

APLICACIÓN DE LA PROTEÓMICA A LA CARACTERIZACIÓN DE PROCEDENCIAS DE *QUERCUS ILEX* L. SUBSP. *BALLOTA* (DESF.) SAMP.

A proteomic approach to characterize *Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp. provenances

J. V. Jorrín Novo¹, R. M^a Navarro Cerrillo², I. Jorge¹, C. Gómez¹ y D. Ariza Mateos²

¹ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. ETSIAM. Campus de Rabanales, Edificio Severo Ochoa (C6), planta baja. 14071-CÓRDOBA (España). Correo electrónico: bf1jonoj@uco.es

² Departamento de Ingeniería Forestal. ETSIAM. Avda. Menéndez Pidal s/n.14080-CÓRDOBA (España). Correo electrónico: ir1nacer@uco.es

Resumen

En el presente trabajo se presentan datos preliminares sobre la separación de proteínas de hoja de plantones de tres procedencias de *Quercus ilex* L. de la Península Ibérica mediante electroforesis bidimensional. Los geles 2-DE resultantes de las tres procedencias estudiadas mostraron 16 spots diferentes, siendo mayores las diferencias encontradas entre las procedencias Extremadura y La Alcarria respecto a la procedencia Sierra Morena. Se encontraron importantes diferencias cuantitativas en la expresión de la proteína RubisCO en la procedencia de Sierra Morena, aunque esta expresión diferencial podría ser debida a variaciones ambientales.

Palabras clave: *Sierra Morena*, *Proteínas*, *Electroforesis*, *Stress*

Summary

We have initiated a *Quercus ilex* proteome project. Protocols for protein analysis by 2-DE have been optimised as a first approach to investigate the leaf proteome in this specie. 2-DE gels from the three studied provenances (Extremadura, Sierra Morena and La Alcarria) showed differences in 16 spots. Some of them were specific of provenance and might be used as molecular markers for such population.

Key words: *Sierra Morena*, *Proteins*, *Electroforesis*, *Stress*

INTRODUCCIÓN

Las técnicas moleculares aplicadas a la ecofisiología forestal no estaban muy desarrolladas, debido quizá a la mayor complejidad de estos sistemas. Sin embargo, la biología molecular aplicada a estudios ecofisiológicos está cobrando cada

vez mayor importancia y el desarrollo de esta tecnología y, en particular, el estudio de proteínas de especies forestales es un campo que requiere de un importante esfuerzo de investigación.

La aproximación proteómica constituye, hoy en día, una herramienta de gran utilidad en investigaciones biológicas, ya que no sólo per-

mite profundizar en el conocimiento de los seres vivos, sino que también tiene importantes aplicaciones prácticas. Mediante dicha aproximación pretendemos establecer el patrón de expresión proteico que caracteriza a un organismo, órgano, tejido o célula, estado de diferenciación o desarrollo como respuesta a unas particulares condiciones ambientales. Mientras que el genoma es invariable, el proteoma es tremendamente dinámico. El desarrollo de la proteómica ha sido posible gracias al avance en técnicas de separación de proteínas (electroforesis bidimensional y cromatografía multidimensional), de caracterización por espectrometría de masas y de herramientas de bioinformática, y va parejo a la disponibilidad de bases de datos de secuencias genómicas o ESTs. Una descripción detallada de la situación actual de la proteómica vegetal aparece recogida en la revisión de CÁNOVAS et al. (2003).

La investigación sobre la identificación, la abundancia y la función que desarrollan en plantas de interés forestal, tales como *Quercus ilex*, proteínas ya estudiadas en otras especies podría permitir no sólo un mejor conocimiento de sus procesos vitales sino el 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 o la identificación de respuesta a estreses. Además, en el cultivo de planta en vivero, podría permitir el desarrollo de un óptimo criterio de selección entre distintas procedencias de una misma especie, basado en las condiciones del lugar de establecimiento.

Nuestros grupos de investigación han iniciado recientemente un proyecto de caracterización del proteoma de *Quercus ilex* con un doble objetivo:

- i) Caracterizar el patrón proteico de diferentes procedencias en un intento de establecer diferencias entre ellas;
- ii) Identificar y caracterizar proteínas de respuesta a estrés, especialmente de respuesta a patógenos y a sequía

En el presente trabajo se presentan datos preliminares sobre la separación de proteínas de hoja de plántones de *Quercus ilex*, pertenecientes a tres procedencias de la Península Ibérica, mediante electroforesis bidimensional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El ensayo se ha realizado a partir de brinzales de una savia de tres procedencias distintas de *Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp. suministrada por Viveros Genfora. Las procedencias seleccionadas fueron: Alcarria y Serranía de Cuenca (Qi9), Región Extremadura-Sierra de San Pedro-Guadalupe (Qi11b) y Región Extremadura-Sierra Morena Occidental (Qi11e) (JIMÉNEZ et al., 1996). El cultivo se llevó a cabo en bandeja PLS-45/350 con sustrato turba-perlita (3:1, v/v).

