



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Programa de Doctorado: Biociencias y Ciencias Agroalimentarias

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

Application of functional genomics techniques to the characterization of water stress and inoculation of mycorrhizae response of *Pinus* spp. species from the forest polygon of Chianga-Huambo, Angola.

Directores: D. Rafael María Navarro Cerrillo

D. David Ariza Mateos

Autora: Orlis Bárbara Alfonso Loret de Mola

Diciembre, 2019

TITULO: *APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE GENÓMICA FUNCIONAL A LA CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA AL ESTRES HÍDRICO Y A INOCULACION DE MICORRIZAS DE ESPECIES DE PINUS SPP. DEL POLIGONO FORESTAL DE LA CHIANGA-HUAMBO, ANGOLA.*

AUTOR: *Orlis Barbara Alfonso Loret de Mola*

© Edita: UCOPress. 2020
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es>



TÍTULO DE LA TESIS: Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

DOCTORANDA: Orlis Bárbara Alfonso Loret de Mola

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La tesis presentada por la doctoranda Orlis Bárbara Alfonso Loret de Mola ha tenido como objeto aplicar técnicas de genómica funcional (proteómica) como herramienta en la caracterización de las especies de pinos más empleadas en los programas de repoblación forestal de la estación forestal experimental de Chianga (Huambo, Angola) y su respuesta diferencial a situaciones de estrés hídrico y a la micorrización en condiciones controladas.

Siguiendo una secuencia lógica de trabajo se caracterizaron dos especies de pinos (*Pinus greggii* y *Pinus patula*) y se identificaron las proteínas expresadas diferencialmente en semillas de estas especies con un enfoque basado en el análisis por espectrometría de masa nLC LTQ Orbitrap. Una vez caracterizadas las especies de trabajo se comparó su respuesta a nivel morfofisiológico y molecular a las dos condiciones naturales de la Meseta Central de Angola (época de seca y época de lluvias) en condiciones controladas. Por último, se evaluó el efecto de la micorrización con el hongo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* en plántulas de *P. patula* sometidas a estrés hídrico a través de un análisis morfofisiológico y proteómico en condiciones controladas. Todo ello, con el objetivo de aplicar el conocimiento generado en programas de producción de planta forestal de repoblación en Angola.

Tanto el diseño, como la metodología desarrollada, el trabajo de investigación realizado y los resultados y conclusiones obtenidos son satisfactorios.

La doctoranda ha desarrollado un buen trabajo, incorporando a su formación nuevas disciplinas y enfoques de trabajo y demostrando su capacidad de trabajo y evolución durante el periodo de doctorado, características que todo egresado con el grado de doctor de esta universidad debe cumplir.

Como resultado del trabajo realizado se han publicado los siguientes trabajos:

Alfonso-Loret de Mola, O. B., Ariza-Mateos, D. Navarro-Cerrillo, R.M. (2014). Congreso Nacional “Agosto Científico 2014”. Universidad José Eduardo dos Santos de Angola. 12-15 Agosto. Huambo, Angola. Comunicación Oral: “Metodologia aplicada sobre as técnicas de genômica funcional à caracterização da resposta ao estres hídrico e a inoculação de micorrizas em espécies de Pinus do polígono florestal da Chianga, Huambo”.

Sánchez Cárdenas, S., Alexandre Manuel, G., Alfonso-Loret de Mola, O. B., Boicet-Fabré, T. (2014). Proposta de metodologia para a avaliação da sustentabilidade de Agroecossistemas em duas províncias do Planalto Central de Angola. Libro de actas del Congreso Nacional “Agosto Científico”. Universidade José Eduardo dos Santos de Angola 1ra Edición, Luanda-Angola. ISBN 7965/2017

Alfonso-Loret de Mola, O. B., Ariza-Mateos, D., Alexandre Manuel, G., Navarro-Cerrillo. (2016). Crecimiento de plantas de Pinus patula Schl et Cham y Pinus greggii Engelm na época seca e chuvosa no Planalto Central de Angola. Libro de actas del Congreso Nacional “Agosto Científico”. Universidad José Eduardo dos Santos de Angola 1ra Edición, Luanda-Angola. ISBN 7965/2017

IX Simposio Internacional sobre Manejo Sostenible de los Recursos Forestales (SIMFOR 2016). 15 al 17 de junio 2016. Universidad de Pinar del Río, Cuba. Póster: “Respuesta a estrés hídrico en dos especies de Pinus spp (Pinus patula y Pinus greggii)”.

Alexandre Manuel, G., Ngandu, J., Alfonso-Loret de Mola, O. B. (2018). Management of the fertility of acid soils of the Central Plateau of Angola. Libro de actas do SSASCAL Science Symposium Promoting Science for sustainable development. Lusaka-Zambia from 16 to 20 April. Póster.

Alfonso-Loret de Mola, O.B., Ariza-Mateos, D. (2019). Jornadas Cientificas Alusivas ao 107 Aniversário da Cidade de Huambo. “Determinação da expressão de proteínas de sementes de espécies de Pinus (Pinus greggii Engelm. E Pinus patula Schiede and Deppe in Schlecht) a través da genômica funcional (Proteómica).” Universidad José Eduardo dos Santos de Angola. Setembro 2019. Comunicación Oral.

Alfonso-Loret de Mola, O.B., Ariza-Mateos, D., Palacios-Rodríguez, G., Ginhas Manues, A., Ruíz-Gómez, F. (2019). Seed protein profile of the subtropical species Pinus greggii Engelm. and Pinus patula Schiede and Dppe in Schlecht. through functional genomics análisis. Aceptado para su publicación en la revista BOSQUE correspondiente al índice de impacto JCR, el 28 de noviembre de 2019 y presentado como indicio de calidad de esta tesis.

Se considera que el trabajo realizado cumple con los requisitos necesarios para su presentación y lectura.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 4 de diciembre de 2019

Firma del/de los director/es

Fdo.: Rafael María Navarro Cerrillo

Fdo.: David Ariza Mateos

AGRADECIMIENTOS

Estoy a punto de cumplir una gran meta, fueron muchas las personas que se cruzaron en esta longa caminata y que sin ellos no hubiera sido posible concluir. Pido sinceras disculpa por si olvido a alguien, pues no es mi intención. Mil gracias por todo y a todos de corazón.

Comienzo agradeciendo a mi familia: A mis padres por todo el cariño que me han dado y toda la fuerza moral para seguir adelante, por siempre inculcarme que en la vida todo lo podía alcanzar con estudio y dedicación. A mis hermanos que siempre me animaron cuando me venía abajo. A mi esposo, compañero y amigo por sus sabios y oportunos consejos y por su contribución en el desarrollo de este trabajo. A mis niños Carlos y Densel por comprender mi ausencia durante este tiempo de formación y por ser mi fuente de inspiración.

A mis directores: Rafa, gracias por todo el apoyo científico-técnico brindado, por permitirme entrar en tu grupo de investigación, por cada correo que me enviabas y al final siempre decían ÁNIMO!!! No imaginas lo que significaban esas cinco letras para mí. A ti David, por tantas horas dedicadas, a veces junto a mí en el laboratorio al inicio de los experimentos, por tu prontitud en responderme cada duda y orientarme cuando lo necesitaba, no importando en qué lugar del mundo estuvieras, por tus corridas al Rectorado cuando yo estaba fuera de España. A los dos mil gracias por todo.

Agradezco infinitamente al colectivo de Profesores de la Universidad José Eduardo Dos Santos muy en especial al Magnifico Rector Cristovão Simões, por su disposición en viabilizar las cosas siempre que fuera necesario y por su preocupación con la superación de los docentes. Que decir de la Vice Rectora Científica Dra Virginia Quartin, sinceramente, no tengo palabras para agradecerle, pocas personas tienen un corazón tan grande e tan generoso. Sin vuestra ayuda no hubiera sido posible.

Muchísimas gracias al Grupo de Evaluación y Restauración de Sistemas Agrícolas y Forestales por estar siempre dispuestos a ayudarme en todo lo que precisara en especial a Fran por su gran contribución en el artículo publicado, Guillermo, Rafa, a Roberto que tantas horas pasamos juntos en el laboratorio. A Rubén, Kiko, Emilio, Ana, Andrés, Carlos, Joaquín, Jesús, Lales, a Lourdes tan agradable y simpática, siempre dispuesta ayudar con cualquier gestión, a mi querida Chelo por las veces que salimos de noche del

laboratorio en su coche y volvíamos bien tempranito en la mañana. A todos muchas gracias.

Gracias al grupo de Investigación de Bioquímica y Proteómica Vegetal y Agrícola, a Jesús por abrirme las puertas de su Laboratorio y a Rosa por darme el primer baño de proteómica.

Al personal del servicio de Proteómica del SCAI de la Universidad de Córdoba, gracias por responder siempre a cualquier duda, en especial a Fran con el que aprendí mucho sobre proteómica, a Carlos por su ayuda en la identificación de proteínas.

Al profesor Armando González-Cabán, Investigador de la estación Forestal del Suroeste de California, USA, por las correcciones del inglés. Gracias también a los profesores Hilda Welcomo, Manuel Riera y Yobanis Osorio, por ayudarme en algunos análisis estadísticos y con las imágenes. Vuestra ayuda fue muy valiosa.

Por supuesto a mi familia cordobesa González-Osuna por tratarme como un miembro más y hacerme sentir que no estaba sola, a mi Pepa que es como si fuera mi hermana. A Aurora y Rafa y el resto de la familia muchas gracias por el cariño. Se les quiere a todos.

A mis amigos y amigas Emilio, Urda, Saray, Maryanis, Baby, gracias por apoyarme en los momentos buenos y malos, a mi amiga Mariela que ya no está con nosotros pero que muchas veces me decía el camino se hace andando, te recordamos con mucho cariño. En fin, gracias a todos desde el fondo de mi corazón.

*A mis padres por todo su apoyo en el logro de mis objetivos
A mis hermanos porque a pesar de la distancia han estado siempre conmigo
A mi esposo que me ayudado en los momento más difíciles y en especial a mis hijos
Carlos y Densel.*

RESUMEN

En Angola fueron varias las especies de *Pinus* introducidas durante la época colonial, principalmente en la Meseta Central, que de ser explotadas de forma sostenible podrían contribuir al desarrollo económico, social y ambiental del país. El conocimiento sobre la variabilidad genética de estas especies, relacionado con su capacidad para responder a factores abióticos (déficit hídrico), así como a estrategias para mejorar su adaptación a las condiciones climáticas fueron los principales objetivos de esta Tesis Doctoral. Se utilizaron como especies modelo *Pinus patula* y *Pinus greggii* por su adaptabilidad a las condiciones edafoclimáticas locales.

El trabajo fue diseñado siguiendo una secuencia lógica para i) caracterizar las especies de trabajo, ii) identificar la respuesta a nivel fisiológico y molecular de las dos especies estudiadas y su influencia en la supervivencia y crecimiento en función de las condiciones de vivero, y iii) identificar la respuesta de una especie a micorrización en vivero. Todo ello, a través de análisis morfofisiológico y molecular, basado en el análisis por espectrometría de masa nLC LTQ Orbitrap.

Los resultados muestran que existe poca variabilidad genética entre ambas especies, debido a la similitud de sus perfiles proteicos que no mostraron enriquecimiento en ninguna de las categorías (procesos biológicos, componentes celulares y función molecular), predominando las proteínas asociadas en la preparación de la semilla durante el proceso de germinación. Los resultados de la comparativa entre las dos especies en situaciones de estrés a nivel morfofisiológico mostraron que, en general, las plántulas de *P. greggii* fueron más tolerantes a la sequía que las plántulas de *P. patula*. A nivel molecular la expresión diferencial de proteínas fue mayoritaria en la simulación de la época seca comparada con la época lluviosa y en la especie *P. greggii* con respecto a la especie *P. patula*. En ambas especies, el estrés por sequía está relacionado con un aumento en el nivel de la expresión de proteínas en los procesos relacionados con el metabolismo, biosíntesis, organización celular, estímulos abióticos y expresión génica, mientras que por disminución de expresión en los procesos relacionados con la fotosíntesis y el crecimiento. La asociación simbiótica entre *P. patula* y el hongo ectomicorrícico *Pisolithus tinctorius* para mejorar su resistencia a sequía aumentó la supervivencia de la especie, incluso en condiciones de déficit hídrico, así como su tasa fotosintética. Los procesos biológicos sobreexpresados o subexpresados estaban presumiblemente relacionados con procesos de resistencia al déficit hídrico.

ABSTRACT

In Angola there were several species of *Pinus* introduced during the colonial era, mainly in the Central Plateau, which if exploited in a sustainable manner could contribute to the economic, social and environmental development of the country. The knowledge about the genetic variability of these species, related to their capacity to respond to abiotic factors (water stress), as well as to strategies to improve their adaptation to climatic conditions were the main objectives of this Thesis. *Pinus patula* and *Pinus greggii* were used as model species due to their adaptability to local edafoclimatic conditions.

The work was designed following a logical sequence to i) characterize the species, ii) identify the physiological and molecular response of two species and their influence on survival and growth as a function of nursery conditions, and iii) identify the response of a species to mycorrhization in nursery. All this, through morphophysiological and molecular analysis, based on the analysis by mass spectrometry nLC LTQ Orbitrap.

The results show that there isn't a lot of genetic variability between both species, due to the similarity of their protein profiles that did not show enrichment in any of the categories (biological processes, cellular components and molecular function), predominating the proteins associated to the preparation of the seed during the germination process. The results of the comparison between the two species in situations of stress at morphophysiological level showed that, in general, *P. greggii* seedlings were more tolerant to drought than *P. patula* seedlings. At molecular level, the differential expression of proteins was majority in the simulation of the dry season compared with the rainy season and in the species *P. greggii* with respect to the species *P. patula*. In both species, drought stress is related to an increase in the level of protein expression in processes related to metabolism, biosynthesis, cell organization, abiotic stimuli and gene expression, while by decrease of expression in processes related to photosynthesis and growth. The symbiotic association between *P. patula* and the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* to improve its resistance to drought increased the survival of the species, even under water deficit conditions, as well as its photosynthetic rate. Over- or under-expressed biological processes were presumably related to water-deficit resistance processes.

ÍNDICE

1.1. Situación forestal mundial	3
1.2. Situación forestal en África	4
1.2.1. Angola como país florestal. Historia época colonial.	5
1.2.2. Programas de plantaciones forestales de producción en el mundo.....	8
1.2.3. Programas de plantaciones forestales de producción en Angola.	9
1.3. Variabilidad genética del género Pinus.	11
1.4. La Genómica.....	12
1.4.1. Proteómica	15
1.5. Estrés hídrico	18
1.6. Micorrizas.....	23
1.7 Hipótesis y justificación de la Tesis	27
Objetivo General.....	28
2.1. Introducción.....	33
2.2. Materiales y métodos.....	35
2.2.1. Material vegetal	35
2.2.2. Diseño experimental	35
2.2.3. Extracción de proteínas.....	36
2.2.4. Identificación de proteínas nLC-MS/MS.....	37
2.2.5. Clasificación funcional de las proteínas.	39
2.2.6. Análisis estadístico	39
2.3. Resultados.....	40
2.3.1. Clasificación de los perfiles funcionales según los términos GO para los procesos biológico, componentes celulares y funciones moleculares	41
2.3.2. Clasificación funcional de las proteínas explorando la base de datos KEGGs	46
2.4 Discusión	53
2.5 Conclusiones.....	59
3.1. Introducción.....	63
3.2. Materiales y métodos.....	66
3.2.1 Estudio fisiológico	66
3.2.2. Estudio molecular	71
3.3. Resultados.....	77
3.3.1 Resultado estudio fisiológico.....	77

3.3.2 Resultados del estudio molecular	87
3.3.2.1. Resultados de la identificación de proteínas.....	87
3.3.2.1.1. Comparación de <i>P. patula</i> vs <i>P. greggii</i> en los dos tratamientos de simulación de condiciones ambientales (época lluviosa y seca).....	87
3.3.2.1.2. Comparación entre tratamientos (simulación época seca y época de lluvia) de forma individual para cada especie.	89
3.3.2.2. Resultados del análisis de los términos de Ontología Génica.	90
3.3.2.2.1. Comparación de <i>P. patula</i> vs <i>P. greggii</i> en los tratamientos de simulación de la época lluviosa y época seca	91
3.3.2.2.2. Comparación de cada especie en el tratamiento de simulación de la época lluviosa y época seca.	94
3.4. Discusión	97
3.4.1 Estudio fisiológico	97
3.4.2. Estudio molecular	105
3.5. Conclusiones.....	112
4.1 Introducción.....	114
4.2 Materiales y métodos.....	115
4.2.1. Estudio a nivel fisiológico	115
4.2.1.2 Diseño experimental.....	116
4.2.1.3 Medidas morfológicas y fisiológicas.....	117
4.2.1.4 Análisis estadístico	118
4.2.2. Estudio molecular	119
4.3. Resultados.....	120
4.3.2. Estudio molecular	125
4.4. Discusión	130
4.4.1. Estudio morfofisiológico	130
4.5. Conclusiones.....	145
5. DISCUSIÓN GENERAL	147
6. CONCLUSIONES GENERALES.	163
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	163

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

1.1. Situación forestal mundial

Los bosques representan más del 10% del PIB en muchos de los países más pobres. Se estima que el sector forestal procura empleo oficial a 10 millones de personas y empleo informal a otros 30-50 millones de personas en los países en desarrollo (FAO, 2016). A pesar de su importancia en la economía mundial, las pérdidas y la degradación de los bosques continúan produciéndose en numerosos países en desarrollo. En la última evaluación de la FAO (2015), correspondiente al periodo 2010-2015 se concluye que la deforestación continúa avanzando. Las masas forestales cubrían en 1990 el 31,6% de la superficie terrestre, representando 4.128 millones de ha, cifra que se ha reducido al 30,6% en el año 2015, correspondiente a 3.999 millones de ha, lo que equivale a una pérdida de 129 millones de ha en apenas 25 años. Este descenso de la superficie forestal a nivel mundial fue mayor en África y América del Sur (FAO, 2015) (Figura1).

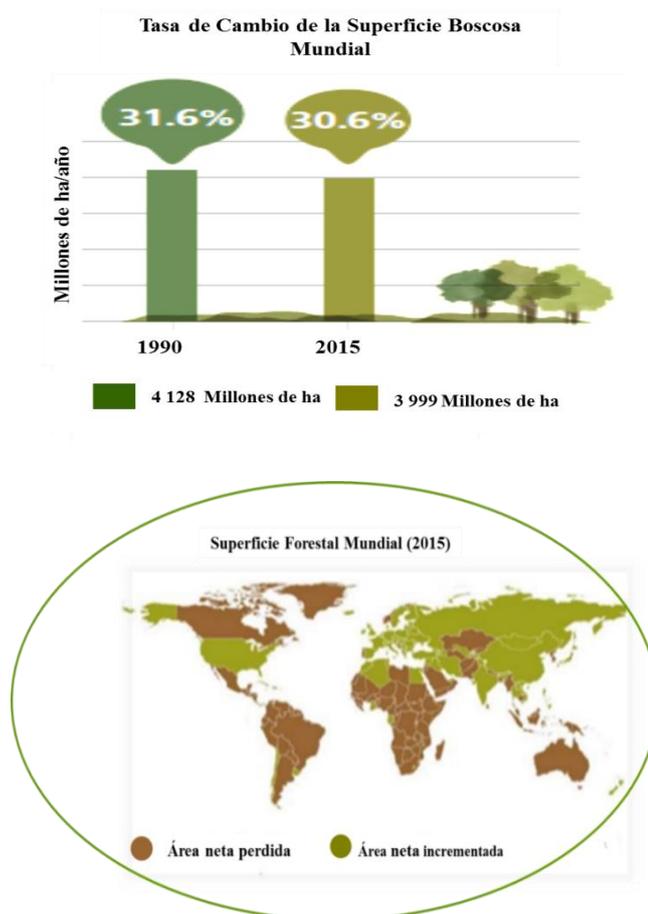


Figura 1. Situación de los bosques en el mundo. Parte superior tasa de cambio de la superficie boscosa mundial entre 1990-2015. Parte inferior distribución en el mundo de las áreas de mayor pérdida e incremento forestal en la actualidad. (Adaptado de la FAO, 2015).

Se estima que desde el surgimiento de la agricultura hará unos 12 000 años, el número de árboles en el mundo se ha reducido a la mitad. (Crowther, *et al.*, 2015; FAO, 2016). A pesar de estos datos alarmantes, se ha evidenciado que en Asia Oriental, la superficie forestal aumenta 3 millones de ha anuales gracias a las plantaciones forestales, correspondiendo al 7 % de la superficie forestal mundial (Figura 2), (FAO, 2015). Y se espera que continúe aumentando en las próximas décadas (Salmón-Rivera, *et al.*, 2016).

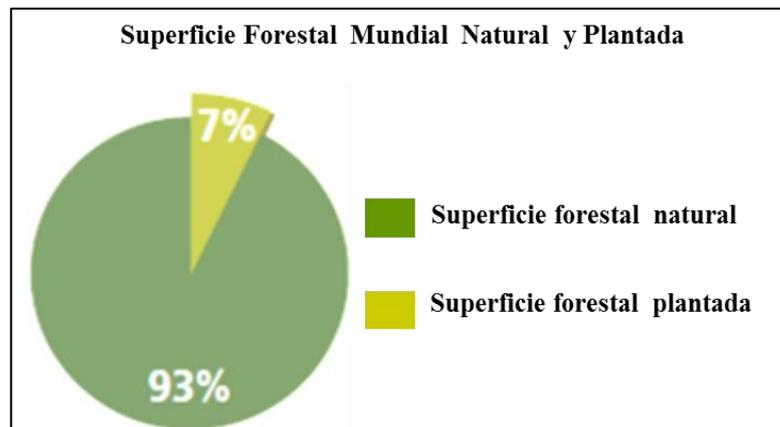


Figura 2. Situación actual de las áreas forestales en el mundo. El mapa muestra que en el mundo la mayoría de los bosques son bosques naturales (Fuente: FAO, 2015).

1.2. Situación forestal en África

En gran parte del continente africano la deforestación aumentó durante la época colonial, cuando se explotaban los bosques para enviar sus productos a Europa. En el siglo XIX se explotaban los bosques con el objeto de obtener combustible para barcos de vapor y trenes, lo cual dejó grandes extensiones del continente aptas para la explotación de los recursos minerales y el desarrollo agrícola. Actualmente en África los bosques cubren el 23% de la superficie, y entre 1990 y 2010 se convirtieron 75 millones de hectáreas de tierras forestales (el 10 % de la superficie forestal total) a otros usos como la agricultura y la ganadería (FAO, 2016).

En África la deforestación está motivada por la demanda de tierras para la producción agrícola y para el pastoreo. Otro factor que ejerce presión sobre los recursos forestales es el uso de la madera como fuente principal de combustible; aproximadamente el 80 % de toda la madera utilizada en la mayor parte del continente africano, incluyendo Angola, se emplea para tal fin, efecto que se agrava por la escasez aguda de leña que sufren algunas zonas del continente (FAO, 2012).

El África subsahariana consta fundamentalmente de sociedades agrarias que dependen principalmente de actividades agrícolas y ganaderas basadas en pocos insumos. En Asia, a diferencia de África, la intensificación agrícola en el marco de la revolución verde contribuyó a reducir la expansión horizontal de la agricultura sin dejar de garantizar el abastecimiento de alimentos suficientes a una población en aumento. Sin embargo, en el África subsahariana la deforestación y la población han aumentado gradualmente en paralelo, siendo mayor la desaparición de bosques en las zonas donde se necesita madera como combustible o donde se necesita superficie forestal para actividades agrícolas. Otros factores, como la producción de cultivos industriales destinados a mercados externos ejemplos (algodón, cacao, café y tabaco), también ha contribuido a la deforestación; la adquisición de terrenos a gran escala por parte de inversores extranjeros ha acelerado recientemente este proceso en algunos países (Cotula, *et al.*, 2009).

1.2.1. Angola como país florestal. Historia época colonial.

Angola es el segundo país más extenso del África subsahariana, con un patrimonio forestal casi único en la región, tanto en términos cuantitativos como cualitativos que de ser explotados de forma sustentable podrían contribuir con el desarrollo económico, social y ambiental del país, sin embargo, la contribución del sector forestal es mayor en la economía de subsistencia que en la economía formal (PIB) (MINUA, 2006), Actualmente cuenta con cerca de 57.8 millones de hectáreas de bosques lo que equivale aproximadamente a 46,4% de su superficie nacional (FAO, 2015), repartida entre formaciones forestales naturales muy diversas y diferenciadas. El país posee 18 reservas forestales, con un área total de 2.7 millones ha (PDMPSA, 2012).

Estas reservas fueron creadas antes de la independencia nacional, fundamentalmente como reservas estratégicas para futuras extracciones de materias

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

primas y plantaciones forestales de especies exóticas, tales como *Eucaliptus*, *Pinus* y *Cupressus*, en una superficie aproximada de 148,000 hectárea (PDMPSA, 2012).

La demanda por leña y carbón, la agricultura itinerante y las quemadas anárquicas, por parte de las poblaciones del medio rural constituyen la principal causa de la deforestación en el país. En Angola la tasa de desforestación anual está estimada en 0,4% equivalente a una superficie aproximada de 150 mil hectáreas devastadas todos los años (MINUA, 2006).

Atendiendo a la composición biológica, factores edáfoclimáticos y fisionómicos, en Angola se distinguen seis biomas: El *Zambezíaco*, *Foresta Guineo-congoles*, *Foresta Afromontano*, *Karoo-Namibe*, *Kalahari* e *Savana Mosaico da foresta Guineo- congoles* (NBSAP, 2006), (Figura 2).

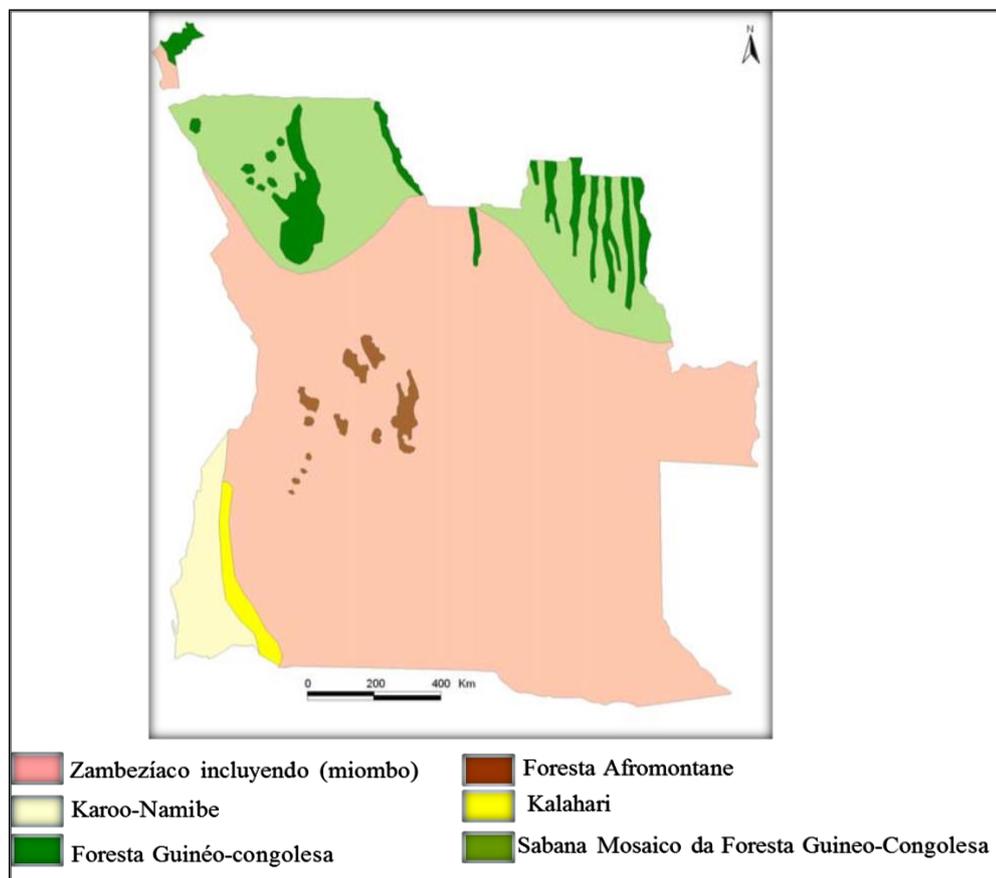


Figura 3. Mapa de los biomas de Angola. El mapa se representan los seis biomas (o divisiones fito-ecológicas) definidos a través de la composición biológica y factores edáficos, climáticos y fisionómicos (Fuente: NBSAP, 2006).

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

El *bioma Zambeziaco*, ocupando más del 80% del territorio nacional, representado fundamentalmente por los miombos de *Brachystegia*. Este bioma desempeña una función social muy importante para las comunidades rurales ya que constituye una fuente de abastecimiento de energía doméstica, material de construcción, alimentos, medicina tradicional, pasto, apicultura y otras manifestaciones culturales.

El *bioma de Savana Mosaico da floresta Guineo-Congolesa* ocupa un área de aproximadamente 51.911 km². Este bioma está formado por sabanas con arbustos, en que predomina la *Hiparrhenia*, *Andropogon*, *Trachiypogon* y *Cordatia*, y de árboles de la especies de *Strichnos*, *Erythrina*, *Cussonia*, *Piliostigma* y *Combretum*, se encuentra rodeada por ríos, valles y bosques aislados que integran el *bioma Guineo-Congolês*.

El *bioma Guineo-Congolês* está constituido por los bosques verdes de las provincias de Cabinda, Zaire, Uíje, Kwanza Norte y Kwanza Sul, representado fundamentalmente por la floresta de Maiombe ocupando un área de aproximadamente 2.000 km². A pesar de su importancia en términos de biodiversidad, en el contexto local, nacional, regional e global, esta floresta es poco protegido. Después de varias décadas de inestabilidad, y como resultado de altas densidades de población, la floresta de Maiombe sufre altas tasas de degradación; principalmente a través del constante corte de árboles y de la caza furtiva, tanto para fines de subsistencia como para fines comerciales.

El *bioma Floresta Afromontane* es de enorme interés biogeográfico ya que representan los únicos bosques húmedos templados que restan, ya que estos bosques antes se distribuían de forma más amplia en el África sub-Sahariana. Actualmente estas formaciones están representadas en Angola de forma aislada. Una de las áreas Afromontanas más importantes ocurre en el Monte Môco en la Provincia de Huambo, y requiere medidas especiales de conservación debido a las perturbaciones antropogénicas, como el corte, la tala y la quema.

El *bioma Karoo-Namibe* que se extiende en las provincias de Namibe y Cunene, constituye un centro regional de endemismo por la presencia *Welwitschia mirabilis* planta endémica de esta región.

El *bioma de Kalahari*, (de transición) ocupa una región entre los arbustos y matorrales de la cintura costera de la zona Karoo-Namibe y los bosques zambeziacos de

Brachystegia caracterizado por una serie continua de tipos de vegetación húmeda que actúan como una barrera entre los dos biomas más secos Karoo-Namibe y los bosques zambeziacos.

En cuanto a las eco regiones, el territorio Angoleño está dividido fundamentalmente en cinco tipos (NBSAP, 2006): (1) *Bosque Tropical de Baja Altitud*, localizado al noreste del país y se caracteriza por altas precipitaciones durante todo el año, alta evaporación, y baja fertilidad del suelo; (2) *Sabana Húmeda*, ocupa cerca del 70% del territorio nacional y se caracteriza por precipitaciones anuales que varían entre 500 a 1.400 mm en la estación lluviosa (octubre a abril); posee además una gran variedad de tipos de suelos generalmente pobres en nutrientes; (3) *Sabana Seca*: se encuentra ubicada en el Sureste de Angola, caracterizándose por precipitaciones anuales que varían entre 500 y 250 mm en la estación lluviosa (octubre a abril) y suelos por lo general, fértiles con escasa vegetación; (4) *Nama-Karoo*: ubicada al Sureste del país y caracterizada por precipitaciones anuales media de entre 100 a 400 mm; donde cerca de 60% ocurre en la estación lluviosa; y (5) *Desierto*: ubicado al Sureste de Angola a lo largo de una estrecha faja costera y se caracteriza por precipitaciones anuales medias muy bajas variando de 10 a 85 mm.

1.2.2. Programas de plantaciones forestales de producción en el mundo.

Según la FRA, (2010) la *forestación* y la *reforestación* son dos términos diferentes y utilizados con frecuencia en temas forestales. La forestación es la acción de establecer bosques mediante plantación y/o siembra deliberada en tierras no clasificadas como forestales. La reforestación se refiere al restablecimiento de bosques mediante plantación y/o siembra deliberada en tierras clasificadas como forestales, por ejemplo, tras un incendio forestal o tormenta, o poblada de matorral.

La forestación y la reforestación no tienen por único objetivo el establecimiento de bosques para satisfacer fines productivos, sino, que también prestan servicios ecosistémicos (protección de las cuencas hidrográficas, control de la desertificación y la prevención de la erosión) y sociales (fuente directa de ingresos), (FRA, 2010). La FRA (2010), en la terminología de FAO a estas masas forestales se les denomina bosques plantados, que tienen la función de producción y protección, para diferenciarlas de las comprendidas bajo el término plantaciones, que son masas artificiales con función preferente la producción de madera en un marco de selvicultura intensiva.

Las plantaciones forestales a través de la introducción de especies arbóreas exóticas y su implantación en grandes macizos para la actividad productiva es una práctica común en numerosos países. Las plantaciones forestales *con especies exóticas* cubren aproximadamente 264 millones de hectáreas, que representan el 7% de todos los bosques en todo el mundo, y se expanden cada año por alrededor de cinco millones de hectáreas en promedio (Koen, *et al.*, 2014).

Esta implantación de masas forestales con fines productivos se realiza con un conjunto reducido de especies de las que se conoce su manejo silvícola e industrial. Por tal motivo se introducen en áreas distintas a las de su origen. Su cultivo intensivo es más fácil y resulta económicamente ventajoso en comparación con el de las especies arbóreas nativas, debido a que sobre las especies arbóreas exóticas se dispone de mayor información referente a las técnicas silvícolas para su manejo (viverización, plantación, podas y raleos) (Dodet y Collet, 2012). Sin embargo, estas introducciones de especies exóticas han iniciado en diferentes regiones del mundo procesos de invasión sobre los sistemas naturales y semi-naturales contiguos a las mismas, convirtiéndose en una amenaza para la biodiversidad (Sarasola, *et al.*, 2006).

El uso de coníferas (autóctonas y exóticas) en trabajos de plantación data en muchos países del hemisferio norte del siglo XIX con el fin de satisfacer la demanda prevista de los productos del bosque principalmente la madera (Brown, *et al.*, 2015). Estas plantaciones ofrecen diversos beneficios de servicios ambientales, que incluyen el almacenamiento de carbono y la facilitación de la regeneración de especies arbóreas indígenas, además de producir agua y otros servicios ecosistémicos (Koen, *et al.*, 2014). Esto ha hecho que muchos países como Brasil, haya promovido grandes plantaciones forestales con especies de los géneros *Eucalyptus* y *Pinus*, ocupando en 2011, una superficie de 6,5 millones de hectáreas (Zinn, *et al.*, 2014). Situaciones análogas se han dado en otros países, como el caso del Bosque de Kibale, al oeste de Uganda, donde desde la década de 1960 y principios de 1970 se convirtieron áreas de pastizales en plantaciones para la producción de fibra de madera (Fimbel y Cheryl, 1996).

1.2.3. Programas de plantaciones forestales de producción en Angola.

Durante las décadas de los años 60 y 70 se establecieron plantaciones de especies exóticas en polígonos forestales en las tierras altas de Angola (Planalto Central) con dos propósitos fundamentales: abastecer de combustible a las locomotoras a vapor de la

línea férrea de Benguela, y suplir de material a la Compañía de Celulosa del Ultramar Portugués (CCUP); posteriormente denominada Compañía de Celulosa del Alto Catumbela (IDF, 2010).

Con la descolonización, los polígonos forestales fueron abandonados, en parte como consecuencia de la situación de inseguridad del medio rural. Esto convirtió a estos recursos forestales en la principal fuente de combustible de las poblaciones rurales. En este contexto, es urgente describir la situación actual de esos polígonos, y proponer alternativas de gestión de los polígonos forestales sobrevivientes, lo que contribuiría a mejorar la situación económica de las poblaciones rurales. La extracción rentable y sostenible de estos recursos forestales puede garantizar su propia conservación, evitando otros usos alternativos de la tierra (cultivos o ganadería intensiva), que acostumbran a degenerar en procesos de deforestación. Una de las principales alternativas para la recuperación de estos bosques es la aplicación de técnicas de manejo forestal utilizando las llamadas “técnicas de explotación de impacto reducido”, es decir, un manejo que sea económicamente factible, socialmente justo y ambientalmente correcto (MINADER, 2012).

Actualmente el Gobierno de Angola reconoce en su documento sobre la Estrategia de Combate a la Pobreza, la importancia del sector forestal en el proceso de desarrollo socio-económico del País y, en particular, en el desarrollo rural integrado, ya que cerca del 60% de la población viven en el medio rural y tienen como principal fuente de subsistencia y renta la leña, el carbón, la carne de caza, la miel, los insectos, los frutos silvestres y los peces de aguas interiores (MINADER, 2012).

En el año 1967, (época colonial) con la remodelación Orgánica del Instituto de Investigación Agraria de Huambo (IIAA) éste pasó a la División de estudios forestales y se designó como “Departamento de Estudios Forestales”, constituido por las divisiones de silvicultura, mejoramiento forestal, tecnologías forestales y aprovechamiento de los recursos zoológicos naturales. En aquellos años existían varios proyectos del (IIAA) que quedaron a cargo de este Departamento, entre ellos el proyecto *17/63-Introducción y adaptación de especies forestales exóticas*. Para ejecutar este proyecto se instalaron varios ensayos en los diferentes Centros de Estudios (Chianga, Cela, Gangassol, Ganda, Humpata, Ceilunga y Luso) pertenecientes a las provincias de Huambo, Bié y Benguela (Planalto Central de Angola) (Figura 2). En el caso concreto de Huambo, en el centro de

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

estudio Chianga se instalaron dos ensayos: uno para estudiar la adaptación de *Pinus* spp. y *Eucalyptus* spp. y otro cultural, plantando especies de *Pinus patula*. Schl. et Cham. y *Pinus elliottii* Engelm para futuros bancos de semillas. Para el caso de *Pinus* spp., se tenía previsto completar la colección en años venideros con 20 especies más, procedentes de países como Vietnam, Formosa, Japón, Filipinas, México, Cuba y Bahamas, con el fin de probar su adaptabilidad en Angola para interés económico (IIAA, 1967).



Figura 4. Provincias donde se instalaron los Centros de Estudios. El mapa muestra las tres provincias principales donde se instalaron los ensayos para ejecutar el proyecto de introducción de especies forestales exóticas en el Planalto Central de Angola (Adaptado de <https://www.google.co.ao>).

1.3. Variabilidad genética del género *Pinus*.

El género *Pinus* es uno de los más importantes desde el punto de vista forestal, tanto por la cantidad de especies como por el valor económico que tienen muchas de ellas en sus países de origen y en los lugares donde han sido introducidas. Existen aproximadamente 120 especies del género *Pinus*, pero pocas de ellas son utilizadas comercialmente en el mundo, su comercialización es fundamentalmente como fuente de materia prima para las industrias de madera aserrada, resina, celulosa o papel. Las especies de este género presentan muchas ventajas cuando son comparadas con otras

candidatas a la silvicultura intensiva, producción e industrialización de la madera y de sus subproductos. Por ejemplo, las fibras largas de su madera son apropiadas para la fabricación de papel de alta resistencia, papel para impresión y otros tipos. Además, algunas especies producen resina a escala comercial. (Pinto, *et al.*, 2013).

Cabe destacar que los beneficios de estas masas forestales no solo se relacionan con la producción de biomasa comercial, sino también con los servicios ambientales hidrológicos y de secuestro de carbono Hernández-Félix, *et al.*, (2017), lo cual contribuye significativamente a la mitigación del cambio climático.

En México los pinos son catalogados como el primer género de árboles en distribución y área, ya que posee una elevada riqueza de taxones de este género, albergando alrededor de 40% de las especies conocidas a nivel mundial, con un total de 47 especies, de las cuales 35 presentan distribución restringida al territorio mexicano, es decir, el 74% son endémicas. (Granados-Victorino, *et al.*, 2015).

Entre las especies forestales mexicanas de gran importancia ecológica y económica, *Pinus patula* y *Pinus greggii*; son especies que crecen formando masas puras o mezcladas, y en ocasiones asociadas. Debido a sus características de rápido crecimiento y adaptación a condiciones edáficas nutricionalmente pobres, asociado al hecho de producir madera de buena calidad, son ampliamente utilizadas en plantaciones de tipo comercial en países como México, India, Indonesia, Brasil, Sudáfrica y Colombia (Carrera y López, 2004). Estas dos especies fueron introducidas en Angola en la época colonial, adaptándose bien a las condiciones edafo-climáticas locales lo que permitió su rápida diseminación por todo el territorio nacional, en especial en el Planalto Central de Angola. Siendo las dos especies objeto de estudio de esta disertación.

1.4. **La Genómica.**

La evaluación del estado de una población forestal, bien sea una planta de vivero, una repoblación joven o una masa forestal adulta, se ha realizado generalmente empleando técnicas fisiológicas. Así se han estudiado variables relacionadas con el estado hídrico de las plantas, como el potencial hídrico del xilema o el contenido relativo de agua; además de otras relacionadas con la fotosíntesis como la tasa de fotosíntesis neta, y la fluorescencia de la clorofila. En la concentración de todos esos

trabajos se ha generado mucha información, pero muchas son también las interrogantes generadas y que podrían ser potencialmente respondidas tras un estudio a nivel bioquímico y molecular. ¿Qué cambios a nivel molecular inducen esas respuestas fisiológicas? ¿Qué importancia cobra, a la hora de la toma de decisiones silvícolas, el conocimiento sobre la especie y su respuesta a situaciones potenciales de estrés hídrico? Para dar respuesta a estas y otras preguntas se han desarrollado una serie de técnicas de bioquímica y biología molecular, llamadas técnicas *ómicas*, como la Genómica funcional (transcriptómica y proteómica). Estas técnicas *ómicas* estudian la expresión génica y de proteínas de las especies relacionándolas con su funcionalidad, bajo condiciones ambientales determinadas, considerándolas un buen indicador del estado fisiológico de la planta en respuesta a distintos tipos de estrés (Ariza, 2011). Estos estudios constituyen un gran desafío, ya que la expresión génica de una célula es bastante dinámica dependiendo del estado de desarrollo, de la presencia de activadores o inhibidores y también de las condiciones ambientales (Pandey y Mann, 2000).

Un ejemplo de las posibilidades que supone el conocimiento de la base genética de algunas especies y su variabilidad biológica es la de caracteres relacionados con su capacidad para responder a factores bióticos como parásitos, enfermedades y depredadores y abióticos, como el cambio climático (Alfonso-Corrado, *et al.*, 2014). Las técnicas moleculares permiten a través de marcadores moleculares seleccionar variedades, procedencias o incluso genotipos (individuos concretos) de una misma especie que a priori se van a establecer y desarrollar con mayor facilidad en un ecosistema bajo unas condiciones concretas, en un momento determinado, y establecer las relaciones filogenéticas de muchos de esos géneros (Ariza *et al.*, 2011).

La Genómica estudia el contenido, organización, estructura y evolución de la información genética contenida en el genoma, teniendo entre sus objetivos descubrir la función, los mecanismos implicados en la regulación de la expresión y el modo en que los genes interaccionan entre sí (Pierce, *et al.*, 2009). La genómica abarca dos áreas principales de estudio *la genómica estructural y la genómica funcional*. La genómica estructural está encargada de estudiar la organización y secuencia de toda la información genética contenida en el genoma, a través de la construcción de mapas genómicos, creados a partir de marcadores moleculares o a través de mapas físicos contruidos a partir de la tecnología de DNA recombinante (Pierce, *et al.*, 2009),

permitiendo, entre otras cosas, la secuenciación de los genomas con distintos métodos de secuenciación. (Alcalde-Alvites, 2015).

Según (Lockhart y Winzeler, 2000) la genómica funcional se encarga del estudio del conjunto de genes expresados en una unidad biológica, en un momento determinado y bajo unas condiciones ambientales concretas. Tiene como objetivos:

- Generar un catálogo de todos los genes y de su función.
- Comprender el comportamiento de los sistemas biológicos y de los algoritmos genéticos que permiten el funcionamiento celular y el desarrollo de los organismos

La genómica funcional comprende un conjunto de disciplinas de estudio llamadas de forma genérica “-Ómicas” que son la *proteómica* o estudio del proteoma, es decir, las proteínas presentes en una unidad biológica en un tiempo (estadio de diferenciación y desarrollo) y bajo condiciones ambientales determinadas; la *transcriptómica* o estudio del transcriptoma, la parte del genoma (el conjunto de genes) que se expresa en una célula en una etapa específica de su desarrollo y bajo unas condiciones ambientales determinadas; y por último, la *metabolómica*, que estudia el conjunto total de metabolitos de una célula, consecuencia de la función de RNAs y proteínas y cuya interacción da lugar a un fenotipo concreto (Jorrín *et al.*, 2009).

La aplicación de la genómica funcional al ámbito forestal comenzó en los años noventa, con estudios de genética y mapeo genético de locus carácter cuantitativo (QTLs), es decir, aquellos caracteres cuantificables que varían de forma continua (Cervera, *et al.*, 2001; Costa, *et al.*, 2016). Gracias al avance técnico, a finales de los noventa se inició en distintos laboratorios el análisis simultáneo de miles de transcritos y proteínas, ayudando a comprender la función de proteínas, regulación génica en las especies arbóreas. (Plomion, *et al.*, 2005).

Las nuevas técnicas de la biología molecular aplicadas a estudios genéticos y moleculares en el área forestal permiten establecer relaciones de parentesco entre individuos (árboles) y progenies, y a su vez profundizar en la estructura y diversidad biológica de sus poblaciones (Pérez-Ramos, *et al.*, 2014).

Estas técnicas moleculares (marcadores moleculares de ADN, transcriptómica, proteómica y metabolómica), junto con las de genética y bioquímica clásica, a menudo han sido utilizadas para caracterizar la variabilidad genética en especies forestales, como es el caso de la encina (*Quercus ilex* L.) (Jorrín y Navarro, 2014). Estos autores concluyen que estos estudios moleculares constituyen una herramienta eficaz para la caracterización genética de esta especie forestal y aún más teniendo en cuenta las previsiones del cambio climático.

Estudios realizados con otras encinas (*Quercus pyrenaica*) aplicando técnicas moleculares (micro satélites nucleares, nSSR) a rebollos en rodales de monte bajo resalveado en Sierra Nevada, concluyen que independientemente del sistema silvícola aplicado existe una elevada diversidad genética de la especie en los montes bajos (Valbuena-Carabaña y Gil, 2014). Estos mismos autores plantean que la aplicación de marcadores moleculares en concreto micro satélites nucleares (nSSR) supone una herramienta adecuada, pues permite, además de caracterizar la diversidad genética intraespecífica, identificar correctamente los clones y las relaciones de parentesco entre los individuos de una población.

Los datos obtenidos a partir de las pruebas genómicas no son suficientes al ser el genoma un sistema estático y fundamentalmente idéntico en cada organismo, mientras que el proteoma es muy dinámico y su análisis proporcionan una visión más detallada de lo que sucede en el interior de la célula. (Martín y Ballesteros, 2010).

1.4.1. Proteómica

Dentro de las técnicas ómicas, la *proteómica*, constituye un área de investigación prioritaria para cualquier organismo, ya que se encarga de estudiar los procesos biológicos que ocurren a través del análisis sistemático de las proteínas (orgánulo, célula, tejido, órgano, individuo, especies o ecosistemas), expresadas en cualquier etapa de desarrollo y en condiciones ambientales y fisiológicas específicas, por lo que refleja el estado actual de funcionamiento de un sistema biológico (García, *et al.*, 2012).

El término "proteómica" fue acuñado por Marc Wilkins, durante la reunión de Siena en 1994, para referirse simplemente al "complemento de proteínas de un genoma" (Wilkins, *et al.*, 1996). Quince años después, la proteómica se ha convertido en algo más que un apéndice de la genómica o un enfoque experimental, convirtiéndose en un

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

complejo disciplinar y científico que estudia el proteoma celular (Abril, *et al.*, 2011) (Figura 1.5).

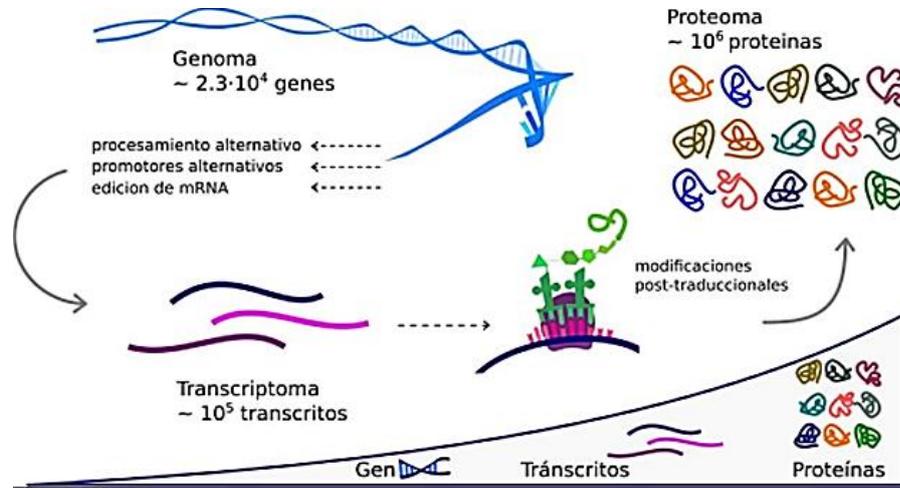


Figura: 1.5. Aumento de complejidad desde el genoma hacia el proteoma. Se muestra el grado de complejidad biológica de forma exponencial desde el gen portador de la información genética hasta las proteínas unidad funcional (<http://www.profemorales.com/wp-content/uploads/2016/01/proteoma.png>).

La proteómica se ha desarrollado gracias al avance en las tecnologías, las cuales van encaminadas a separar, identificar y caracterizar proteínas con las que se pretende obtener información sobre la abundancia de las mismas, su localización, modificación e interacción. (Martín y Ballesteros, 2010).

Los avances tecnológicos más notables son los métodos de separación y análisis de proteínas por electroforesis bidimensional (2DE) y la cromatografía multidimensional, así como la identificación y cuantificación de proteínas mediante espectrometría de masas (MS) y posterior identificación por búsqueda en bases de datos a partir de los datos de huella peptídica o secuenciación “de novo” mediante herramientas bioinformática (Cánovas, *et al.*, 2004; Jorge, *et al.*, 2006).

La espectrometría de masas en tándem, también conocida como MS / MS o MS² es una técnica consolidada, que durante la pasada década ha tenido un gran avance en el ámbito biológico, en la que los átomos o moléculas de una muestra son ionizados, mayoritariamente en modo positivo, separados por su relación masa/carga (m/z) y posteriormente detectados y registrados (García, *et al.*, 2012), (Figura 1.6).

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

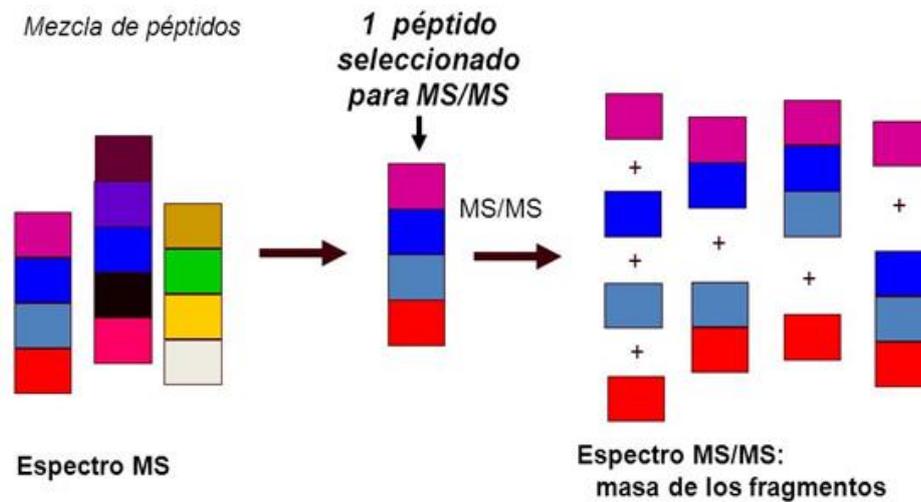


Figura 3.3: Espectrometría de masa MS/MS. En la espectrometría de masa en tándem se seleccionan péptidos precursores, generalmente los de mayor intensidad en el espectro MS¹, para ser fragmentados y generar el espectro MS/MS o MS² (fqb.fcien.edu.uy/docs/2014/Aplicaciones%20MS-Proteomica_2014.pptx).

La ionización por electrospray ESI (Electrospray Ionization) y la ionización por láser desorción/ionización asistida por matriz MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization), son las dos técnicas más comúnmente utilizadas para volatilizar e ionizar las proteínas o péptidos, siendo una etapa crucial en el análisis por de espectrometría (MS) y lo corrobora el hecho de que estas metodologías hayan sido merecedoras de dos premios Nobel en 2002 (Zhang, *et al.*, 2013). Estos dos sistemas de ionización se utilizan con distintos analizadores que se acoplan de forma diferente según el problema analítico a resolver pero en general: MALDI se acopla con TOF y ESI se acopla con LTQ Orbitrap (Martín y Ballesteros, 2010).

Para la identificación de proteínas se han desarrollado varias estrategias, entre las que se destacan la identificación mediante huella peptídica PMF, (peptide mass fingerprinting) utilizando un espectrómetro tipo MALDI-TOF y la otra es la aproximación basada en la secuenciación “de novo” por MS/MS (Damodaran, *et al.*, 2007; Sandoval-Usme, *et al.*, 2009).

Hoy en día se llevan a cabo múltiples investigaciones utilizando la proteómica como aproximación metodológica, destacando las áreas de biología y biomedicina (Görg, Weiss, & Dunn, 2004). En el campo agroforestal también se han realizados diversas investigaciones como por ejemplo, la respuesta de las plantas a diferentes

estreses (abióticos y bióticos) y en particular al estrés hídrico en los géneros *Populus*, (Durand, *et al.*, 2011; Bohler, *et al.*, 2013; Li, *et al.*, 2014) *Pinus*, (He, *et al.*, 2007; Ariza, 2011; Wang, *et al.*, 2013; Xu y Wu, 2016) *Eucalyptus*, (Bedon, *et al.*, 2012; Correia, *et al.*, 2016) y *Quercus* (Valero-Galván, *et al.*, 2013; Simova-Stoilova, *et al.*, 2015). También se ha utilizado para proporcionar información complementaria sobre las proteínas implicadas en la xylogénesis en pinos; concluyendo que la *proteómica* es un enfoque relevante para el seguimiento de los marcadores moleculares claves que intervienen en la formación y propiedades de la madera (Gion, *et al.*, 2005; Paiva, *et al.*, 2008). Su valor también ha sido probado en estudios de mejoramiento tanto de poblaciones naturales como en plantaciones forestales, así como en estudios relacionados con la resistencia a plagas y enfermedades (Azofeifa, 2006).

