Groover, A. (2010). Evolution of development of vascular cambia and secondary growth. *New Phytologist*, 186(3), 577-592.
- Sung, S., & Amasino, R. M. (2005). Remembering winter: toward a molecular understanding of vernalization. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 56, 491-508.
- Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N., & Šmuc, T. (2011). REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PloS one*, 6(7), e21800.
- Talbert PB, Adler HT, Parks DW, Comai L (1995) The *revoluta* gene is necessary for apical meristem development and for limiting cell divisions in the leaves and stems of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 121: 2723–2735
- Tian, T., Liu, Y., Yan, H., You, Q., Yi, X., Du, Z., ... & Su, Z. (2017). agriGO v2. 0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic acids research*, 45(W1), W122-W129.
- Ursache, R., Nieminen, K., & Helariutta, Y. (2013). Genetic and hormonal regulation of cambial development. *Physiologia Plantarum*, 147(1), 36-45.
- Xu, P., Chen, H., Ying, L., & Cai, W. (2016). AtDOF5. 4/OBP4, a DOF transcription factor gene that negatively regulates cell cycle progression and cell expansion in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific reports*, 6, 27705.
- Yamaguchi, M., Goué, N., Igarashi, H., Ohtani, M., Nakano, Y., Mortimer, J. C., ... & Dupree, P. (2010). VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 (VND6) and VND7 Effectively Induce Transdifferentiation into Xylem Vessel Elements under Control of an Induction System. *Plant Physiology*, pp-110.
- Ye, Z. H., Freshour, G., Hahn, M. G., Burk, D. H., & Zhong, R. (2002). Vascular development in Arabidopsis. *International review of cytology*, 225-257.
- Zhao, C., Craig, J. C., Petzold, H. E., Dickerman, A. W., & Beers, E. P. (2005). The xylem and phloem transcriptomes from secondary tissues of the Arabidopsis root-hypocotyl. *Plant Physiology*, 138(2), 803-818.
- Zhong, R., & Ye, Z. H. (2015). The Arabidopsis NAC transcription factor NST2 functions together with SND1 and NST1 to regulate secondary wall biosynthesis in fibers of inflorescence stems. *Plant signaling & behavior*, 10(2), e989746.
- Zhong, R., Demura, T., & Ye, Z. H. (2006). SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of Arabidopsis. *The Plant Cell*, 18(11), 3158-3170.

- Zhong, R., Richardson, E. A., & Ye, Z. H. (2007). The MYB46 transcription factor is a direct target of SND1 and regulates secondary wall biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19(9), 2776-2792.
- Zhou J, Zhong R, Ye Z-H (2014) Arabidopsis NAC Domain Proteins, VND1 to VND5, Are Transcriptional Regulators of Secondary Wall Biosynthesis in Vessels. *PLoS ONE* 9(8): e105726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105726>
- Zhou, G. K., Kubo, M., Zhong, R., Demura, T., & Ye, Z. H. (2007). Overexpression of miR165 affects apical meristem formation, organ polarity establishment and vascular development in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 48(3), 391-404.

Anexo 1. Número de lecturas obtenidas en la secuenciación de RNA

Tabla suplementaria 1. Número de lecturas alineadas por muestra resultantes del RNAseq.

	Número lecturas alineadas		
	Réplica biológica I	Réplica biológica II	Réplica biológica III
7291	7.559.494	7.204.160	7.681.028
7378	8.837.874	6.502.329	7.204.169
7307	9.039.930	8.781.594	9.876.096
7176	6.747.697	7.517.829	5.249.909
7244	8.003.667	7.439.920	6.602.469
6064	8.318.396	7.028.125	7.625.193
7330	9.461.591	7.086.968	6.897.527
7300	7.542.180	6.923.882	6.344.944
7353	8.100.157	6.864.730	6.164.707
Col-0	9.336.072	8.774.213	7.679.849

Anexo 2. Genes relevantes crecimiento secundario: Estrategia A – Selección genes por patrones de expresión en población

Tabla suplemental 2. Genes de relevancia en el crecimiento secundario en *Arabidopsis thaliana* seleccionados mediante la Estrategia A – Selección genes por patrones de expresión en población

