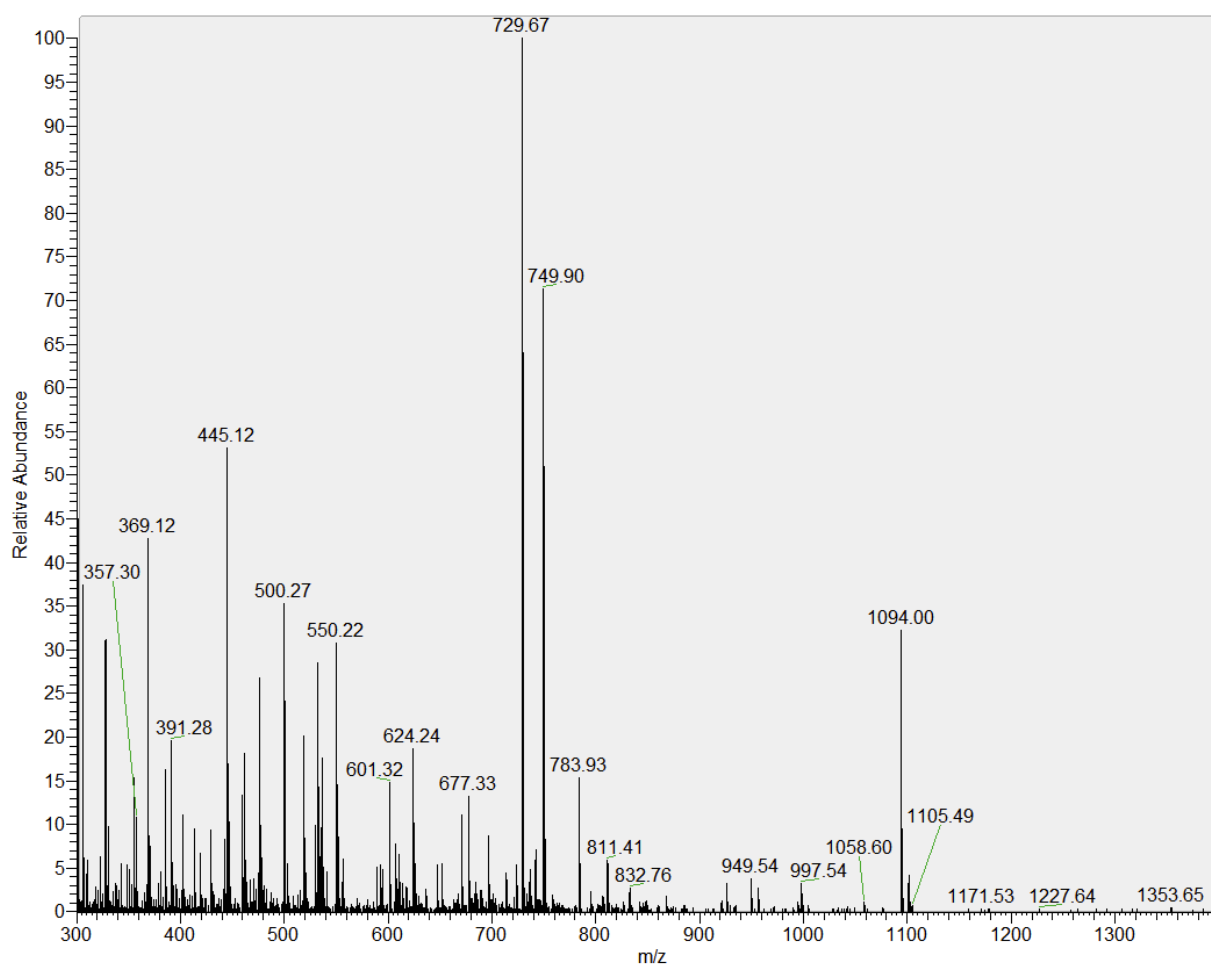




Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Cambios en el perfil proteómico nuclear en respuesta a estrés UV-B



Sara Alegre García
15 de julio de 2014



Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Cambios en el perfil proteómico nuclear en respuesta a estrés UV-B

Sara Alegre García

Firma

Luis Valledor Gonzalez

M^a Jesús Cañal Villanueva

Firma

Firma

AGRADECIMIENTOS

La gratitud es un valor necesario aunque olvidado en la actualidad. Siento la necesidad de dar las gracias a todas las personas que han colaborado en este proyecto de muy distintas maneras.

La realización del trabajo hubiese sido imposible sin mis dos tutores, la Doctora Cañal, quien hizo posible que aterrizase en el grupo de trabajo y siempre está dispuesta a ayudar y colaborar ayudándonos a labrarnos el mejor futuro posible, y el Doctor Valledor, que me ha acompañado durante todo el proyecto, trasladándome sus conocimientos con una paciencia infinita y obligándome a ser crítica y resolutiva en el laboratorio. Sin toda su ayuda y dirección nunca se habría realizado este trabajo. Muchas gracias.

Debo darle las gracias a Chus, sus conocimientos frente a una máquina computacional son infinitos, y han sido imprescindibles para este proyecto. También a Fran, hemos realizado a la par nuestros proyectos y siempre es una buena compañía y una gran mente dispuesta a pensar y colaborar.

El resto del grupo *Epiphysage* merece un reconocimiento, puesto que todos en conjunto crean un ambiente agradable muy adecuado para desempeñar el trabajo a diario.

Por último debo mencionar a mi familia, que hizo posible que recibiera una formación académica, que descubriese la biología y que realizase este Máster, por todo ello y por mucho más que no puede expresarse, gracias infinitas.

ABREVIATURAS

μM - Micromolar

ACN - Acetonitrilo

BCA - Ácido bicinconínico

C18 - Cadena alifática de 18 átomos de carbono

CBB - Comasie Brilliant Blue

DTT - Diotitreitól

FA - Ácido fórmico

nUPLC – Nano cromatografía líquida de alta resolución

PIB - Producto interior bruto

PMSF - Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

SDS - Dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE - electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

TA -Temperatura ambiente

Tris - tris (hidroximetil) aminometano

FDR - Tasa de falsos positivos

PSII - Fotosistema II

RESUMEN

La producción vegetal se ve afectada por el constante incremento en la cantidad de radiación UV-B que llega a la superficie terrestre. Este hecho es de especial importancia en aquellas especies con ciclos de producción muy largos, como son las plantaciones forestales. La planificación de las plantaciones en función de los modelos de cambio climático es clave para garantizar el abastecimiento de recursos madereros en el futuro. En este contexto, se plantea el estudio de los cambios del proteoma nuclear en la especie de interés económico *Pinus radiata* como un primer paso para describir los procesos de regulación inducidos por exceso de radiación UV-B. Con este propósito, se irradiaron plantas aplicando un índice UV13 durante 2 y 16 horas. El proteoma se analizó empleando una estrategia basada en nUPLC y espectrofotometría de masas (MS-Orbitrap) que permitió identificar un total de 867 proteínas. Mediante la combinación de bases de datos fue posible anotar 470 proteínas. Esta aproximación permitió definir 93 proteínas de expresión diferencial entre los distintos tratamientos realizados, de las que 44 estaban anotadas conociéndose sus características funcionales y/o estructurales. Las familias proteicas más destacadas que modificaron su expresión han sido PROTEÍNA RIBOSOMAL L11, CATALASAS, factor de elongación TU e HISTONAS. Este conjunto de proteínas forman parte de la maquinaria que la planta pone en marcha en respuesta al estrés al que es sometida, bien sean directamente frente a UV-B o parte del mecanismo de protección frente al daño oxidativo causado indirectamente. Se plantea el estudio en mayor profundidad para poder caracterizar una mayor cantidad de proteínas y completar la información obtenida en a partir de este ensayo.

SUMMARY

The plant production is affected by the constant increase of the UV-B radiation that reaches the Earth's surface. This fact is especially relevant to those species with very long production cycles, such as forest plantations. The planning of forest plantation according to the climate change is crucial to ensure the wood supply in the future. In this context, the study of the changes of the nuclear proteome in economically interesting species such as, *Pinus radiata* has been raised, as a first step to describe the regulation processes induced by an excess of UV-B radiation. With this purpose, plants were irradiated, with an UV13 index during 2 and 16 hours. The proteoma was analyzed using a strategy based on nUPLC and mass spectrometry (MS-Orbitrap) that enabled to identify a total of 867 proteins. Combining data bases it was possible to find 470 proteins. This approach allowed to define 93 proteins of differential expression from the different treatments that were done, 44 of them were listed knowing their functional and/or structural characteristics. The most remarkable protein families that modified their expression were RPL11, CATALASE, elongation factor TU and HISTONES. These proteins belong to the machinery that the plant uses when it's under stress, either from direct exposure to UV-B or as a part of the defensive mechanism against the oxidative damage caused indirectly. The study was carried out further to be able to characterize, a bigger amount of proteins and complete the information obtained from this study.

