

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA
ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA
BIOLÓGICAS**



**“FENOTIPADO FOTOSINTÉTICO, EVOLUCIÓN ESTRUCTURAL
DE RUBISCO Y TRANSCRIPTÓMICA DE *Calycophyllum spruceanum*
y *Guazuma crinita*”**

Presentada por:

VLADIMIR FERNANDO CAMEL PAUCAR

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
DOCTORIS PHILOSOPHIAE EN CIENCIAS E INGENIERÍA
BIOLÓGICAS**

Lima – Perú

2024

Tesis Doctoral Vladimir Camel_ 2024_ISK_VCP(1).docx

INFORME DE ORIGINALIDAD

3%

INDICE DE SIMILITUD

4%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

0%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

www.mdpi.com

Fuente de Internet

3%

Gaston Zolla Benites
Asesor

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias < 2%

Excluir bibliografía

Apagado

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA
BIOLÓGICAS**

**“FENOTIPADO FOTOSINTÉTICO, EVOLUCIÓN ESTRUCTURAL
DE RUBISCO Y TRANSCRIPTÓMICA DE *Calycophyllum spruceanum*
y *Guazuma crinita*”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
DOCTORIS PHILOSOPHIAE**

Presentada por:

VLADIMIR FERNANDO CAMEL PAUCAR

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Ph.D. Héctor Gonzáles Mora

PRESIDENTE

Dr. Gastón Zolla Benites

ASESOR

Dr. Jorge Jiménez Dávalos

CO-ASESOR

Dra. Ilanit Samolski Klein

MIEMBRO

Ph.D. Ana Kitazono Sugahara

MIEMBRO

Ph.D. Esteban Galeano Gómez

MIEMBRO EXTERNO

DEDICATORIA

El presente proyecto de tesis lo dedico a mis padres que me motivaron desde muy pequeño en la carrera científica. Por otra parte, considero en la actualidad que son necesarias políticas económicas revolucionarias para mejorar la calidad de vida del ser humano y de los demás organismos biológicos que habitan el planeta tierra. Y si no tomamos decisiones drásticas en el presente sobre como adaptarnos y evolucionar respecto a la crisis climática, ambiental, económica, política y social, definitivamente el futuro será catastrófico. Desde ya me pongo a trabajar y siempre disponible para poder unir esfuerzos por la conservación y restauración de los ecosistemas.

AGRADECIMIENTO

Agradezco al Dr. Jorge Jiménez Dávalos director del Programa de Cereales y Granos Nativos, de la Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima-Perú.

De una manera muy especial a mi Asesor Dr. Gastón Zolla, por ser mi orientador científico, quien me brindó conocimientos y la oportunidad de poder desarrollarme académicamente.

Se agradece al Ph.D. José J de Vega, Earlham Institute, Norwich, UK, por apoyar en los procesos bioinformáticos.

Se agradece al Ph.D. Carlos Alberto Martínez, Universidade de São Paulo, Brasil, por ayudarnos a fortalecer mi interés en los procesos fotosintéticos de las plantas.

Se agradece al Ph.D. Esteban Galeano y Dr. Marco Arizapana, por ser mis mentores académicos y brindaron la oportunidad de aprender nuevos conocimientos.

Agradezco a mis amigos de laboratorio, Manuel Hidalgo, Corina, Ángel Vega, Susan Linares, Joao, Rosario Javier, Gean Carlos. Asimismo, a los administrativos del programa, a Ruthy Paucar, William, Cesar, Cachito. Y a todos mis amigos y amigas de la promoción 2019-I del Doctorado en Ciencias e Ingeniería Biológicas.

Agradezco a mis abuelos (Neptali, Valentina, Cesario y Bacilia), padres (Tarcila y Andres), a mi hermano (Carlos), a mi esposa (Zulema Ninanya), y a toda mi familia.

Se agradece a la estación climática Von Humboldt, ubicada en la Universidad Nacional Agraria La Molina, por proporcionarnos los datos climáticos.

De una manera muy especial se agradece a la Universidad Nacional Agraria la Molina, Facultad de Ciencias. Por brindarnos el financiamiento para la ejecución de nuestra investigación. PROCIENCIA número de subvención 177-2015-FONDECYT y 159-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV.

Se agradece al Banco Mundial y a PROCIENCIA, por el apoyo financiero al proyecto N° 159-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV

También se agradece al apoyo del financiamiento de FONDECYT al equipo de investigación Internacional en Cambio Climático – Am Sud 2020. FONDECYT N° 007-2020-CONCYTEC-P; gracias a ello pude hacer capacitaciones de formación científica en el INRA de Francia y en el INTA de Bariloche Argentina, estas experiencias ayudaron a fortalecer mis conocimientos científicos dentro de mi formación como estudiante de Doctorado.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1. Importancia de los recursos forestales.....	6
2.2. Especies de estudio, taxonomía, distribución ecológica e importancia económica	7
2.3. Crecimiento de los árboles	12
2.3.1. Factores ambientales asociados al crecimiento de los árboles.	12
2.3.2. Importancia de la Fotosíntesis en el desarrollo de las plantas.....	14
2.3.3. Importancia de la RuBisCO durante la fotosíntesis	16
2.3.4. Genómica y transcriptómica en árboles tropicales.	18
2.3.5. Secuenciación de ARN y perfiles transcripcionales de xilema secundario.....	20
2.3.6. Vías moleculares que regulan la biosíntesis lignina, celulosa y hemicelulosa.....	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1. Caracterización intra-anual de los rasgos fenotípicos y fotosintéticos de las plantas de <i>C. spruceanum</i> y <i>G. crinita</i>	26
3.1.1. Especie de estudio y condiciones de crecimiento.....	26
3.1.2. Evaluación de crecimiento y fisiología de <i>C. spruceanum</i> y <i>G. crinita</i>	26
3.1.3. Plasticidad fotosintética y anatómica a través del dosel de árboles de <i>G. crinita</i> y <i>C. spruceanum</i>	28
3.1.4. Análisis de datos.....	28
3.2. Evolución estructural de las isoformas de RuBisCO.....	29
3.2.1. Clasificación de las isoformas de RuBisCO.....	29
3.2.2. Selección de estructuras de RuBisCO y análisis filogenético	30
3.2.3. Dinámica molecular.....	31
3.2.4. Análisis de estabilidad y flexibilidad.....	32
3.2.5. Análisis de componentes principales y agrupamiento.....	32
3.2.6. Matrices de dinámica de correlación cruzada.....	33
3.3. Identificación de genes implicados en la formación de la madera en las especies forestales <i>G. crinita</i> y <i>C. spruceanum</i> , utilizando <i>RNAseq</i>	34
3.3.1. Material Biológico.....	34

3.3.2. Preparación de la solución CTAB	35
3.3.3. Extracción de ARN.....	36
3.3.4. Purificación de ARN y remoción de inhibidores.	37
3.3.5. Análisis de Integridad de ARN (RIN) y Librerías de ARNm (TrueSeq Strander mRNA).....	38
3.3.6. Limpieza y montaje de novo	38
3.3.7. Detección y anotaciones de unigenes expresados diferencialmente	38
3.3.8. Anotación funcional	39
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
4.1. Diferencias intra-anual de los rasgos fenotípicos y fotosintéticos	40
4.1.1. Variación intra-anual del crecimiento del tallo y la hoja de <i>C. spruceanum</i> y <i>G. crinita</i>	41
4.1.2. Relación entre temperatura máxima y rendimiento cuántico máximo Fv/Fm	43
4.1.3. Dinámica intra-anual del fotosistema II	46
4.1.4. Circuito de protones y electrones	52
4.1.5. Variación fotosintética en diferentes niveles del dosel de árboles de <i>C. spruceanum</i> y <i>G. crinita</i>	54
4.1.6. Influencia de las variables ambientales y fisiológicos en el crecimiento de <i>C. spruceanum</i> y <i>G. crinita</i>	62
4.2. Evolución estructural de las isoformas de RuBisCO.....	64
4.2.1. Clasificación de las Formas de RuBisCO.....	65
4.2.2. Evaluación de la estabilidad y flexibilidad de las isoformas de RuBisCO	74
4.2.3. Análisis de componentes principales (PCA)	78
4.2.4. Análisis de matriz de correlación cruzada (DCCM)	83
4.3. Identificación de genes implicados en la formación de la madera en <i>C. spruceanum</i> , utilizando <i>RNAseq</i>	89
4.3.1. Selección de plantas para análisis transcriptómico y extracción de ARN.....	89
4.3.2. Ensamblaje y anotación del transcriptoma	90
4.3.3. Análisis de enriquecimiento ontológico (GO) de GDEs	90
4.3.4. Patrones de expresión de genes relacionados con xilema secundario	95

4.4. Identificación de genes implicados en la formación de la madera en <i>G. crinita</i> , utilizando RNAseq.	106
4.4.1. Selección de plantas para análisis transcriptómico y extracción de ARN.....	106
4.4.2. Ensamblaje y anotación del transcriptoma	107
4.4.3. Análisis de enriquecimiento ontológico (GO) de GDEs	107
4.4.4. Patrones de expresión de genes relacionados con biosíntesis de xilema secundario.....	112
V. CONCLUSIONES	123
VI. RECOMENDACIONES	126
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
VII. ANEXOS	158

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Abreviación de las variables fotosintéticas obtenidas por el equipo MultispeQ... 27
Tabla 2. Análisis estadístico de los modelos matemáticos de Gompertz y Lineal 46
Tabla 3. Promedio y error estándar del RMSD de 12 estructuras de RbcL 77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Puntos de presencia de árboles de <i>G. crinita</i> y <i>C. spruceanum</i> a través de los diferentes biomas de sur américa	10
Figura 2. Equipo MultispeQ que mide la fluorescencia de la clorofila en respuesta a pulsos de saturación de luz.....	16
Figura 3. Regulación Redox de la actividad de RuBisCO en el cloroplasto.....	18
Figura 4. Estudios de RNAseq realizados en árboles.....	20
Figura 5. Redes de regulación e interactómica de factores de transcripción asociados a la formación de xilema secundario	24
Figura 6. Diseño de experimentos para el análisis transcriptómico en las especies <i>C. spruceanum</i> y <i>G. crinita</i>	35
Figura 7. Análisis de crecimiento mensual de tallos y hojas en <i>C. spruceanum</i> y <i>G. crinita</i>	42
Figura 8. Variación estacional en la temperatura del aire	45
Figura 9. Series mensuales de parámetros de eficiencia fotosintética del PSII	48
Figura 10. Series mensuales de parámetros fotosintéticos de <i>G. crinita</i> y <i>C. spruceanum</i> . 51	
Figura 11. Relación entre el flujo de protones (vH+) con el flujo lineal de electrones (LEF), además de la relación PAR y LEF	53
Figura 12. Evaluación trimestral de parámetros fotosintéticos en el desarrollo de las hojas en <i>G. crinita</i>	55
Figura 13. Evaluación trimestral de parámetros fotosintéticos en el desarrollo de las hojas en <i>C. spruceanum</i>	60
Figura 14. Cortes histológicos transversales del tallo en tres secciones (superior, medio, inferior).....	61
Figura 15. Coeficientes promedio del modelo que influyen en el mayor incremento del diámetro y la altura de los árboles de <i>G. crinita</i> y <i>C. spruceanum</i>	63
Figura 16. Análisis de componentes principales (PCA) de las estructuras PDB disponibles para las formas de RuBisCO RbcL	66
Figura 17. Análisis filogenético de máxima verosimilitud de la familia de proteínas RuBisCO RbcL	68

Figura 18. Alineamiento de secuencia múltiple basada en la estructura de tres formas de RuBisCO	71
Figura 19. Análisis de modos normales (AMN)	73
Figura 20. Valores de RMSD (nm) y valores RMSF (nm) de los átomos de C-alpha.....	76
Figura 21. Análisis de componentes principales de la isoforma I de RuBisCO.....	79
Figura 22. Análisis de componentes principales de la isoforma II y III de RuBisCO	82
Figura 23. Análisis de correlación cruzada de la isoforma I de RbcL	85
Figura 24. Análisis de correlación cruzada (DCCM) de la isoforma II y III de RbcL.....	88
Figura 25. Análisis de red BINGO utilizando Cytoscape 3.4.0 para GDE sobreexpresados	92
Figura 26. Análisis de red BINGO utilizando Cytoscape 3.4.0 para GDE subexpresados .	94
Figura 27. Abundancia relativa de ARN de 9 genes ERF de Capirona	96
Figura 28. Abundancia relativa de ARN de 4 genes MYB y 1 NAC de Capirona	98
Figura 29. Abundancia relativa de ARN de 4 genes bHLH de Capirona.....	100
Figura 30. Abundancia relativa de ARN de 8 genes implicados en la biosíntesis de Celulosa de Capirona	104
Figura 31. Abundancia relativa de ARN de 6 genes implicados en la biosíntesis de Lignina de Capirona	105
Figura 32. Análisis de red BINGO utilizando Cytoscape 3.4.0 para GDE sobreexpresados	109
Figura 33. Análisis de red BINGO utilizando Cytoscape 3.4.0 para GDE subexpresados.....	111
Figura 34. Abundancia relativa de ARN de 12 genes que codifican FTs MYB y NAC...	115
Figura 35. Abundancia relativa de ARN de 4 genes implicados en la síntesis de Celulosa de Bolaina	117
Figura 36. Abundancia relativa de ARN de 8 genes implicados en la síntesis de Hemicelulosa de Bolaina.....	119
Figura 37. Abundancia relativa de ARN de 8 genes implicados en la síntesis de Lignina de Bolaina	122

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Comparaciones de los incrementos de diámetro y altura de plantas de <i>C. spruceanum</i> y <i>G. crinita</i> , evaluados durante un año	158
Anexo 2. Comparaciones de los incrementos de longitud y ancho de las hojas de las plantas de <i>C. spruceanum</i> y <i>G. crinita</i>	160
Anexo 3. Fluctuación de la temperatura y humedad del aire	162
Anexo 4. Correlación entre el porcentaje de la clorofila relativa de <i>G. crinita</i> y <i>C. spruceanum</i> y los parámetros Phi2, PhiNO, PhiNPQ y NPQt	163
Anexo 5. Correlación entre el flujo lineal de electrones (LEF) y ECSt.mAU, vH+ y gH+.....	163
Anexo 6. Correlación entre el rendimiento cuántico (Phi2), longitud de las hojas, con el incremento diametral y de altura de las plantas de <i>G. crinita</i> y <i>C. spruceanum</i>	164
Anexo 7. Estructuras de isoformas I, II y III de RbcL	165
Anexo 8. Flujo de trabajo de análisis de RuBisCO utilizando el paquete Bio3d.....	168
Anexo 9. Códigos de R-Project para clasificar todas las estructuras de RbcL	169
Anexo 10. Códigos para realizar dinámica molecular utilizando el software Gromacs	171
Anexo 11. Código para graficar las fluctuaciones de RMSD y RMSF.....	172
Anexo 12. Código de R Project para graficar el PCA y DCCM de las dinámicas moleculares.....	173
Anexo 13. Calidad del ARN en geles de agarosa de <i>G. crinita</i> y <i>C. spruceanum</i>	175
Anexo 14. Resultado del RNAseq de 12 muestras.....	176
Anexo 15. Análisis RIN de <i>G. crinita</i> y <i>C. spruceanum</i>	177
Anexo 16. Control de calidad de la biblioteca NGS de <i>G. crinita</i> y <i>C. spruceanum</i>	178
Anexo 17. Abundancia relativa de ARN (TPM), de genes asociados a formación de madera de <i>C. spruceanum</i>	179
Anexo 18. Abundancia relativa de ARN (TPM), de genes asociados a formación de madera de <i>G. crinita</i>	180

LISTADO DE ABREVIATURAS

<i>G. crinita:</i>	<i>Guazuma crinita</i>
<i>C. spruceanum:</i>	<i>Calycophyllum spruceanum</i>
NGS:	Next Generation Sequencing
GDEs:	Genes diferencialmente expresos
FTs:	Factores de transcripción
PAR:	Radiación fotosintéticamente activa
LEF:	Flujo Lineales de electrones
PSI:	Fotosistema I
PSII:	Fotosistema II
Phi2:	Rendimiento cuántico del Fotosistema II
PhiNPQ:	Rendimiento de enfriamiento no fotoquímico
NPQ:	Apagado no fotoquímico
Fv/Fm:	Máxima eficiencia cuántica del fotosistema II
Rfd:	Relación de disminución de la fluorescencia de la clorofila
GLMM:	Modelo lineal generalizado mixto

RESUMEN

La presente tesis tuvo como objetivos caracterizar la fenología fotosintética, analizar la evolución estructural de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCO) y realizar un análisis transcriptómico para identificar genes asociados a la xilogénesis en *Guazuma crinita* Mart. (Bolaina) y *Calycophyllum spruceanum* Benth Hook f. ex Schumann (Capirona). Como resultados principales, *G. crinita* presentó altos índices de rendimiento cuántico (Phi2) durante todo el año. En invierno, sus hojas jóvenes presentaron mayor Phi2 que las hojas viejas y se relacionaron positivamente con el mayor diámetro de lumen de las fibras. Contrario a ello, en las hojas caducas de *C. spruceanum*, disminuyeron abruptamente los valores de Phi2 en invierno, además no se encontró correlación entre Phi2 y diámetro del lumen de la fibra a lo largo del tallo. En ambas especies se incrementaron los valores de enfriamiento no fotoquímico (NPQt) en invierno, ayudando a disipar la energía luminosa en forma de calor para la adaptación al frío y minimizar el daño del PSII. Por otra parte, el estudio de la evolución estructural de RuBisCO en las isoformas I, II y III exhibieron mayor fluctuación en el loop entre α B y β C, además presentaron correlación positiva con el loop 6, la cual es una región importante en la actividad enzimática y en los estados conformacionales de la RuBisCO. Asimismo, un aumento en la flexibilidad de la estructura loop entre α B y β C, Lys322 (loop6) estaría afectando la actividad catalítica de la enzima. Respecto a los resultados del transcriptoma, se logró obtener 3580 genes diferencialmente expresos (GDEs) del xilema secundario para *G. crinita* y 3470 para *C. spruceanum*. Estos genes incluyen factores de transcripción NAC y MYB relacionados con la biosíntesis de la pared celular secundaria, genes relacionados con la mayoría de los pasos metabólicos de la biosíntesis de celulosa, hemicelulosa y lignina. En conclusión, este estudio contribuye a la comprensión de los mecanismos fotosintéticos y de xilogénesis en Bolaina y Capirona, dos árboles endémicos de la amazonia que tienen gran importancia económica, social y ambiental.

Palabra clave: PhotosynQ; Ecofisiología; Bio3D; dinámica molecular; RNAseq

ABSTRACT

The present thesis aimed to characterize the photosynthetic phenology, analyze the structural evolution of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase (RuBisCO), and perform a transcriptomic analysis to identify genes associated with xylogenesis in *Guazuma crinita* Mart. (Bolaina) and *Calycophyllum spruceanum* Benth Hook f. ex Schumann (Capirona). As the main results, *G. crinita* presented high quantum yield (Φ_2) indices throughout the year. In winter, its young leaves presented higher Φ_2 than old leaves and were positively related to the greater lumen diameter of the fibers. Contrary to this, in deciduous leaves of *C. spruceanum*, Φ_2 values decreased abruptly in winter, and no correlation was found between Φ_2 and fiber lumen diameter along the stem. In both species, non-photochemical cooling (NPQt) values increased in winter, helping to dissipate light energy as heat for cold adaptation and minimizing PSII damage. On the other hand, the study of the structural evolution of RuBisCO in isoforms I, II, and III exhibited greater fluctuation in the loop between α B and β C. Also, I presented a positive correlation with loop 6, which is an important region in the enzymatic activity and the conformational states of RuBisCO. Likewise, an increase in the flexibility of the loop structure between α B and β C, Lys322 (loop6) would be affecting the catalytic activity of the enzyme. Regarding the transcriptome results, 3580 differentially expressed genes (DEGs) of the secondary xylem were obtained for *G. crinita* and 3470 for *C. spruceanum*. These genes include NAC and MYB transcription factors related to secondary cell wall biosynthesis and genes related to most metabolic steps of cellulose, hemicellulose, and lignin biosynthesis. In conclusion, this study significantly contributes to the understanding of photosynthetic and xylogenesis mechanisms in Bolaina and Capirona, two endemic trees of the Amazon that have great economic, social, and environmental importance, thereby highlighting the practical implications of our research for the preservation and sustainable use of these species.

Keywords: PhotosynQ; Ecophysiology; Bio3D; Molecular dynamics; RNAseq

I. INTRODUCCIÓN

Debido a la creciente demanda de madera, la industria forestal es un mercado importante a nivel nacional e internacional. Actualmente, se requiere sembrar 5 millones de hectáreas al año para abastecer principalmente a la industria del papel, construcción, bioenergía y otros (Held et al., 2015; Borja, 2018). Por ello, diversos países vienen realizando estudios a nivel molecular en árboles de interés para la industria, agroforestería, restauración ecológica y otros, lo que incluye la comprensión de las características genómicas, transcriptómicas, proteómicas y metabolómicas (Wang et al., 2018).

En el Perú las investigaciones y desarrollos tecnológicos en el sector forestal se han enfocado frecuentemente en la ecología (diversidad genética, estructura, función, dendrocronología y manejo silvicultural) (Pires et al., 2018; Ramos-Huapaya y Torrejon, 2016, 2017; Rochon et al., 2007). Sin embargo, hay escasa información sobre los mecanismos genéticos y fisiológicos involucrados en la xilogénesis, información importante para los genetistas forestales y los biólogos moleculares; con la finalidad de mejorar el crecimiento, reducir la rotación de cultivos y obtener árboles mejor adaptados a su entorno (Camel et al., 2017a, 2017b; Ouyang et al., 2016) y de este modo hacer más competitivo al sector forestal en función del mercado de la celulosa, madera y biocombustibles.

Según la categorización de especies maderables, el SERFOR (Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre) considera a *Guazuma crinita* y *Calycophyllum spruceanum* como una buena alternativa para la reforestación y restauración de áreas degradadas (Borja, 2018; Held et al., 2015), ya que estas especies nativas son de rápido crecimiento y de amplia distribución geográfica en la selva peruana, ocupando principalmente los bosques secundarios. Consecuentemente, la madera de Bolaina y Capirona son utilizadas en la construcción de viviendas prefabricadas, decoración de interiores, parquet, enchapados entre otros (Baldin et al., 2014; Penadillo, 2009). Además, estas especies contribuyen en la reducción del CO₂, evitan la erosión de los suelos, mejoran la regulación del ciclo hídrico y dinamiza la mineralización de los nutrientes (Couvreur, 2018; Yin et al., 2019; Sylvester et al., 2017).

La madera de estos árboles nativos tiene gran valor por su utilidad, calidad y durabilidad (Borja, 2018). Por ello, incrementar la producción de la madera, mejorar la calidad del leño y reducir la rotación de cultivos es de gran importancia para el desarrollo de la industria forestal (Grattapaglia y Kirst, 2008; Pavy et al., 2005; Tuskan et al., 2006). Sin embargo, para extender las plantaciones forestales requerimos entender el comportamiento fisiológico de los árboles a diferentes condiciones ambientales, como la temperatura, la intensidad de la luz solar, humedad y la disponibilidad de agua. Las plantas pueden experimentar diferentes niveles de estrés que afectan su rendimiento y productividad (Fréchette, 2019, 2020; Osei-bonsu et al., 2020). Por tanto, la capacidad de aclimatación de los árboles es importante para su supervivencia. A nivel fotosintético los árboles presentan diferentes estrategias en la utilización de la energía luminosa durante su crecimiento y aclimatación. En consecuencia, la evaluación de los parámetros de fluorescencia de la clorofila, permite fenotipar los rasgos fotosintéticos a nivel de la hoja y el dosel debido a los patrones fisiológicos que siguen las plantas (Krause et al., 2010; Kurjak et al., 2019). Siendo el valor de rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m) y el porcentaje de la clorofila relativa indicadores del estado de la planta frente a condiciones de estrés y parámetros muy útiles al momento de seleccionar ambientes adecuados para el establecimiento de los árboles en nuevos espacios geográficos (Fréchette et al., 2020; Tiwari et al., 2020).

Así mismo, se requiere conocer los mecanismos de la xilogénesis (Wang et al., 2018) para dar soluciones a la industria forestal (producción de madera, celulosa y bioenergía). Siendo necesario desarrollar estudios genéticos y fisiológicos durante el desarrollo vegetativo (estado juvenil de crecimiento) y generativo (estado de reproducción, brote, muerte, etc.), mostrando posibles vías transcripcionales y metabólicas (fenilpropanoides, monolignoles, flavonoides e isoflavonoides) implicadas en la formación de la madera (Demura y Fukuda, 2007; Groover y Robischon, 2006; Lin et al., 2015). En consecuencia, realizar análisis de crecimiento, fotosíntesis, componentes anatómicos y determinación cuantitativa de los transcritos de ARNm implicados en la biosíntesis de lignina, celulosa y hemicelulosa permitiría realizar una reingeniería en la producción de madera, pulpa de papel y biocombustibles (Lin et al., 2015). Por ejemplo, para la producción de biomasa, las plantas dependen de la capacidad fotosintética y de la exportación de sacarosa desde las hojas (Yu et al., 2015), en este proceso un gen importante es la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa

oxigenasa (RuBisCO), ya que es la principal enzima que regula el ciclo del carbono orgánico en la biosfera. Es la más abundante de la tierra y está presente en todos los dominios de la vida en diferentes isoformas (I, II, III y IV). Por ello, estudiar su evolución estructural permitirá dirigir los trabajos en mejoramiento genético con la finalidad de optimizar la producción de madera. Como es sabido, el sitio activo de la RuBisCO experimentó una evolución limitada para mantener la eficiencia de fijación de CO₂ en presencia de O₂ (Andersson y Backlund, 2008; Poudel et al., 2020). Actualmente, es importante mejorar la especificidad (CO₂, O₂) o la eficiencia catalítica de la carboxilación como herramienta para reducir las emisiones de CO₂ y mitigar los efectos del cambio climático.

Por consiguiente, estudios recientes vienen integrando la información sobre el crecimiento, fisiología, anatomía y biología molecular de las plantas a diferentes niveles (células, tejidos y órganos) (Sundell et al., 2017; Tuskan et al., 2018). Por otro lado, es importante señalar que el desarrollo de la madera inicia en el meristemo vascular del cambium en dirección de la médula (Ouyang et al., 2016; Sundell et al., 2017), formando el xilema secundario (madera) y en dirección de la corteza se agregan células de floema para el crecimiento diametral del tallo (Sundell et al., 2017). Las células madre (cambium) tienen la capacidad de dividirse durante largos períodos de tiempo (Alfaro-Sánchez et al., 2017; Herrera-Ramirez et al., 2017), mientras que las células de floema y xilema se dividen en unos pocos ciclos celulares. Además, antes de la diferenciación terminal en células especializadas como las células del xilema y floema se someten a la expansión celular inicial y a la biosíntesis de la pared celular primaria (Ouyang et al., 2016; Sundell et al., 2017). Consecuentemente, estudiar las características de las células madre en los árboles permitirá mejorar las técnicas de propagación vegetativa, regeneración de los tejidos, resistencia a enfermedades y en la reparación de daños causados por el medio ambiente. Sin embargo, para mejorar la comprensión de la formación de la madera es importante evaluar molecularmente a los árboles con diversas metodologías transcriptómicas como: *microarrays* o secuenciación de ARN (RNAseq), las cuales permiten comprender los perfiles de expresión génica de un determinado órgano o tejido (López y Vázquez-Poletti, 2016). La secuenciación de Nueva Generación (NGS, por sus siglas en inglés) es utilizada ampliamente en la investigación genética debido a su capacidad para generar grandes cantidades de datos de secuenciación de

forma eficiente, rápida y rentable (Handel y Disanto, 2013; Yadav et al., 2014). Tiene como fundamento básico la secuenciación del ADN, además permite obtener información como detección de múltiples eventos de *splicing* alternativo, edición de secuencias de ADN y ARN, identificación de nuevos transcritos, estimación de abundancia de expresión génica, entre otros (Handel y Disanto, 2013; Yadav et al., 2014). Por otra parte, la secuenciación directa de ARN aún no es posible con las plataformas comerciales, sin embargo, es posible de secuenciarlo de forma indirecta por transcripción reversa en ADNc (Wang et al., 2009). Este método es capaz de determinar la cantidad de ARNm en una condición específica y de ese modo comparar resultados de experimentos independientes (Wang et al., 2009). Asimismo, la técnica del RNAseq no requiere necesariamente tener genomas de referencia, y puede usarse para identificar de manera efectiva todos los loci transcritos en una muestra, además permite identificar polimorfismos de nucleótido único (SNPs), heterocigosidad y matrices de parentesco (Chen et al., 2018; López y Vázquez-Poletti, 2016; Wang et al., 2009), información importante en los procesos de mejoramiento genético.

En consecuencia, entender la regulación genética en tejidos jóvenes y maduros en el tallo es de gran importancia para entender la dinámica de la xilogénesis. Por ejemplo, Ouyang et al., (2016) estudiaron al árbol tropical *Neolamarckia cadamba* que es de madera dura y de rápido crecimiento, reportando 6202 genes diferencialmente expresados durante la xilogénesis, de los cuales 1634 genes mostraron una sobreexpresión cuando compararon la parte basal y el segmento apical del tallo; reportando a los factores de transcripción de las familias NAC y MYB como los principales reguladores de la biosíntesis de celulosa y lignina en *N. cadamba*. La xilogénesis consiste en procesos de generación, diferenciación y muerte celular programada del xilema (Escamez y Tuominen, 2014). En estos procesos biológicos recientemente mencionados, los factores de transcripción (FT) y las redes reguladoras de la transcripción desempeñan un papel clave (Chen y Zhu, 2004; Jin et al., 2015). Los FT generalmente reconocen una secuencia específica del ADN y regulan la frecuencia de inicio de la transcripción al unirse a sitios específicos en el promotor de los genes objetivo (Lin et al., 2015). En general, los FT pueden funcionar como activadores, represores o ambos para regular la expresión de los genes (Lin et al., 2015). En consecuencia, ya se han ido caracterizando funcionalmente los FT asociados a la xilogenesis en plantas modelo (*Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Populus trichocarpa*) (Zaret, 2014), y por ende

son muy importantes en los programas de mejoramiento genético y la industria forestal (Camel y Galeano, 2021), que desean un crecimiento más rápido, tolerancia a cambios abruptos al clima, resistencia a las enfermedades, mejorar la densidad, la rigidez, la morfología de las fibras y la orientación de la madera para lograr productos relacionados con la madera de alta calidad (Carvalho et al., 2013).

OBJETIVO GENERAL

Este proyecto tiene como objetivo general caracterizar la fenología fotosintética, analizar la evolución estructural de RuBisCO y realizar un análisis transcriptómico de *Calycophyllum spruceanum* y *Guazuma crinita* para identificar genes asociados a la xilogénesis.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Caracterizar de forma intra-anual los rasgos fenotípicos y fotosintéticos de las plantas de *Calycophyllum spruceanum* y *Guazuma crinita*.
2. Evaluar cómo la evolución de secuencia y estructura de la Isoforma I (*Guazuma crinita* y *Calycophyllum spruceanum*), Isoforma II e Isoforma III de RuBisCO define la flexibilidad intrínseca y la interacción residuo-residuo.
3. Analizar genes implicados en la xilogénesis de plantas de rebrote de *Calycophyllum spruceanum*, utilizando RNAseq.
4. Analizar genes implicados en la xilogénesis en tocones de tallo de *Guazuma crinita*, utilizando RNAseq.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Importancia de los recursos forestales

El bosque amazónico peruano presenta una gran diversidad de árboles de gran importancia económica, ecológica, social y ambiental, como *Swetenia macrophylla*, *Cedrelinga cateniformis*, *Guazuma crinita*, *Calycophyllum spruceanum*, *Cedrela montana*, etc. (Cheng et al., 2013; Porro et al., 2015). El mal uso de estos recursos ha generado pérdidas significativas de áreas boscosas, debido a la expansión agrícola, construcción de carreteras, tala ilegal, minería, incendios y explotación de madera (Finer y Jenkins, 2014). De hecho, se han establecido políticas sostenibles (Nacional de Bosques y Vida Silvestre No. 29763) en los últimos años para regularizar su uso (Macintosh et al., 2015), sin embargo se sigue incrementando la tasa de deforestación a causa de la corrupción, informalidad, narcotráfico, etc. Históricamente, la biomasa de origen forestal es usada como fuente bioenergética, y hasta la actualidad la madera es una de las primeras fuentes energéticas disponibles en las zonas rurales, siendo utilizada para la cocción de los alimentos, calefacción, iluminación (Liu et al., 2022) y como combustible para la generación de energía térmica, mecánica y eléctrica (Ali et al., 2023). Sin embargo, el crecimiento de la demografía mundial y las políticas de consumo demanda mayor cantidad de recursos energéticos, viviendas, alimentos, medicinas, entre otros (Chamie, 2001; Lutz, 2015). Además, debido al aumento de la combustión de hidrocarburos fósiles, se ha incrementado la concentración de CO₂ en la atmosfera; siendo la causa principal del calentamiento global (Barnes et al., 2019; Marsooli et al., 2019). Por ello, es importante diversificar las fuentes energéticas sostenibles, y en ese sentido los residuos vegetales son una buena opción para la producción bioetanol y biodiesel, formando parte de la segunda generación de los biocombustibles. El bioetanol se produce a partir de cualquier biomasa que contenga concentraciones de almidón, azúcares o celulosa (Janaswamy et al., 2022). La obtención de estos biocombustibles está acorde a las políticas del desarrollo sostenible debido a que son fuente de energía renovable y reducen el impacto ambiental.

Un caso bien cercano es el de Brasil quien hasta el 2019, ha sustituido la mitad del consumo de la gasolina por el uso de etanol producido a partir de caña de azúcar (Lourenço et al., 2021).

Industrialmente, los árboles de madera blanda y de rápido crecimiento facilitan la producción de chips de celulosa en la fabricación de pulpa de papel (fibra de celulosa de Pino “fibra larga” y Eucalipto “fibra corta”), existiendo una creciente demanda por países como Estados Unidos 17.3%; Alemania 10.6% y China con 10.5%, mientras que los países que mayormente exportan son Canadá, Finlandia y Suecia (Borja, 2018; Held et al., 2015). En cambio, los árboles de madera densa son de lento crecimiento y su gran valor reside en su dureza, veteados, color, resistencia a hongos e insectos, su utilidad es aprovechada en la fabricación de muebles, embarcaciones, parquetes, enchapados, contrachapados, estructuras de construcción, etc. Por último, los árboles no solo ofrecen beneficios económicos, sino también brindan servicios ambientales como: la regulación de los ciclos hidrológicos, mineralización de los nutrientes (C, H, O, N, etc.), evitan erosión de los suelos, reducen emisiones de CO₂, además son hábitats de flora y fauna endémica (Sylvester et al., 2017). Por tanto, hay una tendencia mundial al uso sostenible de los recursos forestales ya que tienen gran importancia económica, ecológica, social y ambiental.

2.2. Especies de estudio, taxonomía, distribución ecológica e importancia económica

***Guazuma crinita* (Bolaina)**

G. crinita presenta la siguiente clasificación taxonómica según Reynel et al., (2003).

Reino	:	Vegetal
División	:	MAGNOLIOPHYTA
Subdivisión	:	ANGIOSPERMA
Clase	:	MAGNOLIOPSIDA
Subclase	:	DIAPÉTALAS
Orden	:	Malvales
Familia	:	Sterculaceae
Género	:	<i>Guazuma</i>
Especie	:	<i>Guazuma crinita</i> Mart.
Nombre común	:	Bolaina, Bolaina blanca

G. crinita tiende a presentar diámetros entre 25 a 80 cm, altura de 15 a 30 m. Presenta un fuste circular, de copa aparasolada, presenta una corteza de color grisácea, negruzca, agrietada a fisurada. Los árboles con mayor diámetro tienden a tener una doble capa de corteza; la región externa es fibrosa-compacta, mientras que la región interna es fibrosa-laminar (Ramos-Huapaya y Torrejon, 2016, 2017).

G. crinita a nivel de su morfológica foliar tiene hojas simples, alternas y dísticas (Reynel et al., 2003). La longitud de sus hojas oscila entre 10 y 18 cm, y de ancho entre 5 y 7 cm, la longitud promedio de su peciolo oscila entre 1.5 y 2 cm. Las hojas frecuentemente son asimétricas, con borde aserrado, nerviación palmeada, la región del ápice es agudo y acuminado, mientras que la base de la hoja es cordada, las hojas también presentan unas cubiertas de pubescencia de pelos estrellados y escamosos sobre todo por la parte del envés (Reynel et al., 2003).

La inflorescencia es de forma de panículas axilares de unos 8-12 x 3-6 cm, con abundantes flores. Las flores pequeñas son hermafroditas, además presentan cáliz, corola y alcanzan una longitud entre 8 y 12 mm. La longitud de los pedicelos, el cáliz y la corola alcanzan promedios entre 4-8 mm, 2-3 mm y 6-12 mm respectivamente (Reynel et al., 2003). Por último, los frutos de *G. crinita* son cápsulas globosas de unos 4 a 8 mm de diámetro, la superficie es cubierta densamente por pelos largos, que alcanzan una longitud entre 3 y 4 cm (Flores, 2018).

***Calycophyllum spruceanum* (Capirona)**

Reino	:	Vegetal
División	:	MAGNOLIOPHYTA
Subdivisión	:	ANGIOSPERMA
Clase	:	MAGNOLIOPSIDA
Subclase	:	
Orden	:	Gentianales
Familia	:	Rubiaceae
Género	:	<i>Calycophyllum</i>
Especie	:	<i>Calycophyllum spruceanum</i> Benth Hook f. ex Schumann.
Nombre común	:	Capirona negra, Palo mulato, Palo Blanco

C. spruceanum es una especie heliófita, pioneros o tardíos, su nicho ecológico naturalmente está restringido a bosques periódicamente inundados, bosques secos tropicales, bosque

húmedo tropical y bosque muy húmedo tropical (Figura 1a), por debajo de los 1200 msnm y en suelos limosos, arcillosos, aluviales y fértiles (Russell et al., 1999; Sotelo et al., 2008). *C. spruceanum* llega a tener hasta 35 metros de altura y 1.20 metros de diámetro, tiene un fuste recto y cilíndrico; la corteza externa es de color verde petróleo, su ritidoma es coriáceo y predomina el color rojizo que se desprende periódicamente (Reynel et al., 2003). Asimismo, su inflorescencia tiene flores blancas, aromáticas y bisexuales. Su fruto alcanza tamaños entre 8 y 10 mm de longitud, es capsular oblonga dehiscente con tricomas dispersos. Sus semillas presentan alas en los extremos, y tienen entre 10 y 30 semillas por fruto, las dimensiones incluyendo el ala varían de 5 – 6 mm de largo, 1 a 2 mm de ancho y de 1 mm de altura (Flores, 2018); las semillas son dispersadas a lo largo de todo el río Amazonas y se asientan principalmente en suelos arcillosos, fértiles e inundados, la germinación de la semilla ocurre de 20 a 40 días después de la siembra, pero con baja germinación (Ugarte-Guerra y Domínguez-Torrejón, 2010). Respecto a sus hojas son simples, opuestas, glabras, subcoriáceas, pecioladas y penninervias, que miden de 9 a 17 cm de largo y de 6 a 7 cm de ancho. La floración dura de 2 a 4 meses (marzo a junio). La maduración de los frutos dura 3 a 5 meses y la diseminación de semillas empieza en agosto, pero alcanza su máxima intensidad en los meses de septiembre y octubre (Flores, 2018).

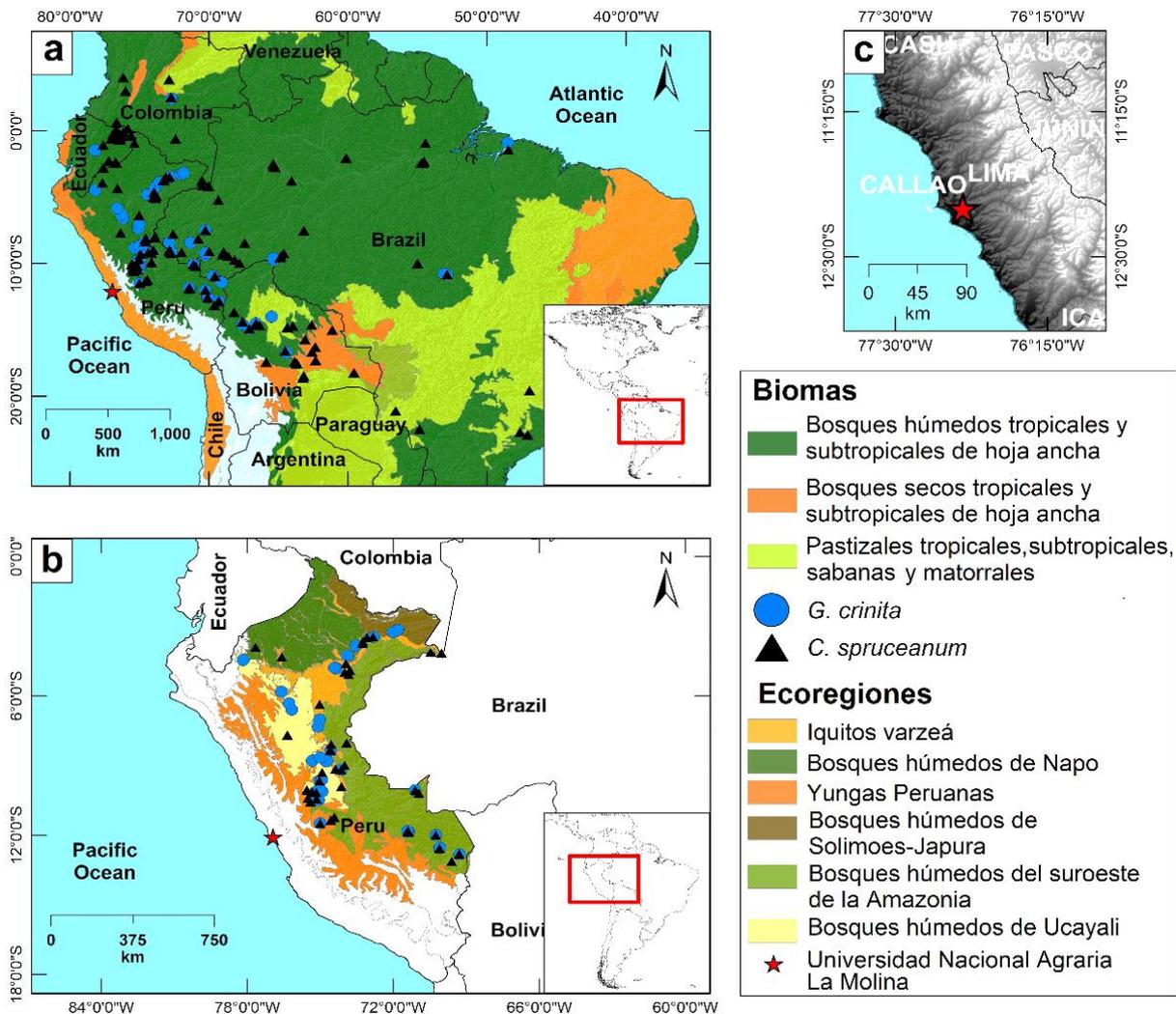


Figura 1. Puntos de presencia de árboles de *G. crinita* y *C. spruceanum* a través de los diferentes biomas de sur américa

Nota. a) Los árboles de *C. spruceanum* y *G. crinita* se encuentran distribuidos en América del Sur (Brasil, Perú, Colombia, Ecuador y Bolivia) mayormente en el bioma de bosques húmedos tropicales y subtropicales de hoja ancha, compuestas principalmente de árboles de hoja caduca semi perennes y perennes. Se caracterizan también por una baja variabilidad en la temperatura anual y altos niveles de lluvia (> 200 centímetros por año). b) En el Perú abarcan 6 ecoregiones de la selva. Teniendo mayor presencia en la región de Ucayali, Loreto y Madre de Dios. c) Ubicación de la Universidad Nacional Agraria La Molina, centro donde se llevó a cabo el experimento. Imagen propia.

G. crinita y *C. spruceanum* son especies maderables importantes para los sistemas agroforestales debido a que presentan una pequeña copa con ramas delgadas y son de rápido crecimiento (Montes y Weber, 1997). Entre 8 y 10 años le toma a *G. crinita* producir madera aprovechable, y su rebrote se utiliza sucesivamente, favoreciendo la economía de los agricultores (Labarta y Weber, 1998). *G. crinita* puede crecer hasta 3 m de altura por año, es por ello por lo que es ampliamente utilizada en programas de reforestación y sistemas agroforestales (IIAP 2009). Bolaina y Capirona, presentan un nicho ecológico similar en la región amazónica, que abarca Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Venezuela y Perú (Ugarte-Guerra y Domínguez-Torrejón, 2010) (Figura 1). En las zonas con mayor precipitación y suelos fértiles ambas especies muestran un desarrollo óptimo (Sotelo et al., 2006; Weber y Montes, 2005). Estas dos especies tienen preferencia por suelos arcillosos y arenosos con alto contenido de materia orgánica, pH 7 y saturación de aluminio inferior al 30%. Sin embargo, no crecen en suelos con pH muy ácidos (4 y 4.5) (Flores, 2019). Su establecimiento depende en gran medida de la dinámica del río, y a menudo se encuentran en playas de llanuras aluviales y claros de suelos arcillosos (Cornelius et al., 2011; Flores, 2019). En Brasil, *C. spruceanum* estaría prácticamente restringida a la región amazónica (Figura 1a), extendiéndose en la selva baja a lo largo río Amazonas (Russell et al., 1999; Weber et al., 2009). Asimismo, *G. crinita* es una especie pionera que coloniza la llanura aluvial y los bosques secundarios perturbados de la selva baja (por debajo de los 1,000 m de altitud) en la cuenca amazónica de Perú, Ecuador y Brasil (López et al., 1990; Rochon et al., 2007a). Respecto a la reproducción de *G. crinita* aún no se tiene información, pero se presume que es sexual por polinización cruzada, siendo un patrón en árboles tropicales (Muchugi et al., 2008).

Por otro lado, Bolaina y Capirona son apreciados por la utilidad de su madera en la fabricación de muebles, casas prefabricadas, enchapados, contrachapados, etc. *G. crinita* también es utilizada para la producción de pulpa de papel, y tiene un gran potencial en la fabricación de plásticos biodegradables. Por otro lado, estudios bioquímicos en *C. spruceanum* lo consideran como un árbol medicinal de gran interés para la industria farmacéutica principalmente por los componentes activos de su corteza (Torrejón et al., 2010). Farmacológicamente, *C. spruceanum* exhibe propiedades antioxidantes que ayudan a retrasar el envejecimiento celular y la fotoprotección ante radiación UV, asimismo tiene

propiedades inmunoestimulantes, antiinflamatorias, antileucémicas, antivirales y antisépticas (de Vargas et al., 2016; dos Santos et al., 2016). En general, la corteza de *C. spruceanum* se usa como cataplasma en el tratamiento de la inflamación y las infecciones por hongos, también se utiliza en la preparación de parches capaces de curar cortes, heridas, quemaduras, infecciones oculares, diabetes, enfermedades ováricas, gástricas y uterinas (de Vargas et al., 2016; dos Santos et al., 2016). En cosmetología, se usa en la preparación de champú para controlar la pérdida de cabello, así como en la preparación de cremas y humectantes para arrugas, manchas y cicatrices en la piel. Por tanto, la Capirona tiene un gran potencial para la industria farmacéutica y valorización de la biodiversidad (Guo et al., 2014) teniendo en cuenta que se aprovecha su madera y corteza.

2.3. Crecimiento de los árboles

2.3.1. Factores ambientales asociados al crecimiento de los árboles

Los factores ambientales limitantes como: temperatura, precipitación y radiación afectan directamente en los procesos del crecimiento de los árboles, ya que se encuentran relacionados con el ciclo del carbono, división celular, eficiencia fotosintética, etc. Actualmente, diversos investigadores estudian las interacciones de los patrones fisiológicos, genéticos (expresión génica de RNAm, etc.) y anatómicos (fibras, traqueidas, fibrotraqueidas, vasos, parénquima, anillos de crecimiento, etc.) con los factores edafoclimáticos (elevación, humedad, transpiración, radiación, pH, materia orgánica, NPK, etc.). Por ejemplo, en periodos secos algunas especies forestales entran en proceso de dormancia manteniendo inactivo el cambium vascular, este fenómeno protege al espacio intracelular de la pérdida hídrica y ayuda a delimitar los anillos de crecimiento. Asimismo, el xilema es un tejido conductor que transporta el agua largas distancia en los árboles, facilitando el transporte del agua dentro de la planta (Fonti et al., 2010). Las características del xilema (diámetro, longitud, frecuencia mm^2) fijan la cantidad hídrica a ser trasladado y excretado; sin embargo, existen procesos de vulnerabilidad en el transporte de agua (formación y propagación de embolias o burbujas), estos factores están asociados a las sequías y heladas (Lamarque et al., 2018; Tyree, 2016). La eficiencia del transporte de agua y la seguridad máxima contra la cavitación y embolias, frecuentemente se atribuye a los

conductos vasculares individuales o a las membranas de las perforaciones que conectan a los vasos (Fonti et al., 2010).

El crecimiento de las plantas también está determinado por procesos fisiológicos como la fotosíntesis, sirven como indicadores del crecimiento y desarrollo de la planta. Una mayor actividad fotosintética puede incrementar el crecimiento, mientras que altas intensidades de luz pueden convertirse en un factor de estrés por radiación limitando su desarrollo y generando procesos fisiológicos negativos como la fotoinhibición (Pires et al., 2018). En los bosques tropicales las plantas jóvenes tienden a someterse a procesos críticos respecto a la capacidad de aprovechamiento de la luz debajo del dosel. Por tanto, algunas plantas pioneras como Bolaina o Capirona tienden a establecerse en los claros para poder asimilar mejor la radiación solar y crecer más rápido (Neira, 2009; Pires et al., 2018).

Por ejemplo, la especie *Guazuma ulmifolia* Lam. que es evolutivamente cercana a *G. crinita* presenta una plasticidad fenotípica para adaptarse al ambiente, logrando tolerar y superar la luz excesiva a través de la aclimatación de sus hojas, las hojas jóvenes se adaptan a los cambios en la intensidad de la luz, mientras que las hojas maduras muestran una plasticidad mucho menor ya que las paredes celulares son rígidas y no se pueden realizar reordenamientos estructurales importantes (Anderson et al., 2017). Asimismo, los cambios temporales de la intensidad de la luz influyen e inducen a determinados ajustes en los rasgos anatómicos, morfométricos y de funcionamiento del aparato fotosintético (Pires et al., 2018). A mayores niveles de intensidad de luz se desarrollan hojas más gruesas y pequeñas, incrementándose las concentraciones de la enzima RuBisCO y el flujo de electrones. Las hojas expandidas tienen mayor tolerancia a las altas intensidades de luz, mientras que las hojas bajo sombra son más susceptibles a la fotoinhibición (Anderson et al., 2017). Para *G. ulmifolia* no se pudo determinar si la recuperación de la actividad fotosintética se debió al desarrollo de nuevas hojas aclimatadas a la luz intensa o la aclimatación de las hojas maduras preexistentes (Portes et al., 2010). Por lo tanto, es posible que la recuperación de la fotoinhibición esté relacionada con el desarrollo de nuevas hojas y no necesariamente con la aclimatación de las hojas preexistentes (Pires et al., 2018).

Es importante estudiar la dinámica de la actividad fotosintética ya que permite mejorar la comprensión de la fenología en los diferentes meses del año. Fréchette et al., (2020) mencionan que la temperatura es la restricción climática más importante para la fotosíntesis

en bosques boreales, mientras que en los bosques tropicales algunos árboles actualmente superan la temperatura fotosintética óptima (Leon-Garcia y Lasso, 2019). En consecuencia, un incremento de la temperatura puede producir cambios irreversibles en el aparato fotosintético (Tiwari et al., 2020). Sin embargo, las plantas pueden tolerar mejor un estrés hídrico dependiendo de la frecuencia, diámetro y longitud de sus elementos vasculares (Fonti et al., 2010) y plasticidad fotosintética del PSII y PSI (Leon-Garcia y Lasso, 2019), lo que permitiría predecir la vulnerabilidad de las plantas a la sequía y al incremento de las temperaturas.

2.3.2. Importancia de la Fotosíntesis en el desarrollo de las plantas

La biomasa de las plantas dependen en gran medida de la capacidad fotosintética y de la exportación de sacarosa desde las hojas hasta los órganos sumidero (ramas, tallos, raíces) a través del floema (Dominguez et al., 2020; Mahboubi y Niittylä, 2018). En varias especies arbóreas, la sacarosa es la forma predominante de carbón transportado (Dominguez et al., 2020; Mahboubi y Niittylä, 2018). Así, la xilogénesis está determinada en gran medida por las condiciones fisiológicas que conectan el sistema hidráulico y fotosintético que surge a partir de la absorción de agua e intercambio de CO₂ en la hoja (Chaves et al., 2002; Vandegheuchte et al., 2015). Durante la temporada de crecimiento la formación del xilema ocurre continuamente, donde las células y las características de los elementos vasculares son influenciados por los factores climáticos (Campelo et al., 2016; Rathgeber et al., 2019). No obstante, entender los cambios fotosintéticos es crucial para la adaptación de las plantas al cambio climático (Fonti et al., 2010; Song et al., 2010). En la actualidad, no existen estudios de fotosíntesis en *G. crinita* y *C. spruceanum*. Por eso, un fenotipado de las hojas podría ayudar a mejorar la comprensión de la fenología de la fotosíntesis en los diferentes meses del año (Ying et al., 2018; Portes et al., 2010; Tiwari et al., 2020). Así también, Frechette et al., (2019) mencionan que la temperatura es la restricción climática más importante para la fotosíntesis en bosques boreales, mientras que en los bosques tropicales algunos árboles actualmente superan la temperatura fotosintética óptima (Leon-Garcia y Lasso, 2019). Un incremento de la temperatura que genera estrés por calor puede producir cambios irreversibles en el aparato fotosintético (Huang et al., 2020; Krause et al., 2013), cuando se alcanzan temperaturas críticas se produce la rotura de la membrana, la fuga de electrolitos,

necrosis de las hojas y debido a eso se reduce la asimilación neta de carbono (Leon-Garcia y Lasso, 2019).

Sin embargo, para realizar óptimas mediciones y monitoreos en campo, se requiere un instrumento eficiente y práctico. En ese sentido, el equipo portátil PhotosynQ (<https://photosynq.org>) permite evaluar la actividad fotosintética de la fase lumínica y el estado de las plantas en pocos minutos (Kuhlgert et al., 2016). El PhotosynQ usa los fundamentos de la fluorescencia de la clorofila, y ayuda a tomar información del fotosistema I (PSI) y II (PSII), además de parámetros ambientales y características cualitativas de las plantas (Kramer, Johnson et al., 2004; Kuhlgert et al., 2016). La energía fotovoltaica absorbida por las clorofilas de las hojas puede ser utilizada para impulsar la primera etapa de la fotosíntesis (fotoquímica) en la obtención de ATP y NADPH, el exceso de energía se puede disipar en forma de calor, mientras que la fluctuación desconocida de energía es denominado PhiNO (Figura 2) (Kuhlgert et al., 2016; Osei-bonsu et al., 2020). El fotosistema II está involucrado en la oxidación del agua y el inicio del transporte de electrones, y se puede obtener información sobre la energía que se destina a la actividad fotoquímica (rendimiento cuántico, ϕ_{II}), disipación de la energía en forma de calor (extinción no fotoquímica, ϕ_{NPQ}), y disipación de forma no regulada (ϕ_{NO}) (Fernández-Calleja et al., 2020). Por otra parte, la extinción no fotoquímica (ϕ_{NPQ}) es un proceso importante en la fotoprotección de las plantas superiores ya que disipa el exceso de energía absorbida en forma de calor (Kanazawa y Kramer, 2002; Tietz et al., 2017), esto permite a las plantas tolerar y adaptarse a las condiciones de frío. Finalmente, debido a que los parámetros fotosintéticos de las plantas están intrínsecamente vinculados con variables climáticas, es importante conocer y predecir la relación del rendimiento fotosintético en función de las tasas de crecimiento.



Figura 2. Equipo MultispeQ que mide la fluorescencia de la clorofila en respuesta a pulsos de saturación de luz

Nota. Facilita la colecta de datos del fotosistema I y II (ϕ_{NPQ} , ϕ_{II} , ϕ_{NO}). El equipo MultispeQ se conecta vía Bluetooth con los celulares que tienen instalado el aplicativo PhotosynQ. Los datos se almacenan en la interfaz web (https://photosynq.org/users/sign_in), de esta forma se facilitan la sistematización de los datos, para los posteriores análisis estadísticos. Adaptado de Fernández-Calleja et al., (2020).

2.3.3. Importancia de la RuBisCO durante la fotosíntesis y en el desarrollo de las plantas

RuBisCO (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa - RbcL) es la enzima más abundante de la naturaleza y desempeña funciones esenciales en la entrada de carbono a la biósfera y en los procesos de fotorrespiración (Figura 3), se encuentra en la mayoría de los organismos autotróficos desde procariontas hasta eucariotas (Erb y Zarzycki, 2018; Whitney et al., 2011). Por la importancia de la RuBisCO, se estudia diversos aspectos sobre genética, biología estructural y molecular, bioquímica y evolución enzimática (Andersson y Backlund, 2008). Algunas investigaciones concuerdan en que la eficiencia de cualquier enzima RuBisCO se

encuentra en los detalles de su estructura tridimensional (relaciones estructura-función), una RuBisCO con mayor especificidad para CO₂ que para O₂ reduciría la fotorrespiración y su pérdida asociada de CO₂. Se prevé que esto sea de beneficio particular en (i) hojas sombreadas donde la fotosíntesis está principalmente limitada por el transporte de electrones y (ii) a temperaturas más altas donde la reacción de oxigenación se ve favorecida debido a su mayor energía de activación y la reducción de CO₂ (Marcus y Gurevitz, 2000).

De acuerdo con estudios evolutivos, la RuBisCO es una enzima clasificada en tres isoformas (I, II y III). Sin embargo, las propiedades estructurales y bioquímicas de estas enzimas aún no están bien claras, por ejemplo, la RuBisCO de las arqueas *Methanococoides burtonii* presentan una forma III, pero sus secuencias de aminoácidos son más próximas a una estructura II. La forma I de RuBisCO que se encuentra en las cianobacterias, las algas verdes y en las plantas inferiores y superiores es una holoenzima que consta de ocho subunidades grandes (RbcL) y ocho pequeñas (RbcS) (Andersson y Backlund, 2008; Erb y Zarzycki, 2018; Whitney et al., 2011).

Las diversas formas estructurales de la RuBisCO limitan nuestra comprensión de cómo las mutaciones pueden interferir con la función del sitio activo, incluso mutaciones aparentemente sutiles en RuBisCO pueden tener efectos funcionales dramáticos (Whitney et al., 2011). A pesar de la variabilidad de la secuencia de aminoácidos dentro de la familia RuBisCO, los residuos clave del sitio activo, química catalítica y procesos de activación están conservados, además hay patrones comunes en el pliegue de su estructura en plantas superiores. Contrario a ello, las Cianobacterias presentan mayor disparidad entre la secuencia y la relación estructural con otras isoformas de RuBisCO (Erb y Zarzycki, 2018).

Los análisis filogenéticos de las secuencias de RuBisCO LSU indican que ciertas estructuras divergen evolutivamente, este es el caso del arroz respecto a otros clados donde se encuentran plantas como la espinaca, guisantes y tabaco (34–67%), asimismo, los estudios mencionan que la estructura de RbcL de *A. thaliana* LSU filogenéticamente es distinto a la RuBisCO del arroz, a pesar de que la RuBisCO exhibe la mayor similitud estructural entre sí. A pesar de las diferencias en la secuencia de aminoácidos primaria de RuBisCO, las comparaciones estructurales indican que la estructura secundaria general de la LSU en las diversas holoenzimas está altamente conservada, lo que es consistente con estudios previos (Andersson y Backlund, 2008). La comprensión actual del cambio conformacional de la

RuBisCO se limita a las diferencias estructurales observadas en las estructuras por cristalografía. La naturaleza dinámica de las proteínas RbcL todavía es poco conocida. Sobre todo las redes dinámicas y el patrón de los movimientos de dominio correlacionados, los cuales son fundamentales en la mediación del reconocimiento de sustratos y la regulación alostérica (Hermida-Carrera et al., 2017; Renault et al., 2019).

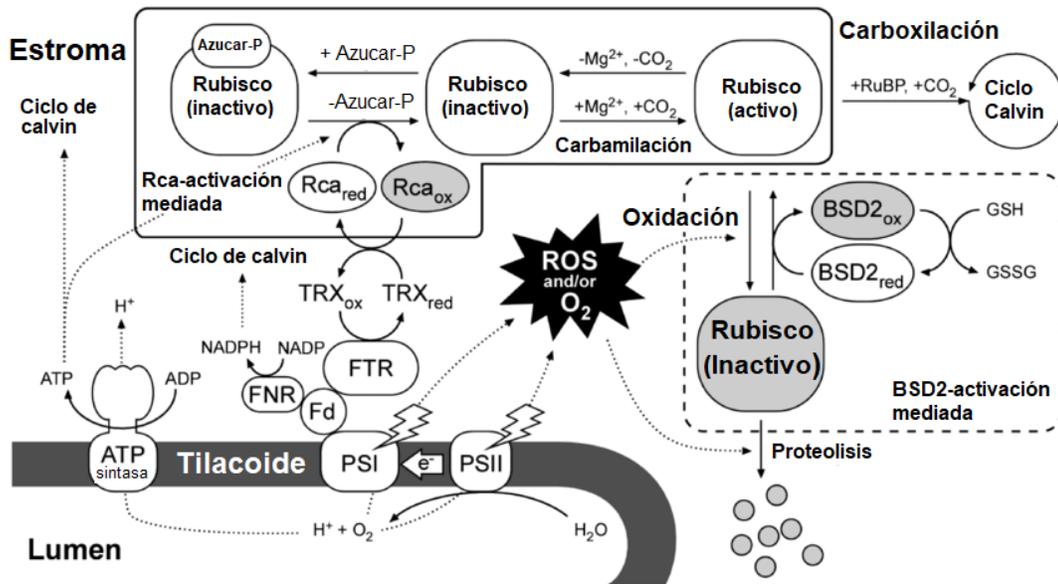


Figura 3. Regulación Redox de la actividad de RuBisCO en el cloroplasto

Nota. En la primera etapa de la fotosíntesis, la energía fotovoltáica es regulada por el fotosistema I (PSI) y II (PSII) y permite obtener ATP y NADPH. Posteriormente en la segunda etapa la coenzima NADPH desempeña un rol importante en la fijación del dióxido de carbono de la fotosíntesis. Asimismo, la enzima RuBisCO cataliza el paso inicial importante, que permite la fijación del dióxido de carbono a una forma orgánica de carbohidrato. GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado, Fd: ferredoxina, FNR: ferredoxina-NADP reductasa, FTR: ferredoxina-TRX reductasa, RuBP: ribulosa-1,5-bisfosfato. Adaptado de Tominaga et al., (2020).

2.3.4. Genómica y transcriptómica en árboles tropicales.

La "genómica" es comprendida como el desarrollo y aplicación de enfoques experimentales sobre el genoma para evaluar la estructura, función, evolución y mapeo del gen. El área forestal entró en la era genómica a principios de la década de 1990, y en el 2004 se publicó

la secuencia completa del genoma de *Populus trichocarpa* (López y Vázquez-Poletti, 2016). Una investigación sobre "ISI Web of Knowledge" realizada por Abril et al., (2011) mostró que entre 1990 y 2010 todos los árboles tenían solo 25,200 artículos relacionados con la biología molecular en comparación con *Arabidopsis*, *Saccharomyces* y Humanos, cada uno con hasta 100,000 publicaciones, respectivamente.

Actualmente, las tecnologías modernas de secuenciación, ensamblaje y anotación de genomas de árboles maderables están facilitando los estudios de caracterización funcional de genes, redes de coexpresión y de regulación genética relacionada con la biología de los árboles (Ouyang et al., 2016), además facilita la comparación genómica, estudios y aplicaciones de asociación de genoma completo (GWAS) entre diferentes especies arbóreas (Vlk y Řepková, 2017). Consecuentemente, la genómica comparativa aumentará nuestra comprensión de cómo estos genomas de árboles altamente dinámicos han evolucionado y dado como resultado la diversidad fenotípica que se encuentra entre y dentro de las especies (Grattapaglia et al., 2009; Mizrachi et al., 2010; Parent et al., 2015).

Al mismo tiempo, la "transcriptómica cuantitativa por medio de RNA-seq" permite una amplia comprensión de la expresión génica en órganos y tejidos de los árboles, (Grattapaglia et al., 2009; Plomion et al., 2011), además permite evaluar la expresión diferencial de genes en condiciones ambientales contrastantes (Wang et al., 2009), detectar nuevos genes, variantes de empalme (Ci et al., 2019), también es una buena estrategia para mejorar la secuenciación y la anotación de genomas (Neale et al., 2014; Revealed et al., 2014). Los estudios centrados en la cobertura profunda del ARNm permitieron descubrir ARN no codificantes, como los microRNA, lincRNA (ARN reguladores no codificantes de larga intervención). Sin embargo, aún hay grandes retos bioinformáticos derivados de las secuencias de ARN en los árboles forestales para obtener resultados biológicos sólidos (Rhoads y Au, 2015). Por ejemplo, el tamaño de los genomas, la poliploidía de ciertas especies y la ausencia de genomas de referencia (Claros et al., 2012).

