

APROXIMACIÓN PROTEÓMICA PARA EL ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA Y LA RESPUESTA A ESTRÉS EN *Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp.

I. Jorge¹, R. M^a Navarro Cerrillo², D. Ariza², C. J. Porras Tejeiro³ y J. V. Jorrín Novo¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. ETSIAM. Campus de Rabanales, Edificio Severo Ochoa (C6), planta baja. 14071, Córdoba. E-mail: bf1jonoj@uco.es

²Departamento de Ingeniería Forestal. ETSIAM. Avda. Menéndez Pidal s/n.14080, Córdoba. E-mail: ir1nacer@uco.es

³CIFA Las Torres y Tomejil, Crta. Sevilla-Alcalá del Río, Km. 12200, 41200 Alcalá del Río, Sevilla.

Resumen

Nuestros grupos de investigación han iniciado recientemente un proyecto de colaboración cuyo objetivo es abordar el estudio en *Quercus ilex* L de la variabilidad poblacional y las respuestas a distintos tipos de estrés, utilizando para ello una aproximación de genómica funcional. Los primeros experimentos han ido dirigidos a caracterizar el proteoma de hoja, utilizando para ello técnicas de electroforesis bidimensional para la separación de proteínas, análisis peptídico por espectrometría de masas e identificación mediante búsqueda en bases de datos de proteínas y DNA. Para ello se han utilizado hojas de árboles adultos y de plántones de diferentes procedencias. En la actualidad se están llevando a cabo estudios de respuesta a estrés hídrico y a patógenos. Los resultados obtenidos y publicados indican que la proteómica puede ser una herramienta valiosa en la determinación y caracterización de la variabilidad genética entre procedencias, de atributos de calidad, así como en la identificación de proteínas y genes de respuesta a estreses.

Palabras clave: *Quercus ilex*, proteómica, procedencias, respuesta a sequía

Abstract

Our research groups have just initiated a collaborative research project directed to studying variability among populations and responses to stresses in *Quercus ilex* L. by using a functional genomic approach. Our first experiments intended to analyze the leaf proteome by mean of two-dimensional gel electrophoresis for protein resolution, peptide analysis by mass spectrometry and protein identification by searching in protein or DNA databases. We have used leaves from adult trees and seedlings from different provenances. At the present we are carrying out studies of responses to water stress and pathogens. Results so far obtained and published support proteomics as an useful experimental approach in order to establish and characterize genetic variability among provenances and populations as well as to identify proteins and genes involved in responses to stresses.

Key words: *Quercus ilex*, proteomic, provenances, drought

INTRODUCCIÓN

En el campo de la biología vegetal son numerosos los estudios llevados a cabo con diferentes especies vegetales, generalmente sistemas modelo y cultivos herbáceos, en los que se han conseguido, mediante la utilización de una aproximación proteómica, llevar a cabo la caracterización de genotipos y la respuesta a estrés (THIELLEMENT *et al.*, 2002). En plantas de interés forestal, tales como *Quercus* ssp., disponemos de estudios que cubren parcialmente dichos objetivos: diferencias dentro de esta especie (RAFFI *et al.*, 1991; ELENA-ROSELLÓ *et al.*, 1992; HOKANSON *et al.*, 1993; VARELA, 1993; BARRENECHE *et al.*, 1996; JIMÉNEZ *et al.*, 1999), la existencia de polimorfismo inter- e intra-poblacional (YACINE & LUMARET, 1989; BERG Y HAMRICK, 1993; RAFFI *et al.*, 1993; LUMARET *et al.*, 2002), y respuestas a distintos tipos de estrés (ABRAMS, 1990; COLLADA *et al.*, 1991; PLA *et al.*, 1998; CRESCENTE *et al.*, 2002; HÓDAR, 2002; PONTON *et al.*, 2002). En dichos trabajos se pone de manifiesto una correlación entre el contenido y la composición proteica en los plántones y su supervivencia en condiciones ambientales adversas (KOZLOWSKI *et al.*, 1991, JOBIDON *et al.*, 1998). En otros trabajos se han abordado estudios sobre los cambios fisiológicos producidos en encina en respuesta a diferentes estreses medioambientales (CASTRO-DÍEZ *et al.*, 1997; LEIVA & FERNÁNDEZ-ALÉS, 1998; FOTELLI *et al.*, 2000; HÓDAR, 2002). A pesar de lo anterior, podemos afirmar que existe muy poca información a nivel génico y molecular, en relación a

