



INFORME FINAL DEL PROYECTO

Título de la Investigación: Determinación de la variabilidad poblacional y la resistencia y/o tolerancia a la sequía de *Pinus occidentalis* Swartz en la Republica Dominicana, mediante de técnicas ómicas (proteómica).

Responsable del Proyecto: Luis Enrique Rodríguez de Francisco,
M.Sc.

Noviembre 2014

Título de la Investigación:

Determinación de la variabilidad poblacional y la resistencia y/o tolerancia a la sequía de *Pinus occidentalis* Swartz en la Republica Dominicana, mediante de técnicas ómicas (proteómica).

Responsable del Proyecto_(Investigador/a principal)

Luis Enrique Rodríguez de Francisco, M.Sc.

Objetivos**Objetivos Principal.**

Determinar la variabilidad poblacional y la resistencia y/o tolerancia a la sequía de *Pinus occidentalis* Swartz en la Republica Dominicana, mediante de técnicas ómicas (proteómica).

Objetivos específicos.

- ✓ Determinar la variabilidad intra e interpoblacional, mediante marcadores moleculares, proteotipado de poblaciones.
- ✓ Analizar mediante técnicas de proteómica la respuesta a estrés por sequía.
- ✓ Determinar la estructura poblacional de *P. occidentalis* en la isla.

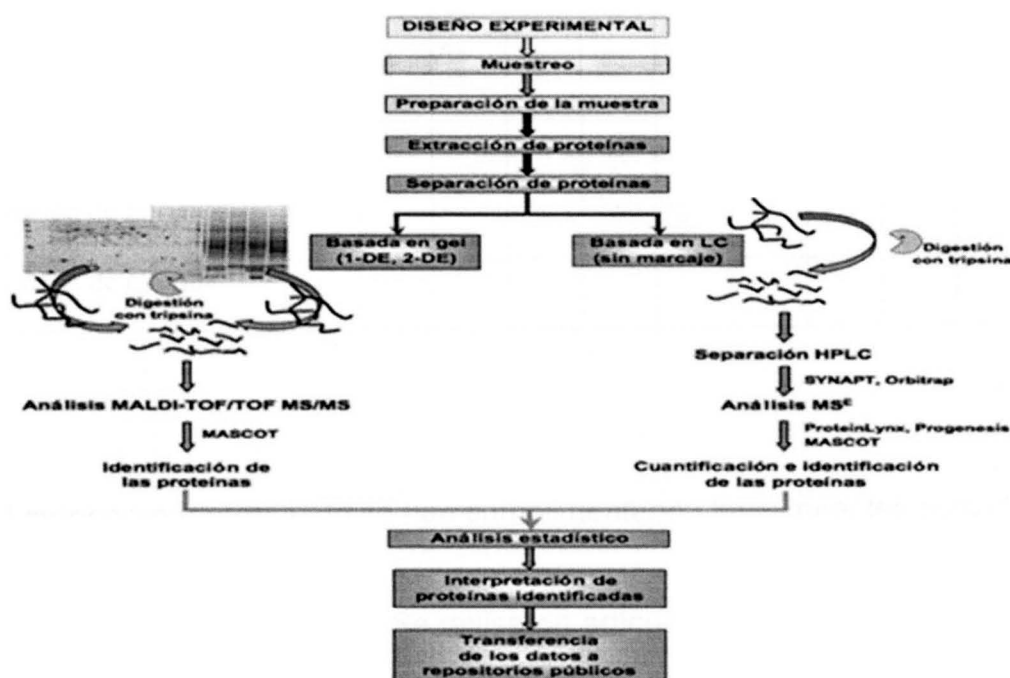
Introducción

La proteómica se encarga de estudiar el proteoma de los diferentes seres vivos, entendiendo éste como el conjunto de todas y cada una de las proteínas presentes en una unidad biológica (fracción subcelular, célula, tejido, órgano, organismo) en un tiempo (estadio de diferenciación y desarrollo) bajo condiciones ambientales determinadas. La proteómica constituye, hoy en día, un área de investigación prioritaria en cualquier proyecto biológico, y la investigación vegetal no es una excepción. Los estudios de proteómica permiten identificar a priori el conjunto de todas y cada una de las proteínas de un sistema biológico y entre ellas aquellas directamente relacionadas con factores de productividad, valor nutricional, marcadores de genotipos, procedencias y respuestas a estreses bióticos y abióticos. Además, dichos estudios permiten la identificación de alérgenos plantas de especies herbáceas, como queda reflejado en las revisiones realizadas sobre el tema. La mayoría de los estudios de proteómica de especies vegetales se han llevado a cabo en herbáceas, (Castillejo, 2006).

Como técnica, la proteómica ha demostrado ser útil en la caracterización de genotipos, a través del estudio de las proteínas, además ha permitido establecer distancias genéticas y relaciones entre líneas, especies y géneros. Junto con lo anterior, la proteómica se ha utilizado fundamentalmente en el estudio de la respuesta a estreses incluyendo la sequía. En especies forestales destacan aquellos trabajos realizados en los géneros *Populus* y *Pinus*.

El uso de la proteómica en el estudio del género *Pinus* es prácticamente novedoso, debido a que los primeros trabajos que se realizaron fueron en el 2004. Desde un punto de vista metodológico, un experimento típico incluye las siguientes etapas: i) obtención de un extracto, generalmente mediante métodos de precipitación (TCA-acetona y TCA-fenol); ii) separación de proteínas por electroforesis mono- y bidimensional, tinción de geles (Coomassie coloidal), análisis de imágenes (PD-Quest), comparación del mapa proteico e identificación de bandas/spots diferenciales; iii) análisis por espectrometría

de masas (por ejemplo, MALDI-TOF/TOF MS/MS) de fragmentos peptídicos obtenidos tras la digestión con tripsina; iv) identificación de proteínas por búsqueda en base de datos (por ejemplo, UniProt) a partir de datos de huella peptídica (PMF o espectros MS) o espectros de fragmentación (MS/MS) utilizando motores de búsqueda (por ejemplo, MASCOT) (Figura 1) . (Valledor et al.; 2010).



El *Pinus occidentalis* es la principal especie comercial en República Dominicana y su distribución se encuentra por casualidad en las cuencas hidrográficas más importantes para la región, el manejo del *P. occidentalis* tiene un impacto en la calidad de vida de los habitantes de la República Dominicana. Sin embargo, como en la mayoría de los países tropicales, el país ha perdido la mayor parte de su cubierta forestal debido a una gestión inadecuada en las áreas forestales, perdiendo en el proceso, la diversidad biológica, así como el potencial forestal. (López, 2009).

Avances según Cronograma de ejecución.