INTRODUCCIÓN

La madera es uno de los recursos naturales más antiguos de los que dispone el hombre, siendo aún en la actualidad de gran importancia para el desarrollo de la vida tal como la entendemos hoy en día (Johnson, 1994). Los bosques siempre han proporcionado combustible, herramientas, alimentos y protección, estando ligado el incremento del consumo de madera con el aumento de la actividad industrial y la población, incluso en nuestros días. Debido a la creciente demanda de madera, y a la limitada superficie forestal disponible, es necesario el uso de especies arbóreas de rápido crecimiento tales como eucalipto y pino. Estas especies de rápido crecimiento aumentan de forma directa la eficiencia de las plantaciones forestales, produciendo más biomasa en menos tiempo. Sin embargo, esta producción no es, todavía, suficiente para garantizar la sostenibilidad de la producción forestal y la preservación de la tala de los bosques naturales.

De entre los árboles más utilizados como recurso destaca *Pinus radiata* D. Don, una de las especies forestales de mayor importancia económica en el mundo, ya que presenta una serie de características que determinan su éxito como planta cultivada, entre las que se debe mencionar el gran crecimiento en climas templados húmedos; la versatilidad de su madera, apta para diversos usos industriales; la posibilidad de recolectar grandes cantidades de semilla y su fácil propagación; la relativa diversidad genética dentro de sus poblaciones naturales, que pueden proporcionar genotipos adecuados para ambientes distintos y su flexibilidad silvícola, es decir, la posibilidad de practicar distintas selviculturas sin que la producción se vea afectada ostensiblemente (Sánchez-Rodríguez 2002).

En la actualidad, las plantaciones de *P. radiata* suponen más de cuatro millones de hectáreas en todo el mundo, distribuyéndose el 90 % de la superficie entre Chile, Nueva Zelanda (aproximadamente 1,5 millones de hectáreas cada uno) y Australia (0,77 millones de hectáreas) (Mead, 2013). En España, la primera plantación registrada de *P. radiata* data de 1840, pero no fue hasta la década de 1950 cuando comenzó a ser plantada ampliamente. En la actualidad hay 287 000 ha plantadas en todo el país, de las cuales 226 000 ha son rodales puros (MAGRAMA, 2006). La producción anual de estos árboles es de 1,5 millones de m³ de trozas, representando un potente sector económico, tanto en nuestro país, como fuera de nuestras fronteras. En Chile, por ejemplo, la industria derivada de esta especie arbórea representa el 3 % del PIB, siendo la segunda actividad económica más importante del país (Álvarez, 1999).

Las condiciones ambientales cambiantes influyen notablemente en la productividad de las plantaciones, disminuyéndola. En general, esta situación se debe tanto a factores abióticos (sequía, altas temperaturas e irradiaciones) como bióticos, así como a la posible interacción de los mismos. A este hecho se suma un aumento constante de la demanda de madera a nivel mundial. En consecuencia, la explotación de estos recursos de manera sostenible en el contexto actual y futuro representa un reto para la humanidad, siendo necesario adaptar las plantaciones para que las nuevas condiciones que se presentan no mermen la cantidad y calidad de los recursos.

Entre los cambios que sufre el sistema Tierra, cabe destacar el aumento de las radiaciones de alta energía que llega a la superficie terrestre como consecuencia de la disminución del grosor de la capa de ozono. Entre estas radiaciones se encuentra la UV-B, con longitudes de onda comprendidas entre los 280-320 nm.

En los últimos años se ha observado una disminución en la concentración de ozono estratosférico, causada principalmente por gases que contienen carbono y halógenos (flúor, cromo y bromo), derivados de actividades antrópicas (McKenzie et al., 2011). El ozono estratosférico tiene un efecto de contención (absorción) de la radiación ultravioleta nociva proveniente del sol, disminuyendo la cantidad de radiaciones de alta energía que llegan a la superficie terrestre. La cantidad de ozono estratosférico se correlaciona inversamente con la penetración de radiación UV-B hasta la biosfera (Herman, 2010).

Esta reducción no es uniforme en todo el planeta ni a lo largo del año, siendo mayor en invierno y primavera en latitudes medias del hemisferio sur, donde hay enormes plantaciones de *Pino radiata* debido a su clima templado. Si a esto sumamos el agujero de ozono en la Antártida, podemos concluir que el problema tiene mayor importancia en el hemisferio sur. A esto hay que agregar la existencia de un nuevo agujero de ozono que se produce exclusivamente en el sur de Perú, Bolivia y la zona norte y central de Chile. Este agujero se produce durante la época de verano, y sus causas aún no son conocidas.

La localización de la mayor parte de las plantaciones de *P. radiata*, Chile, Nueva Zelanda y Australia, coincide con las zonas donde se ha registrado la mayor reducción de la capa de ozono, por lo que estos recursos forestales están altamente expuestos a sufrir altas tasas de radiación UV-B. En España, se plantea una situación similar, aunque menos alarmante, dada la importancia económica de las plantaciones de *P. radiata* en nuestro país y que se ha registrado una disminución de al menos el 10 % de la capa de ozono en las dos últimas décadas (Cachorro et al., 1996). Los últimos modelos predicen que esta tendencia continuará en el futuro, estando modelado que en los próximos 50 años la radiación UV incidente aumentará hasta un 12% en el norte de nuestro país (Figura 1).

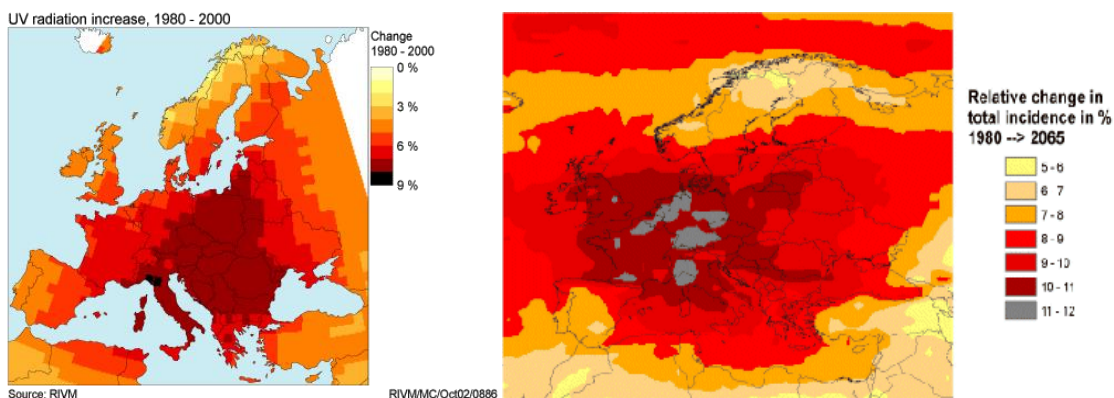


Figura 1. Incremento de radiación UV medido durante un periodo de 20 años en Europa (izquierda). Modelado del incremento de radiación UV hasta 2065 según los datos recogidos hasta la fecha (derecha). Instituto Nacional de Salud Pública y Medio ambiente de los Países Bajos. (http://www.rivm.nl/en/Topics/U/UV_ozone_layer_and_climate/risk_assessment/Europe, consultada el 08/07/2014).

Los seres vivos se ven influenciados notablemente por dichas radiaciones. Se han descrito cambios en los patrones de crecimiento de las plantas al ser sometidas a estrés por radiación UV-B (Caldwell, 1971; Klein 1987), siendo constante en todos los casos estudiados la reducción del peso total de la planta, así como del área foliar (Krizek, 1975; Sisson y Caldwell, 1976; Van y Garrard, 1976). A nivel molecular, también se detallan muchos efectos, directos e indirectos, incluyendo daño al ADN (Landry et al., 1997), las proteínas y las

membranas (Britt, 1996), así como alteraciones en la transpiración, fotosíntesis y acumulación de pigmentos (DeLucia, et al., 1992; Greenberg et al., 1996).

