

Pemán, J. y Navarro R.M. 1998. Ed. Servei de Publicacions Univ. Lleida. 102 pp.

Rossignol. M, Peltier. Jb, Mock. H.P, Matros. A, Maldonado. A, Jorrín. J. 2006. *Proteomics*. 6:5529-5548

Proteómica en *Quercus ilex*: aplicación al estudio de la variabilidad poblacional y la respuesta a estrés hídrico

Echevarría-Zomeño S^{1,2}, Valero J^{1,2}, Ariza J¹, Lenz C³, Navarro RM¹, Jorrín JV²

¹ Dpto. de Ingeniería Forestal, ETSIAM, Universidad de Córdoba; ² Bioquímica y Proteómica Vegetal y Agrícola, Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba; ³ Applied Biosystems Deutschland, Darmstadt, Germany

Introducción

La encina (*Quercus ilex* L.) es la especie forestal más representativa del bosque mediterráneo. Muestra gran variabilidad fenotípica, algo característico de especies alógamas poco intervenidas por el hombre, debido a su origen y condiciones ambientales (Jiménez et al., 1999). En España, es una especie ampliamente utilizada en programas de reforestación (Navarro y Calzado, 2008, en prensa), y aunque se considera tolerante a la sequía, ésta constituye la primera causa de mortalidad de individuos tras el trasplante (Navarro et al., 1998a, Navarro et al., 1998b).

En nuestros grupos de investigación se está llevando a cabo un proyecto multidisciplinar con la especie *Q. ilex* utilizando la proteómica como herramienta clave. Los primeros trabajos pusieron de manifiesto la existencia de gran variabilidad en el perfil proteico 2-DE de hojas, tanto intra e inter-poblacional, como en un mismo individuo (Jorge et al., 2005), y pusieron de manifiesto cambios en el mapa proteico en respuesta a estrés moderado (Jorge et al., 2006).

Tras estos trabajos preliminares, se realizaron nuevos experimentos con un doble objetivo: (i) caracterizar la variabilidad genética de las poblaciones para su posterior catalogación utilizando bellotas, ya que su proteoma se considera más estable que el de hojas y (ii) dilucidar los mecanismos moleculares responsables de la respuesta a estrés hídrico a partir de la identificación de cambios en el patrón de proteínas en condiciones de sequía.

Material y métodos

Para los estudios de variabilidad se utilizaron bellotas de *Q. ilex* de cuatro poblaciones de Andalucía geográficamente distantes. Para los ensayos de estrés hídrico, se usaron hojas de plántulas de *Q. ilex* de la procedencia Extremadura-Sierra Morena Occidental sometidos a tres tratamientos: i) riego a capacidad de campo, ii) sequía (no riego) durante 14 días y iii) sequía durante 7 días más 7 días de riego. La extracción de proteínas se llevó a cabo por precipitación con TCA/acetona (Damerval et al., 1986). Las SDS-PAGE se realizaron en geles al 13% de poliacrilamida. Los IEF se llevaron a cabo en tiras IPG 5-8 de 17 cm. Las imágenes de los geles capturadas con un densitómetro (GS-800, BioRad) se analizaron con los programas QuantityOne o PDQuest (BioRad). Los spots diferenciales se escindieron de los geles y analizaron por MALDI-TOF/TOF o LC-MS/MS. La identificación de las proteínas se realizó utilizando los motores de búsqueda MASCOT o ProteinPilot (Applied Biosystems).

Resultados

Las distintas poblaciones presentan patrones de bandas (SDS-PAGE) o spots (2-DE) característicos y diferenciales, estableciéndose los agrupamientos filogenéticos mostrados en la Figura 1. Algunos de los spots diferenciales se identificaron como pertenecientes al grupo de las leguminas. En respuesta a sequía, se observó un descenso en la expresión de proteínas de la fotosíntesis (PSII OEC 1 y 2) y ruta glicolítica (triosafosfato isomerasa, fructosa bifosfato aldolasa). En el tratamiento de recuperación, las proteínas del

metabolismo fotosintético tienen valores similares a los del control, no así las de la glicolisis, que no se recuperan tras este corto periodo de riego.

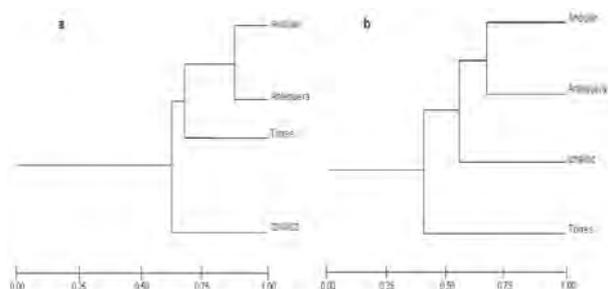


Figura 1. Relaciones filogenéticas de las cuatro poblaciones de encinas andaluzas calculadas con los patrones de bandas (SDS-PAGE) (a) y de spots (2-DE) (b).

Proceso/proteínas	Sequia	Recuperación
Fotosíntesis		
PSII OEC 1	↓	↔
PSII OEC 2	↓	↔
Glicolisis		
Triosafosfato isomerasa	↓	↓
Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa	↔	↓
Estrés		
Peroxidasa	↑	↔
Peroxirredoxina	○	↔
Otras		
Glutamina sintetasa	↔	↓
Isoflavona reductasa	↓	↓
F23N19.10	↓	↔

Tabla 1. Proteínas diferenciales identificadas y sus correspondientes efectos en sequía y recuperación con respecto al control. ↓, el spot correspondiente disminuye en intensidad; ↑, el spot aumenta en intensidad; ○, el spot desaparece; ↔, el spot presenta una intensidad similar a la del control.

Conclusiones

1. Es posible discriminar entre poblaciones de encina mediante electroforesis SDS-PAGE

y 2-DE. Un aspecto clave de esta línea de investigación es el uso de órganos de proteoma estable, como son las semillas.

2. En condiciones de sequía moderada, se observó un descenso en la expresión de enzimas de la fotosíntesis y la glicolisis. Las primeras tienen un nivel similar al control en las plantas recuperadas mientras que las segundas no llegan a recuperarse tras el corto periodo de 7 días de riego.

Bibliografía

Jiménez, P., Gil, L. and Petit, R. J., in: Espinel, S. and Ritter, D. (Eds.), Congreso Internacional sobre Aplicación de la Biotecnología a la Genética Forestal (BIOFOR-99), Diputación Foral de Alava, Vitoria, Spain 1999, pp. 141-142.

Navarro, R. M., Campo, A., Alejano, R. and Alvarez, L., Informaciones Técnicas, Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. D.G. de Investigación y Formación Agraria. Servicios de Publicaciones y Divulgación 1998a, p. 60.

Navarro, R. M., Del Campo, A., Gálvez, C. and Contreras, V., Caracterización del cultivo de planta forestal en contenedor, Conserjería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Sevilla, Spain 1998b, p. 190.

Jorge, I., Navarro, R. M., Lenz, C., Ariza, D., et al., Proteomics 2005, 5, 222-234.

Jorge, I., Navarro, R. M., Lenz, C., Ariza, D. and Jorin, J., Proteomics 2006, 6 Suppl 1, S207-214.

Damerval, C., de Vienne, D., Zivy, M. and Thiellement, H., Electrophoresis 1986, 7, 52-54.