

# Capítulo 13

## Bioquímica y proteómica vegetal y agrícola

Tena Aldave M, Maldonado Alconada A, Palomares Rius JE, Curto Rubio M, Echevarría Zomeño S, Pozo A, Susín R, Castillejo Sánchez MA, Jorge Cerrudo I, Requejo Aguilar R, Jorrin Novo JV<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dep. Bioquímica y Biología Molecular, Campus de Rabanales, Edificio Severo Ochoa (C6), planta baja, 14071 Córdoba; CE <sup>1</sup><bf1jonoj@uco.es>

### RESUMEN

En la presente comunicación se resume lo que ha sido la actividad investigadora del grupo “Bioquímica y Proteómica Vegetal y Agrícola” (PAI AGR-164) en los últimos tres años (2005-2007). Nuestro interés y objetivo científico se ha centrado en el estudio de los cambios adaptativos y reacciones de defensa y de resistencia/tolerancia de las plantas a estreses de tipo biótico (hongos fitopatógenos y plantas parásitas) y abiótico (metales pesados, sequía). Dichos estudios se han llevado a cabo tanto con sistemas modelo (*Arabidopsis thaliana* y *Medicago truncatula*), como con especies de interés agronómico (garbanzo, girasol, guisante, maíz) o forestal (encina, alcornoque y pino). En los proyectos de investigación abordados se ha utilizado, en gran medida, una aproximación de proteómica, y también técnicas de bioquímica clásica y transcriptómica. La proteómica constituye, hoy en día, una línea prioritaria en cualquier investigación biológica, suministrando, en el área de la biología vegetal, y en combinación con las técnicas clásicas de bioquímica y las de transcriptómica, información relevante sobre diferentes aspectos básicos y aplicados relacionados con especies de interés agronómico y forestal, como es el de la respuesta a estreses, y la caracterización de genotipos (poblaciones, mutantes, líneas transgénicas). Además, hay aspectos, como el de las modificaciones postraduccionales, que sólo pueden ser abordados experimentalmente mediante una estrategia de proteómica. Nuestro grupo ha iniciado recientemente una nueva línea, dirigida a estudiar el proteoma redox en *Arabidopsis* y su implicación en la respuesta a patógenos.

Palabras clave: proteómica vegetal, respuestas de las plantas a estreses, modificaciones postraduccionales, proteoma redox.

### Introducción, resultados y discusión

Nuestro interés y objetivo científico se ha centrado en el estudio de los cambios adaptativos y reacciones de defensa y de resistencia/tolerancia de las plantas a estreses de tipo biótico (hongos fitopatógenos y plantas parásitas) y abiótico (metales pesados, sequía). Dichos estudios se han llevado a cabo tanto con sistemas modelo (*Arabidopsis thaliana* y *Medicago truncatula*), como con especies de interés agronómico (garbanzo, girasol, guisante, maíz) o forestal (encina, alcornoque y pino). En el caso de la interacción planta-patógeno/planta parásita se ha abordado el estudio de los siguientes patosistemas: garbanzo-*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (fusariosis vascular del garbanzo), girasol-*Sclerotinia sclerotiorum*, *M. truncatula-Uromyces striatus* (roya), *M. truncatula-Erysiphe pisi* (oidio), guisante-*Orobanche crenata* (jopo), *M. truncatula-O. crenata*, y girasol-*O. cernua* (jopo).

Dicha actividad se resume en la Tabla 1. En los proyectos de investigación abordados se ha utilizado, en gran medida, una aproximación de proteómica, y también de transcriptómica y de bioquímica clásica. En las aproximaciones ómicas se ha pretendido identificar genes y proteínas de respuesta a estreses y mediante técnicas de bioquímica clásica.

Mediante técnicas de bioquímica clásica, y en los estudios de respuestas a patógenos, plantas parásitas y metales pesados, se ha investigado la inducción de determinados metabolitos secundarios, principalmente compuestos

fenólicos (caso de isoflavonoides en leguminosas y cumarinas en girasol) (Prats et al, 2006, 2007).

Además, puesto que la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) se asocia, de forma general, a cualquier tipo de estrés, se ha llevado a cabo un estudio de los sistemas destoxicantes de EROS (químicos y enzimáticos) en garbanzo y maíz y en el contexto de las respuestas a patógenos y metales en maíz y garbanzo (García-Limones et al, 2007). En el caso del estudio de las respuestas a plantas parásitas, se han llevado a cabo además estudios citoquímicos e histológicos, lo que ha permitido identificar mecanismos de defensa responsables de la resistencia del girasol al jopo (Echevarría-Zomeño et al, 2006).

Finalmente, y dentro del grupo de aproximaciones bioquímicas clásicas, se ha contemplado el estudio de factores de patogenicidad en *F. oxysporum*, centrado en la producción por el patógeno de hidrolasas de pared celular vegetal. En este campo, se ha abordado también el estudio del proteoma de *F. oxysporum* y *Botrytis cinerea* (Fernández Acero et al, 2006, 2007; Jorge et al, 2005a, 2006b).

La proteómica, considerada como disciplina científica o aproximación metodológica, tiene como objetivo el estudio del proteoma de los diferentes seres vivos, entendido como el conjunto de todas y cada una de las formas proteicas presentes en una unidad biológica (fracción

subcelular, célula, tejido, órgano, organismo) en un tiempo (estadio de diferenciación y desarrollo) y bajo condiciones ambientales determinadas (Jorrín et al, 2007; Maldonado y Jorrín, 2007). Esta definición da idea, y a diferencia del genoma, del dinamismo que caracteriza al proteoma. La proteómica, constituye, hoy en día, un área de investigación prioritaria en cualquier proyecto biológico, y la investigación vegetal no es una excepción a dicha regla.

Los estudios de proteómica permiten identificar, a priori y en teoría, el conjunto de todas y cada una de las proteínas de un sistema biológico, en el caso que nos ocupa, de las plantas de cultivo, entre ellas aquellas

directamente relacionadas con factores de productividad, valor nutricional, marcadores de genotipos, mutantes, procedencias y respuestas a estreses bióticos y abióticos. Además, dichos estudios permiten la identificación de alérgenos, y abordar análisis de equivalencia sustancial en productos transgénicos y trazabilidad de alimentos. El enorme potencial de la proteómica y su aplicación a los objetivos anteriores está lejos de ser explotada, aunque hay suficientes ejemplos en la literatura que validan esta aproximación. Las posibilidades, contribuciones y retos de la proteómica en el campo vegetal se recoge en revisiones recientes (Cánovas et al, 2004; Jorrín et al, 2006, 2007; Rossignol et al, 2006; Salekdeh et al, 2007).

**Tabla 1. Relación de proyectos de investigación financiados en curso en el grupo de Investigación "Bioquímica y Proteómica Vegetal y Agrícola" (PAI AGR-164), objetivos, sistemas de estudio, aproximaciones metodológicas y artículos publicados.**

Proyecto	Objetivo	Sistemas	Aproximación	Publicaciones
New strategies to improve grain legumes for food and feed (EU, FP6-506223). < <a href="http://www.eugrainlegumes.org/suimary/index.htm">http://www.eugrainlegumes.org/suimary/index.htm</a> >.	Estudio de mecanismos de resistencia a hongos fitopatógenos y plantas parásitas	<i>Medicago truncatula</i> <i>Guisante (Pisum sativum)</i>	Proteómica	Castillejo et al, 2004 Curto et al, 2006
La proteómica como una nueva aproximación en el estudio de la seca de la encina. Monte de Piedad y Caja de ahorros de Huelva y Sevilla.	Estudio de la seca de la encina	Encina ( <i>Quercus ilex</i> )	Microscopía Bioquímica Clásica Proteómica	Jorge et al, 2005 Jorge et al, 2006
Genómica funcional (transcriptómica y proteómica) aplicada al estudio de la variabilidad poblacional y la respuesta a estreses en especies forestales ( <i>Quercus ilex</i> , <i>Quercus rubur</i> , <i>Pinus pinaster</i> ). Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía.	Estudio de la variabilidad poblacional y respuesta a sequía.	Encina ( <i>Quercus ilex</i> ) Alcornoque ( <i>Quercus rubur</i> )		
El proteoma redox: nitrosilación y glutationilación de proteínas en los mecanismos reguladores de las respuestas de defensa de las plantas a patógenos DGI-MEC, Bio-2006.14790.	Estudio de los mecanismos de defensa a patógenos	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Proteómica Transcriptómica Genética inversa	Maldonado et al, 2007
Gene interaction networks and models of cation homeostasis in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . TRANSLUCENT" (EU. P-E-01-06-17). < <a href="http://quiro.uab.es/Jarino/Translucent">http://quiro.uab.es/Jarino/Translucent</a> >.	Mecanismos de homeostasis catiónica	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Proteómica Bioquímica Clásica	Navarrete et al, 2007

En el ámbito de la proteómica de plantas, miembros del grupo han puesto a punto un número de técnicas de extracción para diferentes tejidos y sistemas vegetales (Gómez-Vidal et al, 2008), así como de separación de proteínas por electroforesis bidimensional.

Dichas técnicas no sólo han permitido establecer el proteoma de especies desconocidas a nivel molecular (p.e. encina, *Quercus ilex*, *Pinus radiata*) (Jorge et al, 2005b, 2006a; Valledor et al, 2008), sino también detectar cambios en el patrón de expresión proteica en respuesta a estreses bióticos y abióticos (Requejo y Tena, 2005, 2006), con la posterior identificación de proteínas posiblemente implicadas en procesos de resistencia y tolerancia. En este sentido hemos venido utilizando una plataforma clásica de proteómica de expresión diferencial basada en geles bidimensionales. Recientemente hemos empezado a manejar técnicas de proteómica de las denominadas de segunda generación (DIGE, iTRAQ). También hemos dado un salto cualitativo importante en

relación a los objetivos científicos, habiendo empezado el estudio de modificaciones postraduccionales y, más concretamente, del proteoma redox: oxidación, nitrosilación y glutationilación de proteínas.

Parte de la actividad investigadora del grupo se lleva a cabo con otros grupos, tanto nacionales como extranjeros, entre los que hay que mencionar:

Dr. Jiménez Díaz (ETSIAM e IAS-CSIC, Córdoba): estudio de la fusariosis vascular de garbanzo. (García-Limones et al, 2007; Jorge et al, 2005a, 2006b).

Dres. López-Llorca y Salinas (Univ. Alicante). (Gómez-Vidal et al, 2008).

Dres. Rubiales Olmedo, Prats Pérez y Pérez de Luque (IAS-CSIC, Córdoba), Dra. Dumas-Gaudot (INRA, Dijon, Francia): respuesta a patógenos y plantas parásitas en leguminosas, proteómica de leguminosas. (Castillejo et al,

2004; Curto et al, 2006).

Dres. Navarro Cerrillo (ETSIAM, Córdoba), R. Fernández, Luis Valledor (Universidad de Oviedo), C. Lenz (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania): Proteómica forestal. (Jorge et al, 2005, 2006; Valledor et al, 2008).

Dres. Lamb (John Innes Centre, UK) y Parker (Max Planck Institute, Alemania). Rutas de señalización durante el establecimiento y la expresión de la respuesta inmune en plantas. (Maldonado et al, 2007).

Dres. Muñoz y Caballero (Universidad de Córdoba). Estudios funcionales de un gen de fresa, que codifica un factor de transcripción tipo WRKY. (Encina Villarejo et al, 2007)

Dras. de la Canal y Pinedo (Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina). Respuestas morfogénicas inducidas por estrés: estudios en girasol. (Pinedo et al, 2007)

Dra. Martha Hernández (Bioplantas, Ciego de Ávila, Cuba): caracterización de proteasas, equivalencia sustancial en piña transgénica. (Pérez et al, 2007).

Besma Sghaier (Universidad de Sfax, Túnez): embriogénesis somática en palma datilera. (Sghaier et al, 2007)

Dr. Fernández Acero (U. de Cádiz): proteoma de *Botrytis cinerea*. (Fernández Acero et al, 2006, 2007)

Dres León y Bazzalo (Advanta Semillas, Valcarce, Argentina) (Prats et al, 2006, 2007)

## Referencias

Cánovas M, Dumas-Gaudot E, Recorbet G, Jorrín J, Mock HP, Rossignol M (2004): Plant proteome analysis. *Proteomics* 4: 285-298.

Castillejo MA, Amiour N, Dumas-Gaudot E, Rubiales D, Jorrín JV (2004): A proteomic approach to studying plant response to crenate broomrape (*Orobancha crenata*) in pea (*Pisum sativum*). *Phytochem* 65: 1817-1828.

Curto M, Camafeita E, Lopez JA, Maldonado AM, Rubiales D, Jorrín JV (2006): A proteomic approach to study pea (*Pisum sativum*) responses to powdery mildew (*Erysiphe pisi*). *Proteomics* S1'06: 163-174.

Echevarría-Zomeño S, Pérez-de-Luque A, Jorrín J, Maldonado AM (2006): Pre-haustorial resistance to broomrape (*Orobancha cumana*) in sunflower (*Helianthus annuus*): cytochemical studies. *J Exp Botany* 57: 4189-420.

Encinas-Villarejo S, Maldonado AM, Amil-Ruiz, F, De los Santos B, Romero F, Pliego-Alfaro F, Muñoz-Blanco J, Caballero JL (2009): Evidence for a positive regulatory role of strawberry (*Fragaria x ananassa*) FaWRKY1 and *Arabidopsis* At WRKY75 proteins in resistance. *Journal of Experimental Botany* (en prensa; DOI:10.1093/jxb/erp152).

Fernández-Acero FJ, Jorge I, Calvo E, Vallejo I, Carbú M, Camafeita E, Garrido C, López JA, Jorrín J, Cantoral

JM (2007): Proteomic analysis of phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* as a potential tool for identifying pathogenicity factors, therapeutic targets and for basic research. *Arch Microbiol* 187: 207-215.

Fernández-Acero FJ, Jorge I, Calvo E, Vallejo I, Camafeita LE, López JA, Cantoral JM, Jorrín J (2006): Two-dimensional electrophoresis protein profile of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Proteomics* S1'06: 88-96.

García-Limones C, Dorado G, Navas-Cortés JA, Jiménez-Díaz RM, Tena M (2009): Changes in the redox status of chickpea roots in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*: apoplastic antioxidant enzyme activities and expression of oxidative stress-related genes. *Plant Biology* 11: 194-203.

Gómez-Vidal S, Tena M, Lopez-Llorca LV, Salinas J (2008): Protein extraction from *Phoenix dactylifera* L. leaves, a recalcitrant material, for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 29: 448-56.

Jorge I, de la Rosa O, Navas-Cortés JA, Jiménez-Díaz RM, Tena M (2005a): Extracellular xylanases from two pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*: enzyme production in culture and characterization of a major isoform as an alkaline endo- $\beta$ -(1,4)-xylanase of low molecular weight. *Antonie van Leeuwenhoek* 88: 49-59.

Jorge I, Navarro M, Lenz C, Ariza D, Porrás C, Jorrín J (2005b): The holm oak leaf proteome. Analytical and biological variability in the protein expression level assessed by 2-DE and protein identification by MS/MS de novo sequencing and sequence similarity searching. *Proteomics* 5: 222-234.

Jorge I, Navarro RM, Lenz C, Ariza D, Jorrín J (2006a): Variation in the holm oak leaf proteome at different plant developmental stages, between provenances and in response to drought stress. *Proteomics* S1'06: 207-214.

Jorge I, Navas-Cortés JA, Jiménez-Díaz RM, Tena M (2006b): Cell wall degrading enzymes in *Fusarium* wilt of chickpea: correlation between pectinase and xylanase activities and disease development in plants infected with two pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. *Canadian J Botany* 84: 1395-1404.

Jorrín Novo JV, Calvete JJ, Maldonado AM (2007): Proteómica: conceptos y metodologías. En: Fenoll C, Escobar C, Marcos J, Rodríguez-Palenzuela P, Pallas V (eds): "Herramientas biotecnológicas en Fitopatología". Sociedad Española de Fitopatología/Mundi Prensa (Madrid): 75-92.

Jorrín JV, Maldonado A, Castillejo MA (2007): Plant proteome analysis: a 2007 update. *Proteomics* 7: 2947-2962.

Jorrín JV, Rubiales D, Dumas-Gaudot E, Recorbet G, Maldonado A, Castillejo MA, Curto M (2006): Proteomics: a promising approach to study biotic stresses in legumes. A review. *Euphytica* 147: 37-47.

Maldonado AM, Jorrín JV (2007): Proteómica vegetal: aplicación al estudio de la interacción planta-patógeno y planta-parásita. En: Fenoll C, Escobar C, Marcos J, Rodríguez-Palenzuela P, Pallas V (eds): "Herramientas Biotecnológicas en Fitopatología". Sociedad Española de Fitopatología/Mundi Prensa

- (Madrid): 93-107.
- Maldonado AM, Lindermayr C, Durner J, Jorrín JV (2007): Protein S-nitrosilation in arabidopsis in response to pathogens. 2nd Congress of the Spanish Proteomics Society/1st Meeting of the European Proteomics Association.
- Maldonado AM, Jordá L, Goebel C, Feussner J, Parker J, Lamb C (2007): Arabidopsis EDS1 and PAD4 regulate both the emission and distal perception of signals for systemic immunity. *Plant Physiology* (enviado).
- Navarrete C, Pérez-Pérez ME, Martínez JL, Ruiz MC, Álvarez MC, Calero F, Jorrín J, Ramos J (2007): Salt tolerance in yeast: The regulation of potassium and sodium fluxes. Reunión de la Red Española de Levaduras 2007.
- Perez A, Carvajal C, Trejo S, Torres MJ, Martín I, Natulcci C, Jorrín J, Hernández M (2007): Penduliflorain I: a new papain-like cysteine peptidase isolated from *Hohenbergia penduliflora* stems. VI Congreso Internacional de Biotecnología y Agricultura, BioVeg.
- Pérez de Luque A, Jorrín JV, Cubero JI, Rubiales D (2005): *Orobanche crenata* resistance and avoidance in pea (*Pisum* spp.) operate at different developmental stages of the parasite. *Weed Science* 45: 379-387.
- Pinedo M, de la Canal L, Jorrín JV, Maldonado AM (2007): Analysis of sunflower extracellular proteome. 2nd Congress of the Spanish Proteomics Society/1st Meeting of the European Proteomics Association.
- Prats E, Bazzalo ME, Jorrín JV (2006): Fungitoxic effect of scopolin and related coumarins on *Sclerotinia sclerotiorum*. A way to overcome sunflower head rot. *Euphytica* 147: 451-460.
- Prats E, García-Galindo JC, Bazzalo ME, León A, Macías FA, Rubiales D, Jorrín JV (2007): Antifungal activity of constitutive phenolic compounds from capitulum of a head rot-resistant sunflower genotypes. *J Chem Ecol* 33: 2245-53.
- Requejo R, Tena M (2005): Proteome analysis of maize roots reveals that oxidative stress is a main contributing factor to plant arsenic toxicity. *Phytochemistry* 66: 1519-1528.
- Requejo R, Tena M (2006): Maize response to acute arsenic toxicity as revealed by proteome analysis of plant shoots. *Proteomics*, 6, S156-S162.
- Rispail N., Dita MA, González-Verdejo C, Pérez-de-Luque A, Castillejo MA, Prats E, Román B, Jorrín J, Rubiales D (2007): Plant resistance to parasitic plants: current approaches for an old foe. *New Phytologist* 173: 703-712.
- Rossignol M, Peltier JB, Mock HP, Matros A, Maldonado A, Jorrín J (2006): Plant proteome analysis: a 2004-2006 update. *Proteomics* 6: 5529-5548.
- Salekdeh GH, Komatsu S (2007): Crop proteomics: aim at sustainable agriculture of tomorrow. *Proteomics* 7: 2976-2996.
- Sghaier B, Allouch FM, Bahloul M, Jorrín Novo JV, Drira N (2007): Effect of ABA, arginine and sucrose on protein content of date palm somatic embryos date palm somatic embryo's protein content. *Scientia Horticulturae* 120: 379-385.
- Sghaier-Hammami B, Drira N, Jorrín-Novo JV (2009): Comparative 2-DE proteomic analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) somatic and zygotic embryos. *J Proteomics* (en prensa; DOI: 10.1016/j.jprot.2009.07.003).
- Sghaier-Hammami B, Valledor L, Drira N, Jorrín-Novo JV (2009): Proteomic analysis of the development and germination of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) zygotic embryos. *Proteomics* 9: 2543-2554.
- Valledor L, Castillejo MA, Lenz C, Rodríguez R, Cañal MJ, Jorrín J (2008): The 2-DE proteome of *Pinus radiata* needle tissue: analytical, biological variability and protein identification by LC/MS/MS and substitution-tolerant database searching. *J Proteome Res* 7: 2616-263.