El conjunto de daños y alteraciones que genera el UV-B en las plantas desencadena mecanismos de respuesta como la fotoprotección, proceso muy complejo que conduce a cambios fisiológicos en el contenido de pigmento (Long et al. 1994, Tausz et al. 2001) y a nivel del transcriptoma (Brosché y Strid 2003, Maruta et al. 2010). Dentro de esta respuesta, se considera la inducción de proteínas específicas del estrés causado por la luz, como la familia ELIP (early light-inducible protein) (Rossini et al. 2006, Zarter et al. 2006). La acumulación de ELIP en condiciones de estrés se correlaciona con la fotoinactivación de PSII, la degradación de la proteína D1 del centro de reacción PSII y los cambios en el nivel de pigmentos (Adamska 1997). En el género *Pinus* se han descrito cambios en el transcriptoma y en algunas actividades enzimáticas en respuesta a estrés UV-B (Zinser et al., 2000). En *P. radiata* concretamente, se han detectado cambios moleculares en respuesta a la radiación UV-B, entre los que se destacan el descenso de la cantidad de pigmentos, el descenso en la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis, como la *anhidrasa carbónica*, y el aumento en la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo, como la *ASCORBATO PEROXIDASA* y la *GSTU*. Las proteínas de la familia ELIP se sobreexpresan en el parénquima en empalizada de las acículas como parte de la respuesta de fotoprotección puesta en marcha bajo un estrés causado por radiación UV-B (Valledor et al., 2012).

Los polifenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en varios sectores del reino de las plantas superiores. Aunque poseen muchas funciones en las plantas, cabe destacar que se observan siempre bajo condiciones de estrés vegetal (Díaz et al., 2001). En general, son buenos indicadores del estado fisiológico de las plantas y su estudio aporta información del grado de estrés al que se someten las plantas de un experimento. Se estimula su síntesis bajo condiciones de infección o daño vegetal, así como en condiciones de mala nutrición. Además, las plantas acumulan flavonoides que absorben UV y otros compuesto fenólicos en las vacuolas de las células epidérmicas a fin de prevenir la penetración de este tipo de radiaciones en los tejidos más profundos (Kondo y Kawashima 2000)

En resumen, la radiación UV-B implica en las plantas la expresión diferencial de genes, estimulándose la expresión de genes característicos de las respuestas al estrés y la defensa (Brosché y Strid 2003, Cloix y Jenkins 2008, Kusamo et al. 2011) y silenciándose genes relacionados con la fotosíntesis (Albert et al. 2011). Por tanto, esta situación de estrés disminuye la tasa fotosintética, principalmente por la degradación de proteínas del centro activo PSII, lo que se traduce en la ruptura del flujo de electrones que genera el poder reductor necesario para la producción de fotoasimilados y, en consecuencia, limitando el crecimiento vegetal. Por lo tanto, la radiación UV-B produce un efecto directo en los sistemas forestales disminuyendo su producción de biomasa.

En este escenario de cambio climático, es clave determinar la posibilidad de adaptación de los recursos forestales utilizados para obtener información de su capacidad de respuesta ante una situación de estrés fisiológico como la descrita. Pese a que se conocen algunos de los genes y proteínas implicados en la prevención del daño provocado por UV-B en *Pinus radiata* D Don (Pascual et al., 2014), se desconocen por completo los cambios de regulación génica implicados en estas respuestas, siendo este conocimiento clave para aumentar nuestra comprensión del proceso tanto desde un punto de vista básico como aplicado para poder implementar estrategias de selección en programas de gestión forestal sostenible.

Se planteó como objetivo principal la caracterización y cuantificación del proteoma nuclear de acículas de *Pinus radiata* tras ser sometidas a un estrés por UV-B. Para poder abordar dicho objetivo se plantean 4 objetivos parciales:

1. Establecimiento de un sistema experimental simulando un contexto real, en condiciones no letales, que permita evaluar la respuesta a estrés UV de plántulas de *Pinus radiata* aplicando el pico máximo del índice UV modelado para los próximos años (índice UV 12-14).
2. Definición de un protocolo analítico que permita la purificación, cuantificación, y digestión de proteínas nucleares de *Pinus radiata* que permita su análisis mediante espectrometría de masas.
3. Cuantificación e identificación de las proteínas nucleares mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.
4. Interpretación funcional de los resultados de identificación masiva obtenidos, enfatizando la caracterización biológica y el análisis integrado de los mismos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Se recolectaron acículas totalmente desarrolladas y maduras de plantas de un año de edad de *Pinus radiata* situadas en una cámara de cultivo. Las condiciones ambientales fueron constantes: 22 ° C, 37,3 % humedad, fotoperiodo largo (16/8 horas luz/oscuridad) y una intensidad lumínica de 60 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en el ápice y 26,3 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en la parte basal de las plantas. Previamente a la realización del experimento se aclimataron las plantas durante un periodo de dos meses a las condiciones citadas, evitando así artefactos en los resultados derivados de cualquier otro factor que no fuese el que se deseaba analizar.

El material vegetal proviene de 12 árboles individuos en un diseño de bloques totalmente aleatorizados donde el factor a analizar es el tiempo de exposición a luz UV-B cuando se suplementa a la intensidad lumínica citada con 330 mW m^{-2} UV-B. Se realizaron dos tratamientos, un tiempo de exposición corto (dos horas) y un tiempo de exposición largo (ocho horas durante dos días consecutivos). Como control del experimento se utilizaron plantas no expuestas a luz UV-B (Figura 2). Inmediatamente después de cada tratamiento, se llevó a cabo el muestreo aleatorizado para minimizar los efectos de la ordenación en el espacio del material a analizar. Tras su recolección, las muestras fueron rápidamente introducidas en nitrógeno líquido a fin de conservar el material. Posteriormente se almacenaron a -80 °C hasta su procesado.

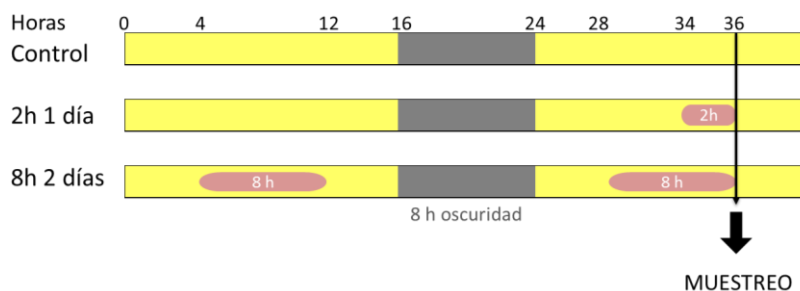


Figura 2. Diseño experimental. Se representan en amarillo las horas de luz y en gris las de oscuridad. La radiación UV-B que se añade en cada tratamiento se representa con los círculos rosados.

Extracción de pigmentos y fijación de muestras para microscopía confocal

Se cuantificó el contenido de pigmentos mediante espectrofotometría siguiendo el protocolo de Sims y Gamon (2002) con ligeras modificaciones, descritas por Valledor et al., (2012). En resumen, se realizó la extracción de clorofila a y b, así como de carotenoides, partiendo de 100 mg de acículas en 2 mL de acetona: Tris-HCl pH 7,8 en una proporción de 80:20 (v/v) respectivamente. Se realizaron 4 réplicas por tratamiento. El cálculo de la cantidad de pigmentos se realizó mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Clorofila a} = 0,01373 \times A_{663 \text{ nm}} - 0,000897 \times A_{537 \text{ nm}} - 0,003046 \times A_{647 \text{ nm}}$$

$$\text{Clorofila b} = 0,02405 \times A_{647 \text{ nm}} - 0,004305 \times A_{537 \text{ nm}} - 0,005507 \times A_{663 \text{ nm}}$$

$$\text{Carotenoides} = [A_{470 \text{ nm}} - (17,1 \times \text{clorofila a} + \text{clorofila b})] / 119,26$$

El contenido de polifenoles se evaluó mediante microscopia confocal. Para lo que en las muestras (ene fresco) se realizaron secciones trasversales de 15 μm de grosor en un criotomo. La presencia de polifenoles se detectó mediante la autofluorescencia emitida al excitar las muestras a 360 nm. Los rangos de emisión se capturaron a 385-530 nm.