Grupo A > Grupo B	7291	7378	7307	7176	7244	6064	7330	7300	7353	Minigráfico
AT1G32770 NST3	2.23	2.42	2.64	1.93	0.88	0.04	0.41	0.26	0.02	
AT2G46770 NST1	2.19	2.08	1.93	2.21	1.15	0.05	0.67	0.38	0.02	
AT5G12870 MYB46	2.01	2.11	2.64	1.71	1.03	0.59	0.90	0.58	0.29	
AT4G28500 SND2	3.11	1.93	2.07	1.70	0.83	0.47	0.77	0.35	0.18	
Gradación (+)	7291	7378	7307	7176	7244	6064	7330	7300	7353	Minigráfico
AT3G61910 NST2	4.83	2.36	1.77	1.52	0.97	0.38	1.16	0.66	0.24	

Tabla suplemental 3. Información relativa a los genes de relevancia en el crecimiento secundario en *Arabidopsis thaliana* seleccionados mediante la Estrategia A – Selección genes por patrones de expresión en población. Las publicaciones mostradas son relativas a los artículos con mayor relevancia en crecimiento secundario.

GeneID	Nombre	Publicaciones
AT1G32770	ANAC012, ATSND1, NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 12, NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING 3, NAC012, NST3 , SECONDARY WALL-ASSOCIATED NAC DOMAIN 1, SND1	<i>SND1, a NAC Domain Transcription Factor, Is a Key Regulator of Secondary Wall Synthesis in Fibers of Arabidopsis.</i> (Zhong et al., 2006)
AT2G46770	ANAC043, ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 43, NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR1, NST1	<i>NAC Transcription Factors, NST1 and NST3, Are Key Regulators of the Formation of Secondary Walls in Woody Tissues of Arabidopsis.</i> (Mitsuda et al., 2007)

AT5G12870	ATMYB46, MYB DOMAIN PROTEIN 46, MYB46	<i>Transcription factor MYB46 is an obligate component of the transcriptional regulatory complex for functional expression of secondary wall-associated cellulose synthases in Arabidopsis thaliana.</i> (Kim et al., 2013)
AT3G61910	ANAC066, NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR2, NAC DOMAIN PROTEIN 66, NAC066, NST2	<i>The Arabidopsis NAC transcription factor NST2 functions together with SND1 and NST1 to regulate secondary wall biosynthesis in fibers of inflorescence stems.</i> (Zhong et al., 2015)
AT4G28500	ANAC073, NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 73, NAC073, SECONDARY WALL-ASSOCIATED NAC DOMAIN PROTEIN 2, SND2	<i>SND2, a NAC transcription factor gene, regulates genes involved in secondary cell wall development in Arabidopsis fibres and increases fibre cell area in Eucalyptus.</i> (Hussey et al., 2011)

Anexo 3. Genes relevantes crecimiento secundario: Estrategia B – Selección genes upstream

Tabla suplemental 4. Información relativa a los genes de relevancia en el crecimiento secundario en Arabidopsis thaliana seleccionados mediante la Estrategia B – Selección genes upstream. Las publicaciones mostradas son relativas a los artículos con mayor relevancia en crecimiento secundario.

GeneID	Nombre	Publicación
AT2G46770	ANAC043, ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 43, NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR1, NST1	<i>NAC Transcription Factors, NST1 and NST3, Are Key Regulators of the Formation of Secondary Walls in Woody Tissues of Arabidopsis.</i> (Mitsuda et al., 2007)
AT3G61910	ANAC066, NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR2, NAC DOMAIN PROTEIN 66, NAC066, NST2	<i>The Arabidopsis NAC transcription factor NST2 functions together with SND1 and NST1 to regulate secondary wall biosynthesis in fibers of inflorescence stems.</i> (Zhong et al., 2015)
AT1G32770	ANAC012, ATSND1, NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 12, NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING 3, NAC012, NST3, SECONDARY WALL-ASSOCIATED NAC DOMAIN 1, SND1	<i>SND1, a NAC Domain Transcription Factor, Is a Key Regulator of Secondary Wall Synthesis in Fibers of Arabidopsis.</i> (Zhong et al., 2006)
AT4G28500	ANAC073, NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 73, NAC073, SECONDARY WALL-ASSOCIATED NAC DOMAIN PROTEIN 2, SND2	<i>SND2, a NAC transcription factor gene, regulates genes involved in secondary cell wall development in Arabidopsis fibres and increases fibre cell area in Eucalyptus.</i> (Hussey et al., 2011)
AT2G18060	ANAC037, ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 37, VASCULAR RELATED NAC-DOMAIN PROTEIN 1, VND1	<i>Arabidopsis NAC Domain Proteins, VND1 to VND5, Are Transcriptional Regulators of Secondary Wall Biosynthesis in Vessels.</i> (Zhou et al., 2014)
AT4G36160	ANAC076, NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 76, NAC076, VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN 2, VND2	<i>Arabidopsis NAC Domain Proteins, VND1 to VND5, Are Transcriptional Regulators of Secondary Wall Biosynthesis in Vessels.</i> (Zhou et al., 2014)

