

Variabilidad y respuesta a distintos estreses en poblaciones de encina (*Quercus ilex* L.) en Andalucía mediante una aproximación proteómica

J. Jorrín-Novo^{1,*}, R.M. Navarro-Cerrillo²

(1) Universidad de Córdoba-CeiA*3.1 Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Grupo de investigación Bioquímica y Proteómica Vegetal y Agroforestal. Campús de Rabanales, 14071 Córdoba, España

(2) Departamento de Ingeniería Forestal. Grupo de investigación Evaluación y Restauración de Sistemas Agrícolas y Forestales. Universidad de Córdoba. Campús de Rabanales, 14071 Córdoba, España.

* Autor de correspondencia: R.M. Navarro-Cerrillo [rmnavarro@uco.es]

> Recibido el 15 de febrero de 2014, aceptado el 11 de julio de 2014.

Jorrín-Novo, J., Navarro-Cerrillo, R.M. 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. Doi.: 10.7818/ECOS.2014.23-2.13

Las condiciones de estrés abiótico impuestas por el cambio climático, y el progresivo aumento de plagas de insectos y organismos patógenos, constituyen, a medio y largo plazo, serias amenazas para las especies y los ecosistemas forestales. La generación de conocimiento para mejorar la descripción y catalogación de la biodiversidad y de los recursos genéticos forestales pasa por una mayor integración entre biólogos moleculares y selvicultores, lo que, en definitiva, favorecerá la conservación de especies y poblaciones forestales y el desarrollo racional de programas de restauración y manejo sostenible de los recursos forestales. Los estudios de proteómica forestal de encina en Andalucía han contribuido principalmente en cuatro áreas de interés: i) describir y catalogar poblaciones andaluzas de encina a partir de herramientas analíticas y -ómicas; ii) mejorar el conocimiento sobre la base genética de la encina a nivel individual, intra-poblacional e inter-poblacional; iii) seleccionar caracteres genéticos relacionados con la tolerancia a distintos tipos de estrés (bióticos y abióticos) y iv) la identificación de marcadores útiles en la selección de árboles plus. Para ello se ha trabajado con muestras de campo y de plantones crecidos en condiciones controladas tanto en condiciones óptimas como de estrés (sequía e infección por *Phytophthora cinnamomi*). Se ha analizado el perfil proteico de diferentes órganos, incluyendo polen, fruto, hojas, y raíz, utilizando para ello una metodología proteómica basada en electroforesis bidimensional acoplada a espectrometría de masas. Los datos obtenidos nos han permitido establecer un catálogo de proteínas de encina así como identificar aquellas que son específicas de poblaciones, de estados de desarrollo, de órgano, o que responden con cambios cualitativos o cuantitativos a situaciones de estrés. La presente revisión es un claro ejemplo de un estudio multidisciplinar orientado a la caracterización, catalogación y conservación de los recursos genéticos de la encina en Andalucía, como marco de referencia para la selección de materiales de base mejor adaptados a los riesgos derivados de estreses bióticos y abióticos, y de la aplicación de este marco en la gestión de encinares en el sur de la península ibérica.

Palabras clave: biodiversidad; *Quercus*; proteómica; progenitores selectos; recursos genéticos

Jorrín-Novo, J., Navarro-Cerrillo, R.M. 2014. Variability and response to different stresses in Andalusia Holm oak (*Quercus ilex* L.) populations by a proteomic approach. *Ecosistemas* 23(2): 99-107. Doi.: 10.7818/ECOS.2014.23-2.13

Abiotic stress conditions imposed by climate change and the progressive increase of insect pests and pathogens in the medium and long term, seriously threat to species and forest ecosystems. Generation of new knowledge to improve the description and documentation of biodiversity and forest genetic resources involve greater integration between molecular biologists and foresters, which ultimately promote the conservation of species and forest communities and the rational development of restoration programs and sustainable management of forest resources. Proteomic studies of Holm oak forest in Andalusia have contributed mainly in four areas of interest: i) describe and catalog Andalusian populations of Holm oak using -omics and analytical tools; ii) improve knowledge of genetic variability at the individual, intra-population and inter-population levels; iii) selecting genetic traits associated with tolerance to different types of stress (biotic and abiotic); and iv) identification of molecular markers for tree plus selection. Field samples and seedlings grown under controlled conditions were used both in optimal and stress conditions (drought and *Phytophthora cinnamomi* infection). We analyzed the protein profile of different organs, including pollen, fruit, leaves, and roots, using a proteomic approach based on two-dimensional electrophoresis coupled to mass spectrometry. Data obtained allowed to establish an oak proteins catalog to identify those from specific populations, states of development, organ, or qualitative or quantitative response to stress. This review is a clear example of an oriented characterization, cataloging and conservation of genetic resources in Holm oak population of Andalusia, as a framework for the selection of potential progenitors better adapted to risks arising from biotic and abiotic agents, and the application of this framework in the management of oaks in the south of the Iberian Peninsula.

Key words: biodiversity; genetic resources; proteomics; *Quercus*; selected progenitors

Selvicultura, variabilidad e investigación genética y molecular

Los bosques afrontan, en la actualidad una gran variedad de riesgos, desde la degradación causada por los incendios de origen antrópico, hasta los problemas relacionados con el cambio climático, pasando por daños asociados a insectos y enfermedades causadas por microorganismos patogénicos. Estos riesgos no sólo amenazan los bosques como recurso productivo, sino que pueden reducir el número de especies que lo pueblan, especialmente en el sur de Europa, debido al potencial impacto del cambio climático (Lindner et al. 2010). Uno de los ejemplos más ilustrativos en Andalucía son las dehesas, sistemas silvopastorales de vital importancia, tanto para el mantenimiento de la biodiversidad como por los servicios ambientales que proporcionan, por lo que resultan esenciales para la conservación, la gestión y el uso de multitud de especies silvestres y domésticas (Díaz et al. 2003; Moreno y Pulido 2008). El cambio climático puede provocar un importante impacto en las dehesas del Sur de Europa, lo cual coloca a estos sistemas como uno de los más vulnerables en el Mediterráneo (Díaz et al. 2003; Valladares et al. 2005).

Las previsiones de incremento de la temperatura durante los próximos 50 años superan las condiciones que muchas especies de árboles pueden tolerar, y eso supone que deberán afrontar procesos de pérdida de diversidad intraespecífica y de extinción de recursos genéticos locales (Jiménez et al. 1996; López de Heredia y Gil 2006). Sin embargo, es previsible que los ecosistemas forestales mediterráneos muestren procesos de adaptación en lugar de desaparecer por completo, con algunas especies y/o poblaciones que ya están mostrando respuestas de adaptación in situ (adaptación local, plasticidad fenotípica, etc.), otras que experimentan cambios en la diversidad intraespecífica, y otras que están sufriendo procesos de decaimiento o mortalidad (Lloret 2012; Bussotti et al. 2013). En las zonas de clima mediterráneo en España, la gran riqueza de especies, los altos niveles de diversidad genética presentes en las masas naturales de muchas de ellas y la existencia de poblaciones singulares adaptadas a condiciones ambientales extremas y su potencial uso en programas de conservación de esas especies (por ejemplo, migraciones asistidas de cara al cambio global) hacen necesarios programas de conservación que eviten la pérdida de la diversidad genética.

Una de las limitaciones a la hora de afrontar el problema de la degradación y la conservación de los recursos forestales es la falta de conocimiento científico de las bases que determinan a nivel funcional, genómico y molecular la diversidad intraespecífica y poblacional de especies forestales. La variabilidad molecular existente en poblaciones forestales naturales se relaciona con su amplia valencia ecológica y su capacidad de adaptación a condiciones ambientales adversas, y el efecto de éstas sobre la estructura genética de las poblaciones, el flujo o la diversidad genética, o la selección de determinados individuos frente a otros en programas de gestión y restauración (Alía et al. 2003; González-Rodríguez et al. 2011). Es, por ello, que la biología, y más concretamente, la genética y la biología molecular se están convirtiendo en áreas complementarias a los estudios de ecología y de selvicultura tradicional en muchos proyectos de investigación, habiendo experimentado un notable avance en los últimos años (Morgenstern 2011; Abril et al. 2011).