Extracción de núcleos

Los núcleos se extrajeron siguiendo el protocolo descrito por Haring et al., 2007. En resumen, partiendo de 1 gramo de tejido por muestra, se homogenizan con un mortero y cada muestra se incuba en 0,44 M sacarosa, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM β -mercaptoetanol y 0,015 mM PMSF, se filtra y se centrifuga, descartándose el sobrenadante. A continuación, se incuba en 0,25 M sacarosa, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl_2 , 1 % Tritón X-100, 5 mM β -Mercaptoetanol y 0,015 mM PMSF. Tras la centrifugación se descarta el sobrenadante y se repite este paso hasta obtener un pellet blanquecino. Seguidamente, para eliminar los restos de detergente de las incubaciones anteriores, se lava con 0.25 M sacarosa, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl_2 , 5 mM β -mercaptoetanol y 0,015 mM PMSF y se centrifuga. Tras descartar el sobrenadante, el pellet obtenido se disgrega con sumo cuidado en 400 μL de una solución con una concentración molar 30 % menor al tercer tampón usado. Por último, se añade un paso de lavado, centrifugando durante 12 min a 3000 x g a través de un gradiente de sacarosa con concentraciones decrecientes desde el inferior del tubo hasta la zona superior (3,2 y 0,32 M sacarosa) donde se añade la muestra. Todo el proceso descrito debe realizarse a 4 °C para conservar la muestra en condiciones óptimas.

Extracción de proteínas

Una vez extraídos los núcleos celulares, en cada muestra se añaden 300 μg de una solución al 1 % de SDS, se sónica (Hielcher UP200S) 15 segundos al 60 % de amplitud y se incuba en un agitador de vórtice 15 min a máxima velocidad para desestabilizar las membranas nucleares. A cada muestra se agrega un volumen de fenol y un volumen de una solución de 1,5 M sacarosa, 10 mM DTT y 1 % inhibidor de proteasa para evitar que las proteínas de la muestra sean degradadas. Se agita vigorosamente y se centrifuga 5 min, 17000 x g, TA. Se conserva la fase superior, es decir, la fenólica. A la fase inferior se le agrega medio volumen de fenol y se repite el proceso juntando las fases fenólicas tras la centrifugación. Por último, se agrega a cada tubo un volumen de la solución de sacarosa, se centrifuga y se conserva la fase fenólica descartándose la fase inferior.

Las proteínas se precipitan con 0,1 M acetato de sodio en metanol a 4 °C durante 12 horas. Tras centrifugar 5 minutos, 5000 x g, 4 °C y descartar el sobrenadante, se lavan los pellets dos veces con metanol 0.5 % (v/v) β -mercaptoetanol y dos veces con acetona. Una vez se obtienen los pellets de proteína, se resuspenden en 30 μL de 8 M urea, 1,5 % SDS y se cuantifican usando el método BCA (Smith et al., 1985).

Identificación y cuantificación de proteínas mediante Ge-LC/MS-MS

Las proteínas se procesaron y analizaron siguiendo el método descrito por Valledor y Weckwerth (2013) con ligeras modificaciones. Se cargaron 35 µg de proteína de cada muestra en 13,5 % SDS-PAGE, corriendo solo 0,5 cm. El gel fue fijado y teñido con CBB R-250 en metanol:ácido acético:agua (40:10:50) durante 30 min y desteñido en metanol:agua (40:60). Las porciones de gel donde se encontraban las proteínas se recortaron y lavaron incubando las muestras en hidrogenocarbonato de amonio 25 mM seguidas de una solución análoga pero al 50 % (v/v) de ACN. A continuación se deshidrataron las porciones de gel con 50 µL de ACN durante 5 minutos. Posteriormente se digirieron con 50 µL de solución de tripsina (12,5 ng/µL; Roche) durante 16 h. Los péptidos se extrajeron en una serie de ACN y se llevaron a sequedad en un *speedvac* (MiVac, Genevac). El pellet se resuspendió en 4 % ACN/0,1 % FA y las muestras se desalaron en una microcolumna C18. Los péptidos se eluyeron en 100 % metanol y se llevaron a sequedad en *speedvac*.

Las muestras fueron enviadas a Doctor Wolfram Weckwerth (Dpto. de Biología Molecular de Sistemas, Universidad de Viena, Austria) para realizar un análisis proteómico libre de marcaje mediante el empleo de cromatografía líquida nUPLC y espectrometría de masas (Orbitrap-MS, Thermo ©). Los péptidos se separaron en un gradiente A (0,1 % FA) y un gradiente B (90 % ACN y 0,1 % FA), comenzando con 5 % del gradiente B que progresa de forma lineal hasta el 95 % durante 120 min a expensas de la disminución del gradiente A.

Los ficheros con los espectros de masas se procesaron en nuestro laboratorio empleando el software Proteome Discoverer (Thermo). Se emplearon 4 bases de datos correspondientes al repositorio *Viridiplantae* (03/07/2014, <http://global.eagle-i.net/i/Viridiplantae>), el transcriptoma de *Pinus taeda* (versión 1.01, <http://dendrome.ucdavis.edu>), y las bases de datos desarrolladas en nuestro grupo de investigación conteniendo todas las secuencias disponibles en bases de datos públicas correspondientes a los géneros *Picea* y *Pinus* (para más información consultar Romero-Rodríguez et. al, 2014). Se utilizaron como ajustes para el uso del programa una tolerancia de la masa del precursor de 10 ppm y de las masas de iones fragmentados de 0,8 Da. Se consideraron como modificaciones variables de aminoácidos la oxidación de la metionina, la fosforilación de los residuos de lisina, arginina o tirosina y la metilación y acetilación en los residuos de lisina y arginina. Asimismo se extrajeron los valores correspondientes al área de cada ion empleado en el análisis para la posterior cuantificación de las especies proteicas. Se consideraron como identificaciones positivas aquellas proteínas para las cuales se detectó al menos un péptido característico con un X-Corr superior en 0,25 unidades a su estado de carga.

Anotación funcional

Las proteínas identificadas en base al análisis frente a las bases de datos de coníferas, se anotaron según la base de datos de *Arabidopsis thaliana* utilizando las herramientas incluidas en la utilidad BLAST del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La anotación obtenida bajo la información de una especie modelo como *A. thaliana* es más certera frente a la realizada con especies no modelo debido a la revisión y mejora constante de esta base de datos.

Para ampliar esta anotación, se utilizaron las mismas herramientas para hacer un análisis de dominios proteicos, buscando de este modo posibles homologías entre las bases de datos y las proteínas halladas mediante la espectrometría de masas.

Análisis estadístico

Los datos fueron preprocesados según las recomendaciones de Valledor y Jorrín (2011) siguiendo un flujo de trabajo basado en cuatro etapas. En primer lugar, se analizó la matriz de datos para discernir entre los valores perdidos y aquellos casos en los que el ion no esté presente en el grupo muestral. Para este efecto, se consideraron valores perdidos solo aquellos en los que el número de valores distintos de cero de cada variable supere el 75 % del número de muestras, en nuestro caso 9. En caso contrario, estos valores no serán considerados perdidos sino ceros. En una segunda etapa se realizó la sustitución de los valores perdidos empleando el algoritmo KNN (K-vecinos más cercanos) aplicado de forma secuencial. A continuación, se normalizó la abundancia de las proteínas siguiendo una aproximación centrada en las muestras. Esto se realizó dividiendo el área de cada proteína entre el área total obtenida en la muestra, permitiendo de esta forma comparar abundancias entre las distintas muestras. A continuación las muestras se transformaron aplicando una raíz cúbica para reducir la dependencia media-error presente en este tipo de datos. La última etapa del pre-procesado consistió en el filtrado de las variables no consistentes, es decir, aquellas presentes solamente en menos de tres muestras no pertenecientes al mismo tratamiento y de aquellas proteínas de localización no nuclear, consideradas como contaminantes.

A fin de minimizar la posible contaminación de proteínas no nucleares se llevó a cabo una normalización de las variables con respecto a una de las regiones invariantes de la histona H2, proteína únicamente presente en el núcleo y que mantiene constante su expresión.

Las especies proteicas filtradas se analizaron estadísticamente empleando aproximaciones uni- y multi-variables. La aproximación univariable se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) tras comprobar la normalidad y homocedasticidad de las mismas. Debido al gran número de comparaciones, para controlar los errores estadísticos, se estableció una tasa de descubrimiento falso (FDR, *false discovery rate*) del 5 % para un nivel de significación del 0,05%. Se excluyeron de este análisis aquellas proteínas cualitativamente diferentes entre tratamientos, es decir aquellas que estaban en uno o dos de los tratamientos únicamente.

