

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

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