A pesar de ser considerada una herramienta muy poderosa para investigar las complejas respuestas de las plantas superiores a las tensiones ambientales, no obstante, se considera que la *proteómica* está muy lejos de ser explotada plenamente en la investigación de la biología vegetal, principalmente en especies forestales (Jorrín y Navarro, 2014), pudiendo deberse a las dificultades que tienen como sistema experimental, o por despertar mayor interés medioambiental que productivo. Incluso hay quien considere que todavía se encuentra en fase inicial si se compara con los estudios realizados en procariotas, levaduras y humanos (Khan, *et al.*, 2007).

Por ejemplo, en los últimos 15 años los resultados obtenidos por diversos investigadores han demostrado que el dinamismo, la variabilidad y el comportamiento de las proteínas son más complejos de lo que se pensaba; sin embargo, estas investigaciones en especies forestales son casi insignificantes si se comparan los estudios de las plantas arbóreas con las especies de plantas herbáceas, exceptuando a los estudios realizados con especies de plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* (Abril, *et al.*, 2011). Por lo tanto, el reto más importante en la *proteómica* es aclarar los principales procesos fisiológicos que determinan la tolerancia de las especies forestales a los diferentes estreses abióticos.

1.5. Estrés hídrico

Estudios recientes indican que actualmente una de las mayores preocupaciones a escala mundial con respecto a las masas forestales es el *estrés hídrico*, por afectar su

crecimiento y supervivencia, seguida por el estrés térmico y la salinidad (García, *et al.*, 2013; Contreras, 2015). El estrés hídrico se produce cuando las plantas no tienen cubiertas sus necesidades hídricas, hasta el punto de provocar serias restricciones en su crecimiento, desarrollo y supervivencia (Ceacero, *et al.*, 2012; Ortuño, *et al.*, 2015). Entre sus causas se encuentran la escasez de humedad durante la época de estiaje, la distribución irregular de la lluvia, el pobre contacto entre el cepellón y el suelo, así como las bajas temperaturas, las cuales dificultan la absorción del agua por las raíces (Prieto, *et al.*, 2012).

Se prevé que para las próximas décadas las alteraciones climáticas aumenten la sequía en algunas áreas del planeta, debido a la disminución de la cantidad y frecuencia de las precipitaciones y el aumento de la temperatura global que favorecerá aún más las pérdidas por evapotranspiración (Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), (Thornton, *et al.*, 2014). Por otro lado, el cambio climático genera nuevos riesgos para los sistemas naturales y humanos, los cuales podrían limitarse a un sector o región en particular (IPCC, 2014). Según Oguntunde, *et al.*, (2014), las previsiones son particularmente más graves en África occidental, provocando, alteraciones en los ecosistemas, la reducción en la disponibilidad de agua y la disminución de la producción agrícola y de alimentos.

El agua para las plantas es extremadamente importante ya que influye en la mayoría de los procesos fisiológicos, como la fotosíntesis, la respiración, la síntesis de compuestos químicos, la división y elongación celular, el transporte de elementos esenciales y la termorregulación foliar de las plantas (Claeys e Inze, 2013); es decir que de modo general el déficit de agua provoca cambios en las plantas tanto a nivel morfológicos, fisiológicos, bioquímicos como moleculares, afectando directa o indirectamente su desarrollo (Akinci y Lösel, 2012).

La aridez global ha aumentado substancialmente desde la década de 1970, debido a un aumento reciente de la sequía en África, el Sur de Europa, Este y Sur de Asia, y el Este de Australia. Las áreas definidas como secas (entre las coordenadas 60 ° S y 75 ° N) han aumentado de 17 % en los años 1950 a cerca de un 27% en la década del 2000 (Dai, 2011).

En todos los ecosistemas, específicamente en los áridos y semiáridos, la sequía es un período crucial en el que las plantas experimentan una competencia por el agua, (López, *et al.*, 2009). Durante estas condiciones las plantas deben ajustar sus procesos fisiológicos para contrarrestar dicha situación de estrés. Las respuestas y los mecanismos o estrategias de las plantas para hacer frente a la escasez de agua se pueden dividir en dos grandes categorías. (Lawlor, 2013; Claeys e Inze, 2013):

- Evitación del estrés, que es la capacidad que tienen las plantas para mantener su potencial hídrico relativamente alto en condiciones de estrés hídrico, mediante el cierre estomático y el ajuste osmótico.

- Tolerancia al estrés, que se refiere a la capacidad de las plantas en disminuir la actividad química del agua concentrar las macromoléculas y por tanto producir cambios en la membrana celular.

Para adaptarse al ambiente, las plantas activan un gran número de genes, lo que conduce a una acumulación de proteínas asociadas específicamente a estrés (Nakashima, *et al.*, 2012). La respuesta de las plantas a los diferentes tipos de estrés (bióticos e abióticos) generalmente modifica el patrón proteico. Estos cambios están relacionados con modificaciones en la expresión de genes específicos, relacionados con la producción de enzimas clave en la vía de síntesis de osmólitos, proteínas con función protectora, enzimas antioxidantes, factores de transcripción y otras proteínas involucradas en las respuestas al estrés hídrico. Todos estos cambios dependerán de la naturaleza (tipo de estrés), duración y severidad del estrés (Moreno, 2009; Baerenfaller, *et al.*, 2012; Verelst, *et al.*, 2013).

El conocimiento de los mecanismos de resistencia al estrés permite comprender los procesos evolutivos implicados en la adaptación de las plantas a un ambiente adverso y predecir hasta cierto punto la respuesta vegetal al incremento de la adversidad asociada en muchos casos al cambio global. Además, este conocimiento puede ser aplicado para mejorar las características de las plantas tanto en su fase de cultivo como en la selección de variedades que se ajusten a unos requerimientos ambientales determinados o, simplemente, a mejorar la productividad de una especie (Valladares, *et al.*, 2008).

Las plantas perciben las señales del medio ambiente y las transmiten a la maquinaria celular. De esta forma se activan procesos utilizando mecanismos complejos que les permiten aclimatarse. La respuesta consiste, en general, en cambios en el tipo, cantidad o actividad de determinadas proteínas de la planta, generando componentes útiles para las nuevas condiciones y eliminando los superfluos (Giacomelli, *et al.*, 2008).

Las alteraciones metabólicas y fisiológicas, comienzan por una reducción de los pigmentos fotosintéticos, (clorofila a/b y carotenoides) responsables por la baja productividad de biomasa vegetal en las plantas estresadas. (Zingaretti, *et al.*, 2013).

La deshidratación también disminuye la superficie de la hoja expuesta a la energía solar y, junto con el cierre de los estomas disminuyen las pérdidas de agua por transpiración, este cierre estomático se produce por el balance hormonal integrado entre ABA, auxinas (Ax) y citoquinina (Ck), lo cual va a provocar una reducción en la asimilación del CO₂, la cantidad de ATP y el nivel de la ribulosa bisfosfato y por consiguiente una disminución de la enzima rubisco, responsable de la fijación de CO₂ (Silva, *et al.*, 2010).

Otra señal de respuesta al estrés hídrico son los cambios en el contenido de hidratos de carbono tales como sacarosa y rafinosa, junto con el desequilibrio de hormonas vegetales, como el ácido abscísico (ABA) que aumenta sustancialmente su nivel en raíces y brotes en estas condiciones (Leach, *et al.*, 2011). El aumento del ABA trae consigo un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno ROS (capacidad antioxidante) y la activación de enzimas antioxidantes tales como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (Zingaretti, *et al.*, 2013). El aumento de los niveles de ABA también juegan un papel importante en el control de la ascorbato peroxidasa (APX) y la glutatión reductasa (GR), evita el estrés oxidativo y la acumulación excesiva de etileno (ET), manteniendo así indirectamente el crecimiento de las raíces y los brotes. (Sharp, 2002; Yang, *et al.*, 2003). Otros mecanismos relevantes son la síntesis de proteínas protectoras como aquaporinas (transporte de agua), la activación de la proteína G, el aumento del Ca²⁺ citosólico y el aumento de la fosforilación/defosforilación de proteínas (Zhang, *et al.*, 2012). En la Figura 4 se resume la respuesta de las plantas al estrés hídrico.

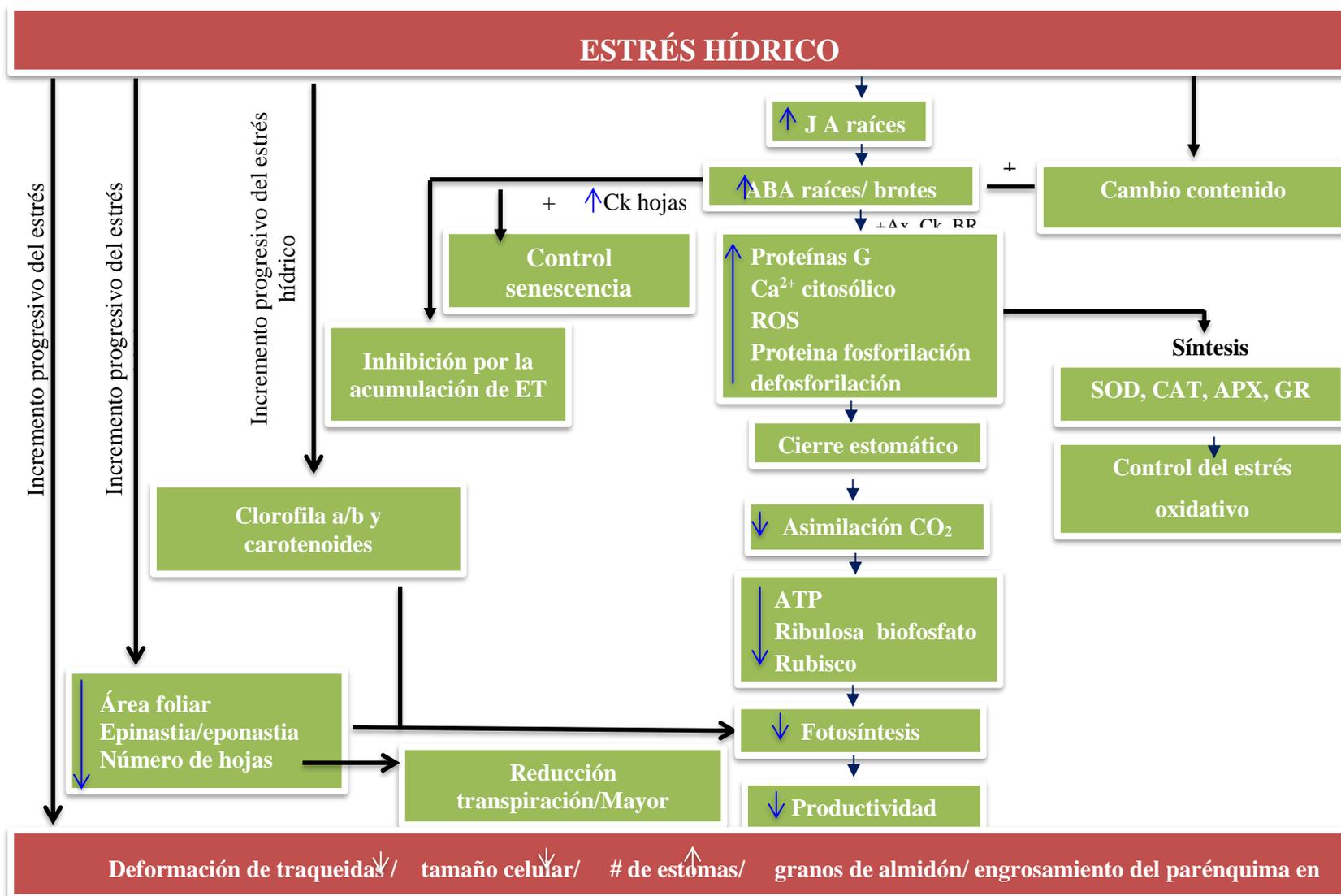


Figura 4. Respuesta de las plantas antes el estrés hídrico. El esquema representa los principales mecanismos que utilizan las plantas en condiciones de estrés hídrico (Adaptado de Zingaretti *et al.*, 2013)

Resumiendo el objetivo de los *mecanismos de evitación del estrés* es equilibrar la absorción y la pérdida de agua. La absorción de agua se ve mejorada por la acumulación de solutos para reducir el potencial de agua de los tejidos y por el aumento de crecimiento de las raíces; mientras que la pérdida de agua por evaporación es limitada por el cierre de los estomas, lo que a la vez restringe el crecimiento de brotes y acelera la senescencia foliar. Y los *mecanismos de tolerancia al estrés* por su parte tienen por objetivo proteger a la planta contra el daño celular cuando el estrés se vuelve más severo y los mecanismos de evitación del estrés ya no son suficientes.

Ambos mecanismos de evitación y tolerancia de estrés, incluyen la destoxificación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la acumulación de proteínas protectoras como las proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) y solutos tales como prolina, la cual tiene una doble función como osmólito y osmoprotector. Tanto las respuestas de evitación como las de tolerancia son orquestadas principalmente por el ácido abscísico (ABA) (Nakashima, *et al.*, 2009). Aunque los mecanismos ABA-independientes, como los relacionados con proteínas del tipo Drought Responsive Element-Binding (DREB) también juegan un rol importante (Zurita-Silva, *et al.*, 2014).

Las plantas también responden al estrés por déficit hídrico a nivel celular y molecular; a nivel molecular la respuesta al estrés hídrico incluye numerosos mecanismos de control a distintos niveles como la regulación post-transcripcional, post-traducciona l o epigenética (Hirayama y Shinokazi, 2010; Vaahtera y Brosché, 2011).

Por ser la sequía uno de los factores críticos que limitan el crecimiento de la planta, el conocimiento sobre la adaptación genética a la sequía es necesario para desarrollar estrategias para la reforestación y forestación exitosa en los sitios propensos a la sequía (Espinoza, *et al.*, 2014).

1.6. Micorrizas.

Desde los inicios de la evolución, una de las estrategias más antiguas, realizada por diferentes organismos para mejorar su adaptación al medio en el que habitaban ha sido establecer asociaciones simbióticas con otros individuos de otras especies. Dentro del ámbito forestal tienen especial relevancia, las micorrizas (Smith y Read, 2008).

Esta asociación en las últimas décadas se ha convertido en una herramienta útil en la silvicultura, horticultura y la agricultura, donde hay evidencias de su eficacia en el

desarrollo competitivo y sostenible de los sistemas de producción (Ruscitti, *et al.*, 2015).

La presencia de micorrizas, asociación simbiótica entre la raíz de una planta (fitosimbionte) y las hifas o células de determinados hongos (micosimbionte), aumenta la resistencia de las plantas frente a los estreses ambientales (sequía) y los provocados por patógenos, además de mejorar la estructura y calidad del suelo (Pouyu-Rojas, *et al.*, 2006; Navarro-Fernández, *et al.*, 2013; Goetten, *et al.*, 2016; Torres-Arias, *et al.*, 2017). Este aumento a la resistencia por parte de las plantas micorrizadas a diversos tipos de estreses biótico (patógenos del suelo) y abiótico (hídrico, salino o por metales) puede deberse al papel crucial que el hongo desempeña en la absorción y el transporte de agua y de nutrientes, ya que el micelio fúngico funciona como una extensión del sistema radical permitiendo aumentar la superficie de absorción (Lehto y Zwiazek, 2011)

Aproximadamente el 80 al 90 % de las plantas vasculares requieren las micorrizas para su nutrición; las coníferas en particular la requieren para sobrevivir (Urgiles, *et al.*, 2016). Las micorrizas pueden distinguirse, según la clasificación tradicional, en base a su estructura y morfología en dos grandes grupos (Figura 5): micorrizas "endotróficas" y micorrizas "ectotróficas". Las micorrizas endotróficas surgen cuando las hifas del hongo penetran en el interior de los tejidos radicales del huésped; mientras que los hongos que forman las micorrizas ectotróficas, envuelven superficialmente y de manera muy abundante las terminaciones radicales, penetrando en los tejidos celulares de manera muy limitada, en la que el hongo desarrolla una estructura laberíntica a través del apoplasto del córtex de la raíz, llamada red de Hartig, donde se lleva a cabo la transferencia de nutrientes entre las células fúngicas y las plantas (Galindo-Flores, *et al.*, 2015). Este tipo de asociación representa sólo el 5% de las asociaciones simbióticas, pero, son muy importantes en muchas especies forestales como: *Pinus sp*, *Quercus sp*. y *Eucalyptus sp* (Smith y Read, 2008).

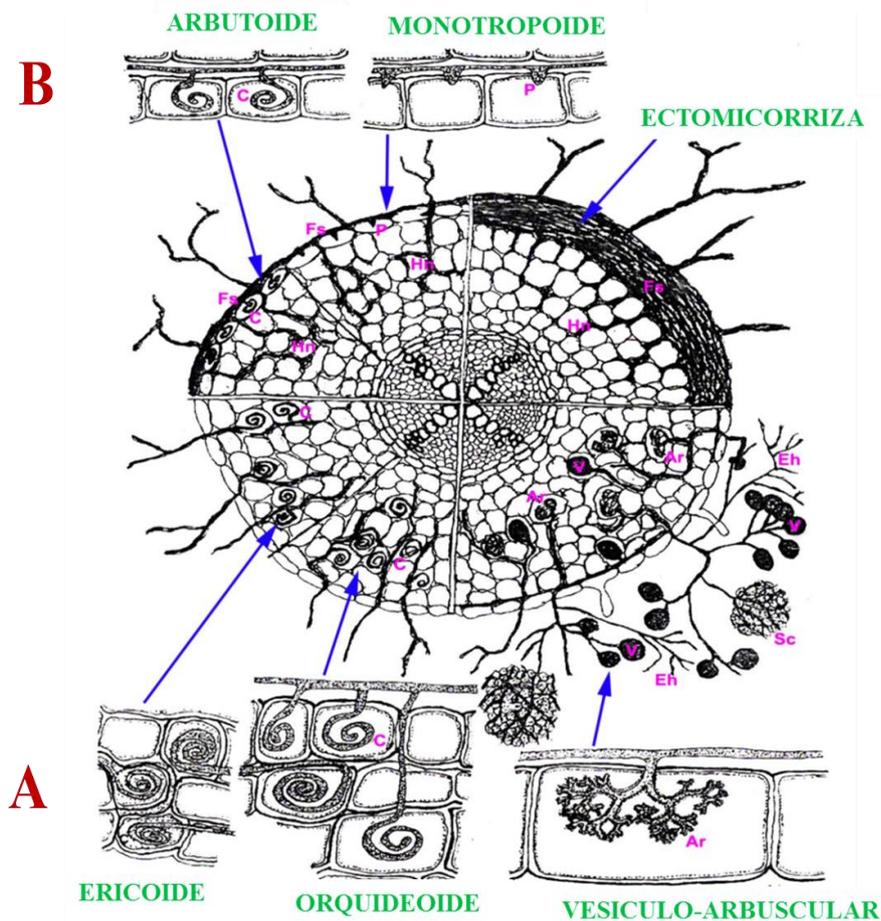


Figura 4. Tipos de micorrizas. El diagrama muestra diferentes tipos de micorrizas A) Endomicorrizas y B) Ectomicorrizas (Adaptado de Agarwal y Sah, 2009). Ar = arbuscúlos, C = Hifas en espiral, Eh = Hifas Extramatricial, Hn = Red de Hartig, Fs = Vaina fúngica, P = Saliente, Sc = Esclerocios, V = Vesículas.

En especies forestales, destacan las ectomicorrizas, simbiosis entre gymnospermas en general y algunas familias de angiospermas y hongos *Ascomycetos* y *Basidiomicetos* (más de 20.000 especies) (Urgiles, *et al.*, 2016). Entre los hongos micorrizicos más utilizados para mejorar la calidad de planta forestal y conseguir una adecuada revegetación, por ser especies de fácil manipulación y que a su vez producen inóculo con gran capacidad de micorrización, destacan *Pisolithus tinctorius*, *Laccaria laccatta* *Amanita muscaria* y *Suillus granulatus*. Estos hongos favorecen el establecimiento, supervivencia y desarrollo de la planta en etapas tempranas al facilitar la absorción y el transporte de nutrientes tales como P, K, NH₄, NO₃, Ca y agua (Brundrett, 2004; Finlay, 2004; Jones, *et al.*, 2004; Carrasco-Hernández, *et al.*, 2010).

La micorrización es un fenómeno ampliamente estudiado en el ámbito forestal. Múltiples estudios en las últimas décadas por científicos de varios países han concluido que las micorrizas juegan un papel importante en el crecimiento y desarrollo con

resultados positivos en la supervivencia en condiciones semiáridas (Martínez-García, 2011). La importancia ecológica de esta asociación se fundamenta en que mejora la capacidad de la planta para la adquisición de nutrientes minerales y agua del suelo, ya que aumenta significativamente el área de contacto de las raíces con el suelo. Esto es de gran importancia en el crecimiento vegetal y en la producción de biomasa de las plantas (Carrasco-Hernández, *et al.*, 2010; Ruiz, *et al.*, 2011; Costa, *et al.*, 2016). Además, las micorrizas tienen un efecto en las relaciones hídricas de la planta y del suelo en condiciones de estrés, ya que, modifican la conductividad estomática, la tasa fotosintética y la transpiración en la planta; por otro lado los exudados fúngicos promueven la cohesión de las partículas del suelo incrementando la retención de agua por parte del sustrato (Garzón, 2016).

La inoculación con hongos micorrícicos es considerada una buena práctica, pues encaja dentro de una gestión biológica dirigida hacia un manejo sustentable y respetuoso del ambiente. (Ruscitti, *et al.*, 2015). En los ecosistemas áridos y semiáridos en particular, la inoculación con hongos micorrícicos se considera una alternativa para incrementar el crecimiento, supervivencia y rendimiento de los cultivos o de otras especies vegetales silvestres en condiciones de sequía en que las plantas compiten por el agua para contrarrestar el estrés (Barroetaveña, 2003).

Los estudios realizados sobre el efecto de las micorrizas en plantas sometidas a estrés hídrico, demuestran que las plantas micorrizadas crecen y mejoran su estado hídrico si las comparamos con las plantas no micorrizadas (Hernández y Salas, 2009; Martínez-García, 2011; Reverchon, *et al.*, 2012).

1.7 Hipótesis y justificación de la Tesis

Angola es un país dependiente totalmente de la industria diamantífera y petrolífera, por lo tanto la apuesta por nuevas áreas que permitan la diversificación de la economía como son la agricultura y la industria forestal sería una estrategia importante para el sector económico del país; y más teniendo en cuenta el potencial natural que posee y las predicciones en cuanto al aumento de la temperatura media mundial en las próximas décadas asociadas al cambio climático. Esto provocará un aumento de la sequía en algunas áreas del planeta, representando una seria amenaza para la agricultura y la silvicultura en todo el mundo, y fundamentalmente para el continente africano, debido a la falta de recursos y de adaptación a estos cambios. Por ejemplo, ya se ha establecido que la seca estacional en Angola es uno de los principales factores limitante en la supervivencia y el crecimiento de las plantas, si añadimos esto a la falta de recursos por parte de los productores, entonces la comprensión de la capacidad de supervivencia y resiliencia de las especies de coníferas exóticas introducidas en Angola a períodos de estrés hídrico severo podría permitir un manejo adecuado de las diferentes especies a futuros escenarios comenzando a partir de la etapa de viverización mediante el uso de micorrizas.

La micorrización podría ser una de alternativas que permita minimizar los daños de la sequía. Sin embargo, a pesar de saber que estos hongos son simbiontes obligados de las plantas y están presentes en todo tipo de ecosistemas terrestres colonizando la mayoría de las plantas vasculares, existen pocos datos sobre su función en los ecosistemas áridos como es el caso de Angola. Por lo que la hipótesis de trabajo en esta disertación es confirmar si la micorrización será la estrategia efectiva que permitirá desarrollar plantas tolerantes al estrés por sequía.

Objetivo General

El objetivo de esta tesis doctoral es aplicar técnicas de genómica funcional (proteómica) como herramienta en la caracterización de dos especies de pinos (*Pinus greggi* y *P. patula*) empleadas en la repoblación forestal de la estación forestal experimental de Chianga (Huambo, El material seleccionado y caracterizado se empleará para estudiar la respuesta diferencial de estas especies a situaciones de estrés hídrico y a la micorrización en condiciones controladas.

Objetivos Específicos

- Analizar e identificar las proteínas expresadas diferencialmente en semillas de *Pinus patula* y *P. greggi* con un enfoque basado en el análisis por espectrometría de masa nLC LTQ Orbitrap.
- Comparar la respuesta morfofisiológica y molecular de *Pinus patula* y *Pinus greggi* a las condiciones naturales (época seca y lluviosa) de la Meseta Central de Angola en condiciones controladas.
- Evaluar el efecto de la inoculación del hongo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* en plántulas de *P.patula* sometidas a estrés hídrico a través de un análisis morfofisiológico y proteómico en condiciones controladas.

Este trabajo de tesis contará con cinco capítulos relacionados según la secuencia metodológica establecida. Cada uno de éstos se desarrollará en un marco metodológico diferenciado, tal y como describimos a continuación:

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

CAPITULO 2. Determinación de la expresión de proteínas de semillas de dos especies de Pinus (*Pinus greggi* Engelm. y *Pinus patula* Schiede and Deppe in Schlecht.) a través de genómica funcional (Proteómica).

Objetivo: Caracterización de la semilla de la especies de *Pinus* (*Pinus patula* y *Pinus greggi*) empleadas en la repoblación forestal realizadas en el polígono forestal de Chianga (Huambo, Angola) a través de marcadores moleculares (proteínas).

CAPITULO 3. Comportamiento fisiológico y molecular de *Pinus patula* Schiede and Deppe in Schlecht. y *Pinus greggi* Engelm bajo dos tratamientos de simulación de

condiciones naturales de crecimiento del Planalto Central de Angola (época seca y época de lluvia).

Objetivo: Evaluar la respuesta al estrés hídrico a través de variables fisiológicas y moleculares en plantas de *Pinus patula* y *Pinus greggii*.

CAPÍTULO 4. Análisis fisiológico y proteómico de plantas de *Pinus* (*Pinus greggii*) micorrizadas con *Pisolithus tinctorius* (Pers.) bajo déficit hídrico.

Objetivo: Evaluar la respuesta al estrés hídrico en plantas de *Pinus patula* con tratamientos de micorrizas en condiciones controladas.

CAPITULO 5. DISCUSIÓN GENERAL

CAPITULO 6. CONCLUSIONES GENERALES

CAPITULO 7. BIBLIOGRAFÍA

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

Capítulo 2. Determinación de la expresión de proteínas de semillas de dos especies de *Pinus* (*Pinus greggii* Engelm. y *Pinus patula* Schiede and Deppe in Schlecht.) a través de genómica funcional (Proteómica).

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

2.1. Introducción

En el ámbito forestal, uno de los géneros botánicos más destacado es el género *Pinus*, tanto por la cantidad de especies como por el valor económico que tienen muchas de ellas, tanto en sus países de origen como en aquellos lugares donde han sido introducidas. En el caso de Angola, varias especies de *Pinus* fueron introducidas en la época colonial, durante los años 60 y 70, en especial de procedencia mexicana. Estas plantaciones se establecieron con dos objetivos, probar su adaptabilidad en las tierras altas de Angola (Planalto Central) a través de proyectos de investigación forestal; y como reserva estratégica para futuras extracciones de materias primas (PDMPSA, 2012). En estos programas se usaron pinos mexicanos que, en su mayoría, se caracterizan por su rápido crecimiento y por la resistencia a condiciones adversas, como la sequía, las heladas, los incendios, el pastoreo, el ataque de algunas plagas y por su capacidad para establecerse en suelos con bajo contenido nutricional, (Rodríguez, *et al.*, 2013), como el caso de los suelos ferralíticos presentes en el Planalto Central (Diniz, 1998). Por estas características, el género *Pinus* ha sido muy utilizado en programas de restauración y conservación. Dentro del grupo de especies subtropicales de *Pinus* se destacan *Pinus patula* Schl et Cham. y *Pinus Greggii* Engelm., que no sólo se han utilizados por su potencial en programas de restauración, sino también para el establecimiento de plantaciones forestales comerciales en ambientes diversos (Landa, Mendizábal, & J., 2005). Por ejemplo, *Pinus patula* es la conífera más intensamente plantada en América, Australia, Asia, y África (Muñoz, Orozco, Coria, & García, 2010), estimándose en más de un millón de hectáreas de plantaciones en el mundo, de las cuales aproximadamente la mitad están plantadas en el continente africano (Wessels, *et al.*, 2015).

En las últimas décadas las investigaciones en el campo forestal están aumentando vertiginosamente en campos relativamente nuevos como la biotecnología (FAO, 2017). Gracias a los avances en la biología molecular se han desarrollado métodos de identificación y caracterización de especies basados en el uso de marcadores moleculares, los cuales han sido propuestos como una herramienta válida para evaluar el crecimiento, productividad y respuestas a diferentes estreses abióticos y bióticos, y en particular al estrés hídrico en los géneros *Populus* (Bohler, *et al.*, 2013; Li, *et al.*, 2014), *Pinus* (Wang, *et al.*, 2013; Xu y Wu, 2016), *Eucalyptus* (Bedon, *et al.*, 2012; Correia, *et al.*, 2016) y *Quercus ilex* (Valero-Galván, *et al.*, 2013; Simova-Stoilova, *et al.*, 2015).

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

También se usan para evaluar el efecto del manejo forestal sobre la variabilidad genética y sistemas reproductivos (Alfonso-Corrado, *et al.*, 2014). Estas herramientas son aplicables a cualquier tipo de material vegetal independiente de la época del año en que se realiza el análisis; permitiendo la identificación correcta de la variedad sin necesidad de muchos caracteres (Azofeifa-Delgado, 2006).

Las nuevas técnicas de biología molecular aplicadas a estudios genéticos y moleculares en el área forestal permiten establecer relaciones de parentesco entre individuos (árboles) y progenies, y a su vez profundizar en la estructura y diversidad biológica de sus poblaciones (Pérez-Ramos, *et al.*, 2014). Dichas técnicas moleculares (marcadores moleculares de ADN, transcriptómica, proteómica y metabolómica), junto con las de genética y bioquímica clásica, han sido utilizadas para caracterizar la variabilidad genética en especies forestales, como la encina (*Quercus ilex* L.) (Jorrín y Navarro-Cerrillo, 2014). Estos autores concluyen que estos estudios moleculares constituyen una herramienta eficaz para la caracterización genética de esta especie forestal. El análisis del perfil proteico de una muestra de un tejido dado, por ejemplo, semilla, es de gran utilidad ya que permite detectar la variabilidad en cuanto a tipos y concentraciones de proteínas e identificar proteínas como marcadores fenotípicos, de población o de genotipos élite (Toledo, *et al.*, 2001; Almaraz, *et al.*, 2002; Rodríguez de Francisco, *et al.*, 2016).

Este estudio se realiza teniendo en cuenta la importancia trascendental que tiene el conocimiento de la variabilidad genética para la selección del material vegetal apropiado en los programas de repoblación forestal en el mundo y en particular en Angola. El objetivo principal del estudio es caracterizar, a través de marcadores moleculares (proteínas), las semillas de dos especies de *Pinus*, *P. patula* y *P. greggii*, empleadas en las parcelas de ensayos de repoblación forestal realizadas en el polígono forestal de Chianga (Huambo, Angola).

Este objetivo general ha sido alcanzado a través de la identificación y análisis de las proteínas expresadas diferencialmente en las semillas de *P. patula* y *P. greggii*, con un enfoque basado en el análisis por espectrometría de masa nLC- MS/MS.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Material vegetal

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio del Grupo de Investigación de Evaluación y Restauración de Sistemas Agrícolas y Forestales (RNM360) de la Universidad de Córdoba, España. Para el estudio fueron utilizadas semillas certificadas de las especies de *Pinus patula* y *Pinus greggii* procedentes de México, suministradas por el Banco de Semillas del Centro de Genética Forestal de México (CNRGM) (Figura 2.1 y Tabla 2.1).

Las semillas utilizadas fueron previamente desinfectadas por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio NaClO al 5% y aclaradas posteriormente con agua corriente.

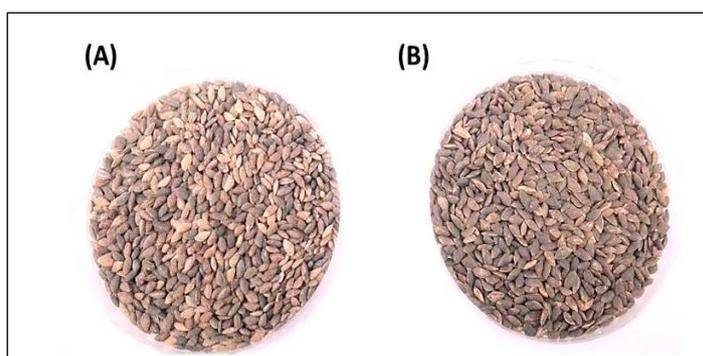


Figura 2.1. Material vegetal utilizado en el estudio. (A) Semillas de *P. patula*, (B). Semillas de *P. greggii*.

Tabla 2. 1. Características de las semillas de *P. patula* y *P. greggii* utilizadas en el trabajo.

Especie	Nombre común	Nº semillas/kg	Viabilidad de las semillas (años)	Humedad (%)	Germinación (%)	Tiempo de germinación (días)
<i>Pinus greggii</i> <i>Englem</i>	Pino greggii (palo prieto)	77,00	5	5 -7%	72-86%	12-15
<i>Pinus patula</i> <i>Schl. et Cham.</i>	Pino patula (pino llorón)	133,06	> 10	6-7%	85-87%	12-15

Fuente: (SIRE-Paquetes Tecnológicos, 2001)

2.2.2. Diseño experimental

Como todo experimento característico de proteómica se siguieron los siguientes pasos: muestreo, preparación del tejido, célula u orgánulo, extracción de proteínas,

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

separación de proteínas, análisis mediante espectrometría de masas, identificación de proteínas, análisis estadístico de los datos y finalmente la validación de los resultados (Zhang, *et al.*, 2013); (Figura 2.2).

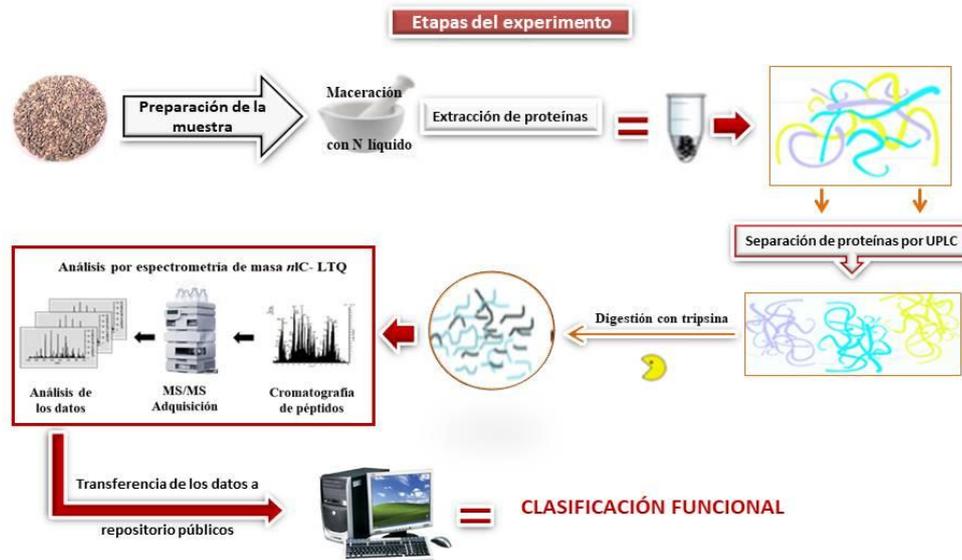


Figura 2.2. Etapas en un experimento de proteómica *shotgun*. i) Digestión de proteínas; ii) separación por UPLC; iii) Obtención de espectros de fragmentación MS/MS en el espectrómetro de masas nLC-LTQ-Orbitrap y v) Comparación en el motor de búsqueda de los espectros empíricos con espectros teóricos asignando una puntuación.

2.2.3. Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se realizó según la metodología del TCA/Fenol/Acetona, descrita por Wang *et al.*, (2006). Primero se maceraron en un mortero las semillas de *Pinus patula* y *Pinus greggii* con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se pesaron seis muestras de polvo (0,2 g) representando las tres réplicas biológicas utilizadas para cada una de las especies. El precipitado proteico obtenido con este protocolo se resuspendió en un medio de solubilización compuesto por urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS al 4% [p/v], Triton X-100 0,5% [v/v] y DTT 100 mM. La solución resultante se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos y por último se cuantificaron las proteínas por el método Bradford, utilizando albúmina sérica bovina (BSA) estándar para la curva patrón (Maldonado, *et al.*, 2008). Las proteínas extraídas fueron conservadas a -80°C hasta la electroforesis.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

2.2.4. Identificación de proteínas nLC-MS/MS.

2.2.4.1 Preparación de las muestras

La identificación de proteínas se realizó en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba. Las proteínas extraídas fueron separadas por cromatografía líquida en un Dionex Ultimate 3000 nano UPLC (Thermo Scientific) y posteriormente analizadas por espectrómetro de masa Thermo Orbitrap Fusion (Q-OT-qIT, Thermo Scientific) según la metodología descrita por Valledor, *et al.*, (2012). Los extractos de proteínas fueron purificados en un gel 1-D (SDS-PAGE) al 10% de poliacrilamida. Las muestras se cargaron en un gel concentrador mediante una corriente de 100 V hasta que el extracto de proteína alcanzó el gel de resolución y desplazado en su interior 1 cm. El gel resultante se tiñó con azul de Coomassie (Coomassie Blue). Las bandas de proteína obtenidas fueron cortadas en piezas y mantenidas en agua hasta su digestión.

2.2.4.2 Digestión de proteínas

Las piezas de gel se destiñeron con una solución de 200 mM de bicarbonato de amonio (AB) en acetonitrilo (ACN) al 50% durante 15 minutos, seguido de 5 minutos en ACN al 100%. Las proteínas contenidas en las piezas de gel fueron reducidas mediante la adición de 20 mM de ditioneol (DTT) en 25 mM AB incubándose durante 20 min a 55 °. Cuando la mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente, se le adicionó 40 mM de yodoacetamida en 25mM de AB y se dejó en oscuridad durante 20 min para la alquilación de tioles libres. Finalmente las piezas de gel fueron lavadas dos veces con 25 mM AB.

La digestión proteolítica se realizó con tripsina (Promega, Madison, WI) a una concentración de 12,5 ng / μ l en AB 25 mM, se incubó a 37 ° C durante una noche y se detuvo con la adición de ácido trifluoroacético (TFA) al 1% de concentración final. Por último las muestras digeridas fueron secadas al vacío en Speed-VacSpeedVac.

2.2.4.3 Análisis nLC- MS/MS

La mezcla de péptidos resultante de la digestión fue limpiada para eliminar las sales en una columna Acclaim Pepmap de 300 μ m de longitud x 5 mm de diámetro (Thermo Scientific) con (ACN) al 2% / TFA al 0,05% durante 5 min a 5 μ l / min. La separación de péptidos nLC se realizó con el equipo Dionex Ultimate 3000 nano UPLC (Thermo Scientific) con una columna analítica C18 75 μ m longitud x 50 mm diámetro

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

Acclaim Pepmam column (Thermo Scientific) a 40 ° C para todas las ejecuciones. La Fase móvil A estaba compuesta por ácido fórmico al 0,1% y la Fase móvil B por ACN al 20 % más ácido fórmico al 0,1%. En la elución se utilizaron los siguientes gradientes de 4-35% de fase B durante 60 minutos; 35-55% de B durante 3 minutos; 55-90% de B durante 3 minutos seguido de lavado de 8 minutos a 90% de B y un reequilibrio de 12 minutos a 4% de B. El tiempo total de cromatografía fue de 85 min.

Los péptidos resultantes de la elución fueron transformados en iones de fase gaseosa mediante ionización por electropulverización nanométrica y se analizaron en un espectrómetro de masas Thermo Orbitrap Fusion (Q-OT-qIT, Thermo Scientific) operado en modo positivo. Se realizaron barridos de estudio de precursores peptídicos en un rango 400 a 1500 m/z a una resolución de 120 K (a 200 m/z). La espectrometría de masa tándem (MS/MS), se realizó con un aislamiento a 1,2 Da con el cuadrupolo y la fragmentación, por el método de disociación inducida por colisión CID (collision-induced dissociation) normalizada de 35%. Apenas se muestrearon para MS/MS aquellos iones precursores con estado de carga entre 2-5. La duración de exclusión dinámica se estableció en 15 s con una tolerancia de 10 ppm alrededor del precursor seleccionado y sus isótopos. La fragmentación MS² se realizó para un máximo de 30 iones precursores con ciclos de 3 segundos.

Finalmente los espectros obtenidos del análisis de masas, fueron analizados con el software Proteome Discoverer v. 2.1.0.81 (Thermo Scientific) y el motor de búsqueda SEQUEST/ HT utilizando la base de datos específica para *Pinus sustainpine* v3 (http://www.scbi.uma.es/sustainpinedb/home_page). Esta base de datos fue generada a partir de predicciones génicas de la última versión de ensamblado del genoma específico de *Pinus pinaster*, extrayendo las proteínas a partir de la secuencias de transcritos, identificando el *frame* de lectura correcto y comparándolo con blastx sustainpine vs. Acrogymnospermae (ancestro), el cual se utilizó para traducir las secuencias que tenían homología. Aquellas secuencias que no fueron homologadas, se les tradujo los 6 frames conservando el frame de lectura mayor.

Los péptidos se generaron por digestión trípica teórica. Como modificaciones fijas se consideraron la carbamidometilación de cisteína, y como modificación variable la oxidación de metionina, tolerancia de error para iones precursor de 10 ppm e iones productos (fragmentados) de 0.1 Da. Las coincidencias espectrales de péptidos (PSM)

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

se validaron con Proteome Discoverer, usando un filtro basado en valores de un 1% de la tasa de falsos descubrimientos FDR (False Discovery Rate).

2.2.5. Clasificación funcional de las proteínas.

Las proteínas identificadas por análisis de nLC LTQ Orbitrap, fueron anotadas funcionalmente mediante el software Blast2GO (v.4. 1.9) (Conesa y Götz, 2008) contra la base de datos nr-NCBI (descargado el 18 de noviembre de 2017), conservando hasta 20 blast “hits” con un e-value umbral de $1e^{-5}$. Así mismo, se realizó anotación de dominios y rutas metabólicas explorando las bases de datos IPRScan y KEGGs (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). El algoritmo “Blast Description Annotator” se utilizó para asignar una descripción a cada secuencia. Para aquellas secuencias que permanecieron sin ningún tipo de información en esta fase (10 secuencias), se relajó el umbral a un e-value $1e^{-3}$ y se procedió a buscar similitud contra nt-NCBI (descargado el 15 de noviembre de 2017), con objeto de asignar una descripción a esas secuencias, aunque este resultado no se utilizó para anotar funcionalmente las mismas debido a su baja confianza.

La clasificación para los perfiles funcionales se realizó teniendo en cuenta los términos de la Gene Ontology (GO), teniendo en cuenta las tres categorías presentes: procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares.

2.2.6. Análisis estadístico

Se realizó un Análisis de Enriquecimiento Singular (SEA) para extraer los términos relevantes de GO asociados con los genes regulados por incremento. Este análisis consistió en clasificar a las proteínas identificadas en dos grupos, el primero formado por proteínas de interés y el segundo por el resto de las proteínas del experimento y compararlos con dos grupos formados aleatoriamente. Estos grupos se convierten en dos listas de anotaciones GO usando la correspondiente tabla de anotación de genes o proteínas. Una vez realizada las listas de anotaciones, se utiliza una prueba exacta de Fisher para tablas de contingencia 2×2 para verificar la sobrerrepresentación significativa de las anotaciones GO en uno de los conjuntos con respecto al otro. Se aplica una corrección de prueba múltiple para tener en cuenta las múltiples hipótesis probadas (una para cada término funcional). Los términos se consideran relevantes mediante la aplicación de pruebas estadísticas para un umbral mínimo de significación $FDR < 0,05$.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

2.3. Resultados

El análisis del perfil proteico de ambas especies de *Pinus* (*patula* y *greggii*) se realizó mediante la estrategia de “shotgun” (“gel-free”), por espectrometría de masas nLC-LTQ-Orbitrap XL. Se identificaron un total de 1091 proteínas: 629 en semillas de *P. patula* y 462 en *P. greggii*.

Una vez comparados los perfiles proteicos se identificaron 362 especies proteicas comunes en ambas especies de *Pinus*. En *P. greggii* se identificaron 100 proteínas ausentes en *P. patula* y en *P. patula* fueron identificadas 267 proteínas ausentes en *P. greggii* (Fig. 2.4 y Anexo 2).

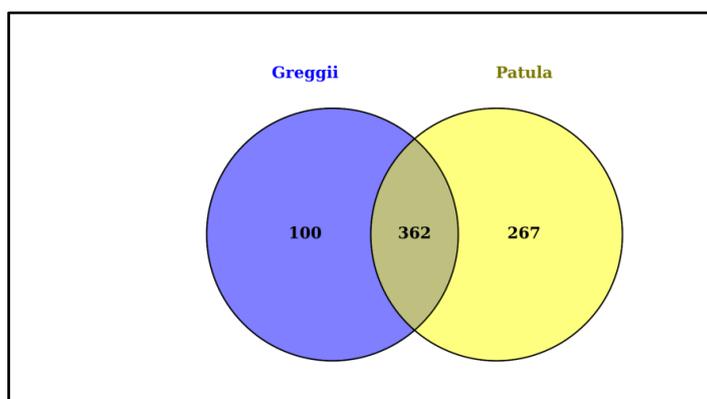


Figura 2.4. Diagrama de Venn ilustrando proteínas comunes y diferenciales identificadas en las semillas de *P. patula* y *P. greggii* por nLC LTQ Orbitrap utilizando el motor de búsqueda Sequest/HT. (<http://bioinfoqp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

La especie que más contribuyó en la anotación de las secuencias de las proteínas identificadas en el estudio fue *Picea sitchensis* y la especie del género *Pinus* que más contribuyó fue *Pinus pinaster* como aparece recogido en la Figura 2.5.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

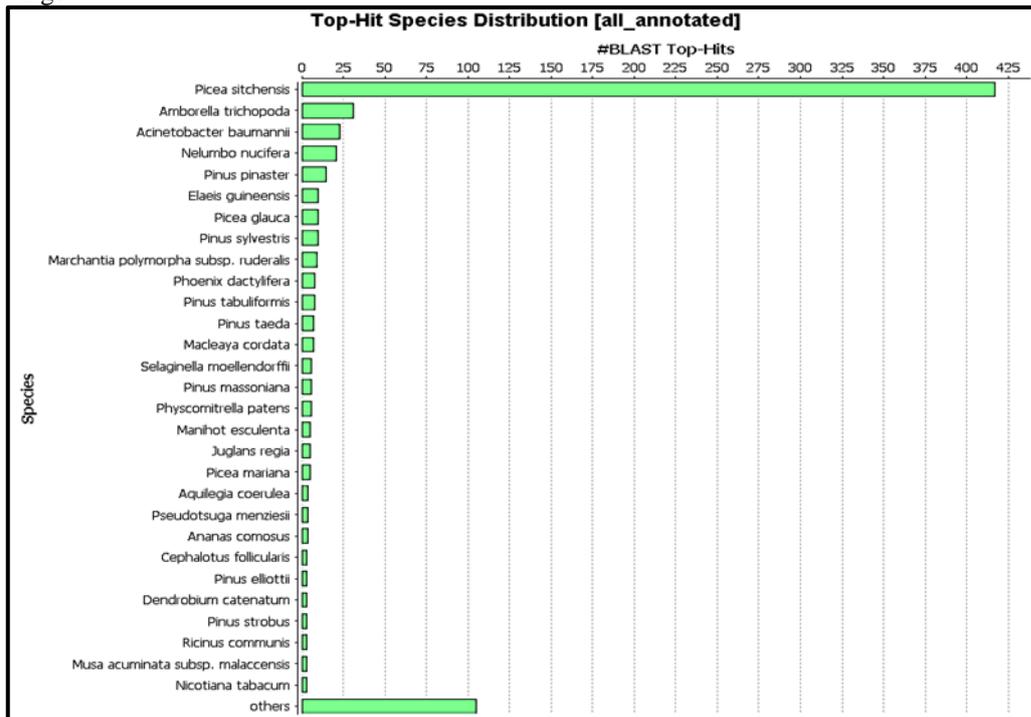


Figura 2.5. Distribución de las especies de mayor contribución en la anotación de las secuencias de las proteínas identificadas en el estudio. Gráfico generado mediante el software Blast2GO (v.4. 1.9) contra la base de datos nr-NCBI (descargado el 18 de noviembre de 2017), conservando hasta 20 blast “hits” con un e-value umbral de $1e^{-5}$.

Clasificación de los perfiles funcionales según los términos GO para los procesos biológico, componentes celulares y funciones moleculares

Procesos biológicos

El análisis comparativo de la distribución de proteínas entre especies en función del proceso biológico revela similitud entre las dos especies (Figura 3.6 y Anexo 3), con mayor predominancia de proteínas involucradas en los procesos de oxidación-reducción (78 y 104 proteínas en *P. greggii* y *P. patula* respectivamente), seguido de los procesos de metabolismo de ácido monocarboxílico, traducción, biogénesis ribosómica y catabolismo de sustancias orgánicas.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

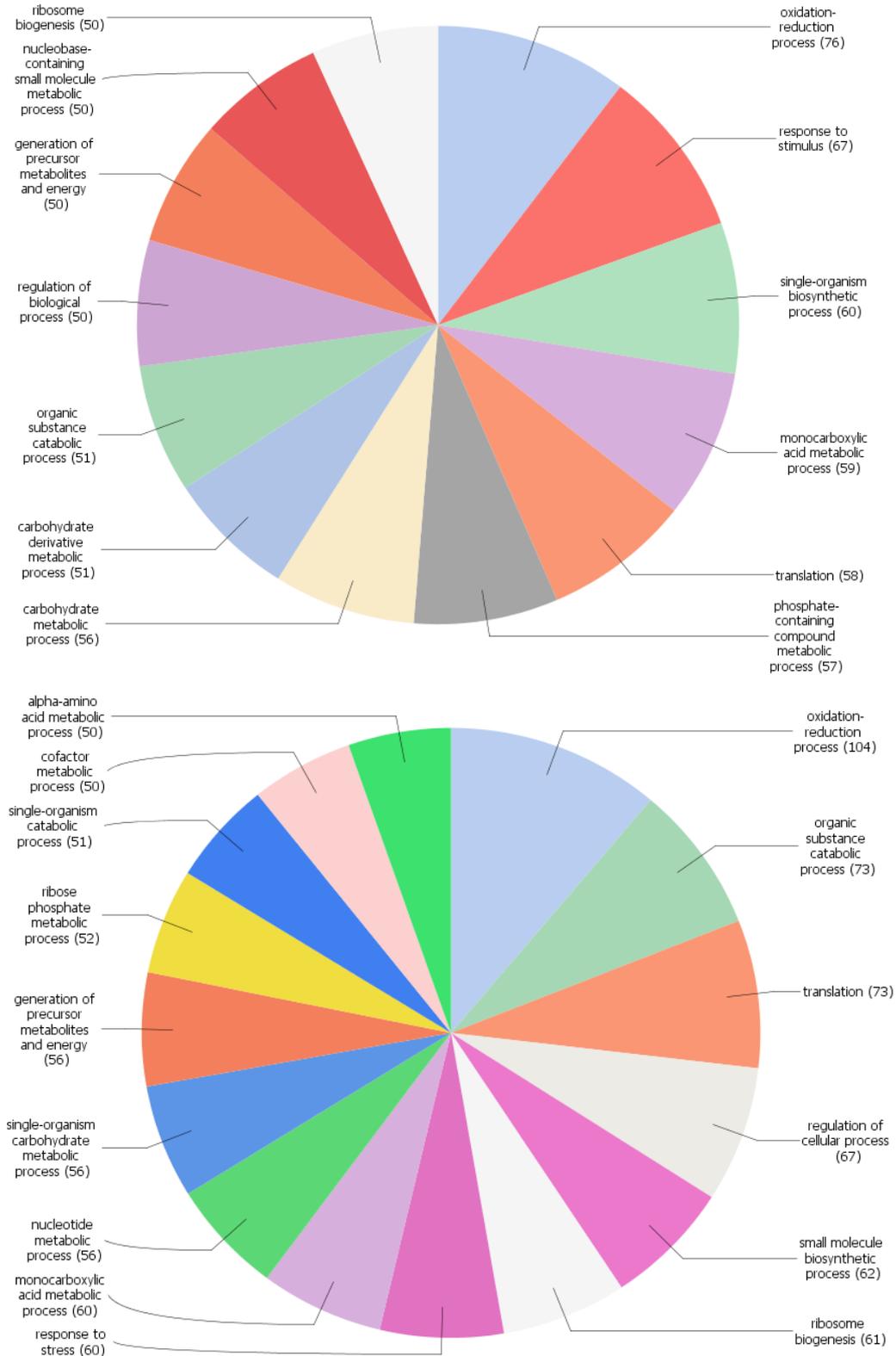
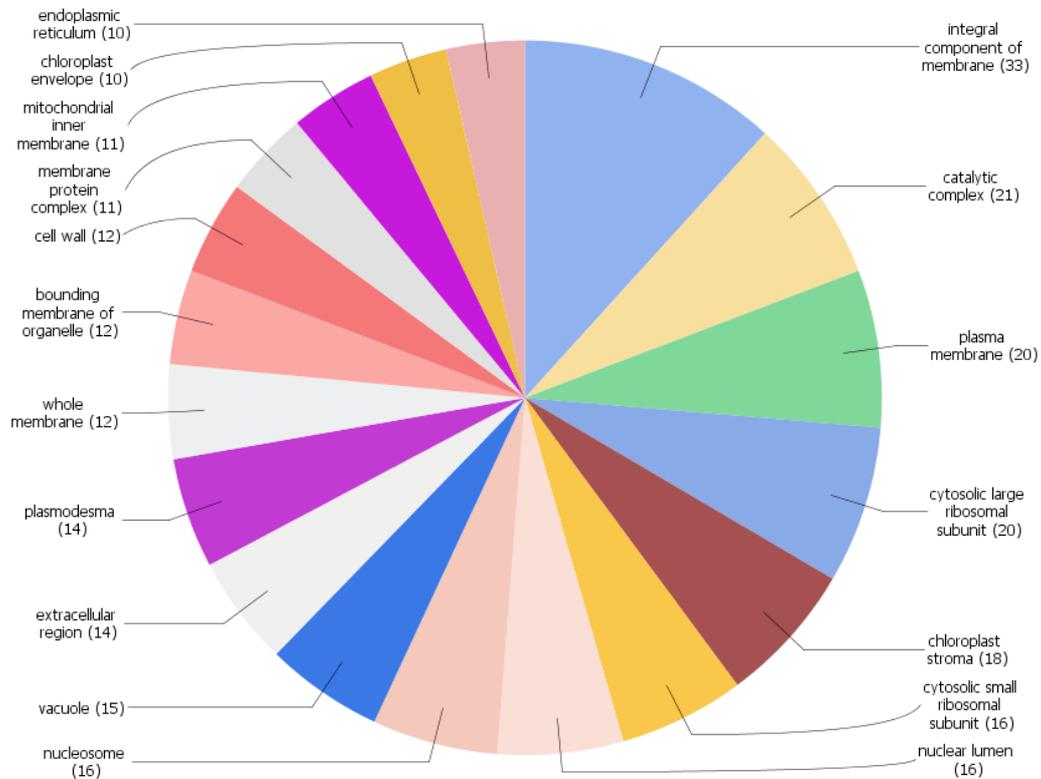


Figura 2.6. Representación gráfica de la distribución de proteínas por Proceso Biológico (BP) GO, presentes en las semillas de las dos especies estudiadas. (A) *Pinus greggii*, (B) *Pinus patula*. Se representan únicamente aquellos procesos en que participan un mínimo de 50 proteínas. Los números indican la cantidad de proteínas que participan en cada uno de los procesos representados.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

Componentes celulares

Cuando se analizó la distribución de proteínas entre los distintos componentes celulares, se verificó que en ambas especies predominan las proteínas integrales o intrínsecas de membrana (33 y 40 en *Pinus greggii* y *Pinus patula* respectivamente) (Figura 2.7). Estas proteínas están relacionadas con funciones celulares como el transporte y la expresión génica. Además, predominan las proteínas localizadas en los ribosomas, plasmodesmos y nucleosoma. En el caso particular del nucleosoma es posible verificar que el número de proteínas localizadas en esta estructura en ambas especies coincide (16).



Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

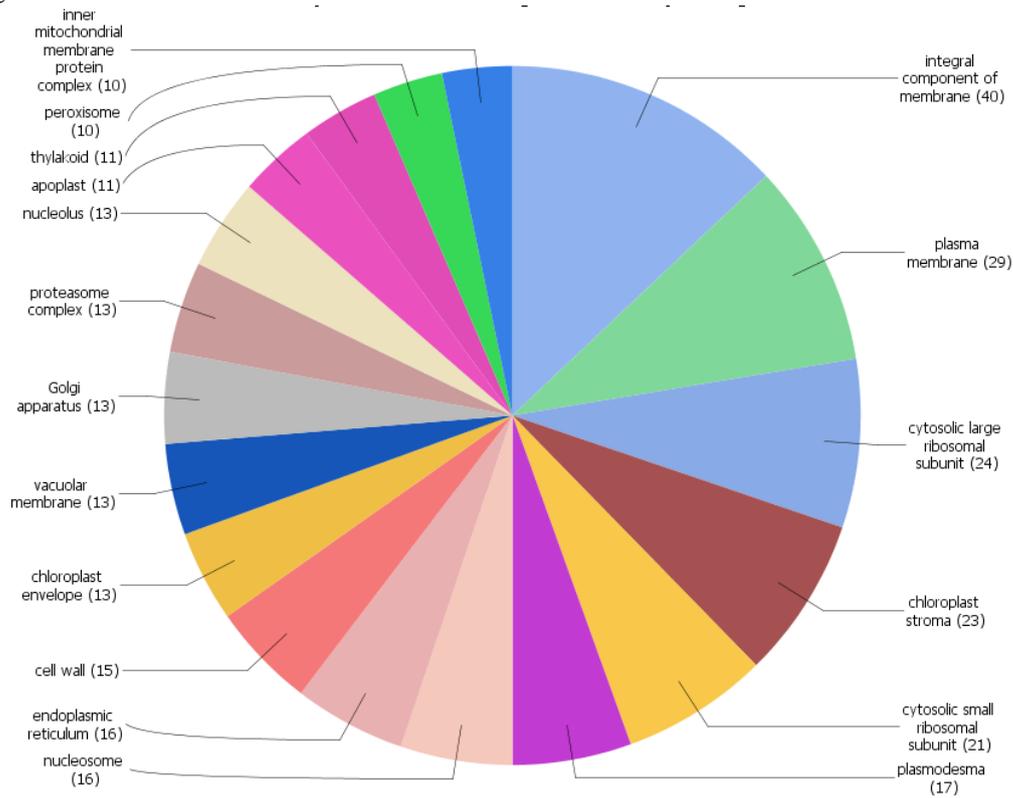


Figura 2.7. Representación gráfica de la distribución de proteínas teniendo en cuenta su localización en componentes celulares (CC) GO, en las semillas de las dos especies estudiadas. (A) *Pinus greggii*, (B) *Pinus patula*. Se representan únicamente aquellos procesos en que participan un mínimo de 10 proteínas. Los números indican la cantidad de proteínas presente en cada componente celular.

Funciones moleculares

En relación a la distribución de proteínas con base en la función molecular, la función en la que participan un mayor número de proteínas en ambas especies es la síntesis de ATP, con 48 y 62 proteínas en *P. greggii* y *P. patula* respectivamente, seguida de la constitución estructural del ribosoma con 48 y 59 proteínas respectivamente (Figura 2.8).

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

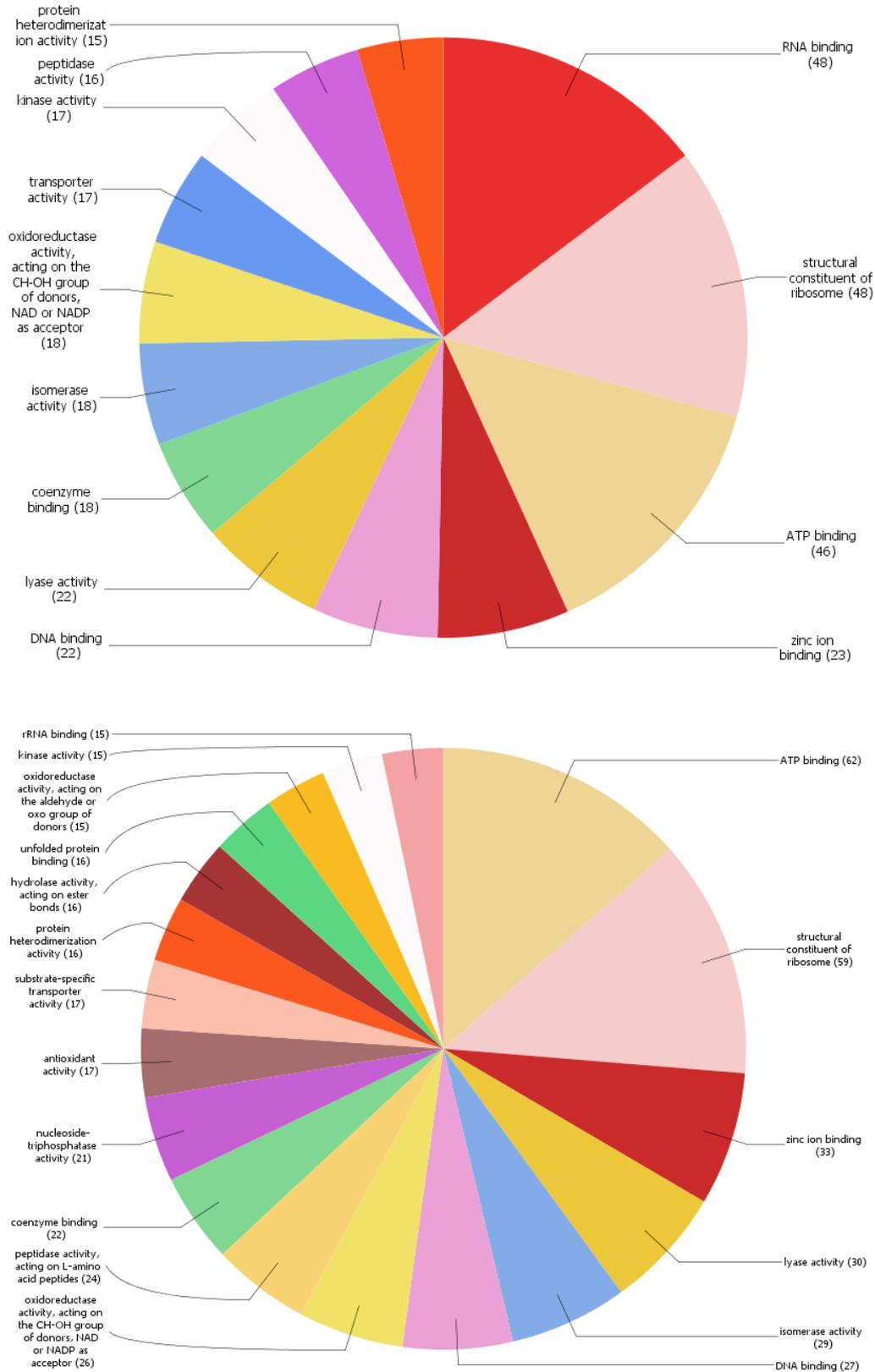


Figura 2.8. Representación gráfica de la distribución de proteínas por Función Molecular (FM) GO, en las semillas de las dos especies estudiadas. (A) *Pinus greggii*, (B) *Pinus patula*. Se representan únicamente aquellas funciones en que participan un mínimo de 15 proteínas. Los números indican la cantidad de proteínas que participan en cada una de las funciones moleculares datos para un umbral de significación FDR < 0.05.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

De forma general los resultados referentes al análisis de los perfiles funcionales para estas dos especies indican que no se detecta enriquecimiento en ningún término GO (procesos biológicos, componentes celulares y función molecular), con una significación $FDR < 0.05$; ya que la mayoría de estos términos tuvieron una representación similar en las dos especies.

Clasificación funcional de las proteínas explorando la base de datos KEGGs

Los resultados de la clasificación funcional de proteínas en la base de datos KEGGs muestran que las proteínas identificadas en el estudio participan en un total de 99 rutas metabólicas entre las dos especies, 90 en *P. greggii* y 99 en *P. patula*. (Anexo 2.4).

Al realizar una aproximación comparativa, sobre las rutas metabólicas identificadas en *P. greggii* en comparación con *P. patula*, se identificaron 9 vías expresadas en *P. patula* que están ausentes en *P. greggii*: metabolismo de biotina, metabolismo de lípidos, biosíntesis de flavonoides, metabolismo de glicerofosfolípidos, metabolismo de ácido linoleico, sistema de señalización de fosfatidilinositol, porfirina y metabolismo de clorofila, metabolismo de riboflavina y biosíntesis de estreptomicina (Anexo 2.4).

Las rutas metabólicas en las que se identificaron mayor número de proteínas involucradas tanto en la especie *P. greggii* como en *P. patula* fueron la vía de la glucólisis/gluconeogénesis, de la biosíntesis de antibióticos, biosíntesis de ácidos grasos en el metabolismo de lípidos, metabolismo del piruvato, metabolismo de nucleótidos, fijación de carbono en organismos fotosintéticos y fosforilación oxidativa.

Una vez evaluadas las rutas metabólicas más representativas, en este trabajo nos vamos a centrar en el análisis de la ruta de la glucólisis/gluconeogénesis, porque, a pesar de ser una ruta mayoritaria, es una de las más importantes en semillas ya que representa una vía indispensable para mantener el equilibrio de los niveles celulares de ATP y el metabolismo de los carbohidratos (Chen, *et al.*, 2016); tan importante en las semillas de las plantas superiores, ya que el almidón constituye el principal carbohidrato de almacenamiento (Bernal y Barajas, 2006; Duan, *et al.*, 2016; Li, *et al.*, 2017); (Tabla 2.3 y Figura 2.9).

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

Tabla 2.3. Proteínas que participan en la ruta metabólica glucólisis/gluconeogénesis expresadas en las semillas de *P. greggii* y *P. patula*.

Accession Numbers ^a	Description ^b	MW [kDa]		Coverage (%)	# Unique Peptides	Comunes	Pinus Greggii	Pinus Patula
		calc ^c	pI ^d					
1032	ATP-dependent 6-phosphofructokinase 2	52	7	5	1		X	
10495	phosphoglycerate chloroplastic	53	9	4	1	X		
10634	phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP]-like	73	7	4	2			X
1069	dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component 2 of pyruvate dehydrogenase mitochondrial-like	62	9	3	1		X	
11278	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating] mitochondrial	60	7	2	1			X
126671	enolase	48	6	29	7	X		
126855	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cytosolic	39	8	62	15	X		
127205	alcohol	51	8	15	1			
12998	pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha	67	7	3	1			X
13226	betaine aldehyde dehydrogenase chloroplastic	27	5	6	1			X
16504	pyruvate cytosolic isozyme	57	8	5	2	X		
16934	fructose-bisphosphate cytoplasmic isozyme 1	42	9	24	5	X		
17023	fructose-bisphosphate aldolase chloroplastic	49	8	5	2	X		
17064	fructose-bisphosphate aldolase cytosolic	44	8	52	15	X		
17080	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta-mitochondrial	41	5	7	1			X

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

Accession Numbers ^a	Description ^b	MW [kDa]		Coverage (%)	# Unique Peptides	Comunes	Pinus Greggii	Pinus Patula
		calc ^c	pI ^d					
17339	alcohol	50	8	22	2			X
18066	phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP]-like	49	9	4	1			X
18227	glucose-6-phosphate isomerase chloroplastic	71	6	12	5	X		
18273	glucose-6-phosphate cytosolic	68	7	7	3	X		
1839	alcohol	41	6	11	1			X
20329	aldehyde dehydrogenase family 2 member mitochondrial	63	8	20	6	X		
2037	glyceraldehyde-3-phosphate cytosolic-like	40	7	51	1		X	
20710	cytosolic triosephosphate isomerase	27	5	30	7		X	
208477	alcohol dehydrogenase class-3	51	8	23	5			X
21225	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cytosolic	40	7	36	1		X	
22555	enolase	48	6	45	1		X	
2308	betaine aldehyde dehydrogenase mitochondrial	59	6	2	1	X		
23105	phosphoglycerate kinase	52	7	20	1		X	
2317	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha-mitochondrial	44	8	3	1	X		
3137	Dihydrolipoyl dehydrogenase mitochondrial	54	8	16	6	X		
3418	aldose reductase	39	7	44	16	X		
37838	phosphoglycerate kinase	44	8	16	7	X		
4123	dihydrolipoyl dehydrogenase	61	7	2	1	X		

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

Accession Numbers ^a	Description ^b	MW [kDa]		Coverage (%)	# Unique Peptides	Comunes	Pinus Greggii	Pinus Patula
		calc ^c	pI ^d					
	chloroplastic							
41574	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	54	7	7	2	X		
44645	aldehyde dehydrogenase family 2 member mitochondrial-like	59	7	8	3	X		
72	pyruvate decarboxylase 2	66	6	5	1			X
782	alcohol	48	8	25	3	X		
893	aldehyde dehydrogenase	47	8	17	4	X		
9616	pyruvate decarboxylase 2	67	6	7	1	X		

^aPinus_DB *Pinus* sustainpine v3.

^bBlast Description Annotator

^cMolecular weight (kDa) and isoelectric point of protein calculated for each database.

^dMolecular weight (kDa) and isoelectric point of protein calculated by using molecular weight standards

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

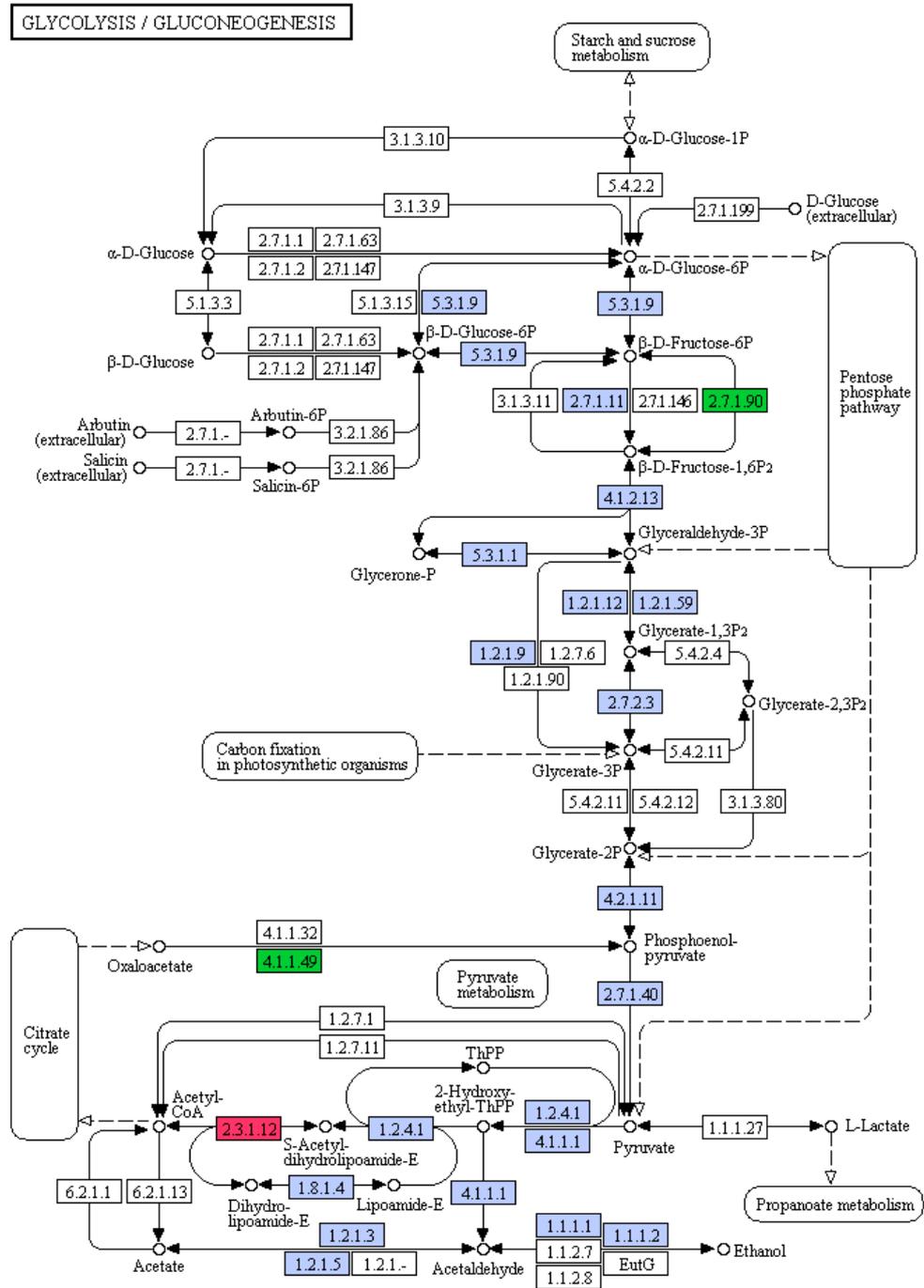


Figura 2.9. Representación gráfica de la vía metabólica glucólisis/gluconeogénesis KEGGs, en las semillas de las dos especies. Se representan con colores las enzimas identificadas que participan en esta ruta. El color azul representa las enzimas comunes en las dos especies, el color rojo representa las enzimas identificadas apenas en *P. greggii* y el verde representa las identificadas solamente en la especie *P. patula*.

Del total de 24 enzimas involucradas en la presente ruta metabólica, 21 son comunes en ambas especies, 1 fue identificada exclusivamente en *P. greggii* y 2 únicamente en *P. patula*.

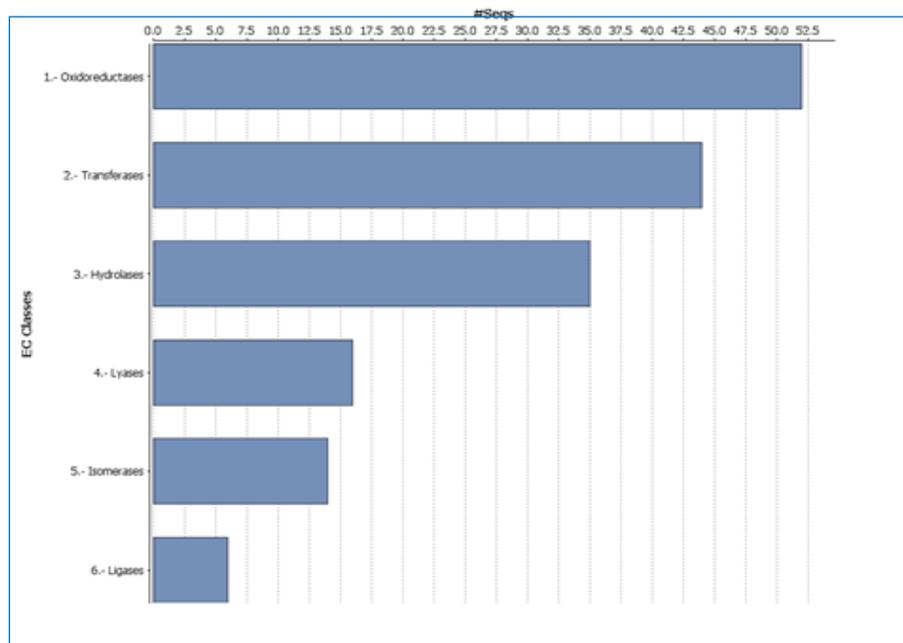
Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

La enzima diferencial expresada en *P. greggii*, fue la acetyltransferase (EC 2.3.1.12). Esta enzima cataliza la transferencia del grupo acetil para dar el acetil-CoA.

En el caso de *P. patula* las dos enzimas diferenciales expresadas fueron la diphosphate-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase (EC 2.7.1.90) y la Fosfoenolpiruvato carboxikinasa ATP (EC 4.1.1.49). La primera cataliza la interconversión reversible entre fructosa-6-fosfato y fructosa-1, 6-bisfosfato, que constituye un paso limitante en la regulación del flujo metabólico primario de carbohidratos hacia la glucólisis o gluconeogénesis y la segunda cataliza la conversión de ATP y oxaloacetato en ADP, fosfoenolpiruvato y dióxido de carbono.

De forma general se identificó una sobreexpresión de las enzimas oxidoreductasa (Figura 2.10). Éstas están básicamente relacionadas con las reacciones de óxido-reducción, lo que concuerda con los resultados obtenidos para los procesos biológicos (GO) anteriormente presentados en los que existía una mayor participación de proteínas en los procesos de oxidación-reducción. Seguida de las oxidoreductasa, en la especie *P. greggii*, aparecen la enzima transferasa. Sin embargo, en la especie *P. patula* no ocurre lo mismo, ya que las hidrolasas están más representadas en comparación con las transferasas. Merece destacarse que estas diferencias para el caso de las enzimas tranferasas en las dos especies (*P. greggii* y *P. patula*) fue similar (44 y 45 secuencias respectivamente) (Figura 2.10).

(A)



Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

(B)

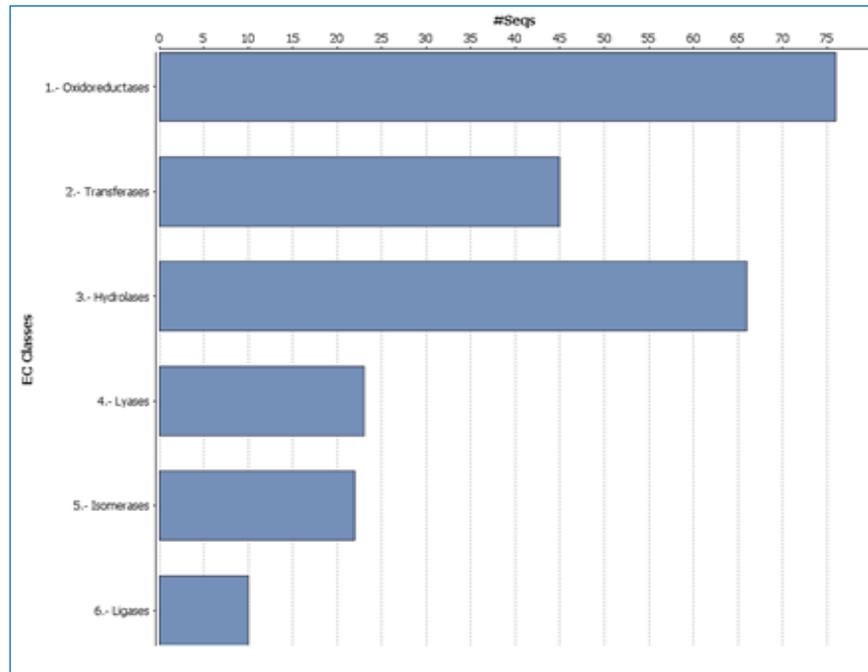


Figura 2.10. Representación gráfica de las enzimas EC (enzyme commission) identificada según sus funciones catalíticas en las dos especies. (A) *Pinus greggii*, (B) *Pinus patula*.

2.4 Discusión

Según García, *et al.*, (2012) el estudio de las proteínas expresadas diferencialmente en los perfiles proteicos de muestras biológicas vegetales nos ofrece la oportunidad de examinar los cambios globales en la expresión génica y patrones temporales de la acumulación de proteínas que ocurren en diferentes procesos vegetales, permitiéndonos la comprensión de su desarrollo y adaptabilidad.

En este trabajo el análisis del perfil proteico se basó en la proteómica *shotgun*, considerada por muchos investigadores (Zhang, *et al.*, 2013; Zhang, *et al.*, 2014; Erickson, *et al.*, 2015; Soufi y Soufi, 2016) como una herramienta útil y efectiva en la mayoría de los estudios proteómicos enfocados a obtener un alto rendimiento. Esto se debe en gran parte a las mejoras tecnológicas realizadas en los espectrómetros de masas de alto rendimiento (Orbitrap Fusion), superando de este modo a las técnicas basadas en gel, en rapidez, sensibilidad, reproducibilidad y aplicabilidad a diferentes muestras y condiciones (Lindemann, *et al.*, 2017).

Cabe destacar que en esta estrategia, la sensibilidad de la identificación de péptidos se ve afectada por el tamaño del espacio de búsqueda. Algunos autores como Romero-Rodríguez, *et al.*, (2014) y Shanmugam y Nesvizhskii, (2015) recomiendan el uso de bases de datos de secuencias específicas con el fin de mejorar la sensibilidad de la identificación de los péptidos en trabajos con especies no modelo. En este caso fue utilizada una base de datos de secuencias específicas para el género en estudio *Pinus sustainpine* v3 generada a partir de predicciones génicas de la última versión de ensamblado del genoma específico *Pinus pinaster*.

El hecho de que una especie contribuya en mayor o menor grado en la anotación proteica de otra no significa que sea la especie más similar, ya que esta contribución está influenciada por dos factores; primero el grado de similitud entre ellas y segundo la cantidad de información disponible de esta especie en las bases de datos. En este estudio, la especie de mayor contribución fue *Picea sitchensis*, especie muy estudiada genómicamente (Ralph, *et al.*, 2008; Philippe, *et al.*, 2009; Hall, *et al.*, 2012; Keeling, *et al.*, 2011; Nystedt *et al.*, 2013; Rudolph *et al.*, 2016; Holliday *et al.*, 2017) de la que existe mucha información disponible en las bases de datos. El otro de los factores que pudo influir es el hecho de que esta especie pertenece al género *Picea* muy

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

cercano a *Pinus* y ambos géneros forman parte de la familia Pinaceae (Arzate-Fernández, *et al.*, 2016) Otros autores que confirman esta estrecha relación son Nystedt, *et al.*, (2013), que estudiando la secuenciación comparativa con especies miembros de la familia Pinaceae revelaron que la diversidad de elementos transponibles se comparte entre ellas. Sin embargo, esta teoría se contradice con lo encontrado por otros autores como Kovacevic, *et al.*, (2013), que en un estudio comparativo entre diez especies diferentes de la familia Pinaceae a través de marcadores de ADN polimórficos amplificados aleatoriamente (RAPD), concluyen que el género *Picea* está claramente separado del género *Pinus* e incluso está más cerca del género *Abies*.

Trabajos realizados corroboran que la variabilidad genética dentro y entre poblaciones puede ser validada por estudios de proteómica de expresión diferencial, teniendo en cuenta los marcadores genéticos (moleculares o fisiológicos), pudiendo permitir el establecimiento de distancias genéticas y relaciones filogenéticas entre individuos o líneas, especies y géneros (Salvato y Carvalho, 2010; Cipriano *et al.*, 2013; Kovacevic *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013, Arzate-Fernández, *et al.*, 2016; Trontin *et al.*, 2016; Aguirre-Limón *et al.*, 2017).

Con respecto a los procesos biológicos, el proceso con mayor número de proteínas expresadas en las dos especies de *Pinus* analizadas fue el de oxidación-reducción. Resultados similares fueron obtenidos por Rodríguez de Francisco *et al.*, (2016), que estudiando el perfil proteómico en semillas de *Pinus occidentalis* mediante la estrategia de *shotgun* también identificó como grupo predominante las proteínas relacionadas con los procesos oxidación-reducción. Pullman, *et al.*, (2015) en su reciente estudio sobre coníferas, han demostrado que los procesos de oxidación-reducción pueden mejorar la iniciación del tejido embriogénico (TE), el desarrollo embrionario en etapa temprana y de la germinación en estas especies.

En el caso del componente celular, donde mayor cantidad de proteínas se localizaron fue en la membrana celular tanto en *P. patula* como en *P. greggii*. Esto puede deberse a que la membrana celular está involucrada directamente en el proceso de germinación, durante el cual experimenta una reorganización específica y funcional participando de forma activa en la imbibición de agua por parte de la semilla (Voegelé, *et al.*, 2011; Rosental, *et al.*, 2014; Yu, *et al.*, 2015).

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

Con respecto a las funciones moleculares se identificó para las dos especies en estudio una sobreexpresión de proteínas en la síntesis de ATP. Esta energía es resultado de la degradación de las sustancias de reservas encontradas en las semillas, incluidos el almidón, las proteínas y los aceites, donde se produce la energía necesaria para la germinación de semillas (Ma *et al.*, 2016).

De forma general se observó que las proteínas sobreexpresadas para las tres categorías GO en semillas de estas dos especies de *Pinus* están involucradas en el almacenamiento, metabolismos de los carbohidratos y síntesis de energía, asociados a la preparación de la semilla para la germinación. Estos resultados también coinciden con los obtenidos por Zhang, *et al.*, (2015) en las semillas de álamo (*Populus × canadensis* Moench); en este caso, se identificó una sobreexpresión en las proteínas involucradas en el metabolismo, síntesis de energía y almacenamiento. Morel, *et al.*, (2014), analizando el proteoma de embriones somáticos de *Pinus pinaster* también encontraron que las proteínas altamente expresadas incluían a las de almacenamiento, embriogénesis, proteínas del metabolismo energético y las relacionadas con el estrés. En este mismo sentido He, *et al.*, (2015) en un análisis comparativo del proteoma de embriones y endosperma de semillas de trigo (*Triticum aestivum*) revelan que las proteínas sobre expresadas estaban relacionadas particularmente con las proteínas de reservas necesarias para la movilización y preparación de la de la semilla durante la germinación.

En este trabajo, el resultado del análisis de expresión diferencial mostró una elevada similitud entre los perfiles proteicos de las dos especies de pinos estudiadas. Esta similitud, sugiere que existe poca variabilidad genética entre ellas. Sin embargo, estas especies sí son diferentes desde el punto de vista morfológico, lo que coincide con los estudios realizados en coníferas mexicanas específicamente en el género *Pinus* por Moreno y Piñero, (2009) y Gernandt y Pérez de la Rosa, (2014). Estos autores encontraron altos niveles de variabilidad en su morfología y bajos niveles de diferenciación interespecífica, pudiendo ser resultado de las bajas tasas de evolución entre las especies en este género.

Estos resultados también están validados por estudios previos realizados por William (2008) sobre distancias genéticas entre especies de pino en México y Centroamérica basadas en análisis de RAPD, en los que se detectó muy poca distancia genética entre *P. greggii* y *P. patula*. Así mismo, coinciden con resultados encontrados

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

por autores como Lee *et al.*, (2011) y Gernandt y Pérez de la Rosa, (2014) sobre el análisis filogenético molecular (análisis de secuencias de ADN) en coníferas, que concluyen que se trata de un grupo monofilético que desciende de un mismo antepasado común hace más de 300 millones de años.

Es bien conocido que las proteínas son elementos vitales de los organismos vivos y que son componentes principales de las rutas metabólicas de las células, ya que la mayor parte de las proteínas son enzimas, cuya función es servir como catalizador para la mayoría de procesos bioquímicos celulares.

De las 99 rutas metabólicas en las que participan proteínas identificadas en las muestras analizadas de *P. patula* y *P. greggii*, fue escogida la ruta de la glucólisis/gluconeogénesis para su estudio por ser una de las rutas con mayor sobreexpresión de proteínas y por su importancia a nivel metabólico.

La *glucólisis* es una vía catabólica en la que ocurre una secuencia de reacciones de forma que la glucosa se descompone en dos moléculas de ácido pirúvico en condiciones aeróbicas, o lactato en condiciones anaeróbicas. La oxidación completa de la glucosa puede involucrar tres vías bioquímicas fundamentales. La primera es la vía glucolítica; la segunda es el ciclo de Krebs (también llamado ciclo de ácido cítrico o ciclo de ácido tricarboxílico), y la fosforilación oxidativa. Por el contrario la *gluconeogénesis* es la ruta anabólica por la cual los precursores no azúcares (lactato, piruvato, propionato, glicerol y aminoácidos) se convierten en glucosa. (Mathews *et al.*, 2002).

La ruta glucólisis/gluconeogénesis es una vía indispensable para mantener el equilibrio de los niveles celulares de ATP y el metabolismo de los carbohidratos (Chen *et al.*, 2016) y el almidón, constituye el principal carbohidrato de almacenamiento en las semillas de las plantas superiores (Bernal y Barajas 2006; Duan *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017). Es lógico, por tanto, esta sobreexpresión de proteínas en las muestras analizadas participando en esta ruta en la cual, a través de la degradación de las reservas de almacenamiento, incluidos el almidón, las proteínas y los aceites, se produce la energía necesaria para la germinación (Rosental, *et al.*, 2014).

En concreto, en los resultados descritos se expresaron 21 enzimas comunes involucradas en esta ruta. Estos resultados están en sintonía con los obtenidos por Zhang, *et al.*, (2017) que, en un trabajo con pepino (*Cucumis sativus*), también, al

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

analizar el proteoma de semilla, también identificaron 21 enzimas involucradas en esta ruta metabólica.

En nuestro trabajo, además se expresaron 3 enzimas diferenciales. La enzima EC 2.3.1.12 que se expresó apenas en las semillas de *P. greggii*. Esta enzima forma parte del complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa (PDC) de la matriz mitocondrial, que cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato para producir acetil-CoA y NADH, ocurriendo en una única dirección, en la que el grupo acetilo se pasa a la coenzima A, que constituye un compuesto clave entre la glucólisis y el ciclo de Krebs (Tovar-Méndez, *et al.*, 2003). A pesar de que algunos trabajos sobre el genoma de *Arabidopsis thaliana* identifican esta enzima en todos los órganos de la planta (Broz, *et al.*, 2014), otros autores como Behal, *et al.*, (2002) correlacionaron la expresión del PDC con la acumulación de lípidos en las semillas, relevantes para la reorganización del metabolismo de las semillas proporcionando energía y carbono para el crecimiento del embrión y la protrusión de la radícula (Rosental, *et al.*, 2014).

Las dos enzimas identificadas de forma diferencial en las semillas de *P. patula*, fueron EC 2.7.1.90 y EC 4.1.1.49. La primera (EC 2.7.1.90) cataliza la interconversión reversible entre fructosa-6-fosfato y fructosa-1, 6-bisfosfato. Esta actividad enzimática es similar a la que realiza la enzima EC 2.7.1.11, que es común en las dos especies y que también está expresada en esta ruta (Duan, *et al.*, 2016). La segunda proteína presente solo en *P. patula* (EC 4.1.1.49) cataliza el primer paso de la ruta de la gluconeogénesis, convirtiendo el oxaloacetato a fosfoenolpiruvato. Estos resultados sugieren que la especie *P. patula* podría iniciar la gluconeogénesis utilizando como sustrato tanto al oxaloacetato como al piruvato, mientras que la especie *P.greggii* apenas podría utilizar como sustrato al piruvato, lo que es posible ya que la gluconeogénesis puede utilizar varios sustratos como el lactato, piruvato y oxoacetato (Berg, *et al.*, 2002).

Estudios realizados sobre los perfiles electroforéticos de las proteínas de las semillas de especies de *Pinus* mexicanos por Almaraz, (2002) revelaron que las semillas de las especies analizadas presentaron una diversa gama de proteínas que podrían estar asociadas a las variadas funciones metabólicas que ocurren durante la germinación y que son relativamente ricas en proteínas de almacenamiento. Estas proteínas de almacenamiento se sintetizan durante la última etapa del desarrollo de la semilla y se

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

depositan en vacuolas de almacenamiento de proteínas en semillas maduras (Bewley, *et al.*, 2013). Estos resultados se corresponden con los obtenidos en las muestras analizadas, ya que , la mayor parte de las proteínas identificadas están involucradas en la ruta de la glucólisis/gluconeogénesis, responsable de la obtención de energía que se utiliza durante el proceso de germinación. Por su parte Zhang, *et al.*, (2017) en trabajos realizados con semillas de arroz identificaron también un aumento de la actividad enzimática en varias rutas metabólicas como la glucólisis durante el proceso de germinación de las semillas.

Con respecto a los resultados sobre las funciones catalíticas de las enzimas identificadas en las semillas de las dos especies estudiadas, los resultados encontrados indican una sobreexpresión de las enzimas oxidorreductasas. Esto coincide con los resultados anteriormente descritos para los procesos biológicos GO, que sitúan a los procesos redox como mayoritarios en cuanto al número de proteínas involucradas, seguidas de la clase de las transferasas en *P. Greggii* y las hidrolasas en *P. patula*. Según el Comité de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología molecular (IUBMB) para la clasificación general de las enzimas, las hidrolasas son una clase especial de las transferasas donde el agua sirve como aceptor del grupo transferido (Castillo, 2015). También trabajos realizados por Light, *et al.*, (2017) indican la existencia de una flexibilidad en la especificidad de las reacciones que catalizan estas dos enzimas.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga- Huambo, Angola.

2.5 Conclusiones

En el estudio del análisis del perfil proteico de semillas de las especies *P.patula* y *P. greggii* a través de la estrategia shotgun (“gel-free”) usando espectrometría de masas nLC-LTQ-Orbitrap XL se identificaron 462 especies proteicas en *P. greggii* y 629 en semillas de *P. patula*. De este total 362 especies proteicas son comunes a ambas especies.

No se detectó enriquecimiento en ninguna de las categorías (procesos biológicos, componentes celulares y función molecular) de la base de datos Gene Ontology (GO).

Para el caso de los procesos biológicos se identificó 76 y 104 proteínas en *P. greggii* y *P. patula* respectivamente asociadas a los procesos de oxidación – reducción.

La función molecular con mayor sobreexpresión de proteínas fue la síntesis de ATP con 48 en *P. greggii* y 62 proteínas en *P. patula* respectivamente y su localización mayoritaria a nivel celular fue en la membrana 33 y 40 en *P. greggii* y *P. patula* respectivamente.

La ruta metabólica con mayor participación de proteínas (22 en *P. greggii* y 23 en *P. patula* respectivamente) fue la vía de la glucólisis/gluconeógenesis.

Las enzimas de mayor abundancia fueron las oxidoreductasa, asociada a los procesos redox con 52 y 75 secuencias en *P. patula* y *P. greggii* respectivamente.

De modo general se concluye que los perfiles proteicos analizados de *P. patula* y *P. greggii* son muy similares, demostrando poca variabilidad genética entre estas dos especies de *Pinus*. Las proteínas mayoritariamente identificadas están asociadas a los procesos metabólicos previos a la germinación.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

Capítulo 3. Comportamiento fisiológico y molecular de *Pinus patula* Schl et Cham. y *Pinus greggii* Engelm bajo dos tratamientos de simulación de condiciones naturales de crecimiento de la Meseta Central de Angola (época seca y época de lluvia)

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

Resumen

Angola cuenta con 148.000 ha de plantaciones forestales de especies exóticas con un volumen comercial estimado en 17.453.000 m³ lo que podría contribuir al desarrollo de la economía del país, a través de una gestión adecuada, desde la producción y selección de planta forestal de calidad en vivero. Este estudio se realizó con el objetivo de comparar la respuesta fisiológica y molecular de dos especies de pinos (*Pinus patula* y *Pinus greggii*) utilizadas de forma generalizada en Angola simulando las dos condiciones climáticas (época seca y lluviosa) de la Meseta Central de Angola. Fue montado un ensayo en cámaras de crecimiento, evaluando la supervivencia, crecimiento, fotosíntesis, y nivel de expresión de proteínas. La simulación de las condiciones de sequía por la interrupción del riego durante 42 días condujo a la muerte de las plantas hasta 60% y 62,5% de mortalidad en *P. greggii* y *P. patula* respectivamente, también se observó una disminución en el crecimiento, la eficiencia fotoquímica y el potencial hídrico encontrándose diferencias significativas entre las épocas, tiempo de exposición a la sequía y las especies. La expresión diferencial de proteínas fue mayoritaria en la simulación de la época seca y en la especie *P. greggii*. El análisis de Ontología de genes (GO) indicó que la mayoría de las proteínas expresadas diferencialmente estaban reguladas por aumento en los procesos relacionados con el metabolismo, biosíntesis, organización celular, estímulos abióticos y expresión génica, mientras que las proteínas reguladas por disminución en las plántulas estresadas estaban relacionadas con el proceso de fotosíntesis y crecimiento. Los resultados demuestran que las plántulas de *P. greggii* fueron más tolerantes a la sequía que las plántulas de *P. patula*, este conocimiento puede ayudar en el desarrollo de estrategias en los programas de repoblación forestal del sur de Angola.

Palabras-claves: *Pinus patula*, *Pinus greggii*, época seca, época lluviosa, expresión diferencial.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

3.1. Introducción

La economía de Angola en los últimos años se ha concentrado casi exclusivamente en la industria petrolífera, representando el 45% del PIB en el año 2013 (Secretaría de Estado y Comercio, 2016), por lo que resulta de vital importancia la adopción de estrategias que permitan la diversificación económica del país. Actualmente el gobierno de Angola reconoce en su documento sobre la Estrategia de Combate al hambre y la pobreza, la importancia del sector forestal en el proceso de desarrollo socio-económico del país. Cabe destacar que Angola cuenta con 57.8 millones de hectáreas de bosques lo que equivale aproximadamente a 46,4% de su superficie nacional (FAO, 2015), de las cuales 148.000 ha son plantaciones forestales de especies exóticas con un volumen comercial estimado en 17.453.000 m³ (PDMPSA, 2012), lo que podría contribuir de forma significativa al desarrollo de la economía del país, a través de una gestión adecuada, desde la producción y selección de planta forestal de calidad en vivero.

La sequía, y su máxima expresión el estrés hídrico, es citado en numerosos trabajos como el principal factor limitante para la supervivencia, el crecimiento, el desarrollo, y la distribución de las plantas, induciendo en ellas una serie de respuestas de ajuste y aclimatación en situaciones moderadas o de cambios bruscos en situaciones más severas (Akinci y Lösel, 2012; Claeys e Inze, 2013; Wang, *et al.*, 2013; Ortuño, *et al.*, 2015).

Para garantizar la vida de las plantas ante condiciones de estrés hídrico es importante mantener las proteínas en su forma funcional, ya que la mayoría de las respuestas que se llevan a cabo bajo estas condiciones implican la síntesis de proteínas metabólicas (osmoprotectores), de proteínas reguladoras en la ruta de transducción de señales y el control y la regulación de la expresión génica unido a los factores de transcripción (Saibo, *et al.*, 2009; Agarwal y Jha, 2010; García-Morales, *et al.*, 2013).

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

Autores como Ceacero, *et al.*, (2012); Planelles-González, *et al.*, (2004) coinciden también en que el estrés hídrico es uno de los principales factores que limitan la supervivencia y crecimiento en la fase inicial de las plantas influyendo potencialmente en la producción forestal y en particular en el crecimiento de coníferas juvenil (Matthew, *et al.*, 2015).

Realizar prácticas de cultivo adecuadas durante la fase de vivero permite preparar a las plantas frente a posibles situaciones de estrés, pudiendo desarrollar características morfológicas y fisiológicas para minimizar el estrés post-trasplante, aumentando la supervivencia (Planelles-González, *et al.*, 2004; Cortina, *et al.*, 2009; Lui, *et al.*, 2009).

Los pinos mexicanos tienen gran importancia ecológica, económica y social (Sánchez-González, 2008). Entre ellos se destacan las especies *Pinus patula* Schl et Cham. y *Pinus greggii* Engelm, debido a sus características de rápido crecimiento y adaptación a condiciones edáficas nutricionalmente pobres, asociados al hecho de producir madera de buena calidad, razones por las cuales han sido utilizados en programas de reforestación en muchas regiones del mundo como Sudamérica, Nueva Zelanda, África y Australia (Carrera y López, 2014). En Angola, en concreto, algunas especies de pinos mexicanos fueron introducidos en distintos programas de forestación para abastecer de combustible a las locomotoras a vapor de la línea férrea de Benguela, y suplir de material a la Compañía de Celulosa del Ultramar Portugués (CCUP).

Se han realizados pocos trabajos sobre estrés hídrico con especies de pinos mexicanos en la etapa de vivero, entre ellos podemos citar los de Cetina, *et al.*, (2001) y Cetina, *et al.*, (2002) en *Pinus greggii* Engelm; Martínez-Trinidad, *et al.*, (2002) en *P. leiophylla* Schltdl. et Cham.; Cornejo y Emmingham, (2003) en *P. arizonica* Engelm; Prieto, *et al.*, (2004) en *P. engelmannii*; Martiñón–Martínez, *et al.*, (2010) en *P. pinceana*; Maldonado-Benitez, *et al.*, (2011) en *Pinus greggii*; Prieto-Ruíz, *et al.*, (2012) *Pinus cooperi* Blanco y Castelán-Muñoz, *et al.*, (2015)

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

en *P. leiophylla*. Estos autores destacan, en general, que el estrés hídrico induce la lignificación, lo cual propicia un mejor pre-acondicionamiento.

Varios autores reconocen que los mecanismos (fisiológicos y bioquímicos) de respuesta de las plantas frente a los estreses bióticos y abióticos no son procesos simples, muy por el contrario requieren de estudios muy amplios y profundos (Abril, *et al.*, 2011; Jorrín, *et al.*, 2007), entre ellos los de enfoque molecular a través de las técnicas ómicas (transcriptómica, proteómica y metabolómica), los cuales están comenzando a cobrar gran importancia gracias a los resultados obtenidos en otras especies, (Fan, *et al.*, 2016) a pesar, que es necesario coordinarlos e integrarlos a las necesidades silvícolas actuales.

Este estudio se realizó con el objetivo de comparar la respuesta morfofisiológica y molecular de *Pinus patula* y *Pinus greggii* a las condiciones naturales de crecimiento (época seca y lluviosa) de la Meseta Central de Angola, de modo a proporcionar conocimientos sobre capacidad de adaptación de estas especies de coníferas frente a los previsibles escenarios de cambio climático. Este conocimiento puede ser clave para la aplicación de programas de conservación y gestión de estas especies exóticas.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1 Estudio fisiológico

Este ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio del Grupo de Investigación de Evaluación y Restauración de Sistemas Agrícolas y Forestales (RNM360) de la Universidad de Córdoba, España.

Para el estudio fueron utilizadas semillas certificadas de especies de *Pinus patula* y *Pinus greggii* procedentes de México, suministradas por el Banco de Semillas del Centro de Genética Forestal (CNRGM), las cuales fueron previamente desinfectadas por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio NaClO al 5% y aclarado posterior con agua corriente. La siembra se realizó en bandejas de cultivo en envases Forest Pot 300 de un volumen 300 cc de capacidad (desinfectados con NaClO al 5%, durante 30 min antes de ser utilizado). El sustrato empleado estaba compuesto de 75 % de turba y 25 % de perlita.

3.2.1.1 Diseño experimental.

Las plántulas crecieron bajo condiciones controladas (cámaras de cultivo). La evaluación de las distintas variables de estudio y la restricción del riego se inició cuando las mismas tenían 6 meses de edad y se prolongó durante un periodo de 42 días. Ver Figura 3.1.



Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

Figura 3.1. Cámara de cultivo el día de comienzo del ensayo. Plantas de *P. patula* y *P. greggii* con 6 meses de edad.

Tratamientos

Fueron estudiados cuatro tratamientos, combinando las especies (*P. patula* y *P. greggii*) con cada una de las estaciones naturales (lluviosa y seca) del Planalto Central de Angola (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Descripción de los tratamientos estudiados.

Tratamientos	Denominación	Descripción
T1	T1 <i>P. greggii</i>	Época de lluvia se estudiaron plantas de la especie <i>P. greggii</i>
T2	T2 <i>P. greggii</i>	Época de seca se estudiaron plantas de la especie <i>P. greggii</i>
T3	T1 <i>P. patula</i>	Época de lluvia se estudiaron plantas de la especie <i>P. patula</i>
T4	T2 <i>P. patula</i>	Época de seca se estudiaron plantas de la especie <i>P. patula</i>

La simulación de las dos épocas corresponde, en media, con las dos estaciones naturales del área de estudio; una estación cálida y lluviosa, que va de octubre a abril, con temperatura de $27\pm 5^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa $60\pm 5\%$ y una estación fría y seca que va de Mayo a Septiembre, con temperaturas de $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa del $40\pm 5\%$. Las temperaturas se mantuvieron constantes durante todo el día y un fotoperiodo de 12 horas de luz/12 de oscuridad.

En la simulación de la época de lluvia, el riego se realizó 3 veces por semana, manteniendo siempre el 100% de la capacidad (hídrica) de campo en cada alveolo.

En la simulación de la época de seca las plantas de las dos especies se sometieron a un ciclo de sequía de 42 días.

Los tratamientos fueron divididos en dos grupos funcionales (mesas), que fueron rotando a lo largo del ensayo para evitar que cualquier posible anomalía de la cámara (posición respecto a los focos, respecto a la puerta de entrada o los

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

ventiladores y humidificadores) afectara de forma significativa a alguno de los tratamientos de forma diferencial.

Población y muestra

En el ensayo fueron empleadas un total de 640 plantas. Para las medidas no destructivas y el seguimiento de la supervivencia se utilizaron 160 plantas (40 plantas x 2 condiciones x 2 especies), y para las medidas destructivas (potencial hídrico y contenido relativo de agua del cepellón y de la parte aérea) 112 plantas (4 plantas x 2 condiciones x 2 especies x 7 tomas de muestras).

3.2.1.2. Variables morfológicas y fisiológicas.

Durante el periodo de seguimiento del ensayo las mediciones para todas las variables evaluadas se realizaron en siete ocasiones, con una periodicidad semanal a los **0, 7, 14, 21, 28, 35** y **42** días.

El crecimiento fue evaluado a partir de la *altura de la parte aérea* y el *diámetro del cuello de la raíz*. La *altura* se midió con una regla graduada desde la base hasta la yema apical y el *diámetro* mediante calibre digital Mitutoyo Absolute digital (Mitutoyo Inc., UK, e ± 0.1 mm).

La *supervivencia* se evaluó a lo largo del ensayo mediante inspección visual (Figura 4.2), considerando planta viva aquella que tenía al menos un tercio de su parte aérea funcional y muerta, aquella que no tenía ni un tercio de su parte aérea verde.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

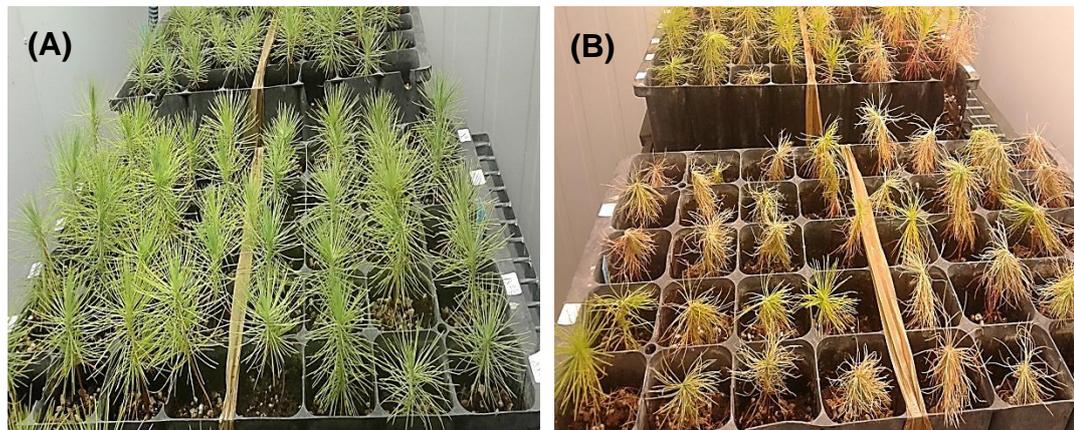


Figura 3.2. Plantas de las dos especies de pinos estudiadas a los 6 meses de edad. Se representa con letra (A) las plantas al inicio del experimento y con la letra (B) al final del experimento a los 42 días sin riego.

Medidas fisiológicas

El potencial hídrico del xilema (ψ_a) fue medido justo antes del inicio de la iluminación (predawn), mediante una cámara de Scholander o cámara de presión (SKPM 1400, Skye Instrumentos) (Scholander, *et al.*, 1965). Para ello se seleccionaron de forma aleatoria 4 plantas por tratamiento.