Cronograma (unidad de tiempo: meses; justificación de la duración del proyecto si es necesario)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Toma de muestras	X		X		X						
Puesta a punto de la metodología de extracción y purificación de proteínas		X	X	X	X	X					
Cuantificación y análisis de las muestras					X	X	X	X	X	X	
Realización de informes parciales						X					
Realización de informe final											X

Según el cronograma propuesto se han cumplimentando las siguientes actividades:

- ✓ Estudio del estado del arte: Se revisaron artículos científicos en la base de datos de revistas indexadas, se solicitaron papers de la temática y se posee el libro sobre Proteómica Vegetal (en Edición)
- ✓ Toma de muestras: Se tomaron muestras de polen y semillas de *P. occidentalis*.
- ✓ Se extrajeron las proteínas de semillas y polen y se cuantificaron las mismas mediante las pruebas de Bradfor.
- ✓ Se han realizado los informes correspondientes al proyecto.

De forma general los resultados que se esperaban en el proyecto se cumplieron en un 100%.

Metodología

Estudio de la variabilidad mediante marcadores moleculares: proteotipado de poblaciones.

Proteotipado.

Se llevará a cabo el análisis del perfil proteico de muestras de polen y semillas mediante proteómica basada en electroforesis mono y bidimensional acoplada a espectrometría de masas, según el procedimiento descrito en (Valero et al. 2012b).

Análisis proteómico de la respuesta a estrés por sequía

La selección se hará sobre la base del fenotipo (crecimiento, y parámetros fisiológicos), tal y como plantea, (Sghaier-Hammami et al. 2012). El estudio de respuesta a estrés abiótico por sequía se hará mediante protocolos desarrollados por (Echevarría-Zomeño et al. 2012).

Material vegetal

Las plantas de *P. occidentalis* utilizadas en este ensayo se cultivaran utilizando semillas de la cinco procedencias y se cultivaran en envase Forest-pot 300® con sustrato de turba y perlita (3:1 v/v), (μ inicial= $15,45 \pm 1,98$; σ inicial = $1,97 \pm 0,27$). El ensayo se llevara a cabo en una cámara de cultivo, en condiciones controladas con una temperatura constante de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, una humedad relativa del 60 ± 5 % y un fotoperiodo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. El ensayo se prolongará durante un período de 42 días con distintos tratamientos de riego y no riego. El riego, en los tratamientos que lo requieren se realiza cada dos días. El número de plantas por tratamiento será de 92, con un total, para todo el ensayo de 368 plantas.

Diseño experimental

El diseño experimental se realizará para evaluar la respuesta de las plantas a estrés hídrico y ver la posible recuperación, así como los mecanismos moleculares que se

generan en los diferentes tratamientos. Con el objetivo de estudiar la respuesta molecular a corto y medio plazo, el ensayo evaluara el estrés hídrico a los 14, 21, 28 y 35 días con posterior recuperación (Costa et al., 2003), con una duración del experimento completo de 42 días, el que se repetirá por dos ocasiones. Las plantas se dividirán en cuatro tratamientos:

- T0: Tratamiento sin estrés. Las plantas de este grupo se usan como control. Estas plantas se mantienen en condiciones de humedad edáfica óptimas con un riego regular durante todo el experimento.
- T1: Tratamiento moderado de estrés con posterior recuperación. Las plantas de este grupo no se regaran en los primeros 14 días del experimento. El día 15 del experimento se comenzaran a regar para su recuperación hasta el día final del ensayo.
- T2: Tratamiento severo de estrés con posterior recuperación. Las plantas de este grupo no se regaran en los primeros 28 días del experimento. El día 29 del experimento se comenzaran a regar para su recuperación hasta el fin del ensayo.
- T3: Tratamiento muy severo de estrés con posterior recuperación. Las plantas de este grupo no se regaran en los primeros 35 días del experimento. El día 36 del experimento se comenzaran a regar para su recuperación hasta el día 42.

A lo largo del ensayo se evaluara semanalmente la supervivencia, el potencial hídrico del xilema al amanecer (ψ_{xa}) (Cámara de Scholander SKPM 1400, Skye Instruments) y la fluorescencia de la clorofila (Fluorímetro Plant Efficiency Analyser PEA, Hansatech Instruments) como medida indirecta de la capacidad fotosintética a través de la relación F_v/F_m (P_{HiP0}) y la eficiencia fotosintética (P_{HiE0}). También se cuantifica el contenido relativo de agua, tanto por bandeja, mediante el pesado de las mismas, así como por cepellón y parte aérea. Además, se realizaran tomas de muestras para la extracción de proteínas, en cada una de las unidades experimentales y para los cuatro tratamientos en los días 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42, con el fin de conocer el estado proteico de las plantas y su relación con el estado fisiológico. De cada planta se separa la parte radical de la parte aérea, y de ésta a su vez se separaran todas las acículas del tallo. Las acículas se lavaran, se congelaran en nitrógeno líquido y se almacenaran a -80°C hasta la extracción de proteínas.

Electroforesis bidimensional.

Las proteínas serán extraídas utilizando 0,4 g de ácicula del material de partida mediante precipitación con TCA-fenol (WANG et al., 2006). Una vez extraídas, las proteínas se solubilizan en tampón con Urea 8M, Chaps al 2%, DTT 20 mM y anfolitos al 0,5% (Bio-Rad), además de 0,001% de bromofenol. Una vez extraídas y solubilizadas, las proteínas tienen que ser separadas para su posterior cuantificación y visualización. La técnica de electroforesis bidimensional de alta resolución (2DE) permite la separación, detección y cuantificación de proteínas de una muestra mediante la combinación de dos métodos electroforéticos de separación. La primera dimensión (IEF) se realizó en tiras de 17 cm con un gradiente lineal de pH 5-8 (IPG strips, Bio-Rad) con un PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad) usando una corriente constante de 50 mA por tira de gel desde los 250 V iniciales hasta los 10000 V a los que llega finalmente y la segunda dimensión se realiza sobre un gel de SDS poliacrilamida (SDS PAGE) al 13% usando el equipo Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad). El voltaje a emplear es de 60 mA constantes por gel durante 12 horas aproximadamente. Posteriormente los geles se tiñen con Coomassie Brilliant Blue G-250, y se digitalizan mediante escaneado con un densitómetro (GS-800, Bio-Rad) para su posterior análisis mediante la aplicación informática PDQuesttm (Bio-Rad) (Castillejo et al. 2006). Las proteínas seleccionadas como marcadores de estrés se identificarán por el servicio central de apoyo a la investigación (SCAI)-Universidad de Córdoba

Tratamiento y análisis de los datos.

Los geles se analizarán en valores de volumen normalizado de los spot mediante el paquete estadístico SPSS 13.0. Para la posterior identificación de proteínas diferenciales se elegirán los spots en función de su presencia o ausencia en todas las réplicas (spot cualitativos) o diferencias en el valor del volumen normalizado (spot cuantitativos) (Jorge et al., 2005).