Puesto que esta aproximación clásica no nos permite valorar las interacciones y relaciones entre los resultados obtenidos, es muy útil el uso de la estadística multivariable. De entre las técnicas disponibles se empleó un análisis discriminante de la regresión mediante mínimos cuadrados parciales (sPLS-DA), para la clasificación de las muestras y la visualización de las distintas estructuras de los datos y grupos. Además se realizó una gráfica de mapa de calor para visualizar de forma rápida las variaciones en los niveles de acumulación de proteínas en las distintas situaciones experimentales.

RESULTADOS

Caracterización fisiológica

El efecto de la radiación UV aplicada sobre las plántulas se abordó mediante la evaluación de la eficiencia fotosintética, la determinación de los pigmentos clorofila a y b y carotenoides y la distribución de compuestos fenólicos en la acícula. Se eligieron estos marcadores debido a que son robustos, simples y fácilmente cuantificables en el laboratorio de una manera rápida.

La radiación ultravioleta aplicada, correspondiente a un índice UV de 13, no tuvo consecuencias inmediatas sobre la eficiencia fotosintética, si bien tras dos días de tratamiento se observó una disminución significativa tanto en la eficiencia fotosintética (Fv/Fm) como en el Rendimiento cuántico (QY) (Figura 3).

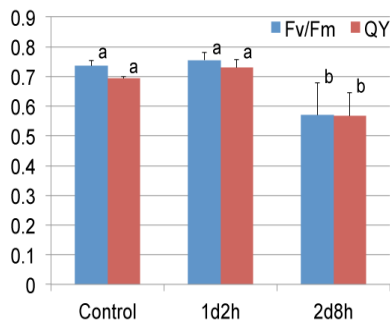


Figura 3. Eficiencia fotosintética estimada con los valores Fv/Fm y Rendimiento cuántico. Las barras de error muestran la desviación típica y las letras indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA seguido de Tukey SD, $p < 0.05$) dentro de cada variable.

Los pigmentos fotosintéticos clorofila a y clorofila b y los carotenoides mostraron la misma tendencia, manteniendo sus niveles tras dos horas de exposición a UV, pero mostrando un decremento tras dos días de tratamiento (Figura 4).

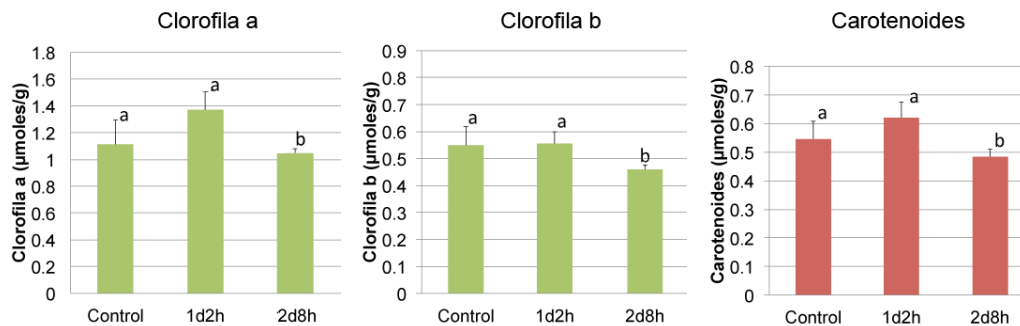


Figura 4. Contenido de clorofilas a y b y carotenoides. Las barras de error muestran la desviación típica y las letras indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA seguido de Tukey SD, $p < 0.05$).

Los polifenoles presentes en la acícula se estudiaron evaluando la autofluorescencia de la acícula en cortes de 35 µm frescos. A este nivel puede verse cómo la acícula reacciona de forma rápida, iniciando la acumulación de los mismos tras dos horas de exposición a la radiación UV, siendo máxima su acumulación tras dos días de exposición (Figura 5).

Estas medidas demostraron que la intensidad de radiación aplicada es suficiente para inducir una respuesta fisiológica adaptativa en las plántulas de *P. radiata*.

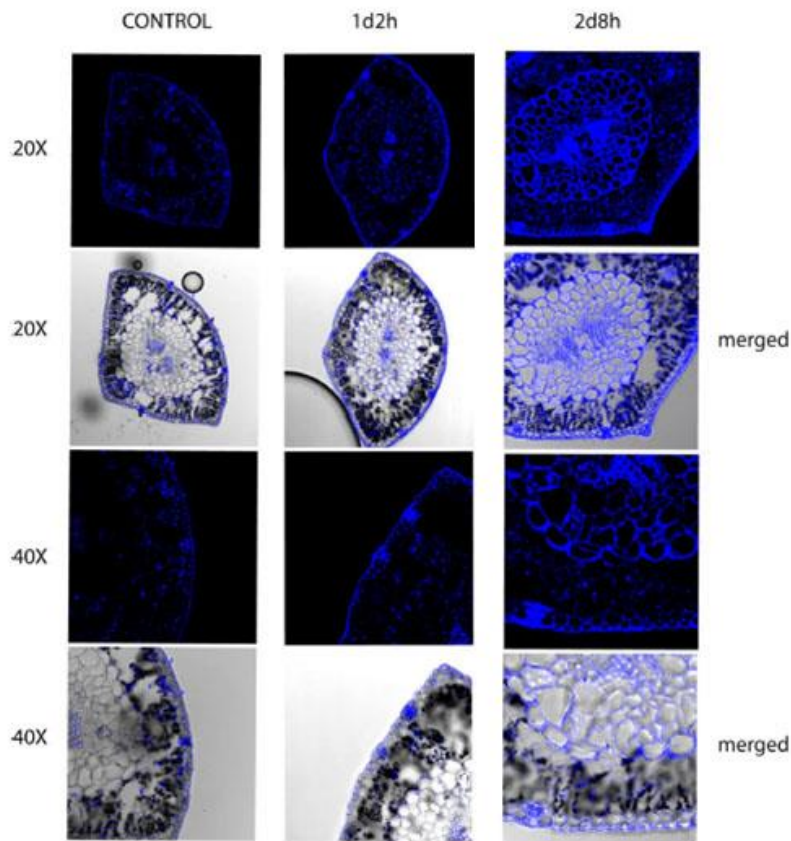


Figura 5. Microscopía láser confocal de secciones transversales de acícula tras los distintos tiempos experimentales. El color azul representa la autofluorescencia de los compuestos fenólicos. Las muestras se excitaron a 364 nm y se capturaron el rango de emisión 385-530nm correspondientes a la autofluorescencia de los fenoles. Las filas de la figura marcadas como "merged" son el resultado de la superposición de la imagen del microscopio de transferencia y la imagen de la autofluorescencia de los compuesto fenólicos.

Extracción, identificación y cuantificación de proteínas

El protocolo de purificación de núcleos y de extracción de proteínas nucleares tuvo un rendimiento de 92,16 µg de proteína por gramo de peso fresco, no habiéndose encontrado diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Tabla 1).

Tabla 1. Rendimiento de la extracción de proteínas nucleares estresado como la cantidad media de proteína obtenida.

TRATAMIENTO	RENDIMIENTO (µg g ⁻¹)
CONTROL	93,31 ± 42,52
2 HORAS	103,65 ± 55,35
8 HORAS	79,53 ± 38,37

Tras la digestión de las proteínas y su análisis mediante nUPLC/MS-Orbitrap, se identificaron 867 proteínas empleando una comparación múltiple frente a cuatro bases de datos, de las cuales 328 estaban anotadas, es decir se conocen sus funciones moleculares

o los procesos en los que están involucradas. Las proteínas anotadas empleando las definiciones propias de cada base de datos supusieron solamente el 37 % de las proteínas identificadas. Estos resultados se complementaron empleando una base de datos densamente anotada, como es la de la especie modelo *A. thaliana* y la herramienta BLAST, comparándose las secuencias de las proteínas identificadas con las de la última versión del genoma disponible en TAIR (www.arabidopsis.org). Esta aproximación de identificación por homología nos permitió anotar 142 proteínas más (17 %). En total pudieron anotarse un 54 % de las proteínas identificadas.

Tras filtrar las proteínas, tanto desde el punto de vista de su consistencia como de su localización funcional, se consideraron 217 proteínas (tabla anexa 1) como inequívocamente nucleares y, además, cuantificables. De entre ellas solo hay 44 proteínas anotadas, suponiendo un 20 % de las proteínas nucleares y un 5 % del total inicial.