Electroforesis bidimensional

Las diferentes etapas del proceso de electroforesis bidimensional se esquematizan en la figura 1. La muestra inicial se prepara a partir de hojas lavadas y congeladas en nitrógeno líquido almacenadas a -80°C hasta su procesado. El método de extracción de proteínas se realizó mediante precipitación con TCA-acetona (DAMERVAL et al., 1986). Las proteínas se solubilizaron en tampón que contenía Urea 8 M, CHAPS 2 %, IPG-buffer 0,5 %, DTT 20 mM. La concentración de proteína se determinó usando el kit RC-DC Protein Assay (Bio-Rad).

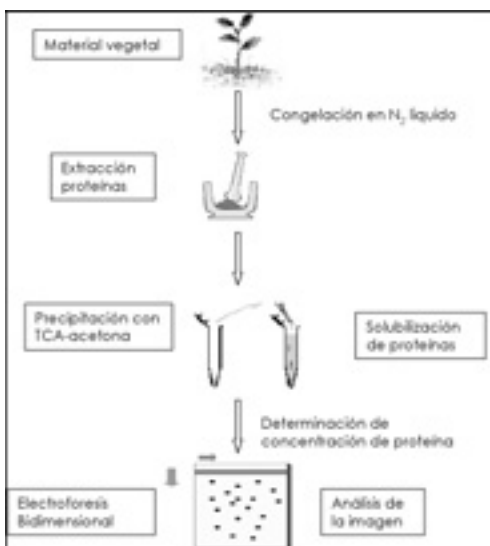


Figura 1. Esquema del proceso de extracción, solubilización y electroforesis bidimensional de proteínas de hoja.

La primera dimensión, IEF, se llevó a cabo en tiras de 17 cm con un gradiente lineal de pH 5-8 (IPG strips, Bio-Rad). La segunda dimensión, SDS-PAGE, se realizó sobre geles de poliacrilamida al 12 % (GÖRG *et al.*, 1987). Los geles se tiñeron con Coomassie o plata. Finalmente se capturó la imagen del gel con un densitómetro GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad) y se analizó con el paquete informático PDQuest™ (Bio-Rad).

RESULTADOS

Los geles 2-DE resultantes teñidos con Coomassie de plantones de las tres procedencias

estudiadas muestran diferencias en 16 spots (Figura 2; Tabla1), siendo mayores las diferencias encontradas entre las procedencias Extremadura y La Alcarria respecto a la procedencia Sierra Morena. Estos resultados fueron corroborados con tinciones de plata.

Se encontraron spots característicos de procedencia, como el caso del spot nº 13 de Sierra Morena, o el spot nº 16 de La Alcarria, no encontrándose ningún spot característico de Extremadura, aunque cuantitativamente el spot nº 5 se encuentra en mayor cantidad en esta procedencia que en el resto (Figura 2, Tabla1).

Algunas de las proteínas teñidas con Coomassie fueron identificadas por MALDI-

Nº spot	Mr experimental	pI experimental	Extremadura	La Alcarria	Sierra Morena
1	45	6,35	+	+	-
2	20,5	6,65	+	+	-
3	14,5	7,25	-	+	+
4	33	5,7	-	+	+
5	21	6,1	—	—	—
6	50	6,85	-	+	+
7	50	6,7	-	+	+
8	75	6,8	-	+	+
9	60	6,8	-	+	+
10	60	6,9	-	+	+
11	45	7,1	-	+	+
12	16	5,65	+	-	+
13	21,3	6,15	-	-	+
14	24,5	6,8	+	+	-
15	24	6,65	-	+	+
16	36,5	7,2	-	+	-

Tabla 1. Relación de proteínas expresadas diferencialmente en las distintas procedencias utilizadas

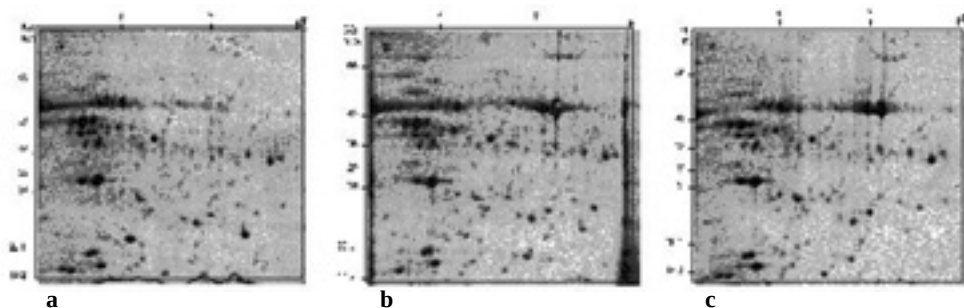


Figura 2. Electroforesis bidimensional de muestras de hoja de plantones de encina de las siguientes procedencias: (a) Extremadura, (b) la Alcarria, (c) Sierra Morena

TOF-espectrometría de masas, después de su digestión con tripsina. Las masas peptídicas, junto con los pesos moleculares y puntos isoelectrónicos fueron utilizados para la búsqueda en la base de datos NCBIInr utilizando el paquete informático Mascot™. Así, los spots nº 6 y 7, fueron identificados como la subunidad larga de la enzima Ribulosa bifsosfato carboxilasa (RubisCO). Se encontraron importantes diferencias de expresión de esta enzima en una de las procedencias (Sierra Morena), aunque esta diferencia no debe ser atribuida a la procedencia si no mas bien, a variaciones ambientales que afectan al nivel de expresión de la RubisCO.

DISCUSIÓN

La electroforesis bidimensional es una técnica que permite discriminar entre procedencias de encinas. Hasta el momento los ensayos realizados han servido para optimizar los protocolos de extracción de proteínas y poner a punto las técnicas que permitieran definir los patrones de expresión proteica en hojas de encina. Gracias a la aplicación de esta metodología, fue posible el estudio de esos patrones proteicos, encontrándose diferencias entre procedencias, fácilmente observables. De los resultados obtenidos, cabe destacar la presencia de spots característicos en las procedencias estudiadas, y otros que aparecen en distintos niveles. Algunas diferencias podrían utilizarse como marcadores específicos para cada población, aunque otros, podrían no deberse tanto a las diferencias propias de la procedencia como a otras aparecidas como consecuencia de variaciones ambientales que afectan a los niveles de expresión proteicos. Existen otros trabajos que indican el alto grado de polimorfismo existente en encina, realizados usando indicadores enzimáticos (RAFIÍ et al., 1993) y anatómicos, en una misma población y entre diferentes poblaciones (CASTRO-DÍEZ et al., 1997; NADER, 1990). De todas las proteínas resultantes de las electroforesis, se han identificado algunas que presentan patrones de variación, como es el caso de la RubisCO. Éste enzima cumple un papel fundamental en el proceso de fotosíntesis, por lo que su ausencia, tiene que ser interpretada como el resultado de alguna variación ambiental impor-

tante y no como una ausencia real de esta enzima en las plantas de esa procedencia.

El trabajo de investigación continúa en lo que hace referencia a la caracterización del proteoma de hojas de *Quercus*. El perfil de proteínas 2-DE de hoja de encina mostró una gran variabilidad, cuantitativa y cualitativa, tanto analítica como biológica, indicando la complejidad del estudio del proteoma en árboles adultos de esta especie forestal (JORGE et al., 2004). Este análisis estadístico de la expresión de proteínas en hoja es necesario para futuros estudios del proteoma de encina y su uso para catalogar genotipos, líneas o procedencias. Es este trabajo también se llevó a cabo la identificación de las proteínas mayoritarias mediante secuenciación de novo y comparando la secuencia con bases de datos de secuencias de proteínas de otras especies vegetales, ya que ni el genoma ni el proteoma de *Q. ilex* ha sido caracterizado en profundidad.

En cualquier caso, el desarrollo de estos ensayos nos ha permitido una primera aproximación a las técnicas y como éstas pueden ser aplicables a sectores prácticos como la determinación de calidad final de planta. En definitiva, alcanzar un mejor conocimiento del estado de la planta así como su respuesta ante determinados estímulos o situaciones de estrés y desarrollar en consecuencia un óptimo criterio de selección entre distintas procedencias de una misma especie, basado en las condiciones del lugar de establecimiento, a la hora de planificar cualquier actuación de restauración forestal.

BIBLIOGRAFÍA

- CANOVAS, F.M.; DUMAS-GAUDOT, E.; RECOBERT, G.; JORRÍN, J.; MOCK, H.P. & ROSSIGNOL, M.; 2004. Plant proteome analysis. *Proteomics* 4:285-298.
- 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.
- DAMERVAL, C.; DE VIENNE, D.; ZYVI, M. & THIELLEMENT, H.; 1986. Technical improve-

- ments two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* 7: 52-54.
- GÖRG, A.; POSTEL, W.; WESER, J.; GÜNTHER, S.; STRAHLER, J.R.; HANASH, S. & SOMERLOT, L.; 1987. Elimination of point streaking on silver stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer. *Electrophoresis* 8: 122-124.
- JIMÉNEZ, M.P.; DÍAZ-FERNÁNDEZ, P.; IGLESIAS, S.; DE TUERO, M. Y GIL, L.; 1996. *Las regiones de procedencia de Quercus ilex L. en España*. Instituto Nacional para la conservación de la Naturaleza. Madrid.
- JORGE, I.; NAVARRO, R.M.; LENZ, C.; ARIZA, D.; PORRAS, C. & JORRÍN, J.; 2004. 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 sequence similarity searching. *Proteomics* (en prensa).
- NADER, S.; 1990. *Contribution à l'étude structural des phytocinoses ligneuses méditerranéennes. Aspects écologiques et biochimiques*. Ph. D. Thesis. Université Aix-Marseille III. 295 pp.
- RAFII, Z.A.; DODD, R.S. & PELLAU, Y.; 1993. Biochemical diversity and systematics of Mediterranean evergreen oak from South East France. *Bioch. Sist.. Ecol.* 21: 687-694.