la variabilidad genética entre poblaciones de encinas en cuanto a su tolerancia a dichos estreses. En España, por ejemplo, las poblaciones o procedencias de encina muestran un patrón geográfico complejo de variación genética, distribuyéndose en distintas áreas forestales (LUMARET *et al.*, 2002). Algunas de estas procedencias han sobrevivido a condiciones extremas de sequía que predominan al Sur de la península por lo que cabría esperar que estos individuos presenten mecanismos eficaces de adaptación y tolerancia a la sequía (FOTELLI *et al.*, 2000).

La aproximación de proteómica constituye, hoy en día, una herramienta de gran utilidad en investigaciones biológicas, ya que no sólo permite profundizar en el conocimiento de los seres vivos, sino que también tiene importantes aplicaciones prácticas. El desarrollo de la proteómica ha sido posible gracias al avance en técnicas de separación de proteínas tales como la electroforesis bidimensional y la cromatografía multidimensional, y de identificación de proteínas mediante espectrometría de masas y posterior búsqueda en bases de datos genómicas y proteómicas con algoritmos específicos (PORULEVA *et al.*, 2001; CÁNOVAS *et al.*, 2004; CHAMRAD *et al.*, 2004).

Nuestros grupos de investigación han iniciado recientemente un proyecto de colaboración cuyo objetivo es abordar el estudio en *Quercus ilex* L de la variabilidad poblacional y las respuestas a estreses, utilizando para ello una aproximación de genómica funcional. Los primeros experimentos han ido dirigidos a caracterizar el proteoma de hoja, utilizando para ello técnicas de electroforesis bidimensional para la separación de proteínas, análisis peptídico por espectrometría de masas e identificación mediante búsqueda en bases de datos de proteínas y DNA. El objetivo perseguido es doble:

i) detectar la variabilidad genética en la expresión de proteínas entre individuos de distintas procedencias de encinas y entre distintos estados de desarrollo de la planta.

ii) identificar proteínas de respuesta a distintos tipos de estrés tanto bióticos como abióticos, especialmente en respuesta a patógenos y a sequía, y conseguir marcadores moleculares de atributos de calidad o de tolerancia y resistencia a situaciones de estrés.

LÍNEAS DE TRABAJO

La aplicación de la proteómica al estudio de la identificación, la abundancia y la función que desarrollan en plantas de interés forestal, tales como *Q. ilex*, proteínas ya estudiadas en otras especies permitiría un gran avance en el conocimiento no sólo de sus procesos vitales sino del desarrollo de herramientas para cuantificar su estado fisiológico, así como la caracterización de especies o genotipos, la estimación de la variabilidad genética entre poblaciones, la caracterización de mutantes y la identificación de la respuesta de la planta a distintos estreses. En este sentido, nuestro grupo de trabajo lleva a cabo una serie de ensayos destinados a tales objetivos, en el que se emplean tanto árboles adultos como plántulas de una savia de encinas de distintas procedencias españolas. Las líneas de trabajo llevadas a cabo y en curso, son las siguientes:

Optimización del protocolo de extracción de proteínas y de la electroforesis bidimensional (2-DE)