La variabilidad genética se puede analizar a distintos niveles jerárquicos de organización, desde individuos a poblaciones y especies, utilizando diferentes aproximaciones y parámetros, desde la morfología, la fenología, la fisiología y la biología molecular. Su estudio responde, desde una perspectiva de la selvicultura moderna, a la necesidad de definir la arquitectura genética de la variación de las especies, de manera que permita seleccionar aquellos individuos o poblaciones críticas para la conservación de gran parte de su variabilidad, base de cualquier programa de gestión y restauración de los ecosistemas en los cuales están presentes. En ese sentido, es necesario desarrollar y ejecutar programas de catalogación, conservación y gestión de los recursos genéticos forestales, los

que serán útiles en la medida que integren diferentes áreas del conocimiento, tales como la genética, la ecología, la fitoclimatología y la selvicultura (Boshier y Young 2000; Morgenstern 2011).

La cuantificación de la diversidad genética de las especies forestales, y en concreto de las especies pertenecientes al género *Quercus*, es importante porque esta diversidad determina, en gran medida, la evolución futura de las poblaciones, su adaptación al medio en condiciones frecuentes de cambio y su conservación (Jiménez et al. 1999; Alía et al. 2003; López de Heredia et al. 2005). La diversidad genética de *Quercus* está relacionada con la disposición geográfica de las masas (Rafii et al. 1991, López de Heredia 2006), con su posición topográfica (Morales et al. 2005) y con las características climáticas; además de los procesos de introgresión e hibridación que se dan como consecuencia de la coexistencia de distintas especies en un mismo hábitat y su cercanía filogenética (Dumolin-Lapegue et al. 1997; Jiménez Sancho 2001; López de Heredia 2006). Por otro lado, para garantizar la viabilidad y la conservación de los recursos genéticos de las especies del género *Quercus*, máxime cuando su localización actual manifiesta un patrón fragmentado y riesgos ambientales importantes, es necesario potenciar la capacidad de adaptación de las poblaciones a las diferentes presiones de selección (aspectos climáticos, enfermedades, producción, etc.). Dicha capacidad va a depender de la variabilidad genética existente (Finkeldey y Ziehe 2004). Es, por ello, que los estudios genéticos, la identificación de genes, la determinación de variantes alélicas y el patrón de expresión ayudarán a sentar las bases de los programas de conservación de la biodiversidad existente.

La biotecnología moderna puede brindar posibilidades para una selvicultura más acorde con los nuevos riesgos ambientales (plagas, enfermedades, cambio climático) mediante programas de conservación, gestión y uso de recursos genéticos, basándose en la diversidad existente en los bosques naturales. En la actualidad, con la incorporación de potentes marcadores moleculares (proteotipado y genotipado a través de microsatélites nucleares y cloroplásticos, PCR-RFLPs -del inglés Polymerase Chain Reaction y Restriction Fragment Length Polymorphism, AFLPs -del inglés Amplified Fragment Length Polymorphism), han permitido avanzar en la caracterización de la diversidad de las principales especies esclerófilas ibéricas del género *Quercus* (Elena-Roselló et al. 1992; Michaud et al. 1992; Varela et al. 1993; Bellarosa et al. 1996; Jiménez et al. 1999; Collada et al. 2001; López de Heredia et al. 2005; Valero Galván et al. 2011; 2012; 2013a; 2013b) y en el conocimiento de la diferenciación genética de las poblaciones, así como las relaciones filogenéticas y los procesos de migración que han sufrido (Morales et al. 2005; López de Heredia et al. 2005).

Por lo que respecta a los estudios del efecto de los estreses bióticos y abióticos relacionados con el decaimiento forestal, las principales aplicaciones de los estudios genéticos y moleculares son la caracterización de la variabilidad en cuanto al efecto y la respuesta a los mismos, la búsqueda de mecanismos y marcadores de tolerancia y resistencia y la selección de individuos elite para su uso en restauración de ecosistemas forestales, todo ello acompañado de técnicas de propagación y programas de conservación *in situ* y *ex situ*. La respuesta a estreses bióticos y abióticos es un proceso complejo, cuyo conocimiento requiere de un estudio amplio (Maldonado y Jorrín-Novo 2007; Abril et al. 2011). De entre los estudios, los de enfoque molecular a través de herramientas -ómicas (transcriptómica, proteómica y metabolómica), están empezando a dar importantes resultados, aunque es necesario coordinarlos e integrarlos con las necesidades de la selvicultura.

La variabilidad molecular (de secuencias de ADN, genes, transcriptomas, proteomas y metabolitos) existente en poblaciones naturales de la encina en el sur de la península ibérica se relaciona con su amplia valencia ecológica y su capacidad de adaptación frente a cambios climáticos del pasado, los cuales determinan la compleja filogeografía de la especie y condicionan su evolución futura. El conocimiento de dicha variabilidad podría ser clave para la aplicación de programas de conservación exitosos de cara a los retos que plantea el futuro, para lo que además se requieren estu-

dios multidisciplinares que ya contempla la selvicultura moderna. El objetivo de esta revisión es presentar los avances realizados en la descripción, la catalogación, la selección y la respuesta a estreses de poblaciones naturales de encina (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* [Desf.] Samp.) en Andalucía a partir del estudio de su proteoma. Estos estudios han contribuido principalmente en cuatro áreas de interés: i) descripción y catalogación de poblaciones andaluzas de encina a partir de herramientas analíticas y -ómicas; ii) conocer más sobre la base genética de la encina a nivel individual, intra-poblacional e inter-poblacional; iii) seleccionar caracteres genéticos relacionados con la tolerancia a distintos tipos de estrés (bióticos y abióticos), y iv) la identificación de marcadores útiles en la selección de árboles plus.

La variabilidad de poblaciones de encina

La encina es una especie forestal dominante en la mayoría de las comunidades naturales a lo largo de extensas áreas del oeste de la Cuenca Mediterránea (Quézuel y Médail 2003). Los bosques de *Quercus* son muy plásticos en cuanto a sus necesidades ecológicas, constituyendo, cuando se hallan bien conservados, un sistema natural complejo y equilibrado.

La gran capacidad de adaptación del género *Quercus* a variaciones del medio favorece la aparición de individuos con fenotipos distintos. Por otro lado, la amplia distribución geográfica de la encina, ocupando hábitats de características de suelo y clima muy dispares, hace posible que se pueda encontrar variabilidad asociada tanto al ambiente como a la influencia del hombre sufrida a lo largo de la historia (Jiménez et al. 1996). Dicha capacidad de adaptación es posible gracias a la gran variabilidad genética presente en las especies de *Quercus*, dando lugar a poblaciones altamente heterogéneas en áreas relativamente poco extensas (López de Heredia et al. 2005). La determinación y cuantificación de esta variabilidad genética es imprescindible para poder conocer y, en la medida de lo posible, predecir y gestionar la evolución de las poblaciones de encina en cuanto a su capacidad de adaptación al medio en condiciones ambientales adversas o cambiantes (Alía et al. 2003).

Tradicionalmente, la variabilidad de las poblaciones de encina se ha determinado por las características morfológicas de las hojas y frutos (Vicioso 1950; Vázquez Pardo 1998). Sin embargo, la necesidad de regular y controlar los movimientos de material reproductivo para evitar el desarrollo de masas forestales sensibles a las condiciones ambientales adversas de una determinada zona, ha promovido el desarrollo y el uso de nuevas técnicas moleculares que hacen posible relacionar los caracteres de una población o individuo, influenciados en gran medida por el ambiente, con componentes estables en cualquier situación, como son los genéticos (Morales et al. 2005).

Proteómica forestal

Las técnicas moleculares, incluyendo marcadores moleculares de ADN y las más modernas ómicas (transcriptómica, proteómica y metabolómica), junto con las de genética y bioquímica clásica, permiten caracterizar la variabilidad entre individuos, poblaciones y especies, y relacionar el genotipo con el fenotipo, pudiendo identificar factores genéticos, epigenéticos y ambientales implicados en procesos de crecimiento, desarrollo y respuesta a estreses. Así, los estudios llevados a cabo con encina a nivel molecular han mostrado ser una herramienta eficaz para la caracterización genética de esta especie (Rafii et al. 1991; 1993; Elena-Roselló et al. 1992; Varela et al. 1993; Jiménez et al. 1999; Lumaret et al. 2002).