Hasta el momento, entre las gimnospermas las especies más estudiadas pertenecen a la familia Pinaceae con 74 estudios y Cupressaceae (18 estudios), mientras que en las angiospermas son las familias Salicaceae, Rosaceae, Fabaceae y Fagaceae (Figura 4) (López y Vázquez-Poletti, 2016), aún quedan muchas especies de gran interés que estudiar y dentro de ellas se encuentran *G. crinita* y *C. spruceanum*.

Por último, el progreso de la genómica de especies forestales junto con herramientas biotecnológicas disponibles para el análisis estructural y funcional de estos genomas promete grandes saltos en las próximas décadas (Pavy et al., 2008).

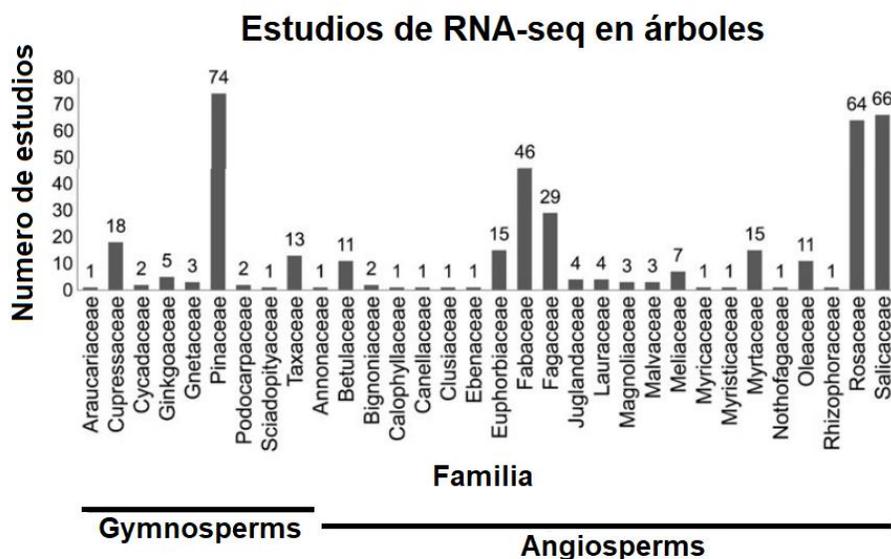


Figura 4. Estudios de RNAseq realizados en árboles.

Nota. El género más estudiado es Pinaceae con 74 especies estudiadas a la fecha. En el grupo de las Angiospermas, los géneros más estudiados son las Rosaceae, Salicaceae y Fabaceae. Adaptado de López y Vázquez-Poletti (2016).

2.3.5. Secuenciación de ARN y perfiles transcripcionales de xilema secundario

Es esencial obtener perfiles transcripcionales de la zona del cambium para encontrar unigenes involucrados en la biosíntesis de lignina y celulosa (Wei et al., 2013). Mizrachi et al., (2010) obtuvieron el perfil transcripcional de tejidos xilogénicos de eucalipto por RNAseq, y Bao et al., (2013) obtuvieron el transcriptoma de xilema de *Populus trichocarpa*, lo que significa una información invaluable y un gran valor científico forestal, un hecho que ha aportado un gran conocimiento para el análisis de la producción de biomasa a partir de madera de eucalipto y otras especies de árboles, así como análisis del crecimiento y desarrollo de tejidos lignificados. Posteriormente, Bai et al., (2011) por medio de RNAseq identificaron factores de transcripción expresados en el floema del árbol *Fraxinus* spp. involucrados en la defensa de las plantas, así como quinasas y lipoxigenasas dependientes de calcio. Así también, Bai et al., (2011) estudiaron especies nativas del género *Fraxinus* que tienen variaciones en la

resistencia de los insectos, reportando unigenes involucrados en la producción de compuestos asociados con esta resistencia en el xilema secundario y floema. Finalmente, Marques et al., (2013) encontraron en el transcriptoma de tejidos lignificados de eucalipto, factores de transcripción SHINE involucrados en la síntesis de la pared celular, descubiertos recientemente en *A. thaliana*, observando la expresión diferencial de los genes SHINE *Egr33m* y *Egr40m* en el xilema de los árboles adultos, lo que indica la duplicación génica de *EgrSHN* en eucalipto.

2.3.6. Vías moleculares que regulan la biosíntesis lignina, celulosa y hemicelulosa

La madera es un producto renovable importante en la tierra, regula el ciclo del carbono dentro de los ecosistemas mitigando las emisiones de CO₂ (Rathgeber et al., 2019). Por tanto, es importante entender como las variables ambientales (temperatura, humedad, radiación, precipitación, etc.) afectan la expresión génica (Sundell et al., 2017). Por otro lado, el desarrollo de los árboles es el resultado de la división y expansión celular en los meristemas apicales y cambiales (Rathgeber et al., 2019). Como producto se obtiene la madera que viene a ser el soporte mecánico de los árboles, el tejido leñoso que la constituye forma parte de su sistema vascular, y es capaz de reaccionar a los estímulos ambientales, siendo bastante receptivos y presentando una plasticidad anatómica (Camel et al., 2019).

La madera es el término usado para describir el xilema secundario, un tejido específico del sistema vascular que está compuesto de celulosa (50%), lignina (25%), hemicelulosa (25%), proteínas y ácidos fenólicos (Javier-Astete, 2021). Para la formación de la madera tiene que haber división celular, expansión celular, síntesis de pared secundaria, muerte celular programada (MCP), y formación de vasos y traqueidas (Campelo et al., 2016; Cruz-García et al., 2019; Huang et al., 2020). Algunos investigadores vienen estudiando a nivel molecular los sistemas complejos de interacciones moleculares (redes de regulación genética), estas redes están formadas por proteínas, ácidos nucleicos y otros reguladores, que interactúan entre sí para controlar la expresión de los genes asociados a la síntesis de celulosa, hemicelulosa, lignina, etc. en respuesta a diferentes señales y condiciones ambientales (Xu et al., 2022). Dentro del grupo de las proteínas, actualmente se conocen 58 familias de FTs en plantas (Naika et al., 2013), de las cuales algunos de ellos cumplen funciones específicas como la formación del xilema secundario (Brown et al., 2005; Olins et al., 2018; Zhao y

Bartley, 2014), procesos de diferenciación celular, regulación de vías metabólicas secundarias (fenilpropanoides, flavonoides, isoflavonoides, etc.), muerte celular programada, etc. Dentro de las familias más relevantes se encuentran AP2, MYB, NAC, bHLH, ERF y ARF, de las cuales las proteínas MYB presentan dominios compuestos por dos regiones de ~50 aminoácidos. Estas regiones forman tres alfa hélices que les permite unirse al ADN de forma estable (Arratia y Aguirre, 2013). Asimismo, presentan secuencias repetidas imperfectas (R1, R2 y R3) en esta región. Cada una de estas secuencias repetidas contiene tres residuos de triptófano, lo que ayuda formar un centro hidrofóbico en el plegamiento tridimensional hélice-giro-hélice de cada región repetida (Stracke et al., 2001). De acuerdo a varios estudios, se reporta que los factores de transcripción MYB están vinculados a la formación y diferenciación del xilema, biosíntesis de lignina en la pared celular (McCarthy et al., 2009; Zhong y Ye, 2012), siendo un caso el estudio de la sobreexpresión de los genes *AmMYB308* y *AmMYB330* de *Antirrhinum majus* en tabaco evidenciándose que estos genes generan la disminución del ácido hidroxicinámico y acumulación de monolignoles con una reducción del 17% de lignina en xilema secundario (Tamagnone et al., 1998). También, se sabe que las familias NAC y MYB activan redes de regulación transcripcional y expresión de genes implicados en la biosíntesis de la pared celular secundaria (Figura 5), como los FTs PtrMYB2, PtrMYB4 (*Populus trichocarpa*) (Tang et al., 2015; S. Wang et al., 2014) y EgMYB2 (*Eucalyptus grandis*), que funcionan como reguladores maestros durante la formación de madera.

Por otra parte, los factores de transcripción NAC (NAM, ATAF y CUC) son específicos de plantas y están involucrados en el desarrollo y la diferenciación de los elementos traqueales y la formación de madera durante las estaciones (Sakamoto et al., 2016). Experimentos realizados usando los genes VND2 y VND3 demostraron que están involucrados en la tasa de diferenciación de las células del metaxilema (Ramachandran et al., 2021), el gen *ANAC022* promueve el crecimiento en los tejidos meristemático radiculares y confieren tolerancia al estrés abiótico y actúa como un activador de la transcripción para mediar en la señalización de auxina (Xie y Ding, 2022). El gen *AtANAC029* regula la transcripción de genes implicados en la respuesta molecular frente al estrés de alta salinidad, incrementando su transcripción bajo señales de estrés hídrico (Carrillo-Bermejo et al., 2020); mientras que *AtANAC058* se identificó como modulador de la germinación y es mediado por ABA (Coego

et al., 2014). En ese sentido, los FTs NAC pueden desempeñar funciones sinérgicas o antagónicas en la formación de la madera y las respuestas al estrés abiótico (Li et al., 2016; Li et al., 2012).

Por otro lado, los FTs GATA constan de dos hojas antiparalelas seguidas de una α -hélice y una cola básica no estructurada (Lowry y Atchley, 2000; Teakle et al., 2002). La expresión diferencial de los genes GATA influye en el metabolismo del carbono y el nitrógeno, el crecimiento vegetativo, la síntesis de clorofila, el tamaño del cloroplasto y la eficiencia fotosintética (Lowry y Atchley, 2000; Teakle et al., 2002). Un estudio de *A. thaliana* reveló que la expresión de FTs GATA de algunos miembros varía con la luz, la oscuridad y cambios en el ritmo circadiano (Reyes et al., 2004; Teakle et al., 2002).

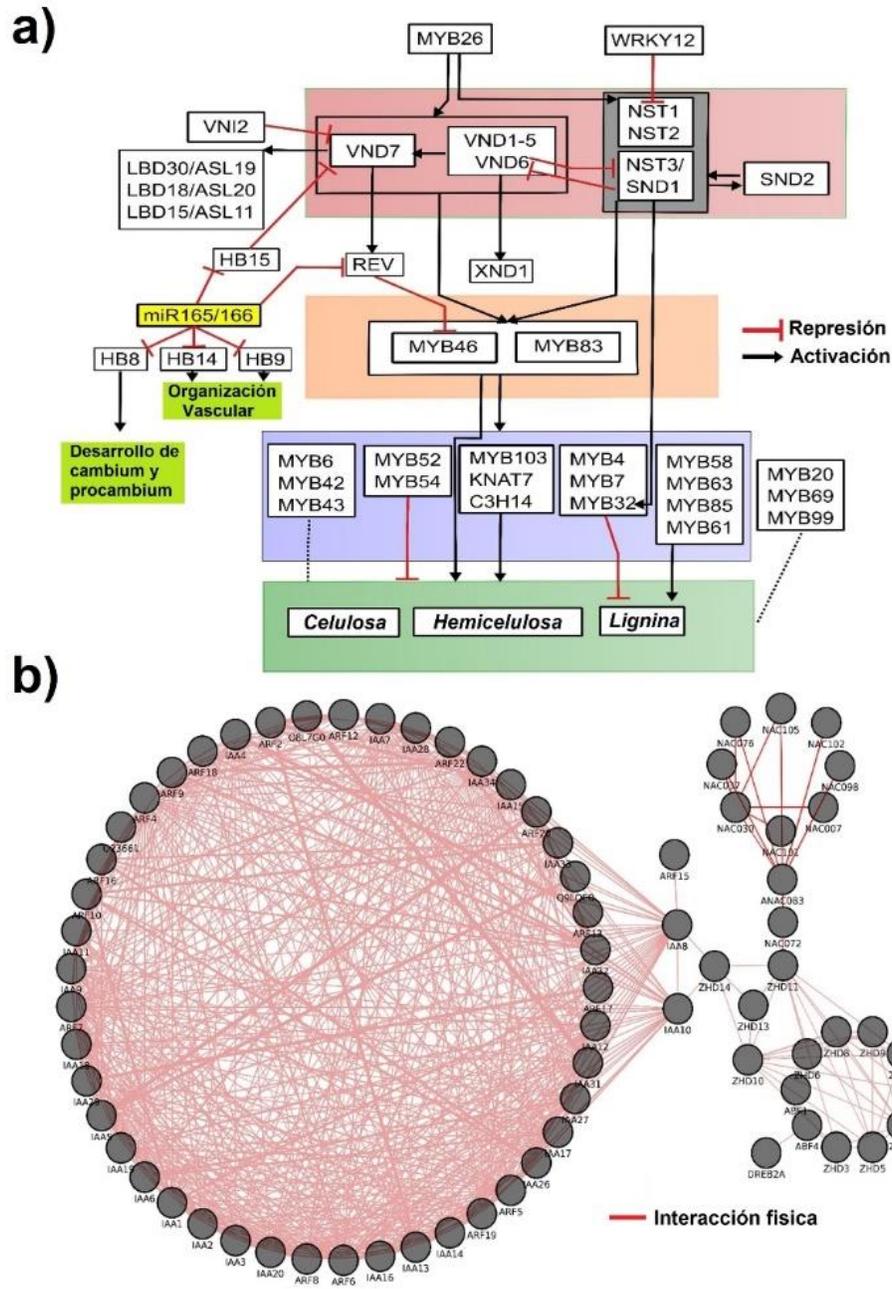


Figura 5. Redes de regulación e interactómica de factores de transcripción asociados a la formación de xilema secundario

Nota. a) Redes de regulación genética de factores de transcripción (FT) de *A. thaliana* implicados en la biosíntesis de celulosa, hemicelulosa y lignina. **b)** Redes de interacciones físicas entre factores de transcripción de *Arabidopsis*; vía de regulación de FTs ABA, NAC y MYB. Adaptado de Camel y Galeano (2021).

Los genes involucrados en la formación de madera y la biosíntesis de carbohidratos son candidatos para tener variantes que afecten las propiedades de la madera (Cao et al., 2020; Matias y Oliveira, 2019), por lo tanto, son útiles para los programas de mejoramiento genético de árboles. Dentro de las proteínas asociadas a síntesis de la madera la cinnamil alcohol deshidrogenasa (CAD), es la segunda enzima reductora en la vía fenilpropanoides, la lignina es el producto final de la vía del fenilpropanoides, siendo la familia de la enzima CAD las que están implicadas en la catalización de aldehídos de cinnamil en alcoholes de cinnamil (Barakat et al., 2009; Sibout et al., 2005). En la ruta de fenilpropanoides y monolignoles también se encuentra varias enzimas relacionadas con el depósito ectópico de la lignina como: phenilalanina amoniaco-liasa, cinamato 4-hidroxilasa, 4-Hidroxicinamoil CoA ligasa, Hydroxycinnamoyl-CoA: shikimate / quinate hydroxycinnamoyl transferase, *p* - Cumamarato 3-hidroxilasa, Cinnamoyl CoA reductasa, Ferular 5-hidroxilasa -, Ácido cafeico O- metiltransferasa, quitinasas y lacasas (Emiliani et al., 2011).

Por otro lado, las enzimas celulosa sintasa (CesA) sintetizan la celulosa; por lo tanto, los genes *CesA* juegan un papel central en el desarrollo de las plantas y afectan el rendimiento y la calidad de la madera, propiedades esenciales para aplicaciones industriales de biomasa vegetal (Slabaugh et al., 2014). Estudios recientes informaron que las plantas superiores tienen múltiples genes *CesA* que comparten una estructura conservada (Hermans et al., 2010; Xiong et al., 2013). En el genoma de *A. thaliana* se reportó 10 miembros de la familia de genes *CesA* (Beeckman et al., 2002). En *P. trichocarpa* se han identificado 18 genes *CesA* y cinco de ellos muestran una expresión significativa en el desarrollo de tejido de xilema sometido a un engrosamiento secundario de la pared celular (Abbas et al., 2019). Para manipular efectivamente la biosíntesis de la madera en los árboles y mejorar la calidad de la madera, necesitamos tener una mejor comprensión en los mecanismos de expresión de los diferentes genes *CesA* (Eckardt, 2003).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Caracterización intra-anual de los rasgos fenotípicos y fotosintéticos de las plantas de *C. spruceanum* y *G. crinita*

3.1.1. Especie de estudio y condiciones de crecimiento

El estudio se desarrolló con 2 especies de árboles maderables de rápido crecimiento, *C. spruceanum* y *G. crinita*. Por cada especie se adquirieron 300 plantas de 6 meses del vivero Ayahuasca Ecolodge EIRL, Región Ucayali, Perú. Posteriormente las plantas fueron trasladadas y establecidas en viveros de la Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú. *G. crinita* se estableció durante todo el experimento en un vivero cubierto por mallas raschel del 70 % de interferencia de radiación, según Paredes et al., (2010) a estas condiciones se garantiza las mejores condiciones de temperatura, humedad relativa y luminosidad para la adaptación de las plantas de Bolaina. En el caso de *C. spruceanum* se estableció en un vivero con 50 % de interferencia de luminosidad como en estudios previos de Abanto-Rodriguez et al., (2016). En ambas especies se seleccionaron y codificaron 50 individuos de acuerdo con sus características fenotípicas (diámetro y altura de tallo, fuste recto, hojas saludables, etc.) y buen estado fitosanitario, luego se plantaron en macetas de 12 L que contenían tierra agrícola, materia orgánica y vermiculita en una proporción 3:2:1 respectivamente, el riego fue constante durante todo el experimento para evitar estrés hídrico.

3.1.2. Evaluación de crecimiento y fisiología de *C. spruceanum* y *G. crinita*

El monitoreo del crecimiento y parámetros fisiológicos para las dos especies fue por un año (setiembre 2019, agosto 2020). La medición del diámetro del tallo a la altura del suelo fue con un vernier (2 mediciones Este-Oeste y Norte-Sur), asimismo se tomaron datos de la altura total, número de hojas, largo y ancho de hojas. La medición de los parámetros fotosintéticos

fue de 2 veces al mes, en un rango diurno de 11 am a 2 pm. Para *G. crinita* se tomó en cuenta la tercera hoja de la parte superior del tallo, mientras que en *C. spruceanum* fue la segunda. Los parámetros de fotosíntesis fueron medidos utilizando el equipo MultispeQ (<https://www.photosynq.com/>) que incluyen: Rendimiento cuántico del Fotosistema II (Φ_2); Rendimiento de extinción no fotoquímica (Φ_{NPQ}); Rendimiento de disipación de energía no regulada (Φ_{NO}); Flujo lineal de electrones (LEF), tasa de estado estacionario del flujo de protones a través de la ATP sintasa del cloroplasto (gH^+); Conductividad de protones de la ATP sintasa del cloroplasto (vH^+), magnitud total de la disminución de ECS (desplazamiento electrocrómico) durante una transición de luz a oscuridad (ECSt_tAU); Contenido relativo de clorofila (RC) y otros parámetros obtenidos por el aparato MultispeQ y que se consideran en la Tabla 1. Las variables climáticas (temperatura, humedad y radiación) se registraron por los sensores establecidos en la estación Von Humboldt, ubicado en la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Tabla 1. Abreviación de las variables fotosintéticas obtenidas por el equipo MultispeQ

brevisión	Definición	Unidades
PSI	Fotosistema I	--
PSII	Fotosistema II	--
ECSt_tAU	Magnitud total de ECS (cambio electrocrómico) decaimiento durante una transición luz-oscuridad	--
gH^+	Tasa de estado estacionario del flujo de protones a través del cloroplasto ATP sintasa	--
vH^+	Conductividad de protones de la ATP sintasa del cloroplasto	--
Φ_2	Rendimiento cuántico del Fotosistema II	--
Φ_{NPQ}	Rendimiento de enfriamiento no fotoquímico	--
qL	Fracción de centros del Fotosistema II que están en estado abierto	--
NPQ	Apagado no fotoquímico (estimación de la tasa de energía luminosa perdida como calor por PSII)	--
NPQt	Apagado no fotoquímico	--
Φ_{NO}	Rendimiento de disipación de energía no regulada	--
Fv/Fm	Máxima eficiencia cuántica del fotosistema II	--

Rfd	Relación de disminución de la fluorescencia de la clorofila	--
PAR	Radiación fotosintéticamente activa	$\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ $\mu\text{mol electrons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
LEF	Flujo Lineal de electrones	
RC	Contenido relativo de clorofila	%
LTD	Temperatura diferencial de Hoja	
LT	Temperatura de hoja	$^{\circ}\text{C}$
Di	Incremento diametral	mm
Hi	Incremento de altura	cm

3.1.3. Plasticidad fotosintética y anatómica a través del dosel de árboles de *G. crinita* y *C. spruceanum*

Para evaluar la relación entre el rendimiento cuántico (Φ_2) y el ancho de lumen a través del tallo, fueron seleccionados 15 árboles fenotípicamente similares y en buen estado fitosanitario por cada especie, luego seccionamos al dosel en tres partes (superior, medio e inferior), seguidamente se identificaron y codificaron 2 hojas por cada sección y se monitorearon sus rasgos fotosintéticos por un periodo de tres meses (abril 2020 a junio 2020). Al finalizar las mediciones de fotosíntesis se colectaron de cada árbol 3 pedazos de tallo (superior, medio e inferior) para su evaluación anatómica. Para ello los tocones fueron ablandados en una solución 1:1 de alcohol y glicerina. Luego utilizando un micrótopo se realizó cortes histológicos transversales de 10 μm a 25 μm . Los cortes histológicos fueron deshidratados durante 30 segundos en concentraciones de alcohol al 75, 50 y 35 %, luego se lavaron las muestras en agua destilada y se sumergieron en safranina. La captura de las imágenes transversales fue usando un microscopio (Motic MODELO Panthera). Posteriormente, se utilizó el *software* ImageJ (<http://imagej.net/Downloads>), para medir el diámetro de lumen y la frecuencia de fibras por mm^2 .

3.1.4. Análisis de datos

En ambas especies todos los análisis estadísticos de datos fisiológicos y de crecimiento se realizaron aplicando modelos lineales generalizados mixtos (GLMM). Dado que la distribución de los datos estaba sesgada positivamente, ajustamos los GLMM con la familia

Gamma y el enlace "log". Se utilizaron las pruebas post hoc de Tukey para evaluar las diferencias mensuales de los parámetros fotosintéticos (Phi2, PhiNO y PhiNPQ), y de crecimiento (número y tamaño de hojas, incremento diametral y altitudinal) en un año. Para tener en cuenta la posible falta de independencia de los parámetros evaluados, incluimos al mes de medición como un factor aleatorio (Bolker et al., 2009). Así también, evaluamos los cambios fotosintéticos (Clorofila, EST_tAU, gH⁺, vH⁺, Phi2, PhiNO, PhiNPQ Y NPQ) en tres secciones del dosel del árbol (superior, media e inferior) en ambas especies.

Finalmente, para evaluar los predictores de la estructura de las dos especies utilizamos un enfoque de inferencia de múltiples modelos. El incremento diametral y longitudinal de los tallos de *G. crinita* y *C. spruceanum* fueron considerados como variable respuesta asociada al incremento de biomasa. En el modelo se consideró como variable predictora a la temperatura, humedad, tamaño de hojas, número de hojas y los parámetros fotosintéticos como posibles predictores de la estructura. Basándonos en el criterio de información de Akaike (AIC), clasificamos los modelos del mejor al peor y consideramos el conjunto de modelos con $\Delta AICc < 4$ (Burnham y Anderson, 2002). Todos los análisis se realizaron utilizando el *software* R-Project (R Development Core Team, 2015); para el GLMM usamos el paquete lme4 (efectos y lmerTest) (Bates et al., 2015), paquete MuMIn para la inferencia multimodelo (Bartón, 2012), paquetes investr (Greenwell y Schubert, 2014) y ggplot2 (Wickham y Chang, 2016), y para las series de tiempo el paquete plyr.

3.2. Evolución estructural de las isoformas de RuBisCO

3.2.1. Clasificación de las isoformas de RuBisCO

Los códigos de las proteínas de RuBisCO (1RLC, 4RUB, 4HHH, 1GK8, 4LF1, 3A12) fueron usadas para buscar estructuras homologas usando BLAST (Altschul et al., 1990), seguidamente las diferentes estructuras de RuBisCO determinadas por cristalografía fueron descargadas de la base de datos RCSB PDB (Berman et al., 2000) utilizando el paquete Bio3D (Grant et al., 2021; Skjaerven et al., 2014). Se usó un límite de identidad de secuencia del 70 % según Kalenkiewicz et al.,(2015) para aislar estructuras de las isoformas I, II y III, de ese modo se descargaron 64 estructuras cristalinas de la sub unidad RbcL de RuBisCO,

sin embargo, se eliminaron las estructuras redundantes con residuos de aminoácidos perdidos. Esto produjo un conjunto de 46 estructuras PDB únicas. Las estructuras incluyen RbcL de tipo salvaje y mutantes en proteobacterias y arqueas. Las secuencias de aminoácidos de las 46 cadenas diferentes se alinearon utilizando el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004). Luego, todas las conformaciones se superpusieron estructuralmente entre sí mediante el ajuste por mínimos cuadrados de las coordenadas cartesianas de átomos C- α equivalentes al dominio C-Terminal, ya que se encontró que este dominio presenta regiones estructuralmente más invariantes. Se utilizó el análisis de componentes principales (PCA) para evaluar las relaciones entre los conformadores en el conjunto de estructuras superpuestas. Se ha demostrado previamente que esta técnica es una herramienta valiosa para evaluar las distribuciones de estructuras experimentales y compararlas con las conformaciones obtenidas mediante simulaciones MD (Kalenkiewicz et al., 2015; Skjaerven et al., 2014).

3.2.2. Selección de estructuras de RuBisCO y análisis filogenético

En función del análisis de componentes principales, se seleccionaron estructuras de RbcL Wt y mutantes de organismos modelo con una resolución $\leq 2.7 \text{ \AA}$ (Blow, 2002; Yu-Feng, 2007), que no presenten residuos de aminoácidos perdidos, y que la estructura cristalizada sea ≥ 95 % de la proteína (RbcL) total en las tres isoformas (I, II, III). Para clasificar evolutivamente a la RbcL de *G. crinita*, *C. spruceanum* y las estructuras seleccionadas, se desarrolló un árbol filogenético siguiendo los pasos presentados por Kacar et al., (2017), se hizo uso del servicio web PhyloBot (Hanson-Smith y Johnson, 2016), utilizamos 137 secuencias de proteínas de RuBisCO incluyendo las secuencias proporcionadas por Kacar et al., (2017) y las secuencias de las estructuras de RuBisCO seleccionadas, incluyendo *G. crinita* y *C. spruceanum*. Los ortólogos de la familia RuBisCO se identificaron mediante la herramienta NCBI BLAST (Altschul et al., 1990). Con 137 secuencias seleccionadas, se infirieron alineamientos de secuencias múltiples utilizando el algoritmo MSAProbs (Liu et al., 2010) y MUSCLE (Edgar, 2004) con la configuración predeterminada. Los dos alineamientos se ajustaron mejor al modelo PROTCATWAG (Lartillot y Philippe, 2004; Le y Gascuel, 2008). La inferencia filogenética de máxima verosimilitud (ML) (Yang, 1996) fue ejecutada usando el servicio web RAXML (Kozlov et al., 2019). Posteriormente exportamos la filogenia ML al servicio web PhyML (Guindon et al., 2010), con el fin de calcular el soporte estadístico para

las ramas como razones de probabilidad aproximadas. Se utilizó secuencias de la familia del grupo IV como el grupo externo para enraizar el árbol (Kacar et al., 2017). El gráfico final de la filogenia fue desarrollado usando el *software* Mega6 (Tamura et al., 2013).

3.2.3. Dinámica molecular

Los modelos de simulación se basaron en las estructuras cristalográficas de alta resolución de las subunidades RbcL de RuBisCO, fueron seleccionados 6 estructuras de la isoforma I (código PDB: 1WDD, 4RUB, 5IU0, 1IWA, 1GK8 y 6FTL), 3 de la isoforma II (código PDB: 4LF1^{WT}, 5HAN y 5HJX) y 3 de la isoforma III (código PDB: 3A12^{WT}, 3KDO y 3WQP). Para los respectivos modelos se eliminaron las moléculas de agua y monómeros. Los residuos de aminoácidos faltantes en todas las estructuras fueron completados utilizando el *software* MODELLER versión 10.0 (Accelrys, San Diego, CA, USA) (Webb y Sali, 2016), se generó un total de 100 modelos basados en la alineación *target-template* (Siqueira et al., 2016). El refinamiento automático de bucle se utilizó después de la construcción del modelo, los modelos se generaron satisfaciendo las restricciones espaciales tales como longitudes de enlace, ángulos de enlace, ángulos diedros e interacciones entre residuos no enlazados. La calidad estereoquímica del modelo se evaluó mediante un gráfico de Ramachandran generado en el servidor MolProbity (Williams et al., 2018). La calidad del plegado se determinó mediante Verify3D (Bowie et al., 1991; Luthy et al., 1992).

La simulación de dinámica molecular se realizó usando el *software* GROMACS2020 versión GPU (Abraham et al., 2015). Se utilizó el módulo PDB2GMX para generar la topología que contenía la información sobre los parámetros no enlazados (tipos de átomos y cargas) y los parámetros enlazados (enlaces, ángulos y diedros) dentro de la simulación. El campo de fuerza CHARMM36 (Huang y MacKerell, 2013) fue elegido para las simulaciones de todos los sistemas de RuBisCO siguiendo estudios similares (Ahrari et al., 2019; Faulkner et al., 2020a; Salmas et al., 2016). Se aplicaron condiciones de contorno periódicas (PBC) en todas las direcciones de una caja cúbica con un tamaño lateral de 10 Å. Los sistemas se solvataron con el modelo de agua TIP3P (Tamura et al., 2013). Luego el sistema se neutralizó agregando iones de Na⁺ como en estudios previos (Guinot, 2016; Siqueira et al., 2016). Para minimizar la energía de todos los sistemas, se utilizó el algoritmo de pasos descendentes con 50000

pasos y con una búsqueda de energía menor a 1000 kcal/mol. Utilizamos el conjunto isotermodisobárico con dos fases de equilibrio para simular los sistemas a condiciones fisiológicas celulares. La primera fase de equilibrio se ejecutó con un conjunto NVT con una temperatura igual a 300 K mantenida constantemente con un termostato Berendsen. La segunda etapa de equilibrio se ejecutó con un conjunto NPT a una presión de 1 bar durante 2 ns utilizando el baróstato Parrinello-Rahman. La simulación se realizó durante 50 ns de tiempo de producción con pasos de integración de 2 fs, bajo condiciones de presión y temperatura constantes, utilizando el algoritmo de integración Leap-frog. El algoritmo LINCS se utilizó para restringir todos los enlaces durante el equilibrio (Hess et al., 1997), el algoritmo de malla de partículas de Ewald se utilizó para interacciones iónicas de largo alcance. Para desarrollar los análisis de PCA y DCCM en el paquete Bio3D seguimos las recomendaciones de Yu y Dalby (2020), el cambio de formato de archivo xtc a dcd fue utilizando el *plugin* CatDCD del *software* VMD (Humphrey et al., 1996), mientras que la edición de imágenes fue mediante Pymol (Schrodinger, 2010).

3.2.4. Análisis de estabilidad y flexibilidad

El RMSD (Raíz de la desviación cuadrática media) se utilizó para medir las desviaciones entre la columna vertebral de la proteína desde su conformación estructural original hasta su conformación estructural final. La estabilidad de la proteína podría evaluarse por la desviación producida durante la simulación. Las flexibilidades de dos sistemas fueron evaluadas por RMSF y RMSD por residuo. El RMSF sirvió para medir la movilidad promedio de los átomos de la columna vertebral ($C\alpha$) durante la simulación de MD. El RMSD por residuo podría determinar el grado de desviación estructural de la proteína en relación con la estructura media durante la simulación. La RMSD y RMSF se realizaron utilizando protocolos incorporados de GROMACS y Bio3D.

3.2.5. Análisis de componentes principales y agrupamiento

El análisis de componentes principales (PCA) fue realizado utilizando el paquete Bio3D (Skjaerven et al., 2014) implementado en el *software* R y ProDy (Bakan et al., 2014; Bakan et al., 2011). En este estudio, el PCA se llevó a cabo en átomos $C\alpha$ de todas las proteínas en

los últimos 40 ns de las trayectorias. El PCA, es un método estadístico multivariado, es adecuado para la reducción de dimensionalidad y permite analizar las conformaciones estructurales dominantes de las proteínas (Buslaev et al., 2016). Los movimientos correlacionados de la proteína completa pueden ser representados por los autovectores y autovalores, los autovectores, también llamados componentes principales (PC), dieron la dirección del movimiento coordinado de los átomos y los autovalores representaron la magnitud del movimiento a lo largo de los autovectores correspondientes (Hong et al., 2018). Por lo tanto, se computaron los PC1 y PC2 (primeros dos componentes principales; PC1/2), que contribuyeron de manera más significativa en el análisis de PCA. Brevemente, PCA se basa en la diagonalización de la matriz de covarianza, C , con elementos C_{ij} calculados a partir de las coordenadas cartesianas alineadas y superpuestas, r , de átomos $C\alpha$ equivalentes (Skjaerven et al., 2014):

$$C_{ij} = \langle \mathbf{r}_i - \langle \mathbf{r}_i \rangle \cdot (\mathbf{r}_j - \langle \mathbf{r}_j \rangle) \rangle$$

Aquí, r_i y r_j eran coordenadas cartesianas de los átomos i th y j th $C\alpha$, $\langle r_i \rangle$ y $\langle r_j \rangle$ representan el promedio de tiempo sobre todas las configuraciones derivadas de la simulación de dinámica molecular. Nuestro análisis se limitó a $C\alpha$ átomos, ya que están menos perturbados por el ruido estadístico y proporcionan una caracterización significativa de los movimientos espaciales esenciales.

3.2.6. Matrices de dinámica de correlación cruzada

Para tener una mejor comprensión sobre la dinámica de las estructuras en las tres isoformas de RuBisCO, se utilizó el análisis de correlación cruzada (DCCM) para evaluar los desplazamientos de correlación cruzada de los átomos de carbono alfa ($C\alpha$) de la columna vertebral en las trayectorias de dinámica molecular de todos los sistemas (Bahar et al., 1997). Asimismo, el DCCM proporciona información sobre el efecto de las mutaciones en la dinámica de proteínas mediante el análisis de cómo se acoplaron los desplazamientos atómicos (Li et al., 2018; Wang et al., 2019). El mapa DCCM, una notación de matriz 3D, muestra gráficamente información relacionada con el tiempo de los residuos de proteínas. Los datos dependientes del tiempo basados en residuos se pueden analizar mediante el

reconocimiento visual de patrones. El mapa DCCM muestra las correlaciones de los movimientos de aminoácidos, y se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación (Ichiye y Karplus, 1991):

$$C_{ij} = \frac{(\Delta r_i \cdot \Delta r_j)}{(\langle \Delta r_i^2 \rangle \langle \Delta r_j^2 \rangle)^{1/2}}$$

Aquí, Δr_i y Δr_j son los desplazamientos desde la posición media de los átomos *i-ésimo* y *j-ésimo* con respecto al tiempo, respectivamente. Los corchetes angulares " $\langle \rangle$ " representan el tiempo promedio sobre toda la trayectoria. Los valores de C_{ij} fueron de -1 a +1, el valor positivo representó un movimiento correlacionado positivamente (movimiento en la misma dirección) entre los residuos *i* y *j*, mientras que el valor negativo implicó un movimiento correlacionado negativamente (anti-correlacionados o movimiento en dirección opuesta) entre los residuos *i* y *j* (Liu et al., 2019; Sun et al., 2019). El DCCM se construyó usando el paquete Bio3D de R-Project (Skjaerven et al., 2014).

3.3. Identificación de genes implicados en la formación de la madera en las especies forestales *G. crinita* y *C. spruceanum*, utilizando RNAseq

3.3.1. Material Biológico

Trabajamos con dos especies de árboles, *C. spruceanum* (Malvaceae) y *G. crinita* (Rubiaceae) adquiridas en el vivero Ayahuasca Ecolodge EIRL, Ucayali, Perú. Para evaluar la extracción de ARN, primero seleccionamos 20 plantas de dos años a partir del fenotipado fotosintético y las mediciones dasométricas del tallo, esta selección permitió identificar a las plantas con un similar potencial de rendimiento fotosintético y además con un tamaño similar. En el caso *C. spruceanum* a 10 plantas se les cortó el tallo a 10 cm de diámetro a la altura del suelo (DAS), en el mes de Noviembre (2020), para la colecta de ARN se esperó que los rebrotes lleguen al mes de marzo periodo en el que la especie registró mayor crecimiento diametral y longitudinal (Figura 6). En el caso de *G. crinita* se cortó el tallo de 10 árboles a 10 cm del DAS y se evitó el rebrote cortando las yemas apicales y quedándonos solo con los tocones en latencia (Figura 6).

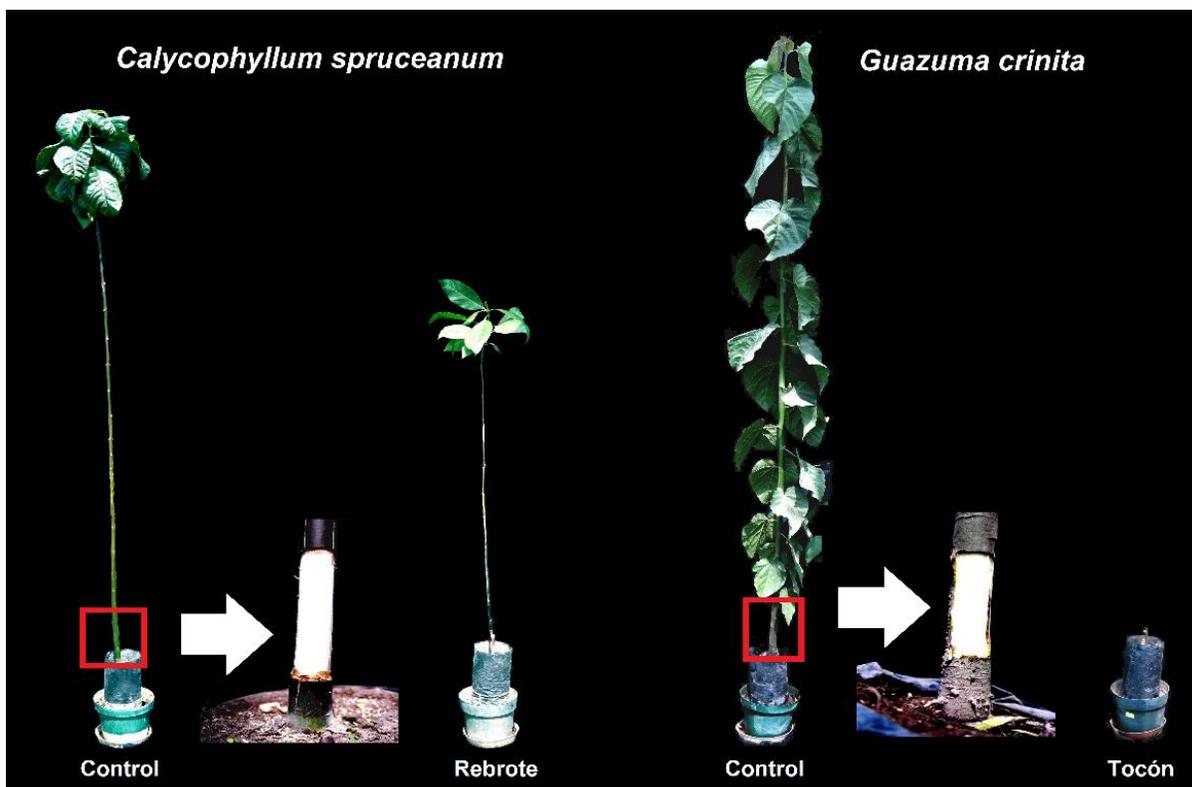


Figura 6. Diseño de experimentos para el análisis transcriptómico en *C. spruceanum* y *G. crinita*

Nota. Se extrajo ARN del xilema secundario de los tallos de plantas control y de rebrotes. En el caso de *G. crinita* el ARN total se extrajo de los tallos de las plantas control y los tocones. Los cuadrados de color rojo indican la sección de donde se extrajeron las muestras. Mientras que las flechas de color blanco muestran la parte del tejido de xilema secundario colectado en ambas especies.

3.3.2. Preparación de la solución CTAB

Preparamos 1 litro de solución tampón que contenía bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) al 2% (p/v), Tris-HCl 100 mmol. L⁻¹ (pH 8.0), EDTA 100 mmol. L⁻¹, NaCl 1.4 mol. L⁻¹ y β-mercaptoetanol 5% (v / v). Para obtener la solución, primero juntamos en un frasco 700 ml de agua destilada, 20 g de CTAB, 29.224 g de EDTA, 12.11 g de Tris-HCl y 81.816 g NaCl. Seguidamente la solución fue disuelta a 80°C utilizando un agitador magnético, posteriormente a una temperatura de 30°C se ajustó el pH a 8 utilizando pastillas de NaOH.

Finalmente, se vertió 50.50 ml de β -mercaptoetanol, y luego se aforó a 1 litro, se autoclavó la solución y luego se guardó a 2° C.

3.3.3. Extracción de ARN

Seleccionamos árboles en buen estado fitosanitario y buen crecimiento, la parte basal del tallo fue limpiada usando agua destilada. Con ayuda de un bisturí se colectó 1 g de muestras de xilema secundario del tallo, seguidamente se congeló en nitrógeno líquido y almacenó a -80°C. Luego los tejidos congelados se trituraron usando mortero y N-líquido hasta obtener un polvo fino. Las muestras fueron vertidas en tubos de centrifuga de 50 ml previamente enfriados con N-líquido, y se almacenó a -80°C para evitar la degradación del material biológico. Posteriormente, el tejido pulverizado y almacenado a -80°C se suspendió usando 20 ml de la solución tampón de extracción de ARN (CTAB) pre-calentado (65 °C durante 5 minutos), se homogeneizó la muestra en la solución por 1 minuto usando un vórtex, en seguida se incubó a baño maría a 65 °C durante 30 minutos. Luego se añadió 20 ml de cloroformo / alcohol isoamílico (24:1, v / v), se homogeneizó vigorosamente con las manos por 5 minutos, y se centrifugó a 7800 rpm entre 40 y 50 min a 2 °C.

Para el caso de *G. crinita* que presentó mucha goma se repitió el procedimiento, sacando 15 ml de sobrenadante y vertiendo 15 ml de cloroformo / alcohol isoamílico (24:1, v / v), centrifugando a 7800 rpm por 50 min a 2° C, en algunos casos es recomendable repetir el proceso hasta 3 veces para reducir la concentración de gomas y resinas.

Finalizando el procedimiento de centrifugado para el caso de las dos especies, sacamos 9 ml de sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo, y se añadió 3 ml de LiCl, se mezcló bien y se dejó incubando a -20° C durante 12 horas. Luego, la mezcla de reacción se centrifugó a 7800 rpm durante 40 min a 2° C para producir un sedimento. Posteriormente, se desechó todo el sobrenadante y el material precipitado se disolvió en 1 ml de TRI-Reagent (Zymo), la muestra fue mezclada con un vórtex por 20 segundos. En seguida se transfirió 1 ml de solución a un microtubo de 1.5 ml y se mezcló con 0.2 ml de cloroformo y se centrifugó a 13000 rpm (2° C) durante 20 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, al que se le añadieron 500 μ l de isopropanol, se homogeneizó vigorosamente e incubó la muestra a -20° C durante 40 minutos. Luego, la mezcla se centrifugó a 13000 rpm durante 20 min a 2° C. Se

desechó el sobrenadante, el sedimento final se lavó con 1 ml de etanol al 70% (v / v) a 13000 rpm por 3 minutos, este paso se repitió dos veces y al final el *pellet* se secó a condiciones ambientales por 4 o 5 min. Por último, el ARN fue disuelto con 50 µl de agua miliQ y almacenado a – 80° C.

Esta técnica de extracción (CTAB) se comparó con el método de TRIzol (Chomczynski 1993; Piotr et al., 2006) y el kit Direct-zol RNA MiniPrep (ZYMO Research; <https://www.zymoresearch.com/products/direct-zol-rna-miniprep-kits>), mediante la evaluación del rendimiento, la pureza (A₂₆₀ / A₂₈₀) y la integridad (28S / 18S) del ARN resultante. Finalmente, el ARN aislado se examinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

3.3.4. Purificación de ARN y remoción de inhibidores

Para eliminar los residuos de gomas, polisacáridos, metabolitos secundarios y otros contaminantes de la extracción de ARN utilizamos el kit Direct-zol RNA MiniPrep (ZYMO Research, <https://www.zymoresearch.com/products/direct-zol-rna-miniprep-kits>), este kit incluye 3 soluciones (Pre Wash, Wash y DNase/RNase Free water). Inicialmente, mezclamos 50 µl de ARN extraído, con 150 µl de TRI-Reagent y 200 µl de etanol puro. Los 400 µl de solución fueron transferidos a las columnas proporcionadas por el kit y seguidamente se centrifugó a 13000 rpm por 1 minuto. Luego se agregó a la comuna 400 µl de la solución Pre Wash y se centrifugó durante 1 minuto a 13000 rpm, este paso se repitió una vez más. Después se vertió 700 µl de RNA Wash Buffer y centrifugó por 2 minutos a 13000 rpm. La columna se transfirió a un nuevo microtubo previamente etiquetado, y se depositó 25 µl de la solución DNase/RNase free water y centrifugó 13000 rpm por 2 minutos. Las muestras fueron almacenadas inmediatamente en hielo para evitar la degradación del ARN. Se realizaron las mediciones correspondientes de calidad y cantidad de ARN.

Para eliminar los inhibidores restantes (polifenoles, ácidos húmicos/fúlvicos, taninos, melanina, etc.) que perjudican la construcción de las librerías para secuenciación total del ARN, utilizamos el PCR Inhibitor Removal Kit (ZYMO Research, <https://www.zymoresearch.com/collections/onestep-pcr-inhibitor-removal-kits>). Para ello, seleccionamos las mejores muestras de extracción de ARN en calidad y cantidad, unimos

muestras para alcanzar un volumen de 200 μ l. Siguiendo el protocolo, colocamos las columnas en los tubos colectores y vertimos 600 μ l de Pre-Solution y centrifugamos a 8000 xg por 3 minutos, esto permitió activar la membrana que depura los inhibidores de ARN. Luego, las columnas fueron transferidas a nuevos microtubos eppendorf de 1.5 ml, y se suministró los 200 μ l de ARN, seguidamente se centrifugó a 16000 xg por 3 minutos. Finalmente, se analizó la calidad y cantidad de ARN y almacenó las muestras a -80° C.

3.3.5. Análisis de Integridad de ARN (RIN) y Librerías de ARNm (TrueSeq Strander mRNA)

Los análisis de calidad, cantidad e integridad de ARN para el manejo y preparación de la librería de ARNm fueron hechos con kits de ARNm por medio de la empresa MACROGEN Inc., Seoul, Korea (<http://macrogen.com>), según sus protocolos. El experimento incluyó 3 muestras de árboles de 2 años, y 3 muestras de plantas de rebrote de *G. crinita* y *C. spruceanum* respectivamente, lo cual originó 6 librerías de ARNm.

3.3.6. Limpieza y montaje *de novo*

Utilizando el *software* FastQC se eliminó las secuencias de los adaptadores y las secuencias de baja calidad, incluyendo las secuencias de nucleótidos desconocidos > 5% y más de 10% de bases con una puntuación de calidad (valor Q) de < 20. Posteriormente las lecturas limpias fueron ensambladas *de novo* utilizando la plataforma Trinity (parámetros 'K-mer = 25, distancia de pares de grupo = 300'). Las lecturas obtenidas para las muestras de tallo y sus réplicas biológicas se ensamblaron juntas. Las lecturas cortas se ensamblaron primero en *contigs* más largos y luego se unieron en transcripciones basadas en la información del extremo pareado y la similitud entre los *contigs*. La transcripción más larga se tomó como muestra UniGene. Los transcriptomas usados como referencia fueron los de las especies *Theobroma cacao*, *Populus trichocarpa*, *Eucaliptus globulus* y *Arabidopsis thaliana*.

3.3.7. Detección y anotaciones de unigenes expresados diferencialmente

Se utilizó el paquete EdgeR de R-Bioconductor, para realizar la expresión diferencial de unigenes. La estimación del conteo de la abundancia de *reads* se obtuvo utilizando

RSEM. Posteriormente se generarán dos matrices, una que contiene los recuentos de fragmentos de ARN-seq que será utilizada para la expresión diferencial por EdgeR y la otra que será para la normalización de TMM para generar gráficos. Los grupos para la comparación fueron realizados por cada especie (*C. spruceanum*, *G. crinita*). Los resultados fueron representados mediante gráficas "MA" y "volcano plot" de las comparaciones por pares utilizando ambas réplicas para las dos secciones evaluadas, el límite de tasa de descubrimiento falso (FDR) fue de ≤ 0.05 . Después, se presentó un código a los *contigs* obtenidos a partir del ensamblado por Trinity y se obtuvo finalmente un archivo en formato fasta. Los unigenes expresados diferencialmente fueron anotados usando Blast2Go. Los parámetros en la "anotación de Ontología Génica" fueron realizadas mediante un filtro de impacto de *E-valor* 1.0E-6. Por último, utilizando el *software* Blast2Go se obtuvieron las rutas metabólicas de KEGG.

3.3.8. Anotación funcional

Las funciones putativas de los UniGenes obtenidos se anotaron mediante un análisis con BLASTx con un umbral de valor 1.0E-6 contra las bases de datos de proteínas, se incluyó la base de datos no redundante (nr) del NCBI, la base de datos de proteínas Swiss-Prot, la base de datos Gene Ontology (GO), la base de datos Clusters of Orthologous Groups of Proteins (COG) y la base de datos de rutas metabólicas (KEGG).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Diferencias intra-anual de los rasgos fenotípicos y fotosintéticos

Para el desarrollo de este objetivo, por cada especie (*C. spruceanum* y *G. crinita*) se seleccionó 50 individuos, los cuales fueron plantados en macetas de 12 L que contenían tierra agrícola, materia orgánica y vermiculita en una proporción 3:2:1, respectivamente. Las plantas de *G. crinita* fueron establecidas en un vivero cubierto por mallas raschel del 70 % de interferencia de radiación (Paredes et al., 2010). En el caso de *C. spruceanum* se estableció en un vivero con 50 % de interferencia de luminosidad (Abanto-Rodriguez et al., 2016). El monitoreo del crecimiento (diámetro, altura total, número de hojas, largo y ancho de hojas) y parámetros fotosintéticos (LEF, Phi2, vH+, PhiNPQ, ECSt_tAU, etc.) para las dos especies fue por un año (setiembre 2019, agosto 2020). Las variables climáticas (temperatura, humedad y radiación) se registraron por los sensores establecidos en la estación Von Humboldt, ubicado en la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Por otro lado, para evaluar la relación del Phi2 y el ancho de lumen de las fibras fueron seleccionados 15 árboles fenotípicamente similares, luego el tallo fue seccionado en tres partes (superior, medio e inferior), seguidamente se identificaron y codificaron 2 hojas por cada sección y se monitorearon sus rasgos fotosintéticos por un periodo de tres meses (abril 2020 a junio 2020). Al finalizar las mediciones de fotosíntesis se colectaron de cada árbol 3 fragmentos del tallo (superior, medio e inferior) para su evaluación anatómica.

4.1.1. Variación intra-anual del crecimiento del tallo y la hoja de *C. spruceanum* y *G. crinita*

Los árboles tropicales desempeñan un papel clave en la mitigación de CO₂. Sin embargo, el mal uso de estos recursos naturales está generando grandes pérdidas de áreas boscosas (Peres et al., 2010). Para mitigar este efecto, diversos organismos internacionales apuestan por la reforestación y restauración de los ecosistemas ya que podrían reducir hasta 26 gigatoneladas de gases de efecto invernadero de la atmósfera (Fischer et al., 2021). Sin embargo, se dispone pocos datos sobre el desarrollo biológico, fisiología y los estados fenológicos de las especies forestales nativas amazónicas, conocimiento que es necesario para el manejo forestal y su adaptación a otras zonas geográficas. En consecuencia, nuestro estudio ayuda a mejorar la comprensión del crecimiento y la fenología de la fotosíntesis de *C. spruceanum* y *G. crinita* (Figura 8, 9). Esta información es importante ya que a través de la fotosíntesis los árboles asimilan el carbono que luego se almacena en la madera por xilogénesis (Figura 7) (Ouyang et al., 2016; Rathgeber et al., 2019). Asimismo, nuestros resultados evidencian que hay diferencias intra anuales en el crecimiento (Figura 7) y la fenología de la fotosíntesis (Figura 8, 9) en *C. spruceanum* y *G. crinita*. En ambas especies los rasgos de incremento diametral y de altura de los árboles mostraron un mayor crecimiento en verano respecto del periodo de invierno (Figura 7), (Anexo 1), Bolaina creció 65 cm (entre Febrero y Marzo) mientras que Capirona mostro un crecimiento de 33 cm (entre Febrero y Marzo), siendo consistente con estudios previos en árboles de regiones templadas (Sotelo et al., 2003) y boreales donde la temperatura desempeña un papel significativo en la xilogénesis (Frechette, 2019; Tiwari et al., 2020; Yousfi et al., 2016). Las condiciones climáticas más cálidas permiten el crecimiento radial de los árboles activando el cambium a nivel celular y que es definido comúnmente como un aumento en el número de células cambiales y la aparición de un xilema recién formado en las primeras etapas del desarrollo (Prislan et al., 2018; Ziaco Truettner et al., 2018). El cambium vascular es un meristema lateral importante que se divide de manera periclinal cuando las condiciones de temperatura son favorables (Figura 7), además hay suficiente humedad en el suelo y existe un adecuado fotoperiodo (Campelo et al., 2016; Dox et al., 2020; Prislan et al., 2018).

Por otra parte, el estudio de las hojas en el dosel evidenció que ambas especies presentaron mayor número de hojas y área foliar al término del verano (Figura 7c, d). Este patrón es

provocado por el aumento de la temperatura (Figura 8a), (Anexo 2), incrementándose de forma constante el origen de nuevas hojas desde noviembre-2019 a mayo-2020, periodo donde la cobertura del dosel alcanzó su punto máximo cuando la temperatura (Figura 8) y la radiación solar fueron más altas. Algunos reportes comentan que en ciertas especies de árboles la producción de hojas está controlada por el fotoperiodo exhibiendo una sincronía intraespecífica en el enrojecimiento de las hojas con una baja variabilidad interanual (Borchert et al., 2002; Elliott et al., 2006). Según Rivera et al., (2002), en las regiones cercanas al Ecuador donde los cambios temporales en la duración del día son mínimos, la ruptura de la yema de las hojas en las caducifolias es inducida por un aumento en el fotoperiodo de 30 minutos o menos. En nuestro estudio se mantuvo un riego constante durante todo el periodo de monitoreo. Por lo tanto, la interacción de la baja temperatura y el fotoperiodo de las plantas en invierno posiblemente sería el desencadenante del enrojecimiento de las hojas de *C. spruceanum*. Asimismo, nuestros resultados mostraron un sincronismo entre los períodos de mayor cobertura foliar, radiación y temperatura (Figura 7, 8, 9). Sin embargo, se sugiere para experimentos futuros evaluar la influencia del fotoperiodo durante el desarrollo foliar.

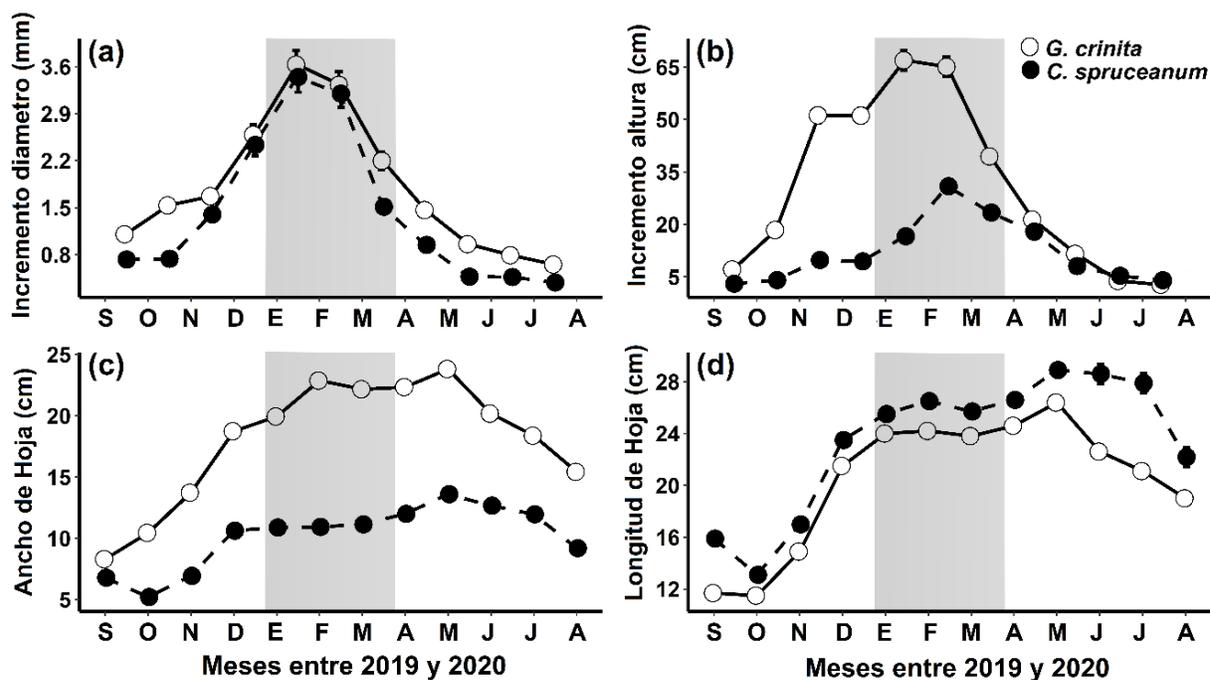


Figura 7. Análisis de crecimiento mensual de tallos y hojas en *C. spruceanum* y *G. crinita*

Nota. a) Incremento mensual del diámetro del tallo (mm). **b)** Incremento mensual de la altura del tallo (mm). **c)** Ancho de la hoja (cm) y **d)** Largo de la hoja (cm).

4.1.2. Relación entre temperatura máxima y rendimiento cuántico máximo Fv/Fm

Entre agosto del 2019 y setiembre del 2020 se registró una temperatura media anual de 21 °C (Figura 8a) y una humedad media anual de 54 %. Durante el verano (enero-marzo) la temperatura máxima osciló entre $28.1^{\circ}\text{C} \pm 0.4$ y $30.2^{\circ}\text{C} \pm 0.43$, contrario a ello en invierno (junio-agosto) el rango de temperatura fue entre $19.9^{\circ} \pm 0.28$ y $21^{\circ} \pm 0.3$, existiendo un diferencial de $\sim 10^{\circ}\text{C}$ entre ambas estaciones (Figura 8a), (Anexo 3). Por ello, es importante evaluar la dinámica de los parámetros de fluorescencia de la clorofila respecto de las variables climáticas (Figura 9), esto permite fenotipar los rasgos fotosintéticos a escala de la hoja y el dosel debido a los patrones fisiológicos que siguen las plantas (Figura 9, 10) (Krause et al., 2010; Kurjak et al., 2019). En tal sentido, el valor de rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm) es un indicador del estado de la planta frente a las condiciones de estrés y puede ser un parámetro útil al momento de seleccionar entornos ambientales para el establecimiento de los árboles (Fréchette et al., 2020; Tiwari et al., 2020). De acuerdo con los resultados de la Figura 8, en ambas especies a mayor temperatura se incrementan los valores de Fv/Fm en la parte superior del dosel de los árboles (Figura 8b, c), evidenciándose que los modelos no lineales mostraron un mejor coeficiente de determinación respecto al modelo lineal (Figura 8b, c).

En *G. crinita* el modelo no lineal ($R^2=0.92$; $\text{AIC}=-61.04$) mostró que el mayor Fv/Fm fue de 0.74, ese valor se hizo constante a una temperatura máxima de $\sim 30^{\circ}\text{C}$ (Figura 8b), sin embargo, en la Figura 8a también se muestra que *G. crinita* tiene altos valores de rendimiento cuántico máximo desde temperaturas de 25°C . Por otro lado, en los árboles evaluados de *C. spruceanum* el valor máximo de Fv/Fm fue de 0.73 (Figura 8c), valor alcanzado en los meses de máxima temperatura. Asimismo, *C. spruceanum* presentó mayor variación de Fv/Fm, donde el máximo valor fue a la temperatura máxima de 30.2°C durante todo el año de evaluación.

Por tanto, las dos especies evaluadas tienen un potencial de aclimatación diferente en su desempeño fotosintético y tolerancia al estrés cuando se exponen a diferentes temperaturas

mensuales durante un año, esto debido posiblemente a la estructura de sus hojas caducas (*C. spruceanum*) y perennes (*G. crinita*) (Figura 8). Asimismo, en las dos especies los valores máximos de Fv/Fm oscilaron entre 0.7 y 0.8 en un rango de temperaturas entre 25 y 35 °C (Figura 8), las reducciones en Fv/Fm típicamente reflejan la disipación del exceso de energía dentro de las antenas recolectoras de luz (Jägerbrand y Kudo, 2016). Asimismo, estos resultados son coherentes con los obtenidos por Sastry et al., (2018) donde 6 especies de árboles tropicales caducifolios y de hojas perennes mostraron valores de Fv/Fm entre 0.7 y 0.8, los valores se mantuvieron constante desde 25°C hasta los 40 °C, posterior a este límite de temperatura (40°C) la función del fotosistema II se vio afectada drásticamente, perdiéndose hasta el 50% de la función del PSII, causando daños irreversibles al fotosistema y necrosis a las hojas (Sastry et al., 2018), estos patrones también fueron reportados para *A. thaliana* (Essemine et al., 2012), *Cosmarium strains* (Stamenković y Hanelt, 2013) y *Fagus sylvatica* (Kurjak et al., 2019). Asimismo, algunos estudios mencionan que la capacidad de aclimatación de una especie está asociada a la variación del Fv/Fm, la mayor fluctuación en los valores de Fv/Fm en un lugar específico puede causar una menor capacidad de aclimatación, mientras que las especies con poca variación significativa en un lugar específico pueden tener una mayor capacidad de aclimatación (Jägerbrand y Kudo, 2016). En consecuencia, posiblemente *C. spruceanum* mostró mayor estrés por temperatura debido a los cambios abruptos de Fv/Fm entre invierno y verano (Figura 8b) respecto a *G. crinita* (Figura 8a). El menor valor del Fv/Fm en *C. spruceanum* fue de 0.43, y estaría asociado a la senescencia de las hojas en los periodos de menor temperatura. En el reporte de Brodribb y Holbrook (2003) se menciona que las hojas de *Calycophyllum candidissimum* (Rubiaceae) disminuyen de cinco a diez veces la conductancia hidráulica de la hoja entre el tiempo de rendimiento cuántico máximo y el período inmediatamente anterior a la caída de las hojas (Brodribb y Holbrook, 2003). Sin embargo, aún se desconoce si la disminución de la conductancia hidráulica es la causal en el proceso de senescencia de la hoja o simplemente una respuesta a cambios ambientales (radiación, temperatura, humedad) en las características de la hoja durante la senescencia (Brodribb y Holbrook, 2003). Por último, es importante mencionar que los altos niveles de radiación pueden influir negativamente en el crecimiento de los árboles jóvenes si no están sombreados por rodales maduros, ya que la luz adicional puede causar fotoinhibición y estrés oxidativo al PSII (Huang et al., 2018; Ranjan et al.,

2014). Siendo este fenómeno una amenaza especialmente importante para las plantaciones forestales en campos abiertos.

