INFLUENCIA DE LA FECHA DE PLANTACIÓN AL ESTABLECIMIENTO DE *PINUS HALEPENSIS* MILL. APLICACIÓN DE LA PROTEÓMICA A ESTUDIOS DE ECOFISIOLOGÍA EN CAMPO

David Ariza Mateos [1], Rafael Mª Navarro Cerrillo [1], Antonio D. del Campo García [2], Antonio J. Ibáñez Lloris [2] y Jesús V. Jorrín Novo [3]

[1] E.T.S. Ingenieros Agrónomos y de Montes. Dep. Ingeniería Forestal. Universidad de Córdoba. Apdo. 3048. 14080-CÓRDOBA. Correo electrónico: oikos2002es@yahoo.es
[2] Dep. Ing. Hidráulica y Medio Ambiente. EPSG. UPV. Crta. Nazaret-Oliva s/n. 46730-GRAO DE GANDÍA (Valencia, España)
[3] Dep. Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba. Apdo. 14071-CÓRDOBA (España)

Resumen

Pinus halepensis Mill. en el ámbito mediterráneo, y en particular en ambientes semiáridos, ha demostrado ser una especie con buena adaptabilidad y capaz de sobrevivir en situaciones de fuerte estrés hídrico siendo una de las especies más utilizadas en los programas de reforestación del sureste español. La proteómica tiene como objetivo el estudio del proteoma de los diferentes seres vivos, es decir, el estudio de las proteínas presentes en una unidad biológica, en un momento concreto y bajo condiciones ambientales determinadas, siendo un buen indicador del estado fisiológico de la planta y su respuesta a estrés. El objetivo de este trabajo es aplicar la proteómica como herramienta para el estudio del efecto de la fecha de plantación sobre una repoblación de *Pinus halepensis* en el levante español bajo condiciones de estrés. La fecha de plantación tuvo efecto sobre la variable crecimiento en términos de altura, diámetro y esbeltez y sobre el potencial hídrico, no siendo demasiado notable su influencia sobre la supervivencia o la fluorescencia de la clorofila. Mediante un análisis de proteómica previo, se encontraron algunas diferencias a nivel de expresión de proteínas que podrían servir como marcadores moleculares de estrés hídrico una vez hayan sido identificadas.

Palabras clave: *Pino carrasco, Repoblación, Estrés hídrico, Proteómica, Electroforesis bidimensional*

INTRODUCCIÓN

El éxito de una repoblación depende de la adecuación de la especie seleccionada, de las condiciones ambientales, la morfología y fisiología de la planta (calidad de la planta) y el manejo de dicha planta para su establecimiento en campo.

Los climas mediterráneos semiáridos, un caso particular del clima mediterráneo, con precipitaciones anuales por debajo de los 350 mm (CEBALLOS et *al*., 2004), son particularmente limitantes para el establecimiento de repoblaciones forestales, siendo el déficit hídrico, asociado normalmente a otros factores limitantes como las altas temperaturas, el déficit de presión de vapor o las elevadas radiaciones (CALAMASSI et *al*., 2001) la causa principal de mortalidad de la planta.

ISSN: 1575-2410
© 2008 Sociedad Española de Ciencias Forestales

Pinus halepensis Mill. en el ámbito mediterráneo, y en particular en ambientes semiáridos, ha demostrado ser una especie con buena adaptabilidad y capaz de sobrevivir en situaciones de fuerte estrés hídrico (DÍAZ & ROLDÁN, 1999). El pino carrasco puede crecer en todos los sustratos y prácticamente en todos los climas de la región mediterránea. Aunque su desarrollo óptimo se produce en rangos de precipitaciones entre 350 y 700 mm de media anual y entre -2 y 10ºC de temperatura, pueden hacerlo en condiciones mucho más desfavorables como en el sur de España donde pueden llegar a estar por debajo de 260 mm de lluvia anual y con temperaturas medias mucho más elevadas (RUIZ DE LA TORRE, 2006). Por esta capacidad de adaptación el P. halepensis ha sido y es una de las especies más utilizadas en los programas de reforestación del Sureste español (DE MIGUEL, 1999).