La proteómica, término acuñado en 1995 (Wilkins et al. 1996), tiene como objetivo estudiar el proteoma de los diferentes seres vivos, es decir, el estudio del conjunto de todas y cada una de las especies proteicas o productos génicos 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 puede darnos una visión no real de lo que ocurre en la célula, ya que se ha visto que no siempre existe una correlación perfecta entre ARNm y las proteínas para las que codifica (Gygi et al. 1999). Por último, las modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales, determinantes de la actividad de las proteínas, junto con la interactómica, los determinantes reales del fenotipo, sólo se pueden establecer más allá de las predicciones o estudios hechos por simulación en ordenador, mediante una aproximación proteómica (Jorrín-Novo y Valledor 2013; Jorrín-Novo et al. 2013).

La proteómica constituye una herramienta muy válida en muchos proyectos de investigación sobre variabilidad genética de especies vegetales, y a este respecto las especies forestales no son una excepción. No obstante, en este último caso, a las dificultades como sistema experimental, a su interés más medioambiental que productivo, hay que unir su carácter de especies huérfanas, poco estudiadas a nivel molecular, y prácticamente ausentes en bases de datos genómicos. Destaca, entre ellas, *Quercus*Map que es una base de datos que contiene información de genotipos y fenotipos de especies de *Quercus* (<https://w3.pierroton.inra.fr/QuercusPortal/index.php?p=qmap-INRA>), así como los trabajos desarrollados por el CIFOR-INIA (<http://wwwsp.inia.es/Investigacion/centros/CIFOR/>). Todos estos aspectos han sido discutidos en detalle en la revisión de Abril et al. (2011) sobre proteómica de especies forestales.

Nuestros trabajos de proteómica en encina tienen un doble objetivo, la caracterización de la variabilidad y el estudio de las respuestas a estreses bióticos y abióticos relacionados con las condiciones de cambio climático, como son la sequía, y la infección por *Phytophthora cinnamomi*. Entre los patógenos fúngicos virulentos asociados a los daños en sistemas de dehesa, *P. cinnamomi* se ha confirmado como el más importante (Sánchez et al. 2002). Se trata de un Oomiceto patógeno que produce la muerte de las raíces absorbentes, y como consecuencia reduce el aporte de agua y nutrientes a la planta, dando lugar a marchitez y muerte progresiva de la parte aérea de los árboles afectados. En estas condiciones, con el sistema radical infectado, los árboles no son capaces de resistir el déficit hídrico acumulado y mueren (Corcobado et al. 2013). Esta situación se ha extendido por todo el sur de la península ibérica, donde causa elevadas tasas de mortalidad en dehesas de encina y alcornoque (Sánchez et al. 2002).

En los trabajos llevados a cabo en los grupos que lideran los autores del presente artículo, se han utilizado muestras de campo procedentes de árboles adultos y de plántulas crecidas bajo condiciones controladas. Como material de partida se han utilizado hojas, semillas, polen, y, en menor medida, raíces. Ello ha supuesto, en primer lugar, un esfuerzo importante tanto en la recolección de material, como en la puesta a punto de protocolos de extracción de proteínas, su separación por electroforesis, y análisis por espectrometría de masas de extractos totales o bandas y spots electroforéticos (ver Glosario). Esto ha ido acompañado de potentes programas informáticos y algoritmos para el análisis estadístico de los datos, identificación de proteínas en bases de datos y construcción de una base de datos de proteínas para el género *Quercus*.

Proteómica de *Quercus* esclerófilos ibéricos

Nuestros primeros estudios de proteómica de encina se llevaron a cabo con muestras de campo en las que se analizó el proteoma de hojas, a partir de muestras de hoja de cuatro árboles adultos de la procedencia ES11-Sierra Morena Occidental. Los resultados han sido publicados en Jorge et al. (2005; 2006). Los trabajos de puesta a punto y optimización del protocolo de extracción y separación del componente proteico de la hoja de encina mediante electroforesis mono (1-DE) y bidimensional (2-DE) en geles de poliacrilamida, concluyó que el número spots o bandas proteicas resueltas fue de unas 400 (Jorge et al. 2005). Posteriormente, se recuperaron de los geles

las proteínas mayoritarias del mapa 2-DE de hoja de encina para su análisis mediante espectrometría de masas e identificación por coincidencia con secuencias proteicas conocidas (Fig. 1). La mayoría de las proteínas del perfil 2-DE de la hoja de encina resultaron ser enzimas fotosintéticas, hecho que evidencia la gran importancia biológica del proceso fotosintético (Watson et al. 2003). También se encontraron enzimas del metabolismo energético, del metabolismo del nitrógeno, relacionadas con la degradación de proteínas, metabolismo de los compuestos fenólicos, enzimas antioxidantes y proteínas relacionadas con la regulación hormonal.

Para determinar la variabilidad biológica dentro del mismo individuo y entre individuos distintos, se llevó a cabo un estudio de proteómica comparativa con hojas de encinas adultas que se tomaron de distintas orientaciones geográficas, recogidas a distintas horas del día y de árboles diferentes. Como resultado, la variabilidad biológica debida a la orientación de las hojas fue de 39.8 %, la debida al diferente momento de recolecta resultó de 37.9 % y la variabilidad debida a individuos distintos se incrementó hasta un 58.6 % (Jorge et al. 2005). La alta variabilidad encontrada es un dato demostrativo de la enorme plasticidad de las plantas y su adaptación a condiciones de intensidad lumínica y temperatura (orientación y hora de recolecta de las hojas). Cuando el estudio comparativo se llevó a cabo con plántulas de encina de 2 años (diez hojas para cada fuente de semillas, aproximadamente 2 g de peso fresco) de tres procedencias distintas (región extremeña y Sierra Morena Occidental, Qi11e; Sierra Nevada-Filabres, Qi16a; Sierras Béticas Occidentales-Sierras Interiores, Qi14a, Jiménez et al. 1996), cultivadas en invernadero, la variabilidad biológica entre individuos de la misma procedencia, aunque alta, se redujo a un valor medio de 69.37 % frente a 74.08 % para plántulas y árboles adultos respectivamente (Fig. 2), poniendo de manifiesto que unas condiciones más estables y homogéneas que las de campo, como son las de invernadero, provoca una disminución en la variabilidad de la expresión de proteínas.

El estudio del proteoma de hojas de 300 plántulas procedentes de las mismas procedencias reveló cuatro proteínas cuya ausencia o presencia podía discriminar las procedencias en este análisis, de las cuales sólo dos fueron identificadas (ATP sintasa alfa y 2,3-bis-fosfoglicerato mutasa) (Jorge et al. 2006) (Fig. 3). De estos resultados se puede concluir la dificultad de utilizar la hoja, en especial con muestras de campo, en la catalogación de procedencias o poblaciones, dado el importante efecto ambiental sobre el perfil proteico y la enorme plasticidad de la hoja. Es por ello que se planteó hacer el estudio proteómico de la variabilidad utilizando como material de partida órganos con un proteoma más estable en cuanto a que la posición en la copa y el tiempo de muestreo no afectaron al perfil proteico; es el caso de la bellota y el polen