Para determinar *el contenido relativo de agua del sustrato y de la parte aérea*, se seleccionaron cuatro plantas de cada tratamiento que fueron pesadas en fresco en una balanza Metler Toledo ($e \pm 10$ mg). Una vez pesadas en fresco, se mantuvieron en estufa de convección a 80° C durante un periodo de dos días hasta alcanzar un peso constante; posteriormente fueron pesadas nuevamente para determinar el peso seco. El porcentaje de humedad del sustrato y de la parte aérea se calculó a través del método propuesto por Landis, *et al.*, (1989).

$$W (\%) = \frac{\text{Pesos fresco de la muestra} - \text{Peso seco de la muestra}}{\text{Peso seco de la muestra}} \times 100$$

Donde W (%) = contenido gravimétrico del agua en la muestra

La fluorescencia de las acículas fue medida sobre un grupo de acículas del tercio central de cada planta en 20 plantas por tratamiento medidas mediante un

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

fluorímetro (Plant Efficiency Analyzer, Hansatech Instruments) (Maldonado-Rodríguez, 1999). Las medidas se realizaron a las 12h:00 min, tres horas después de la iluminación de la cámara. Tras un periodo de oscuridad, en el que las acículas se protegen de la luz del exterior mediante una pinza (Figura 4.3), se le suministra una luz continua y homogénea, a través de 6 diodos que emiten luz actínica roja a 660 nm de intensidad (a $4500 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$), sobre una superficie de 4 mm. Los datos, registrado se analizaron aplicando las ecuaciones del JIP-test mediante el software Biolyzer (Strasser y Tsimilli-Michael, 2001). Las variables estudiadas fueron, la **relación Fv/Fm**, como indicador de la proporción de energía atrapada en los centros de reacción que no se ha dispersado en forma de calor ni como fluorescencia, es decir, la máxima energía que pasa a los centros de reacción de la absorbida inicialmente, la **eficiencia fotosintética (P_{HiE0})**, como un indicador de la energía que ha pasado a los centros de reacción y se utiliza en la cadena de transporte de electrones respecto de la que se absorbió en el complejo antena del fotosistema II y el “**Performance Index**” (**PI_{abs}**) o índice de ejecución, como un índice global que resume la eficiencia del sistema (Hermans, *et al.*, 2003).



Figura 3.3. Medida de fluorescencia. Realizadas sobre las acículas del tercio central de cada planta protegidas de la luz mediante las pinzas de protección del fluorímetro.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

3.2.1.3. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de todas las variables fisiológicas analizadas (crecimiento, peso fresco de la parte aérea, potencial hídrico del xilema, fluorescencia de la clorofila y peso seco del sustrato) fueron sometidos a un test de comparación de medias, ANOVA, según modelo lineal de clasificación simple, y las medias comparadas mediante el test de Tukey a 5% de probabilidad, después de verificarse que cumplían con el ajuste de distribución normal y de homogeneidad de varianza. Asimismo, se estimó el coeficiente de correlación de las variables de la fluorescencia (PHiE0) y PI (ABS), Todo ello a través del programa estadístico SPSS® versión 22,0 para Microsoft® Windows® (Visuata, 1998).

El análisis estadístico de la supervivencia se llevó a cabo mediante el método descriptivo de *Kaplan-Meier*, (Kaplan y Meier, 1958), que es un estimador de la probabilidad de supervivencia individual y del tiempo acumulado hasta que se produce el evento. Para aplicar esta prueba hay que asumir que todos los individuos son estudiados al mismo tiempo, lo cual es importante en este caso que se están comparando los resultados para dos épocas y dos especies distintas.

3.2.2. Estudio molecular

Para el estudio molecular (*proteómica de expresión diferencial comparativa*), además de utilizar la metodología descrita en el capítulo 3 de este trabajo, se realizó un análisis cuantitativo, con el objetivo de proporcionar información sobre la cantidad exacta o “confiable” de proteínas de expresión diferencial presentes en cada muestra analizada, como se observa en la Figura 3.4.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

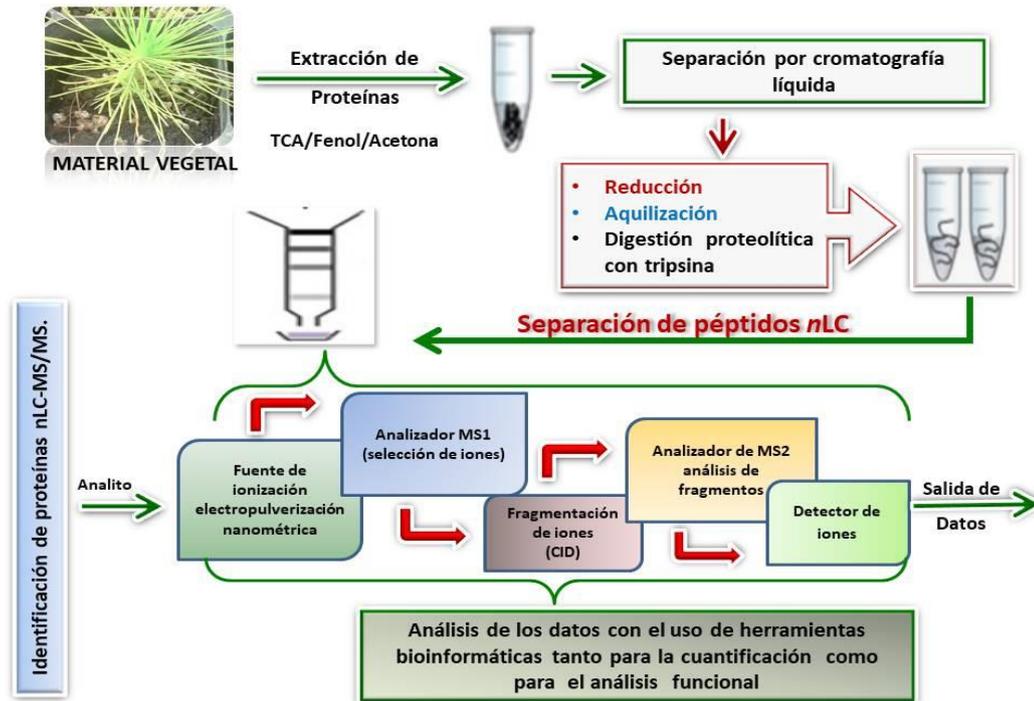


Figura 3.4. Flujo de trabajo utilizado. Extracción de proteínas; separación por cromatografía líquida UPLC; Obtención de espectros de fragmentación MS/MS en el espectrómetro de masas nLC-LTQ-Orbitrap e identificación y cuantificación de proteínas basado en Espectrometría de masas.

3.2.2.1. Extracción de proteínas.

La extracción de proteínas se realizó según la metodología del TCA/Fenol/Acetona (Wang, *et al.*, 2006). Primeramente se maceraron en un mortero acúculas de *Pinus patula* y *Pinus greggii* con nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo fino. Se pesaron seis muestras de polvo (0,2 g) representando las tres réplicas biológicas utilizadas para cada una de las especies. El precipitado proteico obtenido con este protocolo se resuspendió en un medio de solubilización compuesto por urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS al 4% [p/v], Triton X-100 0,5% [v/v] y DTT 100 m. El resultado de la solubilización se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos y por último se cuantificaron las proteínas por el método Bradford, utilizando albúmina sérica bovina (BSA) estándar para la curva patrón

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

(Maldonado, *et al.*, 2008). Las proteínas extraídas fueron conservadas a -80°C hasta la electroforesis.

3.2.2.2. Identificación de proteínas nLC-MS/MS.

Preparación de la muestra

La identificación de proteínas se realizó en el SCAI de la Universidad de Córdoba. Las proteínas extraídas fueron separadas por cromatografía líquida en un Dionex Ultimate 3000 nano UPLC (Thermo Scientific) y posteriormente analizadas por espectrómetro de masa Thermo Orbitrap Fusion (Q-OT-qIT, Thermo Scientific) según la metodología descrita por Valledor, (2012). Los extractos de proteínas fueron purificados en un gel 1-D (SDS-PAGE) al 10% de poliacrilamida. Las muestras se cargaron en el gel concentrador mediante una corriente de 100 V hasta que el extracto de proteína alcanzó el gel de resolución y desplazado en su interior 1 cm. El gel resultante obtenido se tiñó con azul de Coomassie (Coomassie Blue). Las bandas de proteína obtenidas fueron cortadas en piezas y mantenidas en agua hasta la digestión.

Digestión de proteínas

Las piezas de gel se destiñeron con una solución de 200 mM de bicarbonato de amonio (AB) en acetonitrilo (ACN) al 50% durante 15 minutos, seguido de 5 minutos en ACN al 100%. Las proteínas contenidas en las piezas de gel fueron reducidas mediante la adición de 20 mM de ditioneitol (DTT) en 25 mM AB incubándose durante 20 min a 55°C . Cuando la mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente, se le adicionó 40 mM de yodoacetamida en 25mM de AB y se dejó en la oscuridad durante 20 min para la alquilación de tioles libres. Finalmente, las piezas de gel fueron lavadas dos veces con 25 mM AB.

La digestión proteolítica se realizó con tripsina (Promega, Madison, WI) a una concentración de 12,5 ng / μl en AB 25 mM y se incubó a 37°C durante la noche. La digestión fue detenida con la adición de ácido trifluoroacético (TFA) al

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

1% de concentración final. Por último, las muestras digeridas fueron secadas en un SpeedVac.

Análisis nLC- MS/MS

Posteriormente a la mezcla de péptidos se les eliminó las sales en una columna Acclaim Pepmap de 300 μm de longitud x 5 mm de diámetro (Thermo Scientific) con ACN al 2% / TFA al 0,05% durante 5 min a 5 μl / min. La separación de péptidos nLC se realizó con el equipo Dionex Ultimate 3000 nano UPLC (Thermo Scientific) con una columna analítica C18 75 μm longitud x 50 mm diámetro Acclaim Pepmap column (Thermo Scientific) a 40 ° C para todas las ejecuciones. La Fase móvil A estaba compuesta por ácido fórmico al 0,1% y la Fase móvil B: ACN al 20 % más ácido fórmico al 0,1%. , En la elución se utilizaron los siguientes gradientes: de 4-35% de fase B durante 60 minutos; 35-55% de B durante 3 minutos; 55-90% de B durante 3 minutos seguido de lavado de 8 minutos a 90% de B y un reequilibrio de 12 minutos a 4% de B. El tiempo total de cromatografía fue de 85 min.

Los péptidos resultantes de la elución fueron transformados en iones de fase gaseosa mediante ionización por electropulverización nanométrica y se analizaron en un espectrómetro de masas Thermo Orbitrap Fusion (Q-OT-qIT, Thermo Scientific) operado en modo positivo. Se realizaron barridos de estudio de precursores peptídicos en un rango de 400 a 1500 (m/z) a una resolución de 120 K (a 200 (m/z)). La espectrometría de masa tándem (MS/MS), se realizó con un aislamiento a 1,2 Da con el cuádrupolo y la fragmentación por el método de disociación inducida por colisión CID (collision-induced dissociation) normalizada de 35%. Apenas se muestrearon para MS/MS aquellos iones precursores con estado de carga entre 2-5. La duración de exclusión dinámica se estableció en 15 s con una tolerancia de 10 ppm alrededor del precursor seleccionado y sus isótopos. La fragmentación MS² se realizó para un máximo de 30 iones precursores con ciclos de 3 segundos.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

Para una identificación inicial, finalmente, los espectros obtenidos del análisis de masas fueron analizados con el software Proteome Discoverer v. 2.1.0.81 (Thermo Scientific) y el motor de búsqueda SEQUEST/ HT utilizando una base de datos de proteínas de pino inferida a partir de la colección de transcritos existente en *Pinus sustainpine* v3 (http://www.scbi.uma.es/sustainpinedb/home_page). Esta base de datos fue generada a partir de predicciones génicas de la última versión de ensamblado del genoma específico de *Pinus pinaster*, extrayendo las proteínas a partir de las secuencias de transcritos, identificando el frame de lectura correcto y comparándolo con blastx sustainpine vs. Acrogymnospermae (ancestro), el cual se utilizó para traducir las secuencias que tenían homología. Aquellas secuencias que no fueron homologadas, se les tradujo los 6 frames conservando el frame de lectura mayor.

Los péptidos se generaron por digestión triptica teórica. Como modificaciones fijas se consideraron la carbamidometilación de cisteína, y como modificación variable la oxidación de metionina, tolerancia de error para iones precursor de 10 ppm e iones productos (fragmentados) de 0.1 Da. Los espectros coincidentes con una secuencia peptídica (PSMs) se validaron con el software Proteome Discoverer usando un filtro basado en valores de un 1% de la tasa de falsos descubrimientos FDR (False Discovery Rate).

3.2.2.3. Cuantificación de proteínas basada en Espectrometría de masas.

Los datos se procesaron utilizando el software MaxQuant (versión 1.5.5.1), que permite altas tasas de identificación de péptidos, mayor precisión en el rango de masas individualizadas y cuantificación proteica de proteínas (Cox y Mann, 2008). Los espectros MS² se buscaron con el motor de búsqueda Andrómeda, usando la base de datos descrita anteriormente y los péptidos generados por digestión triptica teórica de la base de datos descrita anteriormente. La carbamidometilación de cisteína y la oxidación de metionina se establecieron

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

como modificaciones fijas y variables respectivamente. La tolerancia de la masa del precursor fue de 10 ppm y los iones del producto se buscaron con una tolerancia de 0,1 Da (Cox, *et al.*, 2011). Se validaron las coincidencias espectrales de péptidos (PSMs) en Maxquant que integra múltiples parámetros de cada péptido, tales como longitud, carga, número de modificaciones y la puntuación de identificación, en una única valoración, que actúa como evidencia estadística de la calidad de cada combinación de espectro y péptido individual.

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo con el método MaxLFQ, que permite una cuantificación precisa de todo el proteoma (Cox, *et al.*, 2014). Con este método de cuantificación, se aplica un alineamiento del tiempo de retención y un protocolo de transferencia de identificación (función "coincidencia entre ejecuciones" en MaxQuant).

El análisis estadístico para identificar las proteínas expresadas de forma diferencial se realizó con el software Perseus (versión 1.5.6.0) (<http://www.coxdocs.org/doku.php?id=perseus:start>). Los valores de intensidades LFQ de todas las proteínas se importaron en el software Perseus, donde se transformaron a escala logarítmica con base dos. Las proteínas Ids se filtraron al menos en 3 repeticiones por condición y los valores perdidos se reemplazaron con el valor de la intensidad más baja. La cuantificación de proteínas y el cálculo de la significación estadística se llevaron a cabo utilizando la prueba de *Student's t*-bidireccional y la corrección de errores (valor de $p < 0,05$) usando el método de FDR basado en permutación. Para visualizar la relación multivariante de las distintas situaciones experimentales analizadas, los datos normalizados se representaron en un mapa de calor y un análisis de componentes principales (PCA). Todas aquellas proteínas que cambiaron su expresión al menos 1.5 veces, y un valor de FDR < 0.05 se consideraron expresadas diferencialmente.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

3.2.2.4. Clasificación funcional de las proteínas.

Las proteínas identificadas por análisis de nLC LTQ Orbitrap, fueron anotadas funcionalmente mediante el software Blast2GO (v.5, GO Version Oct 7 2018) (Conesa y Götz, 2008), comenzando con una búsqueda de similitud mediante blastx-fast contra la base de datos nr-NCBI (descargado el 3 de julio de 2018), conservando hasta 20 blast “hits” con un e-value umbral de $1e^{-3}$. Así mismo, se realizó anotación de dominios y rutas metabólicas explorando las bases de datos IPRScan y KEGGs (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). El algoritmo “Blast Description Annotator” se utilizó para asignar una descripción a cada secuencia. Para aquellas secuencias que permanecieron sin ningún tipo de información en esta fase (11 secuencias), se relajó el umbral a un e-value $1e^{-3}$ y se procedió a buscar similitud contra nt-NCBI (descargado el 3 de enero de 2018), con objeto de asignar una descripción a esas secuencias, aunque este resultado no se utilizó para anotar funcionalmente las mismas debido a su baja confianza.

La clasificación para los perfiles funcionales se realizó teniendo en cuenta los términos de la Gene Ontology (GO), considerando las tres categorías presentes: **procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares**. Se realizó una reducción de redundancia funcional mediante la aplicación de PlantSlim. En cada pareja de situaciones experimentales comparadas, todas las funciones obtenidas para la categoría Proceso Biológico, fueron comparadas, para remarcar las diferencias funcionales encontradas.

3.3. Resultados

3.3.1 Resultado estudio fisiológico

Durante los 42 días del ensayo, además de la supervivencia en los distintos tratamientos, fueron evaluadas variables morfológicas (crecimiento en diámetro y altura) y fisiológicas (potencial hídrico del xilema antes del amanecer y

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

fluorescencia de la clorofila). De forma general las variables potencial hídrico y crecimiento de las plántulas presentaron una mejor respuesta en la época seca que en la época de lluvia. Cabe destacar que el crecimiento inicial de las plantas fue a 100% de la capacidad de campo (condiciones normales de irrigación), pudiendo haber influido en los resultados otros factores como la temperatura, ya que en la época lluviosa las temperaturas son más elevadas que en la época de seca, alejándose del rango óptimo de crecimiento de las dos especies de pinos estudiadas.

Supervivencia

Las plantas del tratamiento T1 (simulación de época de lluvia) se mantuvieron vivas hasta el final del ensayo lo que puede deberse a que en esta época se mantuvo el riego durante todo el ensayo. En el caso de las plantas del tratamiento T2 (simulación de la época seca), la supervivencia de ambas especies disminuye con el tiempo, a medida que disminuye la disponibilidad hídrica.

En la tabla 3.2 se representan los datos descriptivos de supervivencia al final del experimento en el tratamiento T2 (simulación de la época seca), después de 42 días de ensayo: el número inicial de plantas por especie (40), el número de plantas muertas por especie al final del experimento, 24 en *P. greggii* y 25 en *P. patula*, el número de censurados, o lo que es lo mismo, el número de casos que no murieron durante el ensayo para las dos especies, 16 en *P. greggii* y 15 en *P. patula* y el porcentaje que representa.

El número de plantas muertas fue gradual en las dos especies. Las (40) plantas iniciales se mantuvieron vivas hasta la medida del día 21, fecha a partir de la cual, la mortalidad comenzó a aumentar los días 28 (1 en *P. greggii* y 2 en *P. patula*), y 35 (5 en *P. greggii* y 3 en *P. patula*). Al final ensayo (día 42) la mortalidad fue de 24 plantas en *P. greggii* y 25 en *P. patula*.

Tabla 3.2. Resumen del procesamiento de la supervivencia lo largo de 42 días del experimento mediante la Prueba de Kaplan-Meier. En la tabla se representan los datos descriptivos de la época

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

seca, el número de plantas al inicio del ensayo para las dos especies, el número de muertes y el número de censurados, así como el porcentaje de los mismos.

Especies	Nº total	Nº de eventos	Censurado	
			Nº	Porcentaje
<i>P. greggii</i>	40	24	16	40,0%
<i>P. patula</i>	40	25	15	37,5%
Global	80	49	31	38,8%

Como se observa en la Tabla 3.2, la distribución de supervivencia de las dos especies no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las dos especies al final del experimento; observándose un 60% de plantas muertas en la especie *P. greggii* y un 62,5% en la especie *P. patula*. Esto indica que las plantas de las dos especies estudiadas no sobrevivieron a un estrés hídrico severo.

Tabla 3.3. Comparaciones globales de la supervivencia lo largo de 42 días del experimento mediante la Prueba de Kaplan-Meier. En la tabla se muestra que no existen diferencias significativas entre las dos especies al final del experimento con respecto al número de plantas muertas.

Comparaciones globales			
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	0,052	1	0,820

Finalmente, la Prueba de Kaplan-Meier nos arroja un gráfico representativo sobre el comportamiento de la supervivencia al final del ensayo para la época seca (Gráfico 3.1).

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

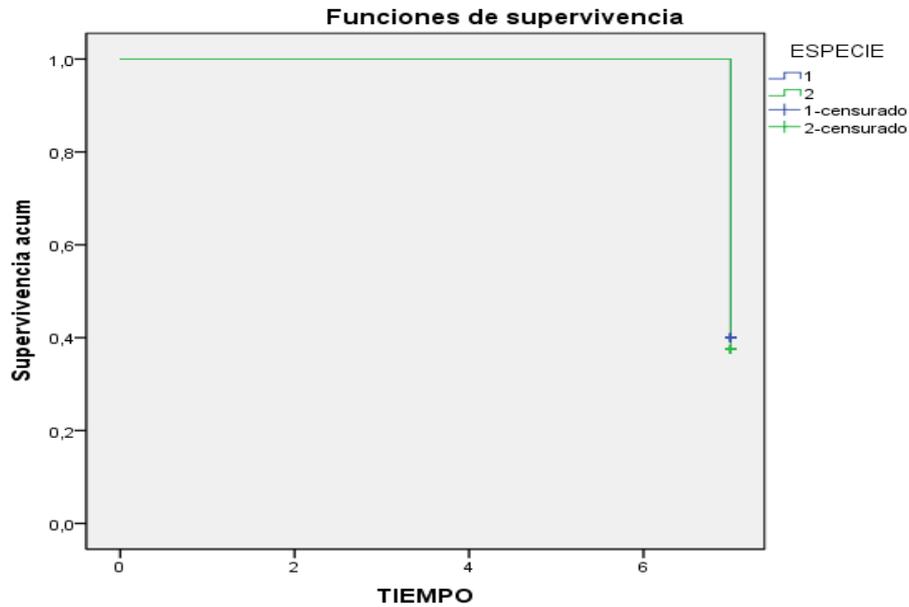


Gráfico 3.1. Comportamiento de la supervivencia según la Prueba de Kaplan-Meier para las dos especies estudiadas a los 42 días que finalizó el ensayo. Se representan el número de plantas que murieron al final del ensayo en la época seca.

Crecimiento

La Figura 3.5 muestra los resultados de las variables morfológicas: altura de la parte aérea y diámetro en el cuello de la raíz. En todas las fechas de medición, la altura fue mayor en las plantas de *P. greggii* con respecto a *P. patula*. De la misma forma, los individuos crecidos bajo el tratamiento 2 (simulación de la época seca) mostraron un mayor desarrollo con respecto a las plantas crecidas bajo el tratamiento 1 (simulación de la época de lluvia). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas según el Test de Tukey (con un 95 % de significación)

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

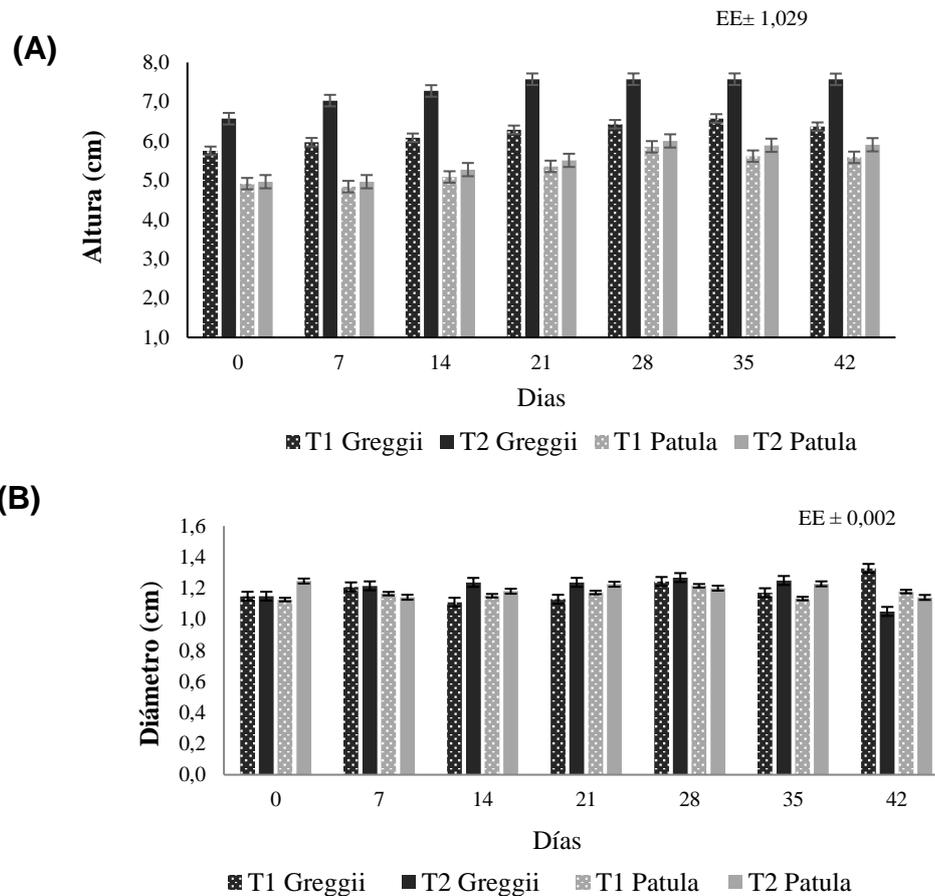


Figura 3.5. Evolución temporal de las variables de crecimiento estudiadas en todos los tratamientos a lo largo del experimento. Representada la altura por la letra (A) y el diámetro por la letra (B).

Al inicio del ensayo, cuando las plantas tenían 6 meses de edad, las plantas sometidas al tratamiento T2 (simulación de la época seca) tuvieron un mayor desarrollo, tanto en altura como en diámetro.

Al inicio del experimento las plantas de *P. greggii* sometidas al tratamiento T1 tenían una altura media de 5,7 cm y las de *P. patula* de 4,8 cm, lo que equivale aproximadamente a un incremento mensual de 0,95 cm y 0,80 cm respectivamente. Este incremento en altura se mantuvo durante todo el ensayo, ya que el riego (10 ml de agua por alveolo) no se interrumpió y las plantas continuaron su crecimiento normal alcanzando al final del experimento valores de entre 6,6 cm en el caso de *P. greggii* y 5,6 en *P. patula*.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

En el tratamiento T2 (simulación de la época seca), inicialmente las plantas alcanzaron mayor altura 6,6 cm en *P. greggii* y 5 cm *P. patula*, lo que equivale a un incremento mensual en altura de 1,1 cm y de 0,83 cm respectivamente. Este incremento en altura continuó hasta el día 21 (1,0 cm para el caso de *P. greggii* y 0,81 cm para *P. patula*). Sin embargo, a partir del día 28 el crecimiento se detuvo, probablemente debido al déficit hídrico.

En el caso del diámetro, en general no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (95% de significación), excepto en la medida del día 42 en que se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, debido quizás a los efectos del estrés causado por la sequía, con valores de $1,20 \pm 0,5$ cm en las plantas sometidas al tratamiento T2.

Porcentaje de humedad de la parte aérea

Los resultados para esta variable se muestran en la Figura 3.6. De forma general, hasta el día 35 del ensayo se evidenció un comportamiento similar, sin diferencias estadísticamente significativas (95% significación) entre las plantas sometidas a los dos tratamientos, con valores por encima del 60%. A partir del día 35, se observan diferencias entre las dos especies, de forma que *P. patula* presenta mayor porcentaje de humedad, superando significativamente a la especie *P. greggii*.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

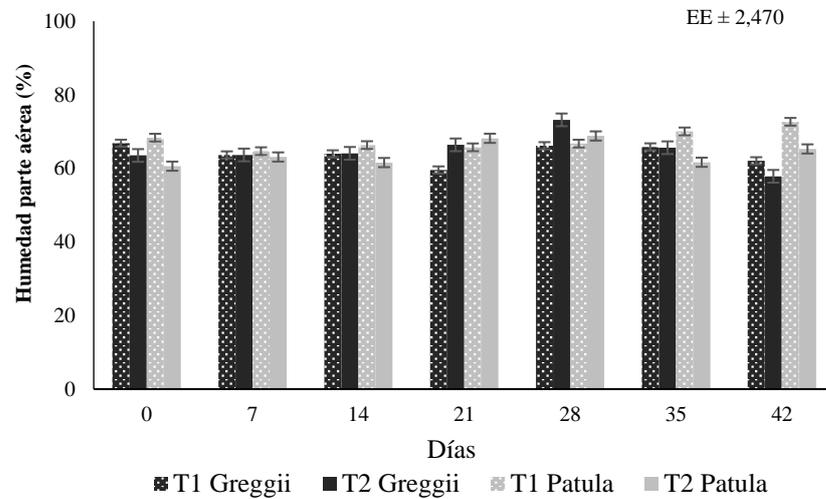


Figura 3.6. Evolución temporal de la variable humedad de la parte aérea a lo largo del experimento. Están representadas todas las medidas realizadas a lo largo del experimento en todos los tratamientos.

Porcentaje de humedad del sustrato

Con respecto a la humedad del sustrato utilizado para ambas especies (Figura 3.7), en el tratamiento T1, sometido a riego, no se observaron diferencias significativas, manteniéndose la humedad del sustrato por encima del 65%.

En el tratamiento T2, no regado, se verificó una disminución considerable de la humedad del sustrato a medida que se prolongaba el tiempo sin riego. Estas diferencias tuvieron significación estadística (95% de significación) a partir del día 28.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

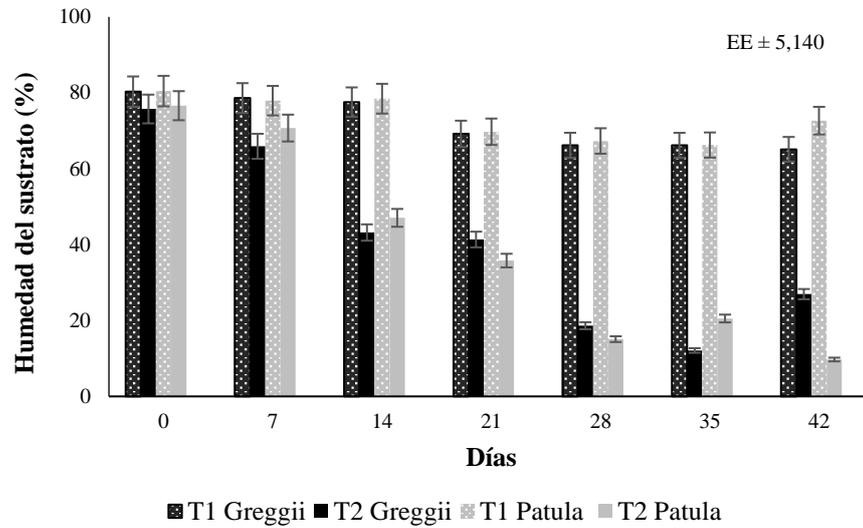


Figura 3.7. Evolución temporal del porcentaje de humedad del sustrato. Representado todas las medidas realizadas a lo largo del experimento en todos los tratamientos.

Potencial hídrico del xilema

En la figura 3.8 se representa el comportamiento del potencial hídrico en los diferentes tratamientos estudiados. En la figura 4.8 se representa el comportamiento del potencial hídrico en los diferentes tratamientos estudiados. En la misma se observa que no hubo diferencias entre especies y entre épocas en las medidas realizadas los días 0, 7 y 14. A partir del día 21, se encontraron diferencias significativas en función de la variable estación (seca o lluviosa), mientras que a partir del día 35 se encontraron diferencias significativas tanto entre especies como entre estaciones, alcanzando valores de potencial hídrico de -5,77 MPa en *Pinus patula* y de -4.35 en *Pinus greggii* en los tratamientos que simulaban la estación seca. Estas diferencias son estadísticamente significativas a un nivel de significancia del 95%.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

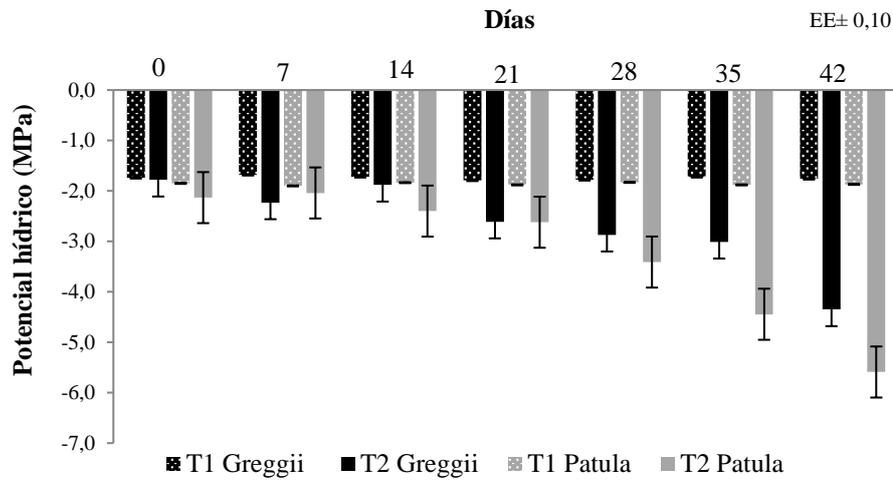


Figura 3.8. Potencial hídrico del xilema al amanecer. Representado para todas las fecha de medición y para todos los tratamientos.

Fluorescencia

En este estudio, como indicadores de alteraciones en la actividad fotosintética se estudiaron las variables relación F_v/F_m (PHiP0), la eficiencia fotoquímica (PHiE0) (Figura 3.9), y el “Performance Index” (PIabs) o índice de ejecución, como un índice global que resume la eficiencia del sistema. Hasta el día 28 del ensayo, los valores de la relación F_v/F_m rondaron entre 0.4 y 0.8, no mostrando diferencias significativas ($P > 0.05$) ni entre los dos tratamientos ni entre las especies. A partir del día 28 se observó una reducción significativa de la relación F_v/F_m encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos los días 35 y 42 de medición. El día 35 se detectaron valores muy bajos tanto para la especie *P. patula* como *P. greggii*, 0,35 y 0,38 respectivamente, y al final del experimento (día 42) la relación F_v/F_m (PHiP0) disminuye hasta 0 para las dos especies.

De manera análoga se comportó la eficiencia fotoquímica (PHiE0), es decir, no se encontraron de forma general diferencias significativas, rondaron sus valores entre 0,1 y 0,2.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

En la figura 3.10 se representa la correlación entre los valores del Índice de Ejecución (PI_{ABS}) y la eficiencia fotoquímica ($PHiE0$). En la gráfica se refleja una correlación lineal positiva ($r= 0,495$) entre las variables $PHiE0$ (eficiencia fotoquímica) y el índice de ejecución (PI_{ABS}). Esto implica que a medida que aumenta la variable $PHiE0$, aumenta (PI_{ABS}). Por lo tanto, podemos inferir que esto constituye un buen indicador para evaluar las condiciones fisiológicas del aparato fotosintético.

Esta relación presentó valores de (R^2) muy elevados, tanto en la época lluviosa como en la época seca con valores de $R^2=0.94$ y $R^2=0.92$ respectivamente.

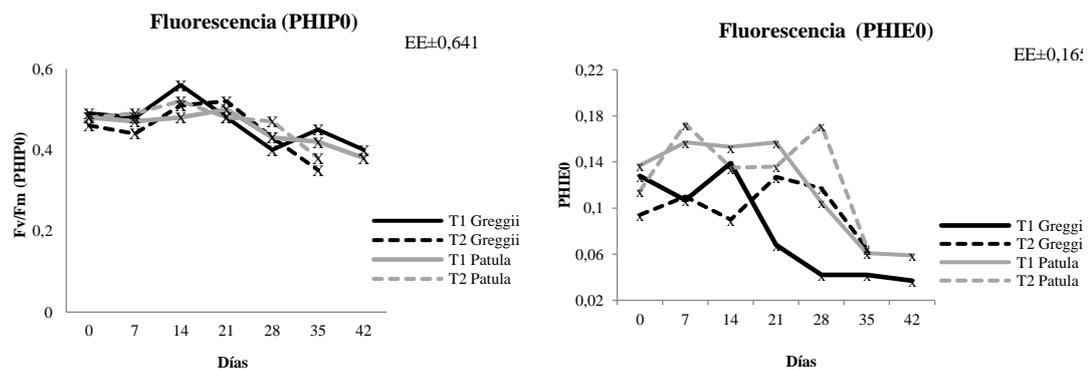
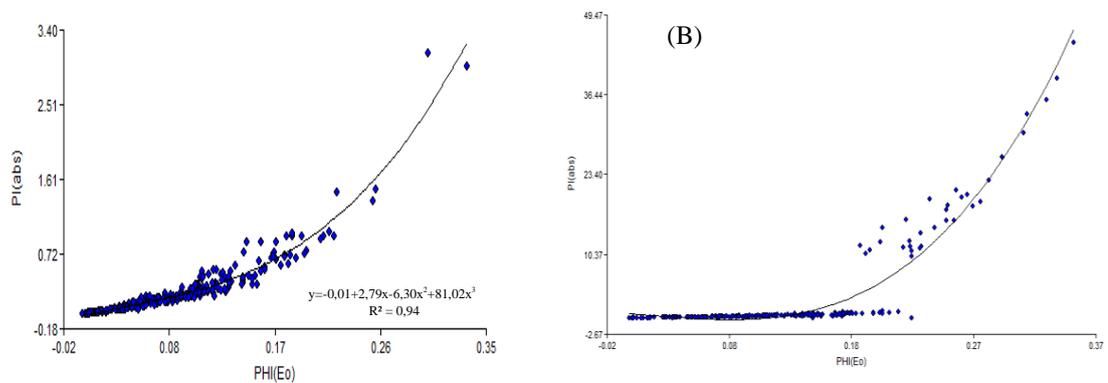


Figura 3.9. Fluorescencia de la clorofila para todos los tratamientos y fechas de medición. Representado a la izquierda, la variable relación Fv/Fm ($PHIP0$) y a la derecha, la eficiencia fotosintética ($PHiE0$).



Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

Figura 3.10. Gráfico de dispersión entre la Eficiencia fotosintética relativa $(PHiE0)_{rel}$ y el logaritmo del “Performance Index” relativo $(Log (PIabs)_{rel})$. Se presentan dos gráficas, (A) a la época de lluvia y (B) a la época de seca. Se puede observar como el R^2 es muy elevado con valores 0.94 en la época de lluvia y 0.92 para la época de seca.

3.3.2 Resultados del estudio molecular

3.3.2.1. Resultados de la identificación de proteínas

Con el objetivo de identificar proteínas expresadas diferencialmente en plántulas de pinos estudiadas bajo las condiciones climáticas (época lluviosa y seca) del Planalto Central de Angola, así como analizar su función molecular y participación en los diferentes procesos metabólicos, se realizaron cuatro análisis comparativos del proteoma de acículas de *Pinus* sp. El primer y segundo análisis, correspondieron a comparaciones de las dos especies (*P. patula* vs *P. greggii*) en cada una de los tratamientos de simulación de estaciones realizados (lluviosa y seca), mientras que la tercera y cuarta comparativa fue realizada en cada una de las especies entre los dos tratamientos de simulación de estaciones realizados.

Mediante el análisis de proteómica comparativa, se identificaron las proteínas expresadas diferencialmente y de forma significativa (en cada especie o época), proteínas comunes (encontradas en las dos especies o en las dos épocas) y exclusivas (encontradas apenas en una especie o en una época).

3.3.2.1.1. Comparación de *P. patula* vs *P. greggii* en los dos tratamientos de simulación de condiciones ambientales (época lluviosa y seca)

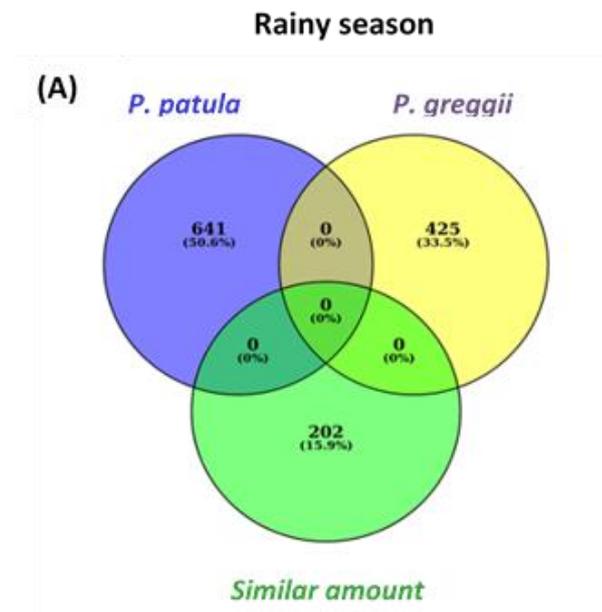
El número de proteínas identificadas en el tratamiento de simulación de la época lluviosa fue mayor en *P. patula* en relación a *P. greggii*. Por el contrario, en el tratamiento de simulación de la época seca, el número de proteínas identificadas fue mayor en *P. greggii* en relación a *P. patula*. Los perfiles proteicos reflejaron diferencias en la expresión de proteínas tanto en las especies como en los tratamientos analizados.

En el tratamiento de simulación de la época lluviosa fueron identificadas 202 proteínas comunes en ambas especies. El total de proteínas identificadas en *P.*

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

patula fue 641 (50,6%), de las cuales 323 proteínas eran exclusivas. En la especie *P. greggii* fueron identificadas un total de 425 proteínas (33,5%), siendo exclusivas 209.

Sin embargo, en el tratamiento de simulación de la época de seca se identificaron el doble de proteínas comunes (409) (28,7%) para ambas especies con respecto a la época de lluvia. En el caso de la especie *P. patula* se identificaron 585 proteínas totales (41,5%), de las cuales, 245 eran exclusivas. En la especie *P. greggii* se identificaron 432 proteínas totales (30,3%), siendo 180 exclusivas (Fig. 3.11 y Anexo II).



Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

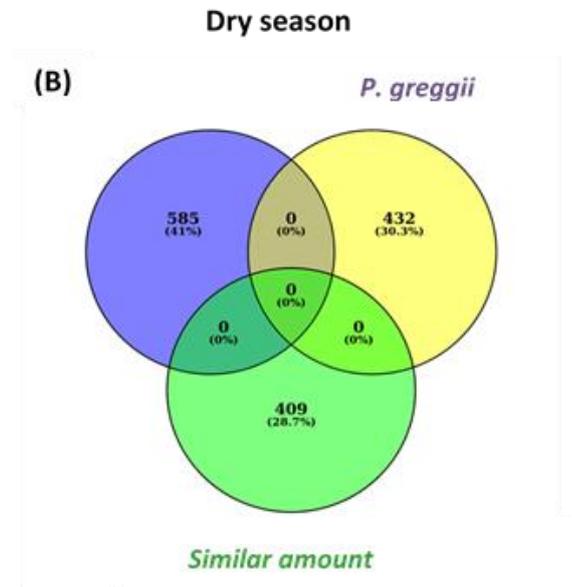


Figura 3.11. Diagrama de Venn indicando las proteínas comunes y diferenciales identificadas en las acículas de *P. patula* y *P. greggii*. en la por nLC LTQ Orbitrap utilizando el motor de búsqueda Sequest/ HT. (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>). La letra A representa tratamiento de época lluviosa y la letra B representa tratamiento de época seca.

3.3.2.1.2. Comparación entre tratamientos (simulación época seca y época de lluvia) de forma individual para cada especie.

En el análisis individual de cada una de las especies en función del tratamiento de simulación de estaciones fueron identificadas de forma mayoritarias proteínas expresadas en “la época de seca”. La expresión mayoritaria de estas proteínas podría estar relacionada con el tratamiento (simulación épocas de lluvia y seca) pudiendo aportarnos información del porqué de su expresión, de cuál es su función molecular y con qué procesos metabólicos están relacionadas.

En la Fig. 3.12 se representa la comparación del perfil proteómico de ambas especies en cada una de los tratamientos de simulación revelándose variaciones en los niveles de expresión de proteínas. En *P. patula*, fueron identificadas mayor número de proteínas en el tratamiento de simulación de la época seca (497) (45,6%) con respecto a la época lluviosa (269) (24,7%). Las proteínas comunes fueron 323 (29,7%); las exclusivas de la época lluviosa fueron

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

157 y de la época seca 255. En *P. greggii* también se identificaron diferencias importantes en la expresión de proteínas. Al igual que en *P. patula* fueron identificadas mayor número de proteínas en el tratamiento de simulación de la época seca (633) (47,8%) con respecto al tratamiento de simulación de la época lluviosa (451) (34,1%). Las proteínas comunes fueron 239 (18,1%), siendo exclusivas de “la época lluviosa” 198 y de “la época de seca” 278.

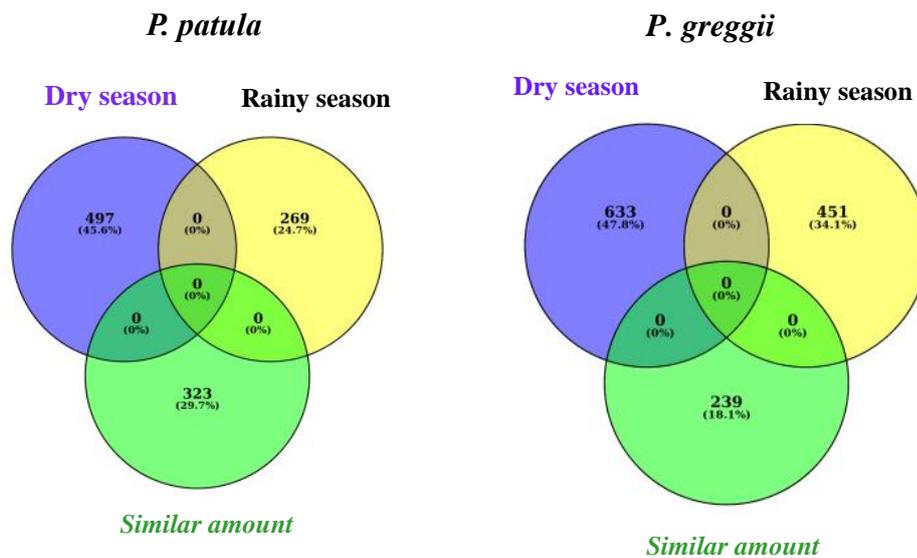


Figura 3.12. Diagrama de Venn representando las proteínas comunes y diferenciales identificadas en las acículas de *P. patula* y *P. greggii* en los dos tratamientos de simulación (época seca y lluviosa) por nLC LTQ Orbitrap utilizando el motor de búsqueda Sequest/ HT. (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

3.3.2.2. Resultados del análisis de los términos de Ontología Génica.

Para el análisis de los perfiles funcionales de las cuatro comparaciones realizadas se tuvieron en cuenta los términos de la Gene Ontology (GO) mediante la aplicación de PlantSlim para la categoría Procesos Biológicos. De forma general, se pueden apreciar algunas diferencias considerables con respecto a las proteínas expresadas tanto por aumento como por disminución en las cuatro comparaciones. Estos resultados son interesantes ya que revelan los mecanismos

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

fisiológicos de estas dos especies en respuesta a las dos condiciones experimentales impuestas (época lluviosa y época seca).

3.3.2.2.1. Comparación de *P. patula* vs *P. greggii* en los tratamientos de simulación de la época lluviosa y época seca.

Los resultados de los perfiles funcionales para la ontología relativa a procesos biológicos tanto para la especie *P. patula* como para la especie *P. greggii* en ambas épocas revelan ciertas diferencias entre los procesos representados en cada especie dentro de la misma época.

La participación mayoritaria de proteínas en el tratamiento de simulación de la época de lluvia para las dos especies se asoció básicamente a los procesos de **metabolismo** (primario, de sustancias orgánicas, proteínas y de componentes del nitrógeno), **fotosíntesis**, **procesos biosintéticos** y por disminución de expresión de las proteínas **responsables de estímulos extracelulares** (Figura 3.13).

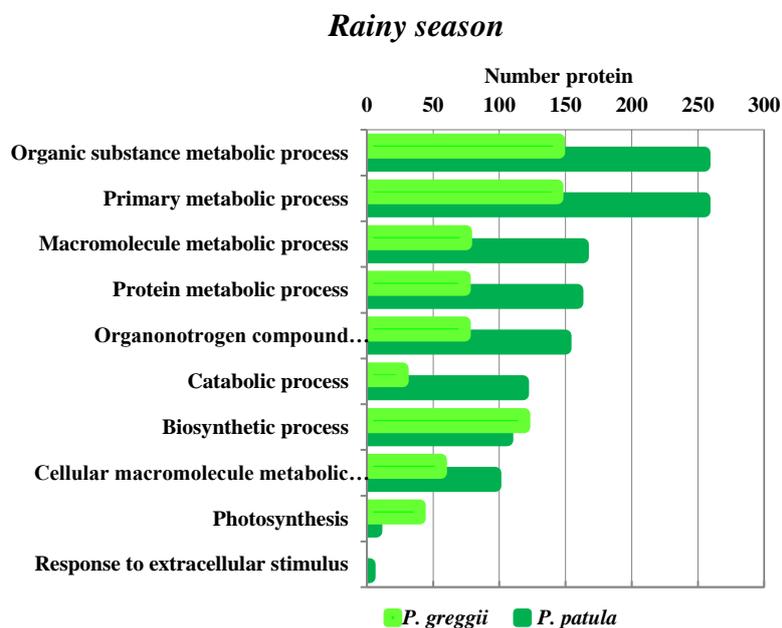


Figura 3.13. Comparación entre *P. patula* y *P. greggii* en el tratamiento de simulación de la época lluvia. En el gráfico se representan aquellos procesos biológicos (aumento o disminución) cuyo porcentaje de diferencia de proteína expresada en cada especie es igual o superior al 40%

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

Cabe destacar que la expresión mayoritaria de proteínas en este tratamiento se produjo en la especie *P. patula* para todos los procesos biológicos, excepto en el proceso de la fotosíntesis en el que se identificaron 7 proteínas asociadas a este proceso mientras que en *P. greggii* se identificaron 40 proteínas relacionadas con la fotosíntesis, representando una diferencia del 70%.

En el tratamiento de simulación de la época seca los procesos biológicos enriquecidos en ambas especies incluyen las categorías de **biosíntesis**, **metabolismos** (carbohidratos, lípidos, sustancias orgánicas, componentes del nitrógeno y péptidos), **componentes de la organización celular**, **responsables de estímulos abióticos**, **de expresión génica** y las relacionadas con la **fotosíntesis** y **crecimiento** que reducen su nivel de expresión siendo esta reducción más acentuada en la especie *P. patula*, con una diferencia del 44% respecto a *P. greggii* (Figura 3.14).

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

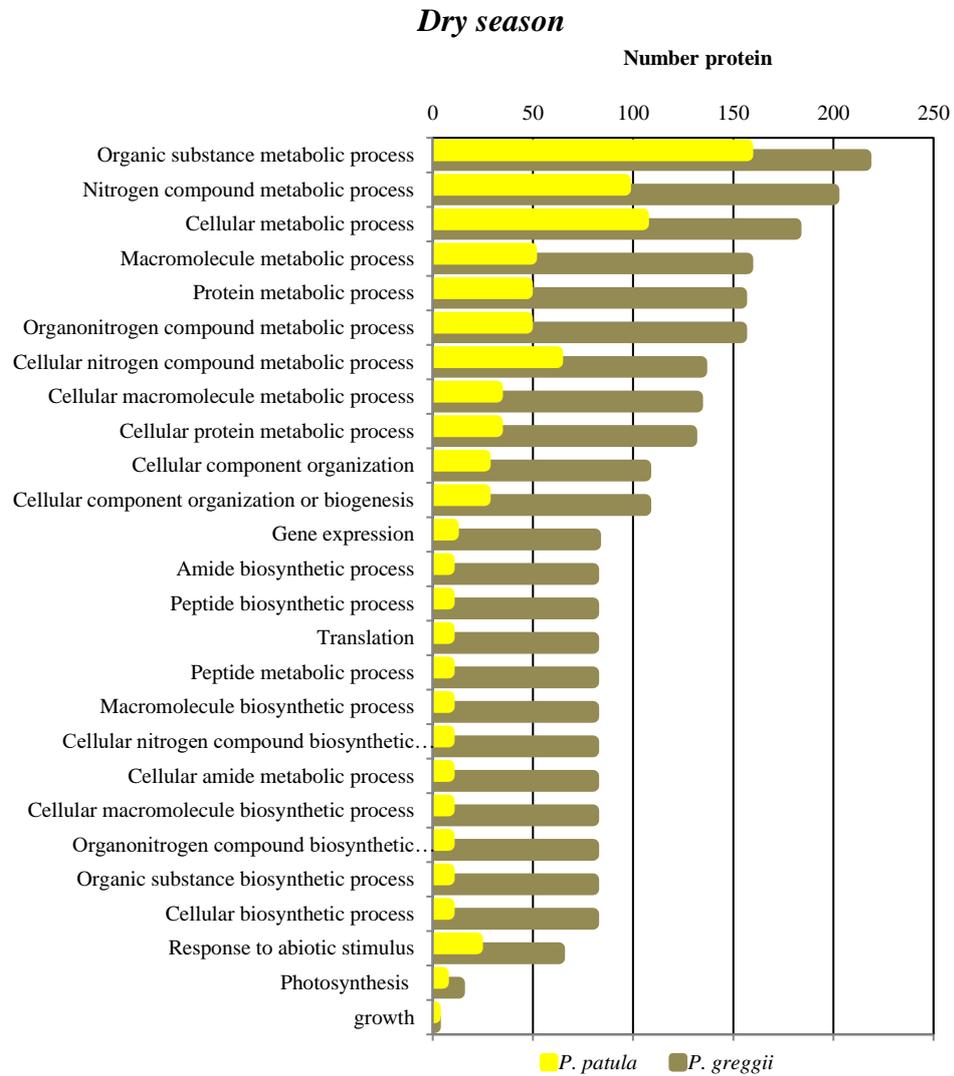


Figura 3.14. Comparación entre *P. patula* y *P. greggii* en el tratamiento de simulación de la época seca. En el gráfico se representan aquellos procesos biológicos (aumento o disminución) cuyo porcentaje de diferencia de proteína expresada en cada especie es igual o superior a 40%

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

3.3.2.2.2. Comparación de cada especie en el tratamiento de simulación de la época lluviosa y época seca.

En la comparación individual de cada especie en ambos tratamientos de simulación de las dos épocas, se identifica una mayor participación de proteínas en los procesos sobreexpresados en la época seca con respecto a la época lluviosa.

Por ejemplo, la especie *P. greggii* en el tratamiento de época seca, revela una mayor expresión de proteínas en los procesos de **metabolismo** (primario, carbohidratos, sustancias orgánicas y lípidos), **procesos catabólicos**, **muerte celular y de respuestas estímulos extracelulares** y menor expresión en los procesos de **fotosíntesis y expresión génica** con diferencia de 82 y 50% respectivamente con respecto a la época de lluvia (Figura 3.15).

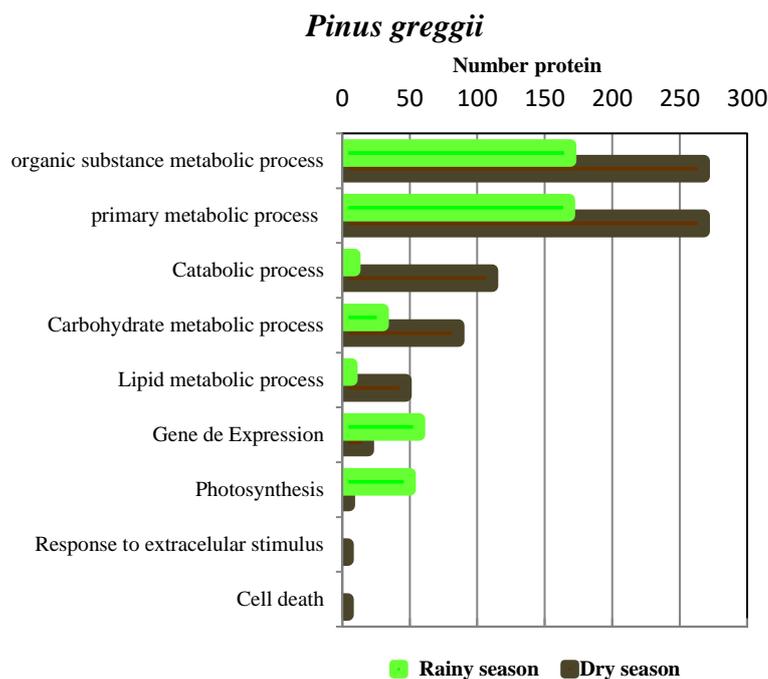


Figura 3.15. Comparación entre los tratamientos de simulación de la época seca y la época lluviosa en *P. greggii*. En el gráfico se representan aquellos procesos biológicos (aumento o disminución) cuyo porcentaje de diferencia de proteína expresada en cada época es igual o superior al 40%

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

En el caso de *P. patula* en la época seca los principales procesos biológicos sobreexpresados fueron **metabolismo** (primario, celular, de las proteínas, de sustancias orgánicas y de componentes del nitrógeno), **procesos biológicos, muerte celular, expresión génica y respuesta a estímulos abióticos**, siendo el proceso menos expresado el de **fotosíntesis** (Figura 3.16).