Diversos trabajos han puesto de manifiesto la influencia de la fecha de plantación en el desarrollo postransplante, (NAVARRO et *al*., 2004a) haciendo hincapié en el menor desarrollo radical de las plantaciones tardías frente a otras más tempranas (CORCHERO et *al*., 2002)

A las técnicas clásicas para el control de la calidad de planta, de manejo de dicha planta para su implantación en campo y de seguimiento de las poblaciones establecidas, actualmente se están incorporando otras de bioquímica y biología molecular, aplicadas a la ecofisiología forestal, entre las que hay que destacar las nuevas metodologías "-ómicas", genómica y proteómica. Estas técnicas permiten conocer el estado fisiológico de la planta, además de ayudarnos a conocer otras variables importantes como la variabilidad genética entre poblaciones y la respuesta a distintos tipos de estrés y de esta forma realizar una selección óptima de genotipos en función de las condiciones del lugar de establecimiento (CANOVAS et *al*., 2004, JORGE et *al*., 2006).

La proteómica, considerada como disciplina científica o aproximación metodológica, tiene como objetivo el estudio del proteoma de los diferentes seres vivos, es decir, el estudio de las proteínas presentes en una unidad biológica (fracción subcelular, célula, tejido, órgano, organismo) en un tiempo (estadio de diferenciación y desarrollo) y bajo condiciones ambientales determinadas (ROSSIGNOL et *al*., 2006). La importancia de conocer el proteoma de un organismo se basa en el hecho de que las proteínas son las moléculas que ejecutan directamente la información contenida en los genes. Además, esta disciplina es necesaria porque la genómica no siempre es suficiente para explicar determinadas situaciones: no existe una correlación perfecta entre ARNm y las proteínas para las que codifica (GYGI et *al*., 1999) y existen modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales que alteran los productos esperados de la traducción (FEDER & WALTER, 2005).

La proteómica aplicada al sector forestal constituye una buena herramienta para el conocimiento del estado fisiológico de las masas y su respuesta a distintos tipos de estrés post-trasplante (bióticos o abióticos) (COSTA et *al*., 1998; TURCO et *al*., 2004), la variabilidad genética entre poblaciones (BARRENECHE et *al*., 1996, JORGE et *al*., 2004) o la respuesta diferencial a estrés en base a esa variabilidad (selección de genotipos) (JORGE et *al*., 2006). El objetivo de este trabajo es aplicar la proteómica como herramienta para el estudio del efecto de la fecha de plantación sobre una repoblación de Pinus halepensis en el levante español bajo condiciones de estrés hídrico durante el primer año post-trasplante.

En una primera aproximación, este trabajo se centró en la optimización de un protocolo de extracción, separación e identificación de proteínas utilizando técnicas de electroforesis bidimensional para su posterior utilización en el seguimiento de la repoblación de estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

La planta utilizada en este ensayo fue *P. halepensis* de la procedencia Levante Interior, de un año de edad y cultivada en el vivero de La Hunde, en el termino municipal de Ayora, en envase Forest-pot 300® con turba y perlita (3:1), (h= 11,69 ± 1,98; Ø = 2.76 ± 0,27). La parcela de ensayo se localizó en el monte "Castellano" (T. M. Calles-Valencia), situada a 900 m. de altitud, y se seleccionó de una de las parcelas del programa de restauración forestal de la cuenca vertiente al embalse del Loriguilla (Provincia Valencia, T.M. Calles y Domeño) cofinanciado por el

Ministerio de Medio Ambiente, La Generalitat valenciana y el programa F.E.D.E.R.

Diseño experimental

El diseño experimental se realizó para evaluar la respuesta de las plantas a estrés hídrico en función de su fecha de plantación. Para cumplir este objetivo, se realizaron dos plantaciones, una temprana en el mes de noviembre de 2005 y una tardía en enero de 2006. Estas dos fechas fueron elegidas en base a la bibliografía consultada (NAVARRO et *al*., 2004a) y en base a las condiciones climáticas incluidas en el proyecto de restauración que mostraban diferencias suficientemente significativas en temperatura y precipitación entre ambas fechas como para esperar una respuesta diferencial tras la plantación. La parcela se organizó según el siguiente diseño de plantación: tres bloques completos al azar para cada fecha de plantación, cada bloque con tres unidades experimentales (filas) de 18 plantas cada una, es decir, 162 plantas por fecha de plantación y 344 plantas en total.