En un primer trabajo con estos materiales, se estudiaron los datos de variabilidad en el proteoma de harina de bellota, comparándose 10 poblaciones andaluzas (Valero Galván et al. 2011). Se utilizó una aproximación basada en electroforesis (mono o bidimensional) acoplada a espectrometría de masas. Se identificaron un total de 23 bandas, obteniéndose diferencias en 8-12 de ellas (Tabla 1). Un análisis correlacional con las condiciones climáticas del origen geográfico de cada población mostró un patrón de variabilidad norte-sur, discriminando las poblaciones más métricas frente a las más xéricas. Los extractos de harina de bellota de las poblaciones más contrastadas fueron analizados por 2-DE, y se identificaron 56 spots diferenciales como marcadores de la variabilidad. Las proteínas identificadas se clasifican en dos categorías principales: de almacenamiento y de proteínas de estrés / defensa. Dichos datos confirmaron el origen geográfico de la variabilidad de las poblaciones de encina en Andalucía observado mediante el análisis morfométrico de la bellota y su composición química (Valero Galván et al. 2011; 2013b). En los estudios de polen se compararon, utilizando una metodología similar, cuatro poblaciones de encina, encontrándose 18 bandas y 16 spots variables, permitiendo, de nuevo, la separación de poblaciones localizadas en el norte y sur del área de distribución de la especie (Valero Galván et al. 2011; 2013b). El análisis multivariante mostró que la población

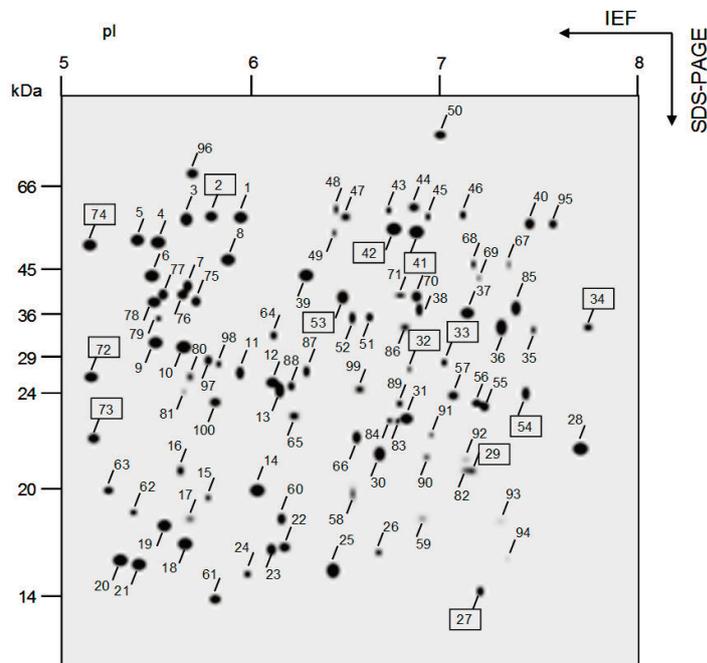


Figura 1. Perfil proteico de proteínas de hoja de encina obtenido mediante electroforesis bidimensional (2-DE) en geles de poliacrilamida. Datos tomados de Jorge et al. (2005). Las proteínas (400 mg) se separaron por isoelectroforesis en un gradiente de pH 5–8 lineal (Primera dimensión) y por electroforesis desnaturante en geles del 13 % (segunda dimensión). La masa molecular (M_r) se indica a la izquierda, mientras que el punto isoeléctrico (pI) se muestra en la parte superior de la figura. La imagen corresponde a hojas con orientación norte colectadas durante la mañana. Se indican los cien spots para los que se determinó la variabilidad biológica y analítica.

Figure 1. Leaf protein profile of Holm oak obtained by two-dimensional electrophoresis (2-DE). Data from Jorge et al. (2005). Proteins (400 mg) were separated by isoelectric focusing in a pH gradient of 5–8 pH (first dimension) and denaturing electrophoresis on 13 % gels (second dimension). The molecular mass (M_r) is indicated on the left, while the isoelectric point (pI) shown on top. The image corresponded to north-facing leaves collected in the morning. The hundred spots to which biological and analytical variables determined are indicated.

de Almería (Sierra de Alhamilla) se diferenciaba de las poblaciones de Cádiz (Benamahoma), Granada (Arenas del Rey) y de Sevilla (El Garrobo), lo cual puede deberse a un origen geográfico común o aun mayor aislamiento de la población almeriense.

Estudios de respuesta a estreses

Las perturbaciones bióticas y abióticas a las que están sometidos muchos sistemas forestales hacen que su conservación dependa, en buena medida, del conocimiento de los recursos genéticos de las especies y de la respuesta diferencial de los genotipos a diferentes tipos de estrés. En ciertos casos se observan procesos de mortalidad o de pérdida de vigor de especies e individuos (Allen et al. 2010; Lloret 2012; Bussotti et al. 2013), que afectan a extensas áreas en ecosistemas forestales. En este contexto, los trabajos realizados sobre la respuesta a estrés de poblaciones de encina han considerado dos situaciones, el estrés por sequía y la infección por *Phytophthora cinnamomi* dado el previsible incremento de ambos tipos de estrés en el futuro.

El experimento clásico de proteómica aplicada al estudio de condiciones adversas consiste en la comparación del perfil proteico entre la o las situaciones que se quieren estudiar y un control. La identificación de proteínas diferenciales entre genotipos (p.e., infectado y no infectado) o/y tratamientos (p.e., riego normal y riego deficitario), permite caracterizar los mecanismos de respuesta y proporciona información sobre los genes/proteínas que intervienen en las mismas, y aquellas relacionadas con la resistencia (Fig. 4).

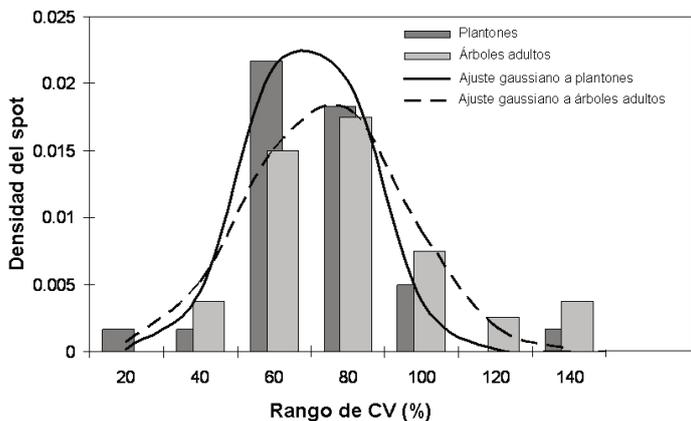


Figura 2. Histograma mostrando las distribuciones de los coeficientes de variación (CV) de los spots analizados en hojas de encina. Datos tomados de Jorge et al. (2006). En el eje y se muestran los valores de densidad de los spots, mientras que en el eje x aparecen los rangos de CV. El mejor ajuste gaussiano se representa sobre los histogramas con medias de 69.37 (error estándar, 15.69) y 74.08 (error estándar 21.17) para plantones y árboles adultos respectivamente. Los datos corresponden a los 100 spots analizados para árboles adultos y plantones.

Figure 2. Histogram showing the distributions of the coefficients of variation (CV) of the spots analyzed in Holm oak leaves. Data from Jorge et al. (2006). Y axis shows the spot density values, while the X axis shows CV ranges. The best Gaussian fit to the histograms shown with averages of 69.37 (standard error, 15.69) and 74.08 (standard error 21.17) for seedlings and mature trees respectively. Data are for the 100 spots analyzed from adult trees and seedlings.

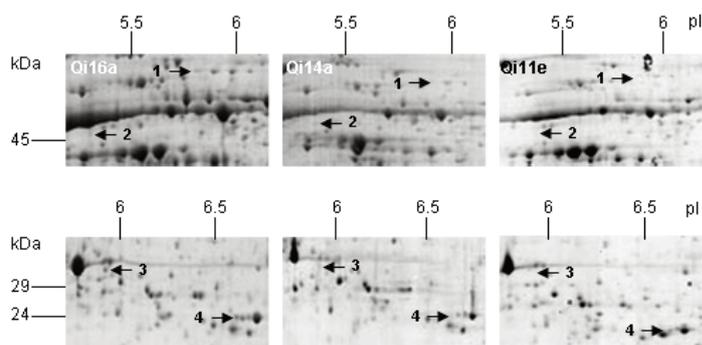


Figura 3. Geles 2-DE de los extractos de hojas de encina de distinta procedencia. Datos tomados de Jorge et al. (2006). Sólo aparecen las áreas en las que se encontraron diferencias. Las flechas señalan los spots que mostraron cambios cualitativos. Procedencias de encina: Q116a- Filabres, Q114a- Sierras Interiores, Q111e- Sierra Morena Occidental.