Del total de proteínas, 57 presentaron variaciones cualitativas entre los distintos tiempos de muestreo, estando ausentes en al menos uno de ellos (Figura 6a). Las diferencias cuantitativas entre las proteínas presentes en todas las muestras se definieron como significativas tras la realización de un ANOVA. Se determinaron 93 proteínas como diferenciales entre tratamientos (p-valor < 0,05 %, FDR 5 %). De las 150 (93+57) proteínas que se determinaron como de respuesta a estrés UV, solo 44 pudieron ser anotadas (tabla anexa 1).

El empleo de un análisis de regresión mediante mínimos cuadrados parciales (sPLS-DA), el cual está encaminado a clasificar las muestras en función de las variables que presentan máxima covarianza con los distintos tiempos experimentales, permitió la separación efectiva de las distintas muestras en función del tiempo de tratamiento (Figura 6b). Los componentes 1 y 2 permiten explicar una gran parte de la variabilidad inherente a las muestras analizadas. Se aprecia que la variabilidad es menor dentro del mismo tratamiento que en el conjunto total. La variabilidad dentro de los tratamientos es baja, ya que cada uno de ellos se agrupa entre si y se aleja de los otro grupos formados.

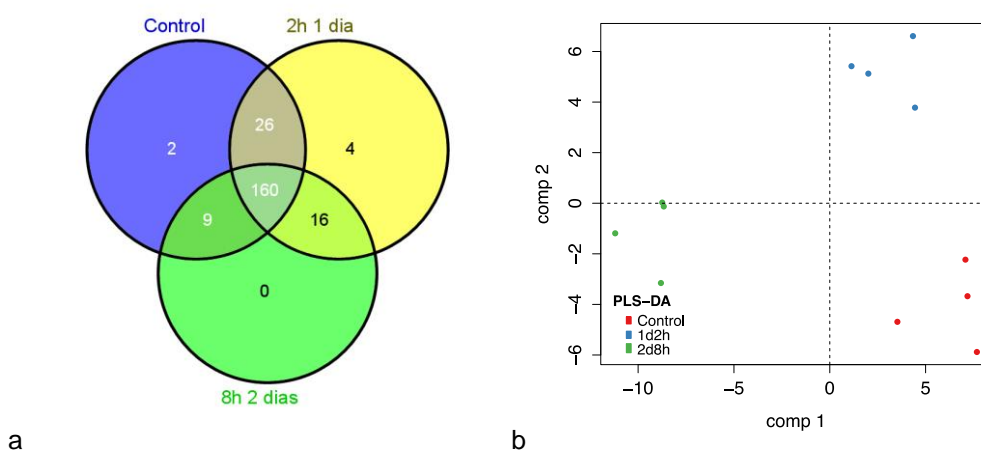


Figura 6. a) Diagrama de Venn que muestra el número de proteínas halladas en los distintos tratamientos. b) Representación del primer y segundo componente obtenidos tras el test sPLS-DA.

Cada una de las componentes puede ser relacionado con procesos fisiológicos concretos al analizar aquellas proteínas que están correlacionadas en mayor medida con cada uno de las componentes (tabla anexa 2). El componente 1 parece que está relacionado

con la aclimatación al estrés UV, puesto que separa las plantas 2d8h del resto. Estas plantas se caracterizan por presentar altos niveles de enzimas protectoras frente al daño oxidativo como son SERINA HIDROXIMETILTRANSFERASA1, CATALASA 2 y 3, y el factor de elongación TU, característico en la mediación de la respuesta al estrés. El componente 2 parece estar relacionado con el pico de daño, que ocurre tras la primera exposición a la radiación UV, separando 1d2h del resto, puesto que muestran una alta correlación con el mismo la PROTEÍNA RIBOSOMAL L11 y la GLICERATO QUINASA.

Al realizar una aproximación multivariable clásica mediante la construcción de un gráfico de mapa de calor (Figura 7) se aprecia una clara separación entre las muestras que han recibido durante más tiempo radiación UV-B (2d8h) del grupo control (c), reflejado a través del árbol formado en la figura. Existe un grupo de proteínas en el que apenas se detecta variación en todo el conjunto muestral del experimento (zona amarilla de la parte superior del gráfico). Asimismo, se aprecia como 8h2 y 8h4 se separan del resto por hiperacumulación de un conjunto de proteínas no presentes en ninguna otra muestra. Las muestras 8h1 y 8h3 distan parcialmente del patrón observado hasta el momento.

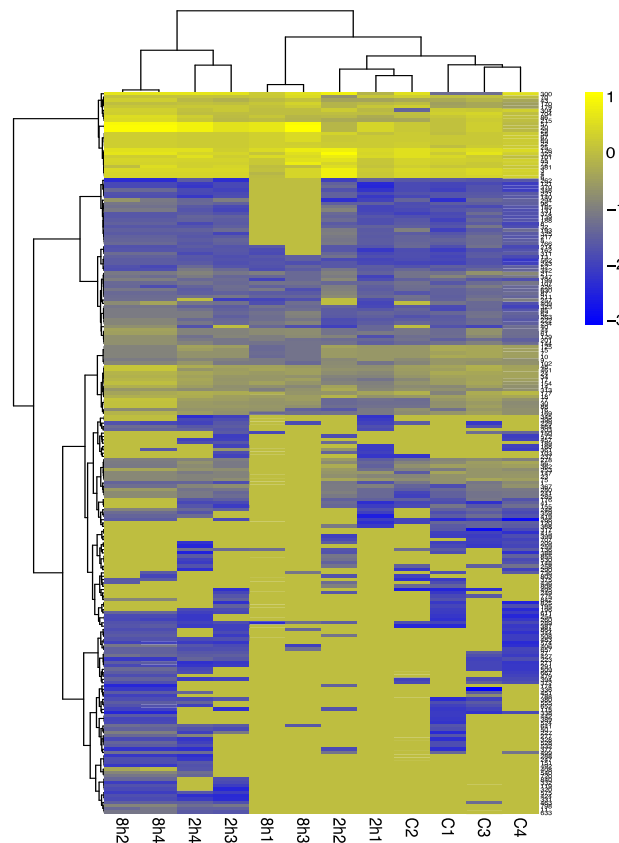


Figura 7. Agrupamiento jerárquico y mapa de calor de las 217 proteínas analizadas en este trabajo. Se pueden considerar 3 ramas principales, la primera reúne a las proteínas presentes en todas las muestras, tanto tratadas como control. Una segunda rama con signos de respuesta a través de una incipiente acumulación diferencial de proteínas y la tercera donde se distingue claramente la expresión diferencial de proteínas algunas de las cuales intervienen en la respuesta al estrés. El grupo control y dos de las muestras del tratamiento de exposición más largo al estrés se ven claramente diferenciadas.

DISCUSIÓN

Es un hecho que el planeta está sufriendo cambios ambientales que afectan a los seres vivos, aunque las dimensiones del problema están aún por definir. La información acerca de la respuesta que puedan ofrecer los bosques ante los incrementos de UV-B previstos para el futuro es muy escasa y difusa, siendo necesarios estudios en esta línea para predecir y anticiparse a posibles cambios, ofreciendo soluciones aplicables al mantenimiento adecuado de los recursos forestales. La exposición a UV-B en plantas genera una amplia gama de efectos nocivos, tales como daño en el ADN y las proteínas o la producción de compuestos reactivos del oxígeno que pueden inhibir las funciones celulares (Jenkins y Brown 2007).

El establecimiento de las condiciones bajo las que se realiza el experimento es determinante para la correcta interpretación de los datos, especialmente en los ensayos con radiaciones. Uno de los puntos a definir es la dosis de radiación UV aplicada. En muchos de los trabajos publicados (Marcel et al., 1998; Bieza y Loise 2001) se aplica una dosis de radiación difícilmente alcanzable en entornos naturales, ahora o en el futuro, y que comprometen la viabilidad celular a muy corto plazo, ofreciendo conclusiones difícilmente trasladables al campo. En el trabajo aquí presentado, se trataron de abordarse los efectos de la radiación UV imitando una situación ecofisiológica plausible en campo, ajustándose a dosis UV a condiciones que alteren a las plantas, pero sin llegar a comprometer su supervivencia. En nuestro caso aplicamos una radiación baja comparada con otros trabajos, aunque elevada si consideramos los niveles ambientales actuales. Esta radiación correspondiente con un índice UV de 13, ya se alcanza en algunas regiones de nuestro planeta, como en las latitudes altas de Chile.