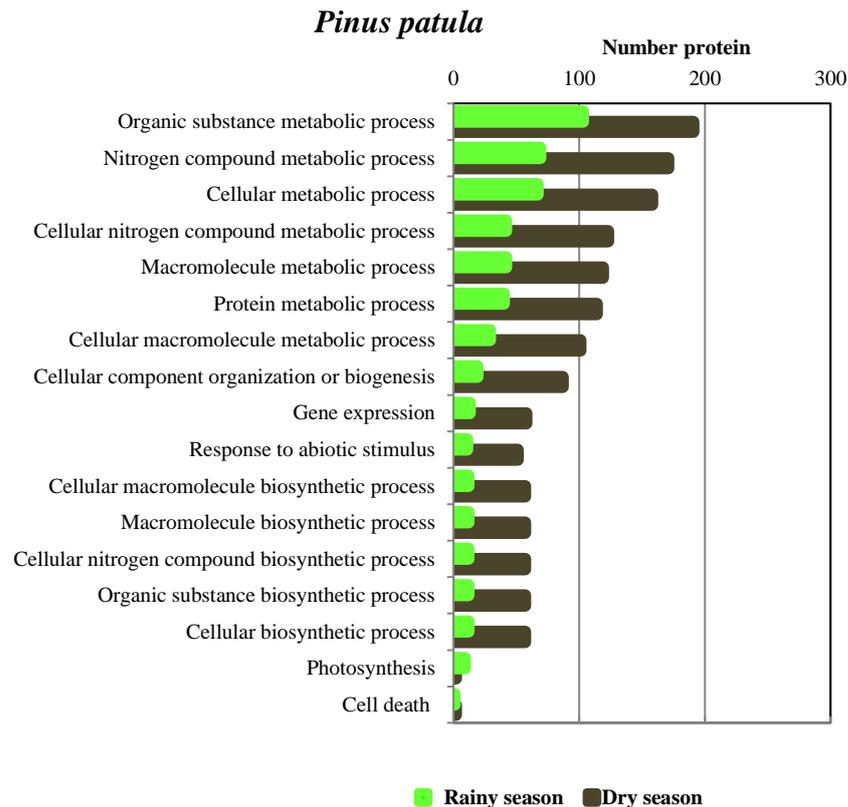


Figura 3.16. Comparación entre los tratamientos de simulación de las épocas seca y lluviosa en *P. patula*. En el gráfico se representan aquellos procesos biológicos (aumento o disminución) cuyo porcentaje de diferencia de proteína expresada en cada época es igual o superior a 40%

Los resultados encontrados indican que la especie *P. greggii* en el tratamiento de simulación de la época seca expresa un menor número de proteínas involucradas en el proceso de expresión génica (19) con respecto a la época lluviosa (57), equivalente a una diferencia 50%. Esto no ocurre en el caso de la especie *P. patula* en la cual este proceso se ve enriquecido en la época seca con

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

respecto a la lluviosa (58 y 13 proteínas respectivamente) representando el 63% de diferencia.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

3.4. Discusión

3.4.1 Estudio fisiológico

La variabilidad en las aportaciones hídricas como resultado de la simulación de la época lluviosa y época seca de la meseta central de Angola, influyó en todas las variables morfofisiológicas estudiadas, tanto en *P. greggii* como en *P. Patula*, con mejores resultados en el tratamiento de simulación de la época seca en la fase inicial del experimento, donde la humedad no era un limitante. Una vez que las plantas estuvieron expuestas al déficit hídrico, su efecto negativo comenzó a incidir en las variables, sobre todo en la supervivencia y como era de esperar, las plantas de la época lluviosa mantuvieron su crecimiento normal. Estos resultados han reforzado nuestro punto de vista sobre el déficit hídrico y su efecto negativo en la reducción del crecimiento y sobre la tasa fotosintética (Anjum, *et al.*, 2011).

Supervivencia

El déficit hídrico es citado como el principal factor limitante para la supervivencia (Ceacero, *et al.*, 2012; Akıncı y Lösel, 2012; Claeys e Inze, 2013; Wang, *et al.*, 2013; Ortuño, *et al.*, 2015).

En este estudio la supervivencia no mostró diferencias a lo largo de los primeros 21 días de ensayo para ningún tratamiento. A partir del día 28 se observó que las plantas comenzaron a morir, aumentando la mortalidad hasta el final del período de medición (día 42), en el que el número de bajas fue de 24 en *P. greggii* y 25 en *P. patula*, lo que equivale al 60% y 62,5% de mortalidad respectivamente.

Este resultado es consistente con el de otros autores como Ceacero, *et al.*, (2012); Espinoza, *et al.*, (2014); Ortuño, *et al.*, (2015) y Sigala, *et al.*, (2015) que en sus estudios apuntan a que la supervivencia, la biomasa y el crecimiento de una planta pueden ser afectados por varios factores, entre ellos la humedad del

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

substrato y la temperatura, hasta el punto de provocar serias restricciones en su crecimiento, desarrollo y supervivencia.

Algunos autores como Eloy, *et al.*, (2014) afirman que existe una fuerte dependencia de la supervivencia con variables de crecimiento (altura y diámetro) por ejercer un papel muy importante en el desarrollo de las plántulas y en consecuencia, con los requerimientos de permanencia en vivero.

Crecimiento

Al evaluar la respuesta de las plantas a los tratamientos de simulación (época seca y época de lluvia), se observó que, en la fase inicial del experimento, cuando las aportaciones hídricas eran iguales para los dos tratamientos las plantas del tratamiento de simulación de la época de seca tuvieron un mayor crecimiento. Este resultado podría deberse a que, las plantas de este tratamiento tuvieron una respuesta positiva al factor temperatura, mayor en el tratamiento de lluvia ya que estas temperaturas se alejan del rango óptimo de crecimiento de las dos especies de *Pinus* estudiadas (SIRE-CONABIO, 2006). En este sentido, autores como Viveros-Viveros, (2013) estudiando los caracteres morfológicos de *P. patula* en diversas zonas altitudinales de México indican que los mismos están muy influenciados por el ambiente, sin que sea posible separar el efecto ambiental del genético.

Los requerimientos agroecológicos reportados para estas especies según el Sistema de Información de Reforestación SIRE-CONABIO, (2006), apuntan a que las temperaturas óptimas para el crecimiento de *P. greggii* y *P. patula* oscilan entre 10-20°C, más cercanas a las del tratamiento de simulación de seca, explicando el mayor crecimiento inicial de las plantas (incremento en altura y diámetro) bajo condiciones de irrigación (20±5°C). Este incremento en altura se manifestó apenas hasta el día 21, en que se intensifica el déficit hídrico y las plantas dejan de crecer (altura). Esto sugiere que, mientras que las temperaturas se

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

mantienen en los valores óptimos para estas especies, es posible reducir el riego a una periodicidad de 21 días.

Autores como Gomes y Paiva (2004) consideran al diámetro como una variable importante a tener en cuenta a la hora de evaluar la calidad de las plántulas forestales en el vivero, ya que, cuando el diámetro es mayor la planta tendrá un mejor equilibrio para soportar el crecimiento de la parte aérea. Sin embargo, en este caso, no encontramos diferencias significativas entre los tratamientos, excepto en la medida del día 42 cuando el déficit hídrico es severo y se produce una reducción del diámetro.

Al evaluar la respuesta diferencial por especie se observó que en el tratamiento de la época seca las plantas de las dos especies soportaron 21 días sin regar, sin diferencias significativas en las variables de crecimiento (altura y diámetro). Este resultado podría ser utilizado para el diseño del régimen de riego en estas condiciones climáticas mejorando la gestión eficiente de los recursos hídricos. En este mismo sentido Fox y Montague, (2009) afirman que los valores más altos encontrados en la altura de las plántulas no siempre están asociados a altos niveles de humedad, pudiéndose economizar grandes cantidades de agua en la etapa de vivero.

En este sentido, autores como Vergara, *et al.*, (2017) estudiando los requerimientos hídricos en otras especies forestales como *Gmelina arborea* en vivero concluyen que el manejo hídrico es determinante para el desarrollo y producción de las plántulas y que un exceso de humedad en el sustrato disminuye la cantidad de oxígeno, lo que genera alteraciones en la fisiología de la planta disminuyendo su velocidad de crecimiento. En este mismo sentido, otros autores Villar-Salvador, *et al.*, (1997); Bulfe y Fernández, (2014), afirman que las plantas cuando comienzan a evidenciar condiciones hídricas desfavorables reducen el crecimiento, promueven la aparición de la yema apical y se inician mecanismos de resistencia ante el estrés.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

Otros muchos resultados en estudios sobre déficit hídrico con especies de pinos mexicanos en la etapa de vivero concluyeron que el estrés hídrico es uno de los factores que más influye en el crecimiento de las plantas, generando daños e incluso la muerte en muchas de ellas (Cetina, *et al.*, 2002; Martínez-Trinidad, *et al.*, 2002; Maldonado-Benitez, *et al.*, 2011; Prieto-Ruíz, *et al.*, 2012 y Sigala, *et al.*, 2012).

Potencial hídrico

Con respecto al potencial hídrico (Ψ), los resultados mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos tratamientos de simulación (época seca y lluviosa) y las dos especies. Estas diferencias se acentuaron en la época seca a partir del día 35, alcanzándose los valores más negativos del potencial hídrico en la última medida día 42, (-5,77 MPa y -4,35 MPa) para las especies *P. patula* y *P. greggii* respectivamente. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Bulfe y Fernández, (2014), que estudiando el déficit hídrico en plántulas de *Pinus taeda* L, encontraron que el potencial hídrico tanto antes del amanecer (predawn) como al mediodía, presentó los menores valores (más negativos) en las plantas con restricción hídrica respecto a las plantas control en cada período de estrés.

Estudios realizados evaluando el efecto de diferentes niveles de endurecimiento por estrés hídrico en *Pinus halepensis* Mill., encontraron que las plántulas de *P. halepensis* comenzaron a morir con valores de potencial - 3,7 MPa (Villar-Salvador, *et al.*, 1997). Estos resultados coinciden, en general, con los obtenidos en este trabajo pues el potencial hídrico solo afectó a la supervivencia a partir de la medida 28, cuando el potencial hídrico alcanzó valores de -2,87 MPa y -3,41 MPa para *P. greggii* y *P. patula* respectivamente.

Sin embargo, en otras especies de pino como *Pinus cooperi* algunos resultados muestran como potenciales similares a los que inducen mortalidad en nuestras especies (-3,24) apenas limitan el crecimiento, pero no afectan a la supervivencia (Prieto-Ruíz, *et al.*, 2012). En este mismo sentido Ritchie y Landis,

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

(2010) apuntan que en la etapa de vivero las coníferas bajo condiciones de estrés disminuyen su potencial hídrico el cual incide en los procesos fisiológicos de las plantas afectando su crecimiento pero muchas veces no, su supervivencia.

Por su parte Prieto, *et al.*, (2004), estudiando la respuesta a estrés hídrico de *Pinus Engelmannii* Carr. producidos en vivero manifestaron que las coníferas son capaces de soportar altos niveles de estrés hídrico, con valores de potencial hídrico de hasta -1,2 MPa sin afectar al crecimiento. Esto estaría en concordancia con los resultados encontrados en este estudio, ya que el crecimiento (altura y diámetro) apenas se limitó a partir de 21 días sometidos a sequía, cuando el potencial hídrico había alcanzado valores -2,61 MPa y -2,62 MPa en *P. greggii* y *P. patula* respectivamente. Estos resultados concuerdan también con las observaciones realizadas por Ávila-Flores, *et al.*, (2014), que en su trabajo sobre preacondicionamiento de *Pinus engelmannii* Carr. mediante déficit de riego en vivero concluyeron que hasta una reducción del potencial hídrico a valores de - 2.90 MPa no produjo una limitación en el crecimiento en altura y diámetro del cuello de las plántulas.

Fluorescencia

Como es bien conocido la luz absorbida por la molécula de clorofila es transformada a través de las reacciones fotoquímicas del proceso de la fotosíntesis de energía luminosa a energía química, emitida en forma de fluorescencia o disipada como energía térmica (Ceacero, *et al.*, 2010). Esto implica que cuando se mide la fluorescencia en determinadas circunstancias se puede conocer la eficiencia de los otros dos procesos (fotoquímica y disipación en forma de calor).

Como ha sido reportado por Baker y Rosenqvist, (2004) el estudio de parámetros como la fluorescencia de la clorofila se ha utilizado de forma rutinaria durante muchos años para examinar el estado del aparato fotosintético de las plantas, tanto en condiciones controladas como de campo, permitiéndonos obtener

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

informaciones cualitativas y cuantitativas de absorción y aprovechamiento de la energía luminosa por el fotosistema II.

En este estudio, de forma general, los valores más altos de todas las variables estudiadas relacionadas con la fluorescencia se detectaron en el tratamiento de simulación de la época de lluvia con respecto a la época seca y la especie *P. patula* presentó los valores más altos con respecto a *P. greggii* en ambas épocas. Cabe destacar que las diferencias entre los valores alcanzados por las dos especies no cobraron significación estadística hasta la última medida (día 42), quizás estos resultados estén relacionados con el crecimiento (altura) ya que la especie *P. greggii* tuvo mayor crecimiento que *P. patula*. A este respecto Di Benedetto y Tognetti, (2016) estudiando diferentes especies forestales en condiciones de campo encontraron relación entre el crecimiento en altura y la capacidad fotosintética, afirmando que un aumento del crecimiento de las plantas puede limitar la expansión de la hoja y la fotosíntesis.

En el caso particular de la relación (Fv/Fm), esta variable no presentó diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$), hasta el día 28 del ciclo de evaluación, con valores medios que oscilan entre 0,4 e 0,8. A partir de la medida del día 35, se observan diferencias significativas entre los tratamientos, detectándose los valores más bajos en el tratamiento de simulación de la época de seca, tanto en *P. patula* como en *P. greggii*, con valores de 0,35 y 0,38 respectivamente. Esta disminución fue acentuándose hasta llegar a 0 al final del ensayo, es decir después de 42 días sin regar. Similares resultados fueron obtenidos por Ditmarová, *et al.*, (2010), estudiando la respuesta fisiológica de plántulas de abeto rojo (*Picea abies*) al estrés por sequía detectaron una disminución significativa de la relación Fv/Fm cuando el estrés hídrico fue severo.

La eficiencia fotoquímica (PHiE0) se comportó de forma análoga, es decir, de forma general no se encontraron diferencias significativas, ($P > 0.05$), con valores entre 0,1 y 0,2. Ya a partir del día 42, es decir al final del experimento estas diferencias cobraron significación estadística, llegando a alcanzar valor 0.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

Cabe destacar que a pesar de haberse detectado las diferencias significativa solo al final del experimento, la especie *P. patula* alcanzó los valores más altos, lo cual puede estar relacionado con el hecho de que esta especie tuvo menor crecimiento en altura que la especie *P. greggii*.

Por último, fue constatada una correlación positiva ($r= 0,495$) entre el índice de Ejecución (PI_{ABS}) y la eficiencia fotoquímica ($PHiE0$). Esto implica que la máxima eficiencia fotoquímica primaria de las hojas es directamente proporcional al índice de Ejecución (PI_{ABS}) por tanto a medida que aumenta la variable $PHiE0$, aumenta (PI_{ABS}).

Según autores como Ceacero, *et al.*, (2012) estudiando la detección temprana del estrés ambiental mediante el análisis de la fluorescencia de la clorofila de brinzales de encina (*Quercus ilex* sub. *ballota*), plantean que el (PI_{ABS}) nos revela una información integrada de los procesos más importantes del sistema fotosintético, por lo que un aumento del (PI_{ABS}) refleja un aumento en la funcionalidad del fotosistema I y II de la planta bajo condiciones de estrés. Por lo tanto, podemos inferir que esto constituye un buen indicador para evaluar las condiciones fisiológicas del aparato fotosintético.

En este mismo sentido Guadagno, *et al.*, (2017) estudiando la fluorescencia variable en coníferas (*Picea engelmannii* y *Pinus contorta*) bajo diferentes regímenes de agua encontraron una fuerte correlación ($r = 0,85$) entre la eficiencia fotoquímica ($PHiE0$) y la fluorescencia variable (Fv/Fm), sugiriendo que la medición de la fluorescencia de la clorofila puede utilizarse como indicador de la supervivencia de las planta ante un déficit hídrico.

Resultados similares fueron obtenidos por Taïbi, *et al.*, (2017) en estudios relacionados con la tolerancia a la sequía de *Pinus halepensis* informan que la eficiencia máxima de PSII (Fv/Fm) fue mayor en las plántulas que crecieron en condiciones de riego con respecto a las que crecieron en condiciones de sequía. Estos resultados son consistentes con los reportado por Zhang, *et al.*, (2017)

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

con otras gimnospermas los cuales concluyen que estas especies tropicales y subtropicales muestran disminuciones estacionales en la tasa fotosintética.

Estos resultados están en consonancia con los encontrados por Mejía de Tafur, *et al.*, (2014), que estudiando la respuesta fotosintética de *Eucalyptus grandis* W. Hill a la disponibilidad de agua en suelo y a la intensidad de luz, concluyeron que *E. grandis* reduce la tasa de fotosíntesis de manera significativa ante un déficit hídrico en el suelo. Otros resultados similares fueron encontrados.

Nuestros resultados y los de los autores citados contrastan con los de Junqueira *et al.*, (2013), que en un estudio sobre la respuesta fisiológica de genotipos de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* a la falta de disponibilidad hídrica y a la fertilización potásica afirman que el déficit hídrico no afectó a la relación Fv/Fm debido a que la fertilización potásica disminuyó los efectos negativos del déficit hídrico en la etapa inicial de crecimiento del eucalipto. Estos autores relacionan resultados con el período de estrés, el cual podría haber sido insuficiente para inducir alteraciones en la eficiencia fotoquímica, o quizás a un aumento en la tolerancia de estos genotipos al déficit hídrico.

Al respecto, Baker y Rosenqvist, (2004) apunta que en condiciones de estrés abiótico (déficit hídrico) ocurre una disminución característica en la eficiencia cuántica potencial del fotosistema II, pudiendo ser detectada por la disminución de los valores de la relación Fv/Fm y PHiE0, sobre todo cuando el déficit hídrico es severo. A este respecto algunos autores consideran que el cierre estomático, es una de las primeras respuestas de las plantas para reducir la pérdida de agua bajo condiciones de estrés hídrico, lo que provoca una disminución de la tasa fotosintética (Pita, *et al.*, 2005; Buckley, *et al.*, 2011).

Por estas razones algunos autores (Jiménez-Suanca, *et al.*, 2015) consideran la fluorescencia como una herramienta de evaluación eficaz bajo los efectos del estrés, ya que la respuesta de las plantas es un buen indicador del estado del aparato fotosintético y por tanto, de las condiciones fisiológicas.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

3.4.2. Estudio molecular

Los resultados del estudio fisiológico, que apuntaban a una mayor resistencia al déficit hídrico de *P. greggii* en relación a *P. patula*, han sido reforzados por los resultados obtenidos a nivel molecular. Teniendo en cuenta que el estudio a nivel proteómico permitió una mayor identificación de proteínas expresadas en la especie *P. greggii* en la simulación de la época de seca cuando comparada con la especie *P. patula*. Estas diferencias en la síntesis mayoritaria de proteínas identificadas en la especie *P. greggii* podría estar relacionada con una estrategia de respuesta, protección o adaptación desarrollada por la especie en condiciones de estrés, aportándole una elevada capacidad ecofisiológica para tolerar la sequía, lo que justificaría su amplia adaptabilidad y distribución en el mundo.

En este sentido autores como García-Morales, *et al.*, (2013); Jorge, *et al.*, (2015); Choudhury, *et al.*, (2017) afirman que las plantas no solo responden al estrés hídrico a nivel fisiológico, sino que esta respuesta también es inducida a nivel molecular, siendo esta quizás una de las más importantes.

Las observaciones referentes al análisis de los términos de Ontología Génica de enriquecimiento para los procesos biológicos revelaron una abundancia significativa de proteínas en procesos biológicos comunes en las dos especies, cuando están expuestas a la misma condición experimental (época lluviosa y seca), no obstante, cabe destacar que este nivel de expresión varía según la especie.

La expresión mayoritaria de proteínas en la simulación de la época lluviosa se identificó en la especie *P. patula* con respecto a *P. greggii* y los procesos más enriquecidos para ambas especies en esta época se resumen a continuación.

La sobreexpresión de proteínas relacionadas con el **metabolismo** (primario, de sustancias orgánicas, proteínas y de componentes del nitrógeno)

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

está relacionado con los procesos de germinación crecimiento, desarrollo y reproducción, y en esta época en la que el riego no fue un limitante, las plantas continuaron su crecimiento normal hasta el final del experimento (día 42) no siendo así en la simulación de la época de seca donde el crecimiento (altura) se detiene a partir del día 21. Estos resultados son corroborados por Pita, *et al.*, (2005) en *Eucalyptus globulus*; Matthew, *et al.*; (2015) en *Pinus radiata*; Du, *et al.*, (2018) en *Pinus Massoniana* los cuales reportan que el procesos de la fotosíntesis se inhibe en condiciones de sequía y consecuentemente disminuye la tasa de crecimiento de las plantas.

Los **procesos biosintéticos** relacionados con la síntesis de sustancias orgánicas y **la fotosíntesis** también estuvieron enriquecidos. Se verificó una disminución en el nivel de expresión de las **proteínas responsables de estímulos extracelulares**, debido quizás a que en esta época las plantas no estaban estresadas y por tanto no percibieron ninguna señal ambiental que justificara una sobreexpresión en este proceso.

Al respecto estudios previos realizados por Taïbi, *et al.*, (2017); Fox, *et al.*, (2018); Du, *et al.*, (2018), estudiando déficit hídrico en otras especies de *Pinus* reportaron enriquecimiento en el proceso de la fotosíntesis en los tratamientos con riego, lo que sugiere que el proceso de fotosíntesis, el crecimiento y consecuentemente la supervivencia de las plantas se asocia con buenas condiciones de irrigación. Esto está en sintonía con los resultados encontrados por El-Asmar, *et al.*, (2017) que investigando la eficiencia del uso de agua utilizando como planta modelo *Pinus pinea*, particularmente en las regiones áridas, reveló que un aumento en la retención de agua del sustrato prolonga el tiempo de supervivencia de las plántulas de pino en un 90%.

Otros resultados similares fueron reportados por Gustafson, *et al.*, (2017) en diferentes especies arbóreas que señalan que el riego aumenta el proceso de fotosíntesis y la producción de biomasa.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

Otros autores como Siles, *et al.*, (2010) o Becerra, *et al.*, (2013), evaluando la eficiencia del riego en diferentes especies arbóreas nativas han reportado un efecto positivo del mismo en la supervivencia y el crecimiento de las plántulas.

En la simulación de la época seca la expresión mayoritaria se identificó en la especie *P. greggii*. Los procesos biológicos enriquecidos en ambas especies incluyen las categorías de **biosíntesis, metabolismo y componentes de la organización celular**.

La sobreexpresión de los procesos biosintéticos se asoció con la biosíntesis de osmólitos, aminoácidos, flavonoides, terpenos y fitohormonas como el ácido abscísico (ABA), considerada como un indicador del proceso adaptativo de las plantas al estrés, ya que sus niveles se incrementan en los tejidos vegetales cuando las plantas están expuestas a diferentes tipos de estrés abióticos (Moreno, 2009; Florido y Bao 2014).

El **metabolismo** (carbohidratos, lípidos, sustancias orgánicas, componentes del nitrógeno y péptidos) y los **componentes de la organización celular** fueron otros de los procesos enriquecidos, pudiendo asociarse con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, reactive oxygen species) en las células vegetales. Autores como García-Morales, *et al.*, (2013) consideran que su síntesis afecta negativamente a los componentes de la estructura celular (lípidos y a las proteínas) y el metabolismo. Sin embargo, Choudhury, *et al.*, (2017) en sus investigaciones concluyen que mientras las células vegetales mantengan reservas de energía lo suficientemente altas como para desintoxicar las ROS, éstas son beneficiosas para las plantas durante el estrés abiótico, permitiéndoles ajustar su metabolismo y adaptarse a estas condiciones.

En este mismo sentido Pastore, *et al.*, (2007) plantean que el aumento en la producción de ROS, el mantenimiento de la estabilidad de la membrana celular, la síntesis de antioxidantes como la *catalasa*, que elimina, H₂O₂ en los peroxisomas, la *peroxidasa* (APX) que elimina H₂O₂ en los cloroplastos, mitocondrias y

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

citoplasmas y la *superóxido de dismutasa* (SOD), que elimina el superóxido O_2^- , son algunos de los mecanismos de protección inevitables que desarrollan las plantas para superar el estrés abiótico.

En cuanto al enriquecimiento identificado en la época de sequía del metabolismo de las sustancias orgánicas, lípidos y de los componentes del nitrógeno, los resultados encontrados son consistentes con las investigaciones realizadas por Bavita, (2015), que considera la modificación en la función de las membranas (celular, fotosintética y mitocondrial), como uno de los procesos más dañinos detectado en las plantas ante condiciones de estrés abiótico, lo que está estrechamente relacionado con el metabolismo de los lípidos y las proteínas. Este resultado es consistente con los de Jaleel, *et al.*, (2008); Du, *et al.*, (2018) que reportan que, en condiciones de déficit hídrico, ocurre una inhibición de la fotosíntesis, alteraciones en el metabolismo y finalmente la muerte de las plantas.

El enriquecimiento relacionado con los componentes del nitrógeno podría asociarse con la biosíntesis de poliaminas (PA). Según autores como Sequera-Petrov, *et al.*, (2015); Sequera-Mutiozabal, *et al.*, (2016), estos metabolitos nitrogenados, se acumulan en las plantas en condiciones de estrés y están relacionados con el ácido abscísico e integrados con los procesos de señalización de especies reactivas de oxígeno (ROS), aumentando así la tolerancia de las plantas a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico.

En este sentido autores como Muilu-Mäkelä, *et al.*, (2015) estudiando las respuestas metabólicas y fisiológicas a la disponibilidad de agua de las plántulas de pino silvestre (*Pinus sylvestris* L.) en la fase de crecimiento revelaron que la expresión de los genes relacionados con la biosíntesis de compuestos nitrogenados como poliaminas, la arginina descarboxilasa (ADC), la espermidina sintasa (SPDS) y la termospermina sintasa (ACL5,) no se ve afectada por el estrés hídrico.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

Los últimos procesos sobrepresados por aumento fueron los **responsables de estímulos abióticos y de expresión génica**. Estos procesos están relacionados con la síntesis de proteínas de prevención contra daños proteicos, como es el caso de las proteínas LEA (*Late Embriogenesis Abundant Proteins*). Según Pinho dos Reis, *et al.*, (2016) y Nadeem, *et al.*, (2019), las plantas inducen varios genes en respuesta a la sequía. Algunos de ellos codifican las proteínas LEA, las acuaporinas, las moléculas de señalización, los factores de transcripción, mientras que otros, pueden participar en la síntesis de osmoprotectores como la glicina e incluso algunas pueden funcionar como antioxidantes, protegiendo las estructuras de la membrana de los daños causados por la sequía, regulando el estatus redox o actuando como desintoxicador de radicales libres

Básicamente el proceso en el que se identifica una reducción significativa en el nivel de expresión fue el proceso de la **fotosíntesis**, pudiendo estar asociado a alteraciones en los procesos fotoquímicos a nivel del fotosistema II (*PSII*), a una disminución de la actividad de la Rubisco, o al sistema generador de ATP (Medrano, *et al.*, 2002). En este mismo contexto, autores como Pšidová, *et al.*, (2015) estudiando la respuesta fotosintética de plántulas de haya europea (*Fagus sylvatica* L.) al déficit hídrico reportaron que en situaciones de simulación de las condiciones de sequía por la interrupción del riego se observa una disminución en la eficiencia de la fotoquímica primaria en el *PSII*.

De acuerdo a los presentes resultados, anteriores estudios han demostrado también que el proceso de la fotosíntesis se ve inhibido en condiciones de estrés, no solo nivel fisiológico, sino también a nivel molecular, pues como fue mencionado anteriormente en el acápite de resultados, existe una subexpresión de proteínas (Ribulosa 1-5 bifosfato carboxilasa/ oxigenasa (Rubisco), fructuosa 1,6 bifosfato (FBPase) y la piruvato ortofosfato dikinasa (PDK), asociadas con este proceso (Anexo 3.2).

Esta subexpresión se identificó en ambas especies, aunque con mayor intensidad en *P patula*. Resultados estos quizás un poco contradictorios ya que la

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

variable fluorescencia en la especie *P. patula* alcanzó mayores valores al final de experimento (día 42) con respecto a *P. greggii*, lo que en teoría demostraría podría deberse al alto grado de complejidad de los sistemas biológicos cuando son expuestos a determinadas condiciones ambientales Huang, *et al.*, (2009). Otra posible causa puede estar relacionada con el tipo de estudio, ya que en los estudios de alto rendimiento se realiza una evaluación masiva de todas las proteínas (proteoma) de forma simultánea, generando una gran cantidad y variedad de datos que obliga a la implementación de flujos de análisis/procesamiento extremadamente complejos que se precisan corregir para evitar que esta variabilidad interfiera en los resultados (Veit, *et al.*, 2016; Pfeuffer, *et al.*, 2017).

En general este estudio arroja resultados que subrayan las conclusiones obtenidas en gran parte de los trabajos previos en este campo por García-Morales, *et al.*, (2013), los cuales plantean que la respuestas al estrés por sequía requiere de la síntesis de proteínas metabólicas importantes, como las que participan en la síntesis de osmoprotectores, y la operación de proteínas reguladoras en la ruta de transducción de señales, o los factores de transcripción, ya que la mayoría de estas respuestas implican el control y la regulación de la expresión de genes.

Estos resultados coinciden con los encontrados por Fox, *et al.*, (2018) que estudiando la especie *Pinus halepensis* tras el análisis de enriquecimiento para procesos biológicos relacionados con la sequía identificó en total diez procesos biológicos, de los cuales, existía un aumento en los relacionados con el nivel de transcripción (condiciones de riego) los procesos relacionados con el metabolismo de sustancias orgánicas, el metabolismo del ADN, la biosíntesis (flavonoides, terpenos y hormonas) y la fotosíntesis y una disminución de la transcripción en los procesos catabólicos de almidón, polisacárido y manano.

De forma análoga, Wang, *et al.*, (2013), en estudios realizados con *Pinus massoniana* Lamb, concluyen que ante condiciones de estrés la expresión de proteínas está relacionada básicamente con cinco categorías funcionales:

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

fotosíntesis, metabolismo energético o primario, metabolismo secundario, estabilidad proteica y defensa. Éstos pueden estar regulados por aumento/disminución de expresión. En este caso en particular, están regulados por disminución los procesos de fotosíntesis y metabolismo primario y por aumento los relacionados con la estabilidad proteica y de defensa.

También Sancho-Knapik, *et al.*, (2017), estudiando déficit hídrico en *Pinus* sp encontró sobreexpresión en los procesos biosintético de osmólitos como la prolina, otros relacionados con la acumulación de ABA y por disminución el proceso de fotosíntesis.

Estos resultados coinciden con los hallazgos de otros estudios realizados por Bechtold, *et al.*, (2016) con la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, que en condiciones de sequía los cambios de los niveles de expresión en los procesos de metabolismo y expresión génica aumentan la tolerancia a la sequía e inician diversas respuestas de evitación y escape de la sequía.

También se han encontrado resultados similares por Müller, *et al.*, (2017), que analizando la expresión génica diferencial en condiciones de estrés por sequía en otras especies forestales como el caso de haya europea (*Fagus sylvatica*)m mostró enriquecimientos de los términos GO en las plantas estresadas en los procesos relacionados con el metabolismo de los lípidos, y la homeostasis.

Por su parte investigadores como Liu, *et al.*, (2015) también encontraron resultados similares en otras especies vegetales como el trigo (*Triticum aestivum* L.) observaron que bajo condiciones normales de irrigación existía un enriquecimiento en las categorías funcionales de la fotosíntesis y las rutas de biosíntesis de nutrientes en relación a plantas estresadas.

Aplicación de técnicas de genómica funcional a la caracterización de la respuesta al estrés hídrico y a inoculación de micorrizas de especies de *Pinus* spp. del polígono forestal de la Chianga-Huambo, Angola.

3.5. Conclusiones

La presente investigación ha analizado el comportamiento fisiológico y molecular de las dos especies de *Pinus* bajo la simulación de las dos condiciones naturales (época seca y lluviosa) del Planalto Central de Angola. A partir de los resultados obtenidos fueron extraídas las siguientes conclusiones:

En la simulación de la época de seca de la meseta central de Angola, las plantas de *P. greggii* y *P. patula* soportaron 21 días sin regar sin diferencias significativas en las variables de crecimiento altura y diámetro. Este resultado podría ser utilizado para una gestión optimizada de los recursos hídricos en condiciones de vivero.

Los resultados del estudio molecular demuestran que la expresión diferencial de proteínas fue mayoritaria en la simulación de la época seca comparada con la época lluviosa y en la especie *P. greggii* con respecto a la especie *P. patula*.

El análisis de ontología de genes (GO) indicó que el estrés por sequía en *Pinus* spp, está relacionado con un aumento en el nivel de la expresión de proteínas en los procesos relacionados con el metabolismo, biosíntesis, organización celular, estímulos abióticos y expresión génica, mientras que por disminución de expresión en los procesos relacionados con la fotosíntesis y el crecimiento.

De forma general, las plántulas de *P. greggii* fueron más tolerantes a la sequía que las plántulas de *P. patula*. Esta información puede ser utilizada como base para la selección de las especies a introducir en los programas de restauración de zonas con condiciones limitantes de agua.

***Capítulo 4. Análisis fisiológico y proteómico de plantas de
Pinus patula micorrizadas con Pisolithus tinctorius (Pers.)
bajo déficit hídrico***

4.1 Introducción

En la actualidad las ectomicorrizas son consideradas una parte esencial del ecosistema forestal, siendo utilizadas a nivel mundial en los programas forestales, ya que las plantas micorrizadas toleran mejor las condiciones de estrés fisiológico, como el estrés post-trasplante, ciclos de sequía prolongados, salinidad excesiva o deficiencia de nutrientes en suelo (Reverchon, et al., 2012).

Angola es un país con un patrimonio forestal casi único en el África Subsahariana, tanto en términos cuantitativos como cualitativos, que de ser explotados de forma sostenible podrían contribuir al desarrollo económico, social y ambiental del país (MINUA, 2006). Uno de los principales factores que limita la supervivencia y el crecimiento de las plantas forestales en Angola es la seca estacional, la cual puede agravarse en los próximos años según las previsiones de cambio climático.

El estrés hídrico ocasionado por la sequía puede afectar géneros de plantas forestales como es el caso de *Pinus* uno de los géneros exóticos más plantados en Angola y que junto a *Cupressus*, ocupan una superficie aproximada de 148.000 hectáreas (PDMPSA, Plano de Desenvolvimento de Médio Prazo do Sector Agrário., 2012).

Entre las posibles soluciones a dicho problema se encuentra la aplicación de tecnologías que permitan producir plantas más resistentes a períodos de estrés hídrico severo comenzando a partir de la etapa de vivero. Es, en esta línea en la cual las micorrizas cobran una gran importancia como alternativa biotecnológica, ya que con la inoculación de las plántulas en vivero mediante hongos ectomicorrícicos se puede garantizar el éxito del establecimiento y desarrollo de estas plántulas aumentando su supervivencia en campo (Fernández, et al., 2013).

Entre los géneros de hongos ectomicorrícicos (HECM) más utilizados se encuentran *Hebeloma*, *Laccaria*, *Rhizophogon*, *Scleroderma*, *Suillus* y *Pisolithus*. (Gómez-Romero, et al., 2013). *Pisolithus tinctorius* es considerado un género de gran interés forestal ya que establece simbiosis ectomicorrícica con gran variedad de plantas entre las que se incluyen más de veinte géneros de gimnospermas y angiospermas con distribución mundial; incluyendo especies forestales de las familias *Casuarinaceae*,

Genómica funcional aplicada a la caracterización de la respuesta a estrés hídrico y a la inoculación de micorrizas en *P. greggi* y *P. patula* introducidas en el polígono forestal de Chianga- Huambo, Angola

Dipterocarpaceae, *Oleaceae*, *Myrtaceae* y particularmente las *Pinaceae* (Pérez-Moreno y Read, 2004; García-Rodríguez, et al., 2006; Ambríz, et al., 2010; Arija, et al., 2013).

La respuesta a estrés hídrico del género *Pinus* no solo se ha estudiado a nivel morfológico y fisiológico sino también a nivel molecular (Ariza, 2011; Wang, et al., 2013; Xu y Wu, 2016). En estos trabajos se han identificado en distintas condiciones de estrés proteínas reguladoras del metabolismo, fotosíntesis, transducción de señales y transcripción. Sin embargo, los estudios realizados no son suficientes (Prieto, et al., 2012). En el caso particular de Angola no se conocen estudios sobre las alteraciones de proteínas bajo estrés hídrico en este género.

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la inoculación del hongo ectomicorrícico *Pisolithus tinctorius* en plántulas de *P. patula* sometidas a sequía a través de un análisis morfofisiológico y proteómico.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1. Estudio a nivel fisiológico

4.2.1.1 Material vegetal

Este ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio del Grupo de Investigación de Evaluación y Restauración de Sistemas Agrícolas y Forestales (RNM360) de la Universidad de Córdoba, España.

La producción de las plantas se realizó a partir de semillas certificadas de las especies de *Pinus patula* y *Pinus greggii* procedentes de México, suministradas por el Banco de Semillas del Centro de Genética Forestal, (CNRGM), las cuales fueron previamente desinfectadas por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio NaClO al 5% y aclarado posterior con agua corriente. La siembra se realizó en bandejas de cultivo con contenedor de 300 cm³ de capacidad (desinfectados con NaClO al 5%, durante 30 min antes de ser utilizado). El sustrato empleado estaba compuesto de 75 % de turba y 25 % de perlita, esterilizado en autoclave durante 1 hora a 120°C, tres veces, dejando intervalos de enfriamiento de 24 horas.

El hongo ectomicorrícico utilizado fue *Pisolithus tinctorius* procedente del MICOLOGIA FORESTAL & APLICADA, S.L.

A los 6 meses de edad las plantas fueron inoculadas disolviendo 2g de inóculo (*Pisolithus tinctorius*) por planta lo más próximo de la raíz. Este protocolo se repitió a los 15 días para garantizar su efectividad.

4.2.1.2 Diseño experimental

El ensayo se llevó a cabo en cámaras de cultivo, bajo condiciones controladas, simulando las condiciones naturales de la Meseta Central de Angola (época seca) con temperatura medias anuales entre de $20\pm 5^{\circ}\text{C}$, una humedad constante durante todo el día y un fotoperiodo de 12 horas de luz/12 de oscuridad.

El experimento se inició cuando las plantas tenían 10 meses de edad y se prolongó durante un periodo de 35 días. El riego, en los tratamientos regados se realizó 3 veces por semana manteniendo siempre el 100% de la capacidad de campo en cada alveolo.

Los tratamientos fueron divididos en dos grupos funcionales (mesas), que fueron rotando a lo largo del ensayo para evitar que cualquier posible anomalía de la cámara (posición respecto a los focos, respecto a la puerta de entrada o los ventiladores y humificadores) afectara de forma significativa alguno de los tratamientos.

Tratamientos

En el ensayo fueron evaluados cuatro tratamientos (Tabla 1), empleándose un total de 320 plantas. Para las medidas no destructivas y el seguimiento de la supervivencia se utilizaron 160 plantas (40 x 4 tratamientos) y para las medidas destructivas (potencial hídrico, contenido relativo de agua del cepellón y parte aérea) 80 plantas (4 plantas x 4 tratamientos x 5 tomas de muestras 0, 21, 28 y 35 días).

Tabla 1. Tratamientos evaluados en el experimento

Tratamientos	Denominación	Descripción
T1	TPIC	Patula Inoculado con micorriza / riego
T2	TPI	Patula Inoculado con micorriza / sin riego
T3	TPNIC	Patula No inoculado con micorriza / riego
T4	TPNI	Patula No inoculado con micorriza / sin riego

4.2.1.3 Medidas morfológicas y fisiológicas

Durante el periodo de seguimiento del ensayo se evaluó la supervivencia, el crecimiento (altura y diámetro), el potencial hídrico del xilema al amanecer, el contenido relativo de agua del cepellón y parte aérea, y la fluorescencia de las acículas. Las mediciones para todas las variables evaluadas se realizaron en cuatro ocasiones, a los 0, 21, 28 y 35 días del experimento.

El crecimiento fue evaluado a partir de la *altura de la parte aérea y el diámetro del cuello de la raíz*. La altura se midió con una regla graduada desde la base (cuello de la raíz) hasta la yema apical y el diámetro mediante calibre digital Mitutoyo Absolute digital (Mitutoyo Inc., UK, e ± 0.1 mm).

La supervivencia se midió a lo largo del ensayo mediante inspección visual, considerando planta viva aquella que tenía al menos un tercio de su parte aérea funcional y muerta, aquella que no tenía ni un tercio de su parte aérea verde.

El potencial hídrico del xilema fue medido justo antes del inicio de la iluminación (ψ_a), mediante una cámara de Scholander o cámara de presión (SKPM 1400, Skye Instrumentos) Scholander, *et al.*, (1965). Para ello se retiraron 4 plantas por especie y por tratamiento.

Para determinar el contenido relativo de agua del cepellón y parte aérea, se retiraron cuatro plantas de cada tratamiento que fueron pesadas en fresco en una balanza Metler Toledo ($e \pm 10$ mg). Una vez pesadas en fresco, se mantuvieron en estufa de convección a 72 °C durante un periodo de 72 horas, tras las cuales fueron pesadas de nuevo.

La fluorescencia de las acículas fue medida sobre un grupo de acículas del tercio central de cada planta en 20 plantas por tratamiento con un fluorímetro (Plant Efficiency Analyzer, Hansatech Instruments) (Navarro-Cerrillo, *et al.*, 2004). La medida con el fluorímetro (Plant Efficiency Analyzer, Hansatech Instruments) se realizó dos horas después de la iluminación de la cámara. Tras un periodo de oscuridad de 30 minutos, en el que las acículas se protegen mediante una pinza de exclusión de luz del exterior, se le suministra una luz continua y homogénea, a través de 6 diodos que emiten luz actínica roja a 660 nm de intensidad (a 4500 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$), sobre una superficie de 4 mm. Una vez registrados los datos, éstos se analizaron aplicando las ecuaciones del JIP-test

Genómica funcional aplicada a la caracterización de la respuesta a estrés hídrico y a la inoculación de micorrizas en *P. greggi* y *P. patula* introducidas en el polígono forestal de Chianga- Huambo, Angola

mediante el software Biolyzer Strasser y Tsimilli-Michael, (2001). Las variables estudiadas fueron la relación F_v/F_m como indicador de la proporción de energía atrapada en los centros de reacción que no se ha dispersado en forma de calor ni como fluorescencia, es decir, la máxima energía que pasa a los centros de reacción de la absorbida inicialmente, la eficiencia fotosintética (PHiE0), como un indicador de la energía que ha pasado a los centros de reacción y se utiliza en la cadena de transporte de electrones respecto de la que se absorbió en el complejo antena del fotosistema II y el “Performance Index” (PIabs) o índice de ejecución, como un índice global que resume la eficiencia del sistema (Hermans, *et al.*, 2003) Figura 4.1.

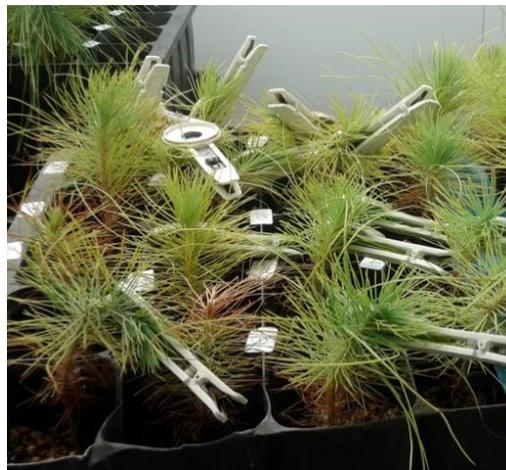


Figura 4.1. Medida de fluorescencia. Plántulas de *Pinus patula* al inicio del experimento (10 meses de edad).

4.2.1.4 Análisis estadístico

Los datos de las variables de cada tratamiento, crecimiento (diámetro del cuello de la raíz y altura), supervivencia, porcentaje de humedad de la parte aérea y del sustrato y fisiológicas (potencial hídrico del xilema, fluorescencia de la clorofila), fueron sometidos a un test de normalidad y de homogeneidad de varianza. Los datos expresados como porcentaje fueron estandarizados utilizando la Transformación Angular de Bliss. Posteriormente se realizó un análisis de varianza ANOVA según modelo lineal de clasificación simple, con un nivel de confianza del 95%. Al existir diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos se realizó una prueba de rango múltiple de Tukey para un 5% de significación para comparar las medias utilizando el programa estadístico SPSS® versión 22,0 para Microsoft® Windows® (Visuata, 1998).

Genómica funcional aplicada a la caracterización de la respuesta a estrés hídrico y a la inoculación de micorrizas en *P. greggi* y *P. patula* introducidas en el polígono forestal de Chianga- Huambo, Angola

4.2.2. Estudio molecular

El estudio molecular se realizó en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba, siguiendo la misma metodología descrita en los capítulos anteriores (2 y 3).

4.3. Resultados

4.3.1. Estudio fisiológico

De forma general, los mejores resultados fueron encontrados en el tratamiento T3 (no inoculado/con riego), sin diferencias significativas con los tratamientos T1 y T2 (inoculado/con riego e inoculado/sin riego, respectivamente) y con diferencias estadísticamente significativas con el tratamiento T4 (no inoculado/sin riego). Las diferencias fueron más acentuadas a los 28 y 35 días de tratamiento.

Supervivencia

Con respecto al porcentaje de supervivencia, en la Figura 4.2 se puede verificar como la supervivencia estuvo influenciada por la inoculación: as plantas inoculadas, a pesar de estar expuestas a un déficit hídrico durante 35 días, presentaron un 60% de supervivencia frente al 33,3% de las plantas no inoculadas. En los tratamientos control (con o sin inoculación) sin interrupción del riego, el porcentaje de supervivencia fue del 100%

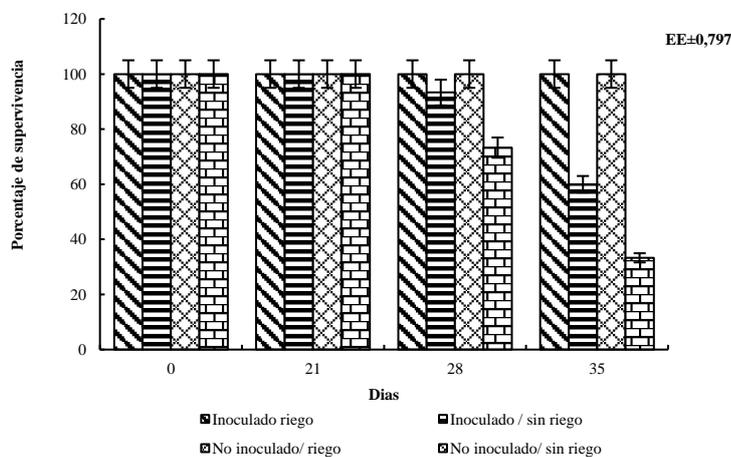


Figura 4.2. Porcentaje de supervivencia de la especie *Pinus patula* con inoculación del hongo ectomicorrízico (*Pisolithus tinctorius*), expuesta a un déficit hídrico de 35 días.

Crecimiento

En el caso de las variables de crecimiento (figura 4.3 y 4.4), las plantas tuvieron un mayor desarrollo, tanto en altura como en diámetro en el tratamiento T3 (No inoculado/riego).

Con respecto a la altura, al inicio del ensayo, cuando las plantas tenían 10 meses de edad la altura media en las plantas de todos los tratamientos era de 9 ± 2 cm. Los valores más altos de altura (11,36 cm) se alcanzaron a los 35 días en el tratamiento T3 (No inoculado/riego), lo que equivale a un incremento mensual aproximado de 0,6 cm. Este incremento en altura a los 21 días se observó en general en todos tratamientos sin diferencias significativas entre ellos.

En las medidas realizadas a los 28 y 35 días de experimento, se observaron diferencias significativas (95% de significación) entre el tratamiento T4 (no inoculado/sin riego) con el resto de los tratamientos. Estas diferencias entre los valores de la altura de las plantas están relacionadas con la supervivencia de las mismas, ya que cuando se determinaron a los 28 y 35 días, aproximadamente el 27% y 67% de las plántulas estaban muertas.

En la figura 4.3 B, se representa los resultados relacionados con el diámetro de las plantas. En la misma se observa que los mayores valores (2,52 cm) fueron alcanzaron en el tratamiento T3 (No inoculado/riego), superando significativamente a los demás tratamientos a los 35 días de experimento.

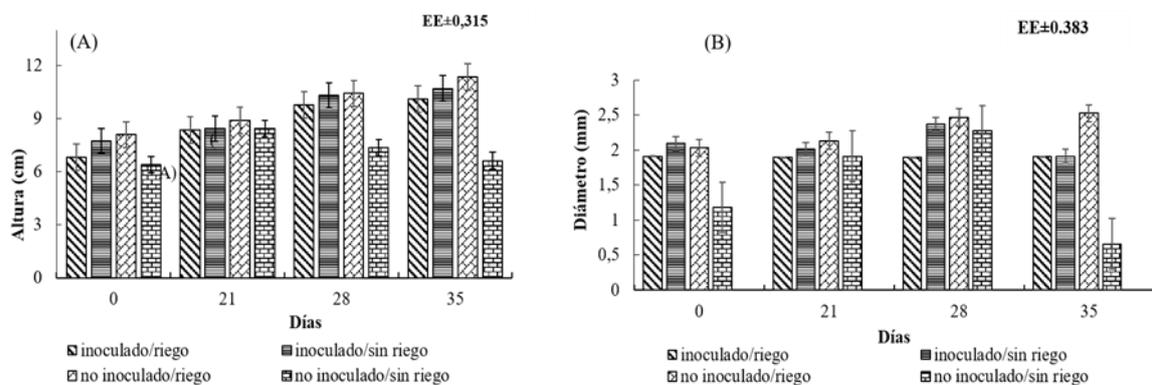


Figura 4.3. Evolución temporal de las variables de crecimiento estudiadas en todos los tratamientos a lo largo del experimento. Representado con la letra (A) la altura con (B) el diámetro.

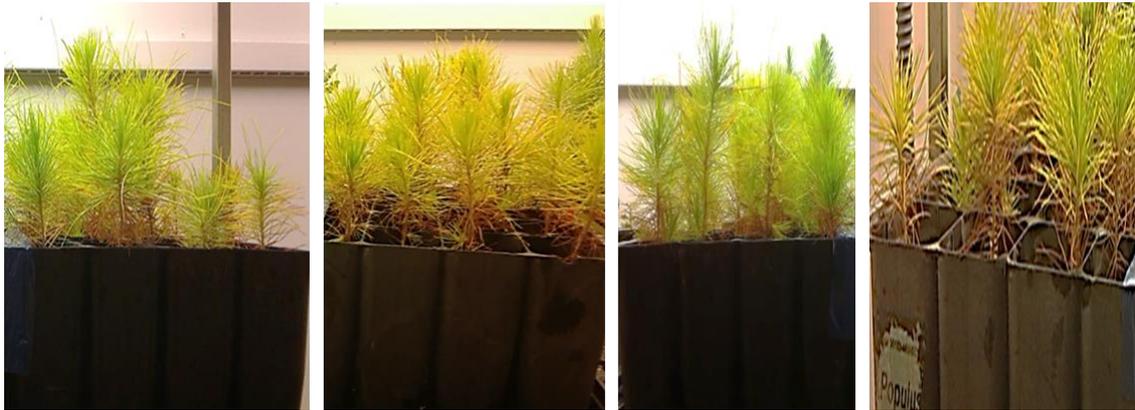


Figura 4.4. Plántulas de *Pinus patula* a los 28 días de inicio do experimento. De izda. a dcha. Tratamientos T1 (riego/inoculado), T2 (sin riego/inoculado) T3 (riego/no inoculado). y T4 (sin riego/no inoculado).

Porcentaje de humedad de la parte aérea y del sustrato.

Con respecto al porcentaje de humedad de la parte aérea y del sustrato no fueron encontradas diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos estudiados hasta el día 21 (figura 4.5).

En el caso del porcentaje de humedad de la parte aérea, a partir del día 28 hasta no existen diferencias entre los tratamientos T1 y T2 aunque sí se observan diferencias significativas con respecto a los tratamientos no inoculados, T3 y T4.

Las diferencias significativas entre todos los tratamientos para el caso del porcentaje de humedad del sustrato también se observan a partir de la medida 28 extendiéndose hasta la medida 35. Los dos tratamientos sometidos a riego, T1 y T3, mantuvieron los mayores porcentajes de humedad con respecto a los tratamientos en los que el riego fue interrumpido T2 y T4.

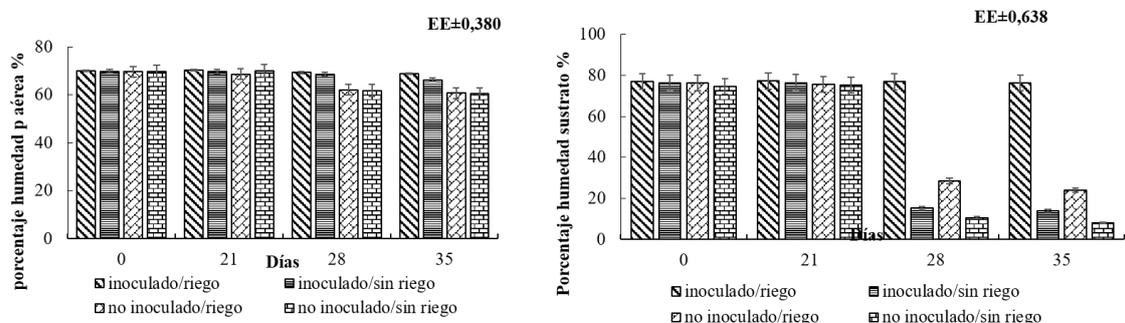


Figura 4.5. Evolución temporal de las variables porcentaje de humedad de la parte aérea (izda.) y del sustrato (dcha.) en todos los tratamientos a lo largo del experimento.