Figure 3. 2-DE gels from Holm oak leaves from different provenances. Data from Jorge et al. (2006). Images corresponded to areas of the whole gel in which differences appeared. Arrows point to spots that showed qualitative changes. Provenances of Holm oak: Q116a- Filabres, Q114a- Sierras Interiores, Q111e- Sierra Morena Occidental.

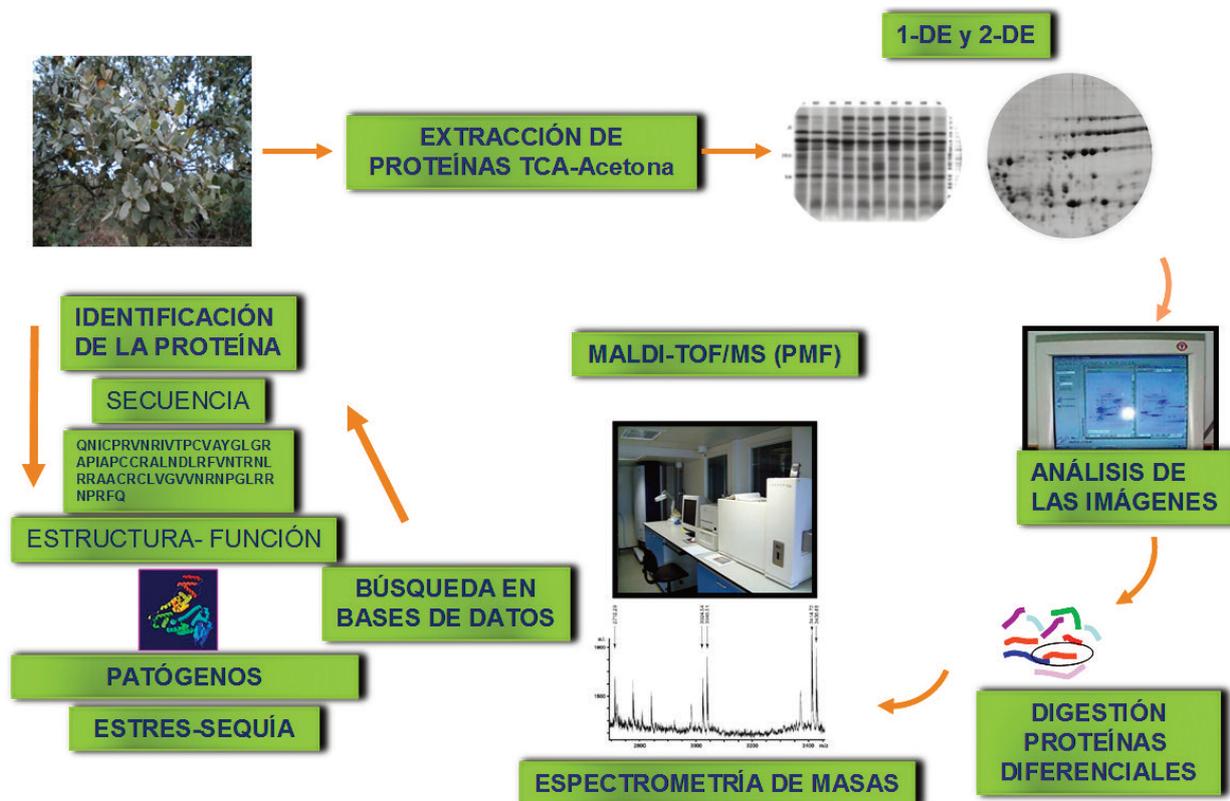


Figura 4. Esquema de análisis proteómico para comparar perfiles de proteínas de hoja de diferentes poblaciones de encina (*Quercus ilex subsp. ballota*) de Andalucía como respuesta a ensayos de estrés bióticos (*Phytophthora cinnamomi*) y abióticos (sequía).

Figure 4. Schematic workflow of a standard proteomics experiments in which the proteome of different populations and treatments (drought, as abiotic stress; *Phytophthora cinnamomi* inoculation, as biotic stress) are compared.

Tabla 1. Análisis del perfil proteico de harina de bellota obtenida de diferentes poblaciones andaluzas de encina. Datos tomados de Valero Galván et al. 2013a. Tras la extracción de proteínas se determinó su contenido (media \pm error estándar), y el perfil proteico se analizó mediante electroforesis en una dimensión (1-DE). Se presentan datos sobre el número total de bandas observado para cada población y el número de bandas que presentaron diferencias cuantitativas (mayor o menor intensidad) o cualitativas (presencia o ausencia).

Table 1. Proteomic profile analysis of acorn flour obtained from different Andalusian Holm oak populations. Data from Valero Galván et al. 2013a. After tissue homogenization, and protein extraction, proteins were quantified (Bradford assay; mean \pm standard error), and the profile analyzed by one-dimensional electrophoresis (1-DE). Data on the total number of bands observed for each population and the number of bands showing quantitative differences (higher or lower intensity) or qualitative (presence or absence) are presented.

Población	Localización	Latitud (Norte), Longitud (Oeste)	Concentración Proteínas (mg g ⁻¹ materia seca)	Número total bandas	Bandas variables
Almería (SAA)	Sierra de Alhamilla	36° 59', 06° 05'	2.92 \pm 1.25	21	15
Cádiz 2 (SCA)	Puerto Serrano	36° 54', 05° 31'	3.06 \pm 0.40	22	17
Cádiz 1 (BCA)	Benamahoma	36° 45', 05° 27'	3.58 \pm 2.05	21	15
Córdoba (PCO)	Pozoblanco	38° 22', 04° 54'	5.72 \pm 0.93	21	15
Granada (RG)	Arenas del Rey	36° 57', 03° 54'	3.84 \pm 0.45	22	17
Huelva (CHU)	Calaña	37° 38', 06° 51'	5.92 \pm 2.20	20	13
Jaén 1 (VJA)	Valdepeñas	37° 30', 03° 56'	4.41 \pm 0.88	21	15
Jaén 2 (PJA)	Pozoalcón	38° 17', 02° 36'	3.92 \pm 1.09	21	15
Sevilla 1 (APS)	Almadén de la Plata	37° 52', 06° 05'	4.98 \pm 0.37	21	15
Sevilla 2 (GSE)	El Garrobo	37° 37', 06° 10'	3.76 \pm 0.00	17	7

Resistencia a estrés por sequía

A través de ensayos de sequía se ha logrado caracterizar la respuesta molecular de encina a este tipo de estrés abiótico (Echevarría-Zomeño et al. 2009). Los cambios en el patrón de proteína de la hoja en respuesta a los tratamientos de sequía se analizaron mediante el uso de un enfoque proteómico. Se observaron diferencias cuantitativas en veintitrés spots diferentes al comparar el perfil de electroforesis bidimensional del control y las plantas estresadas. En total se identificaron catorce proteínas de respuesta a estrés, relacionadas con el proceso fotosintético, el metabolismo de carbohidratos y del nitrógeno, y proteínas funcionales relacionadas con el estrés.

Valero Galván et al. (2013b) avanzó en estos análisis mediante la evaluación de la respuesta a sequía en plántulas de encina procedentes de siete poblaciones andaluzas, de las que se eligieron dos de respuesta extrema entre ellas (la más tolerante – Almería – y la más susceptible – Cádiz –) para el posterior análisis proteómico de hojas. De los spots visibles en un gel bidimensional (unos 400), unos cuarenta presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos poblaciones y/o tratamientos (sequía y riego óptimo). En dichos spots variables se identificaron proteínas, siendo la mayoría de ellas de origen cloroplástico y estando incluidas en la categoría funcional del metabolismo o respuesta a estrés (ATP sintasa, precursores fotosintéticos, LHCII tipo I, RuBisCO, y peroxirredoxina). En respuesta a la sequía, la tendencia general observada fue de una disminución en la abundancia de proteínas de la fotosíntesis, siendo éste descenso menos acusado en la población más tolerante. Dichos datos ponen de manifiesto que la población que habita en condiciones más xéricas es más eficaz en la obtención de energía en situaciones de estrés, lo que supone un coste energético menor que a la larga confiere resistencia al estrés.