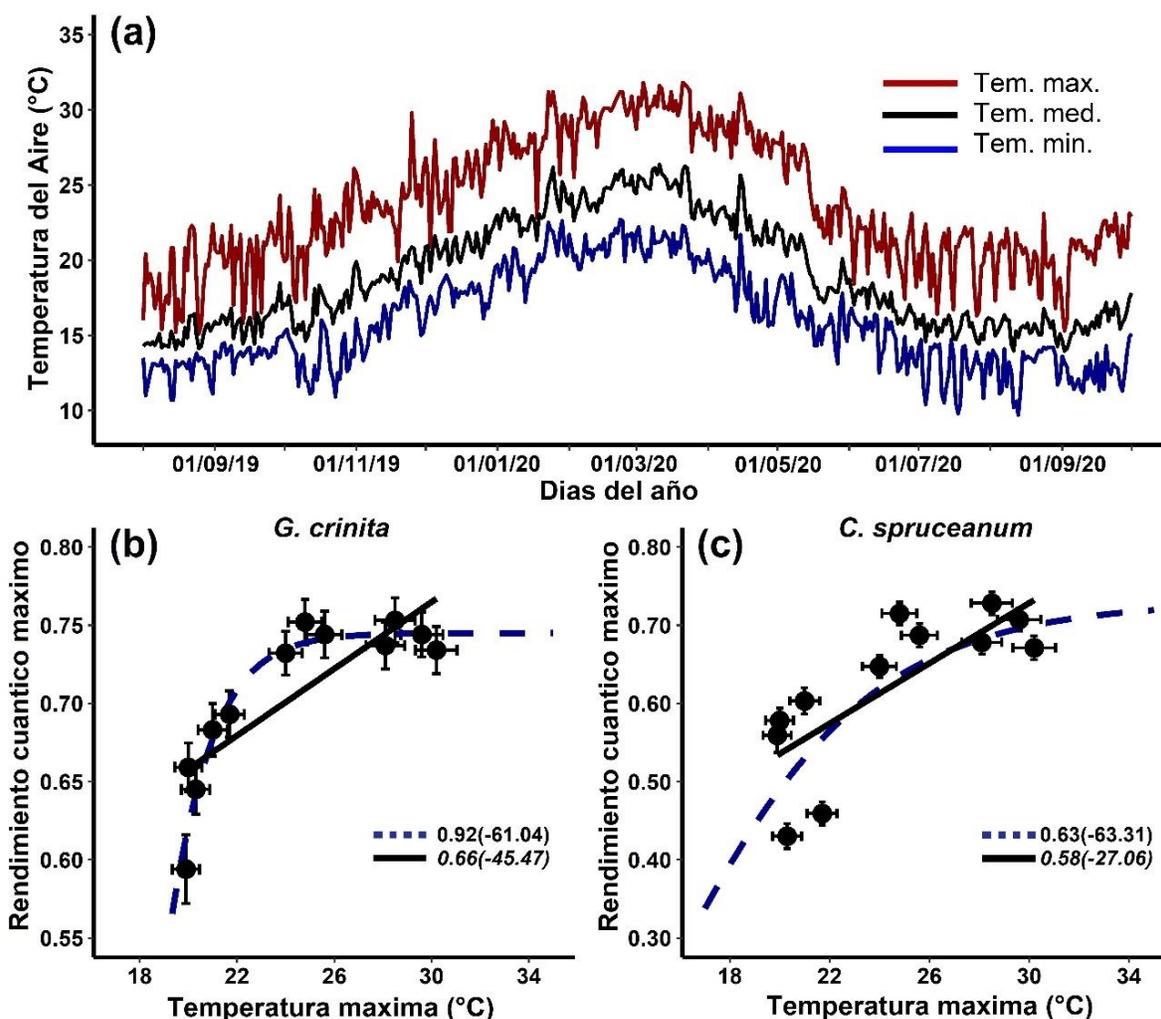


Figura 8. Variación estacional en la temperatura del aire

Nota. a) Series de temperatura registrado por la estación de SENHAMI Von Humboldt, las líneas continuas de color negro indican las medias diarias y las líneas de arriba (color rojo) y abajo (color azul) indican los valores mínimos y máximos diarios. b) Correlación entre temperatura máxima y rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm) de *G. crinita* y c) Correlación entre temperatura máxima y rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm) de *C. spruceanum*. Los números son valores R^2 seguidos de valores AIC entre paréntesis, para modelos no lineales

(números superiores, líneas discontinuas) y modelos lineales (números inferiores, líneas continuas).

Tabla 2. Análisis estadístico de los modelos matemáticos de Gompertz y Lineal

Especie	Modelo	Parámetro	Error estándar	t-valor	Pr(> t)	R	R ²	AIC	
<i>G. crinita</i>	Lineal	a = 0.44	0.059	7.499	2.06E-05	***	0.916	0.665	-45.471
		b = 0.01	0.002	4.46	0.001	**			
	Gompertz	a = 0.74	0.007	103.892	3.6E-15	***	0.961	0.922	-61.046
		b = 11.09	3.785	2.93	0.016	*			
		c = 0.64	0.189	3.399	0.007	**			
<i>C. spruceanum</i>	Lineal	a = 0.15	0.127	1.174	0.267		0.764	0.583	-27.065
		b = 0.02	0.005	3.741	0.003	**			
	Gompertz	a = 0.74	0.105	6.996	6.35E-05	***	0.795	0.633	-63.319
		b = 3.49	4.579	0.762	0.466				
		c = 0.23	0.242	0.932	0.376				

4.1.3. Dinámica intra-anual del fotosistema II

Dado que las estaciones tienen diferentes condiciones ambientales con respecto a la temperatura, la intensidad de la luz solar, humedad y la disponibilidad de agua, las plantas experimentan diferentes niveles de estrés (Fréchette et al., 2020; Osei-bonsu et al., 2020). Por tanto, la capacidad de aclimatación de los árboles es importante para su supervivencia, presentando diferentes estrategias en la utilización de la energía luminosa durante su desarrollo (Figura 9, 10, 11). Para conocer la dinámica fotosintética de *G. crinita* y *C. spruceanum*, evaluamos parámetros del PSII (Phi2, PhiNO y PhiNPQ) durante un año (Figura 9). Generalmente las dos especies evaluadas siguieron la misma secuencia de eventos fotosintéticos evidenciándose que las fluctuaciones de Phi2, PhiNO y PhiNPQ se vieron afectadas por los cambios estacionales del clima (Figura 9).

En nuestras evaluaciones *G. crinita* de hoja perenne y *C. spruceanum* de hoja caduca registraron diferentes patrones de Phi2, PhiNO y PhiNPQ, siendo afectados principalmente por la variación de la temperatura (Figura 8a), humedad y radiación durante los cambios estacionales, siendo señales ambientales importantes que modulan la tasa fotosintética

(Figura 9). Por ejemplo, un reporte en *Lactuca sativa* muestra que los valores de humedad relativa por debajo del 60% o por encima del 85% disminuyen los valores del rendimiento cuántico máximo (Kim et al., 2006), debido a que estimula el cierre de estomas y además disminuye los niveles de concentración de CO₂ intercelular (Jägerbrand y Kudo, 2016; Kim et al., 2006).

Respecto a nuestros estudios, los árboles de *G. crinita* mantuvieron hojas verdes y altos índices de rendimiento fotosintético (Phi2) en todo el periodo de evaluación (Figura 9a), indicando una alta eficiencia fotosintética asociado a su rápido crecimiento longitudinal del tallo (Figura 7b). Contrario a ello, *C. spruceanum* perdió paulatinamente sus hojas en invierno, afectando los valores de PhiNPQ y Phi2 (Figura 9b), sin embargo, los valores de PhiNPQ se incrementaron durante los meses más fríos (Figura 9b), demostrando una mayor termoestabilidad para minimizar el daño potencial del aparato fotosintético, el aumento de la disipación térmica es un mecanismo de aclimatación para generar respuesta de adaptación a bajas temperaturas (Figura 9b). Por el contrario, los valores de PhiNPQ (Figura 9b) se redujeron al incrementar la temperatura entre los meses de noviembre (2019) a mayo (2020) (Figura 8a). Respecto al rendimiento fotosintético (Phi2) existe un incremento progresivo durante los meses que preceden al invierno (Figura 9), alcanzando los valores máximos en el mes de abril (2020), siendo estos meses los periodos de mayor producción fotosintética del dosel (Figura 9).

Por otro lado, en ambas especies los niveles de luz que entran al PSII de las hojas y se pierden en procesos no regulados (PhiNO) se incrementaron en los meses de mayor temperatura y radiación, periodos en los cuales presentarían mayor daño al PSII (Figura 9). Sin embargo, los valores de PhiNO se mantienen relativamente estable en los meses de diciembre (2019) y mayo (2020), periodo donde ambas especies alcanzan su mayor tasa crecimiento diametral y de altura (Figura 7a, b).

Por otra parte, los valores más bajos del flujo lineal de electrones (LEF) fueron registrados en los meses de invierno aumentando en los meses de verano (Figura 10e). Sin embargo, nuestros hallazgos demuestran que la depresión de LEF en las dos especies fue causada principalmente por una disminución de la radiación fotosintéticamente activa (PAR), y no fue a causa de la fotoinhibición del Phi2 ya que se mantuvo constante en los meses de verano

(Figura 9) (Anexo 5), demostrando buena estabilidad para el fenotipado fotosintético en árboles de hoja caduca y perenne.

Otros estudios mencionan que las plantas caducifolias inducen el cese del crecimiento en contraste con los árboles de hoja perenne que requieren un crecimiento y desarrollo continuo (Fréchette, 2019; Fréchette et al., 2020; Tiwari et al., 2020). Por tanto, posiblemente las especies caducifolias como *C. spruceanum* exhiben un menor requerimiento de fotosintatos tras la inducción de la latencia y la aclimatación al frío, lo que representa una disminución en el crecimiento diametral y longitudinal del tallo (Figura 7). En contraste, los árboles de hoja perenne que pasan el invierno mantienen una alta demanda de fotosintatos debido al continuo crecimiento y desarrollo durante la aclimatación al frío, esto mantiene la demanda del sumidero de carbono relativamente constante (Hüner y Grodzinski, 2019; Öquist y Huner, 2003), siendo el caso de *G. crinita* que mantuvo altos valores de Phi2 durante todo el año en un rango de radiación fotosintéticamente activa entre 10 a 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, lo que indica que en sombra *G. crinita* presenta una alta eficiencia fotosintética asociada a su rápido crecimiento (Figura 7, 9), siendo algo característico de las plantas jóvenes pioneras que se desarrollan debajo del dosel del bosque.

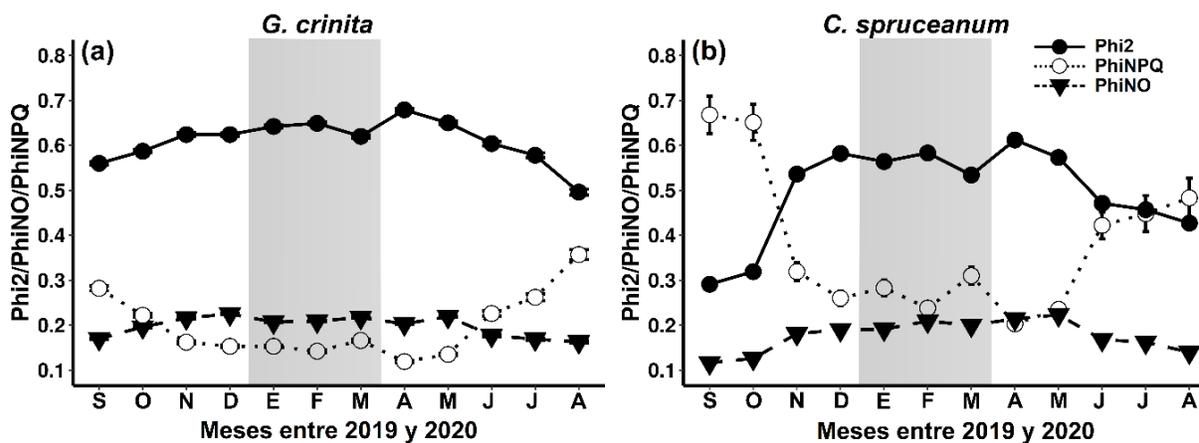


Figura 9. Series mensuales de parámetros de eficiencia fotosintética del PSII

Nota. Rendimiento cuántico del fotosistema II (Phi2), Rendimiento de disipación de energía no regulada (PhiNO) y Rendimiento de enfriamiento no fotoquímico (PhiNPQ). **a)** Fluctuación de variables del fotosistema 2 PSII de *G. crinita*. **b)** Fluctuación de variables del fotosistema 2 PSII de *C. spruceanum*.

Por otra parte, las mediciones de temperatura foliar, clorofila relativa, F_v/F_m y relación de disminución de la fluorescencia de la clorofila (Rfd) en las dos especies siguieron las tendencias estacionales esperadas, siendo bajas en invierno y aumentando con la mejora de las condiciones climáticas en primavera y alcanzando valores máximos durante el verano (Figura 10). Durante el invierno de 2019 y 2020, el rendimiento cuántico máximo de PSII (F_v/F_m) disminuyó en las plántulas de *G. crinita* y *C. spruceanum* (Figura 10c), alcanzando valores cercanos a 0.59 ± 0.05 y 0.43 ± 0.05 respectivamente, durante los meses de enero a abril los valores de F_v/F_m se recuperaron y fueron alrededor de 0.75 ± 0.05 en *G. crinita* y 0.73 ± 0.07 en *C. spruceanum* (Figura 10c). Por otra parte, el incremento de la clorofila relativa está asociada a la mayor actividad fotosintética (Figura 10b), crecimiento y productividad de la biomasa en las dos especies (Figura 7a, b). Respecto a las mediciones de clorofila relativa en *C. spruceanum* oscilaron entre (30% y 60%) (Figura 10b), los cambios en el porcentaje de clorofila en esta especie de hoja caduca coinciden con la variación en la coloración del dosel. *G. crinita* presentó clorofila relativa de 32% en invierno a 52% en verano (Figura 10b). Por otra parte, las diferencias mensuales de Rfd, fueron indicadores del desempeño fotosintético y de los cambios de la exposición de las hojas al sol, en temporadas de verano hay mayor radiación solar asociadas en un incremento de Rfd (Figura 10d), mientras que en invierno hay una reducción significativa, esto podría indicar una disminución de la tasa neta de asimilación de CO_2 , y menor eficiencia del PSII (Figura 1d). Por otra parte, los valores más bajos del flujo lineal de electrones (LEF) fueron registrados en los meses de invierno aumentando en los meses de verano (Figura 10e). Sin embargo, nuestros hallazgos demuestran firmemente que la depresión de LEF en las dos especies fue causada principalmente por una disminución en PAR, y no fue a causa de la fotoinhibición del Φ_2 ya que se mantuvo constante en los meses de verano (Figura 9).

En contraste, el aumento de NPQt en los meses de invierno fue notable, disipando la energía luminosa como calor, y desempeñando así un rol importante en la adaptación de los procesos fotosintéticos al frío (Figura 10f). Bajo el estrés por frío, la clorofila relativa disminuye junto con el aumento del proceso fotoprotector NPQt, en *C. spruceanum* en el mes de setiembre se registró valores de hasta 9.4 ± 0.8 mientras que en el mes de febrero alcanza valores de 1.8 ± 0.8 . *G. crinita* evidenció también cambios significativos, en agosto registro 3.4 ± 0.8 y en febrero 1.2 ± 0.8 (Figura 10f). Para responder a estos cambios ambientales, los árboles

adoptan diferentes estrategias de fotoprotección durante el cambio de estaciones (Yu et al., 2021), como el incremento de los valores de NPQt que permite a la planta disipar la mayor parte de la luz absorbida en forma de calor (Figura 10f), también pueden acumular antocianinas, sintetizar antioxidantes (flavonoides y fenoles) y enzimas antioxidantes (catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa) (Yu et al., 2021). Curiosamente, nuestros datos mostraron mayores valores de NPQt en invierno tanto para *G. crinita* y *C. spruceanum* (Figura 10f), esta respuesta de aclimatación ayuda a proteger al follaje del daño foto-oxidativo durante el invierno, cuando la fotosíntesis se ve restringida o impedida por las bajas temperaturas. Contrario, a nuestros reportes en otras especies tropicales como *Butea monosperma* los valores de NPQ fueron mayores durante el verano, temporada donde hay mayor estrés hídrico y de radiación, lo que provoca el cierre de estomas durante el día reduciendo la actividad fotosintética (Mcdowell et al., 2008). No obstante, cabe señalar que nuestro estudio mantuvo a las plantas en riego constante y la radiación fotosintéticamente activa fue menor al punto de saturación de luz ($750 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (Rivera-Méndez y Romero, 2017), por tanto, la temperatura y el % de humedad relativa fueron los factores limitantes que modularon principalmente la variación del Φ_2 (Figura 9a, b), porcentaje de clorofila, F_v/F_m , R_{fd} y NPQt (Figura 10b, c, d, f).

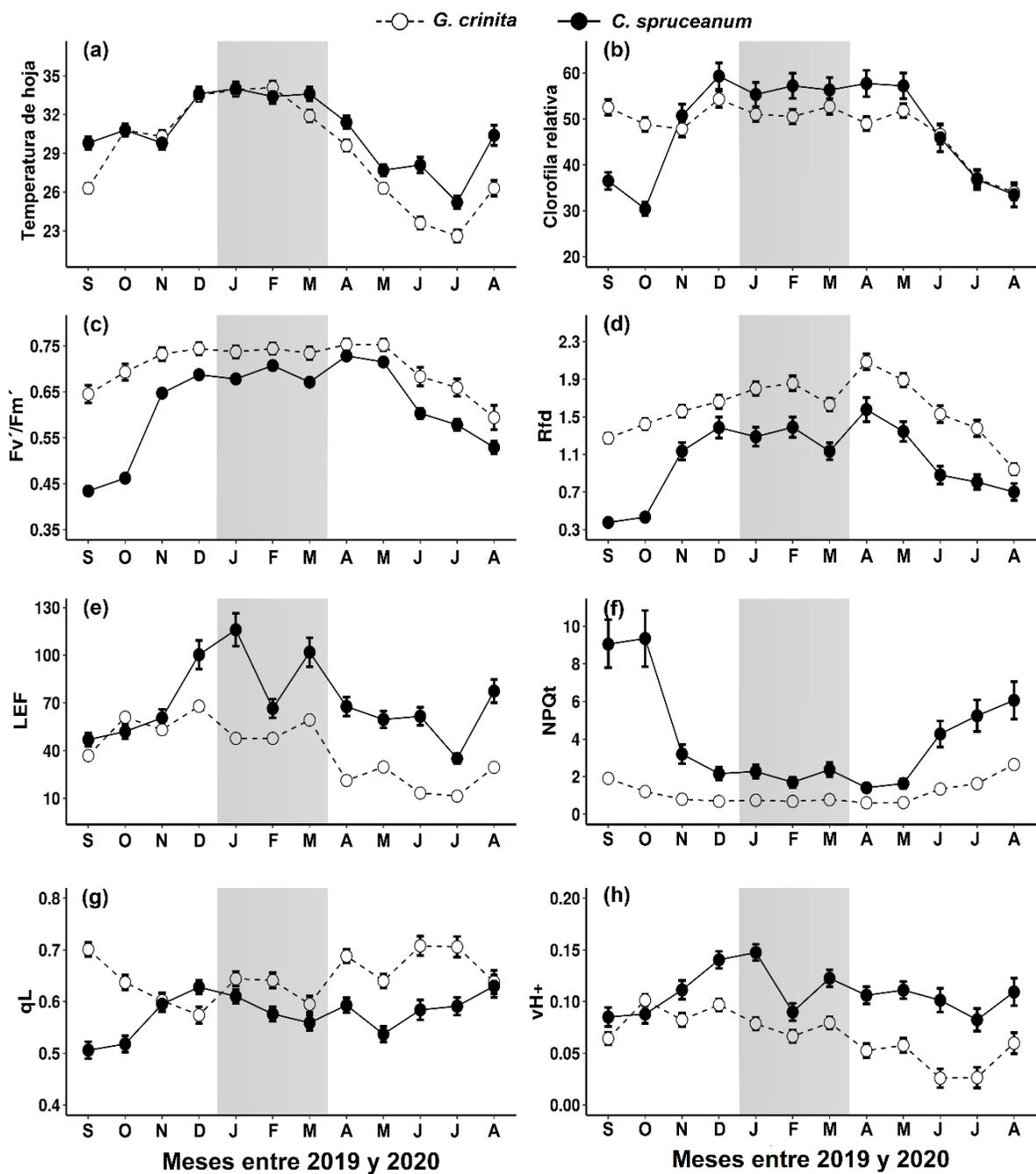


Figura 10. Series mensuales de parámetros fotosintéticos de *G. crinita* y *C. spruceanum*

Nota. a) Temperatura de la hoja. b) Clorofila relativa. c) rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm). d) relación de disminución de la fluorescencia de la clorofila (Rfd); e) flujo lineal de electrones (LEF); f) extinción no fotoquímica corregida por Fm (NPQt); g) Fracción de

centros del Fotosistema II que se encuentran en estado abierto (qL) y **h**) Conductividad protónica de la ATP sintasa del cloroplasto (vH+).

4.1.4. Circuito de protones y electrones

Aunque la fotoinhibición del PSII ocurre a menudo en condiciones de crecimiento natural, el conocimiento sobre el efecto de la fotoinhibición moderada en el flujo de electrones lineales (LEF) sigue siendo controvertido (Huang et al., 2018).

Consecuentemente, las variaciones en las intensidades de PAR y LEF durante un año permitieron evaluar la dinámica de los circuitos de protones y electrones de *G. crinita* y *C. spruceanum* (Figura 11). Nuestros resultados indican que la correlación entre el flujo de protones (vH+) y el flujo lineal de electrones (LEF) refleja una relación positiva, así *G. crinita* de hoja perenne presentó mayor flujo de protones impulsados por los niveles más elevados de luz alcanzando un factor de correlación de $r^2=0.80$ (Figura 11a). Por otro lado, el LEF estaba activo para el rango de intensidades PAR (Figura 11), correlacionándose significativamente con un r^2 de 0.976 ($p < 0.05$) (Figura 11b). Por otra parte, en *C. spruceanum* el vH+ se incrementó a mayores intensidades LEF, reflejando el incremento de los flujos de protones impulsados por la luz a través del aparato fotosintético ($r^2 = 0.44$) (Figura 11c), mientras que la relación PAR y LEF alcanzó un r^2 de 0.57 ($p < 0.05$) debido a las variaciones fotosintéticas que presentó la especie de hoja caduca en los cambios estacionales (Figura 11d).

Cabe señalar que el flujo lineal de electrones (LEF) da como resultado la producción de ATP y de NADPH, y una parte se dirige a la fotorrespiración y a la reacción de Mehler (Cornic y Fresneau, 2002; Biehler y Fock, 1996; Park et al., 1996). Bajo estrés por bajas temperaturas la fotoinhibición de PSII es más severa y está acompañada de una mayor disminución en la conductancia estomática (Hirotsu et al., 2005), lo que afecta la frecuencia del ciclo de Calvin-Benson y, por tanto, al LEF (Figura 10e). Asimismo, la fracción del flujo de electrones expresada como fotosíntesis y fotorrespiración depende de la concentración de CO₂ intercelular y del punto de compensación de CO₂, que depende de la temperatura (Bernacchi et al., 2001; Farquhar y von Caemmerer, 1982). Como se evidencia en la Figura 10, en las dos especies evaluadas la fotoinhibición del PSII influye en el LEF (Figura 10e), mostrando un mayor flujo de electrones en verano comparado con los meses más fríos, sin embargo, en

el mes de febrero (mes más cálido) en *C. spruceanum* se observó reducción de LEF debido a la disminución de PAR, lo que nos demuestra que bajo condiciones de sombra la reducción en el PAR podría afectar negativamente al flujo de electrones (Figura 10e). Contrario a lo que reportamos, estudios en *P. notoginseng* (familia Araliaceae) confirmaron que LEF disminuyó gradualmente durante la exposición a una intensidad de luz de 2258 μmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, donde la acidificación excesiva en los tilacoides regula a la baja el LEF (Livingston et al.,2010).

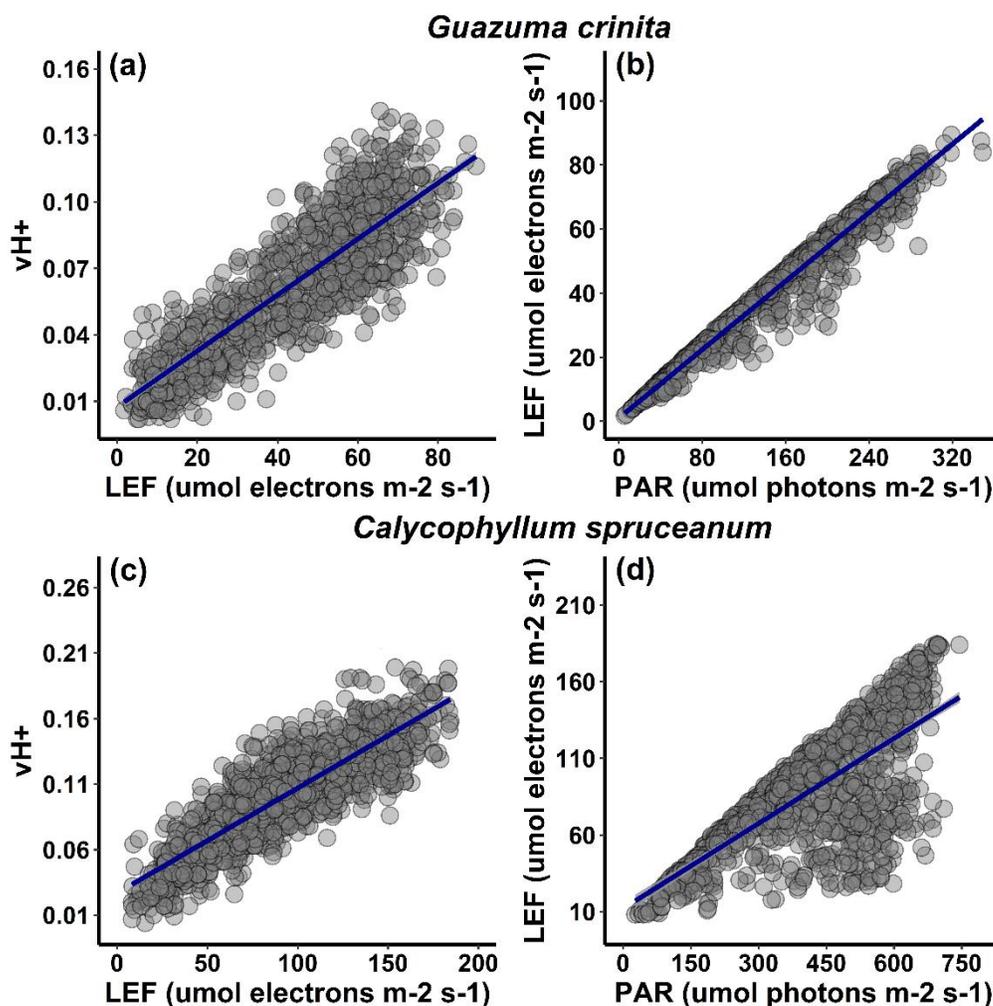


Figura 11. Relación entre el flujo de protones (vH^+) con el flujo lineal de electrones (LEF), además de la relación PAR y LEF

Nota. **a)** Relación LEF y vH^+ de *G. crinita*; **b)** Relación PAR y LEF de *G. crinita*; **c)** Relación LEF y Conductividad de protones de la ATP sintasa del cloroplasto (vH^+) de *C. spruceanum*; **d)** Relación PAR y LEF de *C. spruceanum*.

4.1.5. Variación fotosintética en diferentes niveles del dosel de árboles de *C. spruceanum* y *G. crinita*

Como nuestros resultados mostraron cambios abruptos en la fenología fotosintética de *G. crinita* y *C. spruceanum* entre los meses de abril, mayo y junio (Figura 12, 13), fue necesario conocer a mayor detalle el desarrollo foliar en ese periodo donde las hojas modifican sus respuestas fisiológicas para adaptarse a un ambiente más frío (Figura 12). El aparato fotosintético de las hojas en crecimiento madura progresivamente llegando a su desarrollo pleno cuando el área foliar y la concentración de clorofila alcanzan sus valores máximos (Figura 12, 13), mientras que la longevidad de las hojas depende en gran parte de la forma de crecimiento de las plantas. Algunos estudios en ecosistemas tropicales mencionan que la temperatura óptima de síntesis general de clorofila vegetal es de 30° C (Nagata et al., 2005), nuestros resultados mostraron que el rango de temperatura óptima para la fotosíntesis y el crecimiento de las plantas de *G. crinita* y *C. spruceanum* se encontraron entre los 25 y 30 °C (Figura 8).

De acuerdo con nuestros resultados, en los meses de abril, mayo y junio se evidenciaron cambios abruptos en el crecimiento del tallo (Figura 7a, b) y los rasgos fotosintéticos (Figura 12, 13). Por tanto, evaluamos en este periodo la dinámica del PSII en las hojas en tres secciones del dosel (Superior, Medio e Inferior) durante 3 meses (abril, mayo, junio). En *G. crinita*, los resultados muestran que las hojas jóvenes en el mes de abril, presentaron menores valores de clorofila relativa, PhiNPQ, NPQt y qL respecto de las hojas más viejas (Figura 12a, f, h, l). Sin embargo, la dinámica del desarrollo foliar nos permitió notar un incremento constante en el porcentaje de clorofila relativa y PhiNO a medida que la hoja alcanzó su madurez en el dosel (Figura 12a, e). Por el contrario, las hojas viejas de la parte inferior del dosel redujeron la concentración de clorofila al igual que los valores de Phi2, Fv/Fm y Rfd (Figura 12d, g, i). Respecto a la temperatura de la hoja, no se encontró cambios significativos entre hojas de diferente etapa de desarrollo, sin embargo, se redujo de 29°C a 23 °C (Figura 12b), esto debido a que las mediciones se efectuaron en el paso estacional de temporada

cálida a fría. Por otro lado, el flujo de protones (gH^+ y vH^+) y electrones (LEF) fue mayor en las hojas jóvenes que en las hojas viejas (Figura 12c, j, k).

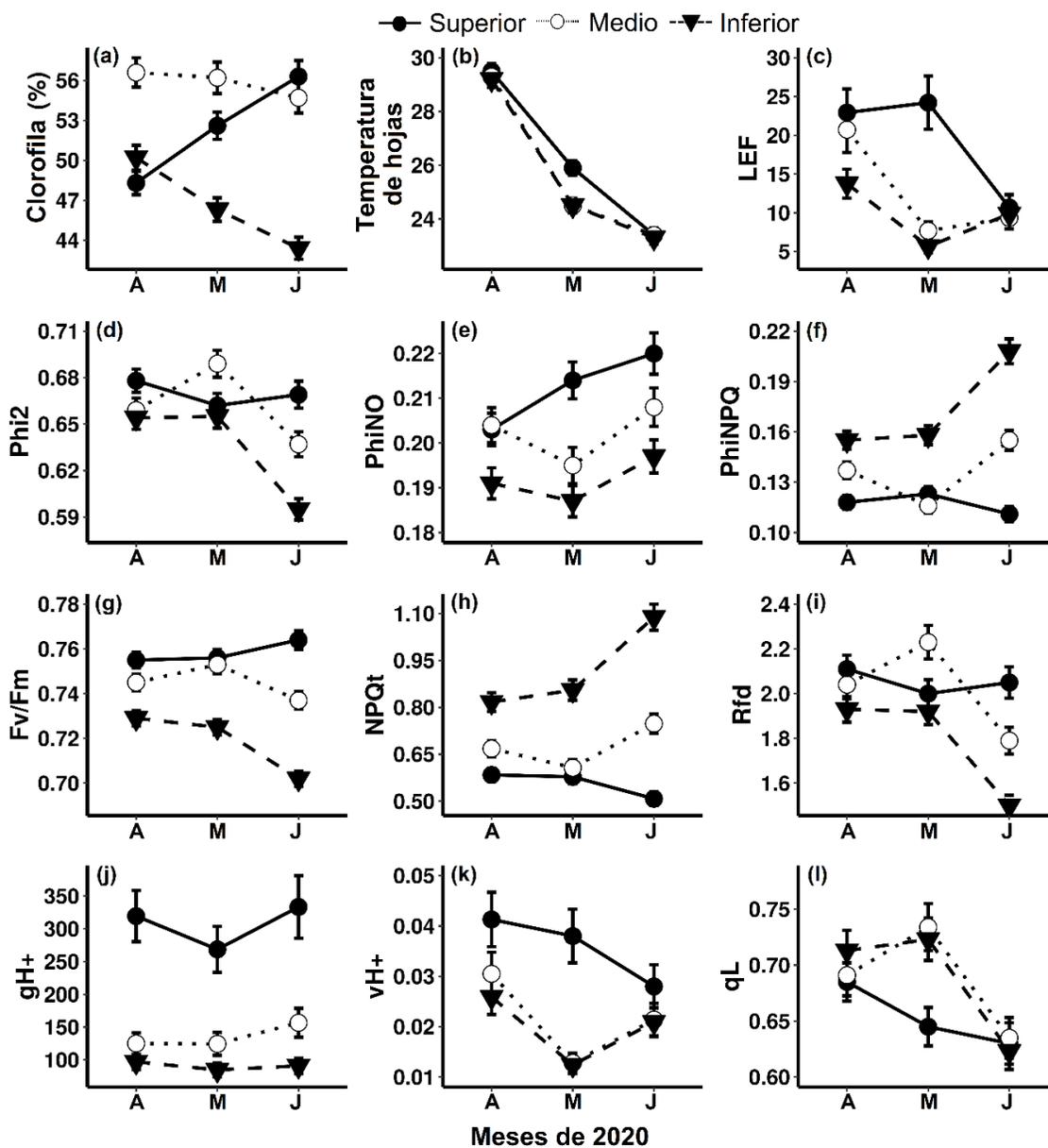


Figura 12. Evaluación trimestral de parámetros fotosintéticos en el desarrollo de las hojas en *G. crinita*

Nota. **a)** Clorofila relativa. **b)** temperatura de la hoja; **c)** flujo lineal de electrones (LEF); **d)** Rendimiento cuántico del Fotosistema II (Φ_2); **e)** Rendimiento de disipación de energía no regulada (Φ_{NO}); **f)** Rendimiento de extinción no fotoquímica (Φ_{NPQ}); **g)** Máxima eficiencia cuántica del Fotosistema II (F_v/F_m); **h)** extinción no fotoquímica corregida por F_m (NPQ_t); **i)** Relación de disminución de la fluorescencia de la clorofila (R_{fd}); **j)** tasa de flujo de protones en estado estacionario a través de la ATP sintasa del cloroplasto (g_{H^+}); **k)** Conductividad protónica de la ATP sintasa del cloroplasto (v_{H^+}); **l)** Fracción de centros del Fotosistema II que se encuentran en estado abierto (q_L). La medición fue realizada en tres meses del año: Abril (A), Mayo (M) y Junio (J).

Como muestra la Figura 12, las tasas fotosintéticas del dosel varían según el clima y los diferentes estadios de desarrollo de las hojas en las copas de los árboles (Figura 12, 13), donde la dinámica y longevidad de las hojas son reguladas para maximizar la ganancia de carbono y la eficiencia en el uso de los recursos energéticos (Figura 12).

Sin embargo, en la Figura 12a y 13a podemos apreciar que las hojas jóvenes incrementaron su concentración de clorofila relativa a pesar de la reducción de la temperatura foliar de 29°C a 23°C . Asimismo, en un periodo de 90 días las hojas jóvenes alcanzaron la misma concentración de clorofila relativa que las hojas maduras de la parte media del dosel (Figura 12a, 13a), contrario a ello se evidenció una reducción significativa del porcentaje de clorofila de las hojas viejas después de la maduración (Figura 12a, 13a), confirmando de este modo que el porcentaje de clorofila está asociado a la edad de las hojas. Además la variación de los pigmentos de clorofila y del PSII están regulados por los cambios de la expresión génica, factores ambientales y la edad de las hojas (Pleban y Ewers, 2020; Tiwari et al., 2020; Wong et al., 2019), pudimos notar que las hojas de la parte superior del dosel de *G. crinita* incrementaron significativamente los valores de F_v/F_m y Φ_{NO} (Figura 12e, g), mientras que los valores de Φ_2 , Φ_{NPQ} , R_{fd} , g_{H^+} (Figura 12d, f, i, j) se mantuvieron constantes, contrario a ello se redujeron los niveles de NPQ_t , v_{H^+} y q_L (Figura 12h, k, l).

Los resultados obtenidos indicarían que las hojas de la parte superior tienen mayor capacidad de adaptación que las hojas de la parte inferior del dosel. Estos resultados también fueron corroborados en estudios de *Guazuma ulmifolia* (Malvaceae) donde las hojas jóvenes presentan mayor plasticidad fenotípica para adaptarse al ambiente, logrando tolerar y superar los cambios en la intensidad de la luz, mientras que las hojas maduras muestran una

plasticidad menor ya que las paredes celulares son rígidas y no se puede realizar reordenamientos estructurales importantes (Pires et al., 2018). Asimismo, los cambios temporales de la intensidad de la luz y la temperatura influyen e inducen a determinados ajustes en los rasgos anatómicos, morfométricos y de funcionamiento del PSII en las hojas (Pires et al., 2018). A mayores intensidades de luz se desarrollan hojas más gruesas y pequeñas, incrementándose las concentraciones de la RuBisCO y el flujo de electrones, respecto a las hojas desarrolladas bajo condiciones de sombra. Para *G. ulmifolia* no quedó claro si la recuperación de la fotosíntesis se debió al desarrollo de nuevas hojas aclimatadas a la luz intensa o la aclimatación de las hojas maduras, ya que los análisis siempre se realizaron en la penúltima hoja totalmente expandida.

Consecuentemente, nuestros resultados mostraron que las hojas de la parte superior del dosel al estar expuestas a mayor horas luz y en completo desarrollo, presentan mayores tasas fotosintéticas (Figura 12d) y por tanto mayor asimilación de carbono. Asimismo, es posible que en *G. crinita* la recuperación de la fotoinhibición radique en el desarrollo completo de nuevas hojas (Figura 12d, g), siendo fuente de asimilación del CO₂ de la atmósfera, y lo convierten en glucosa y otros azúcares, que posteriormente los exportan para el crecimiento de los órganos sumideros como el tallo, ramas y raíces de las plantas jóvenes. Por otra parte, de los diferentes grados de desarrollo foliar las limitaciones bioquímicas y estructurales de las hojas viejas pueden resultar en tasas fotosintéticas más bajas hasta en un 50% antes del inicio de la senescencia de la hoja respecto de las hojas jóvenes completamente desarrolladas (Grassi y Magnani, 2005). En consecuencia, en este estudio también proporcionamos evidencias de que las hojas desarrolladas de la parte superior del dosel de *G. crinita* tienen mayor capacidad fotosintética y suministrarían más fotosintatos y contribuirían en una mayor síntesis de celulosa en la parte superior del tallo (Figura 12a, b, c, d), los cortes histológicos nos mostraron fibras con mayor diámetro de lumen, respecto de la parte media e inferior del tallo. Por tanto, posiblemente el flujo de fotosintatos de la fuente al sumidero de carbono sea más próximo, reduciendo gasto de energía de transporte por todo el tallo del árbol, esto nos ayudaría a entender porque *G. crinita* mantiene mayores tasas de crecimiento (Figura 7) y en muchos casos no mostrando anillos de crecimiento bien definidos.

En *C. spruceanum*, los resultados indican cambios marcados en las características fotosintéticas de las hojas de la parte superior, media e inferior del dosel (Figura 13a, e, f, g,

h). A medida que disminuye la temperatura foliar en las tres secciones evaluadas (Figura 13b), se observa también una reducción en el flujo lineal de electrones (LEF) y flujo de protones (vH^+) (Figura 12, 13c, k). Por otra parte, independientemente de las tendencias de temperatura, los valores de clorofila relativa incrementaron en las hojas de la sección superior del dosel contrario a las hojas de la parte baja, las hojas de la sección media de la copa se mantuvieron relativamente constante (Figura 13a). Asimismo, los valores de Φ_2 y R_{fd} indicaron que en el mes de abril y mayo no hubo diferencias estadísticas entre las hojas de la partes superior e inferior de las copas (Figura 13d, i), sin embargo, a medida que envejecen las hojas de la parte inferior del dosel también reducen su rendimiento fotosintético (Figura 13d, g, i), contrario a ello las hojas de la parte superior y medio del dosel incrementaron su rendimiento fotosintético, y utilizaron mayor luz en procesos no regulados (Φ_{NO}) (Figura 13e). Respecto a los valores de Φ_{NPQ} , NPQ_t las hojas más viejas no mostraron cambios significativos durante los 3 meses evaluados (Figura 13f, h), contrario a ello decayeron en las hojas de la sección media y superior, de esa forma se evidencia que la especie regula la fotoprotección de sus hojas para optimizar el uso de energía para el crecimiento.

Por el contrario, como muestran los resultados en las Figuras 13 y 14, encontramos algunas diferencias en los patrones de las actividades fotosintéticas y de xilogénesis en las tres secciones del dosel en *C. spruceanum*, de acuerdo con Santano et al., (2020) estas diferencias se deben porque tienen asignación diferencial de nutrientes como el nitrógeno (N y C) que corresponde al hábito de crecimiento foliar. Una hoja caducifolia busca alcanzar una mayor tasa fotosintética en menor tiempo que una hoja perenne ya que esta puede invertir el nitrógeno preferentemente en componentes estructurales. Aunque las hojas viejas de *C. spruceanum* reducen la concentración de clorofila (Figura 13a), los valores de Φ_2 , R_{fd} y q_L (Figura 13d, i, l) incrementaron en el periodo de invierno (Figura 13), el rendimiento cuántico máximo (F_m/F_v), NPQ_t y Φ_{NPQ} se mantuvieron constante (Figura 13f, g, h), mientras que hubo una reducción significativa en el flujo lineal de electrones (LEF), la tasa de flujo de protones a través de la ATP sintasa del cloroplasto (gH^+) y la conductividad de protones de la ATP sintasa del cloroplasto (vH^+) (Figura 13c, j, k). A pesar de la senescencia de las hojas de *C. spruceanum*, estas podrían seguir proporcionando fotosintatos (Figura 13d). En un reporte de Brodribb y Holbrook (2003) mencionan que las hojas de *Calycophyllum candidissimum* (Rubiaceae) disminuyen de cinco a diez veces la

conductancia hidráulica de la hoja entre el periodo de rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m) y momentos antes de la caída de las hojas. Además, mencionan, que una característica inusual de esta disminución en la conductancia hidráulica de la hoja fue que el PSII inicialmente no se vio afectada. En nuestros resultados también encontramos una característica inusual, las hojas viejas no perdieron su capacidad fotosintética a pesar de presentar menor porcentaje de clorofila, LEF, gH^+ y vH^+ (Figura 13a, c, j, k). Por otro lado, a pesar de no encontrar correlación entre Φ_2 y diámetro del lumen de la fibra en *C. spruceanum* (Figura 14h), presumimos que el metabolismo del carbono de las hojas viejas coincide con la absorción continua de energía luminosa a baja temperatura maximizando el uso de la energía química, posteriores estudios bioquímicos podrán ayudar a dilucidar mejor los procesos de acumulación de productos fotosintéticos.

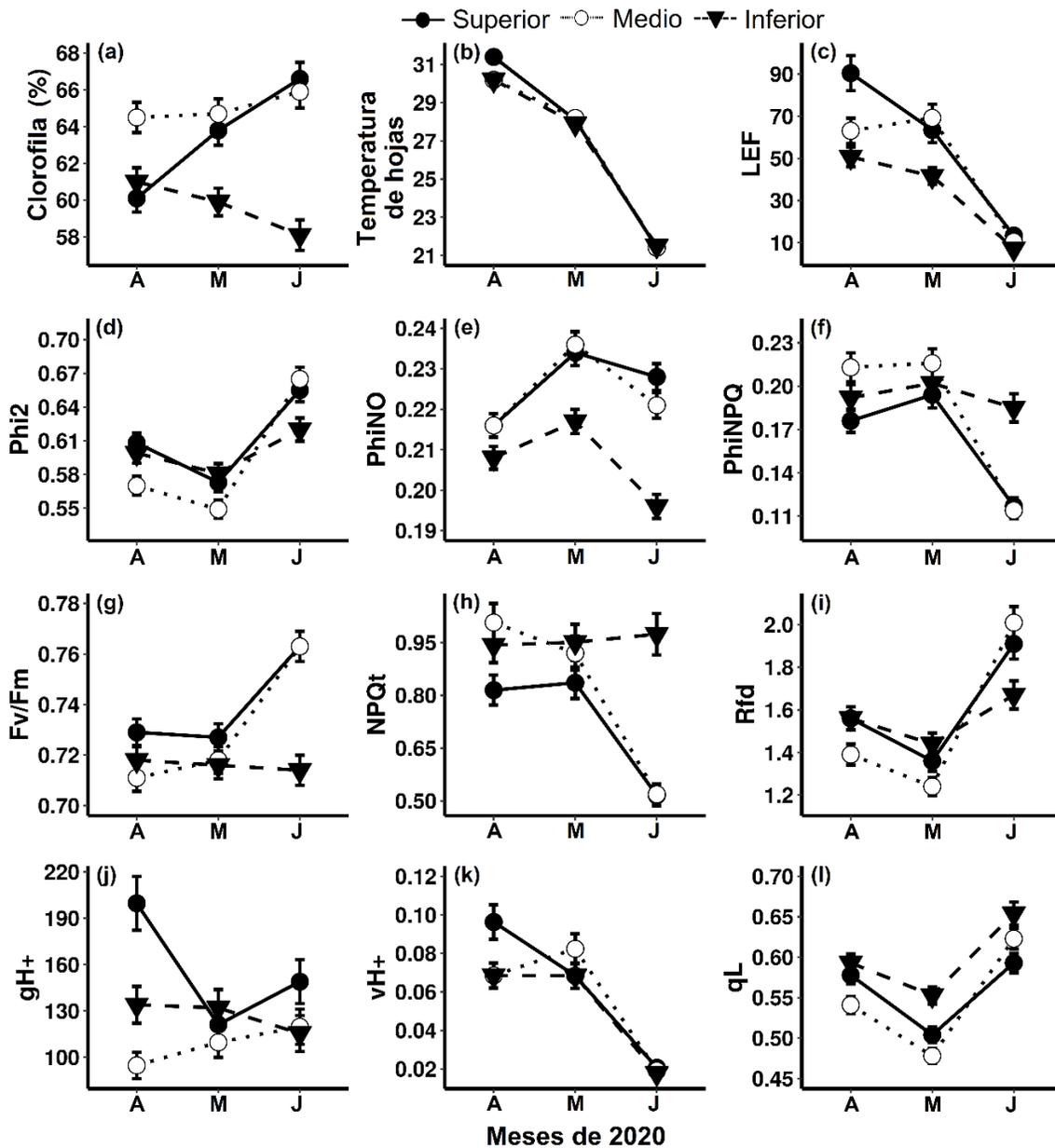


Figura 13. Evaluación trimestral de parámetros fotosintéticos en el desarrollo de las hojas en *C. spruceanum*

Nota. **a)** Clorofila relativa. **b)** temperatura de la hoja; **c)** flujo lineal de electrones (LEF); **d)** Rendimiento cuántico del Fotosistema II (Phi2); **e)** Rendimiento de disipación de energía no regulada (PhiNO); **f)** Rendimiento de extinción no fotoquímica (PhiNPQ); **g)** Máxima eficiencia cuántica del Fotosistema II (Fv/Fm); **h)** extinción no fotoquímica corregida por Fm (NPQt); **i)** Relación de disminución de la fluorescencia de la clorofila (Rfd); **j)** tasa de

flujo de protones en estado estacionario a través de la ATP sintasa del cloroplasto (g_{H^+}); **k**) Conductividad protónica de la ATP sintasa del cloroplasto (v_{H^+}); **i**) Fracción de centros del Fotosistema II que se encuentran en estado abierto (q_L).

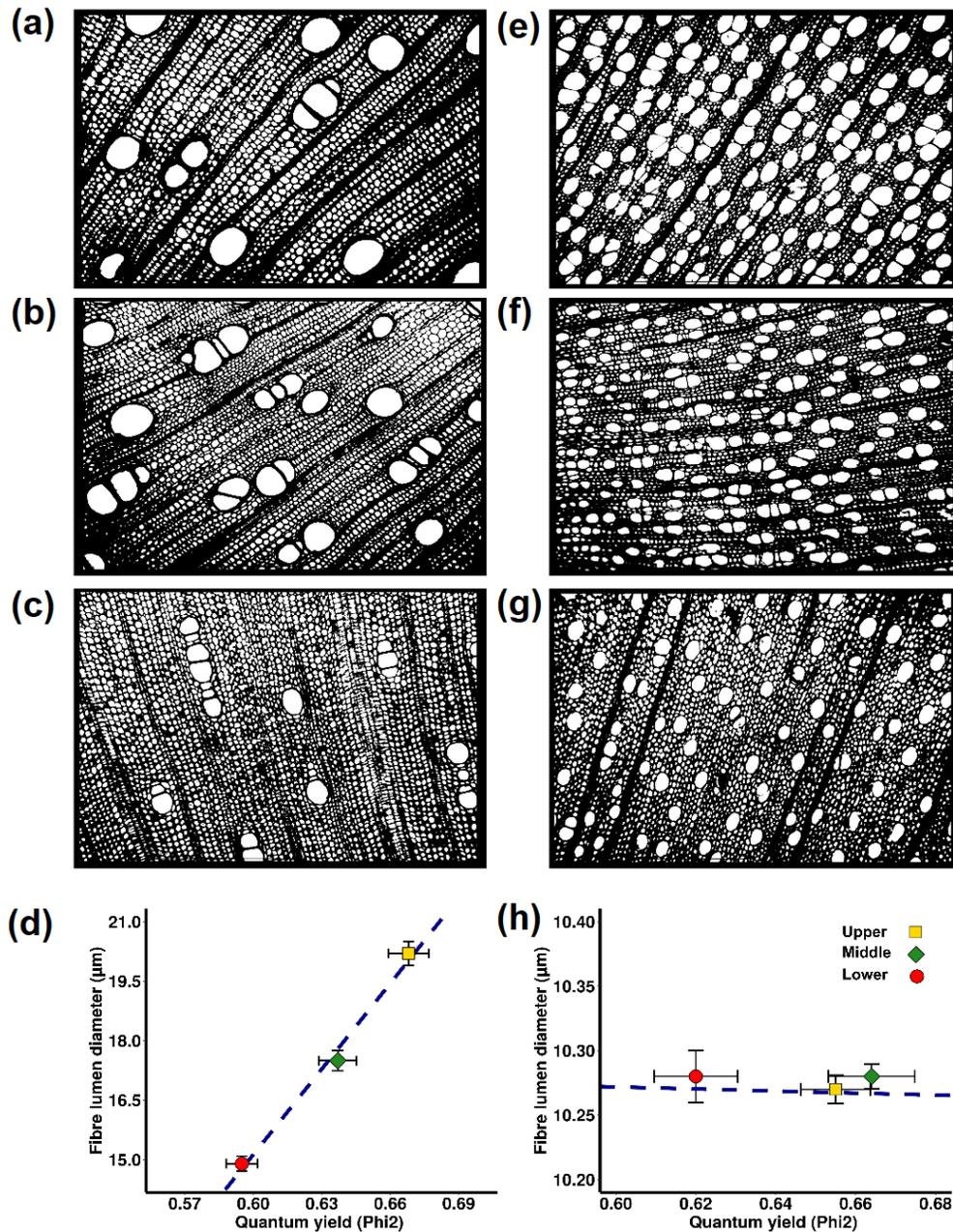


Figura 14. Cortes histológicos transversales del tallo en tres secciones (superior, medio, inferior)

Nota. **a)** Corte histológico parte superior de *G. crinita*, **b)** Corte histológico parte media de *G. crinita*, **c)** Corte histológico parte inferior de *G. crinita*, **d)** Correlación entre rendimiento cuántico del fotosistema II (Phi2) y diámetro de lumen de fibra (μm) de *G. crinita*. **e)** Corte histológico parte superior de *C. spruceanum*, **f)** Corte histológico parte media de *C. spruceanum*, **g)** Corte histológico parte inferior de *C. spruceanum*, **h)** Correlación entre el rendimiento cuántico del fotosistema II (Phi2) y el diámetro de lumen de fibra (μm) de *C. spruceanum*.

Por otra parte, evaluamos las relaciones entre el diámetro de lumen (DL) y el rendimiento cuántico (Phi2) de tres secciones del tallo (Superior, Medio e Inferior) (Figura 14), los resultados muestran que las dos especies tienen patrones diferentes en la biosíntesis de fibras a través del crecimiento longitudinal del tallo (Figura 14d, h). En *G. crinita* encontramos correlaciones positivas significativas entre DL y Phi2 ($r^2 = 0.91$; $p\text{-valor} \geq 0.005$), en la parte apical del tallo el DL fue de $20.4 \pm 0.4 \mu\text{m}$, en la parte media fue $17.5 \pm 0.4 \mu\text{m}$ y en la parte basal $15 \pm 0.4 \mu\text{m}$ (Figura 14d), indicando que a mayor potencial fotosintético de las hojas jóvenes más desarrolladas hay un mayor DL. Por otro lado, en *C. spruceanum* no se encontró correlación entre Phi2 y DL ($r^2 = 0.05$; $p\text{-valor} \geq 0.5$), y el DL mantuvo rangos de $10.23 \pm 0.4 \mu\text{m}$ y $10.27 \pm 0.4 \mu\text{m}$ (Figura 14h).

4.1.6. Influencia de las variables ambientales y fisiológicos en el crecimiento de *C. spruceanum* y *G. crinita*

Para conocer más sobre la relación del crecimiento con la fotosíntesis y las variables climáticas, evaluamos a través de modelos generalizados mixtos la relación del incremento mensual de diámetro y altura de los árboles respecto a las variables predictoras de clima (humedad, temperatura y radiación), fenotipos de hojas y fotosíntesis. Los resultados mostraron que el tamaño y el número de hojas están asociados con el mayor incremento de diámetro y altura en las dos especies. Respecto a la influencia de los parámetros fotosintéticos en los cambios dasométricos de los árboles, no se encontró patrones definidos para ambas especies (Figura 15). En *G. crinita*, los resultados muestran que un mayor grosor de la hoja y valores de apagado no fotoquímico corregido para Fm (NPQt) afectan negativamente en el diámetro basal de los árboles de bolaina (Figura 15a), mientras que la variable explicativa más importantes en el incremento del diámetro fue el ECSt mAU (Figura 15a). Finalmente,

sobre los cambios en la altura de los árboles de *G. crinita*, un mayor incremento en la conductividad de protones de la ATP sintasa (gH+) estaría asociada con el menor incremento de altura (Figura 15b).

Por otra parte, *C. spruceanum* presenta un mayor incremento diametral (mm) mensual a medida que aumenta la temperatura, el porcentaje la clorofila relativa y el rendimiento fotosintético (Phi2) (Figura 15c). Contrario a ello la humedad y los valores de desplazamiento electrocrómico (ECSt MAU) tendrían un efecto negativo (Figura 15c). Por otro lado, la altura de los árboles de *C. spruceanum* mostraron un incremento a medida que se incrementa el rendimiento fotosintético (Phi2), mientras que el incremento en la humedad, NPQt y ECSt MAU afectaron negativamente en el crecimiento mensual de la altura (Figura 15d).

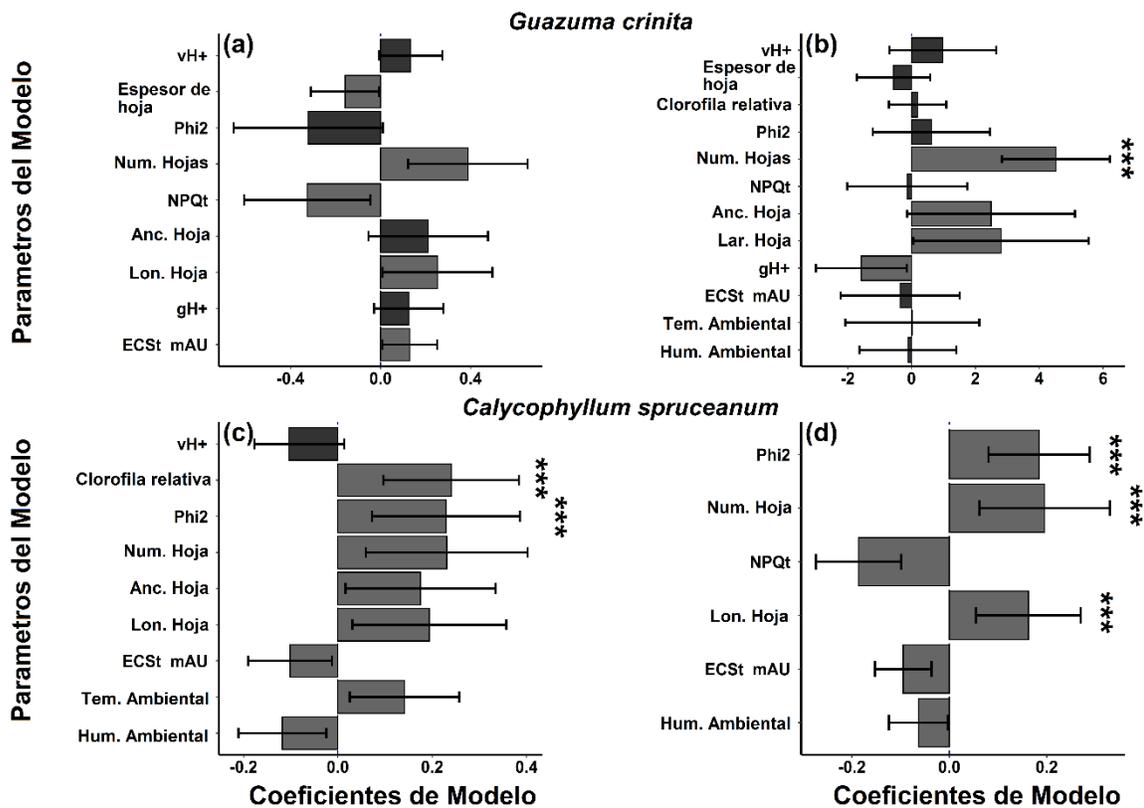


Figura 15. Coeficientes promedio del modelo que influyen en el mayor incremento del diámetro y la altura de los árboles de *G. crinita* y *C. spruceanum*

Nota. a) Variables predictoras que influyen en el incremento mensual de diámetro basal de los árboles de *G. crinita*. b) Variables predictoras que influyen en el incremento mensual de la altura de los árboles de *G. crinita*. c) Variables predictoras que influyen en el incremento

mensual de diámetro basal de los árboles de *C. spruceanum*. **d)** Variables predictores que influyen en el incremento mensual de la altura de los árboles de *C. spruceanum*: Los colores plomos indican diferencias significativas con un valor de $p \leq 0,05$.

4.2. Evolución estructural de las isoformas de RuBisCO

El segundo objetivo de la tesis, fue evaluar la evolución de la secuencia y estructura de la Isoforma I (*G. crinita* y *C. spruceanum*), Isoforma II e Isoforma III de RuBisCO, y como esta define la flexibilidad intrínseca y la interacción residuo-residuo.

Para ello, primero se seleccionaron todas las estructuras de RbcL almacenadas en la base de datos PDB (protein data bank). Luego, todas las conformaciones se superpusieron estructuralmente a través de los átomos C- α , seguidamente se utilizó el análisis de componentes principales (PCA) para clasificar las diferentes isoformas de la RuBisCO. Posteriormente, en función del PCA, se seleccionaron estructuras de RbcL Wt y mutantes de organismos modelo con una resolución ≤ 2.7 Å (Blow, 2002; Yu-Feng, 2007), que no presenten residuos de aminoácidos perdidos, y que la estructura cristalizada sea ≥ 95 % de la proteína (RbcL) total en las tres isoformas (I, II, III).

Para clasificar evolutivamente a la RbcL de *G. crinita*, *C. spruceanum* y las estructuras seleccionadas, se desarrolló un árbol filogenético siguiendo los pasos presentados por Kacar et al., (2017), se utilizó secuencias de la familia del grupo IV como el grupo externo para enraizar el árbol (Kacar et al., 2017). El gráfico final de la filogenia fue desarrollado usando el *software* Mega6 (Tamura et al., 2013).

Estos estudios anteriores, permitieron seleccionar 6 estructuras de la isoforma I (código PDB: 1WDD, 4RUB, 5IU0, 1IWA, 1GK8 y 6FTL), 3 de la isoforma II (código PDB: 4LF1^{WT}, 5HAN y 5HJX) y 3 de la isoforma III (código PDB: 3A12^{WT}, 3KDO y 3WQP) (Anexo 7). Los residuos de aminoácidos faltantes fueron completados utilizando el *software* MODELLER versión 10.0 (Accelrys, San Diego, CA, USA) (Webb y Sali, 2016). Posteriormente, se realizó las dinámicas moleculares usando el *software* GROMACS2020 versión GPU (Abraham et al., 2015). Para desarrollar los análisis de PCA y DCCM (Dinámica de correlación cruzada) se utilizó el paquete Bio3D siguiendo las recomendaciones de Yu y Dalby (2020). Mientras que los análisis de RMSD (Raíz de la

desviación cuadrática media) y RMSF (Fluctuación cuadrática media) fueron realizados usando comandos particulares del software GROMACS2020.

4.2.1. Clasificación de las Formas de RuBisCO

Los resultados del fenotipado fotosintético de *G. crinita* y *C. spruceanum*, mostraron patrones diferentes en la primera etapa de la fotosíntesis (fotoquímica) que permite la obtención de ATP y NADPH. Estas diferencias en los procesos de biosíntesis de ATP y NADPH influyen en el ciclo de Calvin-Benson-Bassham para la obtención de azúcares (Tominaga et al., 2020). En esta etapa, la RuBisCO desempeña un papel clave en la fijación de carbono, es una enzima que posiblemente evolucionó en el Archean Eon (Iñiguez et al., 2020), en un ambiente anaeróbico a partir de una enzima ancestral no fijadora de carbono mucho antes de la aparición del ciclo de Calvin-Benson-Bassham (Erb y Zarzycki, 2018; Poudel et al., 2020). Después de la aparición de la fotosíntesis oxigenada, RuBisCO experimentó una evolución limitada en el sitio activo para mantener su eficiencia de fijación de CO₂ en presencia de O₂ (Andersson y Backlund, 2008; Poudel et al., 2020). Actualmente, es importante mejorar la especificidad (CO₂, O₂) o la eficiencia catalítica de la carboxilación como herramienta para reducir las emisiones de CO₂, mitigar los efectos del cambio climático e incrementar el rendimiento de las especies.

En consecuencia, del banco de datos de proteínas RCSB se descargaron 64 estructuras cristalizadas de RbcL de RuBisCO, 18 estructuras no se consideraron debido a la falta de coordenadas, lo que deja 46 complejos de RuBisCO entre nativas y mutantes (Figura 16), (Anexo 7). Seguidamente, se realizó el análisis de componentes principales (PCA), para ello se superpusieron las proteínas de RbcL sobre el área con menor variación estructural, esto permitió investigar las principales diferencias conformacionales entre las estructuras homólogas a través de la comparación de perfiles de flexibilidad estructural. El 73 % de la varianza total de las fluctuaciones atómicas se capturó a lo largo del primer componente principal (PC), mientras que la segunda y tercera dimensión fueron necesarias para capturar el 83.2 % y 88.2 % respectivamente de la varianza (Figura 16).

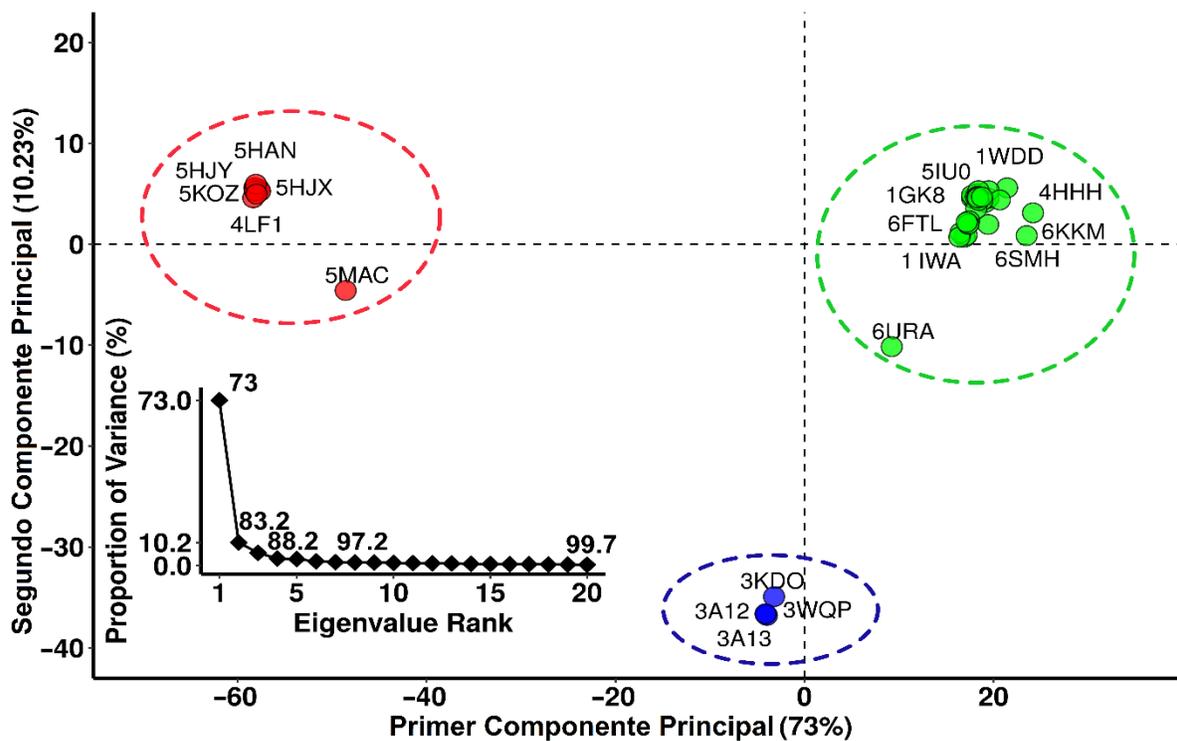


Figura 16. Análisis de componentes principales (PCA) de las estructuras PDB disponibles para las formas de RuBisCO RbcL

Nota. Proyección de los dos primeros componentes principales que representan un total de 73 % de la varianza, los tres colores muestran los tres diferentes clústeres de RbcL; Clúster 1 color verde; Clúster 2 color rojo y Clúster 3 color azul.