AT5G66300	ANAC105, ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 105, NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 105, NAC105, VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN 3, VND3	<i>Arabidopsis NAC Domain Proteins, VND1 to VND5, Are Transcriptional Regulators of Secondary Wall Biosynthesis in Vessels.</i> (Zhou <i>et al.</i> , 2014)
AT1G12260	ANAC007, EMB2749, EMBRYO DEFECTIVE 2749, NAC 007, NAC007, VASCULAR RELATED NAC-DOMAIN PROTEIN 4, VND4	<i>Arabidopsis NAC Domain Proteins, VND1 to VND5, Are Transcriptional Regulators of Secondary Wall Biosynthesis in Vessels.</i> (Zhou <i>et al.</i> , 2014)
AT5G62380	ANAC101, NAC-DOMAIN PROTEIN 101, NAC101, VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN 6, VND6	<i>VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 (VND6) and VND7 Effectively Induce Transdifferentiation into Xylem Vessel Elements under Control of an Induction System.</i> (Yamaguchi <i>et al.</i> , 2010)
AT1G71930	ANAC030, ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 30, VASCULAR RELATED NAC-DOMAIN PROTEIN 7, VND7	<i>VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 (VND6) and VND7 Effectively Induce Transdifferentiation into Xylem Vessel Elements under Control of an Induction System.</i> (Yamaguchi <i>et al.</i> , 2010)
AT5G13180	ANAC083, NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 83, NAC083, VND-INTERACTING 2, VNI2	<i>VND6 and VND7 Effectively Induce Transdifferentiation into Xylem Vessel Elements under Control of an Induction System.</i> (Yamaguchi <i>et al.</i> , 2010)
AT1G33280	ANAC015, BEARSKIN 1, BRN1 , NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 15, NAC015	<i>SOMBRERO, BEARSKIN1, and BEARSKIN2 Regulate Root Cap Maturation in Arabidopsis.</i> (Bennett <i>et al.</i> , 2010)
AT4G10350	ANAC070, BEARSKIN 2, BRN2 , NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 70, NAC070	<i>SOMBRERO, BEARSKIN1, and BEARSKIN2 Regulate Root Cap Maturation in Arabidopsis.</i> (Bennett <i>et al.</i> , 2010)
AT5G12870	ATMYB46, MYB DOMAIN PROTEIN 46, MYB46	<i>Transcription factor MYB46 is an obligate component of the transcriptional regulatory complex for functional expression of secondary wall-associated cellulose synthases in Arabidopsis thaliana.</i> (Kim <i>et al.</i> , 2013)
AT1G09540	ARABIDOPSIS THALIANA MYB DOMAIN PROTEIN 61, ATMYB61 , MYB DOMAIN PROTEIN 61, MYB61	<i>AtMYB61, an R2R3-MYB transcription factor, functions as a pleiotropic regulator via a small gene network.</i> (Romano <i>et al.</i> , 2012)
AT1G52150	ATHB-15, ATHB15 , CNA, CORONA, ICU4, INCURVATA 4	<i>microRNA-directed cleavage of ATHB15 mRNA regulates vascular development in Arabidopsis inflorescence stems.</i> (Kim <i>et al.</i> , 2005)