A lo largo del primer año se evaluaron las variables supervivencia, crecimiento (altura, diámetro basal y la relación de ambas en términos de esbeltez), potenciales hídricos al amanecer, medidos mensualmente, mediante cámara de Scholander (SKPM 1400, Skye Instruments) y fluorescencia de la clorofila con un fluorímetro Plant Efficiency Analyser (PEA, Hansatech Instruments, Reino Unido) como medida indirecta de la capacidad fotosintética. Además, se realizaron tomas de muestras para la extracción de proteínas, en cada una de las unidades experimentales y para las dos fechas de plantación, con el fin de conocer el estado proteico de las plantas en los primeros estadíos postransplante y su relación con el estado fisiológico de dichas plantas. Tanto la recogida de muestras como las medidas de fluorescencia y de crecimiento se realizaron a lo largo del año en cuatro momentos especialmente relevantes desde el punto de vista climático (Febrero, abril, junio y octubre). Se analizaron los geles de las fechas de febrero y Abril, para estudiar la respuesta temprana al acondicionamiento en campo. Los datos obtenidos en valores de volumen normalizado de los spot fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS 13.0. Para la posterior identificación de proteínas diferenciales se eligieron los spots en función de su presencia o ausencia en todas las replicas (spot cualitativos) o diferencias en el valor del volumen normalizado (spot cuantitativos).

Electroforesis bidimensional

Las proteínas fueron extraídas del material de partida mediante precipitación con TCA-Acetona (DAMERVAL et *al*., 1986). Una vez extraídas, las proteínas se solubilizaron en tampón con Urea 8M, Chaps al 2%, DTT 20 mM y anfolitos al 0,5% (Bio-Rad), además de 0,001% de bromofenol.

Una vez extraídas y solubilizadas, las proteínas tienen que ser separadas para su posterior cuantificación y visualización. La técnica de electroforesis bidimensional de alta resolución (2DE) permite la separación, detección y cuantificación de proteínas de una muestra mediante la combinación de dos métodos electroforéticos de separación. La primera dimensión (IEF) se realizó en tiras de 17 cm con un gradiente lineal de pH 5-8 (IPG strips, Bio-Rad) con un PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad) usando una corriente constante de 50 mA por tira de gel desde los 250 V iniciales hasta los 10000 V a los que llegó finalmente y la segunda dimensión se realizó sobre un gel de SDS-poliacrilamida (SDS PAGE) al 13% usando el equipo Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad). El voltaje empleado fue de 60 mA constantes por gel durante 12 horas aproximadamente Posteriormente los geles se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue G-250, se digitalizaron mediante escaneado con un densitómetro (GS-800, Bio-Rad) para su posterior análisis mediante la aplicación informática PDQuest™ (Bio-Rad) (CASTILLEJO et *al*., 2006).

RESULTADOS

Para ambas fechas de plantación la supervivencia no presentó diferencias estadísticamente significativas, siguiendo una tendencia lógica a disminuir, desde el 100% inicial hasta alcanzar su mínimo en septiembre de 2005, momento a partir del cual la tendencia se estabilizó. Al final del primer año la supervivencia fue del 80% tanto para las plantas de noviembre como para las de enero.

Para todas las fechas de medición, el crecimiento en altura y diámetro fue mayor en las plantas plantadas en noviembre que en las de enero (Figura 1). Al final del período de medición las diferencias se mantuvieron (4.37±0.13, 16.81±0.5 de las plantas de noviembre frente a 3.47±0.11, 13.72±0.3 de las plantas de enero). En general, excepto para el caso del diámetro de la tercera medida, las diferencias son significativas aplicando una T-student ($p<0,05$).

En cuanto a los potenciales hídricos, existe una tendencia clara a lo largo de todo el año a que las plantas de noviembre tengan potenciales hídricos más bajos que las plantas de enero aunque esta tendencia no es estadísticamente significativa aplicando una T-student ($p\geq0.05$; Figura 2). Los valores para los meses con potencial hídricos más altos (noviembre) fueron de -0,28 ± 0.03 Mpa para ambas fechas de medición mientras que en junio, donde se presentaban los valores más bajos, fueron de -1,01 ± 0.06 Mpa para las plantas de noviembre y -0,87 ± 0.1 Mpa para las plantas de enero.

La fluorescencia de la clorofila presentó valores en su relación Fv/Fm de entre 0,5 y 0,8, no mostrando diferencias significativas entre fechas de plantación para ninguna de las cuatro fechas en las que se realizaron las medidas ($p>0,05$), aunque se observa una tendencia a que la fluorescencia fuera mayor en las plantas de noviembre (Figura 3).