Uno de los problemas que supuso trabajar con estas dosis fue la determinación de si realmente se estaba ejerciendo un efecto fisiológico sobre las mismas. En este sentido se observaron diferencias en el contenido de pigmentos tras dos días de ensayo, viéndose reducidos los niveles de clorofilas y carotenoides, así como la eficiencia fotosintética. Los pigmentos están directamente relacionados con la función fisiológica de las acículas de las coníferas y proporcionan información interesante sobre el estado de salud y la fisiología de los árboles (Tausz et al., 2001). Su función principal en este aspecto es colaborar en la disipación del exceso de energía evitar el daño en la maquinaria fotosintética (Demming-Adams y Adams 1996).

Estos resultados no fueron sorprendentes, puesto que está ampliamente descrita la reducción en la tasa fotosintética en plantas estresadas (Jansen et al., 1998), así como la reducción de pigmentos en casos de estrés por alta irradiación (lumínica y UV). Existen ciertas similitudes entre las etapas iniciales de la respuesta a estrés UV con los fenómenos de fotoinhibición, debido a que la maquinaria fotosintética de la planta no puede utilizar de modo efectivo el exceso de radiación UV-B haciendo imposible que la fotosíntesis se lleve a cabo correctamente. La acumulación de polifenoles nos indica un paso más hacia la adaptación a este estrés, pues son compuestos fotoprotectores que poseen un máximo de absorción dentro del rango UV, disipando la energía incidente en forma de calor (Kondo y Kawashima 2000). Durante las primeras horas del estrés la planta concentra los polifenoles en sus tejidos más externos, tratando de proteger el interior de la acícula.

Tras dos días, la respuesta se generaliza, pudiendo encontrar polifenoles en todos los tejidos de la acícula, demostrando la penetración de la radiación y la necesidad sistémica de defensa. Esta evolución en la distribución del contenido fenólico es similar a la descrita por Mortiz et al., en *Populus* (2014). Si bien es cierto que el tratamiento indujo un efecto sistémico en la planta, no se registró ningún cambio fenotípico apreciable en la yema apical ni en las acículas durante el ensayo; además, tras dos meses del ensayo, la supervivencia de las plantas utilizadas en el ensayo fue total.

Debido a que la cantidad de proteínas nucleares representa solo una pequeña porción de las totales, tanto en número como en abundancia relativa, es necesario un paso de purificación de núcleos para evitar que el conjunto total de proteínas celulares enmascare las proteínas nucleares.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad de proteínas extraída para cada tratamiento, si bien no hay una homogeneidad entre los valores obtenidos, debido principalmente a las limitaciones técnicas al asociar la extracción de núcleos y proteínas de modo consecutivo, lo que supone una elevada complejidad técnica.

Tras la purificación de núcleos, uno de los desafíos a los que hubo que enfrentarse durante el desarrollo de este trabajo ha sido la identificación y caracterización funcional de las proteínas. El empleo de una estrategia basada en el uso de 4 bases de datos nos ha permitido obtener un número de identificaciones similar al obtenido en especies modelo empleando la misma técnica analítica (Jorriin et al. 2009) siendo superior al descrito en otras especies forestales no secuenciadas incluso cuando se aborda el estudio del proteoma foliar (Abril et al. 2011). Pese a haber identificado un alto número de proteínas, y aunque el genoma de *Pinus taeda* ha sido recientemente secuenciado, el número total de anotaciones ha sido bajo, impidiendo un análisis funcional profundo. El trabajo con extractos proteicos nucleares es difícil incluso en especies modelo, incluso tras el BLAST frente a *Arabidopsis* solo se aumentó un 17 %, lo cual indica la dificultad de este tipo de análisis. Esto se debe a la distancia evolutiva entre las especies comparadas. Por un lado, *A. thaliana* pertenece al grupo de las angiospermas herbáceas que se aleja evolutivamente del grupo al que pertenece nuestra especie de estudio, ya que *P. radiata* pertenece al grupo de las gimnospermas. Por lo que dicha evolución explica que existan solo ciertas regiones conservadas dentro del proteoma de ambas especies que puedan ser identificadas en el análisis. Para una función concreta, en cada grupo vegetal existen proteínas con secuencias únicas y distintas a las de otros grupos, lo que dificulta este tipo de análisis, impidiendo así que exista una gran homología entre las proteínas de las especies comparadas.

El gran consumo de recursos que requiere el empleo de esta metodología impide contar con un número adecuado de réplicas experimentales para su análisis, debiendo adoptarse estrategias específicas que nos permitan analizar los datos y solventar dificultades analíticas como la aparición de datos perdidos. Tanto el bajo número de réplicas, como la aparición de valores perdidos y otros artefactos, son males generales en los estudios ómicos existiendo flujos de trabajo específicos para el procesado de estos datos (Jackson et al, 2006; Fiehn et al., 2006; Valledor y Jorriin, 2011).

La variabilidad de los resultados es un inconveniente común en los estudios científicos basados en nUPLC acoplada a espectrometría de masas. Aunque todas las muestras reciben un procesamiento análogo en el laboratorio, siempre existe una variabilidad técnica ineludible que debe ser corregida en el procesamiento de los datos (Jackson et al, 2006; Fiehn et al., 2006; Valledor y Jorrín, 2011), por lo que la cuantificación obtenida se normaliza para evitar que la variabilidad técnica interfiera en los resultados. Esto se realiza dividiendo el área de cada proteína entre el área total obtenida en la muestra, pudiendo compararse de este modo los valores obtenidos para la misma proteína en diferentes muestras.

Tener como objetivo exclusivo el estudio de los núcleos y su periferia reduce drásticamente la eficiencia de los protocolos de extracción. Comparando, por ejemplo, con la proteína total de la acícula. Esto se traduce en que nunca se han extraído más de 200 µg por gramo de acícula de partida. A este hecho se le suma la ineficacia de los protocolos de extracción de núcleos, los cuales además de su bajo rendimiento, nos imposibilitan tener extractos nucleares puros, obligándonos a realizar un filtrado *in silico* de las proteínas no nucleares tras la identificación de su proteoma.

La aproximación seguida en este trabajo nos ha permitido describir una gran cantidad de familias de proteínas nucleares tales como CATALASAS, HISTONAS, FACTORES DE ELONGACION o PROTEINAS DE UNION A ARN.

Se han descrito proteínas nucleares (factores de transcripción) que actúan sobre familias completas de genes modificando su expresión (Vom Endt et al., 2002). Este hecho cobra mucha relevancia dada la aplicabilidad de estos conocimientos en programas de mejora para obtener líneas o clones altamente resistentes a UV, de modo que buscar un modulador único o un pequeño grupo de factores que sean capaces a actuar directamente sobre la regulación de las rutas de la respuesta a este estrés es uno de los primeros pasos para la obtención de plantas más resistentes a UV-B.

De la información aportada por el sPLS-DA se deriva que el componente 1 parece estar relacionado con la aclimatación al estrés UV, puesto que separa las plantas 2d8h del resto. Estas plantas presentan altos niveles de enzimas protectoras frente al daño oxidativo como son SERINA HIDROXIMETILTRANSFERASA 1, CATALASA 2 y 3, y el factor de elongación TU, característico en la mediación de la respuesta al estrés (Kondo y Kawashima, 2000). Este hecho indica que el daño oxidativo es una de las principales causas de la etiología asociada a este estrés y es, por ello, que las plantas aumentan la protección frente al mismo en su proceso de aclimatación.

Asimismo el componente 2 parece estar relacionado con el pico de daño que ocurre tras la primera exposición a la radiación UV, separando 1d2h del resto puesto que muestran una alta correlación con el mismo la PROTEÍNA RIBOSOMAL L11 y la GLICERATO QUINASA. Los ribosomas pueden ajustar su funcionamiento en condiciones de estrés para llevar a cabo una síntesis eficiente de proteínas (Valledor et al., 2013), pudiendo variar la pauta de lectura de los transcritos, es decir el *splicing* alternativo, así como sufrir una remodelación constante de su arquitectura, lo que soporta los datos obtenidos en la PROTEÍNA RIBOSOMAL L11 que reflejan un proceso de respuesta al estrés.

Durante el estudio, surgen dificultades derivadas de la poca información que existe del genoma y el proteoma de *P. radiata*, y aunque el principal esfuerzo en este campo se centre en la formación de madera o el conocimiento de la fisiología del estrés (Dubos et al., 2003; Gion et al. 2005), la información en la actualidad resulta escasa. Bajo estas circunstancias, es necesario para recabar más información, someter las secuencias de proteínas a un análisis frente a proteínas similares expresadas en especies estrechamente relacionadas pueden ser, siempre que exista cantidad razonable de homología de la secuencia entre ambas por sustitución o delección de aminoácidos puede ser tolerada. Para implementar la información obtenida podrían usarse bases de datos de dominios proteicos en los que las proteínas se reconocen según contengan secuencias específicas que se corresponden con una función concreta.