El primer objetivo es optimizar los protocolos de extracción de proteínas de hoja de encina y poner a punto las técnicas de separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional (2-DE, isoelectroenfoque como primera dimensión y electroforesis desnaturizante como segunda). Tras haber evaluado distintos protocolos de extracción, se observó que la precipitación con TCA-acetona (DAMERVAL *et al.*, 1986) es el que dio mejores resultados. En este protocolo las hojas, previamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, se homogenizaron en mortero con TCA al 10 % (p/v) en acetona (DTT 0,07 %, p/v). Las proteínas se solubilizaron en tampón que contenía Urea 8 M, CHAPS 2 %, IPG-buffer 0,5 %, y DTT 20 mM. La concentración de proteína se determinó usando el kit RC-DC Protein Assay (Bio-Rad). Para la electroforesis bidimensional se utilizaron 400 μg de proteínas. La primera dimensión (IEF) se llevó a cabo en el Protean IEF Cell (Bio-Rad), utilizando tiras de 17 cm y gradiente lineal de pH (5-8, Bio-Rad) (GÖRG *et al.*, 1987). Para la segunda dimensión (SDS-PAGE, 13 % poliacrilamida) se utilizó el equipo Protean II (Bio-Rad). Los geles se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue G-250 (LAEMMLI, 1970), se digitalizaron con un densitómetro (GS-800, Bio-Rad) y se analizaron con el programa PD-QuestTM (Bio-Rad). La

secuenciación *de novo* de los péptidos se llevó a cabo tras el picado de las manchas y digestión con tripsina de las proteínas, mediante MS/MS, utilizando un sistema de nHPLC-Triple cuadrupolo-trampa iónica (Q-trap lineal, Applied Biosystems). Las proteínas fueron identificadas mediante búsqueda por homología [BLAST] en bases de datos de diferentes especies vegetales (JORGE *et al.*, 2004a).

Descripción del proteoma de hoja de encina

Una vez puesto a punto los protocolos y métodos de extracción, análisis por MS e identificación de proteínas, se procedió al análisis de hojas de árboles adultos, la posterior identificación y caracterización de proteínas mayoritarias. La mayor dificultad vino dada por la ausencia de bases de datos con secuencias de DNA de encina o especies próximas, por lo que fue necesario llevar a cabo dicha identificación por homología con otras especies (JORGE *et al.*, 2005a). Del total de proteínas que se identificaron, el 55 % correspondían a enzimas y proteínas del aparato fotosintético y metabolismo de carbohidratos (cadena de transporte electrónico, ciclo de Calvin, glicolisis), con un buen número correspondiendo a la subunidad mayor de la RubisCO, (JORGE *et al.*, 2005a), hecho que se ha descrito en otras especies vegetales y que demuestra la importancia biológica de este proceso (WATSON *et al.*, 2003). Otras proteínas identificadas correspondían a enzimas del metabolismo energético, enzimas del metabolismo del nitrógeno, enzimas de degradación de proteínas, enzimas del metabolismo de compuestos fenólicos, enzimas antioxidantes y proteínas de rutas de señalización (JORGE *et al.*, 2005a).

Análisis de la variabilidad analítica y biológica en el patrón de expresión proteico

Para conseguir la catalogación de genotipos o distinguir entre procedencias de encinas es necesario un análisis estadístico detallado previo de la variabilidad analítica (debido al procedimiento analítico) y biológica (diferencias entre muestras consideradas homogéneas) en la expresión de proteínas. En primer lugar, diseñamos un experimento para estudiar la variabilidad existente en el patrón proteico en hojas de un mismo árbol recogidas en las cuatro orientaciones geográficas (Norte, Sur, Este y Oeste) de la copa del árbol, y la variabilidad existente al recoger las hojas a distintas horas del día (mañana, mediodía y tarde) (JORGE *et al.*, 2005a). Además se analizó la variabilidad biológica entre árboles adultos (JORGE *et al.*, 2005a) y entre plántones de encina de una savia (JORGE *et al.*, 2004b). Nuestros resultados revelaron que *Q. ilex* presenta una mayor variabilidad, tanto cualitativa como cuantitativa, que la encontrada en otras especies vegetales (BURSTIN *et al.*, 1993; 1994), indicando la complejidad de los análisis proteómicos tanto en árboles adultos como en plántones, aunque cabe destacar que la variabilidad encontrada en el perfil proteico en plántones resultó ser menor que en árboles adultos (JORGE *et al.*, 2005b).