Resistencia a estrés por presencia de *Phytophthora cinnamomi*

En un trabajo reciente Sghaier-Hammami et al. (2013) estudiaron la respuesta al estrés asociado a la presencia de *P. cinnamomi* en la expresión proteómica de dos poblaciones andaluzas de encina (Almería y Pozoblanco) diferenciadas genéticamente (Tabla 2). En ambas procedencias se observó una reducción en la conductancia estomática y en la absorción de CO₂ asociado al estrés producido por la podredumbre radical causada por la presencia del patógeno. La mayoría de las proteínas identificadas están implicadas en la fotosíntesis, en el ciclo de Calvin y en el metabolismo de los carbohidratos, disminuyendo su abundancia en todos los casos como

consecuencia de la presencia del ataque de *P. cinnamomi*. Sin embargo, otras proteínas, especialmente aquellas relacionadas con la biosíntesis del almidón y de la glucólisis, mostraron un notable aumento, lo que indica un posible mantenimiento de la capacidad metabólica para reparar el daño celular causado por el patógeno. Se observó disminución general de las proteínas relacionadas con el estrés en ambas procedencias, con excepción de la peroxirredoxina (enzimas antioxidantes que controlan los niveles de peróxido a través de un sistema de óxido/reducción de grupos tioles). Un aspecto importante que se pudo derivarse de este trabajo fue que hubo una respuesta diferencial de las poblaciones a la presencia del patógeno, tanto a nivel fisiológico como proteómico, siendo las plantas de la población de Pozoblanco (Córdoba) las que presentaron una menor susceptibilidad a *P. cinnamomi*, frente a las plantas procedentes de la población más oriental (Almería).

Nuevas líneas de investigación desarrolladas por los grupos de Bioquímica y Evaluación de Recursos Forestales de la Universidad de Córdoba

El estudio detallado de las interacciones genéticas de las especies forestales como respuesta a distintos tipos de estrés debería aportar información que contribuya al desarrollo de herramientas moleculares así como a la selección de materiales de base mejor adaptados a estresores bióticos y abióticos, como por ejemplo, la detección de marcadores de estrés hídrico, en este caso proteicos, que permitan un diagnóstico precoz del problema para su tratamiento o gestión. Además, la proteómica puede contribuir a la identificación y caracterización de interacciones moleculares que implican a proteínas o moléculas señales de la planta afectada.

Sería ingenuo pensar que los objetivos de un mayor conocimiento de la biología de una especie y la traslación de la investigación a la catalogación de biotipos pueden conseguirse mediante la utilización de una sola herramienta metodológica, por lo que en los proyectos que se vienen realizando entre ambos grupos de investigación se pretende un abordaje multidisciplinar en la que se combine la selvicultura, la ecofisiología, y la ecología de poblaciones, junto con herramientas moleculares. Las técnicas complementarias que se están implementando se dirigen al análisis del ADN. En el año 2012, Echevarría Zomeño et al. describieron un protocolo de extracción de ADN y ARN a partir de hojas de encina para el posterior análisis genómico, bien en estudios del perfil transcripcional

asociado a germinación de semillas como en la respuesta a estreses, o en la catalogación de procedencias a partir de ADN genómico o cloroplástico mediante microsatélites. A la vez, se han puesto a punto técnicas de análisis proteómico no basadas en gel con el fin de incrementar el porcentaje de identificación de proteínas. Estos resultados están en fase de publicación y serán motivo de una posterior revisión.

A modo de síntesis, el estudio de genómica y proteómica de las especies forestales contribuyen a la conservación de la diversidad genética de las poblaciones (Silvertown y Charlesworth 2009). Estos estudios se podrían aplicar de forma general a la selección y colecta de material de base caracterizado genéticamente para los programas de conservación *in situ* y *ex situ*, para lo cual se requiere:

- Caracterización molecular de rodales semilleros, y evaluación de la variabilidad intrapoblacional de cada uno de ellos, asegu-

rando la selección del número mínimo de árboles que permitan conservar-utilizar toda la variabilidad genética de cada una de las poblaciones.

- Identificación de zonas de diversidad genética de la encina para conservar toda la variabilidad genética de la especie frente a posibles perturbaciones generales (p. ej., cambio climático) como locales (p. ej., destrucción de poblaciones marginales).
- Selección y colecta de materiales de base caracterizados genéticamente para los programas de conservación *in situ* y *ex situ* (Fig. 5).
- Micropropagación de material seleccionado y establecimiento de bancos clonales de individuos plus (Fig. 6).
- Evaluar la potencial respuesta de individuos y poblaciones a estrés biótico y abiótico, mediante la identificación de árboles con características deseables.

Tabla 2. Análisis del perfil proteico en muestras de hoja de encina de dos poblaciones andaluzas y cambios observados tras la inoculación con *Phytophthora cinnamomi*. Datos tomados de Sghaier-Hammami et al. (2013). Las hojas se muestrearon a los 30 y 90 días tras la inoculación (dpi). Tras la extracción de proteínas se determinó su contenido (media \pm error estándar), y el perfil proteico se analizó mediante electroforesis bidimensional (2-DE). Se presentan datos sobre el número de spots observado para cada población, tratamiento y tiempo.

Table 2. Proteomic profile analysis of leaf tissue from two Andalusian Holm oak populations and changes occurring after plant inoculation with *Phytophthora cinnamomi*. Data from Sghaier-Hammami et al. (2013). Leaves were sampled at 30 and 90 days after inoculation (dpi). After tissue homogenization, and protein extraction, proteins were quantified (Bradford assay; mean \pm standard error), and the profile analyzed by two-dimensional electrophoresis (2-DE). Data on the number of spots observed for each population, treatment and time are presented.

Poblaciones	Concentración de proteínas (mg/g peso fresco)	Número total de spots
Pozoblanco 30 dpi-control	26.34 \pm 1.57	414
Pozoblanco 30 dpi-inoculada	17.18 \pm 0.57	420
Pozoblanco 90 dpi-control	12.89 \pm 0.90	360
Pozoblanco 90 dpi-inoculada	8.49 \pm 1.92	311
Almería 30 dpi-control	22.20 \pm 0.76	340
Almería 30 dpi-inoculada	18.41 \pm 0.65	264
Almería 90 dpi-control	24.27 \pm 1.53	386
Almería 90 dpi-inoculada	14.55 \pm 0.42	345



Figura 5. Colección de progenitores de encina procedentes de poblaciones de Andalucía. Hinojosa del Duque, Universidad de Córdoba-Grupo de Evaluación y Restauración de Sistemas Agrícolas y Forestales-IFAPA.

Figure 5. Progenitor collection of Holm oak from Andalusia populations. Hinojosa del Duque, Universidad de Córdoba-Grupo de Evaluación y Restauración de Sistemas Agrícolas y Forestales-IFAPA.

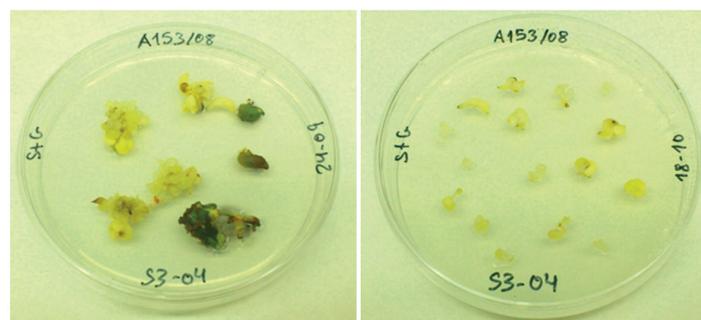


Figura 6. Placas de embriones de encina antes (izqda) y después (dcha) del repicado del Banco de Embriones de encina de la Universidad de Córdoba-Grupo de Evaluación y Restauración de Sistemas Agrícolas y Forestales.

Figure 6. Holm oak embryos before (left) and after (right) pricking. Embryon Bank-Universidad de Córdoba-Grupo de Evaluación y Restauración de Sistemas Agrícolas y Forestales.