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE PROTEINAS

METODO DEL TCA/FENOL (Electroforesis 2006,27, 2782-2786)

- 1) Macerar 2g de hojas en nitrógeno líquido (repetir la maceración tres veces).
IMPORTANTE: Mantener la muestra durante todo el protocolo en frío (hielo).
- 2) Añadir 2 mL de Solución 1, **TCA 10% Acetona**, (conservado a -20°C). Vortex + Inversión (Sonicar durante 10 segundos subiendo poco a poco la intensidad).
- 3) Centrifugar a 4°C a 12000rpm durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante y recuperar el pellet.
- 4) Añadir 2 mL de Solución 2, **Acetato Amónico 0,1 M en Metanol 80%**, al pellet (conservado a -20°C). Vortex + Inversión.
- 5) Centrifugar a 4°C a 12000rpm durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante y recuperar el pellet.
- 6) Añadir 2 mL al pellet de Solución 3, **Acetona 80%**, (conservado a -20°C). Vortex + Inversión.
- 7) Centrifugar a 4°C a 12000rpm durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante y recuperar el pellet. Dejar secar al aire.

A partir de este paso trabajar en CAMPANA

- 8) Añadir 600µL de Solución 5 (**SDS Buffer**) al pellet y mezclar bien . Añadir la Solución 4 (**Phenol pH8 Sigma**)Mezclar e incubar 5 minutos en frío.
- 9) Centrifugar a 4°C a 12000rpm durante 10 minutos.
- 10)Transferir la parte fenólica a un nuevo tubo (la parte superior) y añadirle 2 mL de **Buffer de precipitación** (conservado a -20°C).
- 11)Se deja precipitar 10 minutos a -20°C u overnight a -20°C.
- 12)Centrifugar a 4°C a 12000rpm durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante y guardar el pellet.
- 13)Lavar el pellet una vez con **Metanol 100%** (conservado a -20°C). Dispersar y luego centrifugar a 4°C a 12000rpm durante 10 minutos.
- 14)Lavar el pellet una vez con **80% Acetona** (conservado a -20°C). Dispersar y luego centrifugar a 4°C a 12000rpm durante 10 minutos. Dejar secar.

15) Se bota el sobrenadante y se solubiliza durante dos horas el pellet en 200µL de **Medio de solubilización** usado en el protocolo de extracción con Fenol.

Soluciones y reactivos

Solución 1: Acetona 10% TCA

Solución 2: 0.1 M Acetato amónico en metanol 80%

Solución 3: 80% Acetona

Solución 4: Phenol pH8 sigma

Solución 5: SDS Buffer

Buffer precipitación: Metanol 0.1M acetato amónico

SDS Buffer: 30% sacarosa, 2% SDS, 5%βmercapto, Tris pH8 0.1M (ref. artículo: Protein extracción for two-dimensional Electrophoresis from olive leaf..., Wang y al., electrophoresis 2003,24,2369-2375)

Medio de solubilización: Urea 7M, Thiourea 2M, CHAPS 4%, Triton x100 2%, DTT 100mM (se añadirá los anfóteros y el azul de bromofenol a la hora de realizar la segunda dimensión y no se añadira tritón)

GEL SDS_PAGE 12%, GRANDE

SEPARADOR

	1 GEL	2 GELES
H₂O np	20.25 mL	40.5 mL
Acrilamida 30%	24 mL	48 mL
Tampón Tris pH 8.8	15 mL	30 mL
SDS 10%	0.6 mL	1.2 mL
APS	312 µL	625 µL
Temed	31 µL	62 µL

CONCENTRADOR

	1 GEL	2 GELES
H ₂ O np	10.5 mL	21 mL
Acrilamida 30%	3 mL	6 mL
Tampón tris pH 6.8	4.5 mL	9 mL
SDS 10%	180 μ L	360 μ L
APS	90 μ L	180 μ L
Temed	18 μ L	36 μ L

Gel 2DE pequeño

1^{era} dimensión

Rehidratación de la Tira de 7 cm (cargar desde 60 μ g de proteínas).

- En un volumen final de 200 μ L: μ L de muestra necesarios para X μ g de proteína, y completar hasta 200 μ L de volumen final con solución de rehidratación.
- Ubicar muestra más solución de rehidratación en pocillo entre los electrodos
- Quitar la cubierta protectora del gel que viene en la tira.
- Ubicar la tira de manera que el gel quede en contacto con la muestra y en el sentido de la Polaridad que corresponde (indicado en el pocillo y en los extremos de la tira).
- *Eliminar las burbujas entre la tira y la muestra.*
- Agregar 1 mL de aceite mineral sobre la tira puesta en el pocillo.

Preparación de la solución de rehidratación

- 7M Urea.
- 2M Tiourea.
- 4% CHAPS.
- 0.01% Azul de bromofenol.
- 0.2% de anfolitos (se agrega en el momento).
- 100 mM DTT (se agrega en el momento).

Programa en equipo Protean IEF

- Rehidratación activa a 50 volt por 12 horas con pausa para adicionar papeles filtro en ambos extremos de las tiras (entre la tira y el electrodo).
- 1.- 0 – 40000 voltios (10000 voltios / hora)
- 2.- mantenimiento a 500 voltios rapad 99:00 horas a 20°C.
- Tiras probadas: 3-10, 3-10 NL, 4-7 y 5.8.

Al término del isoelectroenfoque

- Sacar la tira del pocillo y eliminar exceso de aceite mineral ubicándola cuidadosamente de costado en papel filtro limpio.
- Lavar 3 veces con tampón de carrera para eliminar el aceite mineral.
- Añadir 2 mL de "Tampón de equilibrio 1" que contiene 2% de DTT (adicionado en el momento).
- Agitar por 10 minutos.
- Lavar 3 veces con tampón de carrera para eliminar Tampón anterior.
- Añadir 2 mL de "Tampón de equilibrio 2" que contiene 2.5% de Iodoacetamida (adicionado en el momento).
- Agitar por 10 minutos.
- Lavar 3 veces con tampón de carrera para eliminar Tampón anterior.

2^{da} dimensión

Ubicación de la tira en gel SDS_PAGE

- Prepara previamente un gel SDS_PAGE pequeño sin gel concentrador dejando espacio suficiente para agregar la tira.
- Derretir agarosa preparada previamente que contiene Azul de Bromofenol pH.
- Ubicar la parte plástica de la tira en contacto con el vidrio que contiene los separadores en dirección de pH de menor a mayor; de izquierda a derecha.
- Agregar a la izquierda un papel filtro con 5 μ L de Estándar de peso molecular de proteína (dejar levemente separado de la tira).
- Agregar en el espacio sobrante la agarosa derretida.
- Esperar que la agarosa esté sólida para correr el gel.

Resultados

Se obtuvo por primera vez para *Pinus occidentalis*, la cuantificación proteínica a partir de las semillas y el polen determinando que en el caso de las semillas estas poseen un promedio que oscila entre 24 y 37 mg/g de peso seco, lo que nos demuestra la gran cantidad de proteínas totales que posee el piñon o semillas de Pino.