Por último se realizó la extracción de proteínas, en cada una de las unidades experimentales y para las dos fechas de plantación. Un total de 52 proteínas fueron encontradas de forma diferencial en función de la fecha de plantación para las medidas de febrero (6 en las plantas de

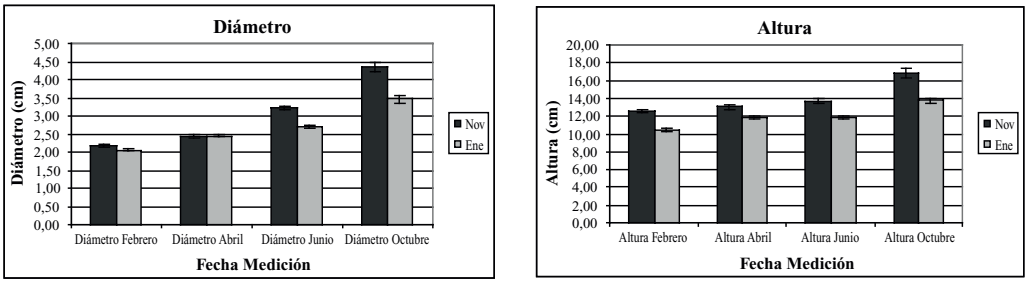

***Figura 1**. Altura y diámetro para las dos fechas de plantación. Las medidas están realizadas en febrero, abril, junio y octubre*

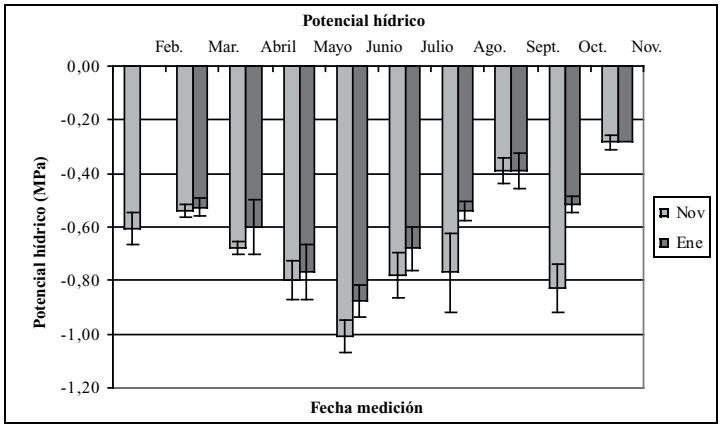

***Figura 2**. Potenciales hídricos al amanecer para ambas fechas de plantación (Noviembre y Enero)*

noviembre y 8 en las de enero) y abril (30 en las plantas de noviembre y 8 en las de abril) (Figura 4). Estas proteínas pueden ser caracterizadas como marcadores moleculares de estrés temprano. La verificación de la reproducibilidad de estos resultados se realizó mediante una T-student para el valor del volumen normalizado de los spot ($P \leq 0.05$); los spot analizados se eligieron en función de su presencia o ausencia en todas las réplicas (spot cualitativos) o diferencias en el valor del volumen normalizado, también en todas las réplicas (spot cuantitativos). Estas Proteínas están siendo identificadas por el servicio central de apoyo a la investigación (SCAI)-Univ. de Córdoba, aunque ya disponemos de algunos datos preliminares.

DISCUSIÓN

En este trabajo se ha analizado la influencia de la fecha de plantación en el arraigo y desarrollo de una repoblación en el Levante español bajo condiciones de estrés hídrico. Para ello se han analizado distintas variables empleadas en trabajos similares y otras de nueva incorporación como es el caso de la proteómica para profundizar aún más en los mecanismos de las

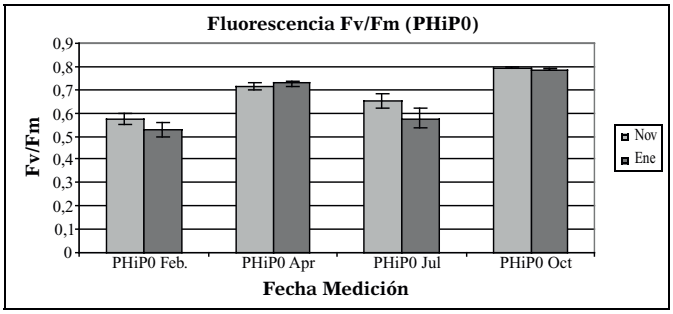

***Figura 3**. Fluorescencia de la clorofila para las dos fechas de plantación medidas en febrero, abril, junio y octubre. La variable medida fue la relación Fv/Fm*

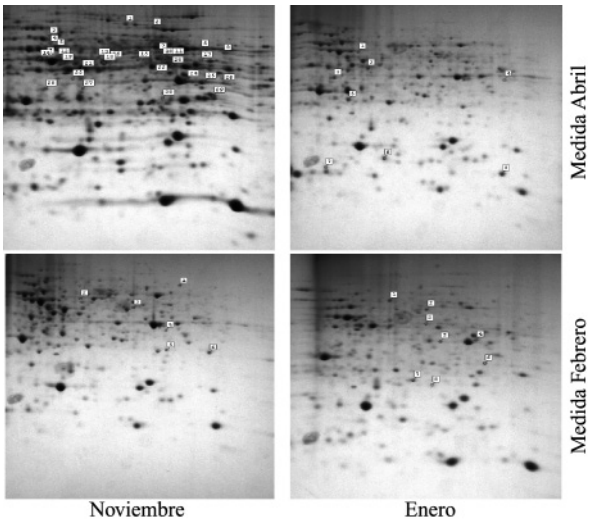

***Figura 4**. Proteínas diferenciales en función de la fecha de plantación para las medidas de febrero y abril*

especies forestales y en concreto del género *Pinus*, de resistencia a la sequía.

Aunque no hay muchos trabajos relacionados con la influencia de la fecha de plantación, algunos trabajos han mostrado esa influencia en la supervivencia y crecimiento de repoblaciones con coníferas en ambientes mediterráneos con resultados desiguales. Autores como (SOUTH et *al*., 2001) no han encontrado diferencias significativas atendiendo a la fecha de plantación, mientras que otros (ROYO et *al*., 2000) si han mostrado la importancia de esta variable, incluso considerándola como la de mayor influencia en el desarrollo post-trasplante (NAVARRO et *al*., 2004b). En nuestro caso, al igual que en el trabajo anterior, la fecha de plantación no influyó significativamente sobre la supervivencia, aunque si lo hizo sobre la variable crecimiento.

La fluorescencia de la clorofila fue una de las variables utilizadas para estudiar la influencia de la fecha de plantación. Esta variable no mostró diferencias importantes entre las plantas de ambas fechas de plantación. Cabe destacar que estos valores fueron en general, y para todas las fechas de medición, bajos en relación a otros trabajos similares (BJÖRKMAN Y DEMMING, 1987) en los que se cita el valor 0.8, como valor óptimo, incluso en relación a trabajos con esta misma especie en condiciones controladas de cámara de cultivo, en los que los valores se acercan más (0.6-0.7), quedando aun así, por debajo (NAVARRO et *al*., 2004a).

La proteómica, a través de técnicas de separación de proteínas por electroforesis bidimensional permite entre otras cosas comparar perfiles proteicos procedentes de distintas situaciones, por ejemplo situaciones de estrés hídrico. Esta técnica ha permitido identificar proteínas de estrés que pueden considerarse marcadores moleculares de estrés hídrico en especies de interés forestal (JORGE et *al*., 2006). En este trabajo se ha puesto a punto la técnica de extracción mediante electroforesis bidimensional para el caso de *Pinus halepensis*, y se ha analizado la influencia de la fecha de plantación en la expresión de proteínas. De los resultados obtenidos cabe destacar la presencia de algunas proteínas diferenciales en función de la fecha de plantación, tanto a nivel cualitativo (presencia o ausencia) como cuantitativo (nivel de expresión), pudiendo ser utilizadas algunas como marcadores moleculares. Estas proteínas se han expresado en mayor número en abril que en la toma de muestras de febrero, y aunque está por determinar la función de esas proteínas (la identificación es preliminar y falta concluirlo) cabe pensar la posibilidad de que se trate de proteínas de expresión en situaciones de estrés, relacionadas con el estado fisiológico de las plantas.

El desarrollo de este trabajo ha permitido un primer acercamiento a la técnica, empleada con anterioridad en otras especies forestales, enfocándola desde un punto de vista más práctico, aplicado al estudio de situaciones de campo. A través del estudio de los marcadores moleculares, se puede conocer de una forma relativamente sencilla el estado fisiológico de una planta.

BIBLIOGRAFÍA

BARRENCHE, T.E.N. & KREMER, A.; 1996. Two dimensional gel electrophoresis confirms the low level of genetic differentiation between Quercus robur L. and Quercus petraea (Matt.) Liebl. *Forest Genetics* 3: 89-92.

BJÓRKMAN, O & DEMMING, B.; 1987. Photon yield of O2 evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 k among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170: 489-504.

CALAMASSI, R.; DELLA ROCCA, G.; PAOLETTI, E. & STRATI, S.; 2001. Resistance to water stress in seedlings of eight european provenances of Pinus halepensis Mill. *Ann. For. Sci*. 58: 663–672.

CÁNOVAS, F.M.; DUMAS-GAUDOT, E.; RECORBET, G.; JORRÍN, J.; MOCK, H-P. & ROSSIGNOL, M.; 2004. Plant Proteome Analysis. *Proteomics* 4: 285–298.

CASTILLEJO, M.A.; 2006. *La proteómica aplicada al estudio de las plantas a estreses bióticos y abióticos*. Tesis Doctoral. Univ. Córdoba. Córdoba.

CEBALLOS, A.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, J. & LUENGO-UGIDOS, M.A.; 2004. Analysis of rainfall trends and dry periods on a pluviometric gradient Representative of Mediterranean climate in the Duero Basin, Spain. *J. Arid Environ*. 58: 215-233

CORCHERO, S.; GOZALO, M.; VILLAR, P. Y PEÑUELAS, J.L.; 2002. Crecimiento radical en campo de Pinus halepensis y Quercus ilex plantados en diferentes momentos. *Montes* 68: 5-11.

COSTA, P.; BAHRMAN, N.; FRIGERIO, J.-M.; KREMER, A. & PLOMION, C.; 1998. Water-deficit-responsive proteins in maritime pine. *Plant Mol. Biol.* 38: 587-596

DAMERVAL, C.; DE VIENNE, D.; ZIVY, M. & THIELLEMENT, H.; 1986. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* 7: 52-54.

DE MIGUEL, S.; 1999. *Crecimiento y supervivencia de repoblaciones forestales sobre terrenos agrícolas con Pinus halepensis Mill. y Pinus pinea L. producidos en vivero sobre diferentes sustratos e inoculados con Rhizopogon roseolus (Corda)* Th. M. Fr. Tesis Doctoral Universidad De Lleida. Lleida.

DÍAZ, E. & ROLDAN, A.; 1999. Effects of afforestation techniques on the nutrient content, photosynthetic rate and stomatal conductance of Pinus halepensis seedlings under semiarid conditions. *Land Degr. Devel.* 11: 364-375.

FEDER, M.E. & WALTER, J.-C.; 2005. The biological limitations of transcriptomics in elucidating stress and stress responses. *J. Evolution. Biol.* 18: 901-910

GYGI, S.P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B.R. & AEBERSOLD, R.; 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 19: 1720-1730

JORGE, I.; NAVARRO, R.M.; LENZ, C.; ARIZA, D.; PORRAS, C. & JORRÍN, J.; 2004. A proteomic approach to characterize and identify different Holm Oak (Quercus ilex) Spanish provenances. *In*: *6th Siena Meeting From Genome To Proteome*. Siena.

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: 207-214

NAVARRO, R.M.; MALDONADO, R. Y ARIZA, D.; 2004. Fluorescencia de la cloroflila en cinco procedencia de Pinus halepensis Mill y su respuesta a estrés hídrico. *Cuad. Soc. Esp. Cie. For.* 17: 69-74.

NAVARRO, R.M. Y PALACIOS, G.; 2004. Efecto de la calidad de planta, el procedimiento de preparación y la fecha de plantación en la supervivencia de una repoblación de Pinus pinea L. *Cuad. Soc. Esp. Cie. For.* 17: 199-204.

ROYO, A.; GIL, L. Y PARDOS, J.A.; 2000. Efecto de la fecha de plantación sobre la supervivencia y el crecimiento del pino carrasco. *Cuad. Soc. Esp. Cie. For.* 10: 57-62.

ROSSIGNOL, M; PELTIER, JB.; MOCK, H.P.; MATROS, A.; MALDONADO, A. & JORRÍN, J.; 2006. Plant Proteome Analysis: A 2004-2006 Update. *Proteomics* 6: 5529-5548.

SOUTH, D.B., ROSE, R.W. & MCNABB, K.L.; 2001. Nursery and site preparation interaction research in the United States. *New Forests* 22: 43-58.

TURCO, E.; CLOSE, T.J.; FENTON, R.D. & RAGAZZI, A.; 2004. Synthesis of dehydrin-like proteins in Quercus ilex L. and Quercus cerris L. seedlings subjected to water stress and infection with Phytophthora cinnamomi. *Physiol. Molecular Pathol.* 65: 137-144.