Referencias

- Abril, N., Gion, J.M., Kerner, R., Müller-Starck, G., Cerrillo, R.M.N., Plomion, C., Jorrin-Novo, J.V. 2011. Proteomics research on forest trees, the most recalcitrant and orphan plant species. *Phytochemistry* 72(10): 1219-1242.
- Alfá, R., Agúndez, D., Alba, N., González Martínez, S.C., Soto, A. 2003. Variabilidad genética y gestión forestal. *Ecosistemas* 3:6.
- Allen, C.D., Macalady, A.K., Chenchouni, H., Bachelet, D., McDowell, N., Venetier, M., Kitzberger, T., Rigling, A., Breshears, D.D., Hogg, E.H., Gonzalez, P., Fensham, R., Zhang, Z., Castro, J., Demidova, N., Lim, J.H., Allard, G., Running, S.W., Semerci, A., Cobb, N. 2010. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology Management* 259: 660–684.
- Bellarosa, R., Schirone, B., Maggini, F., Fineschi, S. 1996. Inter and intraspecific variation in three Mediterranean oaks (*Q. cerris*, *Q. suber*, *Q. crenata*). En: *Proceedings of the Workshop on Inter- and Intraspecific Variation in European Oaks: Evolutionary Implications and Practical Consequences. 15-16 June 1994, Brussels*. Official Publication of the European Communities, Bruselas, Bélgica.
- Boshier, D.H., Young, A.G. 2000. Forest conservation genetics: limitations and future directions. En: Young, A., Boshier, D., Boyle, T. (eds.), *Forest conservation genetics: Principles and practice*, pp. 289-297. CABI Publishing, Reino Unido.
- Bussotti, F., Ferrini, F., Pollastrini, M., Fini, A. 2013. The challenge of Mediterranean sclerophyllous vegetation under climate change: From acclimation to adaptation, *Environmental and Experimental Botany* 103: 80-98.
- Collada, C., Jiménez, P., Gil, L. 2001. Análisis de la variabilidad de ADN de cloroplastos en *Quercus ilex* L., *Quercus suber* L. y *Quercus coccifera*. En: Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía (Ed.). *Actas del III Congreso Forestal Español. Montes para la Sociedad del Nuevo Milenio*. Tomo V. pp: 257-262. Consejería de Medio Ambiente-SECF. Gráficas Coria. Sevilla.
- Corcobado, T., Cubera, E., Moreno, G., Solla, A. 2013. *Quercus ilex* forests are influenced by annual variations in water table, soil water deficit and fine root loss caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Agricultural and Forest Meteorology* 169: 92-99.
- Díaz, M., Pulido, F. J., Marañón, T. 2003. Diversidad biológica y sostenibilidad ecológica y económica de los sistemas adhesionados. *Ecosistemas* 12(3) Disponible en: <http://revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/229>
- Dumolin-Lapegue, S., Pemonge, M.H., Petit, R.J. 1997. An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Molecular Ecology* 6(4): 393-397.
- Echevarría-Zomeño, S., Ariza, D., Jorge, I., Lenz, C., del Campo, A., Jorrín-novo, J.V., Navarro-Cerrillo, R.M.. 2009. Changes in the protein profile of *Quercus ilex* leaves in response to drought stress and recovery. *Journal of Plant Physiology* 166(3), 233-245.
- Echevarría-Zomeño, S., Abril, N., Ruiz-Laguna, J. Jorrín-Novo, J.V., Maldonado A.M. 2012. Simple, rapid and reliable methods to obtain high quality RNA and genomic DNA from *Quercus ilex* L. leaves suitable for molecular biology Studies. *Acta Physiologia Plantarum* 34:793– 805.
- Elena-Roselló, J.A., Lumaret, R., Cabrera, E., Michaud, H. 1992. Evidence for the hybridization between sympatric holm-oak and cork-oak in Spain based on diagnostic enzyme markers. *Vegetatio* 99/100:115-118.
- Finkeldey, R., Ziehe, M. 2004. Genetic implications of silvicultural regimes. *Forest Ecology and Management* 197(1), 231-244.
- González-Rodríguez, V., Villar, R., Navarro-Cerrillo, R.M. 2011. Maternal influences on seed mass effect and initial seedling growth in four *Quercus* species, *Acta Oecologica* 1: 1-9.
- Gygi, S.P., Rist, B., Gerber, S.A., Turecek, F., Gelb, M.H., Aebersold, R. 1999. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature biotechnology* 17(10), 994-999.
- Jiménez, M.P., Díaz-Fernández, P.M., Iglesias, S., De Tuero, M., Gil, L. 1996. *Las regiones de procedencia de Quercus ilex L. en España*. Ministerios de Agricultura y Pesca, Madrid.
- Jiménez, P., Gil, L., Petit, R.J. 1999. Analysis of cpDNA variation in *Quercus suber* and *Quercus ilex* populations. En: Espinel, S., Ritter, D. (eds.), pp:141-142. *Congreso Internacional sobre Aplicación de la Biotecnología a la Genética Forestal* (BIOFOR-99). Diputación Foral de Alava. Vitoria, España.
- Jimenez Sancho, M.P. 2001. Analysis of genetic variability of *Quercus suber* L. by molecular markers and its application to genetic resources conservation. Tesis doctoral, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Madrid (España). Universidad Politécnica de Madrid (España). Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes. Madrid.
- Jorge, I., Navarro-Cerrillo, R.M., Lenz, M., Ariza, D., Porras, C., Jorrín-Novo, J.V. 2005. The Holm Oak leaf proteome. Analytical and biological variability in the protein expression level assessed by 2-DE and protein identification by MS/MS de novo sequencing and sequence similarity searching. *Proteomics* 5: 222-234.
- Jorge, I., Navarro-Cerrillo, R.M., Lenz, M., Ariza, D., Jorrín-Novo, J.V. 2006. Variation in the holm oak leaf proteome at different plant developmental stages, between provenances and in response to drought stress. *Proteomics* 6: S207-S214.
- Jorrin-Novo J.V., Valledor Gonzalez, L. (eds.). 2013. Translational Plant Proteomics. *Journal of Proteomics* 93.
- Jorrin-Novo, J.V., Komatsu, S., Weckwerth, W., Wienkoop, S. (eds.). 2013. *Plant Proteomics: Methods and Protocols*, 2nd edition. Methods in Molecular Biology, Vol. 1072. Humana Press, Springer; New York, Estados Unidos; Heidelberg, Alemania; Dordrecht, Holanda; London, Reino Unido.
- Lindner, M., Maroschek, M., Netherer S., Kremer A., Barbati A., Garcia-Gonzalo J., Seidl R., Delzond, S., Corona P., Kolström, M., Lexer M.J., Marchetti, M. 2010. Climate change impacts, adaptive capacity, and vulnerability of European forest ecosystems. *Forest Ecology and Management* 259(4): 698-709.
- Lloret, F. 2012. Vulnerabilidad y resiliencia de ecosistemas forestales frente a episodios extremos de sequía. *Ecosistemas* 21: 85-90.
- López-de-Heredia, U., Jiménez, P., Díaz-Fernández, P., Gil, L. 2005. Diversidad genética, origen y conservación de las especies esclerófilas del género *Quercus* en las Islas Baleares. *Bolletí de la Societat d'Història Natural de les Balears* 48, 43-60.
- López de Heredia, U. 2006. *Filogeografía de los Quercus esclerófilos (Q. suber L., Q. ilex L. y Q. coccifera L.) en el Mediterráneo occidental*. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid, España.
- López de Heredia, U., Gil, L. 2006. La diversidad en las especies forestales: un cambio de escala. El ejemplo del alcornoque. *Ecosistemas* 15: 24-33.
- Lumaret, R., Mir, C., Michaud, H., Raynal, V. 2002. Phylogeographical variation of chloroplast DNA in holm oak (*Quercus ilex* L.). *Molecular Ecology* 11(11), 2327-2336.
- Maldonado, A.M., Jorrín-novo, J.V. 2007. Proteómica vegetal: aplicación al estudio de la interacción planta-patógeno y planta-parásita. En: Fenoll, C., Escobar, C., Marcos, J., Rodríguez-Palenzuela, P., Pallas, V. (eds). *Herramientas Biotecnológicas en Fitopatología*, pp. 93-107. Sociedad Española de Fitopatología / Mundi Prensa. Madrid, España.
- Michaud, H., Lumaret, R., Romane, F. 1992. Variation in the genetic structure and reproductive biology of holm oak populations. *Vegetatio* 99/100: 107-113.
- Morales, R., Vicente, J.A., Galán de Mera, A. 2005. cpDNA evidence of introgression in *Quercus* L. (Fagaceae). The influence of the phytotopographic position. *Flora* 200: 222-228.
- Moreno, G., Pulido, F.J. 2008. The functioning, management and persistence of dehesas. En: Rigueiro, A., McAdam, J., Mosquera-Losada M.R. (eds.). *Agroforestry in Europe*, pp. 127-160. Springer, Dordrecht, Holanda.
- Morgenstern, M. 2011. *Geographic variation in forest trees: genetic basis and application of knowledge in silviculture*. UBC Press, Vancouver, Canadá.
- Quézel, P., Frédéric M. 2003. *Ecologie et biogéographie des forêts du bassin méditerranéen*. Vol. 572. Elsevier, Paris, Francia.
- Rafii, Z., Zavarin, E., Pelleau, Y. 1991. Chemosystematic differentiation of *Quercus ilex* and *Q. rotundifolia* based on acorn fatty acids. *Biochemical Systematics and Ecology* 2 163-166.
- Rafii, Z., Dodd, R.S., Pelleau, Y. 1993. Biochemical diversity and systematics of Mediterranean evergreen oak from South East France. *Biochemical Systematics and Ecology* 6-7: 687-694.
- Rosignol, M., Peltier, J. B., Mock, H. P., Matros, A., Maldonado, A. M., Jorrín-novo, J. V. 2006. Plant proteome analysis: a 2004–2006 update. *Proteomics* 6(20): 5529-5548.
- Sánchez, ME, Caetano, P, Ferraz, J, Trapero, A. 2002. *Phytophthora* Disease of *Quercus ilex* in South-Western Spain. *Forest Pathology* 32: 5-18.