Caracterización de procedencias de encina

El análisis del patrón de expresión proteico en hojas de encina puede ser una herramienta muy útil a la hora de catalogar genotipos, líneas o procedencias de encinas. En una primera aproximación, hemos realizado un ensayo a partir de plántones de una savia de tres procedencias distintas de *Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp.: Alcarria y Serranía de Cuenca (Qi9), Región Extremadura-Sierra de San Pedro-Guadalupe (Qi11b) y Región Extremadura y Sierra Morena Occidental (Qi11e) (JIMÉNEZ *et al.*, 1996), cultivados en bandeja PLS-45/350 con sustrato turba-perlita (3:1, v/v) y en invernadero, encontrándose diferencias fácilmente observables, tanto cualitativas como cuantitativas, en la expresión de algunas proteínas entre procedencias (GÓMEZ-PINTO *et al.*, 2003). De los resultados obtenidos, cabe destacar la presencia de spots de proteínas característicos en las procedencias estudiadas, y otros que aparecen en distintos niveles de expresión aunque algunas de estas diferencias podrían no deberse tanto a las diferencias propias entre procedencias sino como consecuencia de variaciones ambientales que afecten a los niveles de expresión (JORRÍN-NOVO *et al.*, 2004). Un estudio similar se ha llevado a cabo con plántones de una savia de la Región Extremadura y Sierra Morena Occidental (Qi11e) y las procedencias Sierra Nevada-Filabres (Qi16a) y Sierras Béticas Orientales-Sierra de Segura (Qi15a) (JIMÉNEZ *et al.*, 1996), crecidos en bandeja PLS-45/350 con sustrato turba-perlita (3:1, v/v) y en una cámara de cultivo con condiciones controladas (25 °C/15 °C de temperatura (día/noche), 60-90 % de humedad relativa y 14-h de fotoperiodo a 360 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). También encontramos diferencias cualitativas en la

expresión de algunas proteínas que podrían distinguir las tres procedencias estudiadas (JORGE *et al.*, 2005c). Estos spots de proteínas podrían utilizarse como marcadores específicos para cada población, aunque es necesario un estudio más detallado para llegar a concretar qué proteínas serían marcadores moleculares de cada población y que pudiera permitir, para planta en vivero, el desarrollo de un criterio adecuado de selección entre distintas procedencias de una misma especie, basado en las condiciones del lugar de establecimiento (JORGE *et al.*, 2005b).

Identificación de proteínas de respuesta a estrés hídrico

Las repoblaciones forestales de encinas en áreas mediterráneas están condicionadas principalmente por el déficit hídrico. La identificación de proteínas de respuesta a estrés hídrico permitiría una mayor comprensión de las bases genéticas y los mecanismos moleculares de adaptación de esta especie forestal. Por ello, en nuestro laboratorio, hemos iniciado una serie de ensayos con plantones de encinas crecidos en condiciones controladas, para observar las diferencias en el patrón de expresión proteico cuando las plantas se someten a cortos periodos de sequía y su posterior tiempo de recuperación. En un avance de los primeros resultados podemos indicar que cuando mantenemos la planta durante 7 días sin riego se observan ya diferencias cualitativas en la expresión de algunas de sus proteínas; así, hay proteínas que aparecen *de novo* en las plantas sometidas a estrés y otras proteínas que dejan de expresarse y sólo se observan en las plantas con riego continuo (JORGE *et al.*, 2005c). Como continuación de este estudio, pretendemos identificar, mediante secuenciación *de novo* y comparación de la secuencia con las bases de datos, dichas proteínas asociadas a la respuesta temprana a estrés hídrico (JORGE *et al.*, 2005b). Ello nos permitirá establecer marcadores de tolerancia y criterios de selección de genotipos o procedencias de encinas de cara a actuaciones de repoblación forestal.

Estudios de control de *Phytophthora cinnamomi* en encina mediante el uso de fosfitos

Actualmente se sabe que el fungicida fosfito tiene una gran efectividad en el control de *Phytophthora cinnamomi* en diversas especies forestales, aunque se desconoce con exactitud cuáles son los mecanismos bioquímicos y el modo de acción de este compuesto (JACKSON *et al.* 2000). Hemos iniciado una serie de ensayos en los que pretendemos llevar a cabo estudios de dosis-respuesta, fitotoxicidad, translocación del fosfito, y vida media en la planta, así como su modo de acción (fungotoxicidad o activador de defensas de la planta). Previamente hemos puesto a punto un sistema hidropónico en cámara de cultivo con condiciones controladas, en el que se mantienen plantones de encina de una savia en solución nutritiva. Realizaremos una aplicación foliar de distintas dosis de fosfito y observaremos la evolución de los plantones a lo largo del tiempo, analizando su capacidad fotosintética, el contenido en clorofila y el nivel de supervivencia según la dosis administrada. Se realizarán varias tomas de muestra de hoja y raíz para analizar el contenido de fosfito mediante cromatografía de intercambio iónico y, a su vez, la producción de compuestos fenólicos por la planta como parámetro de referencia de inducción de respuestas de defensa por la planta. En una etapa posterior se realizarán ensayos de inoculación y protección

BIBLIOGRAFÍA

- ABRAMS, M.D.; 1990. Adaptation and responses to drought in *Quercus* species of North America. *Tree Physiology* 7: 227-238.
- BARRENCHÉ, T.; BAHRMAN, N. & KREMER, A.; 1996. Two dimensional gel electrophoresis confirms the low level of genetic differentiation between *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt) Liebl. *Forest Genetics* 3: 89-92.
- BERG, E.E. & HAMRICK, J.L.; 1993. Regional genetic variation in Turkey oak, *Quercus laevis*. *Canadian Journal of Forest Research* 23: 1270-1274.
- BURSTIN, J.; DE VIENNE, D.; DUBREUIL, P. & DAMERVAL, C.; 1994. Molecular markers and protein quantities as genetic descriptors in maize, I. Diversity among 21 inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 943-950.
- BURSTIN, J.; ZIVY, M.; DE VIENNE, D. & DAMERVAL, C.; 1993. Analysis of scaling methods to minimize the experimental variations in 2-DE PAGE quantitative data. Application to the comparison of maize inbred lines. *Electrophoresis* 14: 1067-1073.

- CÁNOVAS, F.M.; DUMAS-GAUDOT, E.; RECORBET, G.; JORRÍN, J.; MOCK, H.P. & ROSSIGNOL, M.; 2004. Plant proteome analysis. *Proteomics* 4:285-98.
- CASTRO-DÍEZ, P.; VILLAR-SALVADOR, P.; PÉREZ-RONTOMÉ, C.; MAESTRO-MARTÍNEZ, M. & MONSERRAT-MARTÍ, G.; 1997. Leaf morphology and leaf chemical composition in three *Quercus* (*Fagaceae*) species along a rainfall gradient in NE Spain. *Trees* 11: 127-134.
- CHAMRAD, D.C.; KÖRTING, G.; STÜHLER, K.; MEYER, H.E.; KLOSE, J. & BLÜGGEL, M.; 2004. Evaluation of algorithms for protein identification from sequence databases using mass spectrometry data. *Proteomics* 4: 619-628.
- COLLADA, C.; CABALLERO, R.G.; CASADO, R. & ARAGONCILLO, C.; 1991. Seed storage proteins in *Fagaceae*: Similarity between *Castanea globulins* and *Quercus glutelins*. *Plant Science* 75: 145-154.
- CRESCENTE, M.F.; GRATANI, L. & LARCHER, W.; 2002. Shoot growth efficiency and production of *Quercus ilex* L. in different climates. *Flora* 197: 2-9.
- DAMERVAL, C.; DE VIENNE, D.; ZIVY, M. & THIELLEMENT, H.; 1986. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* 7: 52-54.
- ELENA-ROSELLÓ, J.A.; LUMARET, R.; CABRERA, E. & MICHAUD, H.; 1992. Evidence for the hybridization between sympatric holm-oak and cork-oak in Spain based on diagnostic enzyme markers. *Vegetatio* 99/100:115-118.
- FOTELLI, M.N.; RADOGLU, K.M. & CONSTANTINIDOU, H.I.; 2000. Water stress responses of seedlings of four Mediterranean oak species. *Tree Physiology* 20: 1065-1075.
- GÓMEZ-PINTO, C.; ARIZA, D.; NAVARRO, R.M. & JORRÍN, J.; 2004. Two-dimensional gel electrophoresis as a tool to characterize and identify different oak (*Quercus ilex*) Spanish provenances. *International Meeting on Proteome Analysis*. Munich (Alemania).
- HÓDAR, J.A.; 2002. Leaf fluctuating asymmetry of holm oak in response to drought under contrasting climatic conditions. *Journal of Arid Environments* 52: 233-243.
- HOKANSON, S.C.; ISEBRANDS, J.G.; JENSEN, R.J. & HANCOCK, J.F.; 1993. Isoenzyme variation in oaks of the apostle islands in Wisconsin. Genetic structure and levels of inbreeding in *Quercus rubra* and *Quercus ellipsoidalis* (*Fagaceae*). *American Journal of Botany* 80: 1349-1357.
- JACKSON, T.J.; BURGESS, T.; CLOQUHOUN, I. & HARDY, G.E.S.; 2000. Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology* 49: 147-154.
- JIMÉNEZ, M.P.; DÍAZ-FERNÁNDEZ, P.; IGLESIAS, S.; DE TUERO, M. & GIL, L.; 1996. Las regiones de procedencia de *Quercus ilex* L. en España. Instituto Nacional para la Conservación de la Naturaleza, Madrid.
- JIMÉNEZ, P.L.; GIL, L. & PETIT, R.J.; 1999. Analysis of cpDNA variation in *Quercus suber* and *Q. ilex* populations. En: S. Espinel y D. Ritter (eds.), *International Scientific Congress Applications of Biotechnology to Forest Genetics*. Diputación Foral de Álava, Vitoria, pp. 141-142.
- JOBIDON, R.; CHARETTE, L. & BERNIER, P.Y.; 1998. Initial size and competing vegetation effects on water stress and growth of *Picea mariana* (Mill.). BSP seedlings planted in three different environments. *Forest Ecology and Management* 103: 293-305.
- JORRÍN NOVO, J.V.; NAVARRO CERRILLO, R.M.; JORGE, I.; GÓMEZ, C. & ARIZA MATEOS, D.; 2004. Aplicación de la proteómica a la caracterización de procedencias de *Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales* 17: 57-61.
- JORGE, I.; NAVARRO, R.M.; LENZ, C.; ARIZA, D.; PORRAS, C. & JORRÍN, J.; 2004a. Studies of leaf proteome from holm oak by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *VII Reunión de Biología Molecular de Plantas*. Málaga (España).

- JORGE, I.; NAVARRO, R.M.; LENZ, C.; ARIZA, D.; PORRAS, C. & JORRÍN, J.; 2004b. A proteomic approach to characterize and identify different holm oak (*Quercus ilex*) Spanish provenances. 6th Siena Meeting from Genome to Proteome. Siena (Italia).
- JORGE, I.; NAVARRO, R.M.; LENZ, C.; ARIZA, D.; PORRAS, C. & JORRÍN, J.; 2005a. The holm oak leaf proteome: Analytical and biological variability in the protein expression level assessed by 2-DE and protein identification tandem mass spectrometry *de novo* sequencing and sequence similarity searching. *Proteomics* 5: 222-234.
- JORGE, I.; NAVARRO, R.M.; LENZ, C.; ARIZA, D.; PORRAS, C. & JORRÍN, J.; 2005 b. Changes in the holm oak leaf proteome at different developmental stages, among provenances and in response to drought stress. *Proteomics* (en preparación).
- JORGE, I.; NAVARRO, R.M.; LENZ, C.; ARIZA, D.; PORRAS, C. & JORRÍN, J.; 2005c. Variation in the holm oak leaf proteome at different developmental stages, among provenances and in response to drought. *I Congreso de la Sociedad Española de Proteómica*. Córdoba (España).
- KOZLOWSKI, T.T.; KRAMER, P.J. & PALLARDY, S.G. (eds.); 1991. *The Physiological and Ecological Woody Plants*, Academic Press, New York, USA, p. 657.
- LAEMMLI, U.K.; 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- LEIVA, M.J. & FERNÁNDEZ-ALÉS, R.; 1998. Variability in seedling water status during drought within a *Quercus ilex* subsp. *ballota* population, and its relation to seedling morphology. *Forest Ecology and Management* 111: 147-156.
- LUMARET, R.; MIR, C.; MICHAUD, H. & RAYNAL, V.; 2002. Phylogeographical variation of chloroplast DNA in holm oak (*Quercus ilex* L.). *Molecular Ecology* 11: 2327-2336.
- PLA, M.; HUGUET, G.; VERDAGUER, D.; PUIGDERRAJOLS, P.; LLOMPART, B.; NADAL, A. & MOLINAS, M.; 1998. Stress proteins co-expressed in suberized and lignified cells and in apical meristems. *Plant Science* 139: 49-57.
- PONTON, S.; DUPOUEY, J.L.; BREDÁ, N. & DREYER, E.; 2002. Comparison of water-use efficiency of seedlings from two sympatric oak species: genotype x environment interactions. *Tree Physiology* 22: 413-422.
- PORULEVA, L.; VANDER VELDEN, K.; KOTHARI, S.; OLIVER, D.J. & CHITNIS, P.R.; 2001. The proteome of maize leaves: Use of gene sequence and expressed sequence tag data for identification of proteins with peptide mass fingerprints. *Electrophoresis* 22: 1724-1738.
- RAFFI, Z.A.; DOOD, R.S. & PELLEAU, Y.; 1993. Biochemical diversity and systematics of Mediterranean evergreen oak from South East France. *Biochemical Systematics and Ecology* 21: 687-694.
- RAFFI, Z.A.; ZAVARIN, E. & PELLEAU, Y.; 1991. Chemosystematic differentiation of quercus ilex and Q. rotundifolia based on acorn fatty acids. *Biochemical Systematics and Ecology* 19: 163-166.
- THIELLEMENT, H.; ZIVY, M. & PLOMION, C.; 2002. Combining proteomic and genetic studies in plants. *Journal of Chromatography B* 782: 137-149.
- VARELA, M.C.; 1993. Conservation of genetic resources of *Quercus* genera in Portugal. En: H.J. Muhs y G. von Wühlisch (eds.), *The Scientific Basis for the Evaluation of Genetic Resources of Beech*. Proceedings of an EC Workshop, Ahrensburg, Germany. Working Document of the EC, DG VI, Brussels, pp. 249-256.
- WATSON, B.S.; ASIRVATHAN, V.S.; WANG, L. & SUMNER, L.W.; 2003. Mapping the proteome of barrel medic (*Medicago truncatula*). *Plant Physiology* 131: 1104-1123.
- YACINE, A. & LUMARET, R.; 1989. Genetic diversity in holm oak (*Quercus ilex* L.). Insight from several enzyme markers. *Silvae Genetica* 38: 140-148.