El PCA de las estructuras se clasificaron principalmente en tres clústeres conformacionales de RuBisCO (Figura 16). De los cuales el clúster más grande corresponde a 32 proteínas (color verde: 1BXN, 5OYA, 6FTL, 5MZ2, 5NV3, 1IWA, 1BWV, 5WSK, 2V6A, 1UW9, 2V68, 2VDH, 2VDI, 1GK8, 2V69, 4HHH, 4RUB, 5IU0, 4MKV, 1IR1, 1WDD, 3ZXW, 1RSC, 1RBL, 7JFO, 6URA, 1SVD, 1RLC, 1RLD, 1EJ7, 6SMH y 6KKM) e involucra a la mayoría de las estructuras de RuBisCO de plantas superiores (Ejemplo *C. spruceanum* y *G. crinita*), algas verdes, algas verdes azuladas, cianobacterias, diatomeas y proteobacterias. El surgimiento del complejo de forma I a través de la incorporación de pequeñas subunidades representa una transición clave aunque poco entendida en la evolución de RuBisCO (Genkov y Spreitzer, 2009). Sin embargo, el PCA mostró que la estructura 6URA de la especie *Promineofilum breve* (Bacteria) presenta una flexibilidad estructural que la agrupa en

isoforma I (Figura 16), teniendo en consideración que 6URA no presenta subunidades pequeñas RbcS (Banda et al., 2020) y además presenta deleciones en elementos estructurales secundarios loop-CD y loop que conecta $\alpha 8$ - αG , la convierte en un punto de referencia para avanzar en nuestra comprensión de la evolución de Forma I.

El segundo clúster (color rojo) está conformado por 10 proteínas (5MAC, 4LF1, 5HQM, 5KOZ, 5HQL, 5HJY, 5HAT, 5HAN, 5HAO y 5HJX) y son principalmente proteobacterias que presentan la Forma II de RuBisCO, a excepción de la arquea *Methanococoides burtonii* (5MAC) que presenta una isoforma II/III (Iñiguez et al., 2020; Liu et al., 2017), debido a que tienen una mayor similitud general con la RuBisCO bacteriana de Forma II, pero tienen residuos específicos como una inserción única de 26-30 aminoácidos entre las estructuras secundarias $\alpha 6$ y $\beta 7$ en la parte inferior del barril $\beta\alpha$ (Alonso et al., 2009), además presentan características estructurales y catalíticas que se asemejan más a la Forma III de arqueas (Figura 16). los metanógenos son estrictamente anaeróbicos y no pueden sobrevivir en presencia de oxígeno (Gunn et al., 2017); por lo tanto, su RuBisCO no estaría bajo presión de selección para mitigar la unión competitiva de O₂ sobre CO₂.

En el tercer clúster (color rojo) hay 4 proteínas (3KDO, 3A13, 3WQP y 3A12), que correspondieron al linaje de arqueas. A pesar de tener tan solo un 30% de identidad de aminoácidos, todas mostraron la estructura de la subunidad L conservada que comprende un dominio N-Terminal (aproximadamente de 150 aminoácidos) y el dominio C-Terminal más grande (aproximadamente 320 aminoácidos) que forma un barril α/β .

En función del análisis de componentes principales (Figura 16), se seleccionaron estructuras de RbcL Wt y mutantes de organismos modelo con una resolución ≤ 2.7 Å, que no presenten residuos de aminoácidos perdidos, y que la estructura cristalizada sea ≥ 95 % de la proteína (RbcL) total. Este criterio permitió seleccionar 6 estructuras wild-type del primer clúster (color verde: 1WDD, 5IU0, 4RUB, 1GK8, 6FTL y 1IWA) (Figura 16), del segundo clúster (color rojo) fueron seleccionados 1 estructura wild-type (4LF1) y 2 mutantes (5HJX^{A47V} y 5HAN^{S59F}), y del tercer clúster (color azul) se seleccionaron 1 wild-type (3A12) y 2 mutantes (3KDO^{SP6} y 3WQP^{T289D}) (Figura 16).

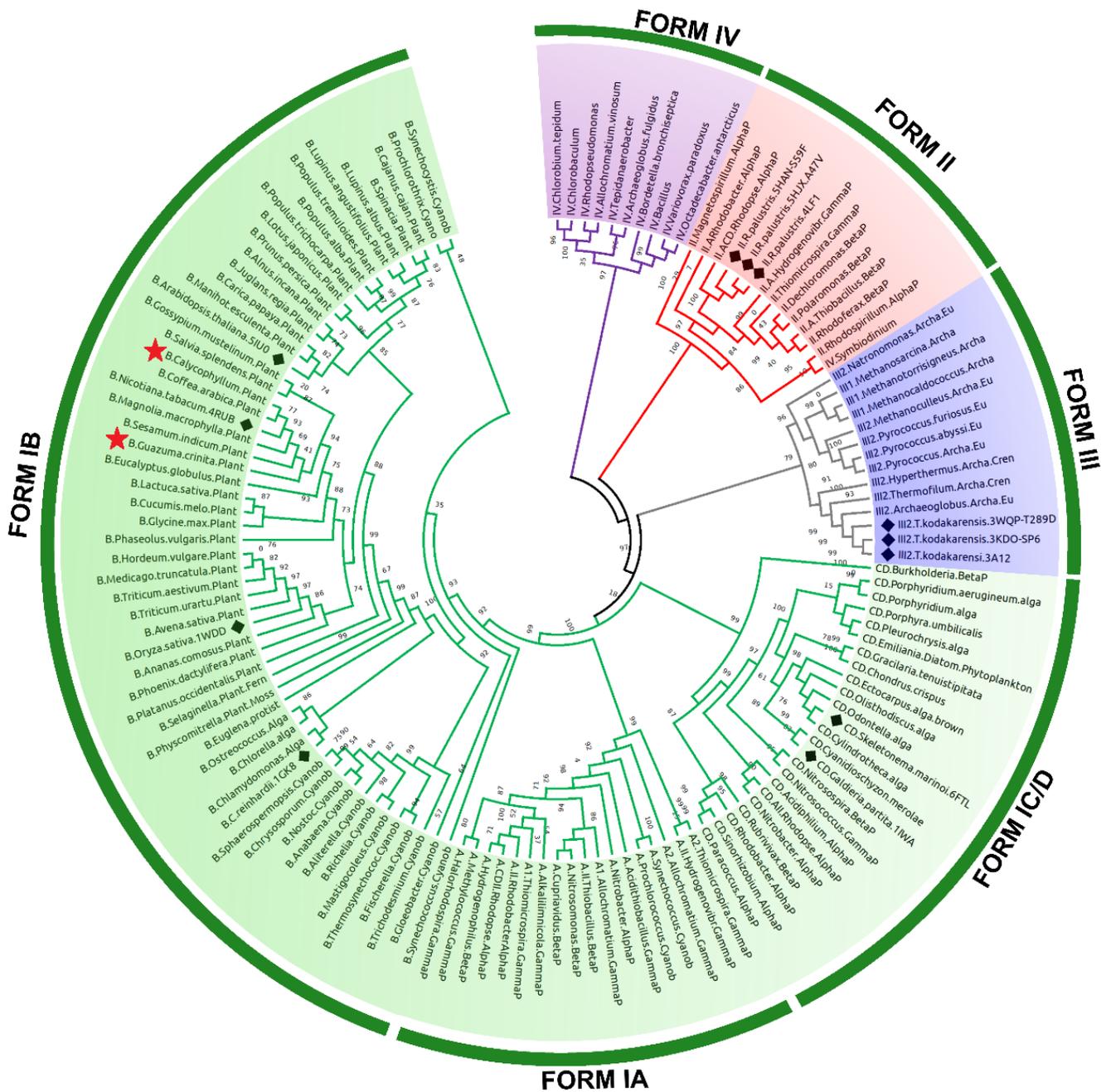


Figura 17. Análisis filogenético de máxima verosimilitud de la familia de proteínas RuBisCO RbcL

Nota. Cuatro formas de RuBisCO están clasificadas con diferente color de ramas (verde, azul, rojo y morado) a lo largo de una trayectoria evolutiva desde el ancestro común más reciente (MRCA) de los grupos VI, II y III hasta el MRCA del Grupo IB. Las secuencias ancestrales se etiquetan según su pertenencia a las subfamilias de RuBisCO. Las posiciones

filogenéticas de las proteínas Wt y mutantes seleccionadas por cada forma de RuBisCO están marcadas en negro. La posición de *C. spruceanum* y *G. crinita* están indicadas por estrellas de color rojo.

Para clasificar evolutivamente a *G. crinita* y *C. spruceanum*, respecto de las 12 estructuras seleccionadas en función de los grupos y subgrupos evolutivos se realizó un árbol filogenético de Máxima verosimilitud (ML) con 137 secuencias de aminoácidos de RbcL de RuBisCO. El análisis filogenético (Figura 17) permitió identificar las diferentes isoformas de RuBisCO, respaldando la idea evolutiva en que RuBisCO fotosintético (forma I, II y III) y RuBisCO-like proteins (RLP, Forma IV) evolucionaron a partir de la misma proteína ancestral (Ashida et al., 2008; Saito et al., 2009; Tabita et al., 2008). Las secuencias RbcL del clado de la isoforma I presenta los subgrupos IA, IB e IC / D, que incluye plantas superiores, cianobacterias, algas verdes, algas rojas y algunas bacterias. Consecuentemente, las estructuras de RuBisCO de las especies *G. crinita*, *C. spruceanum*, *A. thaliana* (5IU0), *Nicotiana tabacum* (4RUB), *Oriza sativa* (1WDD) y *Chlamydomonas reinhardtii* (1GK8) correspondieron al subgrupo IB (Figura 17), donde la estructura de *N. tabacum* fue más cercano evolutivamente a *G. crinita*, *C. spruceanum* (Figura 17). Por otro lado, las especies *Galdieria partita* (1IWA) y *Skeletonema marinoi* (6FTL) están relacionados con el subgrupo IC/D (Figura 17). Las secuencias de RbcL de la isoforma II incluye proteobacterias y algunas alveolatos eucariotas, asimismo dentro de este clado se ubica *Rhodospseudomonas palustris*, wild-type (4LF1) y mutantes (5HJX^{A47V} y 5HAN^{S59F}) (Figura 17). Las estructuras wild-type (3A12) y mutantes (3KDO^{SP6} y 3WQP^{T289D}) pertenecen a la especie *Thermococcus kodakarensis*, linaje arquea y su estructura de RuBisCO es la forma III (Figura 17).

Por otra parte, los resultados muestran diferentes tamaños de la RbcL entre las especies e isoformas. En la isoforma I, *G. partita* presenta 493 residuos de aminoácidos, seguido de *S. marinoi* (484), *A. thaliana* (479), *C. spruceanum* (478), *G. crinita*, *N. tabacum* y *O. sativa* con 477 respectivamente y *C. reinhardtii* con 475 residuos de aminoácidos. En la isoforma II, *R. palustris* tendría 461 residuos, mientras que en la isoforma III *T. kodakarensis* alcanzaría un tamaño de 444 residuos de aminoácidos. Asimismo, es posible que el aumento en la complejidad molecular observada en la RbcL este reflejada en la evolución de las isoformas (Figura 17), permitiendo a los organismos fotosintéticos adoptar diferentes estrategias como mejorar la especificidad de CO₂ (caso de *Galdieria partita*) (Sugawara et

al., 1999), aumentar la concentración de CO₂ intracelular a través de la expresión de un mecanismo de concentración de carbono, o habitar nichos ecológicos que mantienen bajos niveles de O₂/CO₂ como las metanogénicas (caso *Methanococcoides burtonii*) (Poudel et al., 2020).

Respecto a los análisis de alineamiento de secuencia múltiple entre las tres isoformas, la RuBisCO mostró grandes cambios en las regiones N-Terminal y C-Terminal, donde los diferentes tamaños de la RbcL están asociados con el aumento en la complejidad molecular de RuBisCO. Sin embargo, a pesar de tener tan solo un 30% de identidad de aminoácidos, las estructuras conservan los residuos implicados en la unión del sustrato y la actividad catalítica (Figura 18) respaldando la idea de que son fundamentales para plegar y mantener la estructura y funcionamiento general de la RuBisCO fotosintética (Andersson y Backlund, 2008; Poudel et al., 2020). En la Figura 18, se muestra a los residuos del sitio activo conservados (asteriscos en la parte superior del alineamiento) en las 12 secuencias de RbcL evaluadas. Las estructuras secundarias que mantienen residuos de aminoácidos implicados en los procesos de catálisis fueron: α B (E72), α 0 (N144), loop que conecta β 1 y α 1 (K202; K204), motivo catalítico ubicado entre α 1 y α 2 (G223; D225; F226; K228; D230; E231), β 5 (H324) y loop6 (K366) (Figura 18). Asimismo, las estructuras secundarias que conservan los residuos involucrados en la unión de los grupos fosfato en C1 y C5 de RuBP fueron: loop entre α B y β C (T77), β 5 (R325), β 6 (H358), β 6 y loop que conecta β 7 y α 7 (S411; G413) y loop que conecta β 8 y α 8 (G436; G437) (Figura 18).

Cabe señalar sobre la importancia del loop catalítico 6 (Figura 18, 19c), ya que se caracteriza por ser una secuencia conservada y flexible, interactúa con la cola en la región C-Terminal para cerrarse sobre el bolsillo catalítico cuando se une a RuBP, y luego se abre con la catálisis para permitir la liberación del producto. Por otra parte, el loop CD se ubica en el dominio N-Terminal y se acerca a la apertura del sitio activo desde la dirección opuesta al loop 6 y se empaqueta contra el loop 6 (Satagopan et al., 2014). La similitud posicional entre el loop CD y la cola C-Terminal de RuBisCO al unirse al sustrato sugiere que el loop CD puede tener un papel en el posicionamiento del loop 6 (Satagopan et al., 2014).

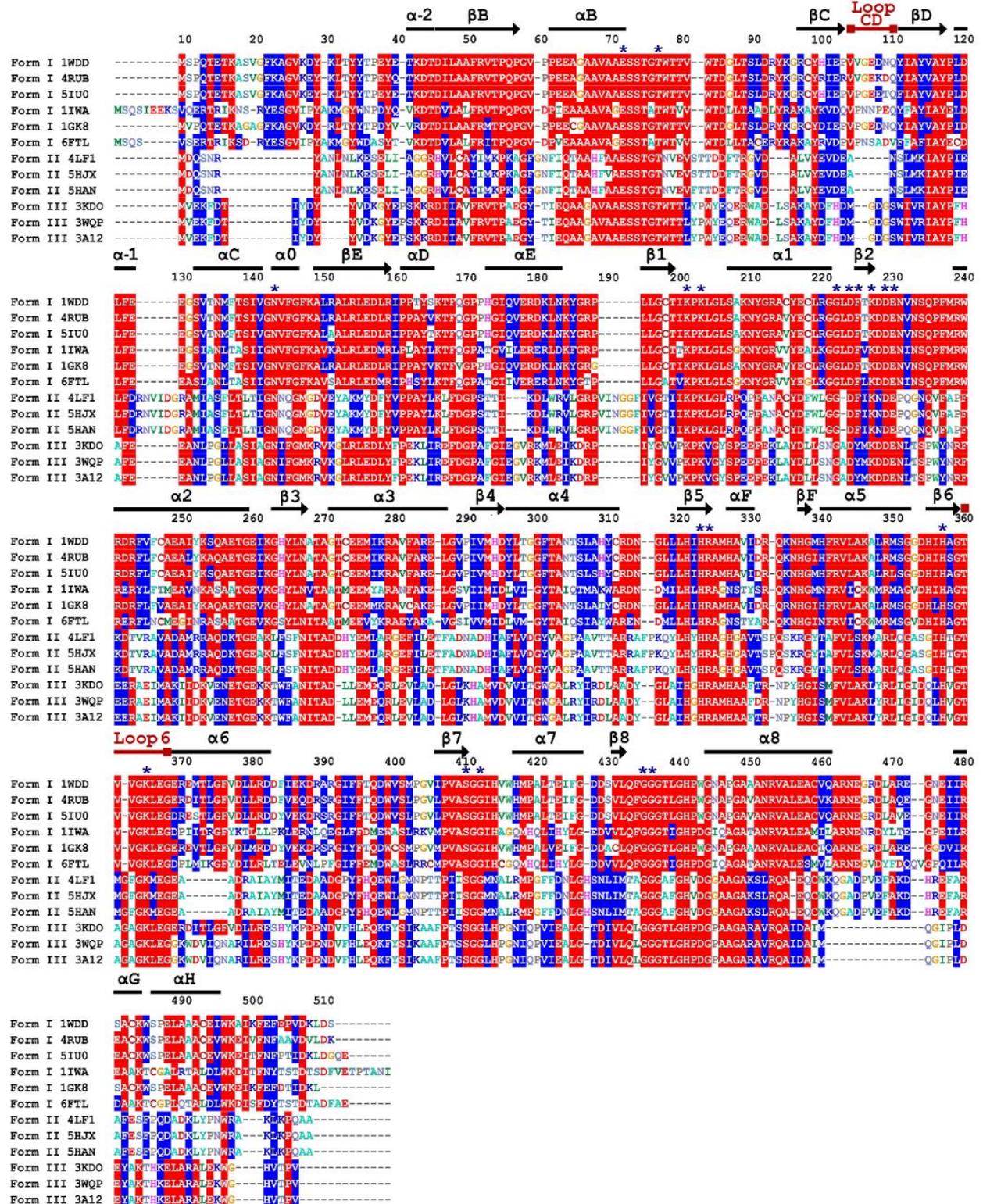


Figura 18. Alineamiento de secuencia múltiple basada en la estructura de tres formas de RuBisCO

Nota. Secuencias de *O. sativa* (1WDD), *N. tabacum* (4RUB), *A. thaliana* (5IU0), *C. reinhardtii* (1GK8), *G. partita* (1IWA) y *S. marinoi* (6FTL) corresponden con la forma I, para la forma II la especie *R. palustris*, 1 wild-type (4LF1) y 2 mutantes (5HJX y 5HAN), y en la forma III la especie *T. kodakarensis* 1 wild-type (3A12) y 2 mutantes (3KDO y 3WQP). Los elementos estructurales secundarios (hélices como barras y cadenas β como flechas). Los asteriscos de color azul indican los residuos de aminoácidos del sitio activo mecánicamente importantes. El sombreado de fondo rojo representa aminoácidos idénticos, el sombreado azul designa aminoácidos similares mientras que el sombreado blanco indica que no hay similitud.

Por otro lado, mediante análisis de modo normal (NMA) evaluamos la flexibilidad intrínseca de las tres isoformas de RuBisCO. En la Figura 19, las fluctuaciones consenso están resaltados de color celeste y revelan movimientos dominantes de la RbcL que se conservan entre las especies y las diferentes isoformas de RuBisCO a pesar de su baja identidad de secuencia debido a sus diferencias evolutivas (Figura 19a, b). Los primeros residuos de aminoácidos del extremo N-Terminal se encuentran recortados debido a que su estructura aún no se encuentra resuelta experimentalmente en la isoforma I (Figura 19b), el extremo C-Terminal se recorta en el residuo 444 debido a que representa el tamaño de *T. kodakarensis* en la Isoforma III. Por otra parte, las tres isoformas muestran una mayor fluctuación en el dominio N-Terminal que abarcan los residuos de aminoácidos (51-68) entre los elementos estructurales secundarios α B y β C (Figura 19a), que son funcionalmente relevantes para RbcL. En esta región, mayores fluctuaciones indicarían también la dirección probable de los cambios conformacionales (Figura 19a). Asimismo, la Forma III de RuBisCO presentó mayor fluctuación (≥ 3 Å) respecto a las isoformas I y II (Figura 19a, b). Mientras que el dominio catalítico de la subunidad barril α/β (número de residuo 150-444) fue más estable en todas las estructuras evaluadas. Por otro lado, los resultados de NMA revelaron patrones de flexibilidad similares en las estructuras de RbcL (Figura 19, 20), demostrando que la distribución de los factores de temperatura (B-Factores) indican que los loop más flexibles durante la catálisis también lo son en las estructuras cristalizadas (Levitt et al., 1985; Schreuder et al., 1993; Seno y Go, 1990), además el NMA reveló que las estructuras que obtienen una conformación loop muestran una mayor flexibilidad en la región N-terminal. Por el contrario, las estructuras β -plegadas y α -hélice muestran valores de fluctuación más

bajos. Estas diferencias en las fluctuaciones resaltan la importancia de considerar múltiples estructuras en los análisis de NMA.

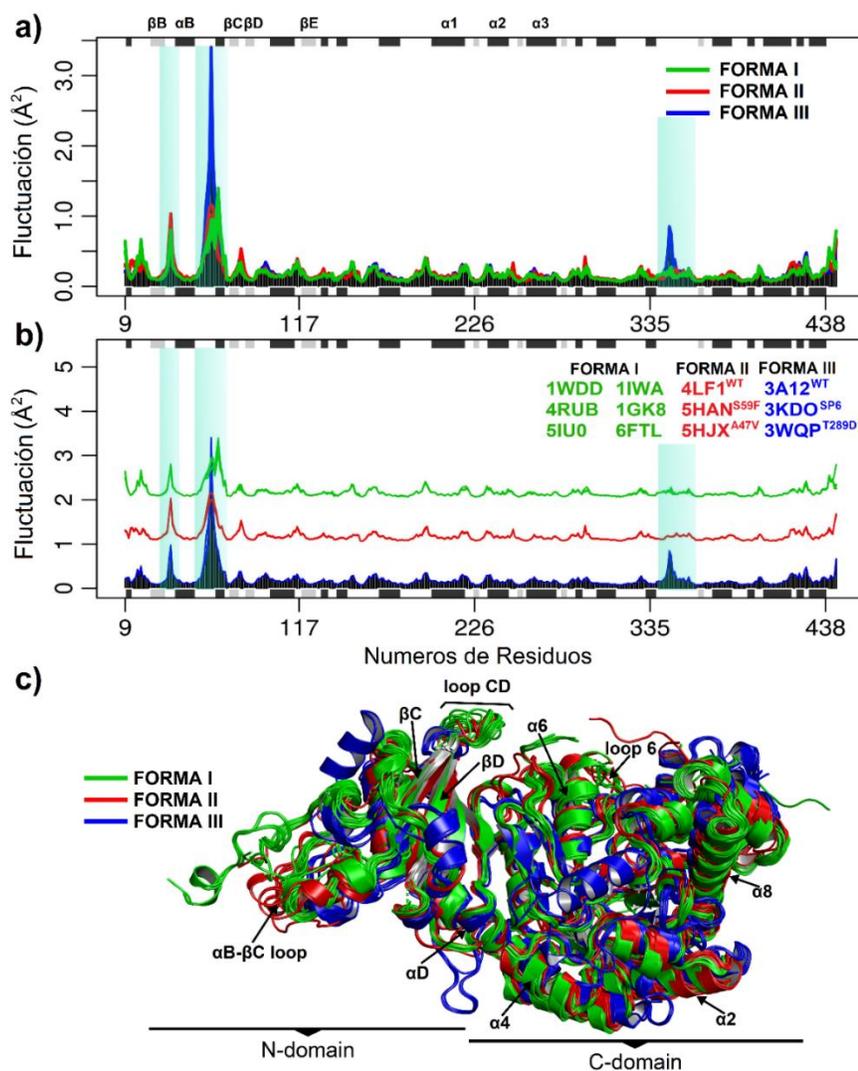


Figura 19. Análisis de modos normales (AMN)

Nota. **a)** Comparación consenso de las fluctuaciones de modo calculadas para las Formas I, II y III de RuBisCO. Las ubicaciones de los principales elementos de la estructura secundaria se muestran en los márgenes del gráfico con las hebras β en gris y las hélices α en negro. **b)** Comparación consenso de las fluctuaciones de modo normal entre especies, en la Forma I se encuentran las especies *O. sativa* (1WDD), *N. tabacum* (4RUB), *A. thaliana* (5IU0), *C. reinhardtii* (1GK8), *G. partita* (1IWA) y *S. marinoi* (6FTL), en la forma II *R. palustris*, 1 wild-type (4LF1) y 2 mutantes (5HJX y 5HAN), y en la forma III la especie *T. kodakarensis*

1 wild-type (3A12) y 2 mutantes (3KDO y 3WQP). c) Estructura monomérica de RbcL. El monómero se divide en dos dominios: un dominio de hoja β en la región N-terminal y un dominio de barril α/β C-terminal. Se indican el loop de conexión α B- β C, loop CD, el loop 6 y α 6. Los diferentes colores indican la Forma I (verde), II (rojo) y III (azul).

4.2.2. Evaluación de la estabilidad y flexibilidad de las isoformas de RuBisCO

Los análisis de dinámica molecular permitieron evaluar la transición de la conformación de la RuBisCO en los 50 ns, además los resultados de RMSD fueron coherentes con estudios previos (Faulkner et al., 2020b; Guinot, 2016; Siqueira et al., 2016). Por lo tanto, nuestros resultados se suman a la acumulación de pruebas teóricas sobre los movimientos estructurales de RuBisCO, y ayudan a comprender los detalles de la sincronización y el mecanismo de cierre que aún se desconocen (Genkov y Spreitzer, 2009). La función de una proteína depende de su estructura, dinámica y puede alterarse a causa de mutaciones. La desviación cuadrática media (RMSD) se utilizó para evaluar la estabilidad conformacional de la proteína durante las simulaciones. La fluctuación cuadrática media (RMSF) fue útil para identificar regiones rígidas y flexibles en las diferentes estructuras de la RuBisCO, la región con un valor de RMSF superior a 0.3 nm se consideró de alta fluctuación, de acuerdo con Selvaraj et al., (2015). Los resultados de la Figura 20a, muestran que la forma tipo I presentó mayor variabilidad en los valores medios de RMSD para las 6 estructuras de diferentes organismos fotosintéticos, donde 4RUB ($\sim 0.36 \text{ nm} \pm 0.00268$), 1GK8 ($\sim 0.34 \text{ nm} \pm 0.0025$), 6FTL ($\sim 0.37 \text{ nm} \pm 0.0027$), 1IWA ($\sim 0.36 \text{ nm} \pm 0.0032$) presentaron los valores más bajos (Tabla 3), contrario a ello 1WDD ($\sim 0.52 \text{ nm} \pm 0.004$) y 5IU0 ($\sim 0.46 \text{ nm} \pm 0.0033$) mostraron promedios más altos de RMSD (Tabla 3), lo que significó que las diferencias entre el tamaño de sus secuencias y variabilidad en los residuos de aminoácidos tiene influencia en el movimiento y estabilidad de la forma I de RuBisCO.

El RMSF de la forma I muestra mayores fluctuaciones en las colas del extremo N-Terminal y C-Terminal, debido a que los primeros y últimos residuos de aminoácidos conforman una estructura en forma de loop. Así también, los seis sistemas evaluados mostraron una mayor flexibilidad en el loop ubicado entre los elementos estructurales secundarios α B y β C ($\geq 0.3 \text{ nm}$) del dominio N-Terminal y que abarcan los siguientes residuos de aminoácidos, 1WDD (Thr68-Ser76), 4RUB (Gly64-Thr75), 5IU0 (Trp66-Thr75), 1IWA (Ala73-Ala86), 1GK8

(Val69-Thr75) y 6FTL (Ser71-Thr80) (Tabla 1). La región estructural del sitio activo de RuBisCO (barril α/β) fue estable presentando una fluctuación ≤ 0.3 nm debido a que se encuentra en el dominio de barril TIM que permiten a la proteína ser ligeramente rígida (Figura 20b).

Por otra parte, el análisis de la forma II incluye el sistema 4LF1^{WT} y dos mutantes 5HAN^{S59F} y 5HJX^{A47V}, los resultados muestran que 4LF1^{WT} (~ 0.24 nm ± 0.001) y la mutante 5HAN^{S59F} (~ 0.28 nm ± 0.002) presentaron valores medios de RMSD más bajo y una mayor estabilidad durante las trayectorias, la mutante 5HJX^{A47V} (~ 0.34 nm ± 0.002) incrementó la media del RMSD y es atribuida a valina 47 (A47V) que conforma parte de la región αB en el extremo N-terminal (Tabla 3). El RMSF de la forma II muestra que la estructura 4LF1^{WT} y los mutantes (5HAN^{S59F} y 5HJX^{A47V}) mantienen una flexibilidad similar en la mayoría de los residuos de aminoácidos. En los tres sistemas la región con mayor fluctuación se encuentra en el loop entre αB y βC [4LF1^{WT} (residuos Gly53-Asp63), 5HAN^{S59F} (residuos Val56-Thr65) y 5HJX^{A47V} (residuos Thr54-Asp63)] y las otras fluctuaciones ≥ 0.3 nm relevantes fueron: 4LF1^{WT} (residuos Val201-Phe202, Pro458-Ala461), 5HAN^{S59F} (residuos Pro458-Ala461) y 5HJX^{A47V} (residuos Lys330-Met331, Pro458-Ala461).

Comparando 4LF1^{WT} y 5HAN^{S59F}, podemos mencionar que la mutación S59F permitió identificar residuos clave que redujeron (residuos Gly53-Glu57, residuos Val201-Phe202) e incrementaron (residuos Phe59, Asp63-Phe64) la flexibilidad en ≥ 0.1 nm (Tabla 3), los cambios se encontraron en las estructuras secundarias Loop6 y el Loop entre αB y βC región crítica para la unión del sustrato gaseoso después de que se haya completado la enolización de RuBP (Duff et al., 2000; Satagopan et al., 2019). Por otra parte, la comparación entre 4LF1^{WT} y 5HJX^{A47V} permitió identificar residuos clave que incrementaron (Gly35, Lys330-Met331) y redujeron (Val201-Phe202) su fluctuación en más de 0.1 nm (Tabla 3). Atribuyendo esos cambios a la mutación A47V, afectando la actividad catalítica en la proteína .

Los análisis comparativos de RMSD de la forma III mostraron que la proteína 3A12-WT (~ 0.18 nm ± 0.001) fue más estable que 3KDO^{SP6} (~ 0.28 nm ± 0.001) y 3WQP^{T289D} (~ 0.22 nm ± 0.001) (Tabla 3). La estructura mutada 3KDO^{SP6} mostró regiones donde el RMSF difiere notablemente del WT (ver Figura 20e). Tales regiones incluyen los residuos Trp55-Tyr62 (loop que conecta αB y βC) y Asn347 (Loop que conecta $\alpha 6$ y $\beta 7$), ambas regiones

mostraron en promedio un RMSF más alto que el WT (Tabla 3). Por otro lado, la región que exhibe un RMSF más bajo es el mutante 3KDO^{SP6} con respecto al WT, incluye la región α F que consta del aminoácido Ala286 (Tabla 3). Alternativamente, la comparación entre 3A12^{WT} y el mutante 3WQP^{T289D}, evidenció que la estructura mutada incrementó en más de 0.1 nm de fluctuación en los residuos 60-61 (Loop que conecta α B, β C) y 322 (Loop 6) (Tabla 3). Asimismo, el aminoácido 322 está involucrado en la interacción directa con el ligando CAP 2-Carboxyarabinitol-1,5-Diphosphate (C₆H₁₄O₁₃P₂), considerando al loop 6 como una región que desempeña un papel dominante en la mejora de la actividad enzimática del mutante 3WQP^{T289D}.

Los resultados evidencian que los dos análisis de dinámica molecular (NMA y RMSF) para identificar regiones de mayor fluctuación en las isoformas de RuBisCO fueron similares, concordando que el Loop entre α B y β C presenta mayor flexibilidad (Figura 20).

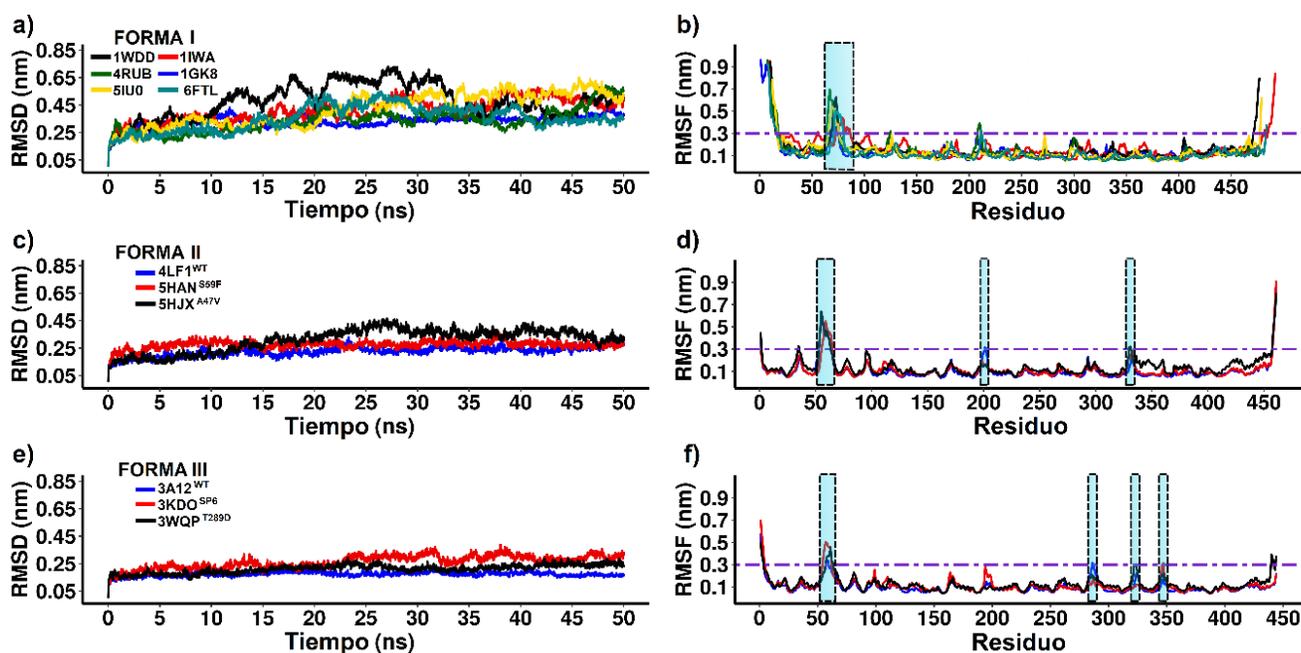


Figura 20. Valores de RMSD (nm) y valores RMSF (nm) de los átomos de C-alpha

Nota. a) RMSD de 50 ns de la Forma I. b) RMSF de la Forma I de RuBisCO. c) RMSD de la Forma II. d) RMSF de la Forma II. e) RMSD de la Forma III. f) RMSF de la Forma III.

Tabla 3. Promedio y error estándar del RMSD de 12 estructuras de RbcL

Forma	Proteína	RMSD	Región ≥ 0.3 de RMSF	Secuencia	Estructuras secundarias
I	1WDD ^{WT}	0.52 \pm 0.004	68-76	TVWTDGLTS	Loop que conecta α B y β C
	4RUB ^{WT}	0.36 \pm 0.002	64-75; 125; 209-211	GTWTTVWTDGLT; F; QPF	Loop que conecta α B y β C; α 0; Loop que conecta β 2 y α 2
	5IU0 ^{WT}	0.46 \pm 0.003	22; 66-75	L; WTTVWTDGLT	Cola N-Terminal; Loop que conecta α B y β C
	1IWA ^{WT}	0.44 \pm 0.003	55-56; 73-86; 482	PG; WTVVWTDLLTAA; T	β B; Loop que conecta α B y β C; Cola C-Terminal
	1GK8 ^{WT}	0.34 \pm 0.002	69-75	VWTDGLT	Loop connecting α B y β C
	6FTL ^{WT}	0.37 \pm 0.002	71-80; 211-212	TVVWTDLLTA; NS	Loop que conecta α B y β C; Loop que conecta β 2 y α 2
II	4LF1 ^{WT}	0.24 \pm 0.001	53-63; 201-202	GTNVEVSTTDD; VF	Loop que conecta α B y β C; Loop que conecta β 2 y α 2
	5HAN ^{S59F}	0.28 \pm 0.002	56-65	VEVFTTDDFT	Loop que conecta α B y β C
	5HJX ^{A47V}	0.34 \pm 0.002	54-63; 330-331	TNVEVSTTDD; KM	Loop que conecta α B y β C; Loop 6
III	3A12 ^{WT}	0.18 \pm 0.001	58-59; 286	LY; A	Loop que conecta α B y β C; α F
	3KDO ^{SP6}	0.28 \pm 0.002	55-62; 347	WTTLYPWY; N	Loop que conecta α B y β C; Loop que conecta α 6 y β 7
	3WQP ^{T289D}	0.22 \pm 0.001	57-63; 322	TLYPWYE; K	Loop que conecta α B y β C; Loop 6

4.2.3. Análisis de componentes principales (PCA)

El análisis de componentes principales (PCA) es una técnica matemática basada en matrices de covarianza, puede convertir los datos de alta dimensión de las trayectorias de simulación de proteínas en un espacio de baja dimensión para obtener una serie de autovectores y autovalores que reflejan los movimientos generales de la proteína. Para obtener información sobre los estados conformacionales de la forma I de RbcL (5IU0, 1IW1, 1GK8, 1WDD, 4RUB y 6FTL), se llevó a cabo el PCA de los átomos de Ca. Se tomaron en consideración los dos primeros PC (PC1/2). La Figura 21 indica la varianza en la distribución conformacional de las proteínas, donde cada punto representa una estructura del sistema (Figura 21). La representación de los puntos de color continuo (del azul al blanco al rojo) resalta los saltos periódicos entre las conformaciones estructurales. Como se muestra en la Figura 21, los PC1/2 de las trayectorias de MD para los seis sistemas fueron bastante variados, mostrando diferencias en el movimiento y la estabilidad de las proteínas que componen la forma I (Figura 21). En los sistemas 5IU0, 1IWA, 1GK8 y 1WDD, hubo mayor movimiento correlacionado a lo largo de los dos primeros componentes juntos, representando con un porcentaje de 85.5%, 80.4 %, 76.7% y 75.6% respectivamente, mientras que en los sistemas 4RUB y 6FTL los valores de los dos PC juntos fueron de 70.6% y 70.5%, respectivamente (Figura 21).

Por otra parte, el subespacio de PC1/2 para los sistemas 5IU0, 1GK8, 1IWA y 6FTL mostró claramente los saltos periódicos termodinámicamente distintos con una barrera de energía sustancial (Figura 21), donde la mayoría de los puntos azules y rojos se ensamblaron y la mayoría de las conformaciones se distribuyeron alrededor de las regiones opuestas, esto indica que la proteína estaba en un estado relativamente estable en el sistema (Figura 21). Las estructuras de RbcL de *Oryza sativa* (1WDD) y *Nicotiana tabacum* 4RUB mostraron un subespacio de PC uniforme y superpuesto que carecía de una barrera de energía, además la mayoría de los puntos azules y rojos estaban en un estado disperso, lo que indica que la mayoría de las conformaciones no eran estables. Es evidente que 1WDD y 4RUB son más flexibles que las demás proteínas estudiadas y tienen un mayor espacio conformacional (Figura 21a, b). Los análisis de PCA sugieren que la subestructura IB de RbcL puede sufrir un cambio periódico en su conformación para reorientar sus dominios (N-Terminal y barril

α/β). El agrupamiento diferenciado puede resultar energéticamente costoso; sin embargo, también puede proporcionar un mecanismo de control y regulación.

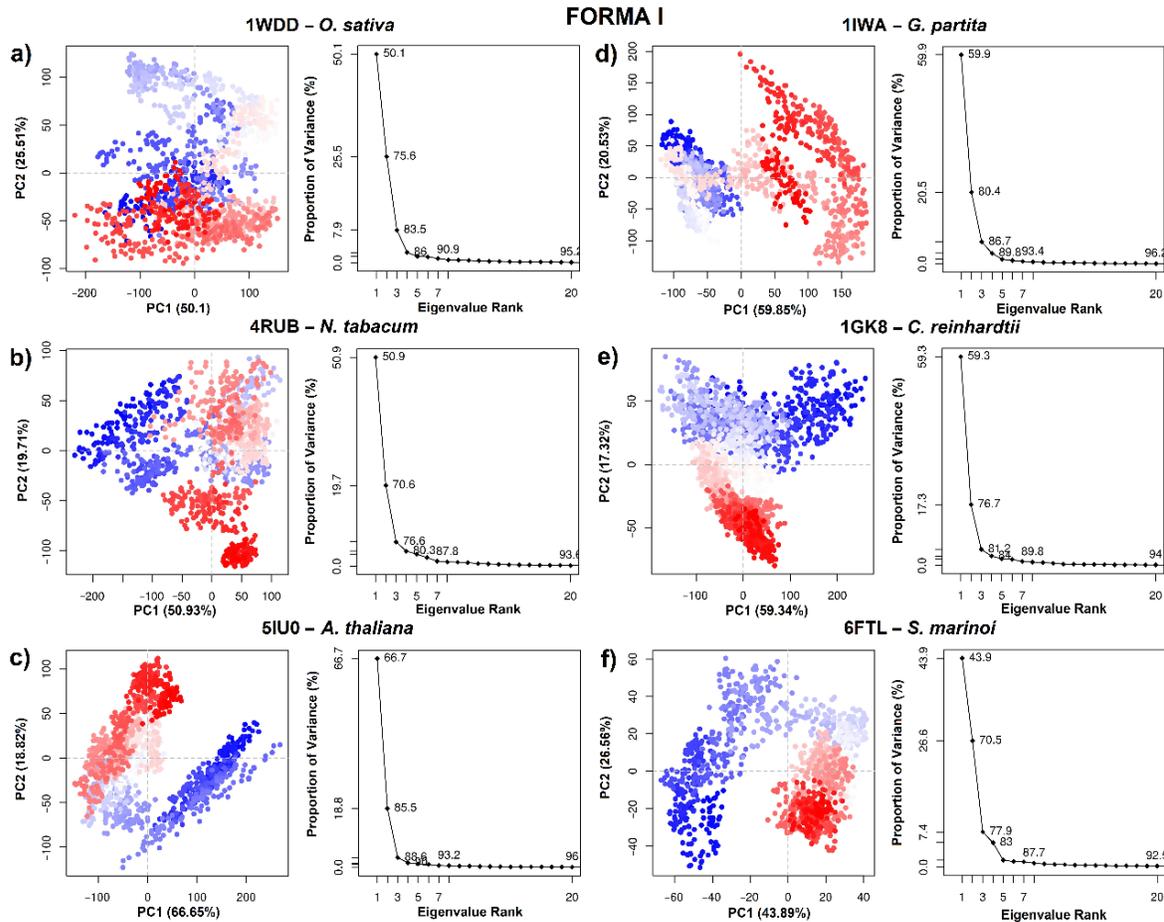


Figura 21. Análisis de componentes principales de la isoforma I de RuBisCO

Nota. Cada punto denota su conformación de la proteína a lo largo de los ejes X e Y. La extensión de los puntos de color azul y rojo describe el grado de cambios conformacionales en la simulación, donde el espectro de color de azul, blanco a rojo es equivalente al tiempo de simulación. El azul especifica el paso de tiempo inicial, el blanco especifica el paso de tiempo intermedio y el paso de tiempo final está representado por el color rojo. **a)** *O. sativa* (1WDD). **b)** *N. tabacum* (4RUB). **c)** *A. thaliana* (5IU0). **d)** *G. partita* (1IWA). **e)** *C. reinhardtii* (1GK8). **f)** *S. marinoi* (6FTL).

Respecto a la forma II de RuBisCO, el análisis de PCA permitió obtener información sobre los estados conformacionales de 4LF1^{WT} y dos mutantes 5HAN^{S59F} y 5HJX^{A47V}. Los PC

fueron suficientes para capturar movimientos que dominaban las funciones biológicas de las proteínas. Como se observa en la Figura 22, los PC de los sistemas 4LF1^{WT}, 5HAN^{S59F} y 5HJX^{A47V} capturaron el 85.4%, 84.2% y 84.3% de las variables totales en la etapa de equilibrio, respectivamente. Curiosamente, las dos primeras PC de tres sistemas contribuyeron con 47.2% / 15.5%, 37% / 13.9% y 52.8% / 9% respectivamente (Figura 22a, b, c), mientras que los otros componentes principales no aportaron más del 8 % del total de variables. Por lo tanto, los dos primeros autovectores capturaron la mayoría de las variables en la distribución inicial de la conformación de la proteína. Para estudiar más a fondo los cambios conformacionales de la proteína, la trayectoria de los dos primeros autovectores (PC1/2) se proyectó en los gráficos espaciales bidimensionales que se muestran en la Figura 22. En el diagrama de distribución de dispersión, los puntos rojos y azules reflejan dos estados conformacionales diferentes estables del sistema de proteínas respectivamente, mientras que los puntos blancos reflejan estados intermedios inestables. Obviamente, se pudo observar a partir de los gráficos de dispersión de la Figura 22 a, b, c que los mutantes (5HAN^{S59F} y 5HJX^{A47V}) habían sufrido un cambio de una conformación intermedia inestable (4LF1^{WT}) a una inestable. De manera similar, como se puede mostrar en la Figura 22 b, c, el número de distribuciones de puntos blancos fue obviamente más que el sistema 4LF1^{WT}, revelando que el WT podría ser más estable que los mutantes. Finalmente, los puntos rojos y los puntos azules fueron más dispersos en el sistema 5HJX^{A47V} (Figura 22c), revelando que la conformación estaba en un estado inestable. Esto fue consistente con los resultados de RMSD donde 5HJX^{A47V} presentó ~ 0.1 nm más flexibilidad respecto del WT. El estado conformacional más disperso producido por las mutaciones represoras S59F y A47V podrían reducir la actividad catalítica de la RuBisCO. En efecto, nuestros resultados de PCA de la DM indicaron que los mutantes (5HAN^{S59F} y 5HJX^{A47V}) habrían sufrido un cambio de una conformación intermedia inestable (4LF1^{WT}) a una inestable (Figura 22), siendo consistente con los resultados de RMSD donde 5HJX^{A47V} presento ~ 0.1 nm más flexibilidad respecto del WT (Figura 20). Consecuentemente, el mutante 5HJX^{A47V} incrementó la fluctuación en más de 0.1 nm de los residuos clave Lys330-Met331 ubicados en el loop6 (Tabla 3). Algunos estudios experimentales que evaluaron el crecimiento de cepas de *R. palustris* con las mutaciones M331L y M331A no mostraron crecimiento, por tanto el residuo Met331 y sus

interacciones parecen ser específicos y críticos para la adición de CO₂ al intermedio 2,3-enediol (ate) derivado de RuBP (Satagopan et al., 2014, 2019). Por el contrario, las cepas con doble mutación (A47V/ M331A y S59F/M331A) si evidenciaron el crecimiento de *R. palustris*, por tanto, es concebible que un cambio negativo en el crecimiento causado por una sustitución de M331A en la enzima de la forma II de *R. palustris* sea suprimido por la sustitución de A47V y S59F (Satagopan et al., 2019). Para explicar este fenómeno Satagopan et al., (2014) acudió a evaluar los movimientos y las estructuras cristalizadas del WT y los mutantes, observando que el carbono α de Ala47 (estructura α B) está a ~ 15 Å de distancia de Met331 (estructura loop6) (Satagopan et al., 2014). Además, nuestros resultados indican que Ala47 y Met331 se desplazan en una misma dirección (correlación positiva > 0.5 ; Figura 24 a, b, c) según la correlación residuo-residuo (DCCM). Asimismo, la cadena lateral se encuentra en un entorno hidrófobo dentro de los 4 Å de Ala70 y Val72 (Satagopan et al., 2014). Se esperaría que la sustitución con una Val (A47V) empujara a la estructura α B (con A47V) hacia el sitio activo, y por ende Lys330 y Met331 muestren una mayor flexibilidad (Tabla 3). Mientras que Glu49 ubicado en la estructura α B funciona para estabilizar Lys330 y ayuda en el cierre del bucle 6 durante la catálisis, y Thr54 en el bucle contiguo participa en la unión del fosfato P1 del sustrato (Mueller-Cajar 2017; Ng et al., 2020; Taylor y Andersson, 1996), de esta forma sería posible la compensación de la capacidad catalítica de RuBisCO a causa de la mutación M331A.

La Figura 22 muestra el análisis de PCA de estructuras de RuBisCO de la forma III (Figura 22 d, e, f), un Wt 3A12 y los dos mutantes 3KDO^{SP6} y 3WQP^{T289D}. La Figura 22 indica que los dos primeros autovectores (PC1/2) capturaron la mayor parte de la varianza en la distribución original del espacio conformacional de la RbcL. Las dos primeras PC (PC1/2) de tres sistemas contribuyeron con 45.1% / 9.3%, 51.5% / 12.6% y 46.7% / 10.3% respectivamente y fueron utilizados para analizar los estados conformacionales (Figura 22 d, e, f). El sistema 3A12^{WT} y los sistemas 3KDO^{SP6} y 3WQP^{T289D} alcanzaron dos estados conformacionales (mostrados como puntos azules y puntos rojos). Los colores de los puntos se transformaron de azul a rojo, lo que significaba que los tres sistemas requerían un salto periódico entre los diferentes estados formativos. Se pudo observar las distribuciones de los puntos a lo largo de PC1 y PC2 (Figura 22 d, e, f). 3A12^{WT} estaban más dispersos que en 3KDO^{SP6} y 3WQP^{T289D}. Por lo tanto, el estado conformacional de los

mutantes fue energéticamente más estable que el sistema WT, siendo consistente con los resultados de RMSF.

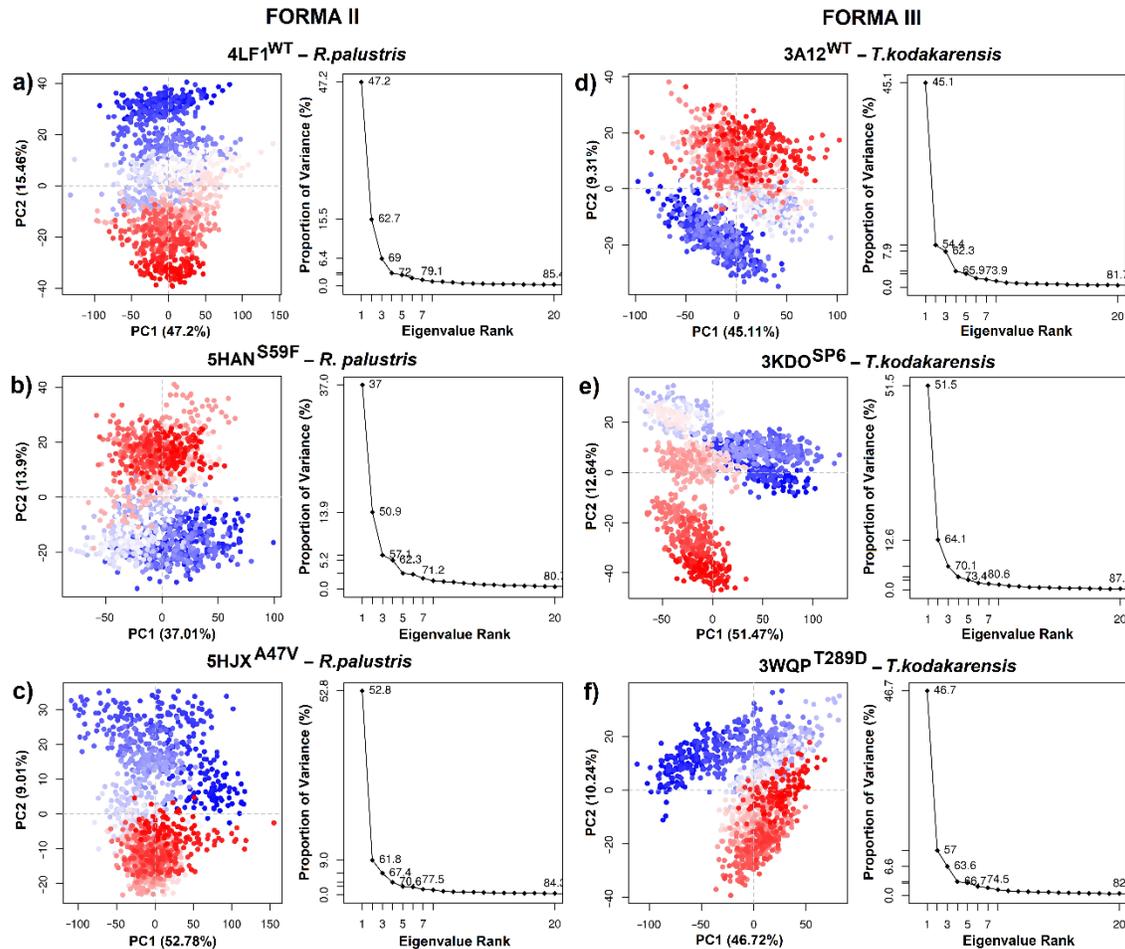


Figura 22. Análisis de componentes principales de la isoforma II y III de RuBisCO

Nota. La Forma II representa la especie *R. palustris* y la Forma III *T. kodakarensis*. **a)** wild-type 4LF1. **b)** mutante 5HAN^{S59F}. **c)** 5HJX^{A47V}. **d)** wild-type (3A12). **e)** mutante 3KDO^{SP6}. **f)** mutante 3WQP^{T289D}.

Analizando más a fondo los movimientos y correlaciones de los residuos, Schreuder et al., (1993) mencionan que los dos estados (abierto y cerrado) de RuBisCO, se distinguen por el grado de accesibilidad del solvente al sitio activo. El estado cerrado está asociado con sustratos e inhibidores unidos (CABP 2-carboxyarabinitol 1,5-bisphosphate) al sitio activo,

esto se lograría mediante un movimiento del loop 6 (residuos 331-338), y del loop que conecta α B y β C entre los residuos ~64-85 (Tabla 3), además los loops N-Terminal y C-Terminal funcionan como pestillos, bloqueando el loop ~64-85 y el loop 6 en sus posiciones cerradas, provocando así la liberación extremadamente lenta de CABP (Schreuder et al., 1993). Por otra parte, estudios de RuBisCO realizados en espinaca y trigo indican que los residuos ~ 8 a 20 del extremo N-Terminal se ordenan sólo cuando el sitio activo está en la forma cerrada (ligando unido) (Ng et al., 2020). En la conformación cerrada el extremo N-Terminal (Phe13, Lys14, Gly16 y Lys18) se coloca directamente sobre el loop ~64-85 (conexión entre α B y β C) que coordina en el sitio P1 del sustrato (Ng et al., 2020). Por el contrario, el estado abierto está asociado con productos débilmente unidos (ión metálico esta catalíticamente inerte), además en el estado abierto el loop 6 del barril α/β está en una posición retraída (lejos del sitio activo), la hebra C-Terminal de la subunidad grande (definida como todos los residuos de Trp462 en la región C-Terminal) es desordenado y el sitio activo está abierto o vacío.

4.2.4. Análisis de matriz de correlación cruzada (DCCM)

Una transición estructural que es esencial para la carboxilación del intermediario 2,3-enediol(ate) es el cierre del sitio activo del loop 6 en una de las subunidades grandes y el movimiento concomitante de un loop N-terminal de residuos (entre α B y β C) de la subunidad grande vecina del par dimérico para estabilizar la conformación catalítica del loop 6 (Ashida et al., 2003; Duff et al., 2000; Satagopan et al., 2019). Por lo tanto, se realizaron DCCM para sondear el conjunto conformacional de estas zonas. En consecuencia, se observaron patrones de correlaciones similares en estructuras de la forma I de RuBisCO para 1WDD, 4RUB, 5IU0, 1GK8 y 6FTL (Figura 23a, b, c y d). Esto puede proporcionar información sobre un mecanismo conservado entre *Chlamydomonas*, *Skeletonema*, *Arabidopsis*, tabaco y arroz. Porque, los residuos 60-80 (parte de la región α B y del loop que conecta α B y β C) ubicados en el dominio N-Terminal muestran un movimiento correlacionado con las estructuras secundarias α 4, β 5, α F, β F, α 5, β 6 y Loop6 ubicados entre los residuos 270-345 en el dominio C-Terminal (Figura 23a, b, c, d). Esta correlación es importante en el funcionamiento de la RuBisCO ya que conecta la región

con mayor flexibilidad (Loop que conecta α B y β C) y las estructuras que tienen los residuos clave de unión al sustrato H294, R295, H327 y K334. Asimismo, el resultado mostró que las estructura β C, Loop CD, β D y α C tenían fuerte correlación negativa de movimientos con las estructuras secundarias α 4, β 5, α F, β F, α 5, β 6 y Loop6, lo que sugiere que se mueven en direcciones opuestas y sus movimientos están fuertemente sincronizados (Figura 23 a, b, c, d).

Por otro lado, la estructura de forma IC/D (1IWA) presentó patrones de correlación diferentes. La proteína 1IWA de *Galdieria partita* presentó una correlación negativa fuerte ≥ -0.5 en los residuos 25-220 (estructuras secundarias α -2, β B, α B, β C, Loop CD, β D, α -1, α C, α 0, β E, α D y α E) respecto a los residuos de aminoácidos ubicados en la posición 350-493 (α 6, β 7, α 7, β 8, α 8, α G y α H) (rectángulo de líneas discontinuas color azul), sin embargo, conserva la correlación positiva entre el loop que conecta α B y β C con las estructuras β 4, α 4, β 5, α F, β F, α 5, β 6 y Loop6 (rectángulo color negro) (Figura 23e).

Galdieria partita es una alga roja termófila con un factor de alta especificidad y muestra una diferencia marcada respecto a la RuBisCO de plantas superiores (Watanabe et al., 2007), nuestros resultados indican que los movimientos de la estructura RbcL de *G. partita* presenta una correlación residuo-residuo diferentes de las estructuras IB y IC/D evaluadas (Figura 23e), si bien *G. partita* tiene más residuos en las regiones N-Terminal y C-Terminal (Figura 18), este fenómeno puede haber desempeñado un rol importante en las modificaciones de movimiento estructural de la RuBisCO tal como lo indican algunos estudios (Ng et al., 2020). Asimismo, el análisis de RMSF de 1IWA (*G. partita*) indica que la región de mayor flexibilidad se encuentra entre los residuos ~Trp73-Ala86 (loop que conecta α B y β C), cabe señalar que Thr74 (posición de residuo secuencia RbcL *G. partita*) es un aminoácido conservado evolutivamente y está involucrado en la unión de los grupos fosfato de RuBP. En efecto, Watanabe et al., (2007) en un estudio indicaron que el residuo Thr74 altera el efecto de empaquetamiento de la hebra C-Terminal. Asimismo, cuando la RuBisCO está en estado abierto, el enlace de hidrógeno entre [P1 y Thr74; Thr76 y Trp470]

se rompe, (Watanabe et al., 2007). El Thr74 se estabiliza por el carbonilo de la cadena principal de Thr76. Mientras que la estabilización de las cadenas laterales Thr76 y Trp470 se da en el estado cerrado de la región loop 6 según el análisis de IFIE (IFIE inter-fragment interaction energy) (Watanabe et al., 2007).

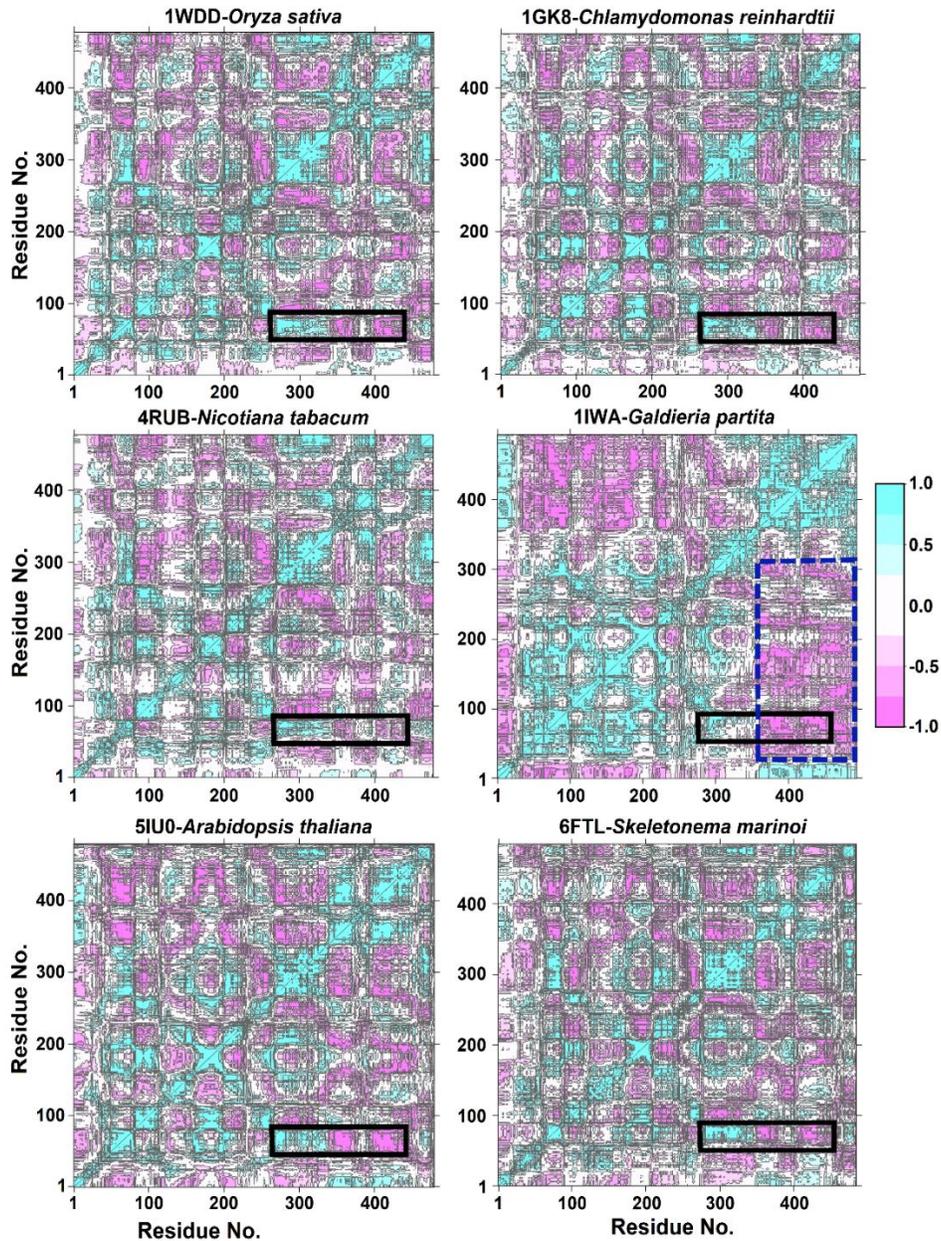


Figura 23. Análisis de correlación cruzada de la isoforma I de RbcL

Nota. La escala de color va del rosa (para valores que varían entre -1 a -0.5), pasando por el blanco (-0.5 a 0.5) a cian (0.5 a 1). Los valores negativos son indicativos de desplazamientos en direcciones opuestas, a saber, movimientos anti-correlacionados, mientras que los valores positivos representan movimientos correlacionados que ocurren en la misma dirección.

Por otro lado, estudios recientes liderados por Satagopan et al., (2019) en la especie *R. rubrum* de la forma II de RuBisCO, también mencionan que existen movimientos vinculados entre el loop α B y β C con el cierre del loop6, concordando con Watanabe et al., (2007) que esta conexión permite estabilizar la conformación del bucle catalítico. Por esta razón Satagopan et al., (2019) usando los mutantes (A47V y S59F) en *R. rubrum* realizaron experimentos de crecimiento donde el CO₂ fue la única fuente de carbono, sus resultados evidenciaron un crecimiento similar entre mutantes y una ligera disminución respecto al WT (Satagopan et al., 2014, 2019). En nuestros resultados, los gráficos analíticos de DCCM para la Forma II de RuBisCO mostraron que la región (residuos 53-63) presentó un movimiento anticorrelacionado con las estructuras β 4, α 4, β 5, α F, β F, α 5 (Ala255-Gly317). La región más flexible (residuos 53-63) ubicada en la estructura loop que conecta α B y β C se mueve en la misma dirección (correlación positiva > 0.5) con respecto a las estructuras secundarias β 6, Loop6 y α 6 ubicados entre los residuos Gly326-Ala341 en el dominio C-Terminal (Figura 27a, b, c). Por tanto, es importante el movimiento del dominio N-terminal (loop que conecta α B y β C) hacia el sitio activo ya que comprende un paso clave en el mecanismo catalítico de RuBisCO que implica la adición de CO₂. Por otra parte, 5HAN^{S59F} en comparación con el sistema 4LF1^{WT}, presentó una reducción en los parches correlacionados negativamente (cuadro de líneas discontinuas de color azul), lo que indicó que la mutación S59F en la región más flexible altera los niveles de la correlación residuo-residuo con la región loop6. Respecto al mutante 5HJX^{A47V} no se encontraron cambios significativos en función de 4LF1^{WT}.

