



Universidad Nacional de Asunción
Facultad de Ciencias Agrarias

Proteómica aplicada a especies forestales

Prof. Dra. Ing. For. Maura Isabel Díaz Lezcano
maura.diaz@agr.una.py

Introducción

Los tejidos de reserva de las semillas acumulan grandes cantidades de proteínas de almacenamiento en forma de cuerpos proteicos. En este trabajo se analizaron extractos proteicos de la almendra de mblokaja mediante electroforesis monodimensional (1D) y bidimensional (2-D). Esta palma se destaca por su gran potencial para producir aceite de pulpa y almendra utilizable como biodiesel, así como también su importancia en la industria.

Objetivos

- **Establecer un protocolo para el análisis proteómico de la semilla de una palma nativa del Paraguay, *Acrocomia aculeata* (mbokaja).**
- **Identificar las proteínas mayoritarias presentes en la almendra.**

Justificación

Para estudiar su potencialidad del mbokaja, la proteómica aplicada al estudio de especies forestales constituye una herramienta complementaria para interpretar los procesos ecofisiológicos.

Almadén de la Plata - Sevilla 51-09
Quercus ilex
subsp. *pyrenaica*
Siembra: 15-01-10
Producción: La Resuma

Proteómica

Es el estudio y caracterización del conjunto de proteínas expresadas de un genoma (proteoma). **El proteoma de una célula varía según el estado en el que se encuentre la célula, por ejemplo si se encuentra en una situación de estrés.** Permite identificar, categorizar y clasificar las proteínas con respecto a su función y a las interacciones que establecen entre ellas. De este modo, se pueden caracterizar las redes funcionales que establecen las proteínas y su dinámica durante procesos fisiológicos y patológicos.

Experimento típico de proteómica

- **En experimento típico de proteómica incluye la mayoría de los siguientes pasos: diseño experimental, muestreo, preparación del tejido, célula u orgánulo, extracción de proteínas, fraccionamiento o purificación, separación, análisis mediante espectrometría de masas, identificación de proteínas y análisis estadístico de los datos y validación.**

Protocolos

- Existen numerosos protocolos en función del material del que se va a extraer (Görg *et al.*, 2000). El más utilizado en el caso de **proteómica vegetal es el de precipitación, concretamente con TCA (ácido tricloroacético)-acetona** (Damerval *et al.*, 1986).

Extracción

- **Una correcta extracción y posterior separación de proteínas requiere tener en cuenta los procesos de rotura celular y eliminación de compuestos que dificulten la extracción. En células que pueden ser lisadas fácilmente se utiliza la lisis osmótica, por congelación o a través de detergentes mientras que en otros casos, como en células vegetales, más difíciles de romper, se utiliza la sonicación, o la homogeneización en presencia de un determinado tampón o de nitrógeno líquido.**

Separación

- Una vez extraídas las proteínas, éstas tienen que ser separadas para su posterior cuantificación y visualización. Llegados a este punto la estrategia puede ser la separación **mediante electroforesis monodimensional en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) o mediante electroforesis bidimensional (2DE)**.

1-D y 2-D

- **Mediante la primera técnica las proteínas se separan en función de su peso molecular, mientras que la segunda permite la separación en función de su pH y su peso molecular.**

Isoelectroenfoque

- **El isoelectroenfoque (IEF) o primera dimensión, consiste en el movimiento de las proteínas a través de un campo eléctrico en presencia de un gradiente de pH, de forma que las proteínas migrarán hacia el valor de pH donde su carga neta sea cero, es decir, su pI. Actualmente se utilizan unas tiras de gel de acrilamida con gradientes de pH inmovilizado gracias a la presencia en el gel de grupos tamponadores (Inmobilinas) (IPG strips)**

2-D

- Una vez separadas las proteínas **en función de su carga**, se puede hacer una segunda separación **en función de su masa molecular** mediante la segunda dimensión (SDS-PAGE).

Identificación de proteínas

- Una vez analizados los geles, **las proteínas de interés son recogidas mediante picado de spots para su posterior identificación.** Esto se realiza mediante la técnica de **espectrometría de masas (MS)**. La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica empleada en la identificación de proteínas, **basada en la digestión enzimática** (con tripsina normalmente) **de bandas o spots de geles.**

Bases de datos

- Una vez obtenidos **los resultados de la espectrometría de masas, hay que correlacionar, mediante aplicaciones bioinformáticas (mediante algoritmos) estos datos con las secuencias disponibles en las bases de datos; es necesario la disponibilidad en estas bases de datos de la secuencia total o parcial de la proteína que estamos buscando o del correspondiente DNA genómico o cDNA (ESTs).**

RESULTADOS

Las proteínas mayoritarias de la semilla del mbokaja, son **proteínas de almacenamiento**

Las técnicas desarrolladas permitirían definir una **“huella peptídica”** característica, que se podría usar en la discriminación de poblaciones con mayores potencialidades para materia prima, así como para analizar la diversidad genética de esta especie.

Han sido identificadas proteínas mayoritarias asociadas a **globulinas y glutelinas**, que son proteínas asociadas a la respuesta al estrés abiótico

Conclusión y Recomendaciones:

- **La proteómica aplicada al estudio de especies forestales constituye una herramienta complementaria para interpretar los procesos ecofisiológicos de las plantas, así como su respuesta a distintas situaciones de estrés que estas manifiesten. Esta técnica permitirá seleccionar individuos, sobre la base de genotipos superiores, que potencialmente podrían constituir en especies utilizables en programas de conservación y producción.**



Líneas abiertas

- Ensayos relacionados a aclimatización de las especies cuyos protocolos de micropropagación han sido establecidos.
- Ensayos de propagación de lapachos de floración precoz.
- Ensayos de Proteómica y Metabolómica.