Se espera que estudios más profundos puedan anotar mayor cantidad de proteínas soporten que el componente 1 está relacionado con la aclimatación a estrés UV-B en la planta y por ello se espera que el posterior análisis de las proteínas que aún no han sido caracterizadas apoye esta hipótesis.

CONCLUSIONES

1. La metodología de la extracción de núcleos acoplada a espectrometría de masas se muestra como una técnica resolutive para el estudio de proteínas nucleares, si bien el problema de anotación de las proteínas se presenta como un reto a superar.
2. El análisis multivariable nos ha permitido la separación de las distintas muestras, mostrando las diferencias causadas a nivel proteico por la exposición a la radiación ultravioleta. La proximidad de las distintas muestras dentro de cada grupo indica una baja dispersión biológica y analítica de las muestras dentro de cada tratamiento.
3. Se verifica, según los datos obtenidos de pigmentos y polifenoles, que la dosis aplicada a las plantas genera una respuesta al daño provocada de un modo directo a través del estrés por UV-B e indirectamente por estrés oxidativo.
4. El estrés ultravioleta causa una profunda remodelación del proteoma nuclear, alterando la maquinaria traduccional (PROTEÍNA RIBOSOMAL L11y familia TU), lo que sugiere una remodelación activa del proteoma total de la célula.
5. Se proponen las proteínas citadas anteriormente como marcadores del daño/aclimatación al estrés UV en *Pinus radiata*.

BIBLIOGRAFIA

- Abril N, Gion JM, Kerner R, Müller-Starck G, Cerrillo RMN, Plomion C y Jorrin-Novo (2011). Proteomics research on forest trees, the most recalcitrant and orphan plant species. *Phytochemistry*, 72(10), 1219–42.
- Adamska I. (1997) ELIPs – light-induced stress proteins. *Physiol Plant* 100: 794–805.
- Albert KR, Mikkels TN, Ro-Poulsen H, Arndal MF y Michelsen A. (2011) Ambient UV-B radiation reduces PSII performance and net photosynthesis in high Arctic *Salix arctica*. *Environ Exp Bot* 72: 439–447.
- Alvarez J, Rodriguez & Suarez F, Domingo (1999). Mejoramiento de la productividad de plantaciones de *Pinus radiata* D. Don, a través de un método racional de fertilización. *Bosque (Valdivia)*, vol.20, no.1, p.23-36. ISSN 0717-9200.
- Bannister MH. (1954). Variation in a sample of *Pinus radiata* cones from the Nelson District. *Transactions of the Royal Society of New Zealand*, 82: 25–40.
- Bieza Ky Lois R. (2001). An *Arabidopsis* mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. *Plant Physiology*, 126(3), 1105-1115.
- Britt AB. (1996) DNA damage and repair in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 75–100
- Brosché M y Strid A. (2003) Molecular events following perception of ultraviolet-B radiation by plants. *Physiol Plantarum* 117: 1–10.
- Cachorro VE, Durán P y De Frutos AM. (1996). Retrieval of vertical ozone content using the Chappuis Band with high spectral resolution solar radiation measurements. *Geophysical Research Letters* 23: doi: 10.1029/96GL03239. issn: 0094-8276
- Caldwell MM. (1971) Solar UV irradiation and the growth and development of higher plants. *Photophysiology*, vol. VI, 131–177.
- Cloix C y Jenkins GI (2008) Interaction of the *Arabidopsis* UV-B-specific signalling component UVR8 with chromatin. *Mol Plant* 1: 118–128.
- Contesse G.D. (1987). Apuntes y consideraciones para la historia del pino radiata en Chile. *Boletín de la Academia Chilena de la Historia*, 97: 351–373.
- DeLucia EH, Day TA y Vogelmann, TC. (1992) Ultraviolet-B and visible light penetration into needles of two species of subalpine conifers during foliar development, *Plant Cell Environ.* 15, 921–929.
- Demmig-Adams B y Adams WW. (1996). The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in plant science*, 1(1), 21-26.
- Demmig-Adams B, Adams WW, Barker DH, Logan B A, Bowling DR, y Verhoeven AS (1996). Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiologia Plantarum*, 98(2), 253-264.
- Don D. (1836). Descriptions of five new species of the genus *Pinus*, discovered by Dr. Coulter in California. *Transactions of the Linnean Society of London*, 17: 442.
- Dubos C y Plomion C. (2003). Identification of water-deficit responsive genes in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) roots. *Plant molecular biology*, 51(2), 249-262.
- Fiehn O, Kristal B, Ommen VB, Sumner LW, Sansone SA, Taylor C, Hardy N, and Rima Kaddurah-Daouk (2006). *OMICS: A Journal of Integrative Biology*. June 2006, 10(2): 158-163.
- Goldazarena A, Romón P y López S. (2012). Bark beetles control in forests of Northern Spain. In S. Soloneski, ed. *Integrated pest management and pest control—current and future tactics*, 323–352.

- Görg A., Postel W, Weser J, Günther S, Strahler JR, Hanash SM, y 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.
- Grant-Downton RT, y Dickinson HG. (2006). Epigenetics and its implications for plant biology 2. The “epigenetic epiphany”: epigenetics, evolution and beyond. *Annals of Botany*, 97(1), 11–27.
- Greenberg BM. (1996) Morphological and physiological responses of *Brassica napus* to ultraviolet-B radiation: photomodification of ribulose-1,5- bisphosphatm carboxylase/oxygenase and potential acclimation processes, *J. Plant Physiol.* 148: 78–85.
- Haring M, Offermann S, Danker T, Horst I, Peterhansel C, y Stam M. (2007). Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization. *Plant Methods*, 3, 11.
- Herman JR. (2010), Global increase in UV irradiance during the past 30 years (1979–2008) estimated from satellite data, *J. Geophys. Res.*, 115, D04203.
- Jansen MA, Gaba,V y Greenberg,BM (1998). Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends in plant science*,3(4), 131-135.
- Jansen MA, van den Noort, RE, Tan MA, Prinsen E, Lagrimini LM y Thorneley RN (2001). Phenol-oxidizing peroxidases contribute to the protection of plants from ultraviolet radiation stress. *Plant Physiology*, 126(3), 1012-1023.
- Jansen, M. A. (2002). Ultraviolet-B radiation effects on plants: induction of morphogenic responses. *Physiologia Plantarum*, 116(3), 423-429.
- Jenkins GI y Brown BA (2007) UV-B perception and signal transduction. Whitelam GC, Halliday KJ (eds) *Light and Plant Development*. Blackwell Publishing, Oxford, 155–182.
- Johnson H. *La madera*. Ed. Blume. 1994. 7-10.
- Jorrín-Novo JV, Maldonado AM, Echevarría-Zomeño S, Valledor L, Castillejo M, Curto M y Redondo I (2009). 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*, 72(3), 285–314.
- Klein RM. (1978) Plant and near ultraviolet radiation. *Bot. Rev.* 44, 1–127.
- Kondo N, y Kawashima M. (2000). Enhancement of the tolerance to oxidative stress in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings by UV-B irradiation: possible involvement of phenolic compounds and antioxidative enzymes. *Journal of Plant Research*, 113(3), 311-317.
- Krizek, DT. (1975) Influence of ultraviolet radiation on germination and carly seedling growth. *Physiol. Plant.* 34: 182–186.
- Kusamo M, Tohge T, Fukushima A, Kobayashi M, Hayashi N, Otsuki H, Kondou Y, Goto H, Kawashima M, Matsuda F, Niida R, Matsui M, Saito K y Fernie AR (2011) Metabolomics reveals comprehensive reprogramming involving two independent metabolic responses in *Arabidopsis* to UV-B light. *Plant J* 67: 354–369.
- Landry LG. (1997) An *Arabidopsis* photolyase mutant is hypersensitive to ultraviolet-B radiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 328–33.
- Lay J, Rohana Liyanage , Borgmann S y Wilkins CL (2006). Problems with the “omics”. *Tends in analytical chemistry*. 11:1046, 1056.
- Libby WJ. (1997). Native origins of domesticated radiata pine. In R.D. Burdon & J.M. Moore, eds. “IUFRO '97 genetics of radiata pine”. Proceedings of NZ FRI–IUFRO Conference 1–4 December, and Workshop 5 December, Rotorua, New Zealand, pp. 9–24. FