

5. PROTEÓMICA VEGETAL

Análisis mediante electroforesis bidimensional de las diferencias de expresión proteica producidas durante la maduración del fruto y entre especies cultivadas (*Fragaria x ananassa*) y silvestres (*Fragaria vesca*) de fresa

Aragüez-Rey I, Botella M A, Valpuesta V, Medina-Escobar, N

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica. Universidad de Málaga. España.

Introducción

Hasta ahora únicamente se han publicado dos estudios de proteómica de fresa, y en ellos sólo se analizaron diferencias entre frutos maduros de diferentes variedades (Hjernø *et al.*, 2006; Alm *et al.*, 2007). Mediante electroforesis bidimensional hemos estudiado los cambios proteicos que ocurren en la transición de fruto verde a maduro, así como las diferencias que existen entre frutos rojos de especies cultivadas (*Fragaria x ananassa*) y silvestres (*Fragaria vesca*).

Material y métodos

La extracción de proteínas de frutos de fresa se optimizó solubilizando las proteínas en fenol (Saravanan y Rose, 2004; Zheng *et al.*, 2007). Para la generación de los geles bidimensionales se emplearon tiras con gradiente de pH inmovilizado de 7 cm y 17 cm, de rangos de pH 3-10 lineal y 5-8 lineal. Los geles se tiñeron con Azul de Coomassie y se analizaron las imágenes de tres réplicas de cada uno de ellos con el programa informático PDQuest, buscándose proteínas de diferente abundancia entre los extractos estudiados. Las proteínas seleccionadas se analizaron mediante MALDI-MS/MS para obtener la huella peptídica, y las búsquedas se realizaron con MASCOT en las bases de datos MSDB y FREST (base de datos de ESTs de fresa).

Resultados

Los primeros experimentos se centraron en el proceso de maduración, y los primeros geles bidimensionales (rango 3-10 lineal, 7 cm) permitieron comprobar la reproducibilidad tanto entre diferentes extracciones proteicas, como entre duplicados, y en diferentes apa-

ratos de isoelectroenfoco. Los geles analíticos correspondientes a los estados de maduración verde y rojo maduro se generaron con tiras con gradiente de pH inmovilizado de rangos 3-10 ó 5-8, ambos de 17 cm. Las tinciones con Azul de Coomassie permitieron resolver unos 400 puntos proteicos con pI entre 5 y 8, y masa molecular comprendida entre 15 kDa y 90 kDa. Las imágenes de los geles se analizaron con el fin de seleccionar proteínas expresadas más de diez veces en frutos verdes o rojos, para su posterior identificación por espectrometría de masas. Siguiendo la misma metodología se analizaron extractos de proteínas procedentes de frutos maduros de una variedad comercial (*Fragaria x ananassa*, cv. Camarosa) y de una especie silvestre (*Fragaria vesca*) de fresa. La comparación de estos geles mostró numerosas diferencias tanto cualitativas como cuantitativas.

Conclusiones

El análisis de las proteínas seleccionadas por su expresión diferencial entre frutos verdes y rojos, ha permitido la identificación de diversas proteínas involucradas en la maduración del fruto de fresa. Con el programa informático PDQuest se han identificado 54 proteínas cuyo contenido en frutos maduros es superior en más de diez veces al contenido de los frutos verdes. Se han analizado 10 proteínas presentes en frutos verdes y ausentes en frutos rojos de fresa, identificándose con éxito el 30% de ellas. Por otro lado, se ha identificado con éxito el 53.6% de las 41 proteínas más abundantes en frutos rojos analizadas (21 proteínas ausentes en frutos verdes y 20 proteínas 10 veces más abundantes en frutos rojos). Entre éstas, destacan proteínas relacionadas con la maduración del fruto de fresa, como son una quinona oxidoreductasa, una chalcona sintasa, y una dioxigenasa.

Referencias

- Alm, R., Ekefjård, A., Krogh, M., Häkkinen, J. *et al.*, *Journal of Proteome Research* 2007, 6, 3011-3020.
- Hjernø, K., Alm, R., Canbäck, B., Matthiesen, R. *et al.*, *Proteomics* 2006, 6, 1574-1587.
- Saravanan, R., Rose, J., *Proteomics* 2004, 4, 2522-2532.
- Zheng, Q., Song, J., Doncaster, K., Rowland, E., *et al.*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, 55, 1663-1673.

Análisis proteómico de la respuesta temprana al establecimiento bajo condiciones de estrés hídrico en *Pinus halepensis* MILL

Ariza-Mateos D¹., Navarro R.M.¹., Del Campo² A., Ibáñez A.². y Jorrín J.V.³

¹E.T.S. Ingenieros Agrónomos y de Montes. Dep. Ingeniería Forestal. Apdo. 3048. 14080 Córdoba. Tel. +34. 957218657, E-mail: oikos2002es@yahoo.es. ²Dep. Ing. Hidráulica y Medio Ambiente. EPSG. UPV. Crta. Nazaret-Oliva s/n. 46730 Grao de Gandía, Valencia. ³Dep. Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba.

Resumen

Los climas mediterráneos semiáridos son especialmente limitantes para el establecimiento de repoblaciones forestales (Ceballos *et al.*, 2004), siendo el déficit hídrico, asociado a otros factores como las altas temperaturas, el déficit de presión de vapor o las elevadas radiaciones la causa principal de mortalidad de la planta (Calamassi *et al.*, 2001). *Pinus halepensis* Mill. es capaz de sobrevivir en situaciones de fuerte estrés hídrico siendo una de las especies más utilizadas en los programas de reforestación del sureste español (Pemán y Navarro, 1998).

La proteómica, a través del estudio de las proteínas presentes en una unidad biológica, bajo condiciones ambientales determinadas, constituye un buen indicador del estado fisiológico de la planta (Canovas *et al.*, 2004., Rossignol *et al.*, 2006) y predictor de su respuesta a estrés (Jorge *et al.*, 2006). El objetivo de este trabajo es aplicar la proteómica para el estudio del efecto de la fecha de plantación sobre una repoblación de *Pinus halepensis* en el levante español.

Se ensayaron dos fechas de plantación, una temprana (noviembre 2005) y una tardía (enero de 2006). Durante el primer año se estudió la influencia de la fecha de plantación sobre las variables supervivencia, crecimiento, potenciales hídricos, capacidad fotosintética a través de la fluorescencia de la clorofila y sobre la expresión de proteínas. La

extracción se realizó mediante el protocolo de Damerval (1986), tras la cual se realizó la separación de las proteínas mediante electroforesis bidimensional en gel de poliacrilmida al 13%. Los geles resultantes se digitalizaron y analizaron mediante la aplicación informática PD-Quest (Bio-Rad). La fecha de plantación tuvo efecto sobre las variables crecimiento y potencial hídrico, no siendo notable su influencia sobre la supervivencia o la fluorescencia de la clorofila. Mediante el análisis proteómico se encontraron algunas diferencias a nivel de expresión de algunas proteínas que pueden servir como marcadores moleculares de estrés hídrico.

Bibliografía

- Calamassi, R., Della Rocca, G., Paoletti, E., Strati, S. 2001. *Ann. For. Sci.* 58: 663-672.
- Cánovas, F.M., Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Jorrín, J., Mock, H-P., Rossignol, M. 2004. *Proteomics* 4: 285-298
- Ceballos, A., Martínez-Fernández, J. Luengo-Ugidos, M.A. 2004. *Journal of Arid Environment.* 58: 215-233.
- Damerval, C., De Vienne, D., Zivy, M., Thiellement, H. 1986. *Electrophoresis.* 7: 52-54
- Jorge, I., Navarro, R., Lenz, C., Ariza, D., Porras, C. Jorrín, J. 2006. *Proteomics.* 6: 207-214