- Silvertown, J. Charlesworth, D. 2009. Introduction to plant population biology. John Wiley AND Sons.
- Sghaier-Hammami, B., Valero-Galván, J., Romero-Rodríguez, M. C., Navarro-Cerrillo, R. M., Abdelly, C., Jorrín-Novo, J.V. 2013. Physiological and proteomics analyses of Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.] Samp.) responses to *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Physiology and Biochemistry* 71: 191-202.
- Valero Galván, J., Jorrín-Novo, J.V., Gómez, A., Ariza, D., García, J., Navarro Cerrillo, R.M. 2011. Population variability based on the morphometry and chemical composition of the acorn in Holm oak (*Quercus ilex*). *European Journal of Forest Research* 131:893-904.
- Valero Galván, J., Valledor, L., González Fernández, R., Navarro-Cerrillo, R.M., Jorrín-Novo, J.V. 2012. Proteomic analysis of Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.] Samp.) pollen. *Journal of Proteomics* 9: 2736-2744.
- Valero Galván, J., Valledor, L., Navarro Cerrillo, R.M., Gil Pelegrín, E., Jorrín-Novo, J.V. 2013a. Studies of variability in Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.] Samp.) through acorn protein profile analysis. *Journal of Proteomics* 74: 8-12
- Valero Galván, J., González Fernández, R., Navarro-Cerrillo, R.M., Gil Pelegrín, E., Jorrín-Novo, J.V. 2013b. Physiological and proteomic analyses of drought stress response in Holm oak provenances. *Journal of Proteome Research* 12: 5110-5123
- Valladares, F., Peñuelas, J., de Luis Calabuig, E. 2005. Impactos sobre los ecosistemas terrestres. En: Valladares, F., Peñuelas, J., de Luis Calabuig, E. (eds.). *Evaluación preliminar de los impactos en España por efecto del cambio climático*, pp. 65-112. Ministerio de Medio Ambiente, 65-112.
- Varela, M.C. 1993. Conservation of genetic resources of *Quercus* genera in Portugal. En: Muhs, H., von Wühlisch, G. (eds.). Pp. 249-256 *The Scientific Basis for the Evaluation of Genetic Resources of Beech*, pp. 249-256. Working Document of the EC, DG VI, Bruselas, Bélgica.
- Vázquez Pardo, F.M. 1998. *Semillas del género Quercus L. (Biología, ecología y manejo)*. Consejería de Agricultura y Comercio, Junta de Extremadura, Mérida, España.
- Vicioso, C. 1950. *Revisión del género Quercus L. en España*. Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias. Madrid, España.
- Watson, B.S., Asirvatham, V.S., Wang, L., Sumner, L.W. (2003). Mapping the proteome of barrel medic (*Medicago truncatula*). *Plant Physiology* 131(3): 1104-1123.
- Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F., Williams, K.L. 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.

Glosario

Banda / spot: Ambos términos se utilizan para hacer alusión a los resultados de la electroforesis en gel de proteínas y ácidos nucleicos. Tras la separación de estas biomoléculas y su posterior tinción aparecen como imágenes discretas en forma rectangular (banda), electroforesis en una dimensión, o esférica (spot), electroforesis bidimensional. Aunque se ha debatido extensamente y para el segundo caso se han propuestos términos en castellano como mancha, punto, en la literatura científica, como en tantos otros casos, se utiliza sin traducir el término spot.

Clon: un grupo de células o individuos genéticamente idénticos. Coloquialmente un individuo formado por algún proceso asexual (de modo que es genéticamente igual a la fuente de la que deriva).

Fenotipo: Totalidad de la naturaleza física, bioquímica y fisiológica de un individuo, tal como viene determinada por su genotipo y el ambiente dentro del cual se desarrolla. Es decir es la manifestación detectable de un determinado genotipo. Los mismos genes a veces producen distintos fenotipos según en qué ambiente se expresen.

Genotipo: La constitución genética (genoma) de un individuo, o de un determinado locus.

Genómica: Es el campo de la genética que intenta comprender el contenido, la organización, la función y la evolución de la información genética contenidos en el genoma completo.

Metabolómica: Es la disciplina científica o aproximación metodológica que tiene como objetivo el estudio del conjunto de todos y cada uno de los metabolitos (biomoléculas) presentes en la célula. En concreto hace alusión a compuestos de bajo peso molecular, por lo que quedan exclui-

dos los polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. El conjunto de dichos compuestos se clasifican en dos grandes grupos, el de los metabolitos primarios (en gran medida azúcares, aminoácidos, ácidos grasos, lípidos simples y fosfolípidos, nucleótidos, hormonas y vitaminas) y secundarios (principalmente fenólicos, terpenoides y alcaloides).

Microsatélite: son secuencias cortas de DNA en las que un fragmento de entre dos y seis pares de bases se repite un número de veces. Cada secuencia SSR se define por el tipo de unidad repetida (lo más frecuente mono, di, tri o tetra nucleótidos) y por el sitio que ocupan en el genoma (locus). La variación en el número de repeticiones crea diferentes alelos. Su frecuencia y tipo de repetición varía en los genomas de distintas especies.

Proteína: desde un punto de vista biológico son las moléculas encargadas de ejecutar la información impresa en los ácidos nucleicos (genes) y por tanto determinantes del fenotipo. Desde un punto de vista químico son polímeros de aminoácidos unidos entre si por enlaces peptídicos, pudiendo presentar, además, algún elemento no aminoácido.

Proteómica: Disciplina bioquímica o aproximación metodológica que tiene como objeto el estudio y la caracterización del proteoma, entendido como el conjunto de todas y cada una de la especies proteicas presentes en una célula.

Técnicas de hibridación: Es la unión complementaria de ácidos nucleicos (ADN o ARN), y se utilizan a menudo para detectar una molécula diana partiendo de una sonda complementaria a ella. Entre ellas están técnicas tan importantes como la PCR o las tecnologías de arrays de ADN.