En el análisis DCCM de la forma III de RuBisCO también nos centramos en la estructura de mayor fluctuación (loop que conecta α B y β C), donde los residuos Pro60-Ala72 tendrían un movimiento anticorrelacionado ($< - 0.5$) con las estructuras β 6 y Loop6. Mientras que los residuos Ser50-Tyr59 presentaron una correlación positiva (> 0.5) respecto a las

estructuras secundarias $\beta 6$ y Loop6. Estos resultados evidencian la naturaleza cambiante en la correlación residuo-residuo entre las diferentes isoformas de RuBisCO y posiblemente son consecuencia de los cambios evolutivos de la enzima. Por otro lado, los movimientos correlacionados se redujeron significativamente en el mutante 3WQP^{T289D} respecto de la estructura 3A12^{WT} (rectángulo de líneas discontinuas color azul), esta región comprende claramente una correlación positiva entre las estructuras αE , $\beta 1$ y loop que conecta $\beta 1$ y $\alpha 1$ con las estructuras $\beta 6$ y loop 6, curiosamente los movimientos de correlación positiva de estas regiones disminuyeron en el mutante 3WQP^{T289D}, lo que muestra que la correlación entre los residuos específicos disminuyó y estas regiones se volvieron más flexibles (Lys322 ubicado en el Loop 6) después de la mutación lo cual puede conducir a una mayor elevación de la actividad enzimática de RuBisCO a temperatura ambiente. Finalmente, el mutante 3KDO^{SP6} que incluye cambios en la estructura $\alpha 6$ en el dominio C-Terminal, comparado con 3A12^{WT} no mostró cambios visibles en los patrones de correlación residuo-residuo.

Respecto a la *arquea* hipertermófila *Thermococcus kodakarensis*, Atomi et al., (2004) y Fujihashi et al., (2016) mencionan que su crecimiento óptimo es a 85°C, a esta temperatura supera 20 veces la actividad de la RuBisCO de espinaca, mientras que a temperatura ambiente solo un octavo (Fujihashi et al., 2016). Por este motivo se busca desarrollar nuevas cepas de *T. kodakarensis* con buen rendimiento fotosintético a temperaturas ambiente. En tal sentido, se desarrollaron experimentos de crecimiento celular con los mutantes 3WQP^{T289D} (Fujihashi et al., 2016) y 3KDO^{SP6} (Nishitani et al., 2010), sus resultados indican que hay un incremento en el número de recambio para la actividad carboxilasa es un 24% y 31%, respectivamente. En el caso de 3KDO^{SP6} la región $\alpha 6$ fue remplazada por 11 residuos de aminoácidos de espinaca (E326-L336 “ERDITLGFVDL”). Consecuentemente, Nishitani et al., (2010) evaluaron los efectos estructurales de la mutación comparando la flexibilidad entre 3A12^{WT} y 3KDO^{SP6}, indicando que existe un aumento de los factores de temperatura (B-Factores Å²) en la estructura secundaria $\alpha 6$. De acuerdo a nuestros resultados del ANM la isoforma III mostró una fluctuación mayor en el loop entre αB y βC y en el loop que conecta $\alpha 6$ y $\beta 7$ (His341-Ala361) respecto a las isoformas I y II. Asimismo, los mutantes fueron energéticamente más estables que el WT (Figura 26e, f), además 3KDO^{SP6} mostró una mayor flexibilidad ~0.15 nm en el loop que

conecta α B y β C (Figura 20f) y 3WQP^{T289D} en el residuo Lys322 (residuo del loop 6 catalíticamente crítico) (Figura 24f, Tabla 3). A partir de este análisis, se puede observar que los cambios en T289D entre α F y β F pueden influir en el movimiento del loop 6 (Tabla 3). Por lo tanto, es posible que un aumento en la flexibilidad de la estructura loop entre α B y β C, Lys322 o en las proximidades del centro catalítico es importante para aumentar la actividad catalítica de RuBisCO de *T. kodakarensis* a temperatura ambiente.

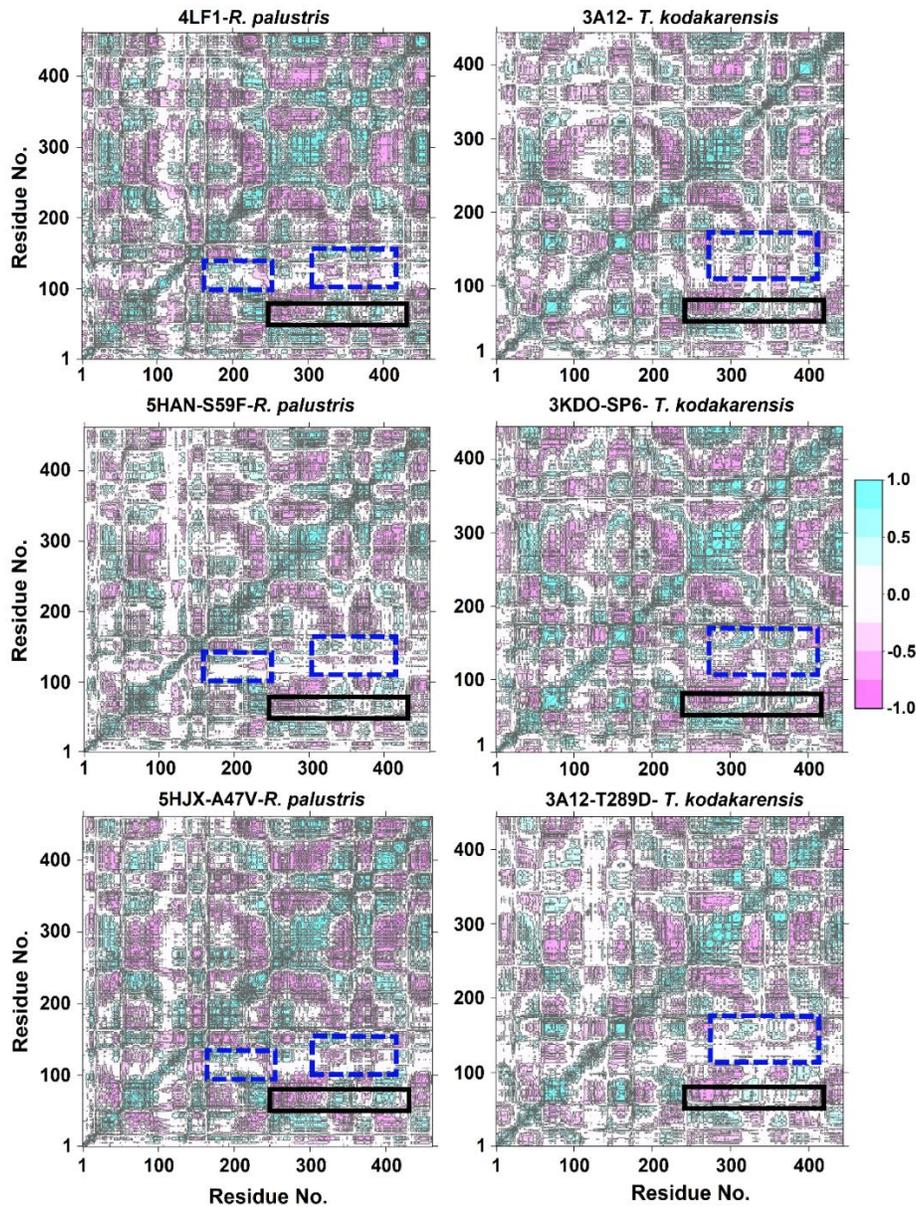


Figura 24. Análisis de correlación cruzada (DCCM) de la isoforma II y III de RbcL

Nota. La escala de color va del rosa (para valores que varían entre -1 a -0.5), pasando por el blanco (-0.5 a 0.5) a cian (0.5 a 1). Los valores negativos son indicativos de desplazamientos en direcciones opuestas, a saber, movimientos anti-correlacionados, mientras que los valores positivos representan movimientos correlacionados que ocurren en la misma dirección.

4.3. Identificación de genes implicados en la formación de la madera en *C. spruceanum*, utilizando RNAseq

4.3.1. Selección de plantas para análisis transcriptómico y extracción de ARN

C. spruceanum es un árbol de gran interés para las plantaciones forestales. Por tanto, es importante comprender las diferentes técnicas de su manejo y aprovechamiento. En ese sentido el sistema de monte bajo (rebrote) permite reducir costos de establecimiento, pero aún no se tienen datos sobre las variaciones o similitudes que tiene su madera respecto del primer corte. En este estudio el análisis de la xilogenesis en diferentes estados de desarrollo de los árboles nos ayudará a identificar si hay genes asociados a síntesis y características (densidad, etc.) de la madera de segundo corte. Por tanto, para realizar el estudio transcriptómico del xilema secundario del tallo de *C. spruceanum*, primero se evaluó el desarrollo de las plantas, luego se caracterizó anatómicamente las fibras de la madera (Figura 14), y se fenotipó fotosintéticamente a las hojas (Figura 13) en tres secciones del tallo de *C. spruceanum* (superior, medio, bajo). Nuestros resultados mostraron que no hay diferencias del diámetro de lumen (DL) y el rendimiento cuántico (Φ_2) en las tres secciones del tallo (Figura 14h). Debido a estos resultados, se decidió comparar el proceso de síntesis del xilema secundario entre plantas de crecimiento normal (altura = 2.60 m; diámetro = 26 cm) y rebrotes (altura = 1.60; diámetro = 11 cm).

Por otro lado, cabe señalar, que la extracción del ARN se dio en el mes de abril, periodo en el que las plantas de *C. spruceanum* presentaron un mayor rendimiento cuántico (Φ_2) (Figura 13) y crecimiento diametral y longitudinal (Figura 7). Respecto a la extracción del ARN, la combinación de CTAB y el kit Direct-zolTM RNA MiniPrep permitió obtener cantidad de ARN del xilema secundario de las plantas en los dos estadios de desarrollo. Esto debido a que el método CTAB incluye β -mercaptoetanol que es un agente reductor

fuerte y es capaz de romper los enlaces disulfuro, y además puede reducir la oxidación de polifenoles e inactivar las ribonucleasas (Jordon-Thaden et al., 2015; Kanani et al., 2019), lo que da como resultado un método robusto y confiable para la extracción del ARN total de tejidos recalcitrantes de árboles como *C. spruceanum*.

4.3.2. Ensamblaje y anotación del transcriptoma

Se produjeron un total de 5.510.902.861 pares de bases totales en 54.563.395 lecturas con un 98,23% de Q20 y 94,94% de Q30 (Tabla 4). Todas las lecturas se ensamblaron en 86814 transcritos (Tabla 4). Los 86814 transcritos ensamblados se anotaron primero con blastx contra las proteínas de cuatro especies: *A. thaliana*, *C. canephora* (valor $e < 1e^{-7}$). Tras el cálculo de la abundancia con Kallisto, y la detección de secuencias con ORF mayores a 200 pb, se procedió a determinar los genes con expresión diferencial utilizando EdgeR. Estos genes fueron filtrados según su nivel de expresión ($\log FC < -2$ y $\log FC > 2$) y su significancia $p > 0.05$, dando como resultado un total de 3544 genes diferencialmente expresados. De estos, 1773 genes estuvieron regulados positivamente (*upregulated*), en tanto que 1771 genes fueron regulados negativamente (*downregulated*).

4.3.3. Análisis de enriquecimiento ontológico (GO) de GDEs

Para identificar los GDEs, se comparó plantas de crecimiento normal (control) con rebrotes de Capirona. En total, se expresaron diferencialmente 3544 transcritos, de las cuales 3204 (90.41 %) se anotaron usando la información de *Coffea canephora*. Para revelar los procesos biológicos involucrados en la formación de madera durante el rebrote de los árboles, realizamos un análisis de enriquecimiento GO de los GDEs. Las ontologías y los genes asociados a los procesos biológicos están soportados estadísticamente por la simulación de Benjamin y Hochberg (0.05 *p-valor*) (Yoav y Yosef, 1995), la cual asocia significativamente genes a diferentes funciones (Maere, 2005). En la Figura 25 se muestran los patrones de ontología génica de GDEs regulados positivamente (1773 genes), los principales genes estuvieron relacionados con procesos biológicos (100%), procesos celulares (48%), proceso metabólico (44%), proceso metabólico primario celular (34%),

regulación de respuesta a estrés (14%), y en menor porcentaje se encontraron genes involucrados en la muerte celular (3%), respuesta al estímulo del ácido abscísico (2%), respuesta al estímulo de carbohidratos (2%), apoptosis (1.6%), respuesta celular al estímulo del ácido abscísico (0.8%) y proceso metabólico del ácido jasmónico (0.5%) (Figura 25). De acuerdo a los resultados, podemos notar que un 14 % de GDEs responden positivamente a estímulos de estrés abiótico como cambios en la temperatura, radiación, además de respuesta a estrés osmótico, salino y de iones oxidativos (Figura 25). Como sabemos los árboles son perennes, por tanto, mantienen óptimos sistemas bioquímicos que regulan espacial y temporalmente sus respuestas fisiológicas frente a los diferentes factores que originan el estrés biótico y abiótico (Magalhaes et al., 2010; Sah et al., 2016). El análisis GO también muestra que ABA y el ácido jasmónico regulan y coordinan múltiples procesos biológicos para hacer frente a los desafíos ambientales (Kuang et al., 2022) y a la biosíntesis de la madera.

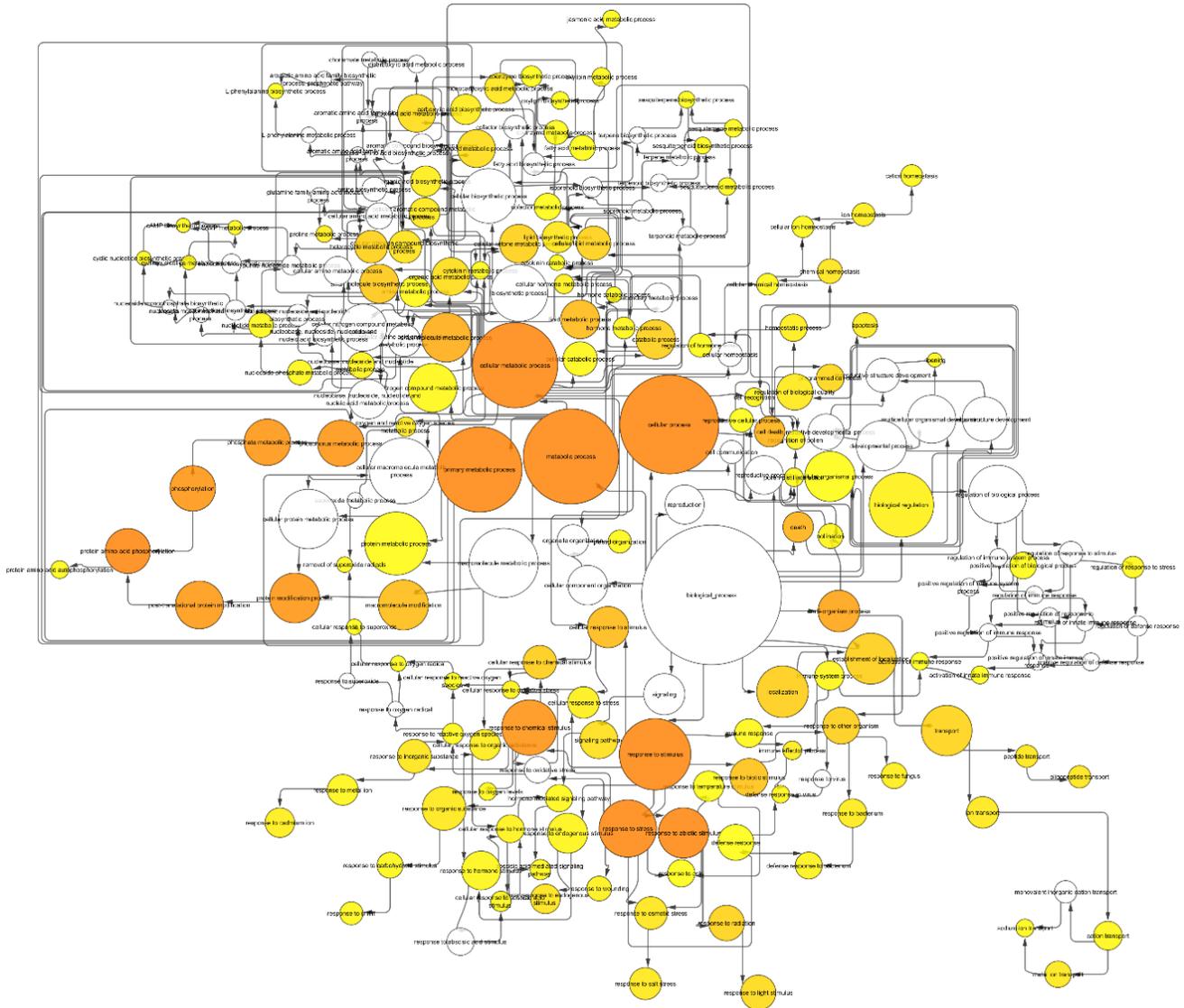


Figura 25. Análisis de red BINGO utilizando Cytoscape 3.4.0 para GDE sobreexpresados

Nota. El color de los nodos representa la importancia de la sobrerrepresentación, con una escala de colores que va desde el amarillo con un valor p de 0,05 hasta el naranja oscuro con un valor p correspondiente a 5 órdenes de magnitud más pequeños que el nivel de significancia ($p = 5.00E-5$).

Por otro lado, en la Figura 26 se observa el perfil de ontología génica de GDEs regulados negativamente (1771 genes), donde los principales genes estuvieron asociados con

procesos celulares (48%), procesos metabólicos (47%), procesos metabólicos primarios (37.6%), también se encontraron procesos metabólicos y biosíntesis de carbohidratos (5.9%), polisacáridos (1.8%), fenilpropanoides (1.16%), almidones (1.06%), flavonoides (0.67%), giberelinas (0.67%), muerte celular (1.93%) y respuesta al estímulo de etileno (1.83%) (Figura 26). De esta forma se evidencian genes relacionados con el metabolismo de los carbohidratos, polisacáridos y enzimas involucradas en la biosíntesis de lignina, además de genes que dan respuesta a estrés abiótico, calor, estrés oxidativo y alta intensidad de luz. Estas proteínas desempeñan un rol importante en la determinación de la composición química y la morfología de la pared celular y, en consecuencia de la calidad de la madera (Carvalho et al., 2013). Por tanto la síntesis del xilema secundario, derivado de la actividad de las células meristemáticas altamente vacuoladas del cambium vascular y meristemas laterales (Carvalho et al., 2013), se relacionan con los procesos de adaptación ambiental (Yang y Loopstra, 2005) y la variación estacional (Wu et al., 2016), confirmando que la formación de la madera está determinada por factores genéticos y ambientales. Como lo demuestran nuestros resultados, las propiedades de la madera juvenil del rebrote del tallo mostraron una mayor subexpresión de los genes implicados en la síntesis de lignina y metabolismo de almidones, carbohidratos y polisacáridos, y posiblemente estarían implicados con la calidad y el desarrollo de la madera que se puede obtener a partir de las plantas de segundo corte en un estadio juvenil.

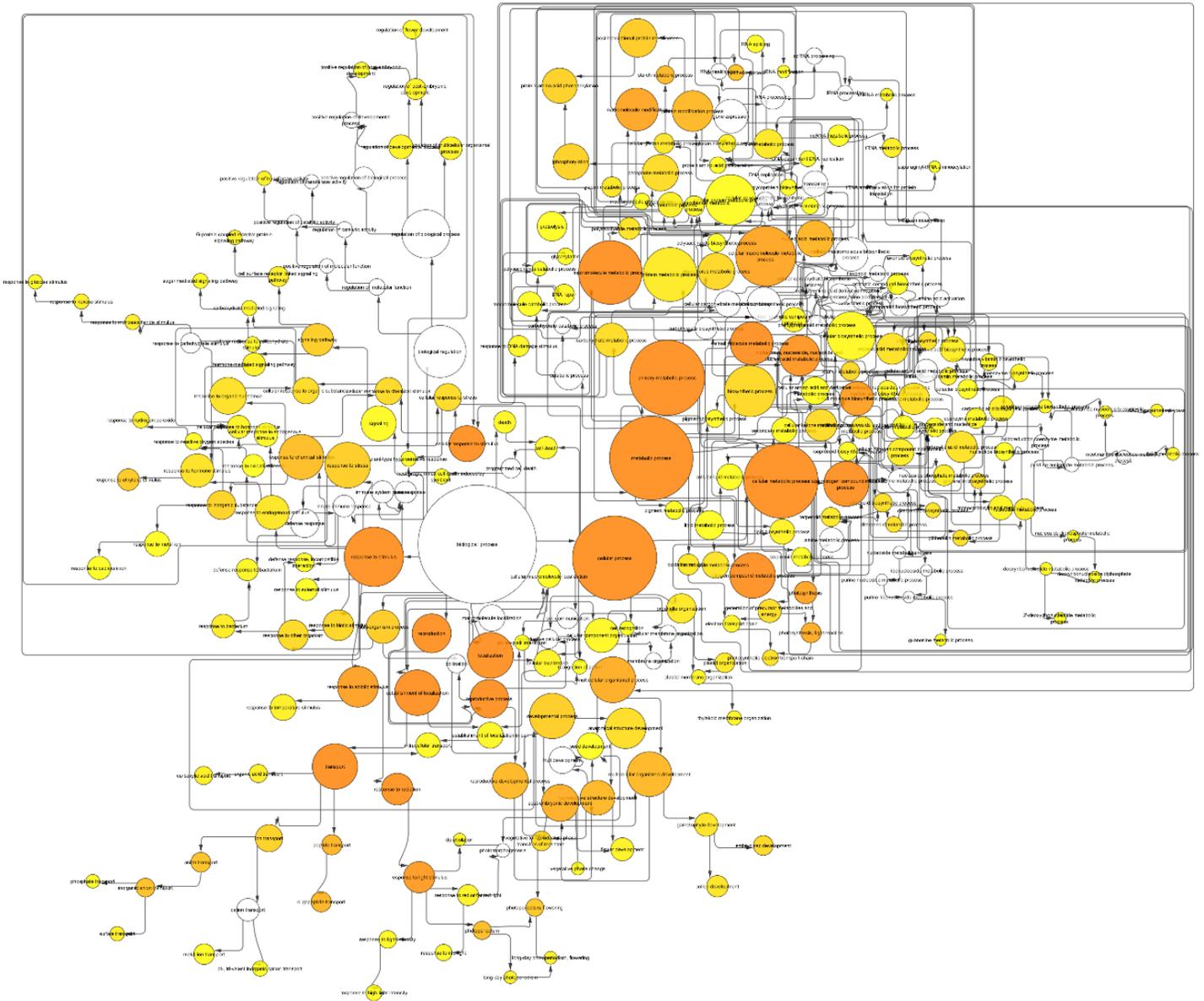


Figura 26. Análisis de red BINGO utilizando Cytoscape 3.4.0 para GDE subexpresados

Nota. El color de los nodos representa la importancia de la sobrerrepresentación, con una escala de colores que va desde el amarillo con un valor p de 0,05 hasta el naranja oscuro con un valor p correspondiente a 5 órdenes de magnitud más pequeños que el nivel de significancia ($p = 5.00E-5$).

4.3.4. Patrones de expresión de genes relacionados con xilema secundario

4.3.4.1. Factores de transcripción

Para estudiar la regulación genética de la síntesis del xilema secundario del tallo en rebrote de plantas jóvenes de Capirona, analizamos los patrones de expresión génica de los factores de transcripción diferencialmente expresados. En nuestros resultados, los principales términos GO para los FTs fueron el desarrollo del xilema, cambium, el transporte de sacarosa y la respuesta a etileno (Figura 27, 28). Consecuentemente, nuestros resultados, muestran a 55 FTs, y se clasificaron según su pertenencia a 11 familias. Las cuales fueron ERF (16 *contigs*), bHLH (14 *contigs*), MyB (7 *contigs*), WRKY (5 *contigs*). Además, de NAC (2 *contigs*), E2F/DP (2 *contigs*), AP2 (2 *contigs*), bZIP (2 *contigs*), NF-YA (2 *contigs*), GATA (1 *contigs*) y C3H (1 *contigs*).

De todos los genes diferencialmente expresados (GDEs), seleccionamos aquellos FTs que presentaron una diferencia significativa alta o moderada, además que sus secuencias de aminoácidos sean completas y no parciales. Para comparar la expresión diferencial entre muestras, se utilizó la unidad TPM (transcripciones por millón) para representar la abundancia relativa de ARN, ya que respeta la propiedad de invariancia (Zhao et al., 2020, 2021).

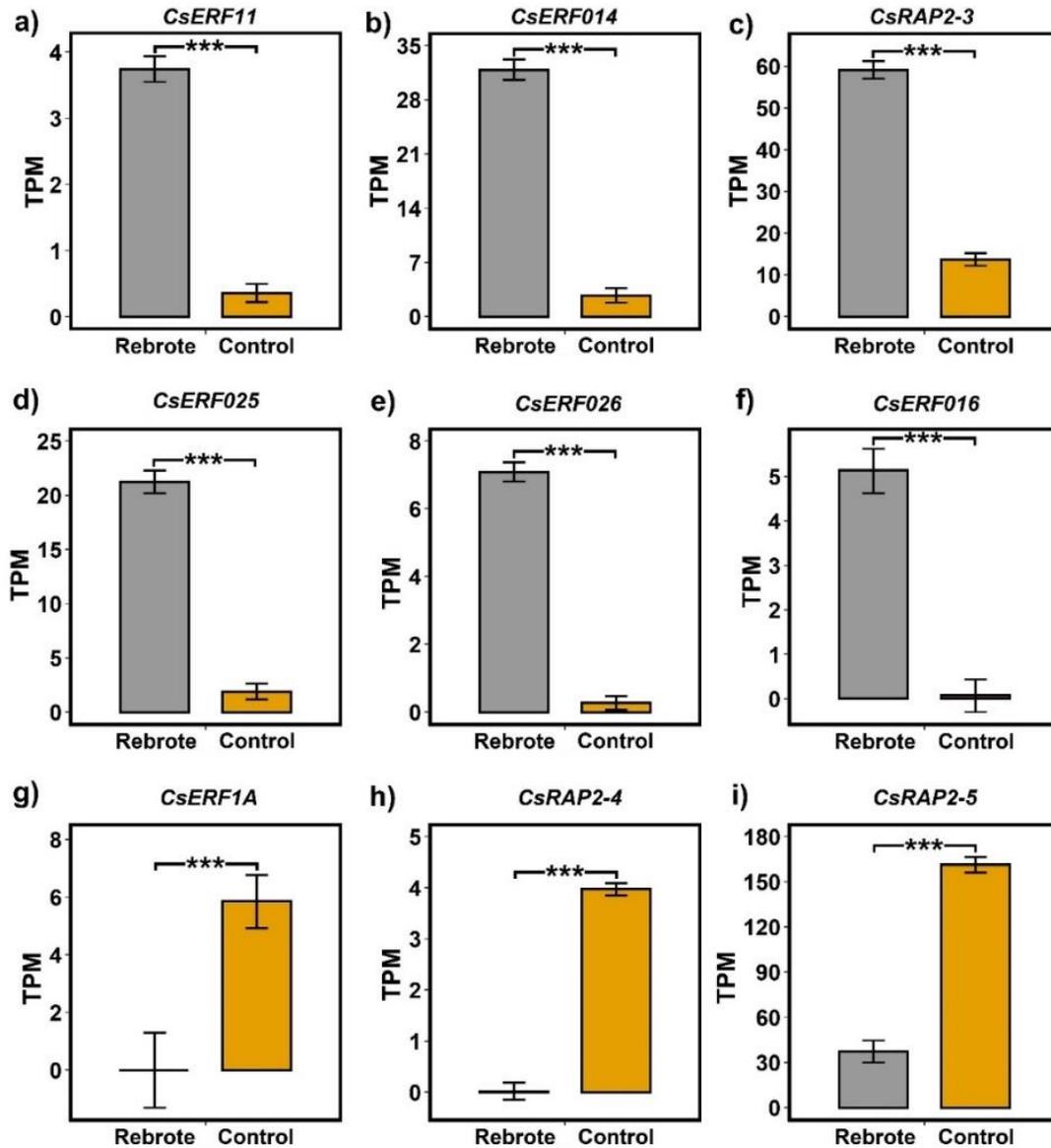


Figura 27. Abundancia relativa de ARN de 9 genes *ERF* de Capirona

Nota. Se examinó la cuantificación relativa de la expresión (TPM) en tejidos de xilema secundario de tallos en plantas de crecimiento normal (control) y tallos de rebrote. El nombre de cada gen se indica en la parte superior de cada histograma. Las viñetas \pm significa SE (error estándar) de tres muestras biológicas replicadas. Los asteriscos indican el nivel de significancia: “*” $p \leq 0,05$; “**” $p \leq 0,01$; y “***” $p \leq 0,001$.

De los 16 GDEs de *ERF* relacionados con la síntesis de xilema secundario, se seleccionaron 9 para el análisis (Figura 27). De los cuales los genes *CsERF11*, *CsERF014*, *CsRAP2-3*, *CsERF25*, *CsERF26* y *CsERF16* (Figura 27, a, b, c, d, e, f) mostraron mayor expresión relativa en los rebrotes de Capirona. *AtERF11* ortólogo de *CsERF11* está asociado a la división celular, vías de señalización activada por etileno, y a la histogénesis del floema o xilema, y también se sabe que responde a varias hormonas, especialmente al ácido jasmónico y al ácido abscísico (ABA) (Dubois et al., 2015; Zhang et al., 2016). En los tallos de la inflorescencia de *Arabidopsis*, el gen *AtERF11* se sobreexpresa progresivamente a medida que madura el tejido vascular (Dubois et al., 2015). Por otra parte, los ortólogos de los genes *CsERF014*, *CsERF25*, *CsRAP2-3* y *CsERF16* en *Arabidopsis* están asociados a los procesos de biosíntesis de carbohidratos y a la respuesta y tolerancia a estrés abiótico.

Respecto a los genes *CsERF1A*, *CsRAP2-4* y *CsRAP2-5* mostraron menor expresión en los rebrotes comparándolo con las plantas control. De acuerdo con los análisis de ortología, el gen *ERF-1* es un punto de control clave de las actividades cambiales del tallo, lo que ayuda a explicar cómo se altera el crecimiento del cambium en respuesta a los cambios ambientales (Mao et al., 2016; Mcpherson et al., 1997). Por ello, los ERF son representados en mayor medida por genes involucrados en múltiples respuestas de estrés biótico/abiótico y el desarrollo (Stepanova et al., 2007). Nuestros resultados sugieren que la expresión de estos reguladores se activa y desactiva dinámicamente en la zona cambial para el crecimiento.

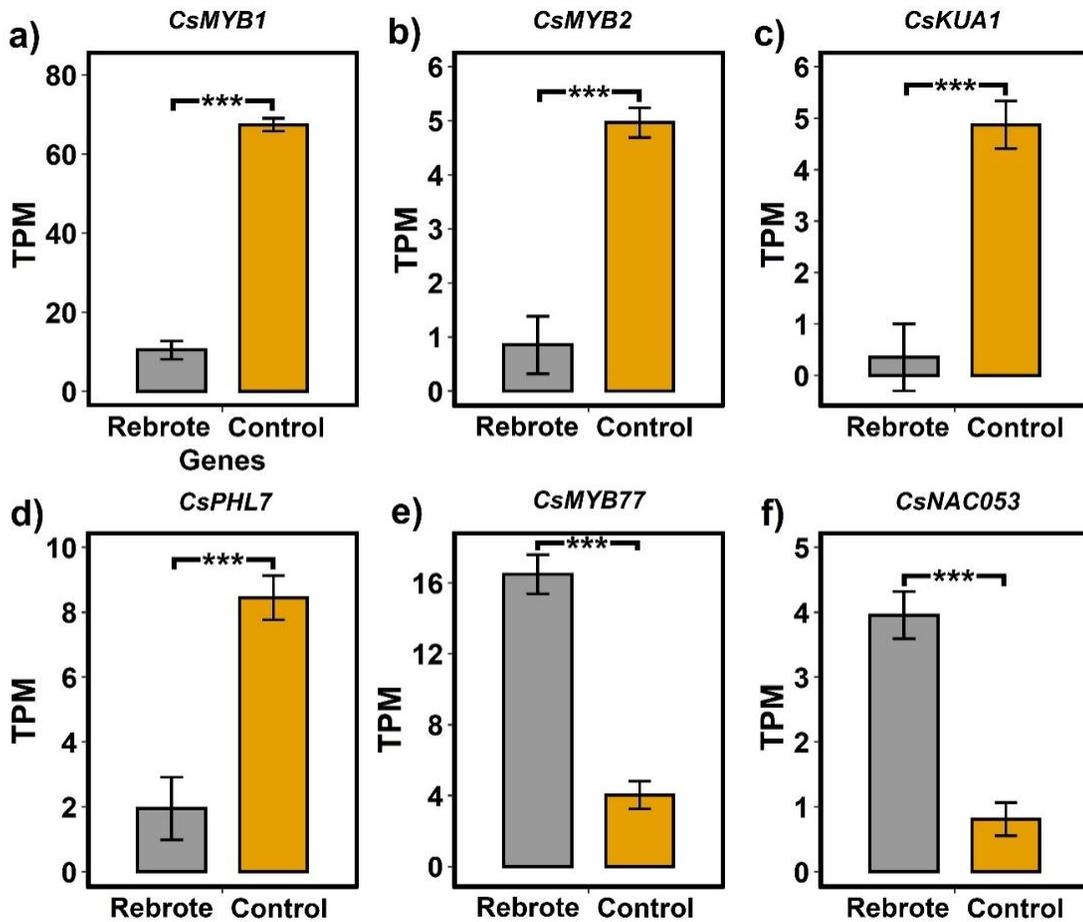


Figura 28. Abundancia relativa de ARN de 4 genes *MYB* y 1 *NAC* de Capirona

Nota. Se examinó la cuantificación relativa de la expresión en tejidos de xilema secundario de tallos en plantas de crecimiento normal (control) y tallos de rebrote. El nombre de cada gen se indica en la parte superior de cada histograma. Las viñetas \pm significa SE (error estándar) de tres muestras biológicas replicadas. Los asteriscos indican el nivel de significancia: “*” $p \leq 0,05$; “**” $p \leq 0,01$; y “****” $p \leq 0,001$.

Dentro de los GDEs se encontraron factores de transcripción MYB y NAC implicados en los procesos de xilogénesis, de los cuales los FTs MYB consisten en una estructura hélice-giro-hélice. En *Arabidopsis*, casi todas las proteínas MYB pertenecen a la clase MYB-R2R3 (con dos repeticiones imperfectas del motivo MYB), representada por 131 miembros (Jin et al., 2015). Las proteínas MYB-R2R3 han evolucionado para regular procesos específicos, incluido el metabolismo secundario (Chen et al., 2022; Schilbert y Glover,

2022), las respuestas a las hormonas vegetales (Guilfoyle y Hagen, 2007) y para dar identidad a tipos de células específicos. Los análisis cuantitativos de TPM mostraron que cinco *MYB* de *Capirona* se expresan diferencialmente en tejidos lignificados, donde los genes *CsMYB1*, *CsMYB2*, *CsKUA1* y *CsPHL7* se muestran una baja expresión en el xilema secundario de rebrote en comparación con el control (Figura 28). Estudios de genómica funcional del gen *KUA1* en *A. thaliana* (Lu et al., 2014) mencionan que reprime directamente la expresión de genes que codifican para peroxidasas que controlan la homeostasis de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en el apoplasto (Lu et al., 2014). Asimismo, las peroxidasas (Prx) pueden estimular y restringir el crecimiento de las plantas, controlando la disponibilidad de H₂O₂ en la pared celular, que es un requisito previo para el entrecruzamiento de los grupos fenólicos, para inhibir el alargamiento celular (Passardi et al., 2004). Además las Prx controlan principalmente la extensibilidad de la pared celular provocando la reticulación o la escisión de los polisacáridos de la pared celular (Passardi et al., 2004). Aun así, es posible que los cambios en la expresión de Prx provoquen otras alteraciones de la pared celular, así como en respuesta a diversos factores externos, como heridas, interacciones con patógenos y limitaciones ambientales, o simplemente como parte del desarrollo normal de la pared celular durante el crecimiento, la diferenciación y la senescencia. Contrario a ello, el gen *CsMYB77* se expresó cuatro veces más en el rebrote, este gen está involucrado en la respuesta de auxina (Figura 28). Donde la interacción entre *MYB77* y ARF define un nuevo tipo de control transcripcional combinatorio en células vegetales para modular la respuesta a la auxina, controlando así el crecimiento y desarrollo de las raíces laterales bajo condiciones ambientales cambiantes (Shin et al., 2007).

Respecto de los FTs NAC, podemos decir que se deriva originalmente de tres proteínas, NAM (sin meristemo apical), ATAF 1-2 (factor de activación de la transcripción de *Arabidopsis*) y CUC2 (cotiledón en forma de copa). Los factores de transcripción de la familia NAC participan en el mantenimiento de los límites de órganos o tejidos que regulan la transición del crecimiento por división celular al crecimiento por expansión celular (Alshareef et al., 2022; Lee et al., 2014). Los genes de la familia NAC se expresan preferentemente en el desarrollo de la madera durante las estaciones y en la diferenciación de elementos traqueales (Lee et al., 2014). El análisis funcional de algunos de estos genes NAC resultó en el descubrimiento de nuevos reguladores fundamentales para la formación

de madera. En la Figura 28 f podemos ver al gen *CsNAC053* que tiene una mayor expresión en el xilema secundario del rebrote. Ortólogos del gen en *Arabidopsis*, muestran que *NAC053* se encuentra asociada a la muerte celular programada, facilitando la producción de ROS en respuesta al estrés por sequía y calor, jugando así un papel importante en las respuestas de resistencia de las plantas a múltiples estreses abióticos (Lee et al., 2014; Lee et al., 2012).

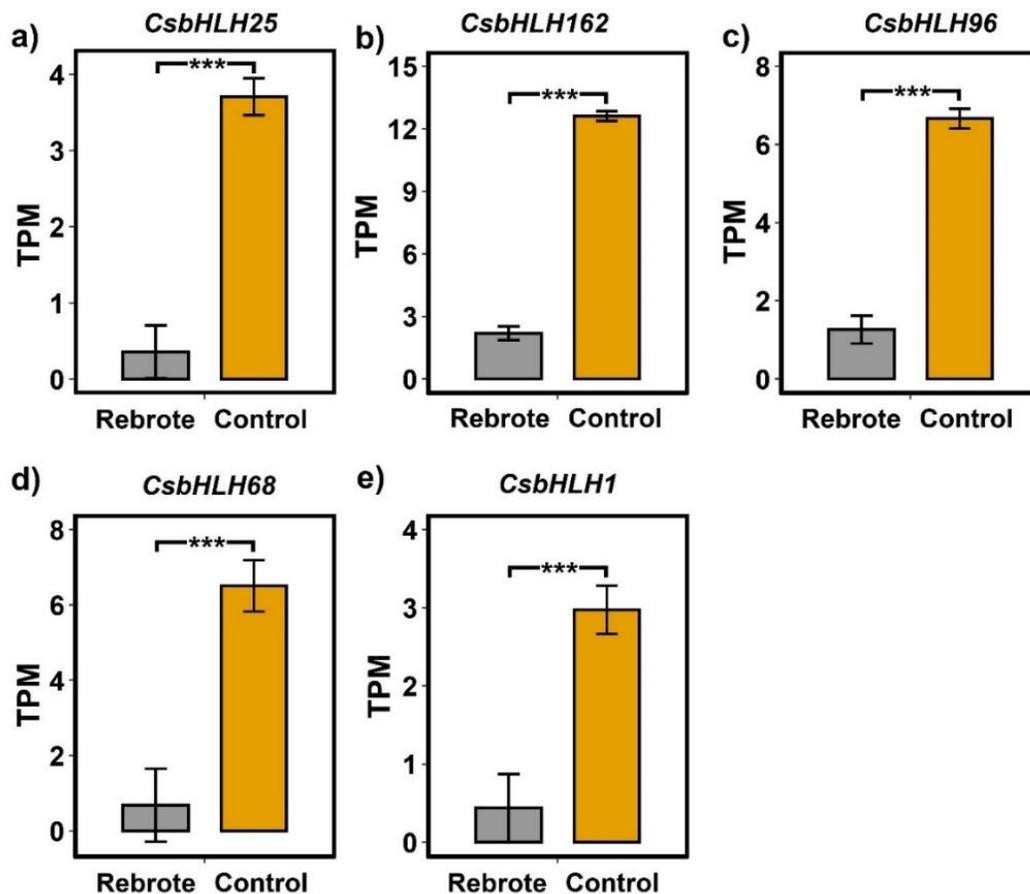


Figura 29. Abundancia relativa de ARN de 4 genes *bHLH* de Capirona

Nota. Se examinó la cuantificación relativa de la expresión en tejidos de xilema secundario de tallos en plantas de crecimiento normal (control) y tallos de rebrote. El nombre de cada gen se indica en la parte superior de cada histograma. Las viñetas \pm significa SE (error estándar) de tres muestras biológicas replicadas. Los asteriscos indican el nivel de significancia: “*” $p \leq 0,05$; “**” $p \leq 0,01$; y “****” $p \leq 0,001$.

Los FT básicos de hélice-bucle-hélice (bHLH) (Figura 29) contienen el dominio de aproximadamente 60 aminoácidos, con dos regiones funcionalmente distintas, la región básica y la región HLH (Atchley y Fitch, 1997; Toledo-Ortiz et al., 2003). La región básica de 15 aminoácidos en el extremo N del dominio bHLH funciona como un motivo de unión al ADN. La región HLH contiene dos hélices α anfipáticas con un bucle de enlace de longitud variable hacia/desde homo o heterodímeros (Atchley y Fitch, 1997; Toledo-Ortiz et al., 2003). Se informa que las interacciones combinatorias entre los FT de bHLH y los FT de MYB desempeñan un papel clave en la biosíntesis de flavonoides en las plantas (Ramsay y Glover, 2005). En conjunto, los FT de bHLH de plantas están involucrados en una amplia gama de procesos biológicos, como la señalización hormonal, las respuestas al estrés abiótico y biótico, la diferenciación celular y la biosíntesis de flavonoides.

Los resultados de la Figura 29 muestran la abundancia relativa de 5 genes que codifican FTs *bHLH* (basic helix-loop-helix) en el xilema secundario de las plantas control respecto del rebrote. De las cuales *CsbHLH162* se expresó cuatro veces más en el control que en el rebrote, estudios de sus ortólogos evidencian la importancia del gen como un posible regulador negativo de genes relacionados con la vía de señalización del estrés biótico, lo que sugiere que *bHLH162* estaría asociado con la respuesta de susceptibilidad a *Phakopsora pachyrhizi* y *Fusarium oxysporum* (Cao et al., 2020; Sun et al., 2022). Por el contrario, bajo estrés abiótico *bHLH162* es un regulador positivo en hojas y raíces de plantas sometidas a estrés por sequía que puede mitigar los daños producidos por la deshidratación en las plantas (Cao et al., 2020; Sun et al., 2022). Por otro lado, la sobreexpresión del gen *AtbHLH68* (Le et al., 2017) (ortólogo de *CsbHLH68* y *CsbHLH01*) permitió a *Arabidopsis* incrementar su tolerancia al estrés por sequía. *AtbHLH68* se expresó en el sistema vascular durante todo el desarrollo de la planta (Le et al., 2017), en Capiróna los genes *CsbHLH68* y *CsbHLH01* se expresaron en el xilema secundario del tallo, y podrían jugar un papel importante en la organización y desarrollo de las partes que componen el xilema. Además, es sabido que los tejidos vasculares son uno de los sitios principales de producción de ABA (Brookbank et al., 2021), con muchos genes involucrados en la biosíntesis, señalización, el catabolismo o el transporte de ABA, y que

se expresan en las células del parénquima vascular o en las células acompañantes del floema (Nicolas et al., 2014).

4.3.4.2 Evaluación de genes implicados en la biosíntesis de Celulosa

En este estudio analizamos molecularmente los diferentes patrones genéticos asociados a la síntesis de la madera entre plantas obtenidas a partir de semillas (control), y plantas de monte bajo (rebrote). Generalmente, la mayoría de los genes diferencialmente expresados en tejidos formadores de madera están relacionados con la biosíntesis de paredes celulares primarias y secundarias, y presentan entre 40 a 50 % de celulosa, hemicelulosa (alrededor del 25 %) y lignina (25-35 %) dentro de los primeros años de su desarrollo (Javier et al., 2021). Sin embargo, la síntesis de estas biomoléculas varía entre los diferentes estadios de desarrollo de los árboles (Galeano et al., 2015). En la Figura 30, en las muestras de rebrotes se observa una mayor expresión génica de *CsXTH23*, *CsXTH16*, *CsXTH17* (xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa XTH), *CsGATL1* (galacturonosiltransferasa), *CsGUX01* y *CsGUX02* (glucuroniltransferasas GUX) (Brown et al., 2007; Persson et al., 2005), enzimas implicadas en la biosíntesis de xilano el principal componente de la hemicelulosa, por tanto es el segundo polímero más abundante en el tejido leñoso de las dicotiledóneas (Brown et al., 2007), y además, desempeñan un papel en la remodelación de la hemicelulosa de la pared celular. El xiloglucano puede fortalecer la rigidez de la pared celular al formar una red esquelética con fibrillas de celulosa (Schröder et al., 1998). Así también, los xilanos afectan la resistencia de la biomasa porque se entrecruzan con la lignina a través de enlaces éster para ferulato y 4- *O*- metil - D -GlcA (Ebringerová y Heinze, 2000; Watanabe y Koshijima, 1988).

Asimismo, estudios demostraron que los genes *XTH* están asociados con el desmontaje de la matriz de celulosa-xiloglucano y han contribuido con el ablandamiento de algunos órganos como frutos (Han et al., 2015). También, se ha demostrado que promueve la expansión celular para acelerar el rápido crecimiento de las plantas (Nishitani y Tominaga, 1992; Thompson et al., 1997), participando en la reestructuración y el ensamblaje de la pared celular (Nishitani y Tominaga, 1992; Thompson et al., 1997). Por otro lado, los genes de álamo *PdGATL1.1* y *PdGATL1.2* (Kong et al., 2009), que son ortólogos al gen *CsGATL1* (Figura 30 f), estuvieron altamente expresados en la madera en desarrollo (Aspeborg et al.,

2005), y están específicamente regulados al alza en las zonas de formación de paredes secundarias y están regulado a la baja durante la formación de madera en tensión (Andersson-gunnera et al., 2006), lo que indica que pueden jugar un papel en la formación de la madera. Contrario a los genes anteriormente mencionados, el gen *CsPGX3* (Poligalacturonasa involucrada en la expansión 3) fue un gen diferencialmente expresado en el xilema secundario de las plantas control. Rui et al., (2017) comentan que los genes *AtPGX3* se expresan en varios tipos de tejidos, incluidas las células de guardia (células vegetales especializadas en la epidermis de hojas, tallos y otros órganos que se utilizan para controlar el intercambio de gases). Los estudios de sobreexpresión de *PGX3* revelaron que promueve la expansión irreversible de los tejidos en crecimiento.

Como vemos en el experimento (Figura 30 d, e), las variaciones significativas de la expresión de los genes *GUX*, *XTH*, *GATL* y *TSD* en los diferentes estadios de desarrollo pueden afectar en la calidad de la madera. Históricamente se ha caracterizado la madera de segundo corte (monte bajo) como de calidad inferior y se ha relegado a la generación de energía. Estudios en *Eucalyptus globulus* mencionan que la madera de rebrotes de la segunda rotación fue de menor densidad que la de árboles unifustales (Miranda y Pereira, 2015).

Sin embargo, creemos que estos genes podrían tener diferentes funciones en el ensamblaje y la modificación de la pared celular, además estarían asociados en el ablandamiento de la madera juvenil y al rápido crecimiento de los árboles, factores que estarían asociados con cambios en los rasgos anatómicos y algunas propiedades físico-mecánicas de la madera de las plantas de monte bajo.

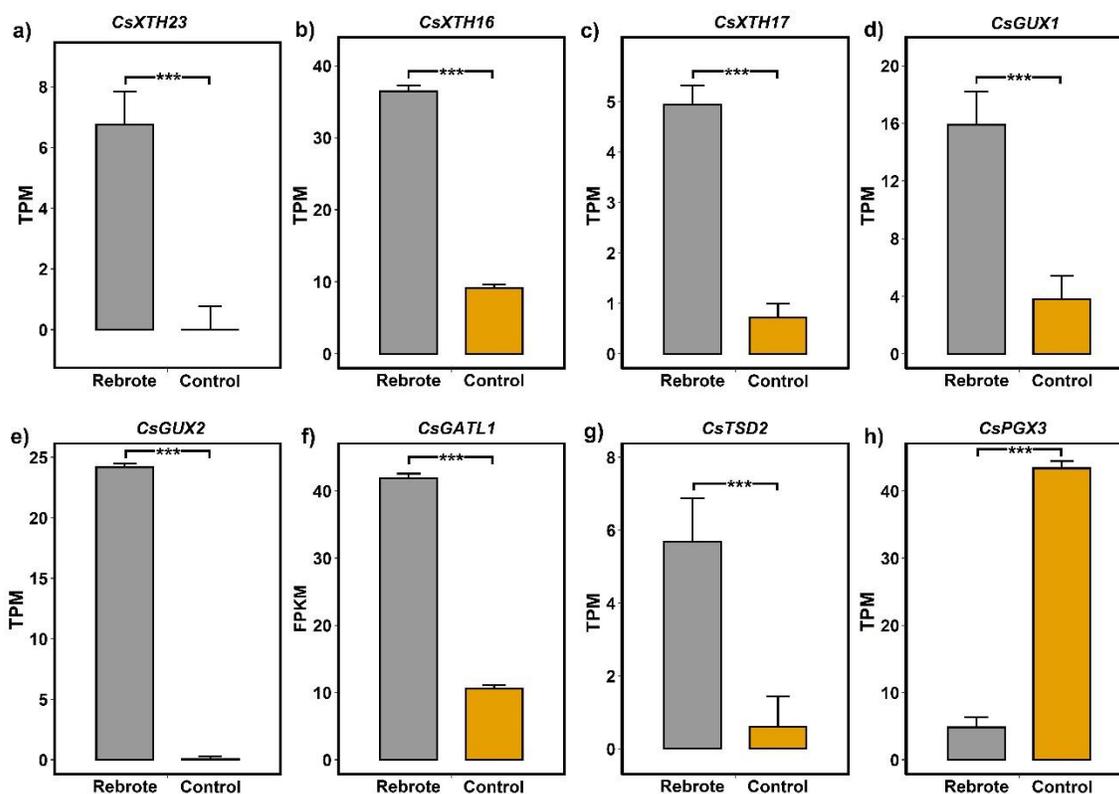


Figura 30. Abundancia relativa de ARN de 8 genes implicados en la biosíntesis de Celulosa de Capirona

Nota. Se examinó la cuantificación relativa de la expresión en tejidos de xilema secundario de tallos en plantas de crecimiento normal (control) y tallos de rebrote. El nombre de cada gen se indica en la parte superior de cada histograma. Las viñetas \pm significa SE (error estándar) de tres muestras biológicas replicadas. Los asteriscos indican el nivel de significancia: “*” $p \leq 0,05$; “**” $p \leq 0,01$; y “***” $p \leq 0,001$.

4.3.4.3 Evaluación de genes implicados en la biosíntesis de Lignina

En nuestros resultados, pudimos notar que la mayor abundancia de transcritos de enzimas involucradas en el metabolismo secundario de la ruta de los fenilpropanoides aumentó considerablemente en las plantas control (Figura 31 a, b, c, d). Estas enzimas corresponden a la *CsCYP98A1*, *CsLAC12*, *CsCCOAMT* y *CsCAD7*. De las cuales, la familia de genes de lacasa (*LAC*) cataliza la lignificación mediante la polimerización de monolignoles en las

plantas y se ha sugerido que juega un papel vital en el reino vegetal. Estudios realizados en *Brachypodium distachyon*, *A. thaliana* (*AtLAC*, *AtLAC4*, *AtLAC7*, *AtLAC8* y *AtLAC15*) y Álamo (*LAC1*, *LAC2*, *LAC3*, *LAC90* y *LAC110*), evidencian que los genes *LAC* se expresaron en los tejidos que presentan alta lignificación, demostrado que afectan directamente la acumulación de lignina (Passardi et al., 2004).

Por otro lado, *CsCAD7* y *CsCAD1* tuvieron niveles de expresión significativos en el xilema secundario del tallo, eso significa que estarían asociados también a la formación de la madera. Sin embargo, *CsCAD1* se expresó en mayor abundancia en las plantas de monte bajo. Estudios de expresión relativa del *CAD1* en *Arabidopsis* y Tabaco muestran que estos genes podrían ser parcialmente responsables de la biosíntesis de precursores de lignina (Damiani et al., 2005). Así también, estudios de *CAD1* en Álamo respalda la idea que hay una relación entre la velocidad de crecimiento y el contenido de lignina, debido a que el crecimiento de las plantas y la biosíntesis de lignina compiten por los mismos recursos de carbono, es concebible que cuando el crecimiento se ralentiza, las plantas tienen más tiempo para lignificar completamente sus paredes celulares (Gómez, 2015).

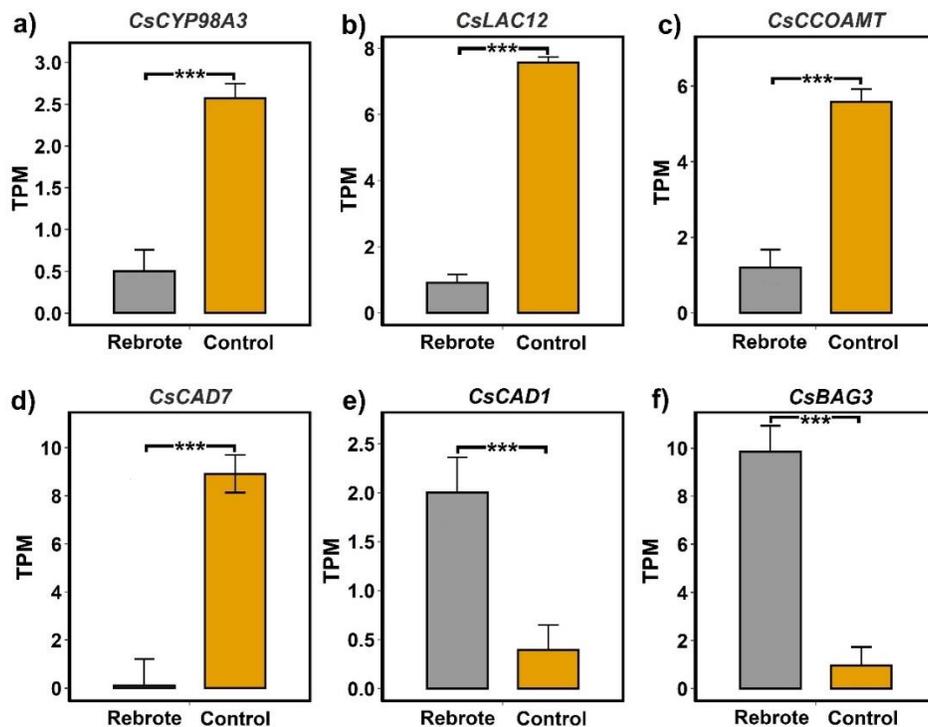


Figura 31. Abundancia relativa de ARN de 6 genes implicados en la biosíntesis de Lignina de Capirona

Nota. Se examinó la cuantificación relativa de la expresión en tejidos de xilema secundario de tallos en plantas de crecimiento normal (control) y tallos de rebrote. El nombre de cada gen se indica en la parte superior de cada histograma. Las viñetas \pm significa SE (error estándar) de tres muestras biológicas replicadas. Los asteriscos indican el nivel de significancia: “*” $p \leq 0,05$; “**” $p \leq 0,01$; y “***” $p \leq 0,001$.

4.4. Identificación de genes implicados en la formación de la madera en *G. crinita*, utilizando RNAseq

4.4.1. Selección de plantas para análisis transcriptómico y extracción de ARN

G. crinita es una especie que demostró ser de rápido crecimiento, manteniendo altos niveles fotosintéticos (PSII) para la obtención de ATP y NADTH (Figura 9 y 10), presentando un crecimiento constante durante todo el año (Figura 7), no obstante, los análisis anatómicos evidenciaron que existe variación en el diámetro de lumen a través de las tres secciones del tallo (basal, medio y apical), esto debido en parte a que las hojas jóvenes son fuente de mayor producción de ATP y NADTH respecto de las hojas viejas (Figura 12). Debido a estos resultados, se decidió comparar el proceso de síntesis del xilema secundario entre plantas de crecimiento normal (altura=2.60 m; diámetro=26 cm) y tocones (altura= 10 cm; diámetro=26 cm) debido a la latencia en el proceso de crecimiento. *G. crinita* es un árbol de gran interés para las plantaciones forestales. Por tanto, es importante comprender los procesos de biosíntesis de su madera. En ese sentido la comparación entre el xilema secundario de los tocones y las plantas control nos permitió identificar a los genes implicados en la síntesis de celulosa, hemicelulosa y lignina.

Por otro lado, cabe señalar, que la extracción del ARN se dio en el mes de abril, periodo donde las plantas de *G. crinita* presentaron un mayor rendimiento cuántico (Φ_2) (Figura 9) y crecimiento diametral y longitudinal (Figura 7). Respecto a la extracción del ARN, la combinación de CTAB, el kit Direct-zolTM RNA MiniPrep y Kit PCR Inhibitor Removal Kit, (ZYMO Research), esto permitió obtener cantidad de ARN lo suficientemente puro para la posterior preparación de la biblioteca de secuenciación de RNAseq. *G. crinita* presenta en la corteza de su tallo gomas, polifenol y polisacáridos que dificultan la

obtención del ARN. Por ello, para reducir las concentraciones de gomas fue importante un pretratamiento inicial del CTAB con el cloroformo / alcohol isoamílico (24:1, v / v). Así también, fue importante la precipitación del ARN con LiCl durante 12 horas a -20°C, esto ayudo a separar el ARN de la contaminación evitando la oxidación de polifenoles en condiciones alcalinas (Jordon-Thaden et al., 2015; Kanani et al., 2019).

4.4.2. Ensamblaje y anotación del transcriptoma

Tras el cálculo de la abundancia relativa con Kallisto, y la detección de secuencias con ORF mayores a 200 pb, se procedió a determinar los genes con expresión diferencial utilizando EdgeR. Estos genes fueron filtrados según su nivel de expresión ($\log FC < -2$ y $\log FC > 2$) y su significancia $p > 0.05$, dando como resultado un total de 3491 genes diferencialmente expresados. De estos, 1938 genes estuvieron regulados positivamente, en tanto que 1553 genes fueron regulados negativamente.

4.4.3. Análisis de enriquecimiento ontológico (GO) de GDEs

Para identificar los GDEs, se comparó plantas de crecimiento normal (Control) con los tocones del tallo de Bolaina. En total, se expresaron diferencialmente 3491 transcritos. Para revelar los procesos biológicos involucrados en la formación de madera durante el crecimiento de los árboles, realizamos un análisis de enriquecimiento GO de los GDEs. Las ontologías y los genes asociados a los procesos biológicos están soportados estadísticamente por la simulación de Benjamin y Hochberg (0.05 *p-value*) (Yoav et al., 1995), la cual asocia significativamente genes a determinadas funciones (Maere et al., 2005). En la Figura 32 se muestra los patrones de ontología génica de GDEs regulados positivamente (1938 genes), los principales genes estuvieron relacionados con procesos celulares (37%), proceso metabólico (36%), proceso metabólico primario celular (27%), respuestas a estímulos (18%), respuesta de estrés (11.6%) y en menor porcentaje se encontraron genes involucrados proceso biosintético de ácido carboxílico (5%), proceso metabólico de lípidos celulares (3.78%), proceso biosintético de aminoácidos celulares (1.59%), muerte celular (1.32%), respuesta a los niveles de nutrientes (0.99%) y respuesta

celular a los niveles de nitrógeno (0.26%) (Figura 32). De acuerdo a los resultados, podemos notar que un 18 % de GDEs responden positivamente a estímulos de estrés abiótico como cambios en la respuesta al ion cadmio, estímulos químicos, frío, estrés osmótico, estrés oxidativo, estímulo de temperatura y estrés salino (Figura 32). Como sabemos en los árboles la síntesis de lignina está asociado a los factores de estrés abiótico y biótico (Magalhaes et al., 2010). Algunos de estos genes codifican enzimas hidrolíticas de la pared celular (p. ej., pectinesterasas y poligalacturonasas), enzimas del metabolismo secundario (p. ej., flavonoides - *O*-glicosiltransferasa, isoflavonas reductasas, dihidroflavonol 4-reductasa e isoflavonas 2'-hidroxilasa), enzimas relacionadas con el metabolismo hormonal y la señalización. Por ejemplo, IAA-amido sintetasa y Ser/Thr proteína quinasa BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 [BRI1]-like), proteínas relacionadas con la degradación de proteínas (p. ej., proteína F-box), proteínas relacionadas con el transporte y el metabolismo del azúcar (p. ej., transportador de hexosa e invertasa), proteínas relacionadas con el transporte proteínas (p. ej., extrusión de compuestos tóxicos y multifármacos [MATE], aminoácidos y transportador de potasio), factores de transcripción (p. ej., ERF, MIELOBLASTOSIS [MYB], HELIX-LOOP-HELIX [bHLH] y HOMEODOMAIN LEUCINE ZIPPER) y estrés- proteínas relacionadas (por ejemplo, proteína relacionada con la patogénesis, endoquitinasas y peroxidasas).

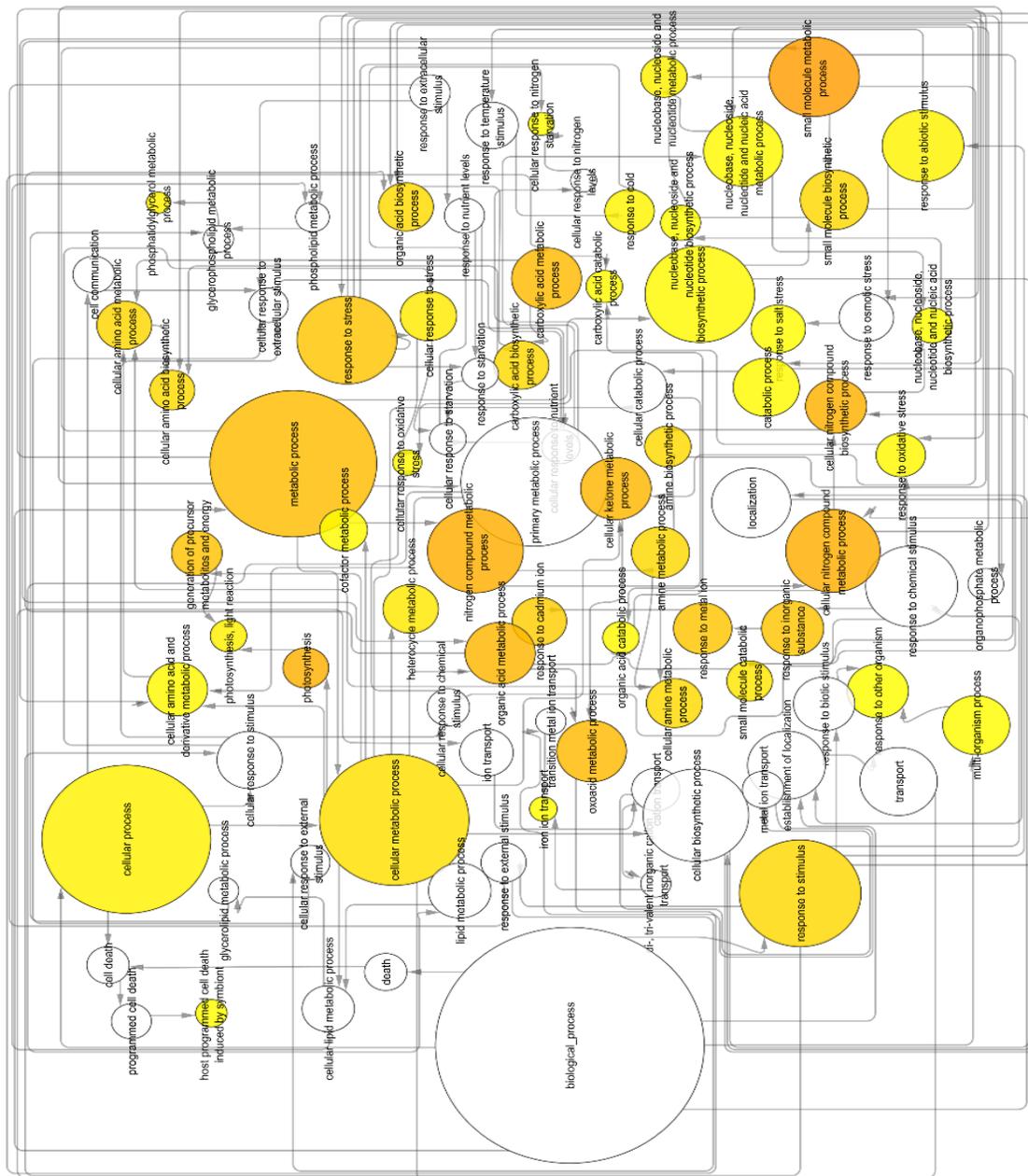


Figura 32. Análisis de red BINGO utilizando Cytoscape 3.4.0 para GDE sobreexpresados

Nota. El color de los nodos representa la importancia de la sobrerrepresentación, con una escala de colores que va desde el amarillo con un valor p de 0,05 hasta el naranja oscuro con un valor p correspondiente a 5 órdenes de magnitud más pequeños que el nivel de significancia ($10 - 5 \times 0,05$).

Por otro lado, en la Figura 33 se observa el perfil de ontología génica de GDEs regulados negativamente (1771 genes), donde los principales genes estuvieron asociados con respuesta a estímulos (18.3%), respuesta a estímulos hormonales (6.2%), procesos metabólicos de lípidos (4.6%), estructura anatómica morfogénesis (3.7%), también se encontraron genes asociados a estímulos de auxina (2.7%), fenilpropanoides (1.5%), almidones (1.06%), flavonoides (0.67%), giberelinas (0.67%), muerte celular (1.93%), biogénesis de la pared celular (1.2%), procesos metabólicos de la lignina (0.8%), glucoronoxilano (0.3%) y xilano (0.3%). De esta forma se evidencia genes relacionados con el metabolismo de los carbohidratos, polisacáridos y enzimas involucradas en la biosíntesis de celulosa, hemicelulosa y lignina, además de genes que dan respuesta a estrés abiótico, calor, estrés oxidativo y alta intensidad de luz. Estas proteínas desempeñan un rol importante en la determinación de la composición química y la morfología de la pared celular y, en consecuencia de la biogénesis de la madera (Carvalho et al., 2013). Por tanto la síntesis del xilema secundario, derivado de la actividad de las células meristemáticas altamente vacuoladas del cambium vascular y meristemas laterales (Carvalho et al., 2013), se relacionan con los procesos de adaptación ambiental (Yang y Loopstra, 2005) y la variación estacional (Wu et al., 2016), confirmando que la formación de la madera está determinado por factores genéticos y ambientales. Por tanto, los perfiles transcriptómicos de la xilogénesis serán diferentes entre genotipos, árboles de diferente edad y las etapas de desarrollo. Como lo demuestran nuestros resultados, mayormente los genes del xilema secundario del tocón del tallo mostraron una mayor subexpresión de los genes implicados en la síntesis de lignina y metabolismo de almidones, carbohidratos y polisacáridos, sin embargo muestran mayor expresión de genes que responden a estímulos hormonales. Por ello, presumimos que los tejidos en estado de dormancia (Druart et al., 2007) estén preparándose para un proceso de inducción del brote propio de los árboles de *G. crinita*.

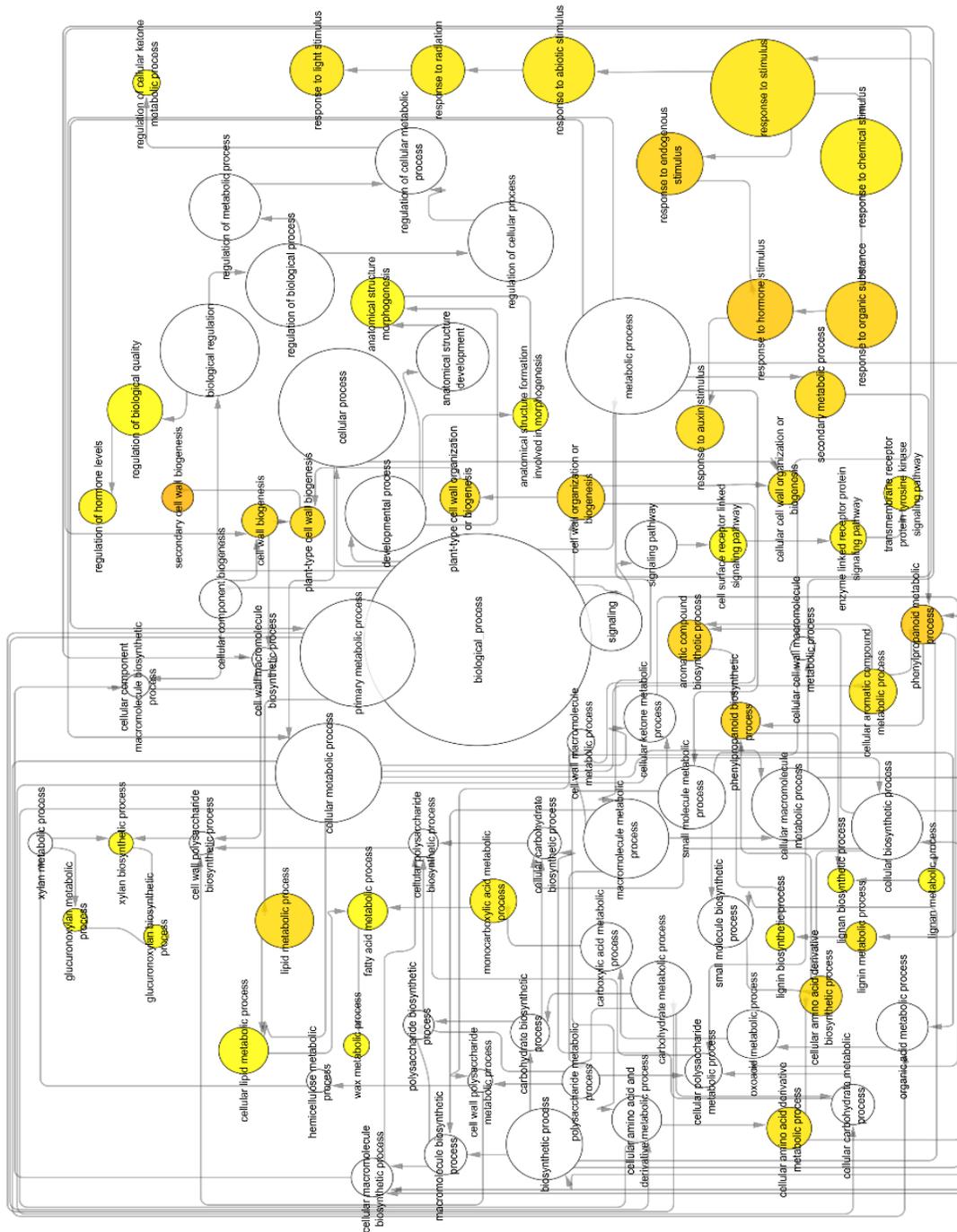


Figura 33. Análisis de red BINGO utilizando Cytoscape 3.4.0 para GDE subexpresados

Nota. El color de los nodos representa la importancia de la sobrerrepresentación, con una escala de colores que va desde el amarillo con un valor p de 0,05 hasta el naranja oscuro con un valor p correspondiente a 5 órdenes de magnitud más pequeños que el nivel de significancia ($p = 5.00E-5$).

4.4.4. Patrones de expresión de genes relacionados con biosíntesis de xilema secundario

4.4.4.1. Factores de transcripción implicados en la formación de xilema secundario

Los factores de transcripción de la familia NAC y MYB regulan diversos procesos fisiológicos, incluidos la biosíntesis de la pared celular secundaria, las respuestas al estrés y el desarrollo, etc. (Maugarny-Calès et al., 2016; Nakano et al., 2015). Los resultados muestran que los FTs MYB *GcMYB103*, *GcMYB95*, *GcMYB83* y *GcMYB26* presentaron una sobreexpresión moderada en las plantas control (Figura 34), mientras que los FTs *GcMYB21* y *GcMYB79* tuvieron una sobreexpresión alta en el xilema secundario de los tocones del tallo (Figura 34). Por tanto, estos FTs MYB (Figura 34) podrían jugar un papel importante en la organización y desarrollo de las partes que componen la albura, como las células radiales de la zona cambial, los vasos y fibras. Y en efecto estudios en los genes ortólogos de *GcMYB103* en *A. thaliana* (*AtMYB103*) y *Oriza sativa* (*OsMYB103L*) comentan que funcionalmente están asociados a la biosíntesis de celulosa y la formación de paredes secundarias principalmente mediante la unión directa a los promotores de *CESA4*, *CESA7*, *CESA9* y *BC1* y regulando su expresión (Ye et al., 2015). Asimismo, *MYB103* puede funcionar como un interruptor maestro para regular la expresión de varios FTs aguas abajo, que participan en la biosíntesis de la pared celular secundaria (Ye et al., 2015; Yu et al., 2020). Por otra parte, estudios experimentales en los ortólogos de los genes *GcMYB83* y *GcMYB26* en *Arabidopsis* comentan que *MYB83* (McCarthy et al., 2009; Zhong y Ye 2012) y *MYB26* (Di Vittori et al., 2021; Steiner-Lange et al., 2003) se expresan tanto en los elementos de vasos y fibras, donde la sobreexpresión daría como resultado un incremento en el engrosamiento de la pared celular secundaria en las células y tejidos (McCarthy et al., 2009; Steiner-Lange et al., 2003). Contrario a ello, los genes *GcMYB21* y *GcMYB79* presentaron una mayor expresión en el xilema secundario de los tocones de tallo (Figura 34 e, f), donde la sobreexpresión de *AtMYB21* ortólogo de *GcMYB21* mejora la tolerancia de las plantas al estrés salino (Zhang et al., 2021), es más, algunos datos de niveles de expresión de *AtMYB79* muestran una regulación positiva a la respuesta a ABA (Cheng et al., 2022). ABA es una hormona importante que puede desencadenar respuestas de las plantas a diversos estreses abióticos, como la salinidad, la sequía, las altas

temperaturas, el frío y el estrés oxidativo (Druart et al., 2007; Sah et al., 2016). Así también, nuestros resultados, presentaron patrones de genes diferencialmente expresados similares a los hallados en los estudios de Ramachandran et al., (2021), donde los genes de xilema que responden a ABA incluyen enzimas Cellulose Synthase (*CESA4*, *CESA7* y *CESA8*), Laccase (*LAC11* y *LAC17*), Xylem Cysteine Peptidase (*XCPI* y *XCP2*), así como genes que codifican los factores de transcripción como *MYB83* (Figura 34 c), *VND2* (Figura 34 l), *VND3* y *VND7* (Ko et al., 2006; Niu et al., 2021) que actúan corriente arriba de muchos genes de biosíntesis de la pared celular secundaria.

Asimismo, en los últimos años, en *Arabidopsis* se ha establecido que la activación coordinada de los genes de biosíntesis de la pared celular secundaria está controlada por una red transcripcional (Lin et al., 2015). En esta red transcripcional, algunos FT de la familia NAC son los interruptores maestros de nivel superior que pueden activar una batería de factores de transcripción aguas abajo, incluidos *MYB26*, *MYB95*, *MYB83* y *MYB103* (Chen y Zhu, 2004; Demura y Fukuda, 2007; Zhong et al., 2008). En el experimento se consiguió identificar a 6 FT NAC diferencialmente expresos y cuyos ortólogos en *Arabidopsis* los asocian funcionalmente con el control del desarrollo de la planta, respuesta al estrés y la senescencia. En la Figura 34, los 5 FTs *GcANAC2* (*ATAF1*), *GcANAC022*, *GcANAC029*, *GcANAC058* y *GcANAC072* presentaron sobreexpresión en el xilema secundario en el tocón comparado con los genes del tallo control, contrario a ello *GcVND2* mostró mayor expresión relativa en el tallo control (Figura 34 l). Asimismo, algunos FTs como *ANAC2* y *VND2* actuarían como activadores o represores transcripcionales, y estarían asociados en redes de coexpresión en las vías de señalización de ABA y respuestas a estrés biótico (Fang et al., 2008; Olins et al., 2018), esta conexión es importante en los procesos de formación de la madera. Es sabido que ABA activa rápidamente la expresión de genes que codifican factores de transcripción del dominio NAC relacionado con tejidos vasculares (VND Vascular-Related NAC-Domain), albura, células radiales de la zona cambial y fibras. Los análisis moleculares y genéticos revelaron que los dos cambios en el desarrollo del xilema mediados por ABA están regulados por distintos miembros de esta familia de factores de transcripción, con *VND2* y *VND3* promoviendo la tasa de diferenciación de las células del metaxilema (Ramachandran et al., 2021), esto es coherente con los resultados obtenidos en el experimento ya que la

sobreexpresión de *GcVND2* se dio en el xilema secundario de tallo en crecimiento (Figura 34 I). Contrario a este resultado, los otros 5 FTs NAC (*ANAC2*, *ANAC022*, *ANAC029*, *ANAC058* y *ANAC072*) estuvieron asociados al control de las respuestas al estrés y la senescencia, coordinado por estímulos de la señalización de ABA. Por ejemplo, el ortólogo de *GcANAC2* en *A. thaliana* (Alshareef et al., 2022; Peng y Neff, 2021), fue previamente identificado como un importante regulador de la senescencia y la respuesta al estrés por sequía. El gen *ANAC022* (NAC1), funcionalmente promueve el crecimiento en los tejidos meristemático radicales y confieren tolerancia al estrés abiótico y actúa como un activador de la transcripción para mediar en la señalización de auxina (Xie y Ding, 2022). El gen *GcANAC029* ortólogo de *ANAC029* de *A. thaliana* regula la transcripción de genes implicados en defensa frente al estrés de alta salinidad e incrementando su transcripción rápidamente bajo señales de estrés hídrico (Carrillo-Bermejo et al., 2020). *AtANAC058* ortólogo de *GcANAC058* se identificó como modulador del potencial de germinación mediado por ABA (Coego et al., 2014). Mientras que la sobreexpresión de *ANAC072* (el ortólogo *GmNAC085*) provoca retraso en el crecimiento y acelera los procesos de senescencia en hojas (Li et al., 2016; Li et al., 2012). En conclusión, los FTs seleccionados pueden desempeñar funciones sinérgicas o antagónicas en la señalización de ABA y el estrés abiótico (Li et al., 2016; Li et al., 2012)

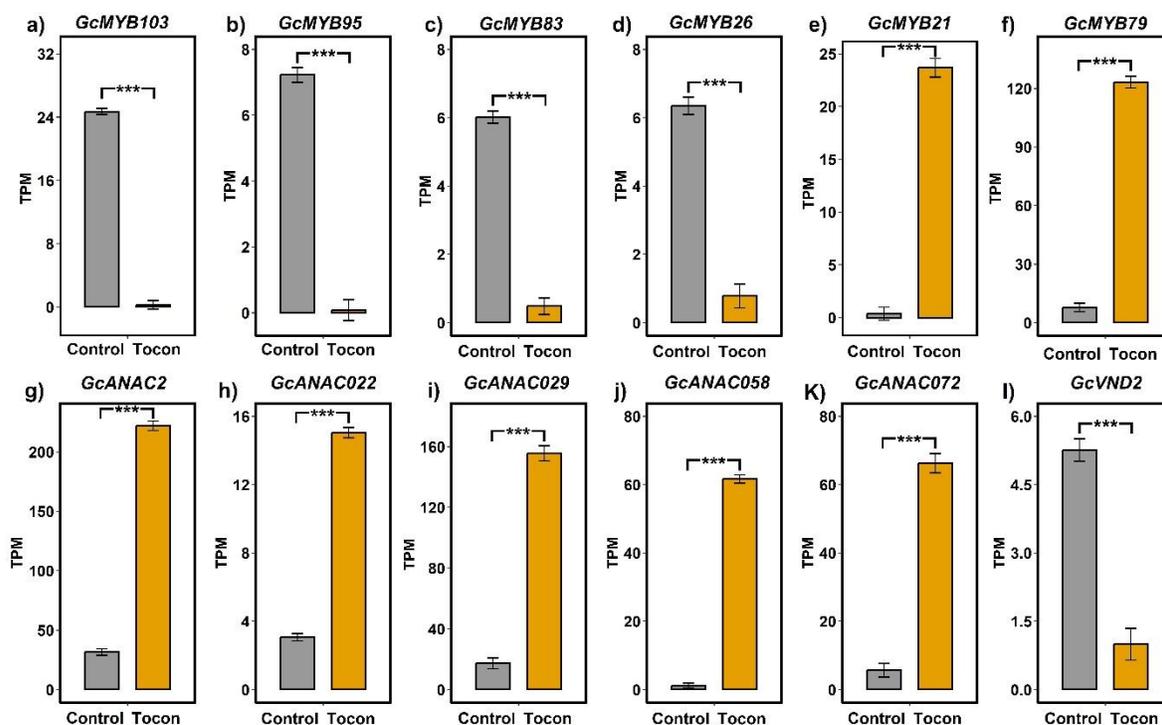


Figura 34. Abundancia relativa de ARN de 12 genes que codifican FTs MYB y NAC

Nota. Se examinó la cuantificación relativa de la expresión (TPM) en tejidos de xilema secundario de tallos en plantas de crecimiento normal (control) y tocones de tallo. El nombre de cada gen se indica en la parte superior de cada histograma. Las viñetas \pm significa SE (error estándar) de tres muestras biológicas replicadas. Los asteriscos indican el nivel de significancia: “*” $p \leq 0,05$; “**” $p \leq 0,01$; y “****” $p \leq 0,001$.

4.4.4.2. Evaluación de genes implicados en la biosíntesis de Celulosa

Las paredes celulares de las plantas regulan la división y expansión celular, brindan integridad estructural, soporte mecánico y son una barrera física contra los patógenos. Además, están recubiertas de componentes fenólicos, polisacáridos (celulosa, hemicelulosa y lignina) y proteínas. En los resultados del transcriptoma, se logró identificar genes implicados en la biosíntesis de celulosa, hemicelulosa y lignina. Respecto a la síntesis de celulosa, los genes *GcPOM1*, *GcCESA8* y *GcCESA1* mostraron una mayor expresión en el xilema secundario de las plantas control (Figura 35). Resultados similares fueron reportados anteriormente en *Arabidopsis* donde los patrones de expresión de *POM1*

están altamente correlacionados con diferentes conjuntos de genes *CESA*, y son necesarios para la biosíntesis de celulosa durante la formación de la pared celular primaria y secundaria, respectivamente (Aktar et al., 2010; Brown et al., 2005). Las plantas control de Bolaina se encontraban en crecimiento, y es coherente que los genes *POM* y *CESA* se encuentren sobre expresados, ya que los tocones del tallo presumiblemente estarían en un estado de latencia. Asimismo, reportes de Mouille et al., (2003), comentan que *POM1* juega un papel clave en el establecimiento de interacciones entre las microfibrillas de celulosa y las hemicelulosas, además desempeña un papel en la determinación de la rigidez de la pared celular y que la actividad está regulada de manera diferencial por vías que se desencadenan por las condiciones ambientales (Sánchez-Rodríguez et al., 2012), como la respuesta a la tolerancia al estrés salino (Kwon et al., 2007), por tanto *POM1* es una enzima que desempeña funciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas según el efecto constitutivo (Aktar Hossain et al., 2010; Hermans et al., 2010; Sánchez-Rodríguez et al., 2012; Zheng et al., 2019).

Al evidenciarse la mayor expresión de los genes *GcPOM1*, *GcCESA8* y *GcCESA1*, se sugiere un vínculo funcional para la síntesis de la pared celular de Bolaina. Sin embargo, que rol desempeñarían los genes *CESA*, de acuerdo a reportes de genes ortólogos en *A. thaliana*, *CESA1*, *CESA3* y *CESA6* estarían asociados en la biosíntesis de celulosa de la pared celular primaria (PCW) (Hill et al., 2014; Persson et al., 2007), mientras que *CESA4*, *CESA7* y *CESA8* se requieren durante el desarrollo de la pared celular secundaria (SCW) (Hill et al., 2014; Persson et al., 2007). Por tanto, diríamos que las plantas control se encontraban en procesos de síntesis de pared celular primaria y secundaria asociadas a su crecimiento diametral, y de acuerdo con algunos estudios previos en *Arabidopsis* es probable que el factor de transcripción master regulador *VND2* (*GcNAC076*) este asociado a su regulación (Olins et al., 2018), y como vemos en la Figura 38i el gen *VND2* se encuentra sobre expresado.

Por el contrario, en el xilema secundario de los tocones hubo una mayor expresión relativa del gen *GcLPEAT2* (LISOFOFATIDILETANOLAMINA ACYLTRANSFERASE), este gen está asociado al control de la deposición molecular de fosfolípidos en la membrana, desempeñando un papel crucial para la fluidez óptima de la membrana, el tráfico de vesículas y otras funciones biológicas relevantes (Tasseva et al., 2004). Sin embargo, otros

estudios comentan que LPEAT desempeña un papel mucho más complejo en la regulación del crecimiento que simplemente mantener la homeostasis con niveles adecuados de fosfatidiletanolamina (PE) en las células. En particular, la sobreexpresión de LPEAT1 o LPEAT2 en *A. thaliana* estaría asociado con plantas con mayor tamaño y mayor peso seco (Jasieniecka-Gazarkiewicz et al., 2017). Por lo tanto, es tentador especular que *GcLPEAT2* estaría involucrada en una red global que regula o induce el crecimiento celular en *G. crinita*.

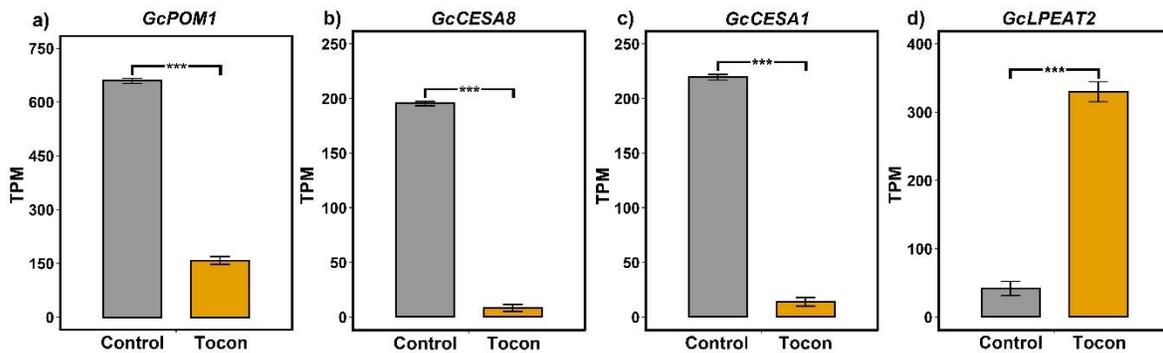


Figura 35. Abundancia relativa de ARN de 4 genes implicados en la síntesis de Celulosa de Bolaina

Nota. Se examinó la cuantificación relativa de la expresión en tejidos de xilema secundario de tallos en plantas de crecimiento normal (control) y tocones de tallo de 10 cm. El nombre de cada gen se indica en la parte superior de cada histograma. Las viñetas \pm significa SE (error estándar) de tres muestras biológicas replicadas. Los asteriscos indican el nivel de significancia: “*” $p \leq 0,05$; “**” $p \leq 0,01$; y “***” $p \leq 0,001$.

4.4.4.3. Evaluación de genes implicados en la biosíntesis de Hemicelulosa

La producción de la pared celular secundaria (SCW) durante el desarrollo del xilema requiere una regulación positiva de la biosíntesis de hemicelulosa, ya que permite reforzar la estructura de los elementos de los vasos y las fibras (Meents et al., 2019). La hemicelulosa es un biopolímero abundante en el reino vegetal, y está formada por unidades de azúcar piranosas y furanosas, que incluyen D-xilosa, D-manosa, L-arabinosa, D-glucosa, ácido D-glucurónico y ácido D-galacturónico (Schnell, 2019). De las cuales, el

xilano es la principal hemicelulosa SCW, se sintetiza en el aparato de Golgi por un conjunto de transferasas (glicosiltransferasas, etc.), así como también con transportadores y proteínas biosintéticas de sustrato (Meents et al., 2019). En consecuencia, los resultados del transcriptoma de *Bolaina* permitieron identificar genes (*GcXTH33*, *GcGUT2*, *GcTBL27*, *GcIRX9*, *GcGAUT13*, *GcIRX15*, *GcPGSIP3* y *GcIRX14*) asociados a la síntesis de Hemicelulosa (Figura 36). Es sabido que las proteínas transmembrana de tipo II IRX (IRREGULAR XYLEM) forman parte de un complejo biosintético del esqueleto de xilano (Faria-Blanc et al., 2018; Freeman et al., 2016; Haghighat et al., 2016; Wang et al., 2016), siendo un marcador de la producción de xilano en el aparato de Golgi de los elementos traqueales del protoxilema en desarrollo en *A. thaliana*. Por tanto, es posible que los genes *GcIRX9*, *GcIRX14* y *GcIRX15* estén asociados a la biosíntesis del esqueleto de xilano, estas hipótesis son respaldados por estudios realizados en los genes ortólogos en *Arabidopsis AtIRX9* y *AtIRX14* (Faria-Blanc et al., 2018; Freeman et al., 2016; Haghighat et al., 2016; Wang et al., 2016). Posteriormente las moléculas de xilano son acetilados principalmente por la proteína ESK1TBL29 (Faria-Blanc et al., 2018; Xiong et al., 2013), aunque otras proteínas TBL (Trichome Birrefringence-Like) también acetilan xilano en diferentes posiciones y con diversas afinidades (Faria-Blanc et al., 2018; Xiong et al., 2013). En el caso de *G. crinita* sería el gen diferencialmente expresado *GcTBL27* (Figura 36), asimismo, reportes recientes comentan de la importancia de la regulación del FT MYB103 a TBL27 para la respuesta positiva a la resistencia al aluminio al modular la *O*-acetilación de la pared celular XyG (xiloglucano de hemicelulosa) (Meents et al., 2019). En nuestros resultados también obtuvimos la sobre expresión del gen *GcMYB103* que se uniría directamente a la región promotora de TBL27 (Figura 36 c) y además activaría el promotor del gen CESA8 (Figura 35 b) (Zhong et al., 2008), también cabe señalar que la sobre expresión de *MYB103* está asociada al grosos de la pared secundaria (Ohman et al., 2013). Por cómo se evidencia en los resultados, el FT *GcMYB103* estaría regulando la biosíntesis de celulosa y hemicelulosa de la pared secundaria en los tejidos del xilema de *G. crinita*, por medio de la regulación de algunos genes que codifican enzimas como *GcTBL27* y *GcCESA8*. Contrario a ello, es coherente que en los tocones del tallo los genes relacionados con síntesis de hemicelulosa estén con baja expresión, mientras que mostró una mayor expresión de genes relacionados a los procesos metabólicos de lípidos, glicerolípidos,

fosfolípidos, y las células respondían mayormente a la generación de metabolitos precursores y energía (Figura 32, 33), presumimos que los tejidos en estado de dormancia (Druart et al., 2007) estén preparándose para un proceso de inducción del brote propio de los árboles de *G. crinita*.

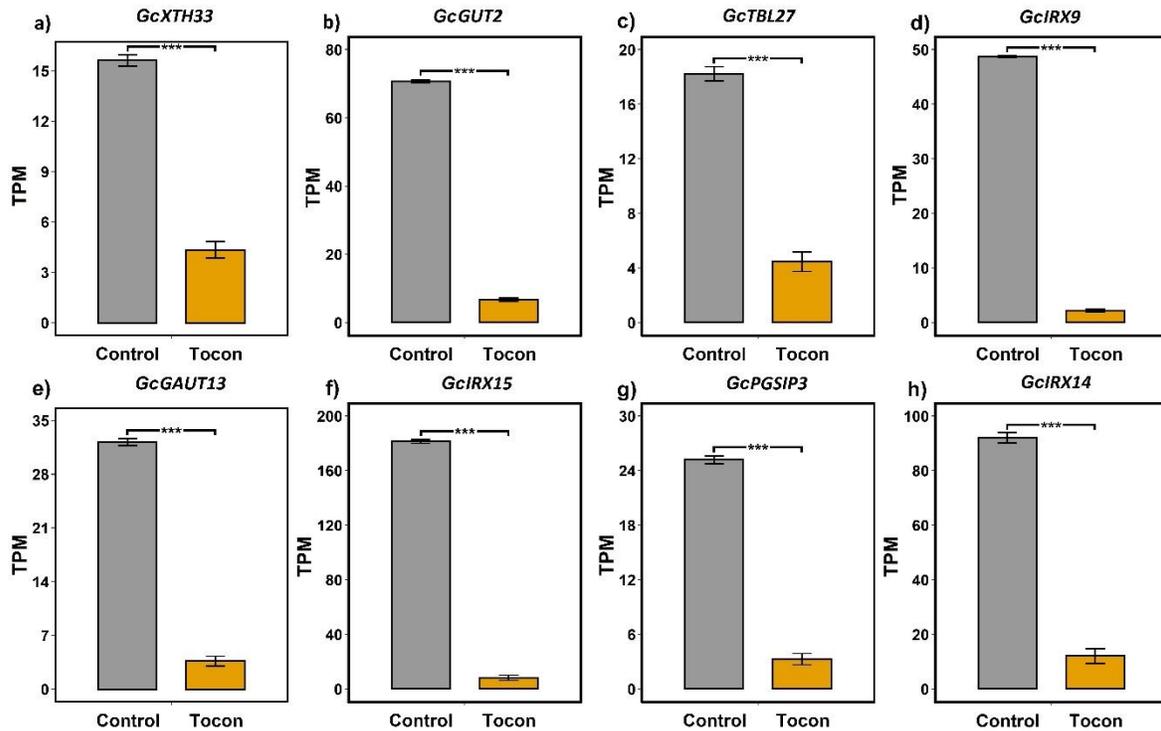


Figura 36. Abundancia relativa de ARN de 8 genes implicados en la síntesis de Hemicelulosa de Bolaina

Nota. Se examinó la cuantificación relativa de la expresión en tejidos de xilema secundario de tallos en plantas de crecimiento normal (control) y tocones de tallo de 10 cm. El nombre de cada gen se indica en la parte superior de cada histograma. Las viñetas \pm significa SE (error estándar) de tres muestras biológicas replicadas. Los asteriscos indican el nivel de significancia: “*” $p \leq 0,05$; “**” $p \leq 0,01$; y “***” $p \leq 0,001$.

4.4.4.4. Evaluación de genes implicados en la biosíntesis de Lignina

En las plantas vasculares la lignina es un polímero compuesto por una red de unidades fenilpropanoides, y actualmente aún se desconoce los procesos de su polimerización en la

pared celular en las plantas. Por tanto, es de interés conocer los genes implicados en la biosíntesis de la lignina de árboles de rápido crecimiento, de los 4076 genes diferencialmente expresos (GDEs), seleccionamos 8 genes que codifican enzimas relacionados con los procesos metabólicos de fenilpropanoides (Figura 37), por tanto, están asociados con la síntesis de los componentes de la pared celular, ya que estos GDEs se sobreexpresaron en el xilema secundario del tallo de las plantas control. Los genes fueron de las familias Laccase (*GcLAC1*, *GcLAC2* y *GcLAC4*), 4-cumarato::CoA ligasa (*Gc4CLI*), cinnamate-4-hydroxylase (*GcC4H*), coumarate 3-hydroxylase (*GcCYP98A3*), caffeoyl coenzyme A dependent O-methyltransferase 1 (*GcCCoAOMT1*) y ferulate-5-hydroxylase (*GcFAH1*) (Figura 37). Dentro del grupo de enzimas que polimerizan la lignina, sobresalieron las Lacasas (*GcLAC1*, *GcLAC2* y *GcLAC4*) una familia de oxidasas multicobre localizadas en la pared celular, y se encargan de catalizar la formación de radicales monolignol por oxidación y facilitan la polimerización de monolignoles a ligninas complejas (Cai et al., 2006). Estudios recientes demostraron que la sobreexpresión del gen *PeuLAC2* ortólogo de *GcLAC2* en Álamo ayuda a mejorar la tolerancia a la sequía, incrementando el potencial hídrico del xilema del tallo debido a una reducción del área de los vasos y un incremento de la frecuencia de vasos por unidad de área (Niu et al., 2021). Asimismo, la sobreexpresión de *PeuLAC2* aumenta el grosor de la pared celular secundaria en las fibras del tallo (Niu et al., 2021). Por otro lado, Berthet et al., (2011) comentan que el gen *AtLAC4* ortólogo de *GcLAC4* regula los procesos de lignificación constitutiva del tallo de la inflorescencia en Arabidopsis.

Por otra parte, *Gc4CLI* codifica la enzima 4-cumarato::CoA ligasa (4CL1) importante en el tercer paso de la ruta de los fenilpropanoides, fundamental de hidroxilación que genera *p*-cumarato, que a su vez es un precursor común de las vías biosintéticas de lignina, monolignoles, sinapatos, flavonoides y otros metabolitos secundarios (Tian et al., 2013; Tsai et al., 2020). Los resultados de Tian et al., (2013) sugieren que 4CL1 es un gen de control de tráfico en la biosíntesis de monolignol y confirma que la actividad de 4CL1 se ha relacionado con la activación de sinapoílo. Además, una reducción en la expresión del gen 4CL1 en menos del 30% no restringiría las características de crecimiento de los árboles, sino que mejoraría el crecimiento de los árboles. Asimismo, un *knockout* de 4CL1 en álamo (*Populus tremula* × *alba*) reduciría la lignina siringil (S), con efectos

insignificantes en la biomasa. Por tanto, la sobreexpresión del gen *GcC4H* (cinnamate-4-hydroxylase) es clave en la ruta metabólica de fenilpropanoides y la formación de la pared celular, este gen es regulado por el FT *ERF012* que se expresa predominantemente en los haces vasculares (Huang et al., 2022).

La mayoría de los genes relacionados con la síntesis de fenilpropanoides presentan familias multigénicas y se expresan diferencialmente. En la Figura 37, los genes *GcC4H*, *GcFAH1* y *GcCYP98A3* muestran una expresión alta, y están involucrados en la lignificación de las células del tallo, ya que requieren una gran cantidad de fenilpropanoides, por tanto, es importante considerar a *GcFAH1* y *CYP98A3* como enzimas de la red fenilpropanoides (Nair et al., 2002). En transgénicos de *Arabidopsis*, los promotores de *CYP98A3* y *C4H* fueron activados a causa de heridas (Nair et al., 2002; Schoch et al., 2001), otra característica de los genes relacionados con la biosíntesis de lignina en el tejido vascular. Resultados similares también fueron reportados en *Arabidopsis* por Schoch et al., (2001) donde muestran un alto nivel de expresión de *CYP98A3* en tallo.

El gen *GcCCoAOMT* (Caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase) codifica a una enzima clave en la biosíntesis de lignina en las plantas. Su ortólogo en *A. thaliana* evidenció que se expresa constitutivamente en todos los tejidos, y el nivel de expresión fue mayor en el tallo, seguido por la corteza del tallo, las raíces y las hojas (Zhang et al., 2014). Asimismo, se reporta que una sobreexpresión de *CcCCoAOMT1* en plantas transgénicas de *A. thaliana* dio como resultado un aumento de la altura de la planta y de la longitud de la silicua en relación con las plantas no transgénicas. Quizás el hallazgo más importante fue que las plantas transgénicas de *Arabidopsis* contenían más lignina (20,44–21,26 %) que las plantas de control (17,56 %), lo que sugiere claramente un papel importante de *CcCCoAOMT1* en la biosíntesis de lignina (Emiliani et al., 2011; Zhang et al., 2014).

Finalmente, la acumulación de la transcripción de los genes de la ruta del fenilpropanoide fue evidente. Se detectaron diferencias en los patrones de acumulación de ARN entre los diferentes estados de desarrollo de la madera (Figura 37). Los resultados obtenidos aquí demostraron que los procesos moleculares involucrados en la biosíntesis de xilema secundario no están restringidos al período de tiempo de actividad cambial, debido a que *G. crinita* es una especie que crece durante todo el año, alcanzando en los meses de febrero

y marzo sus mayores tasas de incremento diametral y altura total (Figura 7). Es por ello que se ven expresos genes muy asociados con la síntesis de celulosa, lignina y hemicelulosa.

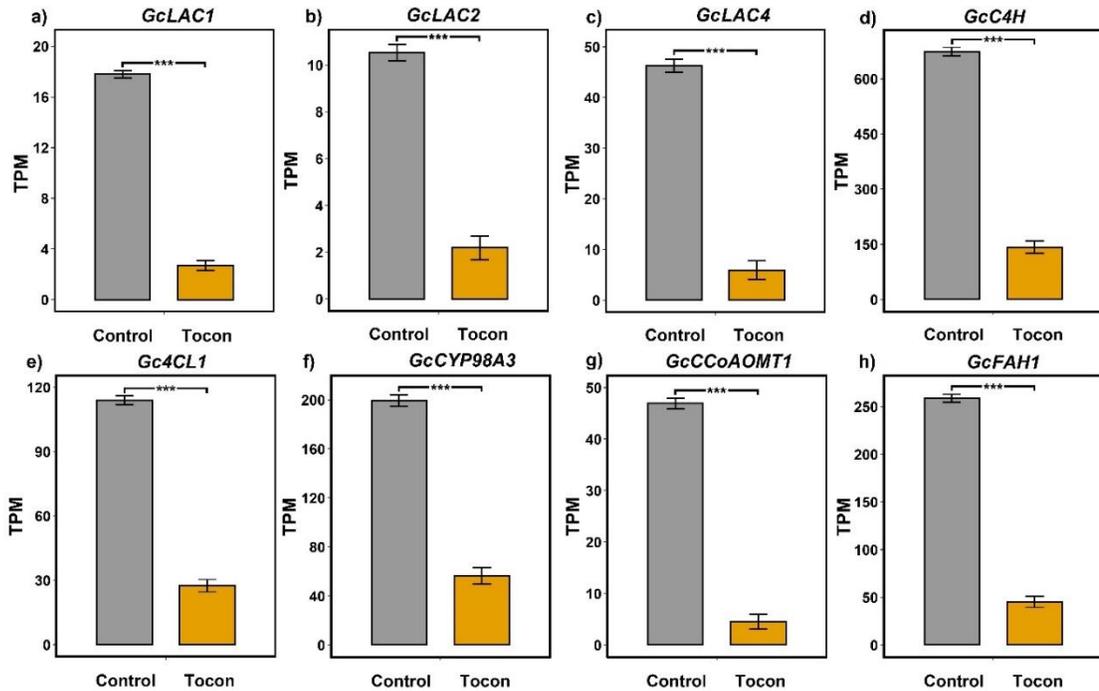


Figura 37. Abundancia relativa de ARN de 8 genes implicados en la síntesis de Lignina de Bolaina

Nota. Se examinó la cuantificación relativa de la expresión en tejidos de xilema secundario de tallos en plantas de crecimiento normal (control) y tocones de tallo de 10 cm. El nombre de cada gen se indica en la parte superior de cada histograma. Las viñetas \pm significa SE (error estándar) de tres muestras biológicas replicadas. Los asteriscos indican el nivel de significancia: “*” $p \leq 0,05$; “**” $p \leq 0,01$; y “***” $p \leq 0,001$.

V. CONCLUSIONES

Las conclusiones generadas en este trabajo son las siguientes:

1. *G. crinita* y *C. spruceanum*, presentan diferentes estrategias en la utilización de la energía luminosa durante su crecimiento y aclimatación. En los meses de mayor temperatura, incrementaron el área foliar, % clorofila relativa, Phi2, Fm/Fv, Rfd, LEF y la densidad de flujo de protones capturada por el dosel. Asimismo, los árboles de *G. crinita* mantuvieron altos índices de Phi2 asociado al rápido crecimiento del tallo durante todo el año. Contrario a ello, *C. spruceanum* pierde paulatinamente sus hojas por senescencia en los meses más fríos, disminuyendo abruptamente los valores de Phi2. Por otro lado, la dinámica fotosintética del dosel por secciones y la biosíntesis de fibras, evidenciaron que en *G. crinita* las hojas de la parte superior del dosel suministran más fotosintatos que las hojas viejas y contribuirían en la mayor síntesis de celulosa en la parte superior del tallo. Por el contrario, pese a la senescencia de las hojas viejas de *C. spruceanum*, estas continúan proporcionando fotosintatos, a pesar de presentar menor % de clorofila, LEF, gH+ y vH+. Y además no se encontró correlación entre Phi2 y diámetro del lumen de la fibra.
2. Los análisis de dinámica molecular revelaron que las estructuras secundarias loop entre α B y β C, y las colas en la región N-Terminal y C-Terminal, muestran mayores fluctuaciones en las tres isoformas evaluadas, y posiblemente sus movimientos están relacionados con los cambios estructurales y actividades funcionales de la RuBisCO durante la transición de estado abierto a cerrado. Por otra parte, los resultados de DCCM indican que hay cambios en las direcciones del movimiento de las estructuras secundarias de las tres isoformas. Sin embargo, se conservan los movimientos en una misma dirección del loop entre α B y β C y el loop 6, esta correlación es importante en la actividad enzimática y estabilización de la conformación del bucle catalítico.

- Finalmente, nuestros resultados se suman a la acumulación de pruebas teóricas sobre los movimientos estructurales de RuBisCO, y ayudan a comprender los detalles de la sincronización y el mecanismo de cierre que aún se desconocen.
3. Realizamos el primer análisis transcriptómico de *C. spruceanum* e identificamos 3544 genes que se expresan diferencialmente durante la xilogénesis, en el xilema secundario de las plantas de rebrote del tallo, y están relacionados con la biosíntesis de paredes celulares primarias y secundaria. Comparando los genes de los tallos del rebrote de plantas y de crecimiento normal, se obtuvieron 1773 UniGenes que exhibieron una sobre expresión, mientras que 1771 mostraron una baja expresión. Los genes incluyeron factores de transcripción *ERF*, *bHLH*, *MYB*, *WRKY*, *NAC*, *E2F/DP*, *AP2*, *bZIP*, *NF-YA*, *GATA* y *C3H* relacionados con la biosíntesis del xilema secundario. También se identificaron genes xiloglucano endotransglucosilasa, galacturonosiltransferasa y glucuroniltransferasas involucrados con los pasos metabólicos de la biosíntesis de xilano. Así también se identificó los genes Lacasa y Cynamil alcohol deshidrogenasa implicados en la lignificación mediante la polimerización de monolignoles. Finalmente, estos genes podrían ser marcadores asociados a la calidad de la madera.
 4. El análisis transcriptómico de *G. crinita* permitió identificar 3491 genes que se expresan diferencialmente en el xilema secundario de tocones del tallo comparados con los tallos de crecimiento normal, de los cuales 1938 UniGenes exhibieron una sobre expresión, mientras que 1771 mostraron una baja expresión relativa. Los genes seleccionados incluyeron factores de transcripción *MYB* y *NAC* relacionados con la biosíntesis del xilema secundario. También se identificaron genes implicados en la biosíntesis de celulosa (quitinasa-like, celulosa sintasa), hemicelulosa (glucosil transferasa) y lignina (Lacasa, cinamato-4-hidroxilasa, cumarato 3-hidroxilasa, ferulato-5-hidroxilasa). Finalmente, estos genes son fundamental en los procesos de xilogénesis y latencia en tallos de *G. crinita*, siendo nuevos

conocimientos sobre los mecanismos moleculares de la formación de la madera en árboles de rápido crecimiento.

VI. RECOMENDACIONES

1. Para encontrar patrones en la dinámica fotosintética de los árboles (*Guazuma crinita*, *Calycophyllum spruceanum*, etc.) es importante monitorear árboles de estas especies por periodos de tiempo más largos, ya que la dinámica fotosintética va variando en función de las etapas del desarrollo. Asimismo, sería relevante realizar fenotipado fotosintético bajo diferentes condiciones de estrés biótico y abiótico.
2. Respecto al estudio de la estructura evolutiva de RuBisCO, sería importante ampliar y construir herramientas computacionales de próxima generación, que con un enfoque PAN-DM nos permitirá integrar información compleja sobre estructura molecular, dinámica y evolución de las proteínas.
3. En el estudio transcriptómico de *C. spruceanum*, se recomienda evaluar los patrones de expresión génica en árboles adultos de segundo corte (monte bajo), esto para conocer molecularmente los cambios físicos y mecánicos de la madera.
4. En el caso del estudio transcriptómico de *G. crinita*, se recomienda realizar análisis moleculares entre los procesos de síntesis de azúcares en las hojas y el depósito de celulosa, hemicelulosa y lignina en los órganos sumideros. De esta forma, se podría ampliar la comprensión de los procesos fisiológicos de la planta en diferentes periodos del desarrollo.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abanto-Rodriguez, C., García-Soria, D., Guerra-Árevalo, W., Murga-Orrillo, H., Saldaña-Ríos, G., Vázquez-Reátegui, D., y Tadashi-Sakazak, R. (2016). Organic substrates in *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) plants Production. *Scientia Agropecuaria*, 7, 341–347. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.03.23>
- Abbas, M., Peszlen, I., Shi, R., Kim, H., Katahira, R., Kafle, K., ... Li, Q. (2019). Involvement of Cesa4, Cesa7-A/B and Cesa8-A/B in secondary wall formation in *Populus trichocarpa* wood. *Tree Physiology*, 40(1), 73–89. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpz020>
- Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., y Lindah, E. (2015). Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1–2, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
- Abril, N., Gion, J. M., Kerner, R., Müller-Starck, G., Cerrillo, R. M. N., Plomion, C., ... Jorin-Novo, J. V. (2011). Proteomics research on forest trees, the most recalcitrant and orphan plant species. *Phytochemistry*, 72(10), 1219–1242. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.005>
- Ahrari, S., Khosravi, F., Osouli, A., Sakhteman, A., Nematollahi, A., Ghasemi, Y., y Savardashtaki, A. (2019). MARK4 protein can explore the active-like conformations in its non-phosphorylated state. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49337-0>
- Aktar Hossain, M., Noh, H. N., Kim, K. Il, Koh, E. J., Wi, S. G., Bae, H. J., ... Hong, S. W. (2010). Mutation of the chitinase-like protein-encoding AtCTL2 gene enhances lignin accumulation in dark-grown *Arabidopsis* seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 167(8), 650–658. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.12.001>
- Alfaro-Sánchez, R., Muller-Landau, H. C., Wright, S. J., y Camarero, J. J. (2017). Growth and reproduction respond differently to climate in three Neotropical tree species. *Oecologia*, 184(2), 531–541. <https://doi.org/10.1007/s00442-017-3879-3>
- Ali Qamar, O., Jamil, F., Hussain, M., Al-Muhtaseb, A. H., Inayat, A., Waris, A., ... Park, Y.-K. (2023). Feasibility-to-applications of value-added products from biomass: Current trends, challenges, and prospects. *Chemical Engineering Journal*, 454(P2), 140240. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.140240>

- Alonso, H., Blayney, M. J., Beck, J. L., y Whitney, S. M. (2009). Substrate-induced assembly of *Methanococcoides burtonii* D-Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase dimers into decamers. *Journal of Biological Chemistry*, 284(49), 33876–33882. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.050989>
- Alshareef, N. O., Otterbach, S. L., Allu, A. D., Woo, Y. H., de Werk, T., Kamranfar, I., ... Schmöckel, S. M. (2022). NAC transcription factors ATAF1 and ANAC055 affect the heat stress response in Arabidopsis. *Scientific Reports*, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14429-x>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Anderson, K., Silva, J., Lourenco, G., Sanada, K., Medri, C., Bianchini, E., ... Caixeta, H. (2017). Acclimation responses to high light by *Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae) leaves at different stages of development Anderson. *Plant Biology*, 19(1), 720–727. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/plb.12592>
- Andersson-gunnera, S., Mellerowicz, E. J., Love, J., Segerman, B., Ohmiya, Y., Coutinho, P. M., ... Sundberg, B. (2006). Biosynthesis of cellulose-enriched tension wood in *Populus*: global analysis of transcripts and metabolites identifies biochemical and developmental regulators in secondary wall biosynthesis. *The Plant Journal*, 45, 144–165. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02584.x>
- Andersson, I., y Backlund, A. (2008). Structure and function of Rubisco. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(3), 275–291. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.01.001>
- Ashida, H., Saito, Y., Kojima, C., Kobayashi, K., Ogasawara, N., y Yokota, A. (2003). A functional link between RuBisCO-like protein of *Bacillus* and photosynthetic RuBisCO. *Science*, 302(5643), 286–290. <https://doi.org/10.1126/science.1086997>
- Ashida, H., Saito, Y., Nakano, T., Tandeau De Marsac, N., Sekowska, A., Danchin, A., y Yokota, A. (2008). RuBisCO-like proteins as the enolase enzyme in the methionine salvage pathway: Functional and evolutionary relationships between RuBisCO-like proteins and photosynthetic RuBisCO. *Journal of Experimental Botany*, 59(7), 1543–1554. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern104>
- Aspeborg, H., Schrader, J., Coutinho, P. M., Stam, M., Kallas, Å., Djerbi, S., ... Teeri, T. T. (2005). Carbohydrate-active enzymes involved in the secondary cell wall biogenesis in hybrid aspen. *Plant Physiology*, 137(3), 983–997. <https://doi.org/10.1104/pp.104.055087>
- Atchley, W. R., y Fitch, W. M. (1997). A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(10), 5172–5176. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.10.5172>
- Atomi, H., Fukui, T., Kanai, T., Morikawa, M., y Imanaka, T. (2004). Description of *Thermococcus kodakaraensis* sp. nov., a well studied hyperthermophilic archaeon

- previously reported as *Pyrococcus* sp. KOD1. *Archaea*, 1(4), 263–267. <https://doi.org/10.1155/2004/204953>
- Bahar, I., Atilgan, A. R., y Erman, B. (1997). Direct evaluation of thermal fluctuations in proteins using a single-parameter harmonic potential. *Folding and Design*, 2(3), 173–181. [https://doi.org/10.1016/S1359-0278\(97\)00024-2](https://doi.org/10.1016/S1359-0278(97)00024-2)
- Bai, X., Rivera-Vega, L., Mamidala, P., Bonello, P., Herms, D. A., y Mittapalli, O. (2011). Transcriptomic signatures of ash (*Fraxinus* spp.) phloem. *PLoS ONE*, 6(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016368>
- Bakan, A., Dutta, A., Mao, W., Liu, Y., Chennubhotla, C., Lezon, T. R., y Bahar, I. (2014). Structural bioinformatics Evol and ProDy for bridging protein sequence evolution and structural dynamics. *Bioinformatics*, 30(18), 2681–2683. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu336>
- Bakan, A., Meireles, L. M., y Bahar, I. (2011). ProDy : Protein Dynamics Inferred from Theory and Experiments. *Bioinformatics*, 27(11), 1575–1577. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr168>
- Baldin, T., Longhi, R. V., y Marchiori, J. N. C. (2014). *Análise preliminar do xilema secundário de Calycophyllum spruceanum (Benth) Hook. f.ex Schum (RUBIACEAE)*. (November), 397–400. <https://doi.org/10.12702/viii.simposfloresta.2014.136-620-1>
- Banda, D. M., Pereira, J. H., Liu, A. K., Orr, D. J., Hammel, M., He, C., ... Shih, P. M. (2020). Novel bacterial clade reveals origin of form I Rubisco. *Nature Plants*, 6(9), 1158–1166. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-00762-4>
- Bao, H., Li, E., Mansfield, S. D., Cronk, Q. C. B., El-Kassaby, Y. A., y Douglas, C. J. (2013). The developing xylem transcriptome and genome-wide analysis of alternative splicing in *Populus trichocarpa* (black cottonwood) populations. *BMC Genomics*, 14(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-359>
- Barakat, A., Bagniewska-Zadworna, A., Choi, A., Plakkat, U., Diloreto, D. S., Yellanki, P., y Carlson, J. E. (2009). The cinnamyl alcohol dehydrogenase gene family in *Populus*: Phylogeny, organization, and expression. *BMC Plant Biology*, 9, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-26>
- Barnes, P. W., Williamson, C. E., Lucas, R. M., Robinson, S. A., Madronich, S., Paul, N. D., ... Aucamp, P. J. (2019). Ozone depletion, ultraviolet radiation, climate change and prospects for a sustainable future. *Nature Sustainability*, 2(July), 569–579. <https://doi.org/10.1038/s41893-019-0314-2>
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., y Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67, 1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Baucher, M., Monties, B., Montagu, M. Van, y Boerjan, W. (1998). Critical Reviews in Plant Sciences Biosynthesis and Genetic Engineering of Lignin Biosynthesis and Genetic Engineering of Lignin. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17(2), 125–197.
- Beeckman, T., Przemeck, G. K. H., Stamatiou, G., Lau, R., Terryn, N., De Rycke, R., ... Berleth, T. (2002). Genetic complexity of cellulose synthase A gene function in

- arabidopsis embryogenesis. *Plant Physiology*, 130(4), 1883–1893.
<https://doi.org/10.1104/pp.102.010603>
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissing, H., ... Bourne, P. (2000). The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242.
<https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Berthet, S., Demont-Caulet, N., Pollet, B., Bidzinski, P., Cézard, L., le Bris, P., ... Jouanin, L. (2011). Disruption of LACCASE4 and 17 results in tissue-specific alterations to lignification of *Arabidopsis thaliana* stems. *Plant Cell*, 23(3), 1124–1137.
<https://doi.org/10.1105/tpc.110.082792>
- Blow, D. (2002). *Outline of Crystallography for Biologists* (O. Y. Press, Ed.). United Kingdom.
- Boerjan, W., Ralph, J., y Baucher, M. (2003). Lignin Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 519–546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938>
- Bolker, B. M., Brooks, M. E., Clark, C. J., Geange, S. W., Poulsen, J. R., Stevens, M. H. H., y White, J. S. S. (2009). Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, 24(3), 127–135.
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.10.008>
- Borchert, R., Rivera, G., y Hagnauer, W. (2002). Modification of vegetative phenology in a tropical semi-deciduous forest by abnormal drought and rain. *Biotropica*, 34(1), 27–39. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2002.tb00239.x>
- Bowie, J., Luthy, R., y Eisenberg, D. (1991). A Method to Identify Protein Sequences That Fold into a Known Three-Dimensional Structure. *Science*, 253(58), 164–169.
- Brodribb, T. J., y Holbrook, N. M. (2003). Changes in leaf hydraulic conductance during leaf shedding in seasonally dry tropical forest. *New Phytologist*, 158(2), 295–303.
<https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00736.x>
- Brookbank, B. P., Patel, J., Gazzarrini, S., y Nambara, E. (2021). Role of basal aba in plant growth and development. *Genes*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/genes12121936>
- Brown, D. M., Goubet, F., Wong, V. W., Goodacre, R., Stephens, E., Dupree, P., y Turner, S. R. (2007). Comparison of five xylan synthesis mutants reveals new insight into the mechanisms of xylan synthesis. *Plant Journal*, 52(6), 1154–1168.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03307.x>
- Brown, D. M., Zeef, L. A. H., Ellis, J., Goodacre, R., y Turner, S. R. (2005). Identification of novel genes in *Arabidopsis* involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics. *Plant Cell*, 17(8), 2281–2295.
<https://doi.org/10.1105/tpc.105.031542>
- Burnham, K., y Anderson, D. (2002). Model Selection and Multimodel Inference. In *Springer* (Vol. 45). <https://doi.org/10.1198/tech.2003.s146>
- Buslaev, P., Gordeliy, V., Grudin, S., y Gushchin, I. (2016). Principal Component Analysis of Lipid Molecule Conformational Changes in Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 12(3), 1019–1028.
<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b01106>

- Cai, X., Davis, E. J., Ballif, J., Liang, M., Bushman, E., Haroldsen, V., ... Wu, Y. (2006). Mutant identification and characterization of the laccase gene family in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 57(11), 2563–2569. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl022>
- Camel, V., Arizapana-Almonacid, M., Pyles, M., Galeano, E., Quispe-Melgar, H. R., Ninanya-Parra, Z., ... Kessler, M. (2019). Using dendrochronology to trace the impact of the hemiparasite *Tristerix chodatianus* on Andean *Polylepis* trees. *Plant Ecology*. <https://doi.org/10.1007/s11258-019-00961-w>
- Camel, V., y Galeano, E. (2021). Molecular Physiology of Teak. In Y. Ramasamy, E. Galeano, y T. T. Win (Eds.), *The Teak Genome* (pp. 219–236). https://doi.org/10.1007/978-3-030-79311-1_14
- Camel, V., Galeano, E., y Carrer, H. (2017a). Análisis in silico y expresión génica del factor de transcripción TgNAC01 implicado en xilogénesis y estrés abiótico en *Tectona grandis*. *Acta Biológica Colombiana*, 22(3), 359–369.
- Camel, V., Galeano, E., y Carrer, H. (2017b). Red de coexpresión de 320 genes de *Tectona grandis* relacionados con procesos de estrés abiótico y Xilogénesis. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, (May), 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.04.001>
- Campelo, F., Nabais, C., Carvalho, A., y Vieira, J. (2016). tracheideR-An R package to standardize tracheidograms. *Dendrochronologia*, 37, 64–68. <https://doi.org/10.1016/j.dendro.2015.12.006>
- Cao, H., Li, J., Ye, Y., Lin, H., Hao, Z., Ye, N., y Yue, C. (2020). Integrative transcriptomic and metabolic analyses provide insights into the role of trichomes in tea plant (*Camellia sinensis*). *Biomolecules*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/biom10020311>
- Carrillo-Bermejo, E. A., Gamboa-Tuz, S. D., Pereira-Santana, A., Keb-Llanes, M. A., Castaño, E., Figueroa-Yañez, L. J., y Rodriguez-Zapata, L. C. (2020). The SoNAP gene from sugarcane (*Saccharum officinarum*) encodes a senescence-associated NAC transcription factor involved in response to osmotic and salt stress. *Journal of Plant Research*, 133(6), 897–909. <https://doi.org/10.1007/s10265-020-01230-y>
- Carvalho, A., Paiva, J., Louzada, J., y Lima-Brito, J. (2013). The Transcriptomics of Secondary Growth and Wood Formation in Conifers. *Molecular Biology International*, 2013, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2013/974324>
- Chalanika De Silva, H. C., y Asaeda, T. (2017). Effects of heat stress on growth, photosynthetic pigments, oxidative damage and competitive capacity of three submerged macrophytes. *Journal of Plant Interactions*, 12(1), 228–236. <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1322153>
- Chamie, J. (2001). WORLD POPULATION IN THE 21 ST CENTURY. *XXIVth IUSSP General Population Conference*, (August).
- Chaves, M. M., Pereira, J. S., Maroco, J., Rodrigues, M. L., Ricardo, C. P. P., Osório, M. L., ... Pinheiro, C. (2002). How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. *Annals of Botany*, 89(SPEC. ISS.), 907–916.

<https://doi.org/10.1093/aob/mcf105>

- Chen, D., Chen, H., Dai, G., Zhang, H., Liu, Y., Shen, W., ... Tan, C. (2022). Genome-wide identification of R2R3-MYB gene family and association with anthocyanin biosynthesis in Brassica species. *BMC Genomics*, 23(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08666-7>
- Chen, W. J., y Zhu, T. (2004). Networks of transcription factors with roles in environmental stress response. *Trends in Plant Science*, 9(12), 591–596. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.10.007>
- Chen, Z., Rao, P., Yang, X., Su, X., Zhao, T., Gao, K., ... An, X. (2018). A Global View of Transcriptome Dynamics during Male Floral Bud Development in *Populus tomentosa*. *Scientific Reports*, 8(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18084-5>
- Cheng, H., Sinha, A., Cruz, F. W., Wang, X., Edwards, R. L., d’Horta, F. M., ... Auler, A. S. (2013). Climate change patterns in Amazonia and biodiversity. *Nature Communications*, 4, 1411. <https://doi.org/10.1038/ncomms2415>
- Cheng, Y., Ma, Y., Zhang, N., Lin, R., Yuan, Y., Tian, H., ... Wang, S. (2022). The R2R3 MYB Transcription Factor MYB71 Regulates Abscisic Acid Response in *Arabidopsis*. *Plants*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/plants11101369>
- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*, 15(3), 532–537.
- Chomczynski, Piotr, y Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on. *Nature Protocols*, 1(2), 581–585. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83>
- Chun, H. J., Baek, D., Cho, H. M., Lee, S. H., Jin, B. J., Yun, D. J., ... Kim, M. C. (2019). Lignin biosynthesis genes play critical roles in the adaptation of *Arabidopsis* plants to high-salt stress. *Plant Signaling and Behavior*, 14(8), 1–4. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1625697>
- Ci, D., Tian, M., Song, Y., Du, Q., Quan, M., Xuan, A., y Yu, J. (2019). Indole - 3 - acetic acid has long - term effects on long non - coding RNA gene methylation and growth in *Populus tomentosa*. *Molecular Genetics and Genomics*, (18). <https://doi.org/10.1007/s00438-019-01593-5>
- Coego, A., Brizuela, E., Castillejo, P., Ruíz, S., Koncz, C., Del Pozo, J. C., ... Koncz, Z. (2014). The TRANSPLANTA collection of *Arabidopsis* lines: A resource for functional analysis of transcription factors based on their conditional overexpression. *Plant Journal*, 77(6), 944–953. <https://doi.org/10.1111/tpj.12443>
- Cornelius, J. P., Sotelo Montes, C., Ugarte-Guerra, L. J., y Weber, J. C. (2011). The effectiveness of phenotypic selection in natural populations: A case study from the Peruvian Amazon. *Silvae Genetica*, 60(5), 205–209. <https://doi.org/10.1515/sg-2011-0027>
- Couvreur, T. L. P. (2018). Unraveling rain forest biodiversity: an interview with Thomas Couvreur. *BMC Biology*, 16(1), 127. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0594-4>

- Cruz-García, R., Balzano, A., Čufar, K., Scharnweber, T., Smiljanić, M., y Wilmking, M. (2019). Combining Dendrometer Series and Xylogenesis Imagery—DevX, a Simple Visualization Tool to Explore Plant Secondary Growth Phenology. *Frontiers in Forests and Global Change*, 2(October), 1–13. <https://doi.org/10.3389/ffgc.2019.00060>
- de Vargas, F. S., Almeida, P. D. O., de Boleti, A. P. A., Pereira, M. M., de Souza, T. P., de Vasconcellos, M. C., ... Lima, E. S. (2016). Antioxidant activity and peroxidase inhibition of Amazonian plants extracts traditionally used as anti-inflammatory. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1061-9>
- Demura, T., y Fukuda, H. (2007). Transcriptional regulation in wood formation. *Trends in Plant Science*, 12(2), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.12.006>
- Di Vittori, V., Bitocchi, E., Rodriguez, M., Alseekh, S., Bellucci, E., Nanni, L., ... Papa, R. (2021). Pod indehiscence in common bean is associated with the fine regulation of PvMYB26. *Journal of Experimental Botany*, 72(5), 1617–1633. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa553>
- Dominguez, P. G., Donev, E., Derba-Maceluch, M., Bündler, A., Hedenström, M., Tomášková, I., ... Niittylä, T. (2020). Sucrose synthase determines carbon allocation in developing wood and alters carbon flow at the whole tree level in aspen. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/nph.16721>
- dos Santos, A. C. V., de Almeida, W. A., Fernandes, C. C., y de Sousa, A. H. (2016). Extractos hidroalcohólicos de plantas propias de la Amazonía suroccidental como alternativa de control de la oruga militar tardía. *Idesia*, 34(4), 63–67. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292016005000019>
- Dox, I., Gričar, J., Marchand, L. J., Leys, S., Zuccarini, P., Geron, C., ... Campioli, M. (2020). Timeline of autumn phenology in temperate deciduous trees. *Tree Physiology*, 40(8), 1001–1013. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpaa058>
- Druart, N., Johansson, A., Baba, K., Schrader, J., Sjödin, A., Bhalerao, R. R., ... Bhalerao, R. P. (2007). Environmental and hormonal regulation of the activity-dormancy cycle in the cambial meristem involves stage-specific modulation of transcriptional and metabolic networks. *Plant Journal*, 50(4), 557–573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03077.x>
- Dubois, M., Van Den Broeck, L., Claeys, H., Van Vlierberghe, K., Matsui, M., y Inzé, D. (2015). The ETHYLENE RESPONSE FACTORS ERF6 and ERF11 antagonistically regulate mannitol-induced growth inhibition in arabidopsis. *Plant Physiology*, 169(1), 166–179. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00335>
- Duff, A. P., Andrews, T. J., y Curmi, P. M. G. (2000). The transition between the open and closed states of rubisco is triggered by the inter-phosphate distance of the bound bisphosphate. *Journal of Molecular Biology*, 298(5), 903–916. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3724>
- Ebringerová, A., y Heinze, T. (2000). Naturally occurring xylans structures, isolation

- procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications*, 21(9), 542–556.
- Eckardt, N. A. (2003). Cellulose synthesis takes the CesaA train. *Plant Cell*, 15(8), 1685–1687. <https://doi.org/10.1105/tpc.150810>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5, 1–19. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>
- Elliott, S., Baker, P. J., y Borchert, R. (2006). Leaf flushing during the dry season: The paradox of Asian monsoon forests. *Global Ecology and Biogeography*, 15(3), 248–257. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2006.00213.x>
- Emiliani, G., Traversi, M. L., Anichini, M., Giachi, G., y Giovannelli, A. (2011). Transcript Accumulation Dynamics of Phenylpropanoid Pathway Genes in the Maturing Xylem and Phloem of *Picea abies* during Latewood Formation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 53(10), 783–799. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2011.01069.x>
- Erb, T., y Zarzycki, J. (2018). A short history of RubisCO : the rise and fall (?) of Nature ' s predominant CO₂ fixing enzyme. *Plant Biotechnology*, 49, 100–107.
- Escamez, S., y Tuominen, H. (2014). Programmes of cell death and autolysis in tracheary elements: When a suicidal cell arranges its own corpse removal. *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1313–1321. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru057>
- Essemine, J., Govindachary, S., Ammar, S., Bouzid, S., y Carpentier, R. (2012). Enhanced sensitivity of the photosynthetic apparatus to heat stress in digalactosyl-diacylglycerol deficient *Arabidopsis*. *Environmental and Experimental Botany*, 80(February 2021), 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.12.022>
- Fang, Y., You, J., Xie, K., Xie, W., y Xiong, L. (2008). Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice. *Molecular Genetics and Genomics*, 280(6), 547–563. <https://doi.org/10.1007/s00438-008-0386-6>
- Faria-Blanc, N., Mortimer, J. C., y Dupree, P. (2018). A transcriptomic analysis of Xylan mutants does not support the existence of a secondary cell wall integrity system in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 9(March), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00384>
- Faulkner, M., Szabó, I., Weetman, S. L., Sicard, F., Huber, R. G., Bond, P. J., ... Liu, L. N. (2020a). Molecular simulations unravel the molecular principles that mediate selective permeability of carboxysome shell protein. *Scientific Reports*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74536-5>
- Faulkner, M., Szabó, I., Weetman, S. L., Sicard, F., Huber, R. G., Bond, P. J., ... Liu, L. N. (2020b). Molecular simulations unravel the molecular principles that mediate selective permeability of carboxysome shell protein. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74536-5>
- Fernández-Calleja, M., Monteagudo, A., Casas, A. M., Boutin, C., Pin, P. A., Morales, F., y Igartua, E. (2020). Rapid on-site phenotyping via field fluorimeter detects differences in photosynthetic performance in a hybrid—parent barley germplasm set.

- Sensors (Switzerland)*, 20(5). <https://doi.org/10.3390/s20051486>
- Fernández Borja, A. (2018). La industria de la madera. In *Economía industrial*.
- Finer, M., y Jenkins, C. N. (2014). Logging Concessions Enable Illegal Logging Crisis in the Peruvian Amazon. *Scientific Reports*, (June). <https://doi.org/10.1038/srep04719>
- Fischer, J., Riechers, M., Loos, J., Martin-Lopez, B., y Temperton, V. M. (2021). Making the UN Decade on Ecosystem Restoration a Social-Ecological Endeavour. *Trends in Ecology and Evolution*, 36(1), 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2020.08.018>
- Flores Bendezú, Y. (2018). *Árboles nativos de la Región Ucayali (Estación E)*. Pucallpa.
- Flores Bendezú, Y. (2019). *Fichas Técnicas Para Plantaciones Con Especies Nativas En Zona De Selva Baja*. Retrieved from https://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/20.500.12955/943/1/Flores-Fichas_técnicas_para_plantaciones_con_especies_nativas_en_zona_de_Selva_Baja.pdf
- Fonti, P., Arx, G. Von, y Garcá, I. (2010). Studying global change through investigation of the plastic responses of xylem anatomy in tree rings. *New Phytologist*, 42–53. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03030.x>
- Fonti, P., Von Arx, G., García-González, I., Eilmann, B., Sass-Klaassen, U., Gärtner, H., y Eckstein, D. (2010). Studying global change through investigation of the plastic responses of xylem anatomy in tree rings. *New Phytologist*, 185(1), 42–53. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03030.x>
- Fréchette, E. (2019). *Effects of Warming on the Phenology of Photosynthesis of Eastern White Pine and Implications for the Use of Remote Sensing in a Changing Climate*. University of Toronto.
- Fréchette, E., Chang, C. Y. Y., y Ensminger, I. (2020). Variation in the phenology of photosynthesis among eastern white pine provenances in response to warming. *Global Change Biology*, 26(9), 5217–5234. <https://doi.org/10.1111/gcb.15150>
- Freeman, J., Lovegrove, A., Wilkinson, M. D., Saulnier, L., Shewry, P. R., y Mitchell, R. A. C. (2016). Effect of suppression of arabinoxylan synthetic genes in wheat endosperm on chain length of arabinoxylan and extract viscosity. *Plant Biotechnology Journal*, 14(1), 109–116. <https://doi.org/10.1111/pbi.12361>
- French, D. (2012). *Transcriptomic Profiling of North American Ash Trees (Genus Fraxinus) For (Purdue University; Vol. 3)*. <https://doi.org/10.1145/1198467.1198470>
- Fromm, J. (2013). Cellular Aspects of Wood Formation. In *Plant Cell Monographs (Vol. 20)*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-36491-4>
- Fujihashi, M., Nishitani, Y., Kiriya, T., Aono, R., Sato, T., Takai, T., ... Miki, K. (2016). Mutation design of a thermophilic Rubisco based on three-dimensional structure enhances its activity at ambient temperature. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 84(10), 1339–1346. <https://doi.org/10.1002/prot.25080>
- Galeano, E., Vasconcelos, T. S., Vidal, M., Mejia-Guerra, M. K., y Carrer, H. (2015). Large-scale transcriptional profiling of lignified tissues in *Tectona grandis*. *BMC Plant Biology*, 15(1), 221. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0599-x>

- Gamez Penadillo, J. (2009). *EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL Calycophyllum spruceanum (Benth) Hooker F. ex Chuman (CAPIRONA) A TRES NIVELES DEL FUSTE, EN LA ZONA DE TINGO MARÍA- PERÚ*. 80. Retrieved from <http://repositorio.unas.edu.pe/bitstream/handle/UNAS/708/T.FRS-86.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Genkov, T., y Spreitzer, R. J. (2009). Highly conserved small subunit residues influence Rubisco large subunit catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 284(44), 30105–30112. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.044081>
- Goicoechea, M., Lacombe, E., Legay, S., Mihaljevic, S., Rech, P., Jauneau, A., ... Grima-pettenati, J. (2005). Eg MYB2 , a new transcriptional activator from Eucalyptus xylem , regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis. *The Plant Journal*, 43, 553–567. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02480.x>
- Gómez, E. G. (2015). *Characterization of genes involved in lignin biosynthesis in Tectona grandis*. Universidade de São Paulo.
- Grant, B. J., Skjærven, L., y Yao, X. Q. (2021). The Bio3D packages for structural bioinformatics. *Protein Science*, 30(1), 20–30. <https://doi.org/10.1002/pro.3923>
- Grattapaglia, D., y Kirst, M. (2008). Eucalyptus applied genomics: From gene sequences to breeding tools. *New Phytologist*, 179(4), 911–929. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02503.x>
- Grattapaglia, D., Plomion, C., Kirst, M., y Sederoff, R. R. (2009). Genomics of growth traits in forest trees. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(2), 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.12.008>
- Greenwell, B. M., y Schubert Kabban, C. M. (2014). investr: An R package for inverse estimation. *R Journal*, 6(1), 90–100. <https://doi.org/10.32614/rj-2014-009>
- Groover, A., y Robischon, M. (2006). Developmental mechanisms regulating secondary growth in woody plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(1), 55–58. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.11.013>
- Guilfoyle, T. J., y Hagen, G. (2007). Auxin response factors. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(5), 453–460. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.08.014>
- Guindon, S., Dufayard, J., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., y Gascuel, O. (2010). New Algorithms and Methods to Estimate Maximim-Likelihood Phylogenies Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307–321.
- Guinot, A. D. M. (2016). *Structural studies of different form I Rubiscos using molecular dynamics simulations* (Imperial College London). <https://doi.org/https://doi.org/10.25560/51422>
- Gunn, L. H., Valegard, K., y Andersson, I. (2017). A unique structural domain in Methanococcoides burtonii ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) acts as a small subunit mimic. *Journal of Biological Chemistry*, 292(16), 6838–6850. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.767145>
- Guo, Q., Ma, X., Wei, S., Qiu, D., Wilson, I. W., Wu, P., ... Liu, L. (2014). De novo transcriptome sequencing and digital gene expression analysis predict biosynthetic

- pathway of rhynchophylline and isorhynchophylline from *Uncaria rhynchophylla*, a non-model plant with potent anti-alzheimer's properties. *BMC Genomics*, 1–16.
- Haghighat, M., Teng, Q., Zhong, R., y Ye, Z. H. (2016). Evolutionary conservation of xylan biosynthetic genes in *selaginella moellendorffii* and *physcomitrella patens*. *Plant and Cell Physiology*, 57(8), 1707–1719. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw096>
- Han, Y., Zhu, Q., Zhang, Z., Meng, K., Hou, Y., Ban, Q., ... Rao, J. (2015). Analysis of xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase (XTH) genes and diverse roles of isoenzymes during persimmon fruit development and postharvest softening. *PLoS ONE*, 10(4), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123668>
- Handel, A. E., y Disanto, G. (2013). Europe PMC Funders Group Next generation sequencing in understanding complex neurological disease. *Europe PMC Funders Group*, 13(2), 1–24. <https://doi.org/10.1586/ern.12.165.Next>
- Hanson-Smith, V., y Johnson, A. (2016). PhyloBot: A Web Portal for Automated Phylogenetics, Ancestral Sequence Reconstruction, and Exploration of Mutational Trajectories. *PLoS Computational Biology*, 12(7), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004976>
- Held, C., Pawlowski, G., Paredes, A., y Calo, I. (2015). *Cadenas de valor en el sector forestal del Perú*. 1–106. Retrieved from <http://www.greengrowthknowledge.org/sites/default/files/Analisis Completo Cadenas de Valor -completo.pdf>
- Hermans, C., Porco, S., Verbruggen, N., y Bush, D. R. (2010). Chitinase-like protein CTL1 plays a role in altering root system architecture in response to multiple environmental conditions. *Plant Physiology*, 152(2), 904–917. <https://doi.org/10.1104/pp.109.149849>
- Hermida-Carrera, C., Fares, M. A., Fernández, Á., Gil-Pelegrín, E., Kapralov, M. V., Mir, A., ... Galmés, J. (2017). Positively selected amino acid replacements within the RuBisCO enzyme of oak trees are associated with ecological adaptations. *PLoS ONE*, 12(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183970>
- Herrera-Ramirez, D., Andreu-Hayles, L., del Valle, J. I., Santos, G. M., y Gonzalez, P. L. M. (2017). Nonannual tree rings in a climate-sensitive *Prioria copaifera* chronology in the Atrato River, Colombia. *Ecology and Evolution*, 7(16), 6334–6345. <https://doi.org/10.1002/ece3.2905>
- Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C., y Fraaije, J. G. E. M. (1997). LINCS: A Linear Constraint Solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 18(12), 1463–1472. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199709\)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H)
- Hill, J. L., Hammudi, M. B., y Tien, M. (2014). The arabidopsis cellulose synthase complex: A proposed hexamer of cesa trimers in an equimolar stoichiometry. *Plant Cell*, 26(12), 4834–4842. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.131193>
- Hong, L., Ying, M., Zheng, C.-J., Jin, W.-Y., Liu, W.-S., y Wang, R.-L. (2018). Exploring the effect of D61G mutation on SHP2 cause gain of function activity by a molecular

- dynamics study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 36(14), 3856–3868. <https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1402709>
- Huang, J.-G., Ma, Q., Rossi, S., Biondi, F., Deslauriers, A., Fonti, P., ... Ziaco, E. (2020). Photoperiod and temperature as dominant environmental drivers triggering secondary growth resumption in Northern Hemisphere conifers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (August), 202007058. <https://doi.org/10.1073/pnas.2007058117>
- Huang, J., y MacKerell, A. (2013). CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *J Comput Chem.*, 30(25), 2135–2145. <https://doi.org/10.1002/jcc.23354>
- Huang, W., Zhang, S. B., y Liu, T. (2018). Moderate photoinhibition of photosystem II significantly affects linear electron flow in the shade-demanding plant *Panax notoginseng*. *Frontiers in Plant Science*, 9(May), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00637>
- Huang, Y., Liu, L., Hu, H., Tang, N., Shi, L., Xu, F., y Wang, S. (2022). Arabidopsis ERF012 Is a Versatile Regulator of Plant Growth, Development and Abiotic Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12). <https://doi.org/10.3390/ijms23126841>
- Humphrey, W., Dalke, A., y Schulten, K. (1996). VMD: Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(October 1995), 33–38. Retrieved from <https://www.tapbiosystems.com/tap/products/index.htm>
- Hüner, N. P. A., y Grodzinski, B. (2019). Photosynthesis and photoautotrophy. In *Comprehensive Biotechnology* (Third Edit, Vol. 1). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00051-3>
- Ichiye, T., y Karplus, M. (1991). Collective motions in proteins: A covariance analysis of atomic fluctuations in molecular dynamics and normal mode simulations. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 11(3), 205–217. <https://doi.org/10.1002/prot.340110305>
- Iñiguez, C., Capó-Bauçà, S., Niinemets, Ü., Stoll, H., Aguiló-Nicolau, P., y Galmés, J. (2020). Evolutionary trends in RuBisCO kinetics and their co-evolution with CO2 concentrating mechanisms. *Plant Journal*, 101(4), 897–918. <https://doi.org/10.1111/tpj.14643>
- Jägerbrand, A. K., y Kudo, G. (2016). Short-term responses in maximum quantum yield of PSII (Fv/Fm) to ex situ temperature treatment of populations of bryophytes originating from different sites in Hokkaido, Northern Japan. *Plants*, 5(2), 455–465. <https://doi.org/10.3390/plants5020022>
- Janaswamy, S., Yadav, M. P., Hoque, M., Bhattarai, S., y Ahmed, S. (2022). Cellulosic fraction from agricultural biomass as a viable alternative for plastics and plastic products. *Industrial Crops and Products*, 179(February), 114692. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114692>
- Jasieniecka-Gazarkiewicz, K., Lager, I., Carlsson, A. S., Gutbrod, K., Peisker, H.,

- Dörmann, P., ... Banaś, A. (2017). Acyl-CoA: Lysophosphatidylethanolamine acyltransferase activity regulates growth of arabidopsis. *Plant Physiology*, *174*(2), 986–998. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00391>
- Javier-Astete, R., Jimenez-Davalos, J., y Zolla, G. (2021). Determination of hemicellulose, cellulose, holocellulose and lignin content using FTIR in *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) K. Schum. And *Guazuma crinita* Lam. *PLoS ONE*, *16*(10 October), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256559>
- Javier-Astete, R., Melo, J., Jimenez-Davalos, J., y Zolla, G. (2023). Classification of Amazonian fast-growing tree species and wood chemical determination by FTIR and multivariate analysis (PLS-DA, PLS). *Scientific Reports*, *13*(1), 7827. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35107-6>
- Javier, R. (2021). “Validación De La Metodología Para La Determinación De Lignina Celulosa Y Hemicelulosa Por Espectroscopia Infrarroja En Árboles.” Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Jiang, C., Wang, J., Leng, H. N., Wang, X., Liu, Y., Lu, H., ... Zhang, J. (2021). Transcriptional Regulation and Signaling of Developmental Programmed Cell Death in Plants. *Frontiers in Plant Science*, *12*(July), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.702928>
- Jin, J., He, K., Tang, X., Li, Z., Lv, L., Zhao, Y., ... Gao, G. (2015). An arabidopsis transcriptional regulatory map reveals distinct functional and evolutionary features of novel transcription factors. *Molecular Biology and Evolution*, *32*(7), 1767–1773. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv058>
- Jordon-Thaden, I. E., Chandrabali, A. S., Gitzendanner, M. A., y Soltis, D. E. (2015). Modified CTAB and TRIzol protocols improve RNA extraction from chemically complex Embryophyta. *Applications in Plant Sciences*, *3*(5), 1400105. <https://doi.org/10.3732/apps.1400105>
- Kacar, B., Hanson-smith, V., Adam, Z., y Boekelheide, N. (2017). Constraining the timing of the Great Oxidation Event within the Rubisco phylogenetic tree. *Geobiology*, (May), 628–640. <https://doi.org/10.1111/gbi.12243>
- Kalenkiewicz, A., Grant, B. J., y Yang, C. Y. (2015). Enrichment of druggable conformations from apo protein structures using cosolvent-accelerated molecular dynamics. *Biology*, *4*(2), 344–366. <https://doi.org/10.3390/biology4020344>
- Kanani, P., Shukla, Y. M., Modi, A. R., Subhash, N., y Kumar, S. (2019). Standardization of an efficient protocol for isolation of RNA from *Cuminum cyminum*. *Journal of King Saud University - Science*, *31*(4), 1202–1207. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.12.008>
- Kanazawa, A., y Kramer, D. M. (2002). In vivo modulation of nonphotochemical exciton quenching (NPQ) by regulation of the chloroplast ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(20), 12789–12794. <https://doi.org/10.1073/pnas.182427499>
- Kim, K. S., Giacomelii, G. A., Sase, S., Son, J. E., Nam, S. W., y Nakazawa, F. (2006).

- Optimization of growth environment in a plant production facility using a chlorophyll fluorescence method. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 40(2), 149–156. <https://doi.org/10.6090/jarq.40.149>
- Ko, J. H., Beers, E. P., y Han, K. H. (2006). Global comparative transcriptome analysis identifies gene network regulating secondary xylem development in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics*, 276(6), 517–531. <https://doi.org/10.1007/s00438-006-0157-1>
- Kong, Y., Zhou, G., Avci, U., Gu, X., Jones, C., Yin, Y., ... Hahn, M. G. (2009). Two poplar glycosyltransferase genes, PdGATL1.1 and PdGATL1.2, are functional orthologs to PARVUS/AtGATL1 in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 2(5), 1040–1050. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp068>
- Kozlov, A. M., Darriba, D., Flouri, T., Morel, B., y Stamatakis, A. (2019). RAxML-NG: A fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics*, 35(21), 4453–4455. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz305>
- Kramer, D. M., Johnson, G., Kिरats, O., y Edwards, G. E. (2004). New fluorescence parameters for the determination of Q. *Biological Chemistry*, 209–218.
- Krause, G. H., Cheesman, A. W., Winter, K., Krause, B., y Virgo, A. (2013). Thermal tolerance, net CO₂ exchange and growth of a tropical tree species, *Ficus insipida*, cultivated at elevated daytime and nighttime temperatures. *Journal of Plant Physiology*, 170(9), 822–827. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.01.005>
- Krause, G. H., Winter, K., Krause, B., Jahns, P., García, M., Aranda, J., y Virgo, A. (2010). High-temperature tolerance of a tropical tree, *Ficus insipida*: Methodological reassessment and climate change considerations. *Functional Plant Biology*, 37(9), 890–900. <https://doi.org/10.1071/FP10034>
- Kuang, X., Sun, S., Li, Y., Zhang, H., Guo, B., Li, Y., y Sun, C. (2022). Transcriptome sequencing with nanopore technology for acquiring a deeper understanding of abscisic acid regulation of secondary mechanisms in *Salvia miltiorrhiza*. *Industrial Crops and Products*, 177(December 2021). <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114535>
- Kuhlgert, S., Austic, G., Zegarac, R., Osei-Bonsu, I., Hoh, D., Chilvers, M. I., ... Kramer, D. M. (2016). MultispeQ Beta: A tool for large-scale plant phenotyping connected to the open photosynQ network. *Royal Society Open Science*, 3(10). <https://doi.org/10.1098/rsos.160592>
- Kurjak, D., Konôpková, A., Kmet', J., Macková, M., Frýdl, J., Živčák, M., ... Gömöry, D. (2019). Variation in the performance and thermostability of photosystem II in European beech (*Fagus sylvatica* L.) provenances is influenced more by acclimation than by adaptation. *European Journal of Forest Research*, 138(1), 79–92. <https://doi.org/10.1007/s10342-018-1155-7>
- Kwon, Y. R., Kim, S. H., Jung, M. S., Kim, M. S., Oh, J. E., Ju, H. W., ... Hong, S. W. (2007). *Arabidopsis* hot2 encodes an endochitinase-like protein that is essential for

- tolerance to heat, salt and drought stresses. *Plant Journal*, 49(2), 184–193. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02950.x>
- Labarta, R., y Weber, J. C. (1998). Valorización económica de bienes tangibles de cinco especies arbóreas agroforestales en la Cuenca Amazónica Peruana. *Revista Forestal Centroamericana*, (April).
- Lartillot, N., y Philippe, H. (2004). A Bayesian mixture model for across-site heterogeneities in the amino-acid replacement process. *Molecular Biology and Evolution*, 21(6), 1095–1109. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh112>
- Le Hir, R., Castelain, M., Chakraborti, D., Moritz, T., Dinant, S., y Bellini, C. (2017). AtbHLH68 transcription factor contributes to the regulation of ABA homeostasis and drought stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 160(3), 312–327. <https://doi.org/10.1111/ppl.12549>
- Le, S. Q., y Gascuel, O. (2008). An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1307–1320. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn067>
- Lee, S., Lee, H. J., Huh, S. U., Paek, K. H., Ha, J. H., y Park, C. M. (2014). The *Arabidopsis* NAC transcription factor NTL4 participates in a positive feedback loop that induces programmed cell death under heat stress conditions. *Plant Science*, 227, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.07.003>
- Lee, S., Seo, P. J., Lee, H. J., y Park, C. M. (2012). A NAC transcription factor NTL4 promotes reactive oxygen species production during drought-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 70(5), 831–844. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04932.x>
- Leon-Garcia, I. V., y Lasso, E. (2019). High heat tolerance in plants from the Andean highlands: Implications for paramos in a warmer world. *PLoS ONE*, 14(11), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224218>
- Levitt, M., Sander, C., y Stern, P. S. (1985). Protein normal-mode dynamics: Trypsin inhibitor, crambin, ribonuclease and lysozyme. *Journal of Molecular Biology*, 181(3), 423–447. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(85\)90230-X](https://doi.org/10.1016/0022-2836(85)90230-X)
- Li, S., Gao, J., Yao, L., Ren, G., Zhu, X., Gao, S., ... Kuai, B. (2016). The role of ANAC072 in the regulation of chlorophyll degradation during age- and dark-induced leaf senescence. *Plant Cell Reports*, 35(8), 1729–1741. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1991-1>
- Li, W. Y., Wei, H. Y., Sun, Y. Z., Zhou, H., Ma, Y., y Wang, R. L. (2018). Exploring the effect of E76K mutation on SHP2 cause gain-of-function activity by a molecular dynamics study. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(12), 9941–9956. <https://doi.org/10.1002/jcb.27316>
- Li, X. Y., Li, L., Liu, X., Zhang, B., Zheng, W. L., y Ma, W. L. (2012). ANALYSIS OF physiological characteristics OF abscisic acid sensitivity and salt resistance IN *Arabidopsis* ANAC mutants (anac019, anac072 and anac055). *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 26(3), 2966–2970.

<https://doi.org/10.5504/BBEQ.2012.0039>

- Li, Yin, Bao, W., Bongers, F., Chen, B., Chen, G., Guo, K., ... Ma, K. (2019). Drivers of tree carbon storage in subtropical forests. *Science of the Total Environment*, 654, 684–693. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.024>
- Li, Ying, He, N., Hou, J., Xu, L., Liu, C., Zhang, J., ... Wu, X. (2018). Factors influencing leaf chlorophyll content in natural forests at the biome scale. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6(JUN), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00064>
- Lin, L., Lucas, M. De, Turco, G., Toal, T. W., Gaudinier, A., Young, N. F., ... Brady, S. M. (2015). An Arabidopsis gene regulatory network for secondary cell wall synthesis. *Nature*, 517(7536), 571–575. <https://doi.org/10.1038/nature14099>
- Liu, D., Ramya, R. C. S., y Mueller-Cajar, O. (2017). Surveying the expanding prokaryotic Rubisco multiverse. *FEMS Microbiology Letters*, 364(16), 1–10. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx156>
- Liu, J., Chen, X., Chen, W., Xia, M., Chen, Y., Chen, H., ... Yang, H. (2022). Biomass pyrolysis mechanism for carbon-based high-value products. *Proceedings of the Combustion Institute*, 000, 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.proci.2022.09.063>
- Liu, W. S., Wang, R. R., Sun, Y. Z., Li, W. Y., Li, H. L., Liu, C. L., ... Wang, R. L. (2019). Exploring the effect of inhibitor AKB-9778 on VE-PTP by molecular docking and molecular dynamics simulation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(10), 17015–17029. <https://doi.org/10.1002/jcb.28963>
- Liu, Y., Schmidt, B., y Maskell, D. L. (2010). MSAProbs: Multiple sequence alignment based on pair hidden Markov models and partition function posterior probabilities. *Bioinformatics*, 26(16), 1958–1964. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq338>
- Livingston, A. K., Kanazawa, A., Cruz, J. A., y Kramer, D. M. (2010). Regulation of cyclic electron flow in C3 plants: Differential effects of limiting photosynthesis at ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Plant, Cell and Environment*, 33(11), 1779–1788. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02183.x>
- López de Heredia, U., y Vázquez-Poletti, J. L. (2016). RNA-seq analysis in forest tree species: bioinformatic problems and solutions. *Tree Genetics and Genomes*, 12(2), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s11295-016-0995-x>
- López Parodi, J., y Freitas, D. (1990). Geographical aspects of forested wetlands in the lower Ucayali, Peruvian Amazonia. *Forest Ecology and Management*, 33–34(C), 157–168. [https://doi.org/10.1016/0378-1127\(90\)90190-M](https://doi.org/10.1016/0378-1127(90)90190-M)
- Lourenço, V. A., Nadaleti, W. C., Vieira, B. M., y Li, H. (2021). Investigation of ethyl biodiesel via transesterification of rice bran oil: bioenergy from residual biomass in Pelotas, Rio Grande do Sul - Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 144(March). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111016>
- Lowry, J. A., y Atchley, W. R. (2000). Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: Conservation within the DNA-binding domain. *Journal of Molecular Evolution*, 50(2), 103–115. <https://doi.org/10.1007/s002399910012>

- Lu, D., Wang, T., Persson, S., Mueller-Roeber, B., y Schippers, J. H. M. (2014). Transcriptional control of ROS homeostasis by KUODA1 regulates cell expansion during leaf development. *Nature Communications*, 5(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms4767>
- Luthy, R., Bowie, J., y Eisenberg, D. (1992). Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, 359, 83–85.
- Lutz, W. (2015). World Population and Human Capital in the 21st Century. *Popnet*, (46), 1–12.
- Macintosh, A., Keith, H., y Lindenmayer, D. (2015). Rethinking forest carbon assessments to account for policy institutions. *Nature Climate Change*, (June). <https://doi.org/10.1038/nclimate2695>
- Maere, S., Heymans, K., y Kuiper, M. (2005). BiNGO: A Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks. *Bioinformatics*, 21(16), 3448–3449. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti551>
- Magalhaes, J., Valencise, C., Fernandes, J. de O., Carnier, M., y Mazzafera, P. (2010). Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(4), 360–376. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00892.x>
- Mahboubi, A., y Niittylä, T. (2018). Sucrose transport and carbon fluxes during wood formation. *Physiologia Plantarum*, 164(1), 67–81. <https://doi.org/10.1111/pp1.12729>
- Mao, J. L., Miao, Z. Q., Wang, Z., Yu, L. H., Cai, X. T., y Xiang, C. Bin. (2016). Arabidopsis ERF1 Mediates Cross-Talk between Ethylene and Auxin Biosynthesis during Primary Root Elongation by Regulating ASA1 Expression. *PLoS Genetics*, 12(1), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005760>
- Marcus, Y., y Gurevitz, M. (2000). Activation of cyanobacterial RuBP-carboxylase/oxygenase is facilitated by inorganic phosphate via two independent mechanisms. *European Journal of Biochemistry*, 267(19), 5995–6003. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01674.x>
- Marques, W. L., Salazar, M. M., Camargo, E. L. O., Lepikson-Neto, J., Tiburcio, R. A., do Nascimento, L. C., y Pereira, G. A. G. (2013). Identification of four Eucalyptus genes potentially involved in cell wall biosynthesis and evolutionarily related to SHINE transcription factors. *Plant Growth Regulation*, 69(2), 203–208. <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9754-7>
- Marsooli, R., Lin, N., Emanuel, K., y Feng, K. (2019). Climate change exacerbates hurricane flood hazards along US Atlantic and Gulf Coasts in spatially varying patterns. *Nature Communications*, (2019), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11755-z>
- Maugarny-Calès, A., Gonçalves, B., Jouannic, S., Melkonian, M., Ka-Shu Wong, G., y Laufs, P. (2016). Apparition of the NAC Transcription Factors Predates the Emergence of Land Plants. *Molecular Plant*, 9(9), 1345–1348. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.05.016>

- McCarthy, R. L., Zhong, R., y Ye, Z. H. (2009). MYB83 is a direct target of SND1 and acts redundantly with MYB46 in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 50(11), 1950–1964. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp139>
- Mcdowell, N., Mcdowell, N., Pockman, W. T., Allen, C. D., David, D., Cobb, N., ... Yopez, E. A. (2008). Mechanisms of plant survival and mortality during drought : why do some plants survive while others succumb to. *New Phytologist*.
- Mcperson, L. A., Baichwal, V. R., y Weigel, R. J. (1997). Identification of ERF-1 as a member of the AP2 transcription factor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(9), 4342–4347. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4342>
- Meents, M. J., Motani, S., Mansfield, S. D., y Lacey Samuels, A. (2019). Organization of xylan production in the Golgi during secondary cell wall biosynthesis. *Plant Physiology*, 181(2), 527–546. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00715>
- Mizrachi, E., Hefer, C. A., Ranik, M., Joubert, F., y Myburg, A. a. (2010). De novo assembled expressed gene catalog of a fast-growing Eucalyptus tree produced by Illumina mRNA-Seq. *BMC Genomics*, 11(1), 681. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-681> [pii]
- Montes, C. S., y Weber, J. C. (1997). Priorización de especies arbóreas para sistemas agroforestales en la selva baja del Perú. *Agroforesteria En Las Américas*, (January).
- Mouille, G., Robin, S., Lecomte, M., Pagant, S., y Höfte, H. (2003). Classification and identification of Arabidopsis cell wall mutants using Fourier-Transform InfraRed (FT-IR) microspectroscopy. *Plant Journal*, 35(3), 393–404. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01807.x>
- Muchugi, A., Muluvi, G., Kadu, C., Simons, A., y Jamnadass, R. (2008). Genetic structuring of important medicinal species of genus Warburgia as revealed by AFLP analysis Genetic structuring of important medicinal species of genus Warburgia as revealed by AFLP analysis. *Tree Genetics y Genomes*, (October). <https://doi.org/10.1007/s11295-008-0151-3>
- Mueller-Cajar, O. (2017). The diverse AAA+ machines that repair inhibited Rubisco active sites. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 4(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00031>
- Naika, M., Shameer, K., Mathew, O. K., Gowda, R., y Sowdhamini, R. (2013). STIFDB2: An updated version of plant stress-responsive transcription factor database with additional stress signals, stress-responsive transcription factor binding sites and stress-responsive genes in arabidopsis and rice. *Plant and Cell Physiology*, 54(2), 1–15. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs185>
- Nair, R. B., Xia, Q., Kartha, C. J., Kurylo, E., Hirji, R. N., Datla, R., y Selvaraj, G. (2002). Arabidopsis CYP98A3 mediating aromatic 3-hydroxylation. Developmental regulation of the gene, and expression in yeast. *Plant Physiology*, 130(1), 210–220. <https://doi.org/10.1104/pp.008649>

- Nakano, Y., Yamaguchi, M., Endo, H., Rejab, N. A., y Ohtani, M. (2015). NAC-MYB-based transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in land plants. *Frontiers in Plant Science*, 6(May), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00288>
- Neale, D. B., Wegrzyn, J. L., Stevens, K. A., Zimin, A. V, Puiu, D., Crepeau, M. W., ... Langley, C. H. (2014). Decoding the massive genome of loblolly pine using haploid DNA and novel assembly strategies. *Genome Biology*, 1–13. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r59>
- Neira, Y. (2009). *Cuantificación de biomasa y carbono en plantaciones de Guazuma crinita Mart. y asociacion de Guazuma crinita Mart. con Theobroma cacao L., Satipo.*
- Ng, J., Guo, Z., y Mueller-Cajar, O. (2020). Rubisco activase requires residues in the large subunit N terminus to remodel inhibited plant Rubisco. *Journal of Biological Chemistry*, 295(48), 16427–16435. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015759>
- Nicolas, P., Lecourieux, D., Kappel, C., Cluzet, S., Cramer, G., Delrot, S., y Lecourieux, F. (2014). The basic leucine zipper transcription factor ABSCISIC ACID RESPONSE ELEMENT-BINDING FACTOR2 is an important transcriptional regulator of abscisic acid-dependent grape berry ripening processes. *Plant Physiology*, 164(1), 365–383. <https://doi.org/10.1104/pp.113.231977>
- Nishitani, K., y Tominaga, R. (1992). Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. *Journal of Biological Chemistry*, 267(29), 21058–21064. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)36797-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)36797-3)
- Nishitani, Y., Yoshida, S., Fujihashi, M., Kitagawa, K., Doi, T., Atomi, H., ... Miki, K. (2010). Structure-based catalytic optimization of a type III Rubisco from a hyperthermophile. *Journal of Biological Chemistry*, 285(50), 39339–39347. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.147587>
- Niu, Z., Li, G., Hu, H., Lv, J., Zheng, Q., Liu, J., y Wan, D. (2021). A gene that underwent adaptive evolution, LAC2 (LACCASE), in *Populus euphratica* improves drought tolerance by improving water transport capacity. *Horticulture Research*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00518-x>
- Ohman, D., Demedts, B., Kumar, M., Gerber, L., Gorzsas, A., Goeminne, G., ... Sundberg, B. (2013). MYB103 is required for FERULATE-5-HYDROXYLASE expression and syringyl lignin biosynthesis in *Arabidopsis* stems. *Plant Journal*, 73(1), 63–76. <https://doi.org/10.1111/tpj.12018>
- Olins, J. R., Lin, L., Lee, S. J., Trabucco, G. M., Mackinnon, K. J., Hazen, S. P., y Anderson, C. T. (2018). Secondary Wall Regulating NACs Differentially Bind at the Promoter at a CELLULOSE SYNTHASE A4 Cis -eQTL. *Frontiers In Plant Science*, 9(December), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01895>
- Öquist, G., y Huner, N. P. A. (2003). Photosynthesis of Overwintering Evergreen Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 54(October 2015), 329–355. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.072402.115741>
- Osei-bonsu, I., McClain, A., Walker, B., Sharkey, T., y David, M. (2020). *The roles of*

- photorespiration and alternative electron acceptors in the responses of photosynthesis to elevated temperatures in cowpea*. 1–18.
- Ouyang, K., Li, J., Zhao, X., y Que, Q. (2016). Transcriptomic Analysis of Multipurpose Timber Yielding Tree *Neolamarckia cadamba* during Xylogenesis Using RNA-Seq. *PLoS ONE*, 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159407>
- Paredes, O., Soudre-Zambrano, M., Chavez, J., y Guerra, W. (2010). Propagación vegetativa de Bolaina Blanca (*Guazuma crinita* Mart.) mediante injerto, bajo condiciones ambientales controladas. *Folia Amazónica*, 19(1–2), 69. <https://doi.org/10.24841/fa.v19i1-2.346>
- Parent, G. J., Raheison, E., Sena, J., y MacKay, J. J. (2015). Forest Tree Genomics: Review of Progress. *Advances in Botanical Research*, 74, 39–92. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2015.05.004>
- Passardi, F., Penel, C., y Dunand, C. (2004). Performing the paradoxical: How plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science*, 9(11), 534–540. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.09.002>
- Pavy, N., Boyle, B., Nelson, C., Paule, C., Giguère, I., Caron, S., ... Mackay, J. (2008). Identification of conserved core xylem gene sets: Conifer cDNA microarray development, transcript profiling and computational analyses. *New Phytologist*, 180(4), 766–786. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02615.x>
- Pavy, N., Laroche, J., Bousquet, J., y Mackay, J. (2005). Large-scale statistical analysis of secondary xylem ESTs in pine. *Plant Molecular Biology*, 57(2), 203–224. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-6969-7>
- Peng, H., y Neff, M. M. (2021). Two ATAF transcription factors ANAC102 and ATAF1 contribute to the suppression of cytochrome P450-mediated brassinosteroid catabolism in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*, 172(3), 1493–1505. <https://doi.org/10.1111/ppl.13339>
- Peres, C. A., Gardner, T. A., Barlow, J., Zuanon, J., Michalski, F., Lees, A. C., ... Feeley, K. J. (2010). Biodiversity conservation in human-modified Amazonian forest landscapes. *Biological Conservation*, 143(10), 2314–2327. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2010.01.021>
- Persson, S., Paredes, A., Carroll, A., Palsdottir, H., Doblin, M., Poindexter, P., ... Somerville, C. R. (2007). Genetic evidence for three unique components in primary cell-wall cellulose synthase complexes in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(39), 15566–15571. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706592104>
- Persson, S., Wei, H., Milne, J., Page, G. P., y Somerville, C. R. (2005). Identification of genes required for cellulose synthesis by regression analysis of public microarray data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(24), 8633–8638. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503392102>
- Pires, H. R. A., Franco, A. C., Piedade, M. T. F., Scudeller, V. V., Kruijt, B., y Ferreira, C. S. (2018). Flood tolerance in two tree species that inhabit both the Amazonian

- floodplain and the dry Cerrado savanna of Brazil. *AoB PLANTS*, 10(6), 1–15. <https://doi.org/10.1093/aobpla/ply065>
- Pleban, J. R., Guadagno, C. R., Mackay, D. S., Weinig, C., y Ewers, B. E. (2020). Rapid Chlorophyll a Fluorescence Light Response Curves Mechanistically Inform Photosynthesis Modeling. *Plant Physiology*, 183(2), 602–619. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00375>
- Plomion, C., Bastien, C., Bouffier, L., Déjardin, A., y Duplessis, S. (2016). Forest tree genomics: 10 achievements from the past 10 years and future prospects. *Annals Of Forest Science*, 73(1), 77–103. <https://doi.org/10.1007/s13595-015-0488-3>
- Plomion, C., Jean, B., y Kole, C. (2011). *GENETICS, GENOMICS AND BREEDING OF CONIFERS*.
- Porro, R., Lopez-feldman, A., y Vela-alvarado, J. W. (2015). Forest Policy and Economics Forest use and agriculture in Ucayali , Peru : Livelihood strategies , poverty and wealth in an Amazon frontier. *Forest Policy and Economics*, 51, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.forpol.2014.12.001>
- Portes, M. T., Daminieli, D. S. C., Ribeiro, R. V., Monteiro, J. A. F., y Souza, G. M. (2010). Evidence of higher photosynthetic plasticity in the early successional *Guazuma ulmifolia* Lam. compared to the late successional *Hymenaea courbaril* L. grown in contrasting light environments. *Brazilian Journal of Biology*, 70(1), 75–83. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842010000100011>
- Poudel, S., Pike, D. H., Raanan, H., Mancini, J. A., Nanda, V., Rickaby, R. E. M., y Falkowski, P. G. (2020). Biophysical analysis of the structural evolution of substrate specificity in RuBisCO. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(48), 30451–30457. <https://doi.org/10.1073/pnas.2018939117>
- Prislan, P., Mrak, P., Žnidaršič, N., Štrus, J., Humar, M., Thaler, N., ... Gričar, J. (2018). Intra-annual dynamics of phloem formation and ultrastructural changes in sieve tubes in *Fagus sylvatica*. *Tree Physiology*, 39(2), 262–274. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpy102>
- Ralph, J., Lapierre, C., y Boerjan, W. (2019). Lignin structure and its engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.019>
- Ralph, J., Lundquis, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P., ... Boerjan, W. (2004). Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids. *Phytochemistry Reviews*, 34(October 2004). <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000047809.65444.a4>
- Ramachandran, P., Augstein, F., Mazumdar, S., Nguyen, T. Van, Minina, E. A., Melnyk, C. W., y Carlsbecker, A. (2021). Abscisic acid signaling activates distinct VND transcription factors to promote xylem differentiation in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 31(14), 3153-3161.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.04.057>
- Ramos-huapaya, A., y Torrejon, G. (2016). SELECCIÓN DE ÁRBOLES DE BOLAINA BLANCA (*Guazuma crinita* Mart .) COMO CANDIDATOS A ÁRBOLES “ PLUS

” PARA ENSAYOS DE REJUVENECIMIENTO Y BROTACIÓN SELECTION OF BOLAINA BLANCA (Guazuma crinita Mart .) TREES AS " PLUS ". *Ecología Aplicada*, 15(2).

- Ramos-huapaya, A., y Torrejón, G. (2017). DESARROLLO DE ESTACAS DE BOLAINA BLANCA (Guazuma crinita Mart .) EN CÁMARAS DE SUB-IRRIGACIÓN DEVELOPMENT OF CUTS OF BOLAINA BLANCA (Guazuma crinita Mart .) IN SUB- IRRIGATION CHAMBERS FOLIA. *Folia Amazónica*, 26(1), 17–28.
- Ranjan, S., Singh, R., Singh, M., Pathre, U. V., y Shirke, P. A. (2014). Characterizing photoinhibition and photosynthesis in juvenile-red versus mature-green leaves of *Jatropha curcas* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 79(June), 48–59. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.03.007>
- Rathgeber, C. B. K., Fonti, P., Shishov, V. V., y Rozenberg, P. (2019). Wood formation and tree adaptation to climate. *Annals of Forest Science*, 76(4), 17–20. <https://doi.org/10.1007/s13595-019-0902-3>
- Renault, P., Louet, M., Marie, J., Labesse, G., y Floquet, N. (2019). Molecular Dynamics Simulations of the Allosteric Modulation of the Adenosine A2a Receptor by a Mini-G Protein. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41980-x>
- Revealed, L. M., Wegrzyn, J. L., Liechty, J. D., Stevens, K. A., Wu, L., Loopstra, C. A., ... Neale, D. B. (2014). Unique Features of the Loblolly Pine. *Genetics*, 196(March), 891–909. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.159996>
- Reyes, C., Muro-pastor, M. I., y Florencio, F. J. (2004). The GATA Family of Transcription Factors in Arabidopsis and Rice 1. *Society*, 134(April), 1718–1732. <https://doi.org/10.1104/pp.103.037788.called>
- Reynel C., Pennington RT., Pennington TD., F. C. y, y A, D. (2003). Árboles útiles de la Amazonía peruana y sus usos: Un manual con apuntes de identificación, ecología y propagación de las especies. *Tarea Gráfica Educativa*, 15(2), 115.
- Rhoads, A., y Au, K. F. (2015). PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 13(5), 278–289. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.08.002>
- Rivera-Méndez, Y. D., y Romero, H. M. (2017). Fitting of photosynthetic response curves to photosynthetically active radiation in oil palm. *Agronomia Colombiana*, 35(3), 323–329. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v35n3.63119>
- Rochon, C., Margolis, H. a., y Weber, J. C. (2007a). Genetic variation in growth of *Guazuma crinita* (Mart.) trees at an early age in the Peruvian Amazon. *Forest Ecology and Management*, 243(2–3), 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2007.03.025>
- Rochon, C., Margolis, H. A., y Weber, J. C. (2007b). Genetic variation in growth of *Guazuma crinita* (Mart.) trees at an early age in the Peruvian Amazon. *Forest Ecology and Management*, 243(2–3), 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2007.03.025>
- Rogers, L. A., y Campbell, M. M. (2004). The genetic control of lignin deposition during

- plant growth and development. *New Phytologist*, 164(1), 17–30. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01143.x>
- Romanenko, K. O., Babenko, L. M., Smirnov, O. E., y Kosakivska, I. V. (2022). Antioxidant Protection System and Photosynthetic Pigment Composition in *Secale cereale* Subjected to Short-Term Temperature Stresses. *The Open Agriculture Journal*, 16(1), 1–10. <https://doi.org/10.2174/18743315-v16-e2206273>
- Rui, Y., Xiao, C., Yi, H., Kandemir, B., Wang, J. Z., Puri, V. M., y Anderson, C. T. (2017). POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION3 functions in seedling development, rosette growth, and stomatal dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 29(10), 2413–2432. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00568>
- Russell, J. R., Weber, J. C., Booth, A., Powell, W., Sotelo-Montes, C., y Dawson, I. K. (1999). Genetic variation of *Calycophyllum spruceanum* in the Peruvian Amazon Basin, revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis. *Molecular Ecology*, 8(2), 199–204. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1999.00551.x>
- Sablowski, R. W., y Meyerowitz, E. M. (1998). A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA [published erratum appears in *Cell* 1998 Feb 20;92(4):following 585]. *Cell*, 92(1), 93–103.
- Sah, S. K., Reddy, K. R., y Li, J. (2016). Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7(May), 1–26. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00571>
- Saito, Y., Ashida, H., Sakiyama, T., de Marsac, N. T., Danchin, A., Sekowska, A., y Yokota, A. (2009). Structural and functional similarities between a ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO)-like protein from *Bacillus subtilis* and photosynthetic RuBisCO. *Journal of Biological Chemistry*, 284(19), 13256–13264. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807095200>
- Sakamoto, S., Takata, N., Oshima, Y., Yoshida, K., y Taniguchi, T. (2016). Wood reinforcement of poplar by rice NAC transcription factor. *Nature*, 6(August), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep19925>
- Salmas, R. E., Unlu, A., Yurtsever, M., Noskov, S. Y., y Durdagi, S. (2016). In silico investigation of PARP-1 catalytic domains in holo and apo states for the design of high-affinity PARP-1 inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(1), 112–120. <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1005011>
- Sánchez-Rodríguez, C., Bauer, S., Hématy, K., Saxe, F., Ibáñez, A. B., Vodermaier, V., ... Persson, S. (2012). CHITINASE-LIKE1/POM-POM1 and its homolog CTL2 are glucan-interacting proteins important for cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 24(2), 589–607. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.094672>
- Santanoo, S., Vongcharoen, K., Banterng, P., Vorasoot, N., Jogloy, S., Roytrakul, S., y Theerakulpisut, P. (2020). Canopy structure and photosynthetic performance of irrigated cassava genotypes growing in different seasons in a tropical savanna climate.

- In *Agronomy* (Vol. 10). <https://doi.org/10.3390/agronomy10122018>
- Sastry, A., Guha, A., y Barua, D. (2018). Leaf thermotolerance in dry tropical forest tree species: Relationships with leaf traits and effects of drought. *AoB PLANTS*, *10*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plx070>
- Satagopan, S., Chan, S., Perry, L. J., y Tabita, F. R. (2014). Structure-function studies with the unique hexameric form II ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) from *Rhodospseudomonas palustris*. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(31), 21433–21450. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.578625>
- Satagopan, S., North, J. A., Arbing, M. A., Varaljay, V. A., Haines, S. N., Wildenthal, J. A., ... Tabita, F. R. (2019). Structural Perturbations of *Rhodospseudomonas palustris* Form II RuBisCO Mutant Enzymes That Affect CO₂ Fixation [Research-article]. *Biochemistry*, *58*(37), 3880–3892. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00617>
- Schilbert, H. M., y Glover, B. J. (2022). Analysis of flavonol regulator evolution in the Brassicaceae reveals MYB12, MYB111 and MYB21 duplications and MYB11 and MYB24 gene loss. *BMC Genomics*, *23*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08819-8>
- SCHNELL, C. N. (2019). *Aplicaciones del xilano en la formación de complejos de polielectrolitos para la obtención de películas y para la mejora de propiedades de papeles no blanqueados reciclados* (Universidad Nacional del Litoral). Retrieved from <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/handle/11185/5164>
- Schoch, G., Goepfert, S., Morant, M., Hehn, A., Meyer, D., Ullmann, P., y Werck-Reichhart, D. (2001). CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* Is a 3'-Hydroxylase of Phenolic Esters, a Missing Link in the Phenylpropanoid Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(39), 36566–36574. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104047200>
- Schreuder, H. A., Knight, S., Curmi, P. M. G., Andersson, I., Cascio, D., Branden, C. I., y Eisenberg, D. (1993). Formation of the active site of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by a disorder-order transition from the unactivated to the activated form. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(21), 9968–9972. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.21.9968>
- Schröder, R., Atkinson, R. G., Langenkämper, G., y Redgwell, R. J. (1998). Biochemical and molecular characterisation of xyloglucan endotransglycosylase from ripe kiwifruit. *Planta*, *204*(2), 242–251. <https://doi.org/10.1007/s004250050253>
- Schrodinger, L. (2010). *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1*.
- Seno, Y., y Go, N. (1990). Deoxymyoglobin studied by the conformational normal mode analysis. I. Dynamics of globin and the heme-globin interaction. *Journal of Molecular Biology*, *216*(1), 95–109. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80063-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80063-4)
- Shin, R., Burch, A. Y., Huppert, K. A., Tiwari, S. B., Murphy, A. S., Guilfoyle, T. J., y Schachtman, D. P. (2007). The *Arabidopsis* transcription factor MYB77 modulates auxin signal transduction. *Plant Cell*, *19*(8), 2440–2453. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.050963>

- Shivakumar, V. S., Johnson, G., y Zimmer, E. A. (2019). Transcriptome analysis of the curry tree (*Bergera koenigii* L., Rutaceae) during leaf development. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40227-z>
- Sibout, R., Eudes, A., Mouille, G., Pollet, B., Lapiere, C., Jouanin, L., y Séguin, A. (2005). Cinnamyl alcohol dehydrogenase-C and -D are the primary genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of arabidopsis. *Plant Cell*, 17(7), 2059–2076. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.030767>
- Siqueira, A. S., Lima, A. R. J., Dall’Agnol, L. T., de Azevedo, J. S. N., da Silva Gonçalves Vianez, J. L., y Gonçalves, E. C. (2016). Comparative modeling and molecular dynamics suggest high carboxylase activity of the Cyanobium sp. CACIAM14 RbcL protein. *Journal of Molecular Modeling*, 22(3). <https://doi.org/10.1007/s00894-016-2943-y>
- Skjaerven, L., Yao, X. Q., Scarabelli, G., y Grant, B. J. (2014). Integrating protein structural dynamics and evolutionary analysis with Bio3D. *BMC Bioinformatics*, 15(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12859-014-0399-6>
- Slabaugh, E., Davis, J. K., Haigler, C. H., Yingling, Y. G., y Zimmer, J. (2014). Cellulose synthases: New insights from crystallography and modeling. *Trends in Plant Science*, 19(2), 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.09.009>
- Song, L., Chow, W. S., Sun, L., Li, C., y Peng, C. (2010). Acclimation of photosystem II to high temperature in two *Wedelia* species from different geographical origins: Implications for biological invasions upon global warming. *Journal of Experimental Botany*, 61(14), 4087–4096. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq220>
- Sotelo Montes, C., Hernández, R. E., Beaulieu, J., y Weber, J. C. (2006). Genetic variation and correlations between growth and wood density of *Calycophyllum spruceanum* at an early age in the Peruvian Amazon. *Silvae Genetica*, 55(4–5), 217–228. <https://doi.org/10.1515/sg-2006-0029>
- Sotelo Montes, Carmen, Hernández, R. E., Beaulieu, J., y Weber, J. C. (2008). Genetic variation in wood color and its correlations with tree growth and wood density of *Calycophyllum spruceanum* at an early age in the Peruvian Amazon. *New Forests*, 35(1), 57–73. <https://doi.org/10.1007/s11056-007-9060-9>
- Sotelo Montes, Carmen, Vidaurre, H., y Weber, J. (2003). Variation in stem-growth and branch-wood traits among provenances of *Calycophyllum spruceanum* Benth. from the Peruvian Amazon. *New Forests*, 26(1), 1–16. <https://doi.org/10.1023/A:1024425519480>
- Stamenković, M., y Hanelt, D. (2013). Adaptation of growth and photosynthesis to certain temperature regimes is an indicator for the geographical distribution of *Cosmarium* strains (Zygnematophyceae, Streptophyta). *European Journal of Phycology*, 48(1), 116–127. <https://doi.org/10.1080/09670262.2013.772657>
- Steiner-Lange, S., Unte, U. S., Eckstein, L., Yang, C., Wilson, Z. A., Schmelzer, E., ... Saedler, H. (2003). Disruption of *Arabidopsis thaliana* MYB26 results in male sterility due to non-dehiscent anthers. *Plant Journal*, 34(4), 519–528.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01745.x>

- Stepanova, A. N., Yun, J., Likhacheva, A. V., y Alonso, J. M. (2007). Multilevel interactions between ethylene and auxin in Arabidopsis roots. *Plant Cell*, *19*(7), 2169–2185. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.052068>
- Sugawara, H., Yamamoto, H., Shibata, N., Inoue, T., Okada, S., Miyake, C., ... Yasushi, K. (1999). Crystal structure of carboxylase reaction-oriented ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from a thermophilic red alga, *Galdieria partita*. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(22), 15655–15661. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.22.15655>
- Sun, X., Yu, T., Bin, M., Hu, C., Bi, F., Peng, X., ... Zhang, X. (2022). Transcriptomic analysis reveals the defense mechanisms of citrus infested with *Diaphorina citri*. *Horticultural Plant Journal*, (December). <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2022.07.008>
- Sun, Y. Z., Chen, X. B., Wang, R. R., Li, W. Y., y Ma, Y. (2019). Exploring the effect of N308D mutation on protein tyrosine phosphatase-2 cause gain-of-function activity by a molecular dynamics study. *Journal of Cellular Biochemistry*, *120*(4), 5949–5961. <https://doi.org/10.1002/jcb.27883>
- Sundell, D., Street, N. R., Kumar, M., Mellerowicz, E. J., Kucukoglu, M., Johnsson, C., ... Hvidsten, T. R. (2017). Aspwood: High-spatial-resolution transcriptome profiles reveal uncharacterized modularity of wood formation in *populus tremula*. *Plant Cell*, *29*(7), 1585–1604. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00153>
- Sylvester, S. P., Heitkamp, F., Sylvester, M. D. P. V., Jungkunst, H. F., Sipman, H. J. M., Toivonen, J. M., ... Kessler, M. (2017). Relict high-Andean ecosystems challenge our concepts of naturalness and human impact. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03500-7>
- Tabita, F. R., Satagopan, S., Hanson, T. E., Kreel, N. E., y Scott, S. S. (2008). Distinct form I, II, III, and IV Rubisco proteins from the three kingdoms of life provide clues about Rubisco evolution and structure/function relationships. *Journal of Experimental Botany*, *59*(7), 1515–1524. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm361>
- Tamagnone, L., Merida, M., Parr, A., Mackay, S., Cullianez-Macia, F., Roberts, K., y Martin, C. (1998). The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from *antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. *The Plant Cell*, *10*(2), 135–154. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.2.135>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., y Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(12), 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tang, X., Zhuang, Y., Qi, G., Wang, D., Liu, H., Wang, K., ... Zhou, G. (2015). Poplar PdMYB221 is involved in the direct and indirect regulation of secondary wall biosynthesis during wood formation. *Scientific Reports*, *5*(July), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep12240>
- Tasseva, G., Richard, L., y Zachowski, A. (2004). Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis under salt stress involves choline kinases in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS*

- Letters*, 566(1–3), 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.04.015>
- Taylor, T., y Andersson, I. (1996). Structural transitions during activation and ligand binding in hexadecameric Rubisco inferred from the crystal structure of the activated unliganded spinach enzyme. *Nat. Struct. Biol.*, 3, 95–101. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nsb0196-95>
- Teakle, G. R., Manfield, I. W., Graham, J. F., y Gilmartin, P. M. (2002). Arabidopsis thaliana GATA factors: Organisation, expression and DNA-binding characteristics. *Plant Molecular Biology*, 50(1), 43–57. <https://doi.org/10.1023/A:1016062325584>
- Thompson, J. E., Smith, R. C., y Fry, S. C. (1997). Isopycnic Centrifugation in Caesium Trifluoroacetate. *Pharmacia*, 708, 699–708.
- Tian, Q., Wang, X., Li, C., Lu, W., Yang, L., Jiang, Y., y Luo, K. (2013). Functional Characterization of the Poplar R2R3-MYB Transcription Factor PtoMYB216 Involved in the Regulation of Lignin Biosynthesis during Wood Formation. *PLoS ONE*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076369>
- Tian, X. M., Xie, J., Zhao, Y. L., Lu, H., Liu, S. C., Qu, L., ... Jiang, X. N. (2013). Sense-, antisense- and RNAi-4CL1 regulate soluble phenolic acids, cell wall components and growth in transgenic Populus tomentosa Carr. *Plant Physiology and Biochemistry*, 65, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.01.010>
- Tietz, S., Hall, C. C., Cruz, J. A., y Kramer, D. M. (2017). NPQ(T): a chlorophyll fluorescence parameter for rapid estimation and imaging of non-photochemical quenching of excitons in photosystem-II-associated antenna complexes. *Plant Cell and Environment*, 40(8), 1243–1255. <https://doi.org/10.1111/pce.12924>
- Tiwari, R., Gloor, E., da Cruz, W. J. A., Schwantes Marimon, B., Marimon-Junior, B. H., Reis, S. M., ... Galbraith, D. (2020). Photosynthetic quantum efficiency in south-eastern Amazonian trees may be already affected by climate change. *Plant Cell and Environment*, (May). <https://doi.org/10.1111/pce.13770>
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., y Quail, P. H. (2003). The Arabidopsis Basic / Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family. *The Plant Cell*, 15(August), 1749–1770. <https://doi.org/10.1105/tpc.013839.et>
- Tominaga, J., Takahashi, S., Sakamoto, A., y Shimada, H. (2020). Arabidopsis BSD2 reveals a novel redox regulation of Rubisco physiology in vivo. *Plant Signaling and Behavior*, 15(4). <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1740873>
- Torrejón, D., Martín, G., Jesús, J. De, Loayza, G., Diferentes, P. D. E., La, H. D. E., y Ucayali, R. (2010). CONTENIDO DE ALCALOIDES EN CORTEZA DE Uncaria tomentosa (Wild) DC PROCEDENTE DE DIFERENTES HÁBITATS DE LA REGIÓN UCAYALI - PERÚ ALKALOIDS CONTENT IN BARK OF Uncaria tomentosa (Wild) DC FROM DIFFERENT HABITATS IN THE REGION UCAYALI - PERÚ. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*.
- Tsai, C. J., Xu, P., Xue, L. J., Hu, H., Nyamdari, B., Naran, R., ... Harding, S. A. (2020). Compensatory guaiacyl lignin biosynthesis at the expense of syringyl lignin in 4CL1-knockout poplar. *Plant Physiology*, 183(5), 123–136.

- <https://doi.org/10.1104/pp.19.01550>
- Tuskan, G. A., DiFazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., ... Rokhsar, D. (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. y Gray). *Science*, *313*(5793), 1596–1604. <https://doi.org/10.1126/science.1128691>
- Tuskan, Gerald A., Groover, A. T., Schmutz, J., DiFazio, S. P., Myburg, A., Grattapaglia, D., ... Michener, J. K. (2018). Hardwood tree genomics: Unlocking woody plant biology. *Frontiers in Plant Science*, *871*(December), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01799>
- Ugarte-Guerra, L. J., y Domínguez-Torrejón, G. (2010). Índice de sitio (IS) de *Calycophyllum spruceanum* Benth. en relación con la altura dominante del rodal en ensayos de plantación en la cuenca del Aguaytía, Ucayali, Perú. *Ecología Aplicada*, *9*(1–2), 101. <https://doi.org/10.21704/rea.v9i1-2.400>
- Vandegheuchte, M. W., Bloemen, J., Vergeynst, L. L., y Steppe, K. (2015). Woody tissue photosynthesis in trees: Salve on the wounds of drought? *New Phytologist*, *208*(4), 998–1002. <https://doi.org/10.1111/nph.13599>
- Vanholme, R., De Meester, B., Ralph, J., y Boerjan, W. (2019). Lignin biosynthesis and its integration into metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, *56*, 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.018>
- Vlk, D., y Řepková, J. (2017). Application of next-generation sequencing in plant breeding. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, *53*(3), 89–96. <https://doi.org/10.17221/192/2016-CJGPB>
- Wang, J. P., Matthews, M. L., Williams, C. M., Shi, R., Yang, C., Tunlaya-Anukit, S., ... Chiang, V. L. (2018). Improving wood properties for wood utilization through multi-omics integration in lignin biosynthesis. *Nature Communications*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03863-z>
- Wang, R. R., Ma, Y., Du, S., Li, W. Y., Sun, Y. Z., Zhou, H., y Wang, R. L. (2019). Exploring the reason for increased activity of SHP2 caused by D61Y mutation through molecular dynamics. *Computational Biology and Chemistry*, *78*, 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.10.013>
- Wang, S., Li, E., Porth, I., Chen, J. G., Mansfield, S. D., y Douglas, C. J. (2014). Regulation of secondary cell wall biosynthesis by poplar R2R3 MYB transcription factor PtrMYB152 in *Arabidopsis*. *Scientific Reports*, *4*, 3–9. <https://doi.org/10.1038/srep05054>
- Wang, X., Tang, Q., Zhao, X., Jia, C., Yang, X., He, G., ... Zhou, G. (2016). Functional conservation and divergence of *Miscanthus lutarioriparius* GT43 gene family in xylan biosynthesis. *BMC Plant Biology*, *16*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0793-5>
- Wang, Z., Gerstein, M., y Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, *10*(1), 57–63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484.RNA-Seq>
- Watanabe, H., Enomoto, T., y Tanaka, S. (2007). Ab initio study of molecular interactions

- in higher plant and *Galdieria partita* Rubiscos with the fragment molecular orbital method. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361(2), 367–372. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.004>
- Watanabe, T., y Koshijima, T. (1988). Evidence for an ester linkage between lignin and glucuronic acid in lignin-carbohydrate complexes by DDQ-oxidation. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52(11), 2953–2955. <https://doi.org/10.1080/00021369.1988.10869116>
- Webb, B., y Sali, A. (2016). Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. *Curr Protoc Bioinformatics*, 54, 1–37. <https://doi.org/10.1002/cpbi.3>.
- Weber, J. C., y Montes, C. S. (2005). Variation and correlations among stem growth and wood traits of *Calycophyllum spruceanum* Benth. from the Peruvian Amazon. *Silvae Genetica*, 54(1), 31–41. <https://doi.org/10.1515/sg-2005-0005>
- Weber, John C., Montes, C. S., Ugarte, J., y Simons, T. (2009). Phenotypic selection of *calycophyllum spruceanum* on farms in the peruvian amazon: evaluating a low-intensity selection strategy. *Silvae Genetica*, 58(4), 172–179. <https://doi.org/10.1515/sg-2009-0023>
- Wei, H., Gou, J., Yordanov, Y., Zhang, H., Thakur, R., Jones, W., y Burton, A. (2013). Global transcriptomic profiling of aspen trees under elevated [CO₂] to identify potential molecular mechanisms responsible for enhanced radial growth. *Journal of Plant Research*, 126(2), 305–320. <https://doi.org/10.1007/s10265-012-0524-4>
- Whitney, S. M., Houtz, R. L., y Alonso, H. (2011). Advancing our understanding and capacity to engineer nature’s CO₂-sequestering enzyme, Rubisco. *Plant Physiology*, 155(1), 27–35. <https://doi.org/10.1104/pp.110.164814>
- Wickham, H., y Chang, W. (2016). *Package ‘ggplot2’: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics*.
- Williams, C. J., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Prisant, M. G., Videau, L. L., Deis, L. N., ... Richardson, D. C. (2018). MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Science*, 27(1), 293–315. <https://doi.org/10.1002/pro.3330>
- Wong, C. Y. S., D’Odorico, P., Bhatena, Y., Arain, M. A., y Ensminger, I. (2019). Carotenoid based vegetation indices for accurate monitoring of the phenology of photosynthesis at the leaf-scale in deciduous and evergreen trees. *Remote Sensing of Environment*, 233(August), 111407. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2019.111407>
- Wu, H., Xu, H., Li, H., Wei, D., Lin, J., y Li, X. (2016). Seasonal development of cambial activity in relation to xylem formation in Chinese fir. *Journal of Plant Physiology*, 195, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.12.013>
- Xie, C., y Ding, Z. (2022). NAC1 Maintains Root Meristem Activity by Repressing the Transcription of E2Fa in Arabidopsis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms232012258>
- Xiong, G., Cheng, K., y Pauly, M. (2013). Xylan O-acetylation impacts xylem development and enzymatic recalcitrance as indicated by the arabidopsis mutant

- tbl29. *Molecular Plant*, 6(4), 1373–1375. <https://doi.org/10.1093/mp/sst014>
- Yadav, N. K., Shukla, P., Omer, A., Pareek, S., y Singh, R. K. (2014). Next generation sequencing: Potential and application in drug discovery. *The Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/802437>
- Yang, S. H., y Loopstra, C. A. (2005). Seasonal variation in gene expression for loblolly pines (*Pinus taeda*) from different geographical regions. *Tree Physiology*, 25(8), 1063–1073. <https://doi.org/10.1093/treephys/25.8.1063>
- Yang, Z. (1996). Maximum-likelihood models for combined analyses of multiple sequence data. *Journal of Molecular Evolution*, 42(5), 587–596. <https://doi.org/10.1007/BF02352289>
- Ye, Y., Liu, B., Zhao, M., Wu, K., Cheng, W., Chen, X., ... Wu, Y. (2015). CEF1/OsMYB103L is involved in GA-mediated regulation of secondary wall biosynthesis in rice. *Plant Molecular Biology*, 89(4–5), 385–401. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0376-0>
- Yoav Benjamini, y Yosef Hochberg. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 57(1), 289–300.
- Yousfi, N., Sihem, N., Ramzi, A., y Abdelly, C. (2016). Growth, photosynthesis and water relations as affected by different drought regimes and subsequent recovery in *Medicago laciniata* (L.) populations. *Journal of Plant Biology*, 59(1), 33–43. <https://doi.org/10.1007/s12374-016-0422-8>
- Yu-Feng, H. (2007). *Study of Mining Protein Structural Properties and its Application* (Vol. 3). National Taiwan University.
- Yu, F., Wang, S., Zhang, W., Wang, H., Yu, L., Fei, Z., y Li, J. (2020). An R2R3-type myeloblastosis transcription factor MYB103 is involved in phosphorus remobilization. *Food Production, Processing and Nutrition*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/s43014-020-00038-6>
- Yu, H., y Dalby, P. A. (2020). A beginner’s guide to molecular dynamics simulations and the identification of cross-correlation networks for enzyme engineering. *Methods in Enzymology*, 643(May), 15–49. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.04.020>
- Yu, Z. C., Lin, W., Zheng, X. T., Chow, W. S., Luo, Y. N., Cai, M. L., y Peng, C. L. (2021). The relationship between anthocyanin accumulation and photoprotection in young leaves of two dominant tree species in subtropical forests in different seasons. *Photosynthesis Research*, 149(1–2), 41–55. <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00781-4>
- Zaret, M. I. and K. (2014). Pioneer transcription factors in cell reprogramming. *Genes and Development*, (May), 1–11. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1084>
- Zhang, G., Zhang, Y., Xu, J., Niu, X., Qi, J., Tao, A., ... Su, J. (2014). The CCoAOMT1 gene from jute (*Corchorus capsularis* L.) is involved in lignin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 546(2), 398–402. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.05.011>

- Zhang, W., Yang, G., Mu, D., Li, H., Zang, D., Xu, H., ... Wang, Y. (2016). An ethylene-responsive factor BpERF11 negatively modulates salt and osmotic tolerance in betula platyphylla. *Scientific Reports*, 6(March), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep23085>
- Zhang, X., Wu, S., Liu, S., y Takano, T. (2021). The Arabidopsis sucrose non-fermenting-1-related protein kinase AtSnRK2.4 interacts with a transcription factor, AtMYB21, that is involved in salt tolerance. *Plant Science*, 303, 110685. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110685>
- Zhao, K., y Bartley, L. E. (2014). Comparative genomic analysis of the R2R3 MYB secondary cell wall regulators of Arabidopsis, poplar, rice, maize, and switchgrass. *BMC Plant Biology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-135>
- Zhao, S., Ye, Z., y Stanton, R. (2020). Misuse of RPKM or TPM normalization when comparing across samples and sequencing protocols. *Rna*, 26(8), 903–909. <https://doi.org/10.1261/RNA.074922.120>
- Zhao, Y., Li, M. C., Konaté, M. M., Chen, L., Das, B., Karlovich, C., ... McShane, L. M. (2021). TPM, FPKM, or Normalized Counts? A Comparative Study of Quantification Measures for the Analysis of RNA-seq Data from the NCI Patient-Derived Models Repository. *Journal of Translational Medicine*, 19(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-02936-w>
- Zheng, M., Liu, X., Lin, J., Liu, X., Wang, Z., Xin, M., ... Hu, Z. (2019). Histone acetyltransferase GCN5 contributes to cell wall integrity and salt stress tolerance by altering the expression of cellulose synthesis genes. *Plant Journal*, 97(3), 587–602. <https://doi.org/10.1111/tpj.14144>
- Zhong, R., Lee, C., Zhou, J., McCarthy, R. L., y Ye, Z. H. (2008). A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell*, 20(10), 2763–2782. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.061325>
- Zhong, R., y Ye, Z. H. (2012). MYB46 and MYB83 bind to the SMRE sites and directly activate a suite of transcription factors and secondary wall biosynthetic genes. *Plant and Cell Physiology*, 53(2), 368–380. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr185>
- Ziaco, E., Truettner, C., Biondi, F., y Bullock, S. (2018). Moisture-driven xylogenesis in Pinus ponderosa from a Mojave Desert mountain reveals high phenological plasticity. *Plant Cell and Environment*, 41(4), 823–836. <https://doi.org/10.1111/pce.13152>

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Comparaciones de los incrementos de diámetro y altura de plantas de *C. spruceanum* y *G. crinita*, evaluados durante un año

Especie	Variable	Mes	Est.	Std. Error	t value	Pr(> z)	Tukey
<i>Calycophyllum spruceanum</i>	Incremento de altura (cm)	S-O	3.06	0.185	18.507	< 2E-16	*** g
		O-N	4.07	0.234	3.412	0.000644	*** f
		N-D	9.83	0.566	13.978	< 2E-16	*** d
		D-J	9.42	0.542	13.46	< 2E-16	*** d
		J-F	16.61	0.956	20.253	< 2E-16	*** c
		F-M	30.91	1.78	27.695	< 2E-16	*** a
		M-A	23.39	1.347	24.356	< 2E-16	*** b
		A-M	17.94	1.033	21.178	< 2E-16	*** c
		M-J	8.11	0.716	9.112	< 2E-16	*** de
		J-J	5.31	0.545	4.627	3.72E-06	*** ef
	J-A	4.05	0.415	2.344	0.019093	* fg	
	Incremento de diámetro (mm)	S-O	0.727	0.0499	-4.641	3.48E-06	*** d
		O-N	0.739	0.0485	0.189	0.85044	d
		N-D	1.398	0.0918	7.414	1.23E-13	*** c
		D-J	2.436	0.1595	13.763	< 2E-16	*** b
		J-F	3.446	0.2255	17.703	< 2E-16	*** a
		F-M	3.201	0.2096	16.844	< 2E-16	*** ab
		M-A	1.514	0.0995	8.323	< 2E-16	*** c
		A-M	0.946	0.0622	2.986	0.00282	** d
		M-J	0.473	0.0333	-4.684	2.81E-06	*** e
J-J		0.468	0.0335	-4.756	1.97E-06	*** e	
J-A	0.385	0.0436	-4.997	5.83E-07	*** e		

Guazuma crinita

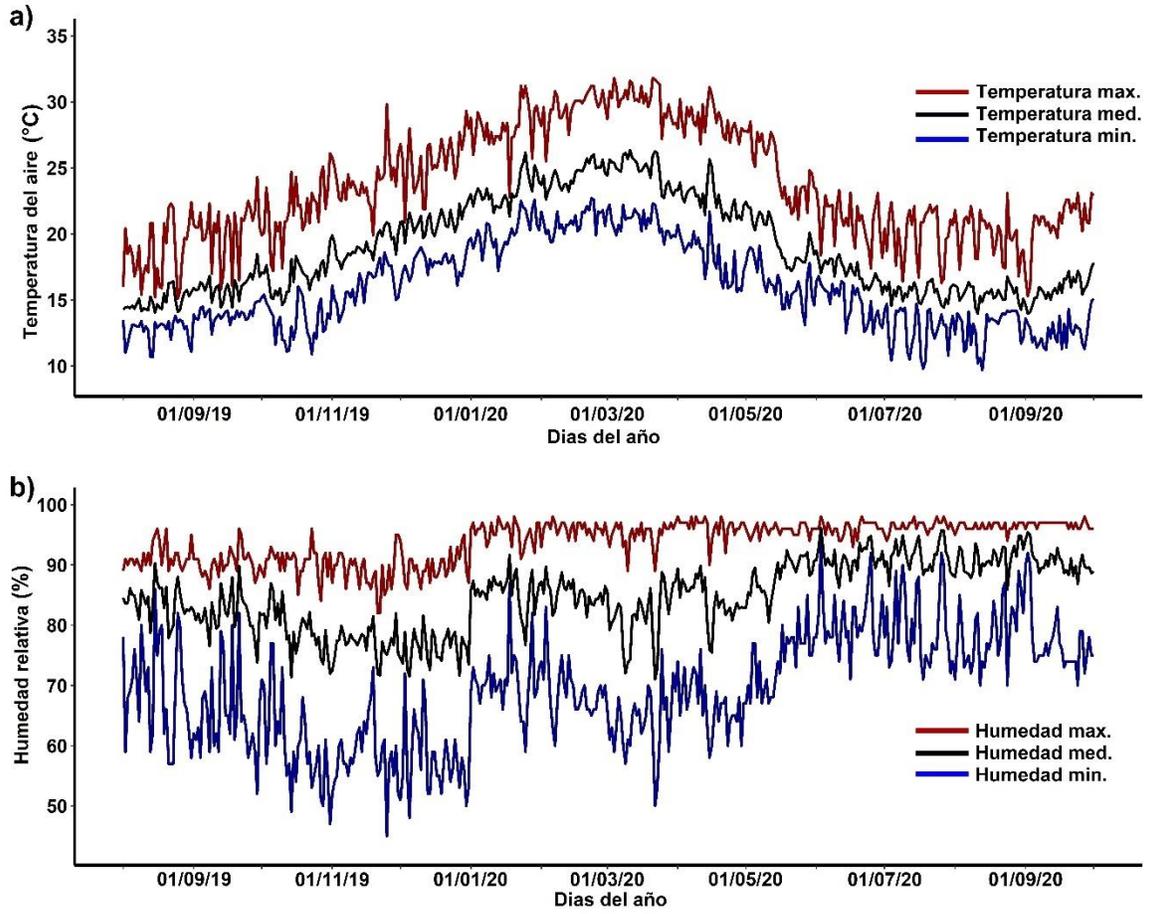
Incremento de Altura (cm)	S-O	7.13	0.301	46.535	< 2E-16	***	f
	O-N	18.38	0.776	15.861	< 2E-16	***	d
	N-D	51.21	2.162	33.028	< 2E-16	***	b
	D-J	51.11	2.158	32.996	< 2E-16	***	b
	J-F	66.94	2.854	37.324	< 2E-16	***	a
	F-M	65.09	2.748	37.045	< 2E-16	***	a
	M-A	39.45	1.665	28.656	< 2E-16	***	c
	A-M	21.39	0.903	18.4	< 2E-16	***	d
	M-J	11.58	0.754	6.244	4.26E-10	***	e
	J-J	3.84	0.287	-7.207	5.72E-13	***	g
	J-A	2.73	0.192	-11.711	< 2E-16	***	h
Incremento de diámetro (mm)	S-O	1.105	0.0648	1.704	0.088461	.	e
	O-N	1.534	0.0899	3.957	7.59E-05	***	d
	N-D	1.67	0.0979	4.982	6.28E-07	***	d
	D-J	2.587	0.1516	10.263	< 2E-16	***	bc
	J-F	3.632	0.2129	14.355	< 2E-16	***	a
	F-M	3.331	0.1972	13.246	< 2E-16	***	ab
	M-A	2.199	0.1289	8.3	< 2E-16	***	c
	A-M	1.465	0.0858	3.399	0.000676	***	d
	M-J	0.957	0.0561	-1.734	0.082987	.	ef
	J-J	0.791	0.0464	-4.026	5.68E-05	***	fg
	J-A	0.653	0.0638	-4.617	3.90E-06	***	g

Anexo 2. Comparaciones de los incrementos de longitud y ancho de las hojas de las plantas de *C. spruceanum* y *G. crinita*

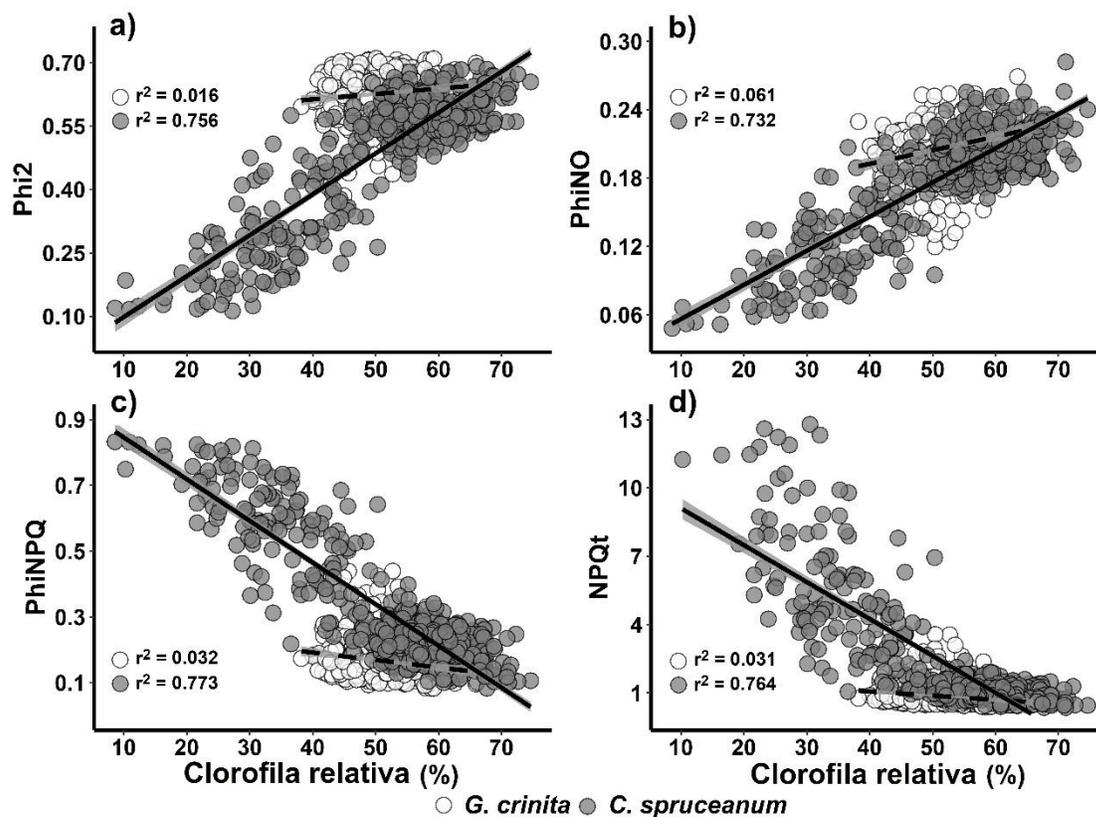
Especies	VARIABLES	Meses	Est.	Std. Error	t value	Pr(> z)	Tukey
<i>Calycophyllum spruceanum</i>	Ancho de hoja (cm)	Set	6.78	0.198	34.23	2.00E-16	*** g
		Oct	5.2	0.192	-5.71	1.91E-08	*** h
		Nov	6.93	0.189	0.543	0.588	g
		Dec	10.62	0.189	14.053	<2e-16	*** e
		Jan	10.88	0.189	15.001	<2e-16	*** de
		Feb	10.93	0.189	15.18	<2e-16	*** de
		Mar	11.14	0.19	15.894	<2e-16	*** cde
		Apr	11.99	0.19	18.985	<2e-16	*** bc
		May	13.59	0.189	24.922	<2e-16	*** a
		Jun	12.67	0.336	15.105	<2e-16	*** ab
	Jul	11.95	0.336	13.266	<2e-16	*** bd	
	Ago	9.19	0.336	6.194	<2e-16	*** f	
	Longitud de hoja (cm)	Set	15.9	0.44	36.005	<2e-16	*** e
		Oct	13.1	0.428	-4.551	6.66E-06	*** f
		Nov	17	0.42	1.881	0.0605	e
		Dec	23.5	0.42	12.621	<2e-16	*** d
		Jan	25.5	0.42	15.86	<2e-16	*** c
		Feb	26.5	0.42	17.426	<2e-16	*** bc
		Mar	25.7	0.424	16.148	<2e-16	*** c
		Apr	26.6	0.424	17.593	<2e-16	*** bc
May		28.9	0.42	21.48	<2e-16	*** a	
Jun		28.6	0.748	14.667	<2e-16	*** ab	
Jul	27.9	0.748	13.82	<2e-16	*** ac		

		<i>Guazuma crinita</i>					
		Mean	SE	DF	P	Signif.	
Ancho de hoja (cm)	Ago	22.2	0.748	7.347	7.99E-13	***	d
	Set	8.29	0.138	127.199	<2e-16	***	g
	Oct	10.44	0.174	9.798	<2e-16	***	f
	Nov	13.72	0.228	21.418	<2e-16	***	e
	Dec	18.73	0.311	34.661	<2e-16	***	c
	Jan	19.94	0.332	37.328	<2e-16	***	c
	Feb	22.87	0.38	43.157	<2e-16	***	a
	Mar	22.16	0.369	41.816	<2e-16	***	ab
	Apr	22.33	0.371	42.137	<2e-16	***	ab
	May	23.81	0.396	44.87	<2e-16	***	a
	Jun	20.18	0.559	27.532	<2e-16	***	bc
	Jul	18.38	0.509	24.632	<2e-16	***	c
Ago	15.42	0.427	19.196	<2e-16	***	d	
Longitud de hoja (cm)	Set	11.7	0.294	39.93	<2e-16	***	g
	Oct	11.5	0.294	-0.563	0.573		g
	Nov	14.9	0.294	7.643	1.12E-13	***	f
	Dec	21.5	0.294	23.626	<2e-16	***	d
	Jan	24	0.294	29.607	<2e-17	***	bc
	Feb	24.2	0.294	29.973	<2e-18	***	bc
	Mar	23.8	0.294	28.991	<2e-19	***	bc
	Apr	24.6	0.294	30.888	<2e-20	***	b
	May	26.4	0.294	35.271	<2e-21	***	a
	Jun	22.6	0.489	18.963	<2e-22	***	cd
	Jul	21.1	0.489	16.452	<2e-23	***	de
	Ago	19	0.489	12.724	<2e-24	***	e

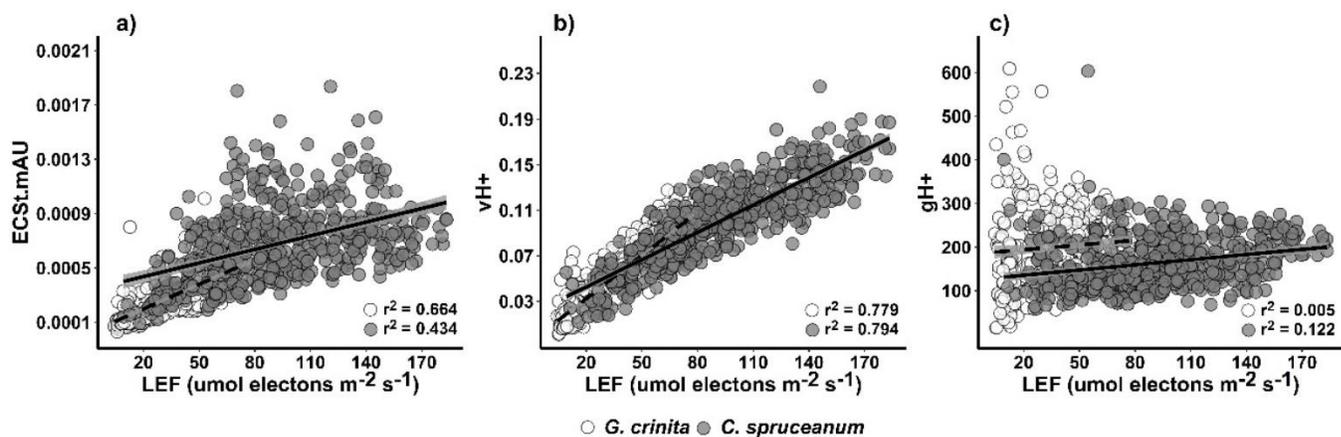
Anexo 3. Fluctuación de la temperatura y humedad del aire



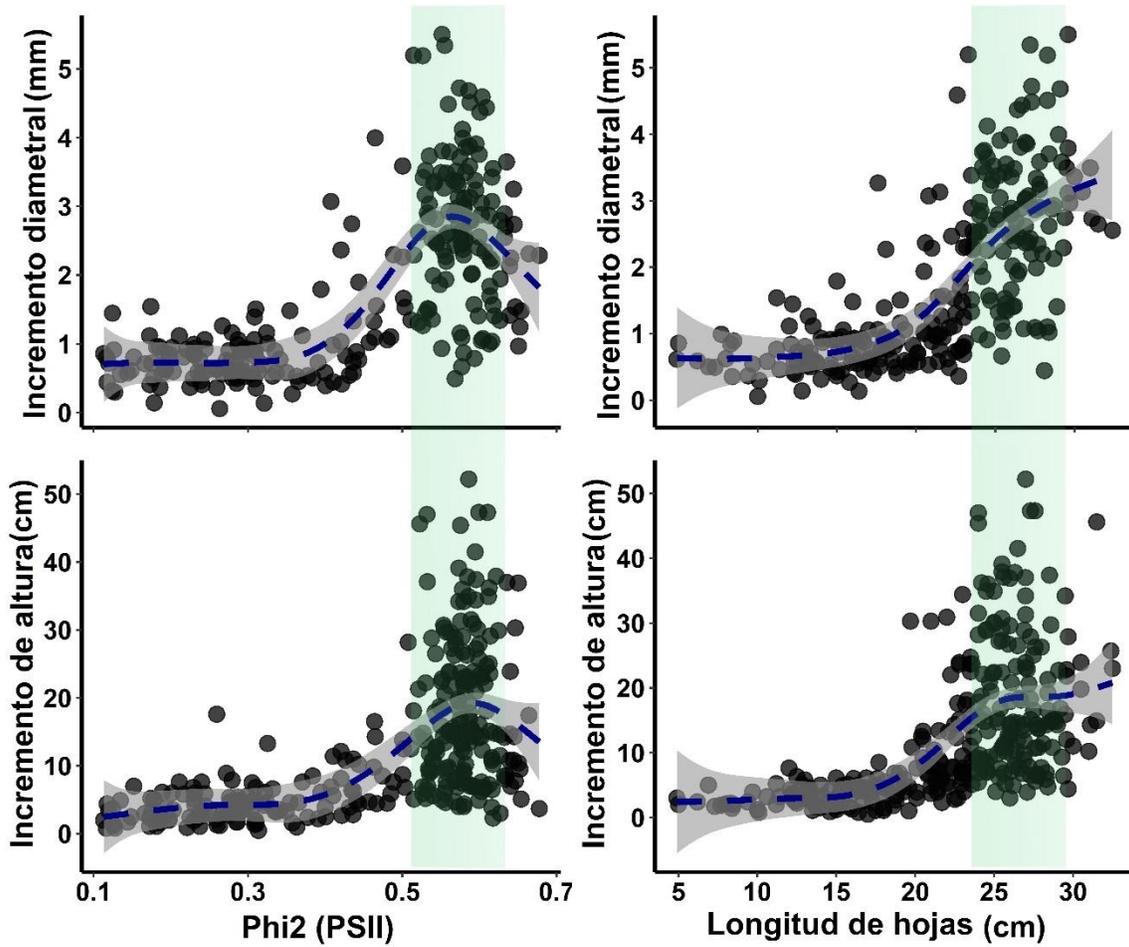
Anexo 4. Correlación entre el porcentaje de la clorofila relativa de *G. crinita* y *C. spruceanum* y los parámetros Phi2, PhiNO, PhiNPQ y NPQt



Anexo 5. Correlación entre el flujo lineal de electrones (LEF) y ECSt.mAU, vH+ y gH+



Anexo 6. Correlación entre el rendimiento cuántico (Phi2), longitud de las hojas, con el incremento diametral y de altura de las plantas de *G. crinita* y *C. spruceanum*



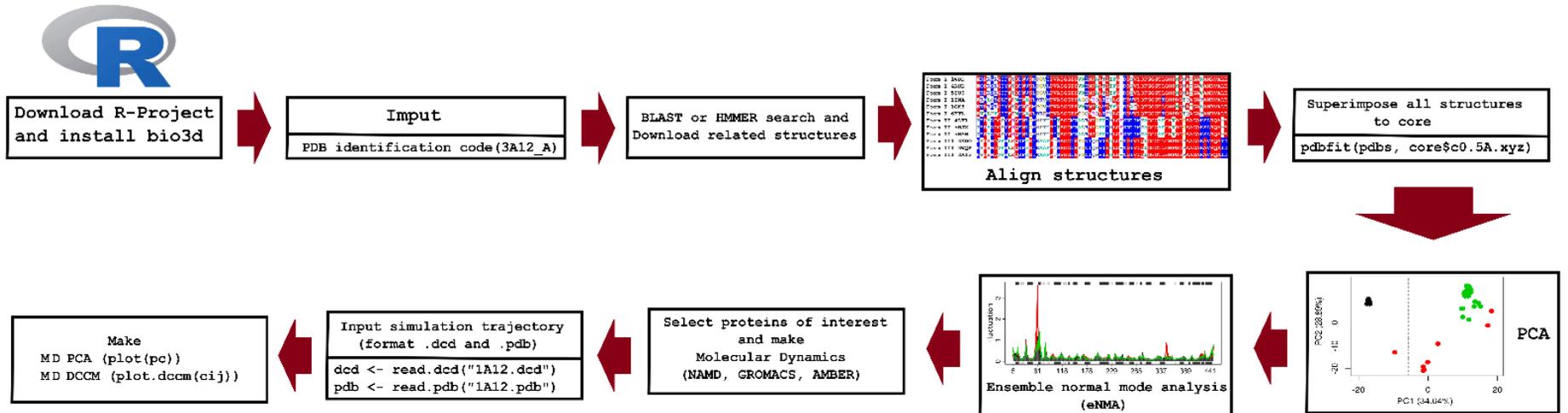
Anexo 7. Estructuras de isoformas I, II y III de RbcL

Formas RuBisCO	Especies	Linage	Código PDB	Org.	Res.	N. Residuos	% de estructura resuelta
IB	<i>Oryza sativa</i>	Plantas superiores	1wdd	Wild-type	1.35 Å	477	97
IB	<i>Triticum aestivum</i>	Plantas superiores	5wsk	Wild-type	1.78 Å	477	93
IB	<i>Pisum sativum</i>	Plantas superiores	4hhh	Wild-type	2.20 Å	475	96
IB	<i>Pisum sativum</i>	Plantas superiores	4mkv	Wild-type	2.15 Å	475	96
IB	<i>Spinacia oleracea</i>	Plantas superiores	1ir1	Wild-type	2.80 Å	475	97
IB	<i>Nicotiana tabacum</i>	Plantas superiores	4rub	Wild-type	2.70 Å	477	97
IB	<i>Nicotiana tabacum</i>	Plantas superiores	1rlc	Wild-type	2.70 Å	477	92
IB	<i>Nicotiana tabacum</i>	Plantas superiores	1rld	Wild-type	2.50 Å	477	92
IB	<i>Nicotiana tabacum</i>	Plantas superiores	1ej7	Wild-type	2.45 Å	477	95
IB	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Plantas superiores	5iu0	Wild-type	1.50 Å	479	96
IB	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Algas verdes	1gk8	Wild-type	1.40 Å	475	98
IB	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Algas verdes	7jfo	Wild-type	2.13 Å	475	93
IB	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Algas verdes	2v6a	Mutante	1.50 Å	475	98
IB	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Algas verdes	1uw9	Mutante	2.05 Å	475	97
IB	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Algas verdes	2v68	Mutante	2.30 Å	475	98
IB	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Algas verdes	2vdh	Mutante	2.30 Å	475	97
IB	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Algas verdes	2vdi	Mutante	2.65 Å	475	97
IB	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Algas verdes	2v69	Mutante	2.80 Å	475	96
IB	<i>Synechococcus elongatus</i>	Cianobacterias	6smh	Wild-type	4.30 Å	472	94
IB	<i>Nostoc sp</i>	Cianobacterias	6kkm	Wild-type	3.00 Å	361	95

IB	<i>Thermosynechococcus elongatus BP-1</i>	Cianobacterias	3zxw	Wild-type	2.10 Å	475	97
IB	<i>Synechococcus elongatus PCC 6301</i>	Cianobacterias	1rsc	Wild-type	2.30 Å	472	98
IB	<i>Synechococcus elongatus PCC 6301</i>	Cianobacterias	1rbl	Wild-type	2.20 Å	472	98
IC/D	<i>Skeletonema marinoi</i>	Diatomeas	6ftl	Wild-type	2.60 Å	484	99
IC/D	<i>Chaetoceros socialis</i>	Diatomeas	5oya	Wild-type	1.80 Å	490	95
IC/D	<i>Thalassiosira antarctica</i>	Diatomeas	5mz2	Wild-type	1.90 Å	490	98
IC/D	<i>Galdieria partita</i>	Alga verde azul	1bwv	Mutante	2.40 Å	493	95
IC/D	<i>Galdieria partita</i>	Alga verde azul	1iwa	Wild-type	2.60 Å	493	95
IA	<i>Cereibacter sphaeroides</i>	Proteobacterias	5nv3	Wild-type	3.39 Å	486	96
IA	<i>Halothiobacillus neapolitanus</i>	Proteobacterias	1svd	Wild-type	1.80 Å	473	94
IA	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Proteobacterias	1bxn	Wild-type	2.70 Å	486	92
IA	<i>Promineofilum breve</i>	Bacterias	6ura	Wild-type	2.17 Å	463	95
<hr/>							
II	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Proteobacterias	4lf1	Wild-type	2.38 Å	461	99
II	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Proteobacterias	5han	Mutante	2.04 Å	461	99
II	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Proteobacterias	5hjx	Mutante	1.80 Å	461	99
II	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Proteobacterias	5koz	Mutante	2.30 Å	461	98
II	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Proteobacterias	5hql	Mutante	2.53 Å	461	99
II	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Proteobacterias	5hjy	Mutante	2.30 Å	461	98
II	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Proteobacterias	5hat	Mutante	2.00 Å	461	98
II	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Proteobacterias	5hao	Mutante	2.18 Å	461	98

II	<i>Rhodopseudomonas palustris, R. rubrum</i>	Proteobacterias	5hqm	Wild-type	1.95 Å	467	98
II	<i>Methanococcoides burtonii</i>	Archaea	5mac	Wild-type	2.60 Å	474	99
III	<i>Thermococcus kodakarensis</i>	Archaea	3a12	Wild-type	2.30 Å	444	98
III	<i>Thermococcus kodakarensis</i>	Archaea	3kdo	Mutante	2.36 Å	444	98
III	<i>Thermococcus kodakarensis</i>	Archaea	3wqp	Mutante	2.25 Å	444	98
III	<i>Thermococcus kodakarensis</i>	Archaea	3a13	Mutante	2.34 Å	444	98

Anexo 8. Flujo de trabajo de análisis de RuBisCO utilizando el paquete Bio3d



Anexo 9. Códigos de R-Project para clasificar todas las estructuras de RbcL

```
Codigo R-Project
library(bio3d)
aa <- get.seq("1RLC_L")
ids <- get.seq(c("1RLC_L", "4HHH_A", "1AA1_B", "4MKV_A", "5OYA_C"))
aa<-
get.seq(c("1RLC_L", "3RUB_L", "1RLD_A", "5IU0_A", "1WDD_A", "4HHH_A", "1AUS_L", "5WSK_A",
"1AA1_B", "4MKV_A", "1GK8_A", "2V69_A", "2V63_A", "1UWA_A", "2V67_A", "2VDI_A", "2VDH_A",
"2V6A_A", "2V68_A", "1UW9_A", "2YBV_A", "3ZXW_A", "1RSC_A", "1RBL_A", "1SVD_A", "1BXN_A",
"1BWV_A", "1IWA_A", "4F0H_A", "5OYA_C", "5N9Z_A", "5MZ2_A", "5OYA_A", "6FTL_A", "1BXN_A",
"5NV3_A", "3A12_A"))
blast <- blast.pdb(aa)
hits <- plot(blast, cutoff=100)
raw.files <- get.pdb(hits$ pdb.id, path = "raw_pdb", gzip=TRUE)
files <- pdbsplit(raw.files, ids = hits$ pdb.id, path = "raw_pdb/split_chain", ncore=4)
pdbs.all <- pdbaln(files, fit=TRUE)
aln <- read.fasta('aln.fa')
pdbs.all <- read.fasta.pdb(aln)
conn <- inspect.connectivity(pdbs.all, cut=9.05) ### 4.05
pdbs <- trim(pdbs.all, row.ind=which(conn))
rd <- filter.rmsd(pdbs$xyz, cutoff=0.1, fit=TRUE)
pdbs <- trim(pdbs, row.ind=rd$ind)
excl <- unlist(lapply(c("2QYG", "2OEK"), grep, pdbs$id))
pdbs <- trim(pdbs, row.ind=which(!(1:length(pdbs$id) %in% excl)))
ids <- unlist(strsplit(basename(pdbs$id), split=".pdb"))
print(pdbs, alignment=FALSE)
anno <- pdb.annotate(ids)
print(unique(anno$source))
core <- core.find(pdbs, ncore = 19)
pdbs$xyz = pdffit(pdbs, core$c0.5A.xyz)
gaps.pos <- gap.inspect(pdbs$xyz)
gaps.res <- gap.inspect(pdbs$ali)
pc.xray <- pca.xyz(pdbs$xyz[,gaps.pos$f.ind])
plot(pc.xray)
pc.xray <- pca(pdbs, core.find=TRUE)
rd <- rmsd(pdbs)
hc.rd <- hclust(dist(rd))
grps.rd <- cutree(hc.rd, k=3)
jpeg("PCA_cluster.jpg", width=8, height=4, units="in", res=800)
par(mfrow=c(1,1))
hclustplot(hc.rd, k=3, labels=anno$source, cex=0.45, fillbox=FALSE)
dev.off()
getwd()
```

```

pymol(pdb, col=core)
view(pdb, col=core)
pc <- pca(pdb)
plot(pc,col = grps.rd)
jpeg("PCA_Rubisco.jpg", width=5, height=5, units="in", res=800)
par(mfrow=c(1,1))
plot(pc.xray$z[,1:2], col = grps.rd, pch=16, cex=1.3, ylab="PC2 (28.89%)", xlab="PC1
(34.64%)")
abline(h=0,col="gray50",lty = 2)
abline(v=0,col="gray50",lty = 2)
dev.off()
library(ggplot2)
library(ggrepel)
## Warning: package 'ggrepel' was built under R version 3.4.2
df <- data.frame(x=pc.xray$z[,1], y=pc.xray$z[,2])
col <- as.factor(grps.rd)
p <- ggplot(df, aes(y, x)) + geom_point(aes(), size=2) +
scale_fill_manual(values=c("gray20","gray20","red"))+
  xlab("PC1") + ylab("PC2") + scale_color_discrete(name="Clusters") +
  geom_text_repel(aes(label=ids), size = 2) +
  theme(text = element_text(size=15),axis.text.x = element_text(vjust=1, colour="black"),
axis.text.y=element_text(colour="black"))+
  theme(plot.title = element_text(hjust = 0.5)) +
  theme_minimal()+
  theme(axis.text=element_text(size=11,face="bold",color="black"),
        axis.title=element_text(size=11,face="bold",color="black"))+
  theme(legend.position="")
p
ggsave(p,width=7, height=7, file="DCA_rubisco.jpg", dpi = 800)

```

Anexo 10. Códigos para realizar dinámica molecular utilizando el software Gromacs

Uso de Gromacs

```
gmx_mpi pdb2gmx -f Proteina.pdb -o Proteina.gro -water spce
gmx_mpi editconf -f Proteina.gro -o Proteina_newbox.gro -c -d 1.0 -bt cubic
gmx_mpi solvate -cp Proteina_newbox.gro -cs spc216.gro -o Proteina_solv.gro -p
topol.top
gmx_mpi grompp -f ions.mdp -c Proteina_solv.gro -p topol.top -o ions.tpr
gmx_mpi genion -s ions.tpr -o Proteina_solv_ions.gro -p topol.top -pname NA -nname
CL -neutral
gmx_mpi grompp -f minim.mdp -c Proteina_solv_ions.gro -p topol.top -o em.tpr
gmx_mpi grompp -f minim.mdp -c Proteina_solv_ions.gro -p topol.top -o em.tpr
gmx_mpi mdrun -v -nb gpu -deffnm em
gmx_mpi grompp -f nvt.mdp -c em.gro -r em.gro -p topol.top -o nvt.tpr
gmx_mpi mdrun -v -nb gpu -deffnm nvt
gmx_mpi grompp -f npt.mdp -c nvt.gro -r nvt.gro -t nvt.cpt -p topol.top -o npt.tpr
gmx_mpi mdrun -v -nb gpu -deffnm npt
gmx_mpi grompp -f md.mdp -c npt.gro -t npt.cpt -p topol.top -o md_0_1.tpr
gmx_mpi mdrun -v -nb gpu -deffnm md_0_1
gmx_mpi trjconv -s md_0_1.tpr -f md_0_1.xtc -o mdnoPBC.xtc -pbc mol -center
gmx_mpi rms -s md_0_1.tpr -f mdnoPBC.xtc -o rmsd.xvg -tu ns
gmx_mpi rmsf -f mdnoPBC.xtc -s md_0_1.tpr -o rmsf_Proteina_alpha.xvg -ox
average.pdb -oq bfactors.pdb -res
gmx_mpi gyrate -f mdnoPBC.xtc -s md_0_1.tpr -p -o Rg1.xvg
gmx_mpi trjconv -f mdnoPBC.xtc -b 10000 -e 50000 -o Dinamica50_2ns.xtc -skip 2
```

Comando para convertir formatos **xtc** obtenido con el software Gromacs a formato **dcd**.

```
catdcd -o Dinamica50_2ns.dcd -xtc Dinamica50_2ns.xtc
```

Anexo 11. Código para graficar las fluctuaciones de RMSD y RMSF

Codigo R-Project

```
install.packages(c("gridGraphics","gridExtra","cowplot","ggplot2"))
library(gridExtra)
library(cowplot)
library(gridGraphics)
library(ggplot2)

datos<-read.csv("RMSD.csv",",",header=TRUE)
attach(datos)
pd <- position_dodge(0)
RMSD<- ggplot(datos,aes(x=Time,y=RMSD,color = Protein)) +
  geom_line(aes(color = Protein), size = 0.8) +scale_fill_Publication ()
+scale_colour_Publication ()+ #geom_line(data=datos,aes(x=Nanosegundos, y=RMSD),
alpha=1.15, size = 1, position = pd)+
#scale_fill_manual(values=c("#00AFBB","gray80","gray80","gray80","gray10","gray10"
,"gray40","gray10"))+theme_classic()+ scale_y_continuous(breaks
=c(0.00,0.10,0.20,0.30,0.40), limits = c(0.0,0.41))+
scale_x_continuous(breaks =c(0,10,20,30,40,50,60,70,80,90,100))+
theme(axis.text.x = element_text(face="bold",color="black", size=16, angle=0),
axis.text.y = element_text(face="bold", color="black",size=16, angle=0))+
guides(linetype = guide_legend("")) +
labs(title = paste("", sep = "\n"), x = "Time (ns)", y = "RMSD (nm)")+
theme(axis.text=element_text(size=17), axis.title=element_text(size=17,face="bold"))+
theme( axis.line = element_line(colour = "black", size = 1, linetype = "solid"))+
theme(legend.position="bottom")
RMSD
```

```
datos<-read.csv("RMSF.csv",",",header=TRUE)
head(datos)
attach(datos)
pd <- position_dodge(0)
RMSF<- ggplot(datos,aes(x=Residue,y=RMSF,color = Protein)) +
geom_line(aes(color = Protein), size = 0.8) +scale_fill_Publication ()
+scale_colour_Publication ()+#geom_line(data=datos,aes(x=Nanosegundos, y=RMSD),
alpha=1.15, size = 1, position = pd)+
#scale_fill_manual(values=c("#00AFBB","gray80","gray80","gray80","gray10","gray10"
,"gray40","gray10"))+
theme_classic()+ scale_y_continuous(breaks =c(0.0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5), limits =
c(0.0,0.55))+
scale_x_continuous(breaks =c(0,50,100,150,200,250,300,350,400,450))+
theme(axis.text.x = element_text(face="bold",color="black", size=16, angle=0),
axis.text.y = element_text(face="bold", color="black",size=16, angle=0))+
```

```

guides(linetype = guide_legend("")) + #geom_hline(yintercept=0.3, linetype="twodash",
color = "purple3", size=0.8)+labs(title = paste("", sep = "\n"), x = "Residue", y = "RMSF
(nm)")+
theme(axis.text=element_text(size=17), axis.title=element_text(size=17,face="bold"))+
theme( axis.line = element_line(colour = "black", size = 1, linetype = "solid"))+
  theme(legend.position="bottom")
RMSF

che<- plot_grid(RMSD, RMSF, labels = c("", ""), align="v", axis="1",rel_widths =
c(1,1,1), nrow = 2,ncol=1)
che
###Guardar la imagen a 800 dpi en formato jpg
ggsave(che, width=10, height=8, file="RMSD_RMSF.jpg", dpi = 800)

```

Anexo 12. Código de R Project para graficar el PCA y DCCM de las dinámicas moleculares

Código R-Project

```

library(bio3d)
dcd <- read.dcd("Dinamica50ns.dcd")
print(dcd)
pdb <- read.pdb("Proteina.pdb")
ca.ind<-atom.select(pdb,elety = 'CA')
xyz<-fit.xyz(fixed = pdb$xyz,mobile = dcd,fixed.ind<= ca.ind<$xyz,mobile.ind<=
ca.ind<$xyz,ncore = 19)
dim(xyz) == dim(dcd)
rd <- rmsd(xyz[1,ca.ind<$xyz], xyz[,ca.ind<$xyz])
head(rd)
par(mfrow=c(1,1))
jpeg("Nombre1.jpg", width=8, height=4.5, units="in", res=800)
#par(mfrow=c(2,4))
plot(rd, typ="l", ylab="RMSD (A)", xlim=c(0,2600),ylim=c(0,4.5),
  cex.lab=1.3,cex.axis=1, lwd=3,xlab="Frame No",font=2,lty=1,col = "darkblue")
dev.off()
points(lowess(rd), typ="l", col="red", lty=2, lwd=2)
par(mfrow=c(1,1))
jpeg("RMSD_Histogram.jpg", width=6, height=4.5, units="in", res=800)
hist(rd, breaks=40, freq=FALSE, main="RMSD Histogram", xlab="RMSD")
lines(density(rd), col="gray1", lwd=3)
dev.off()
summary(rd)
rf <- rmsf(xyz[,ca.ind<$xyz])
write.csv(rf,"RMSF.csv")
jpeg("RMSF.jpg", width=6, height=4.5, units="in", res=800)
plot(rf, ylab="RMSF (nm)", xlim=c(0,460),ylim=c(0,12),

```

```

    cex.lab=1.3,cex.axis=1,lwd=2,xlab="Residue Position",font=2,lty=1,col = "gray1",
    typ="l")
dev.off()
hist(rf, breaks=40, freq=FALSE, main="RMSD Histogram", xlab="RMSD")
lines(density(rf), col="gray1", lwd=3)
summary(rf)
pc <- pca.xyz(xyz[,ca.ind$xyz])
jpeg("PCA_1.jpg", width=7, height=7, units="in", res=800)
plot(pc, col=bwr.colors(nrow(xyz)) )
dev.off()

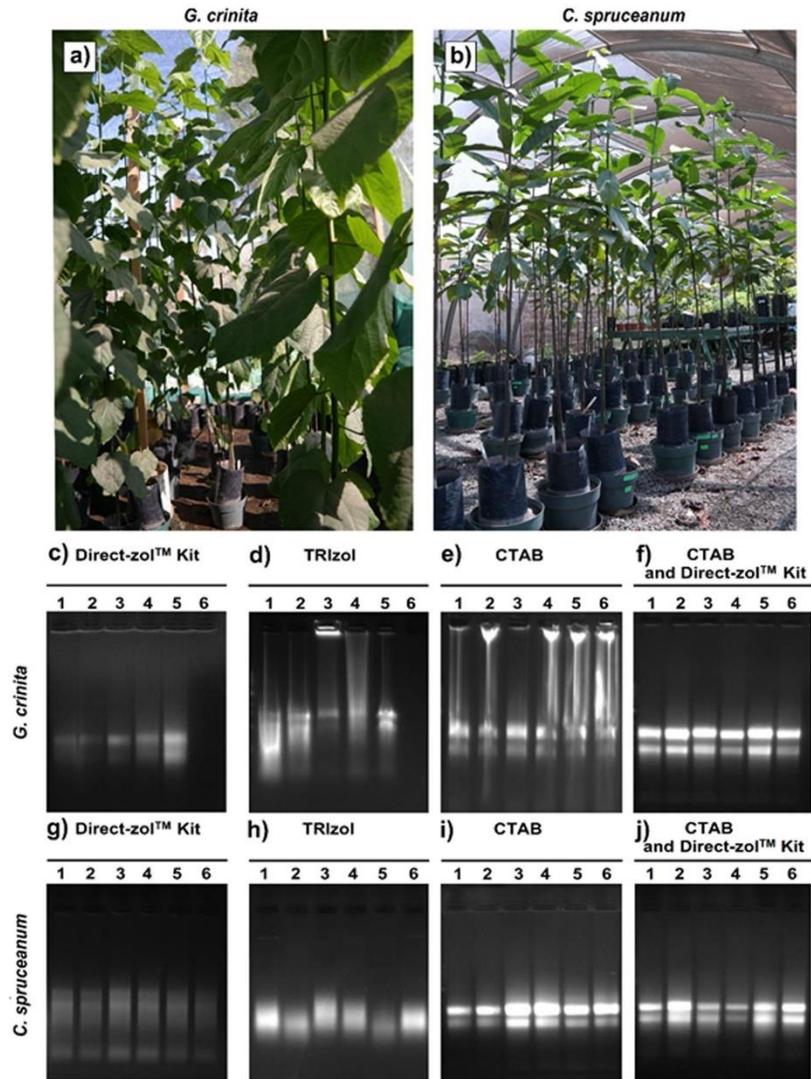
hc <- hclust(dist(pc$z[,1:4]))
grps <- cutree(hc, k=4)
plot(pc, col=grps)
jpeg("PCA1_series.jpg", width=7, height=4, units="in", res=800)
plot.bio3d(pc$au[,1], ylab="PC1 (A)", xlab="Residue Position", typ="l")
points(pc$au[,2], typ="l", col="blue")
dev.off()

p1 <- mktrj.pca(pc, pc=1, b=pc$au[,1], file="pc1.pdb")
p2 <- mktrj.pca(pc, pc=2,b=pc$au[,2], file="pc2.pdb")

write.ncdf(p1, "trj_pc1.nc")
cij<-dccm(xyz[,ca.ind$xyz])
head(pdb)
ch <- ifelse(pdb$atom$chain=="A", 1,2)
jpeg("Residue_cross_correlation_1.jpg", width=7, height=7, units="in", res=800)
plot(cij)
dev.off()
plot.dccm(cij,margin.segments=ch, contour=FALSE, col.regions=bwr.colors(200),
at=seq(-1,1,by=0.01))
pymol.dccm(cij, pdb, type="launch", vertex.label.cex=0.7,step=0.2, omit=0.2, radius =
0.15)
vmd.cna(cij, pdb, launch = TRUE,full = TRUE, vertex.label.cex=0.7)

```

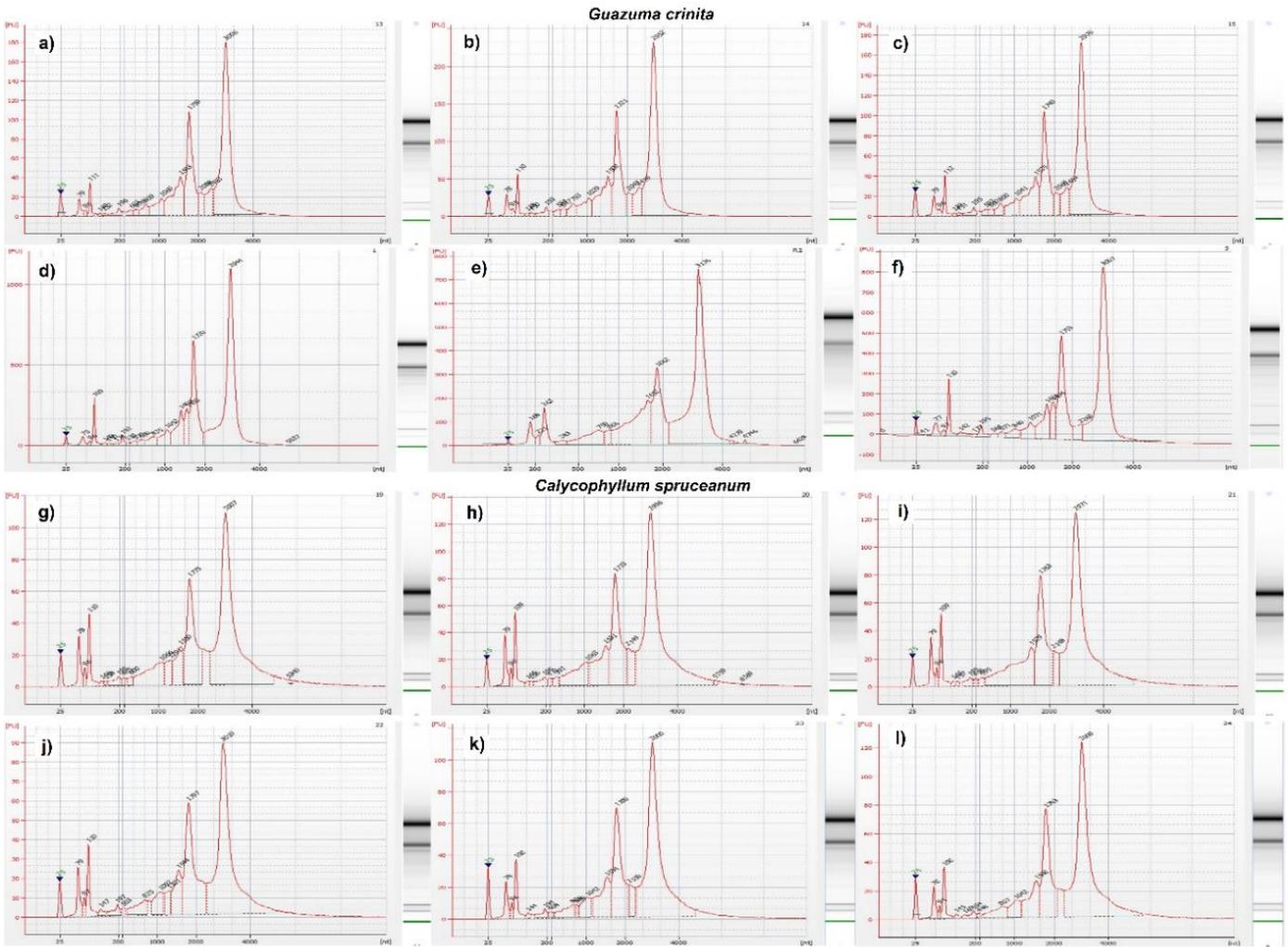
Anexo 13. Calidad del ARN en geles de agarosa de *G. crinita* y *C. spruceanum*



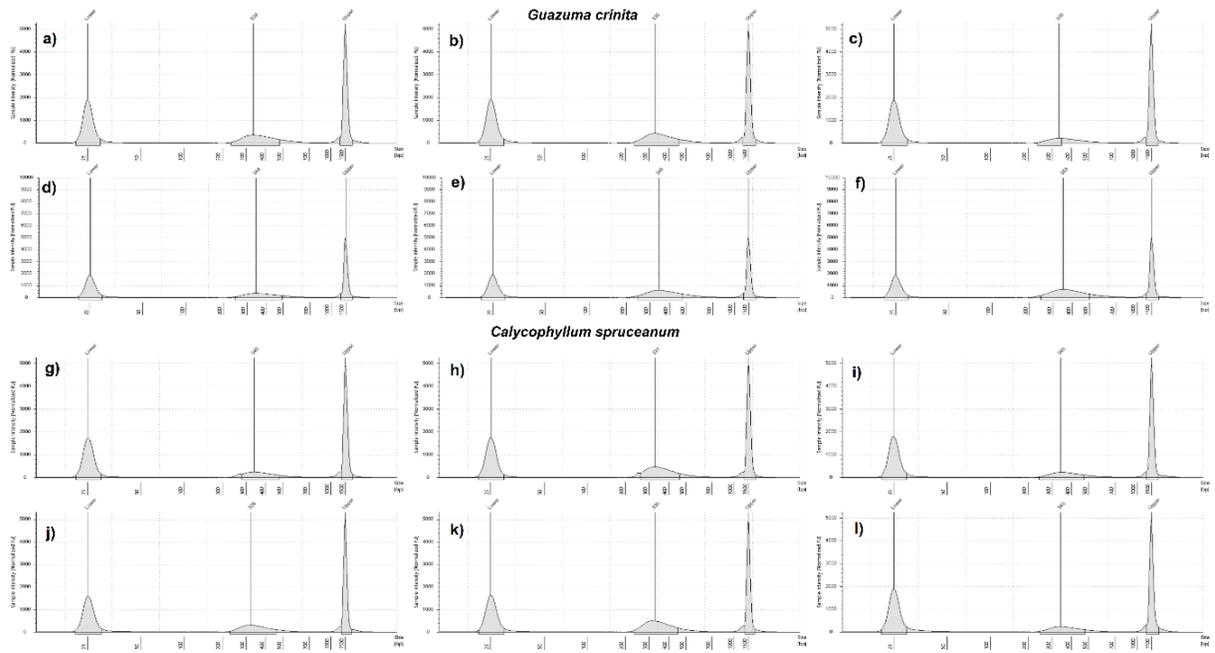
Anexo 14. Resultado del RNAseq de 12 muestras

Especies	Muestra ID	Total, read bases (kbp)	Total, reads	GC (%)	AT (%)	Q20(%)	Q30(%)
<i>G. crinita</i>	BJ1	5,645,955	55,900,552	46.43	53.57	98.54	95.83
	BJ2	5,348,246	52,952,938	46.65	53.35	98.51	95.8
	BJ3	4,189,320	41,478,416	46.47	53.53	98.45	95.69
	BA1	4,072,862	40,325,372	45.4	54.6	98.46	95.36
	BA2	4,048,312	40,082,306	45.3	54.7	98.52	95.48
	BA3	4,050,083	40,099,832	45.11	54.89	98.45	95.35
<i>C. spruceanum</i>	CJ1	5,043,953	49,940,132	45.58	54.42	98.42	95.49
	CJ2	5,542,772	54,878,936	45.23	54.77	98.53	95.76
	CJ3	4,968,155	49,189,656	46.07	53.93	98.39	95.44
	CA1	6,468,740	64,046,940	45.55	54.45	97.89	94.02
	CA2	6,533,295	64,686,092	45.67	54.33	97.96	94.17
	CA3	4,508,499	44,638,612	45.22	54.78	98.19	94.76

Anexo 15. Análisis RIN de *G. crinita* y *C. spruceanum*



Anexo 16. Control de calidad de la biblioteca NGS de *G. crinita* y *C. spruceanum*



Anexo 17. Abundancia relativa de ARN (TPM), de genes asociados a formación de madera de *C. spruceanum*

FTs y Genes asociados a síntesis de Madera	Código		Rebrote (TPM)			Control (TPM)		
	TRINITY	Gen de <i>C. spruceanum</i>	CJ1	CJ2	CJ3	CA1	CA2	CA3
ERF	TRINITY_DN13795_c0_g1_i3	<i>CsERF11</i>	4.03	3.51	3.69	0.00	0.61	0.47
ERF	TRINITY_DN1653_c0_g3_i1	<i>CsERF014</i>	34.67	31.62	29.34	2.22	2.15	3.84
ERF	TRINITY_DN5456_c0_g1_i2	<i>CsRAP2-3</i>	57.85	56.36	63.25	13.90	16.09	10.99
ERF	TRINITY_DN5955_c1_g1_i7	<i>CsERF1A</i>	0.00	0.00	0.00	2.95	6.10	8.49
ERF	TRINITY_DN789_c0_g1_i2	<i>CsERF025</i>	19.12	21.10	23.48	2.37	1.77	1.54
ERF	TRINITY_DN789_c0_g1_i6	<i>CsERF026</i>	7.69	6.91	6.68	0.22	0.59	0.00
ERF	TRINITY_DN9560_c0_g1_i1	<i>CsERF016</i>	5.40	3.70	3.34	0.12	0.00	0.09
ERF	TRINITY_DN9693_c0_g1_i3	<i>CsRAP2-4</i>	0.00	0.06	0.00	4.39	3.69	3.83
ERF	TRINITY_DN9693_c0_g1_i4	<i>CsRAP2-5</i>	39.70	34.24	37.97	163.07	175.65	145.10
MYB	TRINITY_DN107_c0_g2_i2	<i>CsMYB1</i>	9.67	11.63	11.58	70.76	61.92	69.56
MYB	TRINITY_DN107_c0_g2_i3	<i>CsMYB2</i>	1.18	1.19	0.17	4.79	6.00	4.10
MYB	TRINITY_DN1635_c0_g1_i14	<i>CsKUA1</i>	0.27	0.79	0.00	4.32	3.92	6.39
MYB	TRINITY_DN1957_c0_g3_i1	<i>CsMYB77</i>	14.31	16.26	18.90	4.00	4.49	3.60
MYB	TRINITY_DN319_c0_g1_i5	<i>CsPHL7</i>	3.88	1.82	0.15	7.63	9.32	8.39
NAC	TRINITY_DN2085_c0_g1_i7	<i>CsNAC053</i>	4.24	3.87	3.76	0.02	0.97	1.44
bHLH	TRINITY_DN3408_c0_g2_i1	<i>CsbHLH25</i>	0.00	0.57	0.52	4.39	3.08	3.65
bHLH	TRINITY_DN15500_c0_g1_i2	<i>CsbHLH162</i>	1.81	2.07	2.69	13.22	12.34	12.27
bHLH	TRINITY_DN166_c0_g1_i5	<i>CsbHLH96</i>	1.79	1.60	0.40	6.75	6.54	6.69
bHLH	TRINITY_DN1999_c0_g1_i12	<i>CsbHLH68</i>	0.56	1.50	0.00	6.45	8.45	4.64
bHLH	TRINITY_DN1999_c0_g1_i3	<i>CsbHLH1</i>	0.78	0.34	0.20	3.04	2.07	3.81
Celulosa	TRINITY_DN4114_c0_g1_i4.p1	<i>CsXTH23</i>	4.66	6.34	9.25	0.00	0.00	0.00
Celulosa	TRINITY_DN1602_c0_g1_i3.p1	<i>CsXTH16</i>	35.73	35.59	38.05	9.78	9.58	7.92
Celulosa	TRINITY_DN5136_c0_g1_i3.p1	<i>CsGUX1</i>	21.28	11.86	14.54	3.54	4.33	3.56
Celulosa	TRINITY_DN5136_c0_g1_i4.p1	<i>CsGUX2</i>	23.93	23.74	24.87	0.15	0.08	0.00
Celulosa	TRINITY_DN7573_c1_g1_i1.p2	<i>CsXTH17</i>	4.83	5.65	4.33	0.33	0.60	1.25
Celulosa	TRINITY_DN1613_c0_g1_i2.p1	<i>CsGATL1</i>	41.84	43.21	40.54	10.83	9.73	11.33
Celulosa	TRINITY_DN176_c0_g1_i6.p1	<i>CsTDS2</i>	7.64	2.86	6.56	0.88	0.71	0.23
Celulosa	TRINITY_DN7025_c0_g1_i2.p1	<i>CsPGX3</i>	5.36	4.25	4.92	40.65	42.68	46.79
Lignina	TRINITY_DN10661_c2_g1_i1.p1	<i>CsCYP98A3</i>	0.32	0.72	0.48	2.08	2.55	3.07
Lignina	TRINITY_DN2614_c0_g1_i1.p1	<i>CsLAC12</i>	0.43	1.17	1.13	7.18	7.77	7.74
Lignina	TRINITY_DN4843_c0_g1_i3.p1	<i>CsCCOAMT</i>	1.48	1.56	0.59	5.07	5.15	6.56
Lignina	TRINITY_DN7362_c0_g1_i5.p1	<i>CsCAD1</i>	1.31	2.03	2.66	0.23	0.13	0.81
Lignina	TRINITY_DN1237_c0_g1_i4.p1	<i>CsCAD7</i>	0.00	0.00	0.33	10.11	10.41	6.22
Lignina	TRINITY_DN7746_c0_g2_i4.p1	<i>CsBAG3</i>	12.03	8.06	9.46	0.00	0.70	2.19

Anexo 18. Abundancia relativa de ARN (TPM), de genes asociados a formación de madera de *G. crinita*

FTs y Genes asociados a síntesis de Madera	Código		Tocón (TPM)			Control (TPM)		
	TRINITY	Gen de <i>G. crinita</i>	BJ1	BJ2	BJ3	BR1	BR2	BR3
FTs	TRINITY_DN1235_c0_g2_i1	<i>GcMYB103</i>	24.50	23.68	25.94	0.16	0.41	0.35
FTs	TRINITY_DN4358_c1_g3_i1	<i>GcMYB95</i>	6.66	7.03	7.98	0.05	0.11	0.11
FTs	TRINITY_DN11244_c0_g1_i1	<i>GcMYB83</i>	6.19	6.36	5.52	0.31	0.79	0.35
FTs	TRINITY_DN7337_c0_g2_i1	<i>GcMYB26</i>	6.12	7.13	5.80	0.60	0.65	1.11
FTs	TRINITY_DN768_c1_g1_i1	<i>GcMYB21</i>	0.80	0.18	0.17	22.30	23.86	26.01
FTs	TRINITY_DN5250_c0_g2_i1	<i>GcMYB79</i>	8.14	9.14	6.43	116.28	128.65	124.91
FTs	TRINITY_DN5295_c0_g1_i4	<i>GcANAC2</i>	29.87	30.54	34.36	213.17	223.61	229.21
FTs	TRINITY_DN55360_c0_g1_i1	<i>GcANAC022</i>	3.03	2.60	3.55	14.96	14.69	15.49
FTs	TRINITY_DN5295_c0_g1_i4	<i>GcANAC029</i>	14.75	18.93	18.24	144.91	165.92	156.18
FTs	TRINITY_DN55360_c0_g1_i1	<i>GcNAC058</i>	1.01	1.04	1.50	58.94	62.51	63.56
FTs	TRINITY_DN5295_c0_g1_i4	<i>GcANAC072</i>	5.82	6.42	4.68	59.73	71.38	67.66
FTs	TRINITY_DN55360_c0_g1_i1	<i>GcVND2</i>	5.48	5.79	4.52	0.68	1.35	0.96
Celulosa	TRINITY_DN5927_c0_g1_i2	<i>GcPOM1</i>	643.33	681.36	652.61	147.49	165.69	161.51
Celulosa	TRINITY_DN328_c0_g1_i5	<i>GcLPEAT2</i>	44.08	41.73	39.80	294.95	340.68	353.72
Celulosa	TRINITY_DN7229_c0_g2_i3	<i>GcCESA8</i>	188.15	199.16	199.10	8.17	7.79	8.89
Celulosa	TRINITY_DN9118_c0_g1_i2	<i>GcCESA1</i>	210.74	226.36	221.51	12.71	14.93	13.95
Hemicelulosa	TRINITY_DN1235_c0_g2_i1	<i>GcXTH33</i>	15.74	15.94	15.19	5.33	3.39	4.41
Hemicelulosa	TRINITY_DN4358_c1_g3_i1	<i>GcGUT2</i>	70.32	71.03	70.72	5.86	7.71	6.67
Hemicelulosa	TRINITY_DN11244_c0_g1_i1	<i>GcTBL27</i>	17.27	19.60	17.83	3.62	4.28	5.49
Hemicelulosa	TRINITY_DN7337_c0_g2_i1	<i>GcIRX9</i>	48.77	48.30	48.96	2.04	1.94	2.59
Hemicelulosa	TRINITY_DN768_c1_g1_i1	<i>GcGAUT13</i>	32.76	30.66	33.12	3.24	3.64	4.08
Hemicelulosa	TRINITY_DN5250_c0_g2_i1	<i>GcIRX15</i>	179.94	185.74	178.19	7.21	9.08	8.22
Hemicelulosa	TRINITY_DN5295_c0_g1_i4	<i>GcPGSIP3</i>	24.14	26.22	25.22	2.37	3.79	3.69
Hemicelulosa	TRINITY_DN55360_c0_g1_i1	<i>GcIRX14</i>	85.85	96.93	93.18	11.03	12.57	12.67
Lignina	TRINITY_DN9160_c0_g1_i2	<i>GcLAC1</i>	18.50	17.57	17.29	2.06	3.14	2.86
Lignina	TRINITY_DN10584_c0_g1_i1	<i>Gc4CL1</i>	113.00	120.06	108.86	25.04	29.89	27.62
Lignina	TRINITY_DN8941_c0_g1_i2	<i>GcLAC2</i>	9.76	11.74	10.09	2.14	2.13	2.29
Lignina	TRINITY_DN4686_c0_g1_i2	<i>GcC4H</i>	639.99	703.63	678.49	126.84	148.55	150.93
Lignina	TRINITY_DN1941_c0_g3_i1	<i>GcLAC4</i>	43.78	50.69	44.43	4.95	6.67	6.13
Lignina	TRINITY_DN6621_c0_g2_i2	<i>GcCYP98A3</i>	187.45	211.72	199.40	49.43	62.51	57.39
Lignina	TRINITY_DN391_c0_g1_i1	<i>GcCCoAOMT1</i>	44.95	45.49	50.31	4.43	5.19	4.02
Lignina	TRINITY_DN6695_c0_g1_i2	<i>GcFAH1</i>	249.13	271.55	255.41	40.06	46.67	49.30