La separación de proteínas vegetales por electroforesis bidimensional tiene las mismas limitaciones que las encontradas para proteínas de otros orígenes. Hay que resaltar no obstante que el estudio de proteomas vegetales ha contribuido significativamente a demostrar que principalmente las proteínas hidrofóbicas escapan al análisis por electroforesis bidimensional (Santoni y col., 1998; Santoni y col., 1999a). Los procedimientos aceptados para la extracción selectiva de proteínas hidrofóbicas, tales como la separación de fases del Triton X-114, no encuentran continuidad en la incorporación y resolución de dichas proteínas en geles bidimensionales (Santoni y col., 1999b).

Junto a la identificación de nuevas proteínas, una tarea importante en proteómica concierne a la organización de los datos generados en bases de datos. Hasta el año 2001 se habían introducido dos bases de datos dedicadas a proteomas vegetales. La base de datos de pino marítimo constituye la primera base de datos pública de una especie forestal (Costa y col, 1999) <http://www.pierroton.inra.fr/genetics/2D/>. La otra, que incluye datos publicados previamente sobre el proteoma de la membrana plasmática de *Arabidopsis* (Santoni y col., 1998), ofrece además opciones bioinformáticas ampliadas de acceso y descarga de datos (Sahnoun y col, 2000). Actualmente el número de bases de datos va creciendo a medida que avanzan los proyectos proteómicos. Dichos desarrollos van a jugar con toda seguridad un papel clave en la explotación de la enorme cantidad de datos que empieza a producirse por proyectos de investigación de proteómica funcional.

A nivel transcriptómico, técnicas como los microarreglos generan grandes volúmenes de información con respecto a la expresión de transcritos. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que un gen no es equivalente a un transcrito y un transcrito no es equivalente a una proteína (Peck, 2005). Es por esto que resultados transcriptómicos deben ser interpretados cautelosamente ya que los niveles de mRNA y de proteína no están claramente relacionados (Gygi et al., 1999). Además de esta desviación sistemática, la discrepancia entre niveles de mRNA y proteínas es causada naturalmente por la regulación post-transcripcional, que no está distribuida uniformemente entre tejidos ni tipos celulares vegetales. Por estas razones estudios transcriptómicos no proveen información fidedigna sobre la expresión y abundancia de las proteínas.

Además de esto, por la gran heterogeneidad de las propiedades fisicoquímicas de las proteínas expresadas en un momento dado en la célula, las proteínas son mucho más difíciles de aislar, manipular e identificar que el mRNA y no existen técnicas comparables al PCR para amplificar proteínas de baja abundancia. Avances recientes en espectrometría de masas, estandarización de los métodos de separación y en la disponibilidad de bases de datos con información de expresión para especies forestales, han significado potenciar la proteómica transformándola en una herramienta eficiente en la identificación de un gran número de proteínas. Sin embargo, la Proteómica tiene aún serias limitaciones:

- La presencia de sustancias interferentes durante el proceso de extracción (lípidos, ácidos nucleicos, carbohidratos), sumado en plantas a la extracción de proteasas, polifenoles, taninos, pigmentos , lignina y ceras (Carpentier et al., 2005).
- A diferencia de los tejidos animales, las células vegetales se encuentran rodeadas de una pared celular, complicando la extracción.
- Los organelos celulares (mitocondria , cloroplastos, etc.) tienen cada uno su proteoma.
- En tejidos verdes la presencia de una gran cantidad de RuBisCO, puede distorsionar los patrones electroforéticos. La existencia de proteínas abundantes

propone desafíos al rango dinámico de detección para proteínas poco abundantes. En proteínas de semillas existen problemas análogos por la abundancia de proteínas de reserva.

Hasta la fecha, la composición química de las semillas de pino se ha estudiado poco y los datos que se han documentado son bastante variables. En esta dirección, se ha usado la metodología NIRS para determinar un análisis completo de la composición química de la harina de la semilla haciendo énfasis en la comparación, catalogación y caracterización de las poblaciones estudiadas. Los resultados obtenidos demostraron que existen diferencias significativas en cuanto a la composición química entre las poblaciones analizadas.

Los datos obtenidos de los compuestos químicos analizados fueron similares a los trabajos previos publicados en semillas de pino. Sin embargo, los contenidos de grasa total y de los ácidos grasos oleico fueron relativamente más elevados a los contenidos observados por otros autores, mientras que los de ácido linoleico fueron más bajos que los encontrados por otros autores.

Los resultados obtenidos en dichos estudios no permiten concluir claramente si la variabilidad en la composición química es debida a la composición genética o al medio ambiente donde se desarrollan las poblaciones; sin embargo, está claro que el medio ambiente condiciona en gran medida la diversidad en la composición química del género *Pinus*. Por tanto, las variaciones obtenidas en la morfología y composición química de la semilla podrían estar determinadas por varios factores asociados a i) las condiciones medioambientales, tales como las precipitaciones y la temperatura de la zona donde se localiza la población, ii) la fisiología de la semilla, como los procesos de maduración y germinación, y iii) a los estreses abióticos y bióticos, tales como la desecación y el ataque de plagas

Proteoma del polen de la encina.

Debido a la gran variabilidad entre los individuos de una misma población en los perfiles de proteínas encontrados previamente en semillas, se decidió analizar el perfil proteico de polen con el objetivo de caracterizar y catalogar las poblaciones de *Pinus occidentalis*.

Estos valores estuvieron en el rango publicado para otras diferentes especies de plantas y correspondió al 10% del contenido total de proteína determinado por el método de Kjeldahl.

El análisis proteómico de polen de pino realizado utilizando técnicas basadas en gel (1-DE y 2-DE acoplado a MALDI-TOF/TOF MS/MS) y técnicas de análisis masivo basadas en la separación de las proteínas por cromatografía líquida (nLC-LTQ Orbitrap MS), para tener mayor cobertura en la identificación del proteoma de polen. Los análisis filogenético y multivariante de los datos normalizados de los perfiles proteicos obtenidos por 1-DE mostraron perfiles de expresión de proteínas similares. Estas tendencias de agrupamiento de las poblaciones fueron muy similares a los observados a través de los datos normalizados de los perfiles de proteína obtenidos por 2-DE. Cuando comparamos estos agrupamientos con los datos morfométricos y la composición química de la semilla encontramos las mismas tendencias de agrupamientos. Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que el polen puede ser usado para establecer filogenia en pino. No obstante, existen resultados contradictorios en otras especies en cuanto al análisis de los perfiles proteicos.

En *Arabidopsis thaliana* no se observaron diferencias significativas entre los perfiles proteicos de polen de cuatro ecotipos diferentes [105]. Sin embargo, en un estudio de polen de *Betula verrucosa* recogido en diferentes localizaciones mostraron diferencias significativas entre sus perfiles proteicos.

Mediante el análisis 2-DE, se encontraron un total de 16 manchas proteicas variables entre las cuatro poblaciones. Estas manchas variables junto con 84 manchas proteicas

constantes, que cubrían todos los rangos de Mr y pI (para identificar el mayor número posible de especies proteicas), se sometieron a digestión con tripsina para posteriormente ser analizadas mediante MALDI-TOF/TOF MS/MS. En total fueron identificadas 43 manchas proteicas, mediante MALDI TOF/TOF MS/MS, mientras que por medio del análisis masivo nLC-LTQ Orbitrap MS, se identificaron 166 especies proteicas. No obstante, varias proteínas presentaron algunas desviaciones en Mr y pI . Asimismo, algunas manchas proteicas presentaron dos proteínas distintas en la misma mancha proteica. Por otra parte, algunas proteínas fueron identificadas varias veces en distintas manchas proteicas. Este tipo de características también se ha observado en varios estudios de proteomas de polen en otras especies de plantas. Estas características se han atribuido i) a errores en la secuencia (secuencias parciales de proteínas) debido a las modificaciones post-traduccionales, ii) a la posible degradación de las proteínas y síntesis parcial estas durante la maduración del polen, iii) a la traslación de proteínas después del procesamiento de ARN mensajero y a la co-emigración de proteínas. Más de la mitad de las proteínas identificadas por MALDI-TOF/TOF estuvieron relacionadas con las siguientes categorías: metabolismo (37%), respuesta a defensa/estrés (15%) y citoesqueleto (8%)

Bibliografía

Barbazuk, W., Emrich, S., Chen, H., Li, L., & Schnable, P.; 2007. SNP discovery via 454 transcriptome sequencing. *Plant J.*, 51(5):910-918.

Barrenche, T.; E, 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.

Benavides Mesa, H., Gazca, M., Lopez, S., Camacho, F., Young, D., Fernandez, G., 2011. Crecimiento inicial en plántulas de 12 procedencias de *Pinus hartwegii* Lindl. bajo condiciones de vivero. *Rev.Mex.Cienc.For*, Vol.2 Num.5.

Cánovas, F.M.; Dumas-Gaudot, E.; Recorbet, G.; Jorrín, J.; Mock, H-P. Y Rossignol, M.; 2004. Plant Proteome Analysis. *Proteomics* 4: 285 – 298.

Castillejo, M.A. 2006. La proteómica aplicada al estudio de las plantas a estreses bióticos y abióticos. Tesis Doctoral. Univ. Córdoba. Córdoba.

Costa, P.; Bahrman, N.; Frigerio, J.-M.; Kremer, A. & Plomion, C.; 2003. Water-deficit-responsive proteins in maritime pine. *Plant Mol. Biol.* 38: 587-596

Echevarría-Zomero, S.; Ariza, D.; Jorge, I.; Lenz, C.; Del Campo, A.; Jorrín, J. V.; Navarro, R.M.; 2009. Changes in the protein profile of *Quercus ilex* leaves in response to drought stress and recovery. *Journal of plant physiology* 166: 233-245

Echevarría-Zomeño, S., Abril, N., Ruiz-Laguna, J., Jorrín Novo, J., & Maldonado Alconada, A.; 2012. Simple, rapid and reliable methods to obtain high quality RNA and genomic DNA from *Quercus ilex* L., leaves suitable for molecular biology studies. *Acta Physiología Plantarum*.

Feder, M.E. & Walter, J.-C.; 2005. The biological limitations of transcriptomics in elucidating stress and stress responses. *J. Evolution. Biol.* 18: 901-910.

Fernández Pozo, N., Canales, J., Guerrero Fernández, D., Villalobos, D., Díaz Moreno, S., Bautista, R., 2011. EuroPineDB: a high coverage web database for maritime pine transcriptome. *BMC Genomics*, 12:366.

Gygi, S.P.; Rochon, Y.; Franza, B.R. & Aebersold, R.; 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 19: 1720-1730.

Jorge, I.; Navarro-Cerrillo, R.M.; Lenz, C.; Ariza, D.; Porras, C. Jorrín, J.; 2005. the holm oak leaf proteome: analytical and biological variability in the protein expresión 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-Cerrillo, R.; Lenz, C.; Ariza, D.; Porras, C. & Jorrín, J.; 2006 Variation in the Holm Oak leaf proteome at different plant developmental stages between provenances and in response to drought stress.. *Proteomics*. 6: 207-214

Jorrín Jv, Maldonado Am, Castillejo Ma. Plant proteome analysis: A 2006 update. *Proteomics* 2007;7:2947-2962.

Jorrín-Novo Jv, Maldonado Am, Echevarría-Zomeño S, Valledor L, Castillejo Ma, Curto M, Valero J, Sghaier B, Donoso G, Redondo I. Plant proteomics update (2007–2008): Second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. *Journal of Proteomics* 2009;72:285-314.

Lesser, M., Parchman, T., & Buerkle, C.; 2012. Cross-species transferability of SSR loci developed from transcriptome sequencing in lodgepole pine. *Mol Eco Resour*, 12(3):448-455

Lopez Bueno, S., J. Bevilacqua, E.; 2009. Silvicultural tools for managing *Pinus occidentalis* SW

Navarro Cerrillo, R.M.; Maldonado, R. Y Ariza, D.; 2004. Fluorescencia de la clorofila en cinco procedencia de *Pinus halepensis* Mill y su respuesta a estrés hídrico. *Cuad. Soc. Esp. Cie. For.* 17: 69-74.

Parchman, T., Geist, K., Grahnen, J., Benkman, C., & Buerkle, C.; 2010. Transcriptome sequencing in an ecologically important tree species: assembly, annotation and marker discovery. *BMC Genomics*, 11:180.

Ralph, S., Yueh, H., Friedman, M., Aeschliman, D., Zeznik, J., Nelson, C., 2006. Conifer defence against insects: microarray gene expression profiling of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) induced by mechanical wounding or feeding by spruce budworms (*Choristoneura occidentalis*) or white pine weevils (*Pissodes strobi*) reveals large-scale. *Plant Cell Environ*, 29(8):256-258.

Rosignol, M; Peltier, Jb.; Mock, H.P.; Matros, A.; Maldonado, A.; & Jorrín. J.; 2006. Plant Proteome Analysis: A 2004-2006 Update. *Proteomics*. 6: 5529-5548

Sghaier-Hammami, B., Valero-Galván, J., Romero Rodriguez, C., Navarro Cerrillo, R.M., Jorrín Novo, J.; 2012. 2-DE based proteomics approach in the study of holm oak response to *Phytophthora cinnamomi*. *Phytochemistry* (submitted).

Turco, E.; Close, T.J.; Fenton, R.D. & Ragazzi, A.; 2004. Synthesis of dehydrinlike proteins in *Quercus ilex* L. and *Quercus cerris* L. seedlings subjected to water stress

and infection with *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and molecular Pathology* 65: 137-144.

Valero Galván,,J., Jorrín,J.,Gomez,A.,Ariza,D.,Garcia-Olmo,J.,Navarro Cerrillo,R.; 2012a. Population variability based on the morphometry and Chemicals composition of the acorne in holm oak (*Quercus ilex* subsp.Ballota [Desf.] Samp.) Eur J Forest Res. On line first (<http://www.springerlink.com/content/l5735vm06671r607/fulltext.pdf>) . DOI 10.1007/s10342-011-0563-8.

Valero Galván,J, Valledor L, Navarro Cerrillo R, Jorrín-Novo Jv. 2012b.; 2-DE based proteomic analysis of Holm oak (*Quercus ilex* subsp. ballota [Desf.] Samp.) pollen reveals differences among provenances. *Journal of Proteomics* (revised version submitted).

Valledor,L.,Jorrin,J.V.;Rodriguez,J,L.,Lenz,C.,Meijon,M.,Rodriguez,R.,Canal,M,J.; 2010. Combined proteomic and transcriptomic analysis identifies differentially expressed pathways associated to *Pinus radiata* needle maturation. *J.Proteome Res*, 9(8):3954-3979.

Bibliografía

Desglose de Ejecución presupuestaria:

CONCEPTO	Unidad de Medida	Costo Unitario	Gastos
1. Honorarios del personal profesional y de apoyo.			
Coordinador	meses (7)	8,000.00	56,000.00
Asistente	meses (9)	7,000.00	63,000.00
		Sub-total	119,000.00
2. Servicios personales de apoyo.			
Procesamiento y análisis de las proteínas extraídas	varios	176,310.00	176,310.00
Alimentación y Hospedaje		16,000.00	16,000.00
Transporte y combustible		12,139.00	12,139.00
Servicios de comunicaciones			
Procesamiento			
Pagos de Servicios		1,492.00	1,492.32
Fotocopias y reproducción 200 x 30			
		Sub-total	205,941.32
3. Gastos en insumos, materiales y otros			
Materiales	varios		
Equipos de informática para análisis del proteoma	unidad		
Imprevistos			
		Sub-total	
		Total	324,941.32

Anexos

Figura I. Estación de geles en Zaranda Orbital

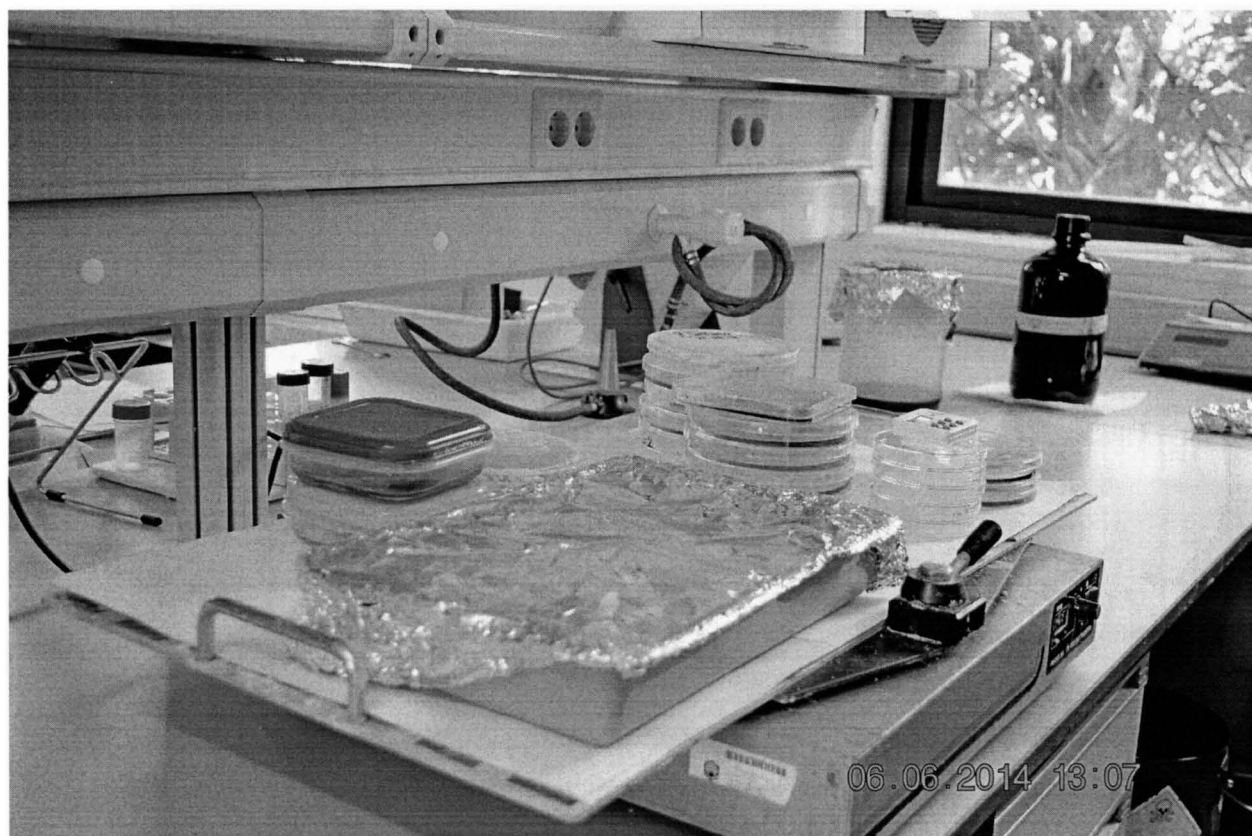


Figura II. Duodeca para geles de semilla y polen

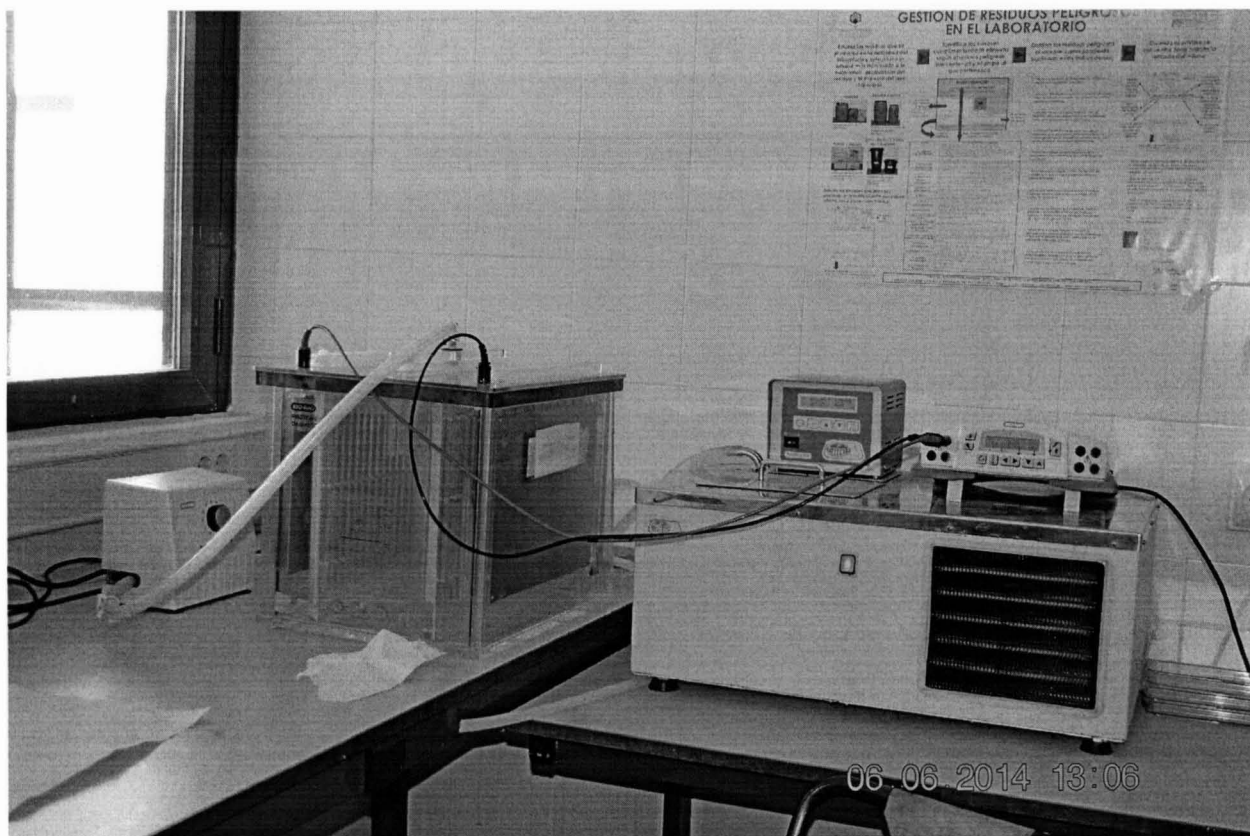


Figura III. Geles 1D en polen y semillas

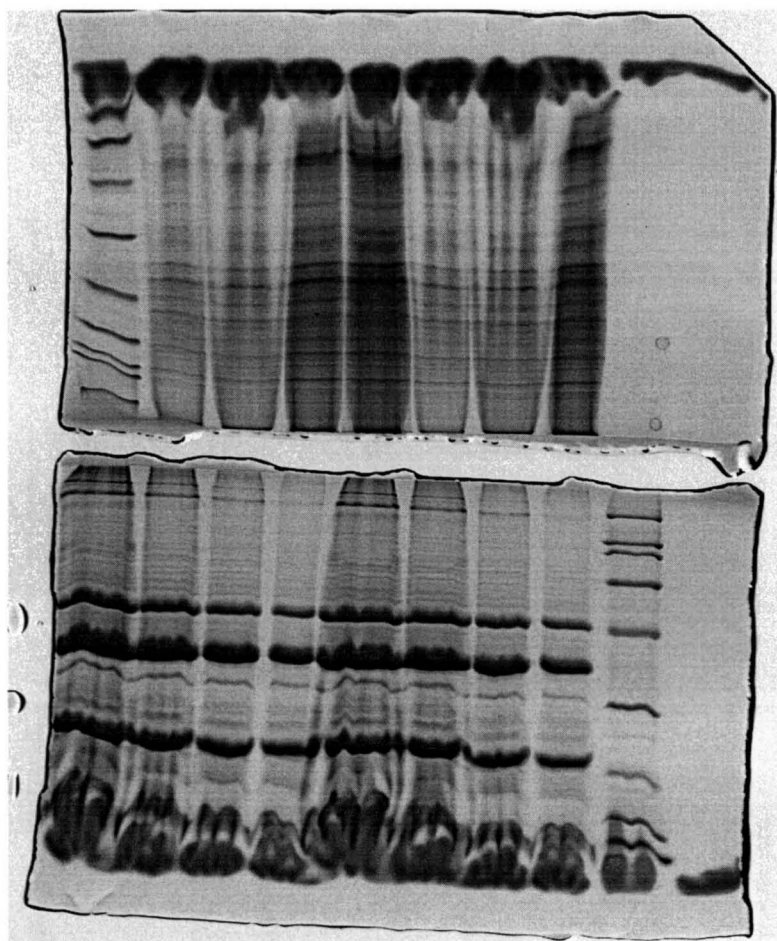


Figura IV. Gel 1D pequeño de semillas

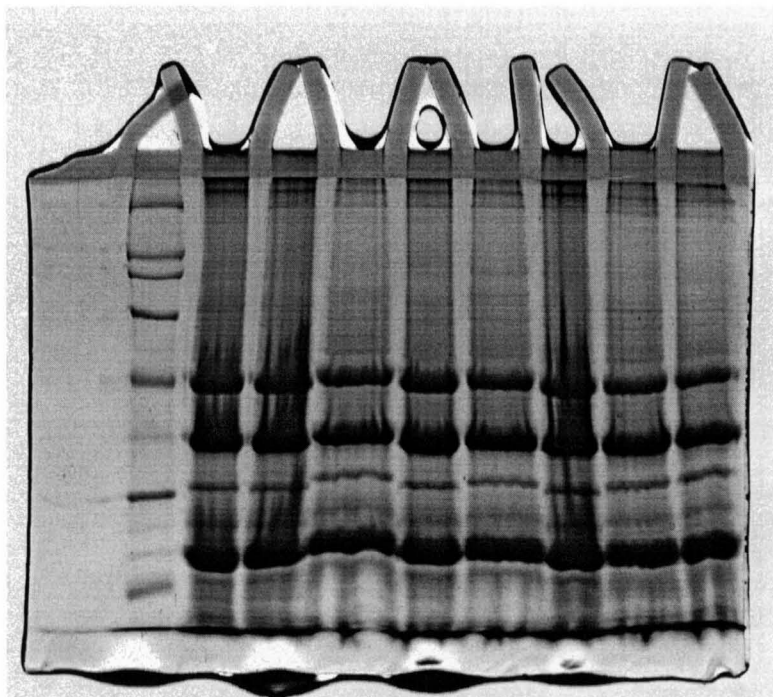


Figura V. Gel 1D grande de semillas de pino

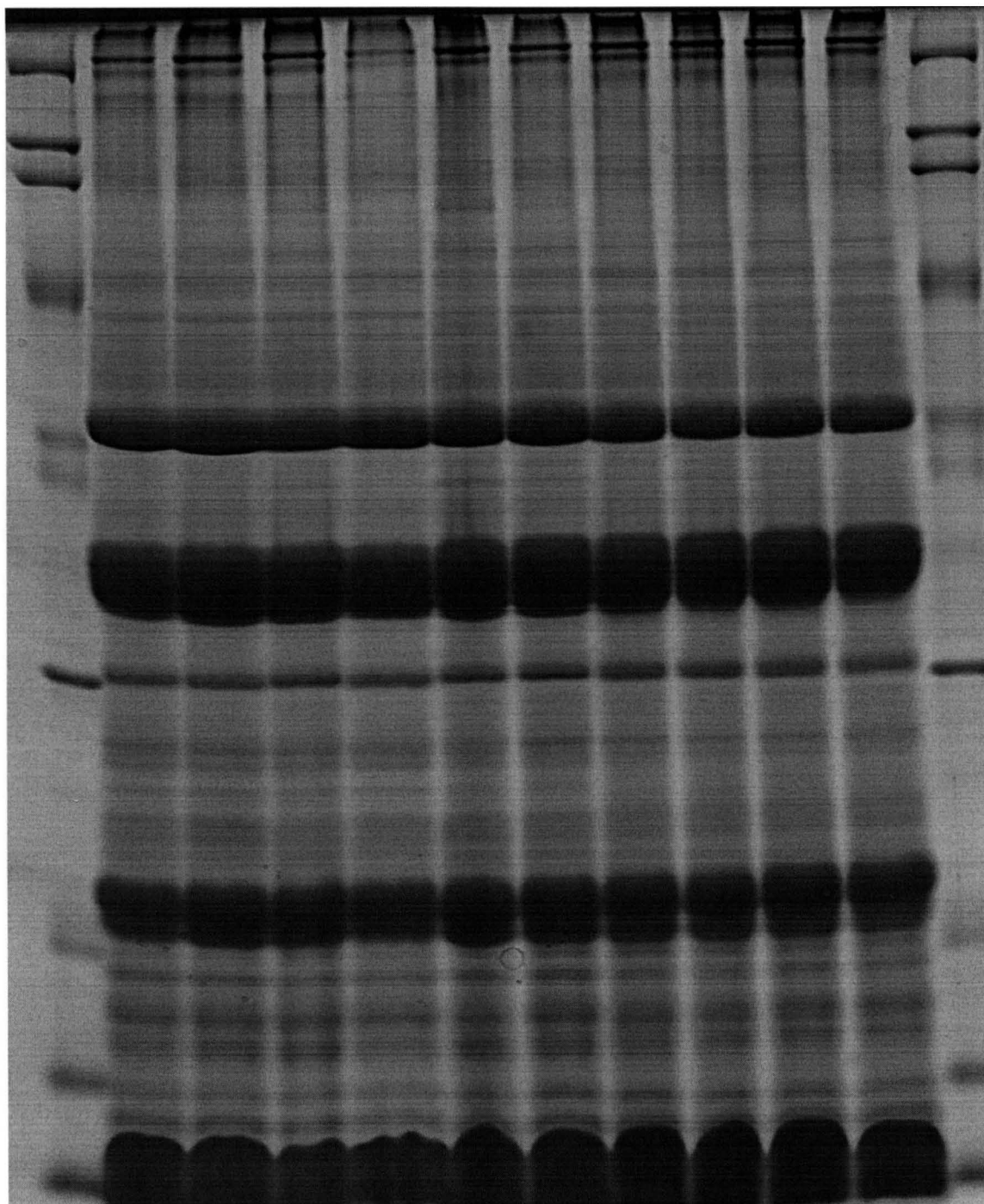


Figura VI. Geles 2D de semillas de pino

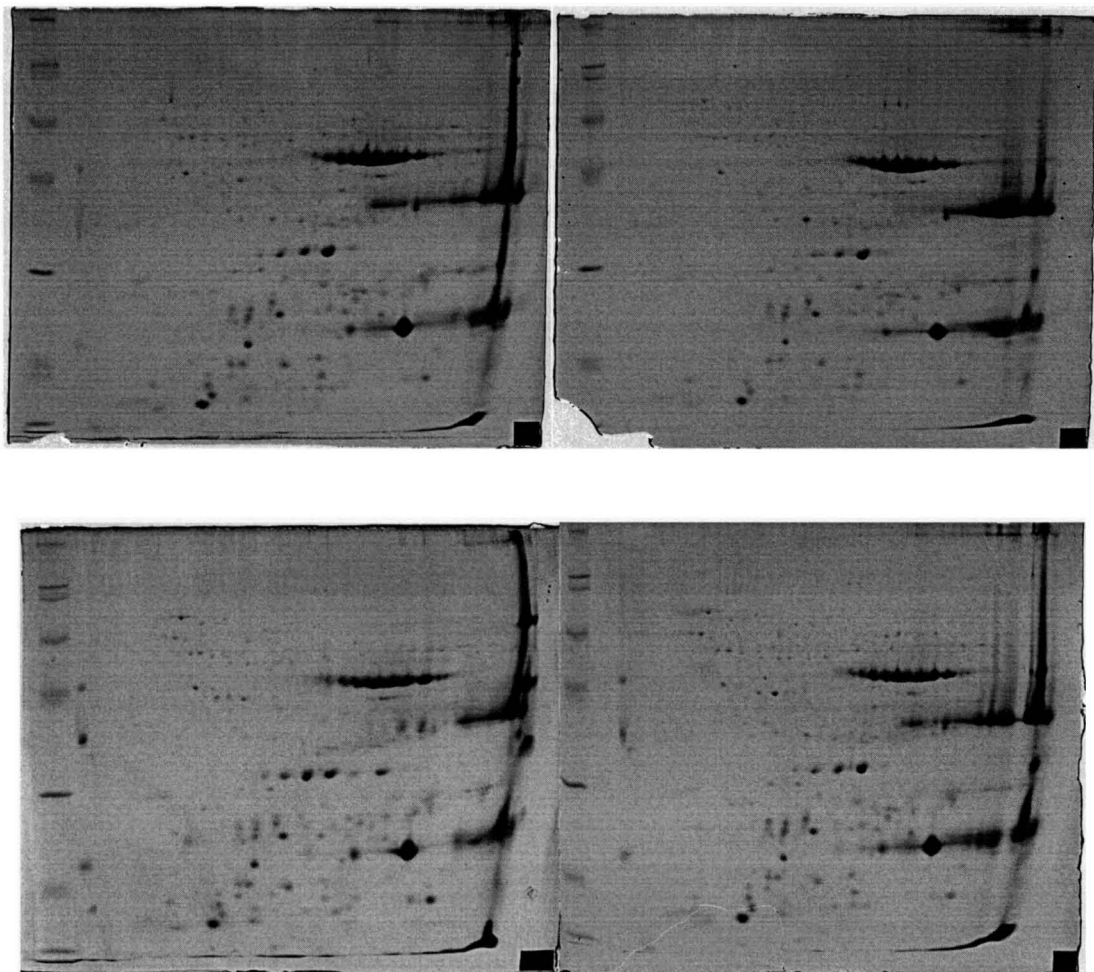


Figura VII. Gel 2D de polen de pino