Potencial hídrico del xilema

En cuanto al potencial hídrico del xilema, como se muestra en la Figura 4.6, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos hasta el final del experimento (día 35), donde el tratamiento T1 difirió significativamente de los demás tratamientos (T2, T3, T4).

Los valores más altos (-1,76 Mpa) de esta variable se encontraron en el tratamiento T1 (inoculado/riego) sin diferencias significativas con el resto de los tratamientos. Este comportamiento se mantuvo casi constante a lo largo del experimento excepto al final (a los 35 días de experimento) donde se encontraron los valores más negativos en los tratamientos T2 y T4 (-3,01 y -3,03 Mpa) respectivamente.

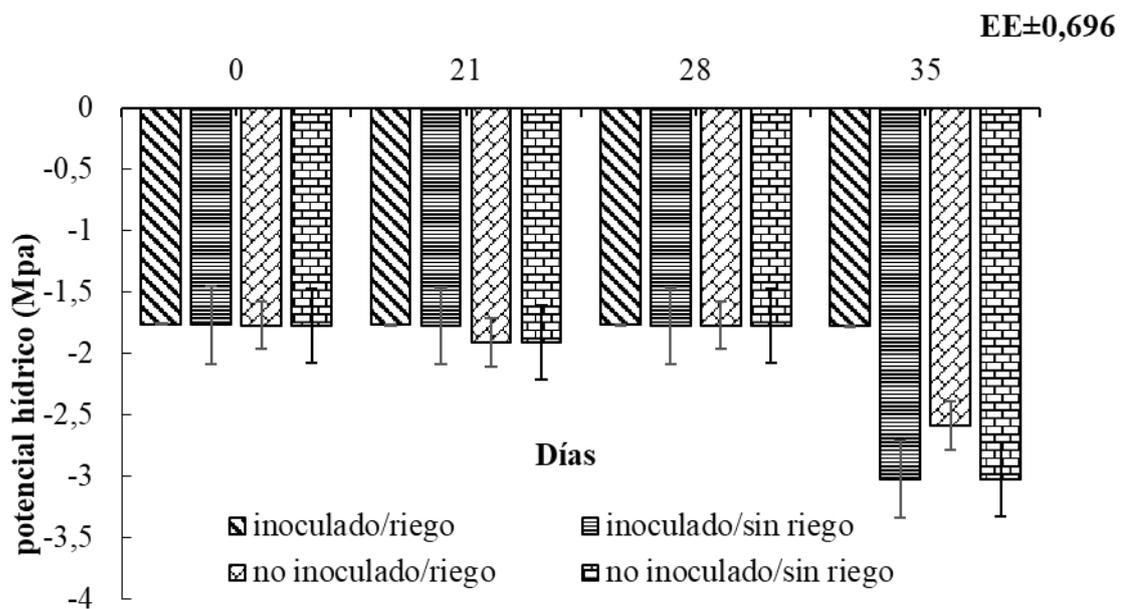


Figura 4.6. Potencial hídrico del xilema al amanecer. Representado para todas las fecha de medición y para todos los tratamientos.

Fluorescencia

Para evaluar la alteración de actividad fotosintética en función del tratamiento se evaluaron la relación F_v/F_m (PHiP0), la eficiencia fotoquímica (PHiE0) (Figura 4.7), y el “Performance Index” (PIabs) o índice de ejecución, como un índice global que resume la eficiencia del sistema.

Los valores más altos para la relación Fv/Fm (PHiP0), fueron encontrados en los tratamientos inoculados (T1 y T2) en todas las medidas realizadas. Estos valores rondaron entre 0.5 y 0.6, sin diferencias significativas ($P>0.05$) con los tratamientos T3 y T4. A partir del día 28 los valores de esta relación Fv/Fm en los tratamientos T3 y T4 (no inoculados) mostraron un descenso, alcanzando los valores más bajos (0,2 y 0,1 respectivamente) al final del experimento (día 35).

De forma similar se comportó la eficiencia fotoquímica (PHiE0), con los máximos valores en los tratamientos T1 y T2, oscilando entre 0,15 y 0,28, y diferencias significativas con respecto a los tratamientos T3 y T4 en todas las medidas realizadas. Los valores más bajos se detectaron al final del ensayo, con valores de las plantas no inoculadas de 0,07 en el T3 y 0,02 en el T4 respectivamente.

El índice de ejecución presentó los mayores valores al inicio del experimento en los tratamientos T1, T2 y T3, con diferencias significativas con el tratamiento T4 a partir del día 21. A partir del día 28, las diferencias fueron significativas entre todos los tratamientos, con los valores más altos en los tratamientos T2 y T3.

De forma general para las tres variables de la fluorescencia analizadas los valores más elevados fueron detectados en los tratamientos T1 y T2 (inoculados con/sin riego), principalmente en las determinaciones realizadas en los días 21 y 28. El tratamiento en el que se observan los menores valores, incluso próximos a 0 al final del experimento (día 35), fue en el T4 (no inoculado/ sin riego).

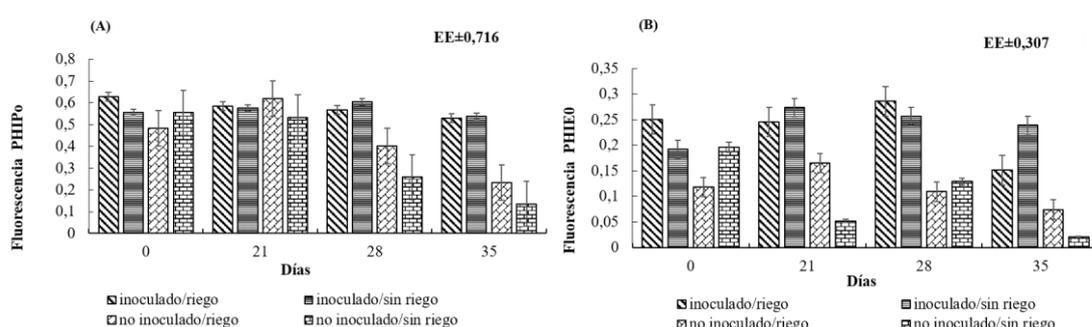


Figura 5.7. Fluorescencia de la clorofila para todos los tratamientos y fechas de medición. Representado con la letra (A), la variable relación Fv/Fm (PHiP0), con (B) la eficiencia fotosintética (PHiE0) y con (C) el índice de ejecución (PIabs).

4.3.2. Estudio molecular

4.3.2.1. Perfiles proteicos

Para el análisis de los perfiles de expresión diferencial de proteínas se realizaron dos análisis comparativos del proteoma de acículas de la especie *P. patula*. La primera comparación correspondió a los tratamientos T1 y T3 (inoculado/no inoculado con hongo ectomicorrícico *Pisolithus tinctorius*) en condiciones normales de irrigación y de los tratamientos T2 y T4 (inoculado/no inoculado) expuestas a un déficit hídrico de 35 días.

En general se observaron cambios importantes en el nivel de expresión de proteínas, fundamentalmente en los tratamientos que estuvieron sometidos a déficit hídrico.

Comparación de P. patula inoculado vs no inoculado con riego.

La comparación de *P. patula* en los dos tratamientos con presencia/ausencia de inoculación con el hongo ectomicorrícico *Pisolithus tinctorius* con riego se muestran en la Figura 4.8. Como se puede observar fueron identificadas un mayor número de proteínas 446 (46,9%) en las plantas no inoculadas con respecto a las 230 (24,2%) identificadas en las plantas inoculadas. Las proteínas comunes fueron 274 (28,8%).

Comparación de P. patula inoculado vs no inoculado sin riego.

La comparación de *P. patula* inoculado vs *P. patula* no inoculado sin riego se muestran en la figura 4.8. En este caso, se identificaron 452 (65%) en las plantas no inoculadas mientras que solo 158 (22,7%) identificadas en las plantas inoculadas. Las proteínas comunes fueron 85 (12,2%).

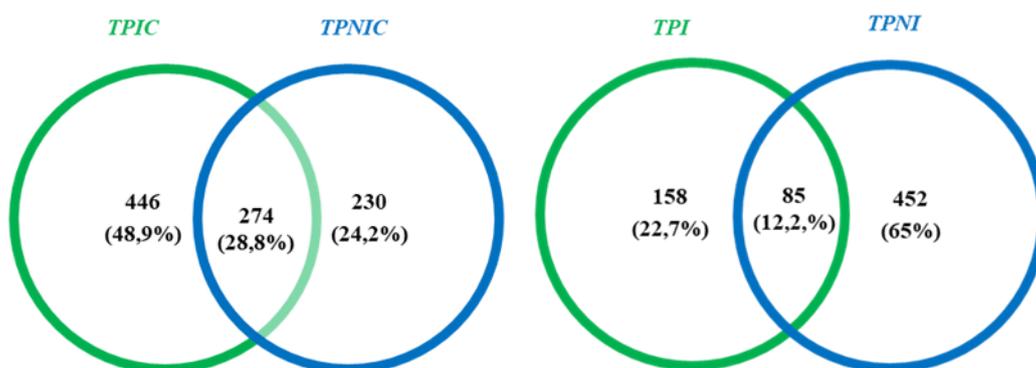


Figura 4.8. Diagrama de Venn. Representa las proteínas comunes y diferenciales identificadas en los tratamientos por nLC LTQ Orbitrap utilizando el motor de búsqueda Sequest/ HT. ([http://bioinfofp.cnb.csic.es/tools/venny/-](http://bioinfofp.cnb.csic.es/tools/venny/))

A partir de los resultados de la cuantificación se generó un mapa de calor (Heatmap de Hierarchical Cluster Analysis) (figura 4.9) donde se representan los cambios en la expresión de las proteínas en cada uno de los tratamientos evaluados. Cada columna corresponde a una muestra del panel superior (*tratamientos*) y cada fila una mancha de las réplicas biológicas, observándose una clara diferencia en los perfiles de proteínas expresadas con presencia/ausencia de inoculación con o sin interrupción del riego. Los *clusters*, de sobreexpresión de proteínas con respecto a la media se representan en color rojo, los de subexpresión en verde y los que no muestran diferencia de expresión en negro.

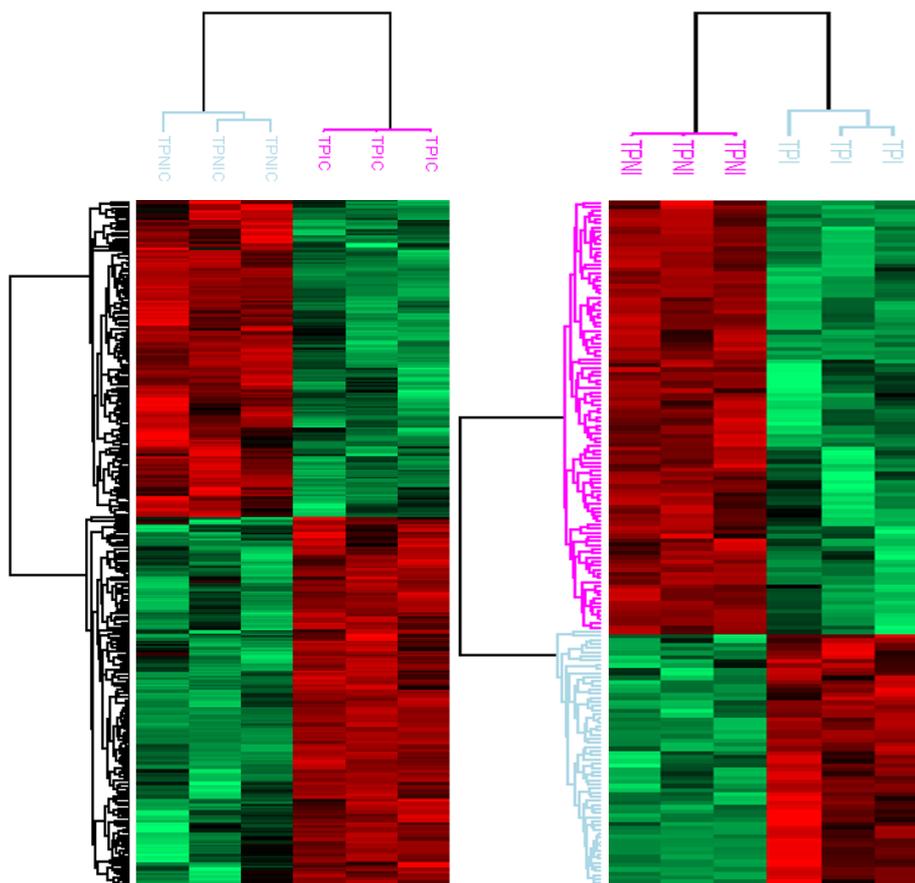


Figura 4.9. Mapa de calor que muestra perfil de proteínas sobre o subexpresados de forma diferencial en los diferentes tratamientos. Representado por la letra (A) T1 y T3 con o sin inóculo con riego y con la letra (B) T2 y T4 con o sin inóculo sin riego. El color verde representa una subexpresión de proteínas y el color rojo sobreexpresión y el color negro una expresión media.

4.3.2.2. Resultados del análisis de los términos de Ontología Génica (GO).

Comparación de P. patula inoculado con el hongo (Pisolithus tinctorius) vs no inoculado con riego.

En la comparación de *P. patula* inoculado vs no inoculado con riego los procesos biológicos que se ven enriquecidos (por aumento o disminución) en el nivel de expresión de proteínas, cuyo porcentaje de diferencia de proteína expresada en cada condición es igual o superior al (40%), son los procesos metabólicos: **metabolismo de los lípidos**, con 44 proteínas identificadas en las plantas no inoculadas con respecto a las 3 proteínas identificadas en las plantas inoculadas, representando una diferencia del 87%, seguido del **metabolismos de péptidos** con 49 y 9 proteínas respectivamente y una diferencia del 69% y con mayor número de proteínas implicadas **el metabolismo de las proteínas** con 90 proteínas identificadas en las plantas no inoculadas frente a las 28 identificadas en las inoculadas, lo que equivale a un 53% de diferencia.

También estuvieron expresados por aumento los procesos de **transporte y localización**, con 45 proteínas identificadas en las plantas no inoculadas frente a las 4 en las inoculadas representando una diferencia del 84%, los procesos de **expresión génica** con 51 proteínas identificadas en las plantas no inoculadas y 9 en las inoculadas (70% de diferencia) y por último los procesos de **biosíntesis de sustancias orgánicas**, identificándose 49 en las plantas no inoculadas y 9 en las inoculadas, con una diferencia del 69%.

Con respecto a los procesos cuyas proteínas asociadas sufren represión en su nivel de expresión se encuentra el proceso de **fotosíntesis** con 6 proteínas identificadas en las plantas no inoculadas frente a las 15 en las plantas inoculadas, lo que equivale a una diferencia del 43% (figura 4.10).

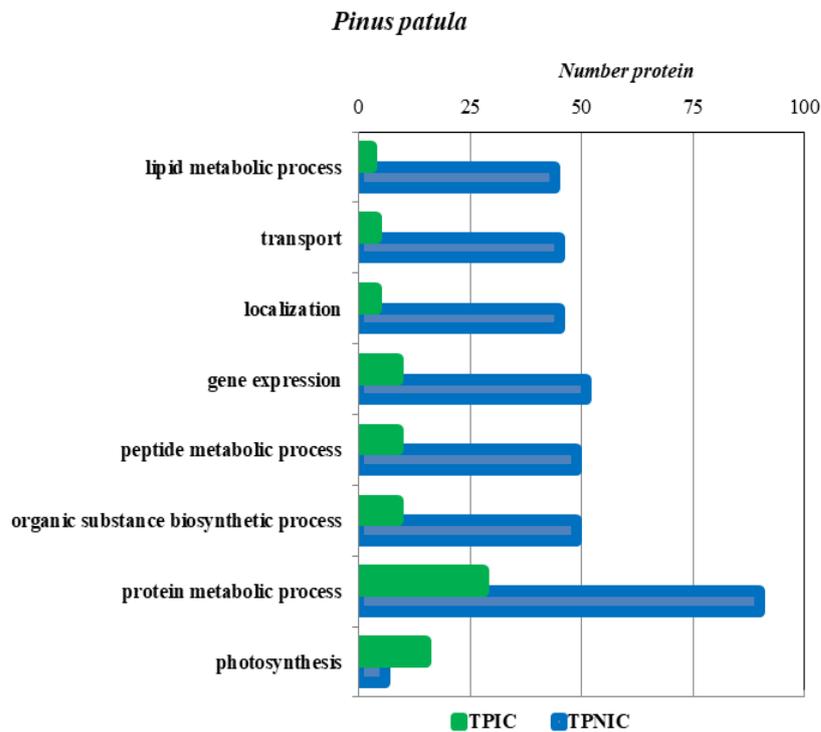


Figura 4.10. Comparación entre *P. patula* no inoculado con el hongo (*Pisolithus tinctorius*) vs inoculado riego. En el gráfico se representan aquellos procesos biológicos (aumento o disminución) cuyo porcentaje de diferencia de proteína expresada en cada condición es igual o superior al 40%.

Comparación de P. patula inoculado vs P. patula no inoculado sin riego.

En el caso de la comparación de *P. patula* no inoculado vs *P. patula* inoculado sin riego, como se puede observar en la figura 4.11, las proteínas sobrepresadas en las plantas no inoculadas se atribuyen mayoritariamente a los procesos biológicos de **traducción de señales, expresión génica, transporte, localización, metabolismo** (de los lípidos, péptidos y proteínas), **componentes de la organización celular, responsables de los estímulos abióticos, biosíntesis sustancias orgánicas**, y los procesos en los que disminuye el nivel de expresión fueron: **metabolismo de los carbohidratos, generadores de precursores metabólicos y fotosíntesis**.

En el proceso de **expresión génica** se identificaron 72 proteínas en las plantas no inoculadas frente a 5 proteínas en las plantas inoculadas, representando una diferencia del 87%. En procesos de **traducción de señales** se identificaron 11 proteínas en las plantas no inoculadas y 2 en las inoculadas, equivalente a un 69% de diferencia. En los procesos **responsables de los estímulos abióticos** fueron encontradas 11 proteínas en las plantas no inoculadas y 2 en las inoculadas, equivalente a un 69% de diferencia.

En el caso particular de los procesos de **transporte** y **localización** fueron identificadas el mismo número de proteínas en ambos procesos, 49 en las plantas no inoculadas y 19 proteínas en las inoculadas, correspondiendo a un 44% de diferencia.

Con respecto a los procesos metabólicos el mayor número de proteínas fue identificada en el **metabolismo de las proteínas**, identificándose 143 proteínas en las plantas no inoculadas y apenas 15 en las inoculadas (81% de diferencia). En el caso de las proteínas relacionadas con procesos de **metabolismo de los péptidos** se encontraron 72 proteínas en las plantas sin inóculo y 3 en las inoculadas, con una diferencia del 92%. Por último, en el caso del **metabolismo de los lípidos** se identificaron 19 proteínas en las plantas no inoculadas frente a 3 en las inoculadas, lo que se corresponde con un 72% de diferencia.

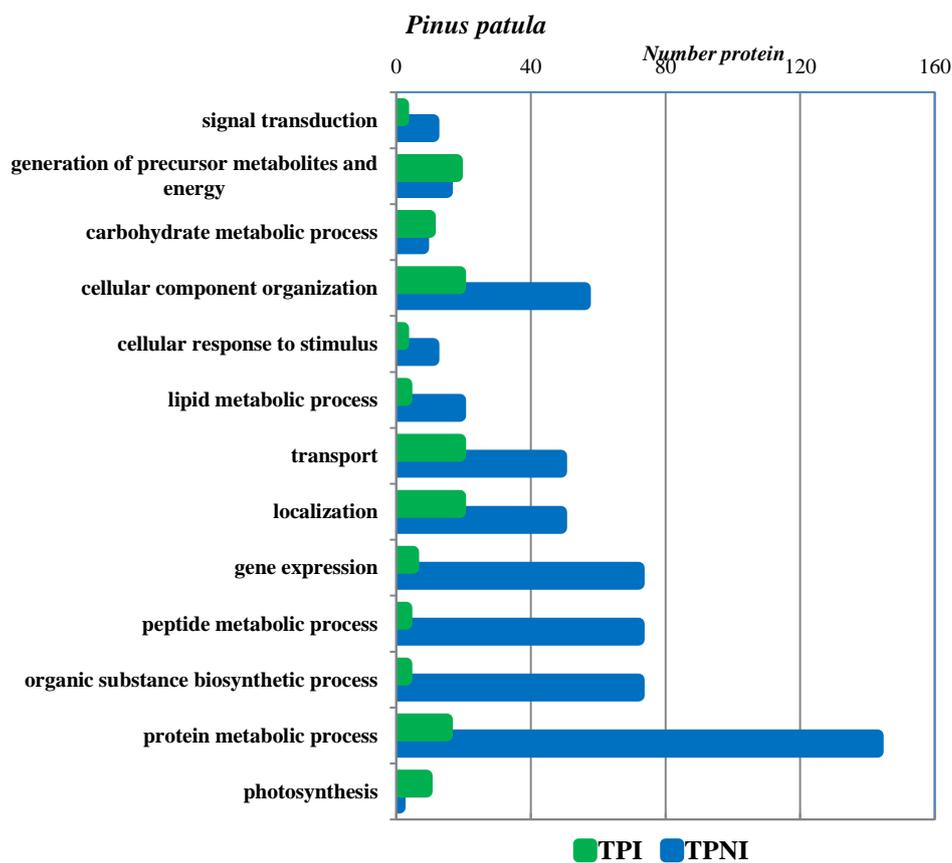


Figura 5.11. Comparación entre *P. patula* no inoculado con el hongo (*Pisolithus tinctorius*) vs inoculado sin riego. En el gráfico se representan aquellos procesos biológicos (aumento o disminución) cuyo porcentaje de diferencia de proteína expresada en cada especie es igual o superior al 40%.

4.4. Discusión

4.4.1. Estudio morfofisiológico

Los resultados del estudio fisiológico apuntan que la inoculación de *P. patula* con el HECM *Pisolithus tinctorius* fue beneficiosa para las plantas inoculadas, encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos (inoculado/no inoculado) en condiciones de *déficit hídrico*. No obstante, cabe destacar que en los tratamientos en los que las plantas estuvieron expuestas a las mismas condiciones de irrigación (controles), no se encontraron diferencias significativas entre las plantas inoculadas y las no inoculadas, quizás porque la micorrización en estas condiciones de irrigación no fue efectiva.

Este comportamiento se asemeja a lo encontrado por Muilu-Mäkelä, *et al.*, (2015), que estudiando la disponibilidad hídrica en plántulas de pino silvestre (*Pinus sylvestris* L.) en fase de crecimiento concluyen que la disponibilidad de agua influye en la morfología y en la efectividad de la micorrización, es decir, que tanto el déficit hídrico como el exceso de agua influyen en la capacidad de las plántulas para mantener una relación simbiótica **efectiva**.

Supervivencia

La supervivencia se vio afectada por el déficit hídrico a partir del día 28 en los tratamientos en los que hubo interrupción del riego, no obstante, a pesar de estar expuestas a un déficit hídrico de 35 días, las plantas inoculadas presentaron un porcentaje de supervivencia del 60% frente al 33,3% de las plantas no inoculadas, lo que apunta a un efecto positivo de la micorrización. Estos resultados coinciden con lo apuntado por autores como Molina, *et al.*, (2005); Brunner, *et al.*, (2015); Victor, *et al.*, (2017), que en estudios con especies forestales han encontrado también beneficios de los hongos micorrícicos para las plantas, relacionando este hecho con el aumento de absorción por parte de las raíces de agua y nutrientes.

Estos resultados son similares a los encontrados por Gómez-Romero, *et al.*, (2013) en *Pinus pseudostrobus* bajo condiciones de restauración, (con estrés nutricional e hídrico) en los que las plantas inoculadas con el HECM *Pisolithus tinctorius*, en los que la micorrización confirió beneficios para la adquisición de nutrientes que

consecuentemente aumentaron la supervivencia de plantas inoculadas (86%) frente a plantas no inoculadas (62%). Esto implicaría una gran ventaja para el establecimiento de las plantas ante bajo estas condiciones desfavorables.

Otros resultados similares fueron obtenidos por Gómez-Romero, *et al.*, (2015), que estudiando el efecto de la sequía en la relación simbiótica entre *Pinus Pseudostrobus* y *Pisolithus Tinctorius* reportaron que todas las plántulas sin inocular murieron tras 14 días sometidas a déficit hídrico mientras que las micorrizadas mantuvieron un 30 % de supervivencia.

Crecimiento

Los valores más altos de altura se observaron en las plántulas no inoculadas regadas. Estas diferencias no fueron estadísticamente en relación a las plantas inoculadas (con o sin riego) aunque sí con respecto a las plantas no inoculadas sin riego. En el caso del diámetro no hubo diferencias significativas entre los tratamientos inoculados. Varios autores como Harris-Valle, *et al.*, (2009); Gómez-Romero, *et al.*, (2015); Ma, *et al.*, (2018); Guerrero-Galán, *et al.*, (2018); Haro y Benito (2019), hacen referencia al efecto positivo de las micorrizas sobre la nutrición y consecuentemente sobre el crecimiento de las plantas. Similarmente Meddad-Hamza, *et al.*, (2010), estudiando la eficiencia de dos hongos micorrícicos nativos (*Glomus mosseae* y *Glomus intraradices*) sobre el crecimiento del olivo micropropagado (*Olea europaea* L.) reportaron un aumento altamente significativo en el crecimiento de plantas inoculadas en comparación con plantas no inoculadas.

Semejantes resultados fueron encontrados por Atala, *et al.*, (2012), que estudiando el impacto de la inoculación con micorrizas (*Rhizopogon luteolus*) sobre la supervivencia y rasgos funcionales de plántulas de *Pinus radiata* en dos tratamientos de riego observaron que la mayoría de los rasgos funcionales no fueron afectados por la frecuencia o cantidad de riego, pero sí por la micorrización ya que la inoculación con *R. luteolus* aumentó la supervivencia (aunque redujo el tamaño de las plántulas). Estos autores concluyeron que la inoculación con micorrizas combinada con algún tipo de riego artificial podría ser una posible estrategia para reducir los efectos negativos de una sequía prolongada.

Otros resultados comparables son los reportados por Sánchez (2000), que estudiando diferentes técnicas de micorrización en *Pinus halepensis* en vivero con dos cepas de hongos ectomicorrízicos *Pisolithus tinctorius* (3SR) y *Lactarius deliciosus* (LDF5), concluye que un régimen de riego reducido (25% de porosidad de aireación) favorece la micorrización sin mermas en el crecimiento de las plantas.

En este sentido Martínez-García, (2011) en ecosistemas semiáridos observó que el exceso de agua causó un decrecimiento en el desarrollo del hongo, mientras que a baja disponibilidad hídrica aumentó la abundancia de colonización micorrícica.

Por otro lado, Meddich, *et al.*, (2015) encontraron que la intensidad de colonización de la raíz de la palma datilera (*Phoenix dactylifera*) por el hongo disminuye cuando aumenta la deficiencia de agua del suelo.

Otros autores como Ortega, *et al.*, (2004) comparando el rendimiento de plántulas de pino radiata (*Pinus radiata* D. Don) inoculadas y no inoculadas en vivero con *R. roseolus* y *S. citrinum* afirman que la micorrización mejoró el crecimiento de los árboles durante los primeros dos años después de la siembra en el campo, particularmente en el sitio más seco.

Debido a la gran variabilidad en la respuesta a la inoculación, para integrar la micorrización controlada en la producción viverística forestal, hay que tener en cuenta a intervención de varios factores (bióticos y abióticos) que influyen en el éxito de la micorrización y que a su vez son difíciles de controlar (Hernández y Salas, 2009; Pérez, *et al.*, 2011; Hu, *et al.*, 2015; Bertolazi, *et al.*, 2018). Por ejemplo, trabajos realizados por González-Ochoa, *et al.*, (2003) con plántulas de *Pinus halepensis* y *Pinus pinaster*, en dos tipos distintos de sustrato (corteza de pino compostada y turba-vermiculita fertilizada) utilizando inóculos de diferentes HECM encontraron diferencias significativas entre ambos tipos de sustrato, siendo, de forma general, la mezcla turba-vermiculita fertilizada, el sustrato con los mejores resultados para las variables morfológicas estudiadas.

Por su parte Carrera y López, (2004), comparando el efecto de la micorrización en *Pinus greggii* de siete especies distintas de HECM (*Laccaria laccata*, *Suillus pseudobrevipes*, *Boletus pinophilus* y *Pisolithus tinctorius*) a los nueve meses de

inoculación encontraron diferencias significativas en la altura y biomasa en peso seco de la planta, independientemente del hongo utilizado.

Porcentaje de humedad de la parte aérea y del sustrato.

Los resultados con respecto al porcentaje de humedad de la parte aérea y del sustrato muestran, de forma general, que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos estudiados hasta el día 21, apareciendo éstas a partir del día 28. El porcentaje de humedad de la parte aérea mostró diferencias significativas entre los tratamientos con o sin inóculo del HECM (*Pisolithus tinctorius*) mientras que en el caso del porcentaje de humedad del sustrato, las diferencias significativas se observan entre los tratamientos sometidos a riego y aquellos en los que se interrumpió el riego.

Estos resultados tienen similitud con los obtenidos por Fernandes, *et al.*, (2019), que estudiando el efecto de la micorrización e de auxinas en el desarrollo de la especie *Varronia leucocephala* concluyen que la asociación micorrícica con los hongos *Gigaspora albida* y *Glomus clarum* aumentó la producción de brotes y raíces, y en consecuencia, el peso seco total, lo que sugiere que esta asociación fue eficiente para promover el desarrollo de la parte aérea de esta especie arbustiva. Igualmente, Hermida-Castro, *et al.*, (2013), investigando el efecto de la micorrización controlada con *Laccaria laccata*, *Pisolithus tinctorius* y *Boletus badius* en el crecimiento de plántulas a partir de semillas de *Quercus robur*, observaron los beneficios de la inoculación en las plántulas de *Quercus robur*, encontrando diferencias significativas en la altura final, el número promedio de hojas, el diámetro, el peso seco de la parte aérea y en el porcentaje de enraizamiento en los tres hongos ectomicorrízicos estudiados. Otros autores como Duñabeitia, *et al.*, (2004), estudiando el efecto de la inoculación de tres HECM *Rhizopogon luteolus*, *Rhizopogon roseolus* y *Scleroderma citrinum* en *Pinus radiata* en vivero también encontraron valores más altos del peso seco en plantas inoculadas con respecto a plantas no inoculadas. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Meddich, *et al.*, (2015), que estudiando la influencia de la micorrización con hongos del género *Glomus* (*monosporus*, *clarum* y *deserticola*) en la palmera datilera (*Phoenix dactylifera*) observaron un aumento de la tolerancia al déficit hídrico de las plantas

micorrizadas, con valores de peso seco de la parte aérea 2,4 veces superior al de las plantas no micorrizadas bajo condiciones limitantes de agua.

Potencial hídrico

En cuanto al potencial hídrico del xilema no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos excepto al final del experimento (día 35) donde sí aparecen diferencias estadísticamente significativas entre las plantas inoculadas regadas con respecto al resto de tratamientos. Los tratamientos con interrupción del riego, inoculados o no, alcanzaron los valores más negativos (-3,01 y -3,03 Mpa). Sin embargo, la relación entre estos bajos valores de potencial hídrico y la supervivencia es muy diferente, ya que las plantas inoculadas presentan una supervivencia del 60% y en los no inoculados apenas del 30%. Autores como Charya, *et al.*, (2019) le atribuyen la resistencia de las plantas inoculadas al déficit hídrico al buen estado nutricional de las mismas y a la capacidad que tienen las hifas fúngicas extramatriciales de transportar agua y nutrientes a las raíces de la planta hospedera, actuando como extensiones del sistema radical y comportándose como estructuras de absorción. Igualmente Meddad-Hamza, *et al.*, (2010), estudiando el efecto de la inoculación y la fertilización química con osmocote de plántulas de *Olea europaea* L. detectaron un crecimiento de brotes ligeramente más bajo en las plántulas inoculadas con *G. mosseae*, lo que duplicó el crecimiento de las raíces, en comparación con el de las plantas fertilizadas y consecuentemente un cambio en la relación raíz/brote permitiendo una mayor utilización de los recursos del suelo y fortaleciendo la capacidad de las plantas para resistir el estrés hídrico.

Resultados similares a los encontrados en este estudio fueron reportados en estudios previos por Pigott, (1982) que estudiando el efecto de la micorrización en *Tilia cordata* confirmó que la inoculación con el hongo *Cenococcum geophilum* permitió que las plantas sobrevivieran a valores de potencial hídrico de hasta -5,5MPa. Por su parte Navarro-García, *et al.*, (2011), en plántulas de *Arbutus unedo* L inoculadas con *Pisolithus tinctorius* bajo déficit hídrico durante el período de vivero, observaron que al final del período de vivero tanto el déficit hídrico como las micorrizas habían alterado la morfología de la planta produciendo cambios en el potencial hídrico y el crecimiento,

relacionados con el proceso de aclimatación en las plántulas, lo que podría proporcionar una mejor resistencia a las condiciones de sequía y estrés después de la plantación.

También en la línea de nuestros resultados, otros autores (Meddich, *et al.*, 2015), estudiando la influencia de la micorrización con los hongos *Glomus (monosporus, clarum y deserticola)* en la palmera datilera (*Phoenix dactylifera*) en la tolerancia al déficit hídrico apuntan que las plántulas de palmeras micorrizadas de los mismos hongos mantienen un potencial hídrico significativamente más negativo en las plantas no inoculadas que en las inoculadas.

Fluorescencia

Los valores más altos para la relación Fv/Fm (PHiP0), se encontraron en los tratamientos inoculados (T1 y T2) en todas las medidas realizadas, aunque estas diferencias solo son estadísticamente significativas a partir del día 28, fecha a partir de la cual, la relación Fv/FM en los tratamientos T3 y T4 (no inoculados) mostró un descenso brusco que se mantuvo hasta el final del experimento (día 35).

De forma similar se comportó la eficiencia fotoquímica (PHiE0), con los máximos valores en los tratamientos inoculados (T1 y T2) con diferencias estadísticamente significativas con respecto a los no inoculados (T3 y T4) en todas las medias realizadas, detectándose los valores más bajos al final del experimento.

El índice de ejecución presento los mayores valores al inicio del experimento en los tratamientos (T1, T2 y T3) con diferencias significativas con el tratamiento T4 a partir del día 21.

De forma general para las tres variables de la fluorescencia analizadas los valores más elevados fueron detectados en los tratamientos T1 y T2 (inoculados con o sin riego) principalmente en las medida 21 y 28 y el tratamiento en el que se observan los menores fue en el tratamiento T4 (no inoculado/sin riego).

Estos resultados resultan consistentes comparados con los estudios realizados por Barea, *et al.*, (2016) quienes sostienen que las micorrizas inducen a las plantas una mayor capacidad de resistencia a la sequía y a la salinidad, pues le permite tener tasas de transpiración y fotosíntesis superiores bajo tales condiciones adversas, Navarro-García, *et al.*, (2011), que en plantas de *Arbutus unedo* inoculadas con *Pisolithus*

tinctorius bajo déficit hídrico durante el período de vivero encontraron que las plantas micorrícicas aumentaron los valores de conductancia estomática y fotosíntesis en relación a las plantas no inoculadas, especialmente en plantas estresadas o Cary y Pittermann, (2018), que observaron múltiples tendencias en la respuesta fisiológica de las plantas a la limitación de nutrientes, afirmando que las plantas con limitación de nutrientes se caracterizan típicamente por bajas tasas de crecimiento y bajas tasas fotosintéticas. Igualmente, Domínguez, *et al.*, (2004) plantean que la tasa fotosintética generalmente es superior en las plantas micorrizadas, debido a una mayor eficiencia en la utilización del fosforo en el proceso fotosintético.

Otros autores, como Rui-qing, *et al.*, (2006), estudiando el efecto de la inoculación de nuevas cepas de HECM en plántulas de pino escocés mongol (*Pinus sylvestris* var mongolica Litvin) concluyen que la micorrización de todas las cepas tuvo una influencia positiva sobre el crecimiento de esta especie y que algunas cepas (GT005) son capaces de incrementar significativamente (más de un 20%) el contenido de clorofilas en las hojas de las plántulas inoculadas con respecto a las plántulas no inoculadas. De igual forma, trabajos realizados por Muilu-Mäkelä, *et al.*, (2015) en Pino silvestre apuntan que, en esta especie, vulnerable a estrés abiótico durante el crecimiento temprano, las raíces micorrizadas pueden ayudar a mantener un contenido estable de agua en los brotes y una alta eficiencia de PSII bajo estrés por sequía.

Por su parte Chen, *et al.*, (2015) investigando las funciones de los HECM bajo un amplio espectro de concentraciones de Cu en el suelo reportaron un aumento de la fotosíntesis y la biomasa en plántulas micorrizadas, concluyendo que la fotosíntesis en las plántulas de pino (*Pinus densiflora*) disminuyó mucho antes de que aparecieran los síntomas visibles de la toxicidad de Cu en las plántulas expuestas al mayor nivel de concentración de dicho elemento.

Sin embargo, todos estos resultados, incluidos los de este trabajo, son contradictorios con los encontrados por Heinonsalo, *et al.*, (2015), que estudiando el efecto de ocho HECM simbióticos comunes en plántulas de pino silvestre, (*Pinus sylvestris*) encontraron que las plantas micorrizadas y no micorrizadas no diferían significativamente en ninguno de los parámetros relacionados con la fotosíntesis. Según sus resultados, la distribución del nitrógeno dentro de las plantas y la economía del agua

de las plantas son los principales efectos de la simbiosis micorrícica que afectan la asignación del carbono en las plantas y la fotosíntesis. Sin llegar a contradecir los resultados, muchos autores apuntan a otras causas no relacionadas con la micorrización para las variaciones en las tasas fotosintéticas. Para Harris-Valle, *et al.*, (2009) la eficiencia en el uso de la energía y del carbono determina el éxito de la asociación micorrícica, lo que a su vez depende de las características del huésped (especie y estado de desarrollo) y de las condiciones ambientales. Salguero *et al.*, (2016) plantean que la tasa de fotosíntesis depende básicamente de las condiciones de radiación, temperatura y agua disponible. Asimismo, Smirnakou, *et al.*, (2017) estudiando los efectos de cuatro diferentes calidades de luz LED de espectro continuo en las características de crecimiento de *Pinus sylvestris* L. y *Abies borisii-regis* Mattf afirman que la calidad e intensidad óptimas de la luz para el crecimiento y desarrollo de las plantas es específica para cada especie y extremadamente importante para el cultivo de plantas en cámaras de crecimiento.

4.4.2. Estudio molecular

Los resultados a nivel morfofisiológico resultan consistentes cuando son comparados con los obtenidos a nivel molecular, identificándose proteínas diferencialmente abundantes en las plantas no inoculadas con respecto a las inoculadas, implicadas fundamentalmente en procesos biológicos relacionados con la resistencia al estrés hídrico. También se encontró mayor número de proteínas comunes en las muestras de las plantas (controles), lo que muestra una menor variabilidad en el perfil proteómico de las muestras de *P. patula* con o sin inóculo dentro de las mismas condiciones de riego, no siendo así en las condiciones de déficit hídrico.

Esta síntesis mayoritaria de proteínas identificadas en las plantas no inoculadas con respecto a las inoculadas, sobre todo en las condiciones de déficit hídrico, podría estar relacionada con el hecho de que estas plantas al no estar micorrizadas carecen de los beneficios que confiere la asociación micorrícica para absorber agua y nutrientes en condiciones de déficit hídrico y por tanto, se ven obligadas a activar mecanismos moleculares como posible estrategia de respuesta, protección o adaptación al déficit hídrico. En este sentido autores como García-Morales, *et al.*, (2013); Florido y Bao (2014); Jorge, *et al.*, (2015); Choudhury, *et al.*, (2017); afirman que las plantas no solo

responden al estrés hídrico a nivel fisiológico, sino que esta respuesta también es inducida a nivel molecular.

En la comparación de *P. patula* inoculado vs no inoculado **en condiciones de riego** existe un enriquecimiento (por un aumento o disminución en el nivel de expresión de proteínas) de las proteínas relacionadas con 8 procesos biológicos, con un porcentaje de diferencia de proteína expresada en cada condición igual o superior al 40%. Entre estos procesos biológicos se encuentra los metabólicos: **metabolismo de los lípidos**, seguido del **metabolismo de los péptidos** y con mayor número de proteínas implicadas **el metabolismo de las proteínas**. También estuvieron expresados por aumento con igual número de proteínas los procesos de **transporte y localización**, de **expresión génica** y por último **biosíntesis sustancias orgánicas**. Con respecto a los procesos cuyas proteínas asociadas sufren represión en su nivel de expresión se encuentra el de la **fotosíntesis**.

En la comparación de *P. patula* no inoculado con el hongo (*Pisolithus tinctorius*) vs inoculado sin riego teniendo en cuenta el enriquecimiento de procesos por Ontología de genes, fueron identificados por (aumento o disminución) en el nivel de expresión de proteínas 13 procesos biológicos, entre los cuales las proteínas implicadas que sufren activación son los relacionados con **traducción de señales, expresión génica, transporte, biosíntesis sustancias orgánicas, metabolismo de los lípidos, metabolismo de los péptidos y metabolismo de las proteínas**, y los procesos en los que disminuye el nivel de expresión fueron: **metabolismo de los carbohidratos, generadores de precursores metabólicos y fotosíntesis**.

De forma general los procesos enriquecidos por aumento o disminución están relacionados con procesos metabólicos, de biosíntesis, transducción de señales, expresión génica, fotosíntesis, transporte y localización. Estos resultados coinciden con los mencionados en la revisión de la literatura científica incluida en la introducción sobre la respuesta al estrés hídrico, del género *Pinus* a nivel molecular por los autores Ariza (2011); Wang *et al.*, (2013) y Xu y Wu (2016), que identificaron la participación de varias proteínas reguladoras del **metabolismo, fotosíntesis, transducción de señales y transcripción**.

Los resultados de este trabajo también coinciden con los encontrados por otros autores. Du, *et al.*, (2018), que evaluando la respuesta a nivel de transcriptoma de Pino masson (*Pinus massoniana*) a diferentes niveles de estrés por sequía encontraron enriquecimiento en varias categorías de ontología génica, principalmente en procesos de **oxidación-reducción, transducción de señales de hormonas vegetales, expresión génica y metabolismo**. Por su parte Lorenz, *et al.*, (2011) encontró cambios en la expresión de genes de *Pinus taeda* L asociados previamente con estrés osmótico, síntesis de fitohormonas, enzimas que desintoxican especies reactivas de oxígeno y varios genes de función desconocida.

La sobreexpresión de proteínas en plantas no inoculadas con respecto a las inoculadas en el proceso de **transducción de señales** y en el de **expresión génica** podría entenderse, ya que en condiciones de estrés hídrico una de las principales respuestas es la modificación en la expresión génica. En este sentido autores como Agarwal y Jha, (2010) apuntan que en condiciones de estrés, las plantas regulan la expresión génica por medio de diferentes factores de transcripción dependientes de ABA e independientes de ABA como DREB, MYC / MYB, AREB / ABF, NAM, ATAF1,2, CUC y sus correspondientes elementos de acción cis DRE, MYCRS / MYBRS, ABRE, NACRS.

Por su parte Liu, *et al.*, (2019) estudiando el efecto de la micorrización en la planta modelo *Medicago truncatula*, encontraron que los perfiles de transcripción de los brotes de las plantas micorrizadas indicaron la inducción sistémica de muchos genes que se predice que están involucrados en la respuesta a estrés o en las respuestas de defensa, concluyendo que la simbiosis se acompaña de un patrón complejo de cambios locales y sistémicos en la expresión génica, incluida la inducción de una respuesta de defensa funcional.

Otros autores como Nakashima *et al.*, (2009), estudiando estrés abiótico en la especie modelo *Arabidopsis thaliana* reportan que la regulación de la expresión génica está relacionada con la producción de enzimas clave en la vía de síntesis de osmólitos, proteínas con función protectora, enzimas antioxidantes y factores de transcripción (proteínas que se unen específicamente a secuencias cortas de ADN) y que inducen (activadores) o inhiben (represores) como la actividad de la enzima ARN polimerasa II.

Así mismo Hirayama y Shinozaki, (2010) ten su revisión sobre respuesta a estrés abiótico de las plantas en la era posterior al genoma apuntan que las rutas de transducción de señales pueden estar relacionadas con genes de respuesta temprana a diversos factores de estrés que a su vez codifican factores de transcripción que activan a los genes de respuesta tardía. Asimismo, Huang, *et al.*, (2012) encontraron en sus revisiones que la percepción del estrés y consecuentemente transducción de señales por parte de las plantas para activar los mecanismos adaptativos es crucial para la supervivencia de las mismas en condiciones ambientales desfavorables.

Otros autores como Lorenz, *et al.*, (2011), estudiando genes reguladores de estrés hídrico en *P. taeda*, sostienen que los mecanismos moleculares subyacentes a la respuesta a estrés hídrico implican la señalización del estrés y la inducción de numerosos genes. Estos mismos autores identificaron varios nodos centrales (centros), como la 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa, zeatina O-glucosiltransferasa y una proteína que responde al ácido abscísico (ABA). Estos centros identificados también incluyen genes que se han asociado previamente con estrés osmótico, fitohormonas, enzimas que desintoxican especies reactivas de oxígeno y varios genes de función desconocida que conducen a la activación de las vías de tolerancia en las plantas.

Con respecto a los proceso de **transporte y localización** cabe destacar que estos dos procesos biológicos parecen estar relacionados ya que ambos procesos presentan el mismo porcentaje de diferencia entre las plantas no inoculadas y las inoculadas, tanto en las condiciones de déficit hídrico como de riego. Estos resultados podrían estar relacionados con la activación de proteínas intrínsecas de membrana, como es el caso de las acuaporinas (AQP), cuya función está relacionada con el transporte de agua y pueden activarse o desactivarse por diferentes mecanismos de regulación.

Autores como Lee *et al.*, (2010), estudiando los efectos del HECM *Suillus tomentosus* sobre las propiedades de transporte de agua en plántulas de pino Jack (*Pinus banksiana*) sugieren que el transporte de agua mediado por AQP puede estar relacionado con la mejora de la resistencia al estrés reportada fundamentalmente en las plantas micorrizadas.

Según Barea, *et al.*, (2016) las micorrizas regulan el funcionamiento de las proteínas de membrana (acuaporinas) que facilitan y regulan el transporte de moléculas

de agua a favor de gradiente de potencial hídrico. Estos mismos autores señalan que la simbiosis micorrícica mejora el ajuste osmótico de la planta acumulando compuestos, conocidos como osmoreguladores (prolina), que permiten que la planta afronte situaciones de bajos potenciales de agua en suelos secos y que mantienen un gradiente de potencial de agua que favorece el flujo de agua hacia la raíz.

Guerrero-Galán, *et al.*, (2018), en sus revisiones sobre el proceso de transporte en la simbiosis micorrícica señalan que los sistemas de transporte de membrana son elementos cruciales para la nutrición y el desarrollo de las plantas, ya que juegan un papel clave en la absorción de nutrientes minerales y agua a nivel de la raíz, pero también en la translocación dentro de la planta lo que les permite adaptarse e interactuar con el entorno.

Con respecto al **metabolismo de las proteínas**, procesos metabólico en el que fue identificado el mayor número de proteínas podría deberse a una mayor producción de enzimas relacionadas con la tolerancia al déficit hídrico producidas por las plantas no inoculadas. Autores como Talbot y Tresede, (2010), en sus hipótesis y predicciones sobre la absorción micorrícica en plantas, presumen que la capacidad de los hongos micorrícicos para asimilar aminoácidos y producir enzimas extracelulares está relacionada con la disponibilidad de recursos de carbono del hongo micorrícico. En otros trabajos realizados por Garcia, *et al.*, (2000) evaluando el efecto de la micorrización en *Pinus halepensis* sobre las actividades enzimáticas como oxidoreductasas (actividades de deshidrogenasa y catalasa) e hidrolasas (ureasa, proteasa y fosfatasa), observaron una influencia positiva en el metabolismo de proteínas en los tratamientos inoculados.

Por su parte Meddich, *et al.*, (2015) estudiando la influencia de la micorrización con los hongos *Glomus (monosporus, clarum y deserticola)* en la palmera datilera también identificaron enzimas involucradas en la estimulación de eventos oxidativos en plantas estresadas, las cuales diferían en su intensidad en dependencia del hongo inoculado.

Por su parte Alvarez, *et al.*, (2009) investigando el metabolismo reactivo del oxígeno (concentración de peróxido de hidrógeno y malondialdehído) y la actividad enzimática antioxidante (superóxido dismutasa, catalasa, ascorbato peroxidasa y

glutación reductasa) en cultivos puros de HECM *Descolea antartica* Sing. y *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch, y raíces no micorrícicas y micorrícicas de raíces de *Nothofagus dombeyi* (Mirb.) en condiciones de riego y condiciones de sequía, encontraron que los HECM estudiados regularon su metabolismo enzimático antioxidante de manera diferencial en respuesta a la sequía, concluyendo que el metabolismo enzimático antioxidante depende de la capacidad del hongo ectomicorrícico, siendo la asociación entre *P. tinctorius* y *N. dombeyi* la más efectiva en el metabolismo de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Sobre **el metabolismo de los lípidos**, autores como Jiang, *et al.*, (2017) refieren que los nutrientes orgánicos que suministran las plantas a los hongos micorrícicos lo hacen principalmente en forma de azúcares. Laczko, *et al.*, (2004) analizando la composición y abundancia de los lípidos en las raíces de plántulas de *Pinus sylvestris* y en micelios de *Pisolithus tinctorius* durante la formación de ectomicorrizas, encontraron cambios drásticos en la composición lipídica de la raíz, con un aumento considerable de todos los componentes lipídicos (ácidos grasos) del micelio fúngico extraradical, lo que indica que en la simbiosis, el hongo transporta los lípidos de las plantas desde la interfaz simbiótica al micelio extraradical

En el proceso de **biosíntesis de sustancias orgánicas** también se identificó una sobreexpresión de proteínas en las plantas no inoculadas con respecto a las inoculadas que podría asociarse con la biosíntesis de enzimas, terpenos, osmólitos, aminoácidos, flavonoides y fitohormonas como el ácido abscísico (ABA). Al respecto Agarwal y Jha (2010), estudiando los factores de transcripción en plantas y señalización de estrés abiótico dependiente e independiente de ABA, señalan que el ABA es una fitohormona de amplio espectro que no solo está involucrada en la regulación de la apertura, el crecimiento y el desarrollo del estoma, sino también en la coordinación de varias vías de transducción de señales de estrés en las plantas durante las tensiones abióticas.

Los principales procesos cuyas proteínas implicadas inhiben su nivel de expresión ante estrés por déficit hídrico en las plantas no inoculadas con *Pisolithus tinctorius* fueron los relacionados con el **metabolismo de los carbohidratos, generadores de precursores metabólicos**, y los procesos de **fotosíntesis**, aunque estos con un menor nivel. Quizás esta disminución en el nivel de expresión de proteínas en las

plantas no inoculadas justifica los resultados encontrados a nivel fisiológico, en los que se detectaron los valores más bajos de la tasa fotosintética en las plantas no inoculadas con respecto a las inoculadas, pudiendo asociarse a la relación positiva que existe entre la micorrización y la fotosíntesis.

La literatura existente sobre el metabolismo de los carbohidratos en la simbiosis ectomicorrícica Nehls, *et al.*, (2016) hacen referencia al impacto de la simbiosis ectomicorrícica en la fotosíntesis de las plantas, el almacenamiento de carbohidratos, así como los posibles mecanismos de transferencia de carbono hacia el hongo.

Gómez-Romero, *et al.*, (2015) en algunos trabajos realizados con *Pinus Pseudostrobus* inoculados con *Pisolithus tinctorius* apuntan que las micorrizas inducen a una mayor capacidad de resistencia a sequía y salinidad permitiéndoles tener tasas de transpiración y fotosíntesis superiores bajo tales condiciones adversas.

Otros autores como Muilu-Mäkelä, *et al.*, (2015) estudiando la respuesta morfológica, metabólica y fisiológica de Pino silvestre (*Pinus sylvestris* L.) a estrés por sequía y micorrización encontraron que las plántulas bajo estrés invirtieron en brotes para mantener el contenido estable de agua en los mismo y una alta eficiencia de *PSII*, acumulando la Putrescina conjugada libre y soluble (Put) en agujas, lo que sugiere el papel de Put en la protección de los tejidos fotosintéticos bajo estrés por sequía, en esta especie. Estos resultados concuerdan con los nuestros, y con los de otros autores como Domínguez, *et al.*, (2004), que estudiando el efecto de la micorrización en *Pinus halepensis*, encontraron que la tasa fotosintética generalmente es superior en las plantas inoculadas, no solo por los efectos de la nutrición en P, sino también por una mayor eficiencia en la utilización de este elemento en el proceso fotosintético, ya que podría inducir la formación de compuestos que influyen en la estructura y función de los cloroplastos.

Todos estos resultados, sin embargo, contrastan con los de otros autores como Harris-Valle, *et al.*, (2009), que estudiando la tolerancia a estrés hídrico en la interacción planta-hongo micorrícico en respuesta al metabolismo energético, consideran que esta asociación puede convertirse en una interacción parasítica donde es mayor el costo que el beneficio. Esto se daría principalmente en condiciones estresantes, ya que los fotoasimilados que la planta transfiere al hongo dejan de ser utilizados por la

planta modificando así su metabolismo, lo que resulta determinante para la supervivencia de la planta. Sin embargo, Nehls, *et al.*, (2007), analizando el reparto de carbohidratos en la simbiosis ectomicorrícica, señalan que a pesar de que en la simbiosis ectomicorrícica, las plantas transfieren hacia el hongo hasta 1/3 de los fotoasimilados, ellas tienen la capacidad de restringir esta pérdida de carbohidratos, combinando la eficiencia de la absorción de la hexosa fúngica con un aumento en la fotosíntesis, evitando así el parasitismo fúngico. En este mismo sentido, Choi *et al.*, (2005), estudiando la influencia de la inoculación con el HECM *Pisolithus tinctorius* sobre el crecimiento y las características fotosintéticas de las plántulas de *Pinus densiflora*, concluyen que a pesar de representar un gasto energético para las plántulas de pinos (por tener que intercambiar hidratos de carbono con los hongos), la asociación simbiótica es beneficiosa ya que facilita la absorción de agua y nutrientes a la planta.

4.5. Conclusiones.

En este trabajo se estudió el efecto de la inoculación del hongo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* en plántulas de *P. patula* sometidas a estrés hídrico a través de un análisis morfofisiológico y proteómico. A partir de los resultados obtenidos podemos extraer las siguientes conclusiones:

La asociación simbiótica entre *P. patula* y el hongo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* aumenta la supervivencia de la especie, incluso en condiciones de déficit hídrico, así como su tasa fotosintética, alcanzándose los mayores valores de la tasa fotosintética en las plántulas inoculadas.

En condiciones de riego, existe una sobreexpresión de proteínas en las plantas no inoculadas relacionada con procesos de transporte, localización, expresión génica, biosíntesis de sustancias orgánicas, metabolismo de lípidos, metabolismo de péptidos y metabolismo de proteínas y una subexpresión en las proteínas relacionadas el metabolismo de los carbohidratos y generadores de precursores metabólicos

En las condiciones de déficit hídrico los procesos cuyas proteínas implicadas sufren activación son las relacionados con transducción de señales, expresión génica, transporte, biosíntesis sustancias orgánicas, metabolismo de los lípidos, metabolismo de los péptidos y metabolismo de las proteínas, mientras que los procesos en los que disminuye el nivel de expresión son el metabolismo de los carbohidratos, generadores de precursores metabólicos y fotosíntesis.

CAPITULO 5.

DISCUSIÓN GENERAL

El género *Pinus* es considerado por varios autores (Pinto, *et al.*, 2013; Zinn, *et al.*, 2014; Garzón, 2016) como un pilar importante en la silvicultura intensiva de plantaciones, sobre todo en el hemisferio sur, no solo por la cantidad de especies sino también por el valor económico (producción e industrialización de la madera y de sus subproductos, producción de resina a escala comercial y en la fabricación de papel de alta resistencia) que tienen muchas de ellas, tanto en sus países de origen como en aquellos lugares donde han sido introducidas.

Según Rodríguez, *et al.*, (2013) los pinos mexicanos, en su mayoría, se caracterizan por su rápido crecimiento y por la resistencia a condiciones adversas, como la sequía, las heladas, los incendios, el pastoreo y al ataque de algunas plagas, además de por su capacidad para establecerse en suelos con bajo contenido nutricional. Sin embargo, a pesar de su abundancia e importancia, se sabe poco sobre los mecanismos moleculares que permitan evaluar el efecto del manejo forestal sobre la variabilidad genética y sistemas reproductivos (Nystedt, *et al.*, 2013; Alfonso-Corrado, *et al.*, 2014).

La presente Tesis Doctoral propuso el empleo de dos especies de pinos originarias de México utilizadas en proyectos de investigación forestal que transcurrieron en la época colonial en Angola durante los años 60 y 70. Estos proyectos tenían dos objetivos: primero probar su adaptación a las tierras altas de Angola (planalto central) y segundo, como reserva estratégica para futuras extracciones de materias primas (IIA, 1967).

Debido a la aparente adaptación a las condiciones edafoclimáticas locales de estas dos especies (*P. greggi* y *P. patula*), fueron seleccionadas como especies modelo en esta disertación para estudiar la respuesta diferencial de las mismas a situaciones de sequía prolongada, situación que se prolonga en Angola durante seis meses al año, y a la micorrización en condiciones controladas. Se aplicaron técnicas moleculares de genómica funcional (proteómica) como herramienta para la caracterización de estas dos especies con el fin de aportar información necesaria para la selección del material vegetal apropiado en los programas de repoblación forestal, mejorando dichos programas lo que podría contribuir a medio plazo con el plano de desarrollo agrario de Angola (PDMPSA, (2012), que tiene como objetivo aumentar la producción de plantas exóticas instalando varios viveros forestales (convencionales) con una capacidad de producción anual estimada en 50.000 plántulas por vivero y poder repoblar las áreas consideradas críticas desde el punto de vista de fragilidad de sus ecosistemas.

Para la identificación y caracterización de estas dos especies se realizó un estudio basado en el uso de marcadores moleculares, los cuales han sido propuestos como una herramienta válida para evaluar crecimiento, productividad y respuesta a diferentes estreses abióticos y bióticos, y en particular a estrés hídrico en géneros como *Populus* (Bohler, *et al.*, 2013; Li, *et al.*, 2014), *Pinus* (Wang, *et al.*, 2013; Xu y Wu, 2016), *Eucalyptus* (Bedon, *et al.*, 2012; Correia, *et al.*, 2016) y *Quercus ilex* (Valero-Galván, *et al.*, 2013; Simova-Stoilova, *et al.*, 2015). Se llevaron a cabo en todos los capítulos de la disertación estudios a nivel molecular basados en la proteómica *shotgun*, considerada por muchos investigadores como una herramienta útil y efectiva en la mayoría de los estudios proteómicos enfocados a obtener un alto rendimiento (Zhang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014; Erickson *et al.*, 2015; Soufi, y Soufi, 2016).

5.1. Determinación de la expresión de proteínas en semillas de *P. greggi* y *P. patula* a través de genómica funcional (Proteómica).

La primera pregunta en este trabajo buscó determinar qué proteínas permiten caracterizar la variabilidad genética entre las especies y su adaptabilidad a diversos ecosistemas. Según García *et al.*, (2012), el estudio de las proteínas expresadas diferencialmente en los perfiles proteicos de muestras biológicas vegetales nos ofrece la oportunidad de examinar los cambios globales en la expresión génica y patrones temporales de la acumulación de proteínas que ocurren en diferentes procesos vegetales, permitiéndonos la comprensión de su desarrollo y adaptabilidad.

En este capítulo se describen y discuten los perfiles proteicos de semillas de *Pinus patula* y *P. greggi* de México a través de un enfoque basado en el análisis por espectrometría de masa nLC- MS/MS, con el fin de aplicar la proteómica comparativa a la identificación de marcadores moleculares, explorando las bases de datos IPRScan y KEGGs y para la clasificación funcional de los perfiles, la base de datos Gene Ontology (GO), teniendo en cuenta las tres categorías presentes: procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares.

Una vez comparados los perfiles proteicos se identificaron 362 especies proteicas comunes en ambas especies de *Pinus*. En *P. greggi* se identificaron 100 proteínas ausentes en *P. patula* y en *P. patula* fueron identificadas 267 proteínas ausentes en *P. greggi*. Esta mayor identificación de proteínas en las semillas de *P. patula* con respecto a *P. greggi* podría relacionarse con la sensibilidad de la

identificación de péptidos, que pudo verse afectada por varios factores como el tamaño del espacio de búsqueda, la reproducibilidad o el tipo de muestra entre otros. Al respecto algunos autores (Veit, *et al.*, 2016; Pfeuffer, *et al.*, 2017) refieren que en este tipo de estudios de alto rendimiento en los que se realiza una evaluación masiva de todas las proteínas (proteoma) de forma simultánea, se genera una gran cantidad y variedad de datos que obliga la implementación de flujos de análisis/procesamiento extremadamente complejos, motivando el uso de distintas herramientas bioinformáticas y la consulta de grandes bases de datos que almacenan la información funcional a nivel de genes. En este sentido, algunos autores recomiendan el uso de bases de datos de secuencias específicas con la finalidad de mejorar la sensibilidad en la identificación de los péptidos (Romero-Rodríguez, *et al.*, 2014; Shanmugam y Nesvizhskii, 2015).

Cuando analizamos los perfiles proteicos explorando la base de datos KEGGs los resultados muestran que las proteínas identificadas en el estudio participan en un total de 99 rutas metabólicas entre las dos especies. La ruta metabólica más representativa fue la glucólisis/gluconeogénesis, lo que podría deberse al hecho de ser una de las más importantes en semillas. Según Chen *et al.*, (2016) esta ruta representa una vía indispensable para mantener el equilibrio de los niveles celulares de ATP, energía utilizada en el proceso de germinación y el metabolismo de los carbohidratos, tan importantes en las semillas de las plantas superiores, ya que el almidón constituye el principal carbohidrato de almacenamiento (Duan *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017).

El análisis comparativo de la distribución de proteínas entre especies en función de los *procesos biológicos* reveló similitud entre las dos especies con mayor predominancia de proteínas involucradas en los procesos de oxidación-reducción. Resultados similares fueron obtenidos por otros autores (Rodríguez, *et al.*, 2016; Pullman *et al.*, 2015), que estudiando el perfil proteómico en semillas de algunas coníferas también identificaron como grupo predominante las proteínas relacionadas con los procesos de oxidación-reducción. Estas proteínas podrían mejorar la iniciación del tejido embriogénico (TE), el desarrollo embrionario en etapa temprana y la germinación en estas especies.

Cuando se analizó la distribución de proteínas entre los distintos *componentes celulares*, se verificó que en ambas especies predominan las proteínas integrales o intrínsecas de membrana. Estas proteínas están relacionadas con funciones celulares como el transporte y la expresión génica. Estos resultados quizás estén relacionados con

el hecho de que la membrana celular está involucrada directamente en el proceso de germinación, durante el cual la membrana celular experimenta una reorganización específica y funcional participando de forma activa en la imbibición de agua por parte de la semilla (Voegelé, *et al.*, 2011); Rosental, *et al.*, 2014; Yu, *et al.*, 2015)

En relación a las *funciones moleculares* en las que participan las proteínas identificadas, en ambas especies fueron identificadas un elevado número de proteínas con participación en la síntesis de ATP. Esta energía es resultado de la degradación de las sustancias de reservas encontradas en las semillas, incluidos el almidón, las proteínas y los aceites, donde se produce la energía necesaria para la germinación de semillas (Ma *et al.*, 2016).

De forma general el análisis de expresión diferencial mostró una elevada similitud entre los perfiles proteicos de las dos especies de pinos estudiadas. Esta similitud sugiere que existe poca variabilidad genética entre ellas. Sin embargo, estas especies son muy diferentes desde el punto de vista morfológico, lo que coincide con estudios realizados en coníferas mexicanas, específicamente en el género *Pinus* (Gernandt y Pérez de la Rosa, 2014) en los que se observaron altos niveles de variabilidad morfológica pero bajos niveles de diferenciación interespecífica, pudiendo ser resultado de las bajas tasas de evolución entre las especies en este género.

Nuestros resultados también están validados por estudios previos realizados por William, (2008) sobre distancias genéticas entre especies de pino en México y Centroamérica basadas en análisis de RAPD, en los que se detectó muy poca distancia genética entre *P. greggii* y *P. patula*. Así mismo, coinciden con resultados encontrados por autores como Gernandt y Pérez de la Rosa (2014) sobre el análisis filogenético molecular (análisis de secuencias de ADN) en coníferas, que concluyen que se trata de un grupo monofilético que desciende de un mismo antepasado común hace más de 300 millones de años.

5.2. Comportamiento fisiológico y molecular de *P. patula* y *P. greggii* bajo dos tratamientos de simulación de condiciones naturales de crecimiento de la Meseta Central de Angola (época seca y época de lluvia).

Una vez comparados los perfiles proteicos de estas dos especies, candidatas a ser utilizadas en los programas de repoblamiento forestal en las tierras altas de Angola, se evaluó el comportamiento morfofisiológico y molecular de ambas especies bajo dos tratamientos de simulación de las condiciones naturales de crecimiento en esta región

del país (época seca y época de lluvia), con vista a proporcionar información sobre la capacidad de adaptación de estas especies frente a los previsibles escenarios de cambio climático. Esta información podría ser para el diseño de programas de conservación y gestión de estas especies exóticas. Algunos autores (Flores *et al.*, 2018) sostienen que incluso a escalas geográficas reducidas, los pinos mexicanos presentan diferencias en la respuesta a estrés hídrico y que estas diferencias entre especies y poblaciones son relevantes en los programas de forestación, así como en actividades de conservación genética.

5.2.1. Análisis a nivel morfofisiológico.

Debido a la complejidad de los sistemas biológicos resulta difícil describir y categorizar de manera sintética el comportamiento de las plantas frente al déficit hídrico, por lo que trataremos de hacer énfasis en aquellas variables que experimentaron un comportamiento relevante como la supervivencia, el crecimiento, el potencial hídrico del xilema y la fluorescencia.

En el caso particular de la supervivencia, esta variable no mostró diferencias a lo largo de los primeros 21 días del experimento. A partir del día 28 en los tratamientos de simulación de la época seca se observó que las plantas comenzaron a morir, aumentando la mortalidad hasta el final del período de medición (día 42), en el que el número de bajas fue de 24 en *P. greggi* y 25 en *P. patula*, lo que equivale al 60% y 62,5% de mortalidad respectivamente. Este resultado es consistente con el de otros autores como (Ceacero, *et al.*, 2012; Espinoza, *et al.*, 2014); Ortuño, *et al.*, 2015; Sigala, *et al.*, 2015) que en sus estudios apuntan a que la supervivencia, la biomasa y el crecimiento de una planta pueden ser afectados por varios factores, entre ellos la humedad del sustrato y la temperatura, hasta el punto de provocar serias restricciones en su crecimiento, desarrollo y supervivencia.

En cuanto al crecimiento, muchos trabajos sobre déficit hídrico con especies de pinos mexicanos en la etapa de vivero concluyeron que el estrés hídrico es uno de los factores que más influye en el crecimiento de las plantas, generando daños e incluso la muerte en muchas de ellas (Maldonado-Benitez, *et al.*, 2011; Prieto-Ruíz, *et al.*, 2012). Bulfe y Fernández (2014), afirman que las plantas cuando comienzan a evidenciar condiciones hídricas desfavorables reducen el crecimiento, promueven la aparición de la yema apical y se inician mecanismos de resistencia ante el estrés. En nuestro caso, al evaluar la respuesta diferencial por especie se observó que, en el tratamiento de

simulación de la época seca, las plantas de las dos especies soportaron 21 días sin regar, sin diferencias significativas en las variables de crecimiento (altura y diámetro). Este resultado podría ser utilizado para el diseño del régimen de riego en estas condiciones climáticas mejorando la gestión de los recursos hídricos.

Los resultados del potencial hídrico (Ψ), mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos tratamientos de simulación (época seca y lluviosa) y las dos especies. Estas diferencias se acentuaron en la época seca a partir del día 35, alcanzándose los valores más negativos de potencial hídrico en la última medida. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Bulfe y Fernández, (2014), que estudiando el déficit hídrico en plántulas de *Pinus taeda*, encontraron que el potencial hídrico, tanto antes del amanecer (predawn) como al mediodía, presentó los menores valores (más negativos) en las plantas con restricción hídrica respecto a las plantas control en cada período de estrés. Sin embargo, en otras especies de pino como *Pinus cooperi* algunos resultados muestran como potenciales hídricos similares a los que inducen mortalidad en las especies estudiadas (-3,24) limitan el crecimiento, pero no afectan a la supervivencia (Prieto-Ruíz, *et al.*, 2012). En este mismo sentido Ritchie y Landis, (2010) apuntan que en la etapa de vivero las coníferas bajo condiciones de estrés disminuyen su potencial hídrico lo que incide en los procesos fisiológicos de las plantas afectando su crecimiento, pero no siempre su supervivencia.

De forma general, los valores más altos de todas las variables estudiadas relacionadas con la fluorescencia se detectaron en el tratamiento de simulación de la época de lluvia. Comparando las dos especies, *P. patula* presentó los valores más altos con respecto *P. greggii* en ambas épocas. Cabe destacar que las diferencias entre los valores alcanzados por las dos especies no cobraron significación estadística hasta la última medida (día 42). Estos resultados podrían estar influenciados por el desarrollo (altura) ya que la especie *P. greggii* tuvo mayor crecimiento que *P. patula* como apuntan otros autores (Di Benedetto y Tognetti, 2016), que estudiando diferentes especies forestales en condiciones de campo encontraron relación entre el crecimiento en altura y la capacidad fotosintética, afirmando que un aumento del crecimiento de las plantas puede limitar la expansión de la hoja y la fotosíntesis.

Por otro lado, los resultados estarían en consonancia con resultados encontrados por otros autores en especies forestales, como Mejía de Tafur, *et al.*, (2014), que estudiando la respuesta fotosintética de *Eucalyptus grandis* W. Hill a la disponibilidad

de agua en suelo y a la intensidad de luz, concluyeron que *E. grandis* reduce la tasa de fotosíntesis de manera significativa ante un déficit hídrico en el suelo como en el caso de las plantas sometidas a déficit hídrico de este trabajo.

Por estas razones algunos autores Jiménez-Suancha, *et al.*, (2015) consideran la fluorescencia como una herramienta de evaluación eficaz bajo los efectos del estrés, ya que la respuesta de las plantas es un buen indicador del estado del aparato fotosintético y, por tanto, de las condiciones fisiológicas.

5.2.2. *Análisis a nivel molecular*

En la actualidad la comunidad científica internacional muestra un gran interés por entender cómo los cambios a nivel molecular están relacionados con las respuestas fisiológicas que experimentan las plantas para aclimatarse y mantener las funciones fisiológicas y morfológicas cuando se enfrentan a condiciones de déficit hídrico (Brunner, *et al.*, 2015).

En nuestro estudio se evidenció una estrecha relación entre los dos análisis (morfofisiológico y molecular) ya que los análisis morfofisiológicos apuntan a la especie *P. greggii* como más resistente al déficit hídrico en relación a *P. patula*, lo que fue reforzado por los resultados obtenidos a nivel molecular. En este sentido autores como Jorge, *et al.*, (2015); Choudhury, *et al.*, (2017) afirman que las plantas no solo responden al estrés hídrico a nivel fisiológico, sino que esta respuesta también es inducida a nivel molecular, siendo esta quizás una de las más importantes. En este sentido, el estudio a nivel proteómico permitió una mayor identificación de proteínas expresadas en *P. greggii* en la simulación de la época de seca en comparación con *P. patula*. Estas diferencias en la síntesis mayoritaria de proteínas identificadas en la especie *P. greggii* podría estar relacionada con una estrategia de respuesta, protección o adaptación, desarrollada por la especie en condiciones de estrés, aportándole una elevada capacidad para tolerar la sequía lo que justificaría su amplia adaptabilidad y distribución en el mundo.

Los términos de Ontología Génica de enriquecimiento revelaron una abundancia significativa de proteínas en procesos biológicos comunes en las dos especies cuando están expuestas a la misma condición experimental (época lluviosa y seca). No obstante, cabe destacar que este nivel de expresión varía según la especie. La expresión mayoritaria de proteínas en la simulación de la **época lluviosa** se identificó en la especie

P. patula con respecto a *P. greggi*, posiblemente para desencadenar mecanismos de resistencia a estrés, ya que esta especie presentaba los peores valores a nivel fisiológico. Los procesos más enriquecidos en ambas especies en este tratamiento (simulación época de lluvias) fueron el **metabolismo** (primario, de sustancias orgánicas, proteínas y de componentes del nitrógeno), **síntesis de sustancias orgánicas** y **fotosíntesis**. Esta sobreexpresión de las proteínas relacionadas con el metabolismo primario podría entenderse, ya que el metabolismo primario está relacionado con los procesos de germinación crecimiento, desarrollo y reproducción, y en esta época en la que el riego no fue una limitante las plantas continuaron su crecimiento normal hasta el final del experimento, no siendo así en la época seca donde el crecimiento (altura) se detiene a partir del día 21. Las proteínas que disminuyeron su nivel de expresión están relacionadas con procesos **responsables de los estímulos extracelulares**, debido quizás, a que en condiciones de riego las plantas no estaban estresadas y por tanto no percibieron ninguna señal ambiental que justificara una sobreexpresión en este proceso.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios de déficit hídrico en *Pinus* (Taïbi, *et al.*, 2017); Fox, *et al.*, 2018); Du, *et al.*, 2018), donde también existe un enriquecimiento en el proceso de la fotosíntesis en los tratamientos con riego, lo que sugiere, que el proceso de fotosíntesis, el crecimiento y consecuentemente la supervivencia de las plantas se asocia con buenas condiciones de irrigación. Otros autores como Jiang *et al.*, (2019), en estudios realizados con plántulas de pino chino (*Pinus tabuliformis*), han identificado proteínas expresadas diferencialmente por aumento involucradas en procesos relacionados con la resistencia a estrés abiótico y biótico, principalmente en los procesos de fotosíntesis y el metabolismo de los carbohidratos.

En la simulación de la **época seca** la expresión mayoritaria de proteínas se identificó en la especie *P. greggi*. Los procesos biológicos enriquecidos en ambas especies se corresponden con procesos **biosintéticos**; del **metabolismo** (carbohidratos, lípidos, sustancias orgánicas, componentes del nitrógeno y péptidos), **componentes de la organización celular**; **responsables de estímulos abióticos** y **de expresión génica**. Todos ellos relacionados con respuesta de las plantas al déficit hídrico.

La sobreexpresión de los procesos biosintéticos se asoció con la biosíntesis de osmólitos, aminoácidos, flavonoides, terpenos y fitohormonas como el ácido abscísico (ABA), considerada como una mediadora del proceso adaptativo de las plantas a

procesos de estrés, ya que sus niveles se incrementan en los tejidos vegetales cuando las plantas están expuestas a diferentes tipos de estrés abióticos (Florido y Bao, 2014).

El perfil proteómico de las plántulas tolerantes a la sequía identificó una enzima relacionada con la biosíntesis de metionina, sugiriendo la síntesis de aminoácidos azufrados como un factor limitante para la tolerancia a la sequía en *Pinus halepensis*.

El metabolismo (carbohidratos, lípidos, sustancias orgánicas, componentes del nitrógeno y péptidos) y los componentes de la organización celular podrían asociarse con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, reactive oxygen species), en las células vegetales. Autores como García-Morales, *et al.*, (2013) consideran que su síntesis afecta negativamente a los componentes de la estructura celular (lípidos y proteínas) y al metabolismo.

Los procesos responsables de estímulos abióticos y de expresión génica, podrían asociarse con la síntesis de proteínas de prevención contra daños proteicos como es el caso de las proteínas LEA (*Late Embriogenesis Abundant Proteins*). Según algunos autores (Pinho dos Reis, *et al.*, 2016; Nadeem, *et al.*, 2019), las plantas inducen varios genes en respuesta a la sequía, de los cuales, algunos codifican las proteínas LEA, las acuaporinas, las moléculas de señalización, los factores de transcripción y otros que pueden participar en la síntesis de osmoprotectores como la glicina o funcionar como antioxidantes, además de proteger las estructuras de la membrana de los daños causados por la sequía, regulando el estatus redox o actuando como desintoxicador de radicales libres.

El proceso en el que se identifica una subexpresión en el nivel de proteínas en las plantas de este tratamiento fue el proceso de la **fotosíntesis**. Esto puede estar asociado a alteraciones en los procesos fotoquímicos a nivel del fotosistema II (*PSII*), a una disminución de la actividad de la Rubisco, o al sistema generador de ATP. Estos resultados son consistentes si los comparamos con los observados por Matthew, *et al.*; (2015) en *Pinus radiata* o Du, *et al.*, (2018) en *Pinus Massoniana*, que también demostraron que en condiciones de sequía se produce un proceso de inhibición de la fotosíntesis, se altera el metabolismo y consecuentemente disminuye la tasa de crecimiento de las plantas.

Estos resultados coinciden con los encontrados por Fox, *et al.*, (2018), que estudiando la especie *Pinus halepensis* tras el análisis de enriquecimiento para procesos

biológicos relacionados con la sequía, identificaron diez procesos biológicos alterados entre los que destacan por aumento a nivel de transcripciones (condiciones de riego), procesos relacionados con el metabolismo de sustancias orgánicas, metabolismo del ADN, biosíntesis (flavonoides, terpenos y hormonas) la fotosíntesis y por disminución de transcripción los procesos catabólicos de almidón, polisacáridos y manano.

Similarmente Wang, *et al.*, (2013), en estudios realizados con *Pinus massoniana* Lamb, concluyen que ante condiciones de estrés, la expresión de proteínas está relacionada básicamente con cinco categorías funcionales: fotosíntesis, metabolismo energético o primario, metabolismo secundario, estabilidad proteica y defensa. Estas funciones podrían estar regulados por aumento/disminución de expresión como en nuestro caso, en el que están regulados por disminución los procesos de fotosíntesis y metabolismo primario y por aumento los relacionados con la estabilidad proteica y de defensa. En esta misma línea, Aranda, *et al.*, (2018), estudiando déficit hídrico en *Fagus sylvatica*, encontró sobreexpresión en los procesos biosintéticos de algunos aminoácidos proteínogénicos como prolina (PRO), valina (VAL) y ácido aspártico (ASP), además de otros relacionados con la acumulación de ABA y por disminución el proceso de fotosíntesis.

5.3. Análisis morfofisiológico y proteómico de plantas de *P. patula* micorrizadas con *Pisolithus tinctorius* (Pers.) bajo déficit hídrico.

Dado el valor económico de estas dos especies sobre la cual hacen referencia autores como Pinto, *et al.*, (2013); Zinn, *et al.*, (2014); Garzón, (2016), en este capítulo nos planteamos utilizar tecnologías que permitan producir plantas más resistentes a períodos de sequía severa comenzando a partir de la etapa de vivero, por lo que nos propusimos utilizar la micorrización como alternativa biotecnológica para aumentar la resistencia de la especie *P. patula* al déficit hídrico, menos resistente que *P. greggii* según los resultados expuestos anteriormente.

En la literatura existente está bien documentado el efecto positivo de la asociación simbiótica entre los hongos ectomicorrícicos (HECM) y las plantas; ya que las plantas micorrizadas toleran mejor las condiciones de estrés fisiológico, como el trasplante, ciclos de sequía, salinidad excesiva o suelos deficientes en nutrientes (Reverchon, *et al.*, 2012). Sin embargo, se sabe muy poco sobre la regulación molecular de estas asociaciones (Heller, *et al.*, 2012).

En este capítulo al igual que en el anterior se evaluó la respuesta morfofisiológica y de expresión proteína de *P. patula* inoculado con HECM *Pisolithus tinctorius* en respuesta al déficit hídrico. En este apartado, se discuten en primer lugar los resultados más relevantes del estudio a nivel morfofisiológico y por último a nivel molecular.

5.3.1. Análisis a nivel morfofisiológico.

Los resultados del estudio morfofisiológico apuntan a que la inoculación de *P. patula* con el hongo HECM *Pisolithus tinctorius* fue beneficiosa, encontrándose diferencias significativas entre las plantas inoculadas y las no inoculadas en condiciones de *deficit hídrico*, y no con respecto a los tratamientos (con o sin inóculo) en los que las plantas estuvieron expuestas a las mismas condiciones de irrigación (controles). Estos resultados se asemejan a los reportado por Muilu-Mäkelä, *et al.*, (2015), que estudiando la disponibilidad hídrica en plántulas de pino silvestre (*Pinus sylvestris* L.) en fase de crecimiento concluyen que la disponibilidad de agua influye en la morfología y en la efectividad de la micorrización, es decir, que tanto el déficit hídrico como el exceso de agua influyen en la capacidad de las plántulas para mantener una relación simbiótica efectiva. Hu, *et al.*, (2015); Bertolazi, *et al.*,(2018) señalan que dada la multiplicidad de respuestas de las plantas a la micorrización controlada, para poderla integrar a la producción viverística forestal hay que tener en cuenta la intervención de varios factores (bióticos y abióticos) que van a influenciar en su efectividad.

La supervivencia estuvo influenciada por el déficit hídrico a partir del día 28 en los tratamientos en los que hubo interrupción del riego. No obstante, a pesar de estar expuestas a un déficit hídrico de 35 días las plantas inoculadas presentaron un porcentaje de supervivencia del 60% mientras que las plantas no inoculadas el porcentaje fue de apenas un 33,3%, lo que indica el efecto positivo de esta asociación. En este sentido, Gómez-Romero *et al.*, (2013), estudiando la especie *Pinus pseudostrobus* bajo condiciones de restauración, (con estrés nutricional e hídrico), observaron que las plantas inoculadas con el HECM *Pisolithus tinctorius*, aumentaron la supervivencia en comparación con plantas no inoculadas, lo que implica una gran ventaja para el establecimiento de las plantas bajo estas condiciones. Otros autores (Brunner, *et al.*, 2015; Victor, *et al.*, 2017), en estudios con especies forestales también hacen referencia a este efecto beneficioso de los hongos micorrícicos, aumentando la absorción de agua y nutrientes por parte de las plantas.

En lo que se refiere al crecimiento, las plantas inoculadas, tuvieron mayor desarrollo, tanto en altura como en diámetro, respecto a las plántulas no inoculadas que se mantuvieron sin interrupción del riego, sin diferencias significativas entre las plantas inoculadas (con o sin riego) y con diferencias estadísticamente significativas con respecto a las plantas sin inóculo y sin riego. Semejantes resultados fueron encontrados por Atala, *et al.*, (2012) estudiando el impacto de la inoculación con micorrizas (*Rhizopogon luteolus*), López-Gutiérrez, *et al.*, 2018), estudiando la inoculación de *Pinus pringlei* con los HECM (*Hebeloma alpinum*, *Laccaria trichodermophora* y *Thelephora terrestres*).

En cuanto al potencial hídrico del xilema no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos excepto al final del experimento donde aparecen diferencias estadísticamente significativas entre las plantas inoculadas bajo riego con respecto a los restantes tratamientos. Los tratamientos con interrupción del riego inoculados o no con (*Pisolithus tinctorius*) alcanzaron los valores más negativos (-3,01 y -3,03 Mpa). Charya, *et al.*, (2019) atribuyen la resistencia de las plantas inoculadas al déficit hídrico al buen estado nutricional de las mismas y a la capacidad que tienen las hifas fúngicas extramatriciales de transportar agua y nutrientes a las raíces de la planta hospedera actuando como extensiones del sistema radical y comportándose como estructuras de absorción.

De forma general para las tres variables de la fluorescencia analizadas los valores más elevados fueron detectados en los tratamientos inoculados principalmente en las determinaciones realizadas en los días 21 y 28, y el tratamiento en el que se observan los menores valores incluso próximos a 0, al final del experimento fue en el tratamiento no inoculado/sin riego. Esto sugiere que la asociación entre esta especie y el hongo *P. tinctorius* es efectiva para estimular la fotosíntesis. Estos resultados resultan consistentes comparados con otros estudios que sostienen que que las micorrizas inducen a las plantas una mayor capacidad de resistencia a la sequía y a la salinidad, pues le permite tener tasas de transpiración y fotosíntesis superiores bajo tales condiciones adversas (Barea, *et al.*, 2016). En cualquier caso, no todas las especies de HECM son efectivas para estimular la fotosíntesis, como demostraron Makita, *et al.*, (2012).

5.3.2. Análisis a nivel molecular.

Los resultados encontrados a nivel molecular podrían ser subyacentes a estas respuestas morfofisiológicas, pudiendo caracterizar en cierta medida la activación de vías de tolerancia al déficit hídrico, ya que se identificaron mayor número de proteínas en las plantas no inoculadas con respecto a las inoculadas. Estas proteínas están implicadas fundamentalmente en procesos biológicos relacionados con la resistencia al estrés hídrico. También se encontró mayor número de proteínas comunes en las muestras de las plantas (controles) lo que muestra una menor variabilidad en el perfil proteómico de las muestras de *P. patula* con o sin inóculo dentro de las mismas condiciones de riego, no siendo así en las condiciones de déficit hídrico.

Esta síntesis mayoritaria de proteínas identificadas en las plantas no inoculadas con respecto a las inoculadas, sobre todo en condiciones de déficit hídrico, podría estar relacionada con el hecho de que estas plantas, al no estar micorrizadas, carecen de los beneficios que confiere la asociación micorrícica en condiciones de estrés, y por tanto se ven obligadas a activar mecanismos moleculares como posible estrategia de respuesta, protección o adaptación al déficit hídrico, como apuntan algunos autores (García-Morales, *et al.*, 2013; Florido y Bao 2014; Jorge, *et al.*, 2015); Choudhury, *et al.*, 2017).

En la comparación de *P. patula* inoculado vs no inoculado en condiciones de riego existe un enriquecimiento (por un aumento o disminución en el nivel de expresión de proteínas) de las proteínas relacionadas con procesos biológicos metabolismo de los lípidos, metabolismo de los péptidos y con mayor número de proteínas implicadas el metabolismo de las proteínas. También estuvieron expresados por aumento con igual número de proteínas los procesos de transporte y localización, de expresión génica y por último biosíntesis sustancias orgánicas. Con respecto a los procesos cuyas proteínas asociadas sufren represión en su nivel de expresión se encuentra el de la fotosíntesis.

En la comparación de *P. patula* no inoculado vs inoculado sin riego fueron identificados por (aumento o disminución) en el nivel de expresión de proteínas varios procesos biológicos, bien por activación, como los relacionados con traducción de señales, expresión génica, transporte, biosíntesis sustancias orgánicas, metabolismo de los lípidos, metabolismo de los péptidos y metabolismo de las proteínas, o por represión, como el metabolismo de carbohidratos, generadores de precursores metabólicos y fotosíntesis.

De forma general los procesos enriquecidos por aumento o disminución están relacionados con procesos metabólicos, de biosíntesis, transducción de señales,

expresión génica, fotosíntesis, transporte y localización. Estos resultados coinciden con los mencionados por otros autores para el género *Pinus* (Wang, *et al.*, 2013; Xu y Wu, 2016) o *Quercus* (Tarkka, *et al.*, 2013).

Resulta interesante destacar que en ambas comparaciones se identifican pocas proteínas involucradas en los procesos de fotosíntesis, metabolismo de los carbohidratos, generadores de precursores metabólicos en las plantas no inoculadas con respecto a las inoculadas. Estos resultados están estrechamente relacionados con los obtenidos a nivel fisiológico en los que las tres variables de la fluorescencia fueron inferiores en los tratamientos no inoculados, con respecto a los inoculados. Este resultado también está apoyado por resultados de otros autores, que afirman que las micorrizas inducen a una mayor capacidad de resistencia a sequía y salinidad permitiéndoles tener tasas de transpiración y fotosíntesis superiores bajo tales condiciones adversas (Gómez-Romero, *et al.*, 2015) y el almacenamiento de carbohidratos, así como los posibles mecanismos de transferencia de carbono hacia el hongo (Nehls, *et al.*, 2016).

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES GENERALES

La presente Tesis Doctoral estuvo enfocada en el estudio de dos especies exóticas de *Pinus* (*P. patula* y *P. greggii*) introducidas en Angola en la década de los 60 y 70. Estas dos especies, debido a su gran distribución fundamentalmente en la Meseta Central de Angola, podrían utilizarse en los programas de reforestación direccionado a las áreas consideradas críticas desde el punto de vista de fragilidad de sus ecosistemas. El objetivo de esta tesis doctoral consistió en aplicar técnicas de genómica funcional (proteómica) como herramienta en la caracterización de dos especies de pinos, *P. greggi* y *P. patula*, y en la respuesta diferencial de estas especies a situaciones de estrés hídrico y a la micorrización en condiciones controladas. Con este objetivo general fueron propuestos tres objetivos específicos.

El primer objetivo fue analizar e identificar las proteínas expresadas diferencialmente en las semillas de *P. patula* y *P. greggii* con un enfoque basado en el análisis por espectrometría de masa nLC LTQ Orbitrap. Las principales conclusiones obtenidas fueron:

- No se detectó enriquecimiento en ninguna de las categorías (procesos biológicos, componentes celulares y función molecular) de la base de datos Gene Ontology (GO) comparando las dos especies.
- Para el caso de los procesos biológicos se identificó 76 y 104 proteínas en *P. greggii* y *P. patula* respectivamente asociadas fundamentalmente a los procesos de oxidación-reducción.
- La función molecular con mayor sobreexpresión de proteínas fue la síntesis de ATP, y su localización mayoritaria a nivel celular fue la membrana, con 33 y 40 proteínas en *P. greggii* y *P. patula* respectivamente.
- La ruta metabólica con mayor participación de proteínas (22 en *P. greggii* y 23 en *P. patula* respectivamente) fue la vía de la glucólisis/gluconeogénesis.
- Las enzimas de mayor abundancia fueron las oxidoreductasa, asociadas a los procesos redox con 52 y 75 secuencias en *P. patula* y *P. greggii* respectivamente.
- De modo general se concluye que los perfiles proteicos analizados de *P. patula* y *P. greggii* son muy similares, demostrando poca variabilidad genética entre estas dos especies de *Pinus*. Las proteínas mayoritariamente identificadas están asociadas a los procesos metabólicos previos a la germinación.

El segundo objetivo era comparar la respuesta morfofisiológica y molecular de *Pinus patula* y *Pinus greggii* a las condiciones naturales de crecimiento (época seca y lluviosa) de la Meseta Central de Angola en condiciones controladas. A partir de los resultados obtenidos podemos extraer las siguientes conclusiones:

- En la simulación de la época de seca de la meseta central de Angola, las plantas de *P. greggii* y *P. patula* soportaron 21 días sin regar sin diferencias significativas en las variables de crecimiento altura y diámetro. Este resultado podría ser utilizado para una gestión optimizada de los recursos hídricos en condiciones de vivero.
- Los resultados del estudio molecular demuestran que la expresión diferencial de proteínas fue mayoritaria en la simulación de la época seca comparada con la época lluviosa y en la especie *P. greggii* con respecto a la especie *P. patula*.
- El análisis de ontología de genes (GO) indicó que el estrés por sequía en *Pinus* spp, está relacionado con un aumento en el nivel de la expresión de proteínas en los procesos relacionados con el metabolismo, biosíntesis, organización celular, estímulos abióticos y expresión génica, mientras que por disminución de expresión en los procesos relacionados con la fotosíntesis y el crecimiento.
- De forma general, las plántulas de *P. greggii* fueron más tolerantes a la sequía que las plántulas de *P. patula*. Esta información puede ser utilizada como base para la selección de las especies a introducir en los programas de restauración de zonas con condiciones limitantes de agua.

Por último, se pretendía evaluar el efecto de la inoculación del hongo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* en plántulas de *P.patula* sometidas a estrés hídrico a través de un análisis morfofisiológico y proteómico en condiciones controladas. Las principales conclusiones extraídas son:

- La asociación simbiótica entre *P. patula* y el hongo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* aumenta la supervivencia de la especie, incluso en condiciones de déficit hídrico, así como su tasa fotosintética, alcanzándose los mayores valores de la tasa fotosintética en las plántulas inoculadas.
- En condiciones de riego, existe una sobreexpresión de proteínas en las plantas no inoculadas relacionada con procesos de transporte, localización, expresión génica, biosíntesis de sustancias orgánicas, metabolismo de lípidos, metabolismo de

péptidos y metabolismo de proteínas y una subexpresión en las proteínas relacionadas el metabolismo de los carbohidratos y generadores de precursores metabólicos

- En las condiciones de déficit hídrico los procesos cuyas proteínas implicadas sufren activación son las relacionados con transducción de señales, expresión génica, transporte, biosíntesis sustancias orgánicas, metabolismo de los lípidos, metabolismo de los péptidos y metabolismo de las proteínas, mientras que los procesos en los que disminuye el nivel de expresión son el metabolismo de los carbohidratos, generadores de precursores metabólicos y fotosíntesis.

Todos los resultados obtenidos en esta tesis aportan información relevante sobre el comportamiento de *P. patula* y *P.greggi* en condiciones de déficit hídrico y en respuesta a la micorrización con *Pisolithus tinctorius* que pueden ser clave para la aplicación de programas de conservación y gestión de estas especies exóticas y más aún en el contexto actual de cambio climático, cuyas previsiones son particularmente más graves en el continente Africano.

BIBLIOGRAFIA

- Abril, N., Gion, J. M., Müller, G., Navarro, R., Plomion, C., Renaut, J., et al. (2011). Proteomics research on forest trees, the most recalcitrant and orphan plant species. *Phytochemistry*, 72(10), 1219-1242.
- Agarwal, P. K. & Jha, B. (2010). Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. *Biol. Plant.*, 54(2), 201-212.
- Aguirre-Limón, V., Alanís, G. F., González-Rojas, J., Flores-Suárez, A., & Favela-Lara, S. (2017). Variación genética de *Pinus pinceana* Gordon evidencia de conectividad en poblaciones fragmentadas. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 8 (43), 39-63.
- Akinci, S., & Lösel, D. (2012). Plant Water-Stress Response Mechanisms. In Ş. Akinci, & D. Lösel, *Water Stress* (pp. 15-42). Croatia: Ismail Md. Mofizur Rahman.
- Alcalde-Alvites. (2015). Genómica: Definiciones, tecnologías y avances en el Perú. *REBIOL*, 35(2), 117-128.
- Alfonso-Corrado, C., Campos-Contreras, J., Sánchez-García, G., Monsalvo-Reyes, A., & Clark-Tapia, R. (2014). Manejo forestal y diversidad genética de *Pinus patula* Schiede ex Schltdl, & Cham, en Sierra Juárez, Oaxaca. *Madera y Bosques*, 20(2), 11-22.
- Almaraz, A. N., Ávila, R. J., N., N. J., Herrera, C. J., & González, G. M. (2002). Perfiles electroforéticos de las proteínas de semilla de pinos como caracteres taxonómicos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 4(2), 38– 44.
- Alvarez, M., Huygens, D., Fernandez, C., Gacitúa, Y., Olivares, E., Saavedra, I., et al. (2009). Effect of ectomycorrhizal colonization and drought on reactive oxygen species metabolism of *Nothofagus dombeyi* roots. *Tree Physiology*, 29(8), 1047–1057.
- Ambríz, E., Báez-Pérez, A. L., Sánchez-Yáñez, J. M., Moutoglis, P., & Villegas, J. (2010). *Fraxinus-Glomus-Pisolithus* symbiosis: Plant growth and soil aggregation effects. *Pedobiología*, 53, 369-373.
- Anjum, S., Xie, X., Wang, L., Saleem, M., & Man, C. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *Afr. J. Agric. Res.*, 6, 2026–2032.
- Aranda, I., Sánchez-Gómez, D., Cadahía, E., & Fernández de Simón, B. (2018). Ecophysiological and metabolic response patterns to drought under controlled

- condition in open-pollinated maternal families from a *Fagus sylvatica* L. population. *Environmental and Experimental Botany*, 150, 209-221.
- Arija, P. A., Hernández-Rodríguez, M., Martín-Pinto, P., & Oria de Rueda, J. A. (2013). Efecto de la micorrización de *Pisolithus tinctorius* y *Rhizopogon roseolus* sobre planta de *Pinus nigra* empleada en la restauración de un monte quemado. 6º Congreso Forestal Español. España: Sociedad Española de Ciencias forestales.
- Ariza, M. (2011). Estudios de la respuesta a estrés hídrico en *Pinus halepensis* Mill. mediante aproximaciones de genómica funcional: transcriptómica y proteómica. Tesis (Doctoral), E.T.S.I. Agrónomos y de Montes. Universidad de Córdoba.
- Arzate-Fernández, A., Gutiérrez-González, G., & Heredia-Bobadilla, R. L. (2016). Diversidad genética de dos especies de coníferas en el Nevado de Toluca: una alternativa de conservación. UAEM.
- Atala, C., Muñoz-Capponi, E., Pereira, G., Navarrete, E., & Oses, R. (2012). Impact of mycorrhizae and irrigation on *Pinus radiata*. *Gayana Botanica*, 69(2).
- Ávila-Flores, I., Prieto-Ruiz, J., Hernández-Díaz, J., Whehenkel, C., & Corral-Rivas, J. (2014). Preacondicionamiento de *Pinus engelmannii* Carr. mediante déficit de riego en vivero. *Rev. Chapingo ser. cienc. for. ambient.*, 20(3).
- Azofeifa, D. A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; Aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221-242.
- Baerenfaller, K., Massonnet, C., Walsh, S., S, B., Bühlmann, P., Hennig, L., et al. (2012). Systems-based analysis of *Arabidopsis* leaf growth reveals adaptation to water deficit. *Mol Syst Biol.*, 8, 606.
- Baker, N., & Rosenqvist, E. (2004). Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J Exp Bot.*, 55(403), 1607-1621.
- Barea, J., Pozo, M., & Azcón-Aguilar, C. (2016). *Significado y aplicación de las micorrizas en agricultura*. Estación Experimental del Zaidín, Departamento de Microbiología del Suelo. Granada: CSIC .
- Barroetaveña, C. R. (2003). Las micorrizas y la producción de plántulas de *Pinus ponderosa* Dougl. ex Laws. en la Patagonia, Argentina. *Bosque*, 24(1), 17-33.
- Bavita, A. (2015). Protective mechanisms of heat tolerance in crop plants. *Journal of Plant Interactions*, 10(1), 202-210.

- Becerra, I., Cruz, G., Ríos, S., & Castelli, G. (2013). Importance of irrigation and plant size in the establishment success of different native species in a degraded ecosystem of central Chile, *34*(1), 103-111.
- Bechtold, U., Penfold, C., Jenkins, D., Legaie, R., Moore, J., Lawson, T., et al. (2016). Time-Series Transcriptomics Reveals That AGAMOUS-LIKE22 Affects Primary Metabolism and Developmental Processes in Drought-Stressed Arabidopsis. *Plant Cell.*, *28*(2), 345-366.
- Bedon, F. V., Mabialangoma, A., Chaumeil, P., Barré, A., Plomion, C., & Gion, J. M. (2012). Proteomic plasticity of two *Eucalyptus* genotypes under contrasted water regimes in the field. *Plant Cell Environ.*, *35*(4), 790-805.
- Behal, R. H., Lin, M., Back, S., & Oliver, D. (2002). Role of acetyl-coenzyme A synthetase in leaves of Arabidopsis thaliana. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *402*(2), 259-267.
- Berg, J., Tymoczko, J., & Stryer, L. (2002). Glycolysis Is an Energy-Conversion Pathway in Many Organisms. En W. H. Company (Ed.), *Biochemistry* (5th ed.). NCBI.
- Bernal, L., & Martínez, E. B. (2006). Una nueva visión de la degradación del almidón. *Rev. del Centro de Inv. Méx.*, *7*(25), 77-99.
- Bertolazi, A., Da Silva, F., Caione, G., Zanchetta, P., Moaci, C., Bastos, S., et al. (2018). Linking Plant Nutritional Status to Plant-AMF Interactions. *Plant Microbiome: Stress Response*, *5*, 351-384.
- Bewley, J. D., Bradford, K., Hilhorst, H., & Nonogaki, H. (2013). *Seeds: physiology of development, germination and dormancy* (3ra ed.). Springer.
- Bohler, S., Sergeant, K., Jolivet, Y., Hoffmann, L., Hausman, J. F., Dizengremel, P., et al. (2013). A physiological and proteomic study of poplar leaves during ozone exposure combined with mild drought. *Proteomics*, *13*(10-11), 1737-54.
- Brown, D., Curtis, T., & Adams, C. E. (2015). Effects of clear-felling versus gradual removal of conifer trees on the survival of understorey plants during the restoration of ancient woodlands. *Forest Ecology and Management*, *348*, 15-22.
- Broz, A., Tovar-Méndez, A., Mooney, B., Johnston, M., Miernyk, J. A., & Randall, D. (2014). A novel regulatory mechanism based upon a dynamic core structure for the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex? *Mitochondrion*, *19*, 144-153.

- Brundrett, M. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews*, 79(3), 473-495.
- Brunner, I., Herzog, C., Dawes, A., Arend, M., & Sperisen, C. (2015). How tree roots respond to drought. *6*(547).
- Buckley, N., Sack, L., & Gilbert, E. (2011). The role of bundle sheath extensions and life form in stomatal responses to leaf water status. *Plant Physiology*, 156(2), 962–973.
- Bulfe, N., & Fernández, M.E. (2014). Efecto del momento de ocurrencia del déficit hídrico sobre el crecimiento de plantines de *Pinus taeda* L. *Rev. Fac. Agron.*, 113(1), 81-93.
- Cánovas, F., Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Jorin, J., Mock, H., & Rossignol, M. (2004). Plant proteome analysis. *Proteomics*, 4(2), 285-298.
- Carrasco-Hernández, V., Pérez-Moreno, J., Espinosa-Hernández, V., Juan José Almaraz-Suárez, J. J., Quintero-Lizaola, R., & Torres-Aquino, M. (2010). Caracterización de micorrizas establecidas entre dos hongos comestibles silvestres y pinos nativos de México. *1*(4), 567-577.
- Carrera, N. A., & López, R. G. (2004). Manejo y evaluación de ectomicorrizas en especies forestales. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente.*, 10(2), 93-98.
- Cary, L. K., & Pittermann, J. (2018). Small trees, big problems: Comparative leaf function under extreme edaphic stress. *105*(1).
- Castelán-Muñoz, N., Jiménez-Casas, M., López-Delgado, H. A., Campos-García, H., & Vargas-Hernández, J. J. (2015). Familial variation in *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham. seedlings in response to drought: water and osmotic potential. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales*, 21(3), 295-306.
- Castillo, B. (2015). *Investigación #2 Clasificación de las enzimas según la unión internacional de bioquímica y biología molecular*. Recuperado el 20 de Diciembre de 2017, de http://www.academia.edu/34332924/INVESTIGACION_2_CLASIFICACION%3%9AN_LA_UNI%3%93N_INTERNACIONAL_DE_BIOQU%3%8DMICA_Y_BIOLOG%3%8DA_MOLECULAR

- Ceacero, C. 2. (2010). *Influencia del contenido de gravas y las técnicas de conservación del suelo sobre la respuesta y ecofisiología de brinzales de encina en forestación de tierras agrarias*. Univ Córdoba.
- Ceacero, C. J., Díaz-Hernández, J. L., Del Campo, A. D., & Navarro-Cerrillo, R. M. (2012). Evaluación temprana de técnicas de restauración forestal mediante fluorescencia de la clorofila y diagnóstico de vitalidad de brinzales de encina (*Quercus ilex* sub. *ballota*). *33*(2), 191-202.
- Cervera, M., Storme, V., Ivens, B., Gusmao, J., Liu, B. H., Hostyn, V., et al. (2001). Dense Genetic Linkage Maps of Three Populus Species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) Based on AFLP and Microsatellite Markers. *Genetics*, *158*(2), 787-809.
- Cetina, A. V., González, H. V., Ortega, D. M., Vargas, H. J., & Villegas, M. A. (2002). Supervivencia y crecimiento en campo de *Pinus greggii* Engelm., previamente sometidos a podas o sequía en vivero. *Agrociencia*, *36*(2), 233-241.
- Cetina, A. V., L., O. D., González, H. V., Vargas, H. J., T., C. L., & Villegas, M. A. (2001). Fotosíntesis y contenido de carbohidratos de *Pinus greggii* Engelm. en respuesta a la poda y al régimen de riego en vivero. *Agrociencia*, *35*(6), 599-607.
- Charya, L., & Garg, S. (2019). Advances in methods and practices of ectomycorrhizal research. *Advances in Biological Science Research*, 303-325.
- Chen, X., Schreiber, K., Appel, J., Makowka, A., Fähnrich, B., Roettgerb, M., et al. (2016). The Entner–Doudoroff pathway is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants. *Plant Biology*, *113* (19), 5441–5446.
- Chen, Y., Nara, K., Wen, Z., Shi, L., Xia, Y., Shen, Z., et al. (2015). Growth and photosynthetic responses of ectomycorrhizal pine seedlings exposed to elevated Cu in soils. *Mycorrhiza*, *25*(7), 561–571.
- Choi, D., Quoreshi, A., Maruyama, Y., & Jin, H. O. & Koike, T. (2005). Effect of ectomycorrhizal infection on growth and photosynthetic characteristics of *Pinus densiflora* seedlings grown under elevated CO₂ concentrations. *Photosynthetica*, *43*(2), 223-229.
- Choudhury, K., Rivero, R., Eduardo Blumwald, E., & Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *90*(5), 856-867.
- Cipriano, J., A., C., Fernandes, C., Gaspar, M., Pires, J., Bento, J., et al. (2013). Evaluation of genetic diversity of Portuguese *Pinus sylvestris* L. populations

- based on molecular data and inferences about the future use of this germplasm. *Journal of Genetics*, 92(2), e41-48.
- Claeys, H. y. (2013). The Agony of Choice: How Plants Balance Growth and Survival under Water Limiting Conditions. *Plant Physiology*, 162(4), 1768-1779.
- Conesa, A., & Götz, S. (2008). Blast2GO: A Comprehensive Suite for Functional Analysis in Plant Genomics. *International Journal of Plant Genomics*, 2008, 1-12.
- Contreras, M. Á. (2015). Nuevos mecanismos moleculares de tolerancia a sequía y otros tipos de estrés abiótico en especies arbóreas de interés económico. *Tesis Doctoral*. Madrid, España.
- Cornejo, O. E., & Emmingham, W. (2003). Effects of water stress on seedling growth, water potential and stomatal conductance of four Pinus species. *Crop Res*, 25(1), 159-190.
- Correia, B., Valledor, L., Hancock, R., Renaut, J., Pascual, J., Soares, A. M., et al. (2016). Integrated proteomics and metabolomics to unlock global and clonal responses of *Eucalyptus globulus* recovery from water deficit. *Metabolomics*, 12(141).
- Cortina, J., Moneris, J., Disante, K., Fuentes, D., & Valdecantos, A. (2009). Fertilización tardía y establecimiento de *Quercus ilex* subsp. ballota. *5to Congreso Forestal Español*. Ávila: Sociedad Española de Ciencias Forestales.
- Costa, O. H., Stürmer, L. S., Ragonezi, C., Graziotti, H. P., Graziotti, S. F., & Silva, B. E. (2016). Species richness and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi in *Syngonanthus elegans*, an endemic and threatened species from the Cerrado domain in Brazil. *Ciência. Agrotecnologia*, 40(3).
- Cotula, L., Vermulen, S., Leonard, R., & Keeley, J. (2009). (IIMAD/FAO/FIDA, Editor, I. I. Londres e Roma, Producer, & FAO) Retrieved 10 2016, from www.ifda.org: www.ifda.org/pub/land/land_grab.pdf.
- Cox, J., & Mann, M. I. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*, 26, 1367–1372.
- Cox, J., Hein, M., Lubner, C., P. I., N. N., & Mann, M. (2014, Sep). Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics*, 13(9), 2513-2526.

- Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R., Olsen, J., & Mann, M. (2011). Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *Journal Proteome Research*, *10*, 1794–1805.
- Crowther, T. G. (2015). Mapping tree density at a global scale. *Nature*, *525*, 201-205.
- Dai, A. (2011). Drought under global warming: a review. WIREs Climate Change. *Wiley Online Library, Web of Science*, *2*, 45–65.
- Damodaran, S., Wood, T., Nagarajan, P., & Rabin, A. (2007). Evaluating Peptide Mass Fingerprinting-based Protein Identification. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, *5*(3-4), 152-157.
- Di Benedetto, A., & Tognetti, J. (2016). Técnicas de análisis de crecimiento de plantas: su aplicación a cultivos intensivos. *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias*, *42*(3).
- Diniz, C. (1998). *Angola, o meio físico e potencialidades agrárias*. Lisboa: Instituto da Cooperação Portuguesa.
- Ditmarová, L., Kurjak, D., Palmroth, S., Kmet', J., & Štřelcová, K. (2010). Physiological responses of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings to drought stress. *Tree Physiology*, *30*(2), 205–213.
- Dodet, M., & Collet, C. (2012). When should exotic forest plantation tree species be considered as an invasive threat and how should we treat them? *Biol Invasions*, *14*, 1765-1778.
- Domínguez, N., Planelles, R., Rodríguez, B., & Saiz de Omeñaca, J. (2004). Influencia de la micorrización con trufa negra (*Tuber melanosporum*) en el crecimiento, intercambio gaseoso y nutrición mineral de plántulas de *Pinus halepensis*. *Investigación Agraria Sistema Recursos Forestales*, *13*(2), 317-327.
- Du, M., Ding, G., & Cai, Q. (2018). The Transcriptomic Responses of *Pinus massoniana* to Drought Stress. *Forests*, *9*(6), 326.
- Duan, E., Wang, Y., Liu, L., Zhu, J., & Zhong, M. (2016). Pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase (PFP) regulates carbon metabolism during grain filling in rice. *Plant Cell Rep*, *35*, 1321–1331.
- Duñabeitia, M., Hormilla, S., García-Plazaola, I., Txarterina, K., Arceche, U., & Becerril, J. (2004). Differential response of three fungal species to environmental factors and their role in the mycorrhization of *Pinus radiata* D. Don. *Mycorrhiza*, *14*(1), 11-18.

- Durand, T. C., Sergeant, K., Renaut, J., Planchon, S., Hoffmann, L., Carpin, S., et al. (2011). Poplar under drought: comparison of leaf and cambial proteomic responses. *Proteomics*, 74(8), 1396-410.
- El-Asmar, J., Jaafar, H., Bashour, I., Farran, T., & Saoud, P. (2017). Hydrogel Banding Improves Plant Growth, Survival, and Water Use Efficiency in Two Calcareous Soils. *CLEAN – Soil, Air, Water*, 45(7).
- Eloy, E., Caron, O. B., Trevisan, R., Behling, A., Schmidt, D., & Queiróz de Souza, V. (2014). Determinação do período de permanência de mudas de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden em casa de vegetação. *Comunicata Scientiae*, 5(1), 44-50
- Erickson, B. K., Jedrychowski, M. P., Mcalister, G. C., Everley, R. A., Kunz, R., & Gygi, S. P. (2015). Evaluating multiplexed quantitative phosphopeptide analysis on a hybrid quadrupole mass filter/linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Analytical Chemistry*, 87 (2), 1241–1249.
- Espinoza, E. S., Martinez, A. V., & Magni, R. C. (2014). Genetic control of growth, biomass allocation, and survival under drought stress in *Pinus radiata* D. Don seedlings. *Tree Genetics & Genomes*, 10(4), 1045-1054.
- Fan, F., Ding, G., & Xiaopeng Wen, X. (2016). Proteomic analyses provide new insights into the responses of *Pinus massoniana* seedlings to phosphorus deficiency. *PROTEOMICS*, 16(3), 504–515.
- FAO. (2012). El estado de los bosques del mundo. Los bosques y la evolución del mundo moderno. 8-16.
- FAO. (2015). *Global Forest Resource Assessment: How are the world's forests changing?* (Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura) Retrieved 8 7, 2016, from <http://www.fao.org/biodiversity/componentes/bosques/es/>.
- FAO. (2016). (Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura) Retrieved 08 07, 2016, from Biodiversity: <http://www.fao.org/biodiversity/componentes/bosques/es/>
- FAO. (2017). Agricultural Biotechnologies.
- Fernandes, S., Morais, B., Mesquita-Oliveira, F., Ulisses, C., Medeiros, F., & Albuquerque, C. (2019). Arbuscular mycorrhizal fungi and auxin associated with microelements in the development of cuttings of *Varronia leucocephala*. ISSN. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 23(3).

- Fernández, V., Marchelli, P., & Fontenla, B. (2013). Ectomycorrhizas Naturally Established in *Nothofagus nervosa* Seedlings Under Different Cultivation Practices in a Forest Nursery. *Microbial Ecology*, 66(3), 581–592.
- Fimbel, A. R., & Fimbel, C. C. (1996). The role of exotic conifer plantations in rehabilitating degraded tropical forest lands: A case study from the Kibale Forest in Uganda. *Forest Ecology and Management.*, 81, 215-226.
- Finlay, R. D. (2004). Mycorrhizal fungi and their multifunctional roles. *Mycologist*, 18(2), 91-96.
- Flores, A., Climent, J., Pando, V., López-Upton, J., & Alía, R. (2018). Intraspecific variation in Pines from the trans-mexican volcanic belt grown under two watering regimes: implications for management of genetic resources. *Forest*, 9(71).
- Florido, B. M. & Bao, F.L. (2014). Tolerancia a estrés por déficit hídrico en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos Tropicales*, 35(3).
- Fox, H., Doron-Faigenboim, A., Kelly, G., Bourstein, R., Attia, Z., Zhou, J., et al. (2018). Transcriptome analysis of *Pinus halepensis* under drought stress and during recovery. *Tree Physiology*, 38(3), 423–441.
- Fox, L. & Montague, T. (2009). Influence of Irrigation Regime on Growth of Select Field-grown Tree Species in a Semi-arid Climate. *Journal of Environmental Horticulture*, 27(3).
- FRA. (2010). *FRA, 2010. Evaluación de los recursos forestales mundiales.* . Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Galindo-Flores, G., Castillo-Guevara, C., Campos-López, A., & Lara, C. (2015). Characterization of ectomycorrhizas formed by *Laccaria trichodermophora* and *Suillus tomentosus* in *Pinus montezumae*. *Botanical Science*, 93(4).
- García, C., Hernandez, T., Roldan, A., Albaladejo, J., & Castillo, V. S. (2000). Organic amendment and mycorrhizal inoculation as a practice in afforestation of soils with *Pinus halepensis* Miller: effect on their microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(8-9), 1173-1181.
- García, L. M., Alonso, J. H., Torres, I. P., Guevara, R. G., & Cruz, A. H. (2012). Participación de las ciencias analíticas modernas (genómica, proteómica, metabolómica) en el estudio de las plantas. *CIENCIA@UAQ*, 5(1), 1-11.

- García-Morales, S., Gómez-Merino, C. F., Trejo-Téllez, I. L., & Herrera-Cabrera, B. E. (2013). Factores de transcripción involucrados en respuestas moleculares de las plantas al estrés osmótico. *Revista fitotecnia Mex.*, 36(2), 105-115.
- García-Rodríguez, J. L., J., P.-M., Aldrete, A., Cetina-Alcalá, V., & Vaquera-Huerta, H. (Septiembre-Octubre de 2006). Caracterización del hongo silvestre ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch en cultivo y en simbiosis con eucalipto y pino. *Agrociencia*, 40, 665-676.
- Garzón, L. P. (2016). Importancia de las micorrizas arbusculares (MA) para un uso sostenible del suelo en la Amazonia Colombiana. *Revista Luna azul*, 42, 217-234.
- Gernandt, D., & Pérez-de la Rosa, J. (2014). Biodiversidad de *Pinophyta* (coníferas) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 26-33.
- Giacomelli, J. I., Cabello, J., Arce, L. A., Dezar, C. A. & Lía-Chan, R. (2008). *Mecanismos moleculares de respuesta a distintos tipos de estrés abiótico en las plantas*. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Laboratorio de Biotecnología Vegetal- Instituto de Agrobiotecnología del Litoral. Santa Fe – Argentina: Academia Nacional de Agronomía e Veterinaria.
- Gion, J. M., Lalanne, C., Le Provost, G., Ferry-Dumazet, H., Paiva, J., Frigerio, J. M., et al. (2005). The proteome of maritime pine wood forming tissue. *Proteomics*, 5(14), 3731–3751.
- Goetten, L. C., Moretto, G., & Stürmer, S. L. (2016). Influence of arbuscular mycorrhizal fungi inoculum produced on-farm and phosphorus on growth and nutrition of native woody plant species from Brazil. *Acta Botânica Brasileira*, 30(1).
- Gomes, J. M., & Paiva, H. P. (2004). *Viveiros florestais - propagação sexuada*. Universidade Federal de Viçosa. Scielo.
- Gómez-Romero, M., Lindig-Cisneros, R., & Del Val, E. (2015). Efecto de la sequía en la relación simbiótica entre *Pinus Pseudostrobus* y *Pisolithus Tinctorius*. *Botanical Sciences*, 93(4), 731-740.
- Gómez-Romero, M., Villegas, J., Sáenz-Romero, C., & Lindig-Cisneros, R. (Septiembre-Noviembre de 2013). Efecto de la micorrización en el establecimiento de *Pinus pseudostrobus* en cárcavas. *Madera bosques*, 19(3), 51-63.

- González-Ochoa, A., De las Heras, J., Torres, P., & Gómez, S. (2003). Mycorrhization of *Pinus halepensis* Mill. and *Pinus pinaster* Aiton seedlings in two commercial nurseries. *60*(1).
- Granados-Victorino, R. L., Granados, S. D., & Sánchez, G. A. (2015). Caracterización y ordenación de los bosques de pino piñonero (*Pinus cembroides* subsp. *orizabensis*) de la Cuenca Oriental (Puebla, Tlaxcala y Veracruz). *Madera y Bosques*, *21*(2), 23-43.
- Guadagno, C. R., Beverly, D., Pleban, J. R., Speckman, H. N., Ewers, B. E., & Weinig, C. (2017). Drought is Coming: Monitoring Vegetation Response to Water Scarcity through Variable Chlorophyll a Fluorescence . *Plant Physiology*. American Society of Plant Biologists ASPB.
- Guerrero-Galán, C., Houdinet, G., Calvo-Polanco, M., Bonaldi, E., Garcia, K., & Zimmermann, D. (2018). The Role of Plant Transporters in Mycorrhizal Symbioses. *Advances in Botanical Research* .
- Gustafson, J., Miranda, R., De Bruijn, M., Sturtevant, R. B., & Kubiske, E. M. (2017). Do rising temperatures always increase forest productivity? Interacting effects of temperature, precipitation, cloudiness and soil texture on tree species growth and competition. *Journal Environmental Modelling & Software archive*, *97*(C), 171-183.
- Hall, D. E., Robert, J. A., Keeling, C. I., Domanski, D., Quesada, A. L., Jancsik, S., et al. (2012). An integrated genomic, proteomic and biochemical analysis of (+)-3-carene biosynthesis in Sitka spruce (*Picea sitchensis*) genotypes that are resistant or susceptible to white pine weevil. *Plant Journal*, *70*(5), 902.
- Haro, R. & Benito, B. (2019). The Role of Soil Fungi in K⁺ Plant Nutrition. *International Journal Molecular Sciences*, *20*(13), 3169.
- Harris-Valle, C., Esqueda, M., Valenzuela-Soto, E., & Castellanos, E. A. (2009). Tolerancia al estrés hídrico en la interacción planta-hongo micorrízico arbuscular: Metabolismo energético y fisiología. *Rev. Fitotec. Mex.*, *32*(4), 2665-271.
- He, C. Y., Zhang, J. G., Duan, A. G., Sun, H. G., Fu, L. H., & Zheng, S. X. (2007). Proteins responding to drought and high-temperature stress in *Pinus armandii* Franch Canadian. *of Botany*, *85*(10), 994-1001.
- He, M., Zhu, C., Dong, K., Zhang, T., Cheng, Z., Li, J., et al. (2015). Comparative proteome analysis of embryo and endosperm reveals central differential

- expression proteins involved in wheat seed germination. *BMC Plant Biology*, 15(97).
- Heinonsalo, J., Juurola, E., Linden, A., & Pumpanen, J. (2015). Ectomycorrhizal fungi affect Scots pine photosynthesis through nitrogen and water economy, not only through increased carbon demand. *Environmental and Experimental Botany*, 109, 103-112.
- Heller, G., Lundén, K., Finlay, D., Asiegbu, O., & Elfstrand, M. (2012). Expression analysis of Clavata1-like and Nodulin21-like genes from *Pinus sylvestris* during ectomycorrhiza formation. *Mycorrhiza*, 22(4), 271–277.
- Hermans, C., Smeyer, M., Maldona, R., Eyletters, M., Strasser, J., & Delhayé, J. (2003). Quality assessment of urban trees: A comparative study of physiological characteristics, airborne and on site fluorescence monitoring by the OJIP-test. *Journal of Plant Physiology*, 160, 81-90.
- Hermida-Castro, M., Hermida-Castro, D., & Orosa, J. A. (2013). Response of *Quercus robur* L. plants to the inoculation with ectomycorrhizae. *Environmental Research Journal*, 7(6), 449-468.
- Hernández, W. & Salas, E. (2009). La inoculación con *Glomus fasciculatum* en el crecimiento de cuatro especies forestales en vivero y campo. *Agronomía Costarricense*, 33(1), 17-30.
- Hernández-Félix, L., Molina-Rosales, D., & Agraz-Hernández, C. (2017). Servicios ecosistémicos y estrategias de conservación en el manglar de Isla Arena. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 14 (3).
- Hernández-León, S., Gernandt, D., Pérez de la Rosa, J., & Jardón-Barbolla, L. (2013). Phylogenetic Relationships and Species Delimitation in *Pinus* Section *Trifoliae* Inferred from Plastid DNA. *PLoS One*, 8(7), e70501.
- Hirayama, T., & Shinozaki, K. (2010). Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant Journal*, 61, 1041-1052.
- Holliday, J. A., Aitken, S. N., Cooke, J., Fady, B., González-Martínez, S., Heuertz, M., et al. (2017). Advances in ecological genomics in forest trees and applications to genetic resources conservation and breeding. *Molecular Ecology*, 26(3), 706–717.
- Hu, J., Yang, A., & Zhu, A. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungal diversity, root colonization, and soil alkaline phosphatase activity in response to maize-wheat rotation and no-tillage in North China. *Journal of Microbiology*, 53(7), 454-461.

- Huang, D. W., & Sherman, B. T. (2009). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research*, 37(1), 1–13.
- Huang, G., S.L., M., Bai, L., Zhang, L., Ma, H., Jia, P., y otros. (2012). Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Molecular Biology Reports*, 39(2), 969–987.
- IDF. (2010). *Inventário Florestal Nacional*. Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e das Pescas. Governo de Angola., Instituto de Desenvolvimento Florestal .Angola: Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e das Pescas.
- IIA. (1967). *Introdução e adaptação de espécies forestais exóticas*. Manual, Instituto de Investigação Agrária do Huambo (IIAA).
- IPCC. (2014). *Impacts, adaptation, and vulnerability. Working Group II Contribution to the Fifth Assessment Report of the IPCC*. Cambridge University Press, Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge, NY, USA.
- Jaleel, C. A., Manivannan, P., Lakshmanan, G. M., Gomathinayagam, M., & Panneerselvam, R. (2008). Alterations in morphological parameters and photosynthetic pigment responses of *Catharanthus roseus* under soil water deficits. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 61, 298-303.
- Jiang, L., Dumroese, R., Liu, Y., Li, G., & Lin, P. (2019). Short-day treatment affects growth, physiological parameters and needle proteome of Chinese pine (*Pinus tabuliformis* Carr.) seedlings. *New Forests*, 50(3), 469-488.
- Jiang, Y., Wang, W., Xie, Q., Liu, N., Liu, L., Wang, D., y otros. (2017). Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi. *Science*, 356(6343).
- Jiménez-Suancha, S., Alvarado, S., & Balaguera-López, H. (2015). Fluorescencia como indicador de estrés en *Helianthus annuus* L. Una revisión. *Revista Colombiana Ciencias. Hortícolas.*, 9 (1), 149-160.
- Jones, M. D. (2004). Exploring functional definitions of mycorrhizas: are mycorrhizas always mutualism? *Canadian Journal of Botany*, 82(8), 1089-1109.
- Jorge, F., Rodrigues, A., Caldana, C., Schmidt, R., van Dongen, T., & Thomas-Oates, J. A. (2015). Mass spectrometry-based plant metabolomics: Metabolite responses to abiotic stress. 35(5), 620-649.

- Jorge, I., Navarro, R., Lenz, C., Ariza, D., Porras, C., & Jorrín, J. (2006). Variation in the holm oak leaf proteome at different plant developmental stages between provenances and in response to drought stress. *Proteomics*, 6(1), 207-214.
- Jorrín, J. V., Maldonado, A. M., & Castillejo, M. A. (2007). Plant proteome analysis: a 2006 update. *Proteomics*, 7(16), 2947–2962.
- Jorrín, N. J., & Navarro, C. R. (2014). Variabilidad y respuesta a distintos estreses en poblaciones de encina (*Quercus ilex* L.) en Andalucía mediante una aproximación proteómica. *Ecosistemas*, 23(2), 99-107.
- Jorrín, N. J., Maldonado, A. M., Echevarría-Zomeño, S., Valledor, L., Castillejo, M. A., Curto, M., et al. (2009). Plant proteomics update (2007–2008). Second generation proteomic techniques, an appropriate experimental design and data analysis to fulfill MIAPE standards increase plant proteome coverage and biological knowledge. *Proteomics*, 72, 285-314.
- Junqueira, Figueiredo de Paula, N., S.E., A., & Cesar de Paula, R. (2013). Respostas fisiológicas de genótipos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* à disponibilidade hídrica e adubação potássica. *CERNE*, 19(4).
- Kaplan, E. L. (1958). Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53(282), 457-481.
- Keeling, C., Weisshaar, S., Ralph, S., Jancsik, S., Hamberger, B. D., & Bohlmann, J. (Mar de 2011). Transcriptome mining, functional characterization, and phylogeny of a large terpene synthase gene family in spruce (*Picea* spp.). *Plant Biol*, 11(43).
- Khan, P. S., Hoffmann, L., Renaut, J., & Hausman, J. F. (2007). Current initiatives in proteomics for the analysis of plant salt tolerance. *Current Science*, 93(6), 807-817.
- Koen, W., Raf, A., Van de Moortele, P., Musila, W., Gulinck, H., & Muys, B. (2014). Contrasting Cloud Forest Restoration Potential Between Plantations of Different Exotic Tree Species. *Restoration Ecology*, 22(4), 472–479.
- Kovacevic, D., Biljana, N., M., S., Srdan, B., Tanja, D., Nemanja, R., et al. (2013). Genetic relationship among some *Pinus*, *Picea* and *Abies* species revealed by RAPD markers. *Genetika*, 45 (2), 493-502.
- Laczko, E., Boller, T., & Wiemken, V. (2004). Lipids in roots of *Pinus sylvestris* seedlings and in mycelia of *Pisolithus tinctorius* during ectomycorrhiza formation: changes in fatty acid and sterol composition. 27(1).

- Landis, T. T. (1989). Seedling nutrition and irrigation. 4. Handbk. 674.
- Lawlor, D. W. (2013). Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. *Journal Experimental Botany*, 64(1), 83–108.
- Leach, K. A., Hejlek, L. G., Hearne, L. B., Nguyen, H. T., Sharp, R. E., & Davis, G. L. (2011). Primary root elongation rate and abscisic acid levels of maize in response to water stress. *Crop Science*, 51(1), 157-172.
- Lee, E. K., Cibrian-Jaramillo, A., Kolokotronis, S. O., Katari, M. S., Stamatakis, A., Ott, M., et al. (2011). A functional phylogenomic view of the seed plants *PLoS Genetics*, 7(12).
- Lee, S. H., Calvo-Polanco, M., Chung, G. C., & Zwiazek, J. J. (2010). *Plant Cell & Environment*, 33(5), 769-780.
- Lehto, T., & Zwiazek, J. (2011). Ectomycorrhizas and water relations of trees. *Revista Mycorrhiza*, 21, 71–90.
- Li, S., Wei, X., Ren, Y., Qiu, J., Jiao, G., Guo, X., et al. (2017). OsBT1 encodes an ADP-glucose transporter involved in starch synthesis and compound granule formation in rice endosperm. *Scientific Reports*, 7, 401-424.
- Li, X., Yang, Y., Sun, X., Lin, H., Chen, J., Ren, J., et al. (2014). Comparative Physiological and Proteomic Analyses of Poplar (*Populus yunnanensis*) Plantlets Exposed to High Temperature and Drought. *PLoS ONE*, 9(9).
- Light, S., Cahoon, L., Mahasenan, K. V., Lee, M., Boggess, B., Halavaty, A., et al. (2017). Transferase Versus Hydrolase: The Role of Conformational Flexibility in Reaction Specificity. *Structure*, 25(2), 295-304.
- Lindemann, C., Thomanek, N., Hundt, F., Lerari, T., Meyer, H., Wolters, D., et al. (2017). Strategies in relative and absolute quantitative mass spectrometry based proteomics. *Journal of Biological Chemistry*, 398(5-6), 687-699.
- Liu, J., Maldonado-Mendoza, I., Lopez-Meyer, M., Cheung, F., Town, D., & Harrison, J. (2019). Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *The plant Journal*, 100(2).
- Liu, Z., Xin, M., Qin, J., Peng, H., Ni, Z., Yao, Y., et al. (2015). Temporal transcriptome profiling reveals expression partitioning of homeologous genes contributing to heat and drought acclimation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biology*, 15(152).

- Lockhart, J. D. (2000). Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature*, *405*, 827-836.
- López-Gutiérrez, A., Pérez-Moreno, J., Hernández-Santiago, F., Uscanga-Mortera, E., García-Esteva, A., Cetina-Alcalá, V., y otros. (2018). Nutrient mobilization, growth and field survival of *Pinus pringlei* inoculated with three ectomycorrhizal mushrooms. *Bot. Sci.*, *96* (2).
- Lorenz, W., Alba, R., Y., Y.-S., Bordeaux, M., & Simões, M. D. (2011). Microarray analysis and scale-free gene networks identify candidate regulators in drought-stressed roots of loblolly pine (*P. taeda* L.). *Plant genomics.*, *12*(264).
- Lui, V., Puertolas, J., Climent, J., Peters, J., González-Rodríguez, A., Morales, D., et al. (2009). Nursery fertilization enhances survival and physiological status in Canary Island pine (*Pinus canariensis*) seedlings planted in a semiarid environment. *European Journal of Forest Research*, *128*(3), 221-229.
- Ma, Z., Guo, D., Xu, X., Lu, M., Bardgett, D. R., Eissenstat, M. D., y otros. (2018). Evolutionary history resolves global organization of root functional traits. *Nature*, *555*, 94–97 .
- Ma, Z., Marsolais, F., Bernards, M., Sumarah, M. W., Bykova, N. V., & U., I. A. (2016). Glyoxylate cycle and metabolism of organic acids in the scutellum of barley seeds during germination. *Plant Science*, *248*.
- Makita, N., Hirano, Y., Yamanaka, T., Yoshimura, K., & Kosugi, Y. (2012). Ectomycorrhizal-fungal colonization induces physio-morphological changes in *Quercus serrata* leaves and roots. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, *75*(6), 900-906.
- Maldonado, A., Echevarría, S., Jean-Baptiste, S., Hernández, M., & Jorrín, J. (2008). Evaluation of three different protocols of protein extraction for *Arabidopsis thaliana* leaf proteome analysis by twodimensional electrophoresis. *Journal of Proteomics*, *71*(4), 461-472.
- Maldonado-Benitez, K. R., Aldrete, A., López-Upton, J., Vaquera-Huerta, H., & Cetina-Alcalá, V. M. (2011). Producción de *Pinus greggii* Engelm. en mezclas de sustrato con hidrogel y riego, en vivero. *Agrociencia* , *45*, 389-398.
- Maldonado-Rodriguez, R. (1999). Biolyzer Software.
- Martín, M. & Ballester, M.G. (2010). *Espectrometría de masas y análisis*. Universidad Complutense. Madrid., Química Analítica, Madrid.

- Martínez-García, L. (2011). Micorrizas arbusculares en ecosistemas semiáridos. Respuesta a factores de estrés ambiental. *Ecosistemas*, 20(2), 117-120.
- Martínez-Trinidad, T., Vargas-Hernández, J. J., López-Upton, J., & Muñoz-Orozco, A. (2002). Respuesta al déficit hídrico en *Pinus leiophylla*: acumulación de biomasa, desarrollo de hojas secundarias y mortandad de plántulas. *Terra*, 20(3), 291-301.
- Martiñón-Martínez, R., Vargas-Hernández, J. J., López-Upton, J., Gómez-Guerrero, A., & Vaquera-Huerta, H. (2010). Respuesta de *Pinus pinceana* Gordon a estrés por sequía y altas temperaturas. *Rev. Fitotecnia. Mexicana*, 33(3).
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E., & Ahern, K. G. (2002). *Bioquímica* (3a ed.). Pearson-Educación S.A.
- Matthew, J., Waghorn, D. W., Michael, S. W., Euan, G. M., & H., J. J. (2015). Growth, biomass, leaf area and water-use efficiency of juvenile *Pinus radiata* in response to water deficits. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 43(3).
- Meddad-Hamza, A., Beddiar, A., Gollotte, A., Lemoine, M., Kuszala, C., & Gianinazz, S. (2010). Arbuscular mycorrhizal fungi improve the growth of olive trees and their resistance to transplantation stress. *African Journal of Biotechnology*, 9(8).
- Meddich, A., Jaiti, F., Bourzik, W., El Asli, A., & Hafidi, M. (2015). Use of mycorrhizal fungi as a strategy for improving the drought tolerance in date palm (*Phoenix dactylifera*). *Scientia Horticulturae*, 192(31), 468-474.
- Medrano, H., Bota, J., Abadía, A., Sampol, B., Escalona, J. M., Flexas J. (2002). Effects of drought on light-energy dissipation mechanisms in high-light-acclimated, field-grown grapevines. *Functional Plant Biology*, 29, 1197-1207.
- Mejía de Tafur, M. S., Burbano, D., M.A., G. D., & G.D., B. (2014). Respuesta fotosintética de *Eucalyptus grandis* W. Hill a la disponibilidad de agua en el suelo y a la intensidad de luz. *Acta Agronómica*, 63(4), 311 - 317.
- MINADER. (2012). *Política Nacional de Florestas, Fauna Selvagem e Áreas de Conservação*. Ministério da Agricultura e do Desenvolvimento Rural, Angola.
- MINUA. (2006). *Relatório do Estado Geral do Ambiente em Angola*. ANGOLA: MINUA.
- Molina, L. M., Zoot, E., Mahecha, L., & M., M. S. (2005). Importancia del manejo de hongos micorrizógenos en el establecimiento de árboles en sistemas silvopastoriles. *Revista Colombiana Ciencias Pecuarias*, 18(2), 162-175.

- Morel, A., Trontin, J.-F., Corbineau, F., A-M., L., Beaufour, M., Reymond, I., et al., (2014). Cotyledonary somatic embryos of *Pinus pinaster* Ait. most closely resemble fresh, maturing cotyledonary zygotic embryos: biological, carbohydrate and proteomic analyses. *240*(5), 1075–1095.
- Moreno, A., & Piñero, D. (2009). Phylogeographic structure of *Pinus strobiformis* Engelm, across the Chihuahuan Desert filter-barrier. *Journal of Biogeography*, *36*(1), 121-131.
- Moreno, F. P. (2009). Plant responses to water deficit stress. *Revista Agronomía Colombiana*, *27*(2), 179-191.
- Muilu-Mäkelä, R., Vuosku, J., Läärä, E., Saarinen, M., Heiskanen, J., Häggman, H., y otros. (2015). Water availability influences morphology, mycorrhizal associations, PSII efficiency and polyamine metabolism at early growth phase of Scots pine seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, *88*, 70-81.
- Müller, M., Seifert, S., Lübbe, T., Leuschner, C., & Finkeldey, R. (2017). De novo transcriptome assembly and analysis of differential gene expression in response to drought in European beech.
- Nadeem, M., Li, J., Yahya, M., Sher, A., Ma, C., Wang, X., y otros. (2019). Research Progress and Perspective on Drought Stress in Legumes. *Journal Molecular Science*, *20*(10), 2541.
- Nakashima, K., Ito, Y., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Transcriptional Regulatory Networks in Response to Abiotic Stresses in *Arabidopsis* and Grasses. *Plant physiology*, *149*, 88-95.
- Nakashima, K., Takasakia, H., Mizoi, J., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. *Elsevier*, *1819*(2), 97-103.
- Navarro-Cerrillo, R. M., Maldonado-Rodríguez, R., & Ariza Mateos, D. (2004). Fluorescencia de la clorofila en cinco procedencias de *Pinus halepensis* Mill. y su respuesta a estrés hídrico. *Cuadernos Sociedad Española Ciencias Forestales*, *17*, 69-74.
- Navarro-Fernández, C. M., De la Riva, E. G., Vera, J. R., Tosto, A., Olmo, M., Pérez-Ramos, I. M., et al. (2013). Diversidad funcional de rasgos radiculares y grado de micorrización de especies leñosas mediterráneas a lo largo de un gradiente de

- disponibilidad de recursos edáficos. *6º Congreso Florestal Español* (pp. 2-13). España: Sociedad Española de Ciencias Forestales.
- Navarro-García, A., Bañón-Árias, S., Morte, A., & Sánchez-Blanco, M. (2011). Effects of nursery preconditioning through mycorrhizal inoculation and drought in *Arbutus unedo* L. plants. *Mycorrhiza*, *21*(1), 53–64.
- NBSAP. (2006). *Primeiro Relatório Nacional para a Conferência das Partes da Convenção da Diversidade Biológica. Projecto 00011125 – Estratégia e Plano de Acção Nacionais para a Biodiversidade*. Angola: Ministério do Urbanismo e Ambiente. República de Angola.
- Nehls, U., Das, A., & Neb, D. (2016). Chapter 10. Carbohydrate metabolism in ectomycorrhizal symbiosis. En F. Martin (Ed.), *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. John Wiley & Sons, Inc.
- Nehls, U., Grunze, N., Willmann, M., Reich, M., & Küster, H. (2007). Sugar for my honey: Carbohydrate partitioning in ectomycorrhizal symbiosis. *Phytochemistry*, *68*(1), 82-91.
- Nystedt, B., Street, N. R., & Jansson, S. (2013). The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. *Nature*, *497*, 579–584.
- Oguntunde, P. G., Abiodun, B. J., Lischeid, G., & Merz, C. (2014). Modelling the impacts of reforestation on the projected hydroclimatology of Niger River Basin, West Africa. *Ecohydrology*, *7*(1), 163-176.
- Ortega, U., Duñabeitia, M., Menéndez, S., González-Murua, C., & Majada, J. (2004). Effectiveness of mycorrhizal inoculation in the nursery on growth and water relations of *Pinus radiata* in different water regimes. *24*(1), 65–73.
- Ortuño, T. A., Díaz, E. L., & Del Río, C. J. (2015). Evolución de la Fisiología Vegetal en los últimos 100 años. Cien años de avances en ciencias de la vida. *Revista Eubacteria*.(34).
- Paiva, J., Garcés, M., Frigerio, J. M., Claverol, S., Barré, A., Fevereiro, P., & Plomion, C. (2008). Molecular and phenotypic profiling from the base to the crown in maritime pine wood forming tissue. *New Phytol.*, *178*(2), 283-301.
- Pandey, A., & Mann, M. (2000). Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, *405*(6788), 837-46.
- Pastore, A., Martin, S., Politou, A., Kondapalli, K., & Stemmler, T. (2007). Desnaturalización sin polarización: baja y alta Despliegue de la temperatura de

- la frataxina de levadura en condiciones fisiológicas. *J Am Chem Soc.*, 129, 5374–5375.
- PDMPSA. (2012). *Plano de Desenvolvimento de Médio Prazo do Sector Agrário*. Angola: Ministério da Agricultura de Angola.
- Pérez, C. A., Rojas, S., & Montes, V. D. (2011). Hongos formadores de micorrizas arbusculares: una alternativa biológica para la sostenibilidad de los agroecosistemas de praderas en el caribe colombiano. *Revista Colombiana De Ciencia Animal*, 3(2), 366-385.
- Pérez-Moreno, J., & Read, D. (2004). Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia*, 29, 239-247.
- Pérez-Ramos, I. M., Villar, R., & Marañón, T. (2014). El fascinante mundo de los *Quercus*: desde la biología molecular hasta la ecología de comunidades. *Ecosistemas*, 23(2), 1-4.
- Petrov, V., Hille, J., Mueller-Roeber, B., & Gechev, S. (2015). ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Frontiers Plant Science*, 6(69).
- Pfeuffer, J., Timo Sachsenberg, T., Alka, O., Walzer, M., Fillbrunn, A., Nilse, L., et al. (2017). OpenMS – A platform for reproducible analysis of mass spectrometry data. *Journal of Biotechnology*, 261(10), 142-148.
- Philippe, R., Ralph, S., Külheim, C., Jancsik, S., & Bohlmann, J. (2009). Poplar defense against insects: genome analysis, full-length cDNA cloning, and transcriptome and protein analysis of the poplar Kunitz-type protease inhibitor family. *New Phytologist*, 184(4), 865-884.
- Pierce, S. E., Davis, R. W., Nislow, C., & Giaever, G. (2009). Chemogenomic Approaches to Elucidation of Gene Function and Genetic Pathways. *Methods Mol Biol*, 548, 115-143.
- Pigott, C. (1982). Survival of mycorrhiza formed by *Cenococcum geophilum* Fr in dry soils. *New Phytologist*, 92(4), 513-517.
- Pinho dos Reis, S., Marques, N., L.A., M., & Batista de Souza, C. (2016). Plant Molecular Adaptations and Strategies Under Drought Stress. *Drought Stress Tolerance in Plants*, 2, 91-122.
- Pinto, J. J., Dos Santos, T. E., V., D. A., Filho, K. N., Filho, P. E., Sturion, A. J., y otros. (2013). Melhoramento genético de espécies arbóreas na Embrapa Florestas: uma visão histórica. *EMBRAPA-Florestas*.

- Pita, P., Cañas, I., Sofía, F., Ruiz, F., & Tobal, G. (2005). Use of physiological traits in tree breeding for improved yield in drought-prone environments: the case of *Eucalyptus globulus*. *Investigación Agraria*, 14(3), 383-393.
- Planelles-González, R., Villar-Salvador, P., Oliet Palá, J., & López Arias, M. (2004). Efecto de tres niveles de estrés hídrico y dos periodos de aplicación sobre algunos parámetros de calidad funcional de *Quercus ilex* L. y su desarrollo postrasplante. *Cuadernos Soc. Esp. Cien. For.*, 17, 81-86.
- Plomion, C., Richardson, T., & Mackay, J. (2005). Advances in forest tree genomics. *New Phytologist*, 166, 713-717.
- Pouyu-Rojas, E., Siqueira, J. O., & Santos, J. G. (2006). Compatibilidade simbiótica de fungos micorrízicos arbusculares com espécies arbóreas tropicais. *Revista Brasileira de Ciência do Solo.*, 30(3), 413-424.
- Prieto, J. A., O, C. E., Domínguez, P. A., C., N. J., Marmolejo, J. G., & Jiménez, J. P. (2004). Estrés hídrico en *Pinus engelmannii* Carr., producido en vivero. *Invest Agrar: Sistema Recurso Forestales*, 13(3), 443-451.
- Prieto-Ruíz, J., Almaraz- Roldán, R., Corral-Rivas, J., & Díaz-Vázquez, A. (2012). Efecto del estrés hídrico en *Pinus cooperi* Blanco durante su preacondicionamiento en vivero. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 3(12), 19-28.
- Pšidová, E., Ditmarová, E., Jamnická, G., Kurjak, D., Majerová, J., Czajkowski, T., et al. (2015). Photosynthetic response of beech seedlings of different origin to water deficit. *Photosynthetica*, 53(2), 187–194.
- Pullman, G. S., Zeng, X., Copeland-Kamp, B., Crockett, J., Lucrezi, J., May, S., et al. (2015). Conifer somatic embryogenesis: improvements by supplementation of medium with oxidation–reduction agents. *Tree Physiology*, 35(2), 209–224.
- Ralph, S. G., Chun, H. J., Kolosova, N., Cooper, D., Oddy, C., Ritland, C. E., et al. (2008). A conifer genomics resource of 200,000 spruce (*Picea* spp.) ESTs and 6,464 high-quality, sequence-finished full-length cDNAs for Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *Genomics*, 14(9), 484.
- Reverchon, F., Ortega-Larrocea, M., Bonilla-Rosso, G., & Perez-Moreno, J. (2012). Structure and species composition of ectomycorrhizal fungal communities colonizing colonizing seedlings and adult trees of *Pinus montezumae* in Mexican neotropical forests. *Microbiology Ecology*, 80, 479-487.

- Ritchie, G. A. & Landis, T. D. (2010). Assessing plant quality. Seedling processing, storage and outplanting. *7*, 17-81.
- Rodríguez de Francisco, L., Romero-Rodríguez, M. C., Navarro-Cerrillo, R. M., Miniño, V., Perdomo, O., & Jorrín-Novo, J. V. (2016). Characterization of the orthodox *Pinus occidentalis* seed and pollen pt. *J. Proteomic*, *143*, 382-389.
- Rodríguez, L., Razo, Z. R., S., V. M., & Meza, R. J. (2013). Características dasométricas de *Pinus greggii* Engelm. ex Parl. var. *greggii* de nueve procedencias en Galena, Nuevo León. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, *4*(18), 117-123.
- Romero-Rodríguez, M. C., Pascual, J., Valledor, L., & Jorrin-Novo, J. (2014). Improving the quality of protein identification in non-model species. Characterization of *Quercus ilex* seed and *Pinus radiata* needle proteomes by using SEQUEST and custom databases. *105*, 85-91.
- Rosental, L., Nonogaki, H., & Fait, A. (2014). Activation and regulation of primary metabolism during seed germination. *Seed Science Research*, *24*(1), 1-15.
- Rudolph, K., Wiegert, T., Schubert, R., & Müller-Uri, F. (2016). The occurrence of progesterone 5 β -reductase is not limited to the angiosperms: a functional gene was identified in *Picea sitchensis* and expressed in *Escherichia coli*. *New Zealand Journal of Forestry Science*, *46*(7).
- Rui-qing, S., Hong-bo, J., Jin-yu, Q., & Bo-ru, Z. (2006). Effect of Ectomycorrhizal Fungi on Seedling Growth of Mongol Scotch Pine. *Journal of Fungal Research*.
- Ruiz, P. O., Rojas, K. C., & Sieverding, E. (2011). La distribución geográfica de los hongos de micorriza arbuscular: una prioridad de investigación en la Amazonía peruana. *Espacio y Desarrollo*, *23*, 47-63.
- Ruscitti, M., Garita, S., Arango, M. C., & Beltrano, J. (2015). Inoculación con aislamientos seleccionados de hongos vesículoarbusculares como alternativa para moderar el estrés hídrico en plantas de tomate platense bajo condiciones de invernáculo. *Revista de la Facultad de ciencias Agrarias y Forestales*, *114*(2), 219-229.
- Saibo, N. J., Lourenco, T., & Oliveira, M. M. (2009). Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Ann. Bot.*, *103*(4), 609-623.

- Salguero, D., Muñoz, F., Cancino, J., Flórez, V., Rubilar, R., Acuña, E., y otros. (2016). Intercambio gaseoso de dos clones de *Paulownia elongata* x *fortunei* al primer año de desarrollo vegetativo en tres sitios del centro-sur de Chile. *73*(2).
- Salmón-Rivera, B., Barrette, M., & Thiffault, N. (2016). Issues and perspectives on the use of exotic species in the sustainable management of Canadian forest. *Reforesta, 1*, 261-280.
- Salvato, F.; Gallo de Carvalho, M.C.C. (2010). Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. *Ciencia Rural, 40*(3).
- Sánchez, C. C. (2000). *Técnicas de micorrización en vivero con hongos ectomicorrízicos. experiencias realizadas en el Centro Nacional de Mejora Forestal "El Serranillo"*. Guadalajara: Tercer Curso Avanzado de Viveros y Producción de Planta Forestal.
- Sánchez-González, A. (2008). Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. *Madera bosques, 14*(1).
- Sancho-Knapik, D., Sanz, M., Peguero-Pina, J., Niinemets, U., & Gil-Pelegrín, E. (2017). Changes of secondary metabolites in *Pinus sylvestris* L. needles under increasing soil water deficit. *Annals of Forest Science, 74*(1), 24.
- Sandoval-Usme, M., Umaña-Pérez, A., Vallejo-Pulido, A., Arévalo-Ferro, C., & Sánchez-Gómez, M. (2009). La proteómica en la era postgenómica. *Acta biol. Colomb., 14*(3), 19-30.
- Sarasola, M., Rusch, E., Schlichter, M., & Ghersa, M. (2006). Invasión de coníferas forestales en áreas de estepa y bosques de ciprés de la cordillera en la Región Andino Patagónica. *Ecología Austral, 16*(2), 143-156.
- Scholander, P., Hammel, E., Bradstreet, E., & Hemmingsen, E. (April de 1965). Sap Pressure in Vascular Plants. *Science, 148*(3668), 339-346.
- Secretaría de Estado y Comercio. (2016). *Informe Económico y Comercial*. Oficina Económica y Comercial de España en Luanda, Luanda.
- Sequera-Mutiozabal, M., Tiburcio, F., & Alcázar, R. (2016). Drought Stress Tolerance in Relation to Polyamine Metabolism in Plants. *Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 1*, 267-286.
- Shanmugam, A., & Nesvizhskii, A. (2015). Effective Leveraging of Targeted Search Spaces for Improving Peptide Identification in Tandem Mass Spectrometry Based Proteomics. *Journal of Proteome Research, 14*(12), 5169–5178.

- Sharp, R. E. (2002). Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant Cell and Environment*, 25(2), 211-222.
- Sigala, J. A., González, M. A., González, H. R., Jiménez, J. P., & Prieto, J. A. (2012). Preacondicionamiento de *Pinus pseudostrabus* Lindl mediante estrés hídrico en vivero.
- Sigala, R. J., & González, T. M. A., & Prieto, J. A. (2015). Supervivencia en plantaciones de *Pinus pseudostrabus* Lindl. en función del sistema de producción y preacondicionamiento en vivero. *Revista Mexicana. de Ciencias. Forestales*, 6(30).
- Siles, G., Rey, P., Alcántara, J., Bastida, J., & Herreros, J. (2010). Effects of soil enrichment, watering and seedling age on establishment of Mediterranean woody species. *Acta Oecologica*, 36(4), 357-364.
- Silva, E. N., Ribeiro, R. V., Ferreira-Silva, S. L., Viegas, R. A., & Silveira, J. A. (2010). Comparative effects of salinity and water stress on photosynthesis, water relations and growth of *Jatropha curcas* plants. *Journal of Arid Environments*, 74(10), 1130-1137.
- Simova-Stoilova, L., Romero-Rodríguez, M. C., Sánchez-Lucas, R., Navarro-Cerrillo, R., Medina-Aunon, J. A., & Jorrín-Novo, V. (2015). 2-DE proteomics analysis of drought treated seedlings of *Quercus ilex* supports a root active strategy for metabolic adaptation in response to water shortage. *Front Plant Science*, 6(627).
- SIRE-Paquetes Tecnológicos. (2001). *Pinus greggii* Englem. SIRE: CONABIO-PRONARE.
- SIRE-Paquetes Tecnológicos. (2001). *Pinus patula* Schl. et Cham. SIRE: CONABIO-PRONARE.
- SIRE-Paquetes Tecnológicos. (2006). *Pinus greggii* Englem. SIRE: CONABIO-PRONARE.
- SIRE-Paquetes Tecnológicos. (2006). *Pinus patula* Schl. et Cham. SIRE: CONABIO-PRONARE.
- Smirnakou, S., Ouzounis, T., & Radoglou, K. (2017). Effects of continuous spectrum LEDs used in indoor cultivation of two coniferous species *Pinus sylvestris* L. and *Abies borisii-regis* Mattf. *Journal of Forest Research*, 32(2).
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). Mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry. In *Mycorrhizal Symbiosis*. (pp. 611-636). London, UK.: 3ra Edición Elsevier.

- Soufi, Y., & Soufi, B. (2016). Mass Spectrometry-Based Bacterial Proteomics: Focus on Dermatologic Microbial Pathogens. *Frontier in Microbiology*, 7(181).
- Strasser, R., Tsimille-Michael, M., & Srivastava, A. (2000). The fluorescence transient as a tool to characterise and screen photosynthetic samples. En M. Junus, U. Pathre, & Mohantriy, *Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation* (págs. 445-483). London and New York: Taylor and Francis LTD.
- Taïbi, K., del Campo, D., Vilagrosa, A., Bellés, M., López-Gresa, M., Davinia Pla, D. et al. (2017). Drought Tolerance in *Pinus halepensis* Seed Sources As Identified by Distinctive Physiological and Molecular Markers. *Front. Plant Sci.*, 8 , 1202.
- Talbot, J. M. & Treseder, K.K. (2010). Controls over mycorrhizal uptake of organic nitrogen. *Pedobiologia*, 53(3), 169-179.
- Tarkka, M., Herrmann, S., Wubet, T., Feldhahn, L., Recht, S., Kurth, F., et al. (2013). OakContigDF159.1, a reference library for studying differential gene expression in *Quercus robur* during controlled biotic interactions: use for quantitative transcriptomic profiling of oak roots in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytol.*, 199(2), 529-540.
- Thornton, P. K., Ericksen, P. J., Herrero, M., & Challinor, A. J. (2014). Climate variability and vulnerability to climate change. *Review. Glob Chang Biol.*, 20(11), 3313–3328.
- Toledo, M. J., Álvarez, J. B., & Abellanas, B. (2001). Análisis de la variabilidad de pino piñonero en Andalucía mediante proteínas del megagametofito. *III Congreso Forestal*.
- Torres-Arias, Y., Ortega- Fors, R., Nobre, C., & Furrázola-Gómez, E. (2017). Production of native arbuscular mycorrhizal fungi inoculum under different environmental conditions. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(1), 87-94.
- Tovar-Méndez, A., Miernyk, J., & Randall, D. (2003). Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in plant cells. *Febs Journal*, 270(6), 1043–1049.
- Trontin, J. F., Klimaszewska, K., Morel, A., Hargreaves, C., & Lelu-Walter, M. (2016). Methods in Molecular Biology . En *Molecular Aspects of Conifer Zygotic and Somatic Embryo Development: A Review of Genome-Wide Approaches and Recent Insights (1359)* 167-207 New York, NY: Springer .

- Urgiles, N., Haug, I., Setaro, S., & Aguirre, N. (2016). *Introduction to Mycorrhizas in the Tropics with emphasis on the Montane Forest in Southern Ecuador*. Ecuador: EDILOJA Cía. Ltda.
- Vaahtera, L., & Brosché, M. (2011). More than the sum of its parts--how to achieve a specific transcriptional response to abiotic stress. *Revista Plant Sci.*, 180(3).
- Valbuena-Carabaña, M., & Gil, L. (2014). Efectos de la gestión selvícola pasada y presente sobre la diversidad genética actual y futura de *Quercus pirenaica* Willd. en Sierra Nevada. *Ecosistemas*, 23(2), 90-98.
- Valero-Galván, J., González-Fernández, R., Navarro-Cerrillo, R., Gil-Pelegrín, E., & Jorrín-Novó, J. (2013). Physiological and proteomic analyses of drought stress response in Holm oak provenances. *Proteome Research*, 12(11), 5110-5123.
- Valladares, F., Peñuelas, J., Ogaya, R., Camarero, J. J., Corcuera, L., Sisó, S., et al. (2008). Estrés hídrico: Ecofisiología y escala de la sequía. In F. Valladares, A. Vilagrosa, J. Peñuelas, R. Ogaya, & J. Camarero, *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante*. (pp. 165-192). Madrid, España: 2ª Edición . Naturaleza y Parques Nacionales. Ministerio de medio ambiente, EGRAF, S. A., Madrid.
- Valledor, L., Recuenco-Munoz, L., Egelhofer, V., Wienkoop, S., & Weckwerth, W. (2012). The different proteomes of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proteomics*, 75(18), 5883–5887.
- Veit, J., Sachsenberg, T., Chernev, A., Aicheler, F., Urlaub, H., & Oliver Kohlbacher, O. (2016). LFQProfiler and RNPxl: Open-Source Tools for Label-Free Quantification and Protein–RNA Cross-Linking Integrated into Proteome Discoverer. *Journal. Proteome Research*, 15(9), 3441-3448.
- Verelst, W., E., B., De Bodt, S., Vandepoele, K., Demeulenaere, M., Pè, M., et al. (2013). Molecular and physiological analysis of growth-limiting drought stress in *Brachypodium distachyon* leaves. *Mol Plant.*, 6(2), 311-22.
- Vergara, A., Mercado, T., Jarma, A., & Gatti, K. (2017). Requerimiento hídrico de *Gmelina arborea* en etapa de vivero bajo condiciones controladas. *Floresta e Ambiente* , 24.
- Victor, T., Delpratt, N., Cseke, B. S., Miller, L., & Cseke, O. (2017). Imaging Nutrient Distribution in the Rhizosphere Using FTIR Imaging. *Analytical*, 89 (9), 4831-4837.

- Vilagrosa, A., Villar-Salvador, P., & Puértolas, J. (2006). El endurecimiento en vivero de especies forestales mediterráneas. En J. Cortina, J. Peñuelas Rubira, J. Puértolas, R. Savé, & A. Vilagrosa, *Calidad de planta forestal para la restauración en ambientes*. 119-140. Madrid, España: Ministerio de Medio Ambiente.
- Villar-Salvador, P., L., O., Peñuelas, J. L., Carrasco, I., & Domínguez, S. (1997). *Efecto de diferentes niveles de endurecimiento por estrés hídrico en el contenido de nutrientes y la resistencia a la desecación de plántulas de Pinus halepensis Mill.* Centro Nacional de Mejora Forestal, Dirección General de Conservación de la Naturaleza. Guadalajara: Ministerio de Medio Ambiente.
- Visuata, B. (1998). Estadística multivariante. En *Análisis estadístico con SPSS para Windows*. (Vol. II). Madrid, España. Mc Graw-Hill.
- Viveros-Viveros. (2013).
- Voegele, A., L. A., Müller, K., & Leubner-Metzger, G. (2011). Members of the gibberellin receptor gene family *GID1* (*GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1*) play distinct roles during *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana* seed germination. *J Exp Bot*, 62(14), 5131-5147.
- Wang, W., Vignani, R., Scali, M., & Cresti, M. (2006). A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis*, 27(13), 2782-2786.
- Wang, X., Liu, Z., Niu, L., & Fu, B. (2013). Long-term effects of simulated acid rain stress on a staple forest plant, *Pinus massoniana* Lamb: a proteomic analysis. *Trees*, 27(1), 297-309.
- Wessels, C. B., Malan, F. S., Seifert, T., Louw, J. H., & Rypstra, T. (2015). The prediction of the flexural lumber properties from standing South African-grown *Pinus patula* trees. *European Journal of Forest Research*, 134, 1-18.
- Wilkins, M. R., Sanchez, J. C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F., et al. (1996). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13(1), 19-50.

- William, D. S. (2008). ¿Estamos más cerca de entender la ascendencia de las poblaciones de la variante *Patula* en la Sierra Madre del Sur México. *Foresta Veracruzana*, 10(1), 59-66.
- Xu, C., & Wu, X. Q. (2016). Physiological and Proteomic Analysis of Mycorrhizal *Pinus massoniana* Inoculated with *Lactarius insulsus* under Drought Stress. *Russian Journal of Plant Physiolog*, 63(5), 709–717.
- Yang, J., Zhang, J. H., Wang, Z. Q., Zhu, Q. S., & Liu, L. J. (2003). Involvement of abscisic acid and cytokinins in the senescence and remobilization of carbon reserves in wheat subjected to water stress during grain filling. 26(2), 1621-1631.
- Yu, X., Li, A., & Li, W. (2015). How membranes organize during seed germination: three patterns of dynamic lipid remodelling define chilling resistance and affect plastid biogenesis. *Plant Cell Environ*, 38(7), 1391–1403.
- Zhang, H. W. (July de 2015). Proteome Analysis of Poplar Seed Vigor. *PloS one*, 10(7).
- Zhang, K., Xia, X., Zhang, Y., & S., G. S. (2012). An ABA-regulated and Golgi-localized protein phosphatase controls water loss during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 69(4), 667-678.
- Zhang, L., Zhang, H., & Li, X. F. (2013). Analysis of genetic diversity in *Larix gmelinii* (Pinaceae) with RAPD and ISSR markers. *Genetic and Molecular Research* , 12 (1), 196-207.
- Zhang, N., Zhang, H., Sun, Q., Cao, Y., Li, X., Zhao, B., et al. (2017). Proteomic analysis reveals a role of melatonin in promoting cucumber seed germination under high salinity by regulating energy production. *Sci Rep.* , 7, 503.
- Zhang, Y., Fonslow, B., Shan, B., Moon-Chang, B., & Yates, J. (2013). Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chemical Reviews*, 113(4), 2343–2394.
- Zhang, Z., Wu, S., Stenoien, D., & L., P.-T. (2014). High-throughput proteomics. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 7, 437-454.
- Zingaretti, M. S., Cascae, I. M., De Matos, P. L., Antunes, P. T., & De Castro, F. S. (2013). Water Stress and Agriculture Chapter 7. In *Stress, Responses of Organisms to Water* (pp. 151-179). Brazil: Sener Akinci, intech.

- Zinn, Y. L., Guerra, A. R., Silva, C. A., Faria, J. A., & Silva, T. A. (2014). Soil organic carbon and morphology as affected by pine plantation establishment in Minas Gerais, Brazil. *Forest Ecology and Management*, 318, 261-269.
- Zurita-Silva, A. S.-E., Razzaghi, F., Alvarez, F. R., Ruiz, K. B., Morales, A., & Silva, H. (2014). Respuestas a la sequía y adaptación de la Quinoa. In F. y. CIRAD, *Estado del arte de la quinua en el mundo en 2013*. (pp. 185-202). Santiago de Chile; Montpellier, França, Chile : D. Bazile.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. 1. Lista de las proteínas identificadas por nLC LTQ Orbitrap en las semillas de *P. greggii* y *P. patula*. La clasificación funcional se realizó mediante el software Blast2GO (v.4. 1.9) contra la base de datos nr-NCBI.

Anexo 2. Clasificación funcional de proteínas en la base de datos KEGGs muestran que las proteínas identificadas en el estudio participan en un total de 99 rutas metabólicas.

Anexo 3. Tablas de salida del análisis estadístico de las variables fisiológicas capítulo 4.

Anexo 4. Perfiles funcionales GO relativos a procesos biológicos *P. patula* vs *P. greggii* (época seca)

Anexo 5. Perfiles funcionales GO relativos a procesos biológicos *P. patula* vs *P. greggii* (época lluvias)

Anexo 6. Perfiles funcionales GO relativos a procesos biológicos *P. patula* época seca vs lluviosa

Anexo 7. Perfiles funcionales GO relativos a procesos biológicos *P. greggii* época seca vs lluvias

Anexo 8. Tablas de salida del análisis estadístico de las variables fisiológicas capítulo 5.

Anexo 9. Perfiles funcionales GO relativos a procesos biológicos *P. patula* no inoculado vs inoculado (Estrés hídrico)

Anexo 10. Perfiles funcionales GO relativos a procesos biológicos *P. patula* no inoculado vs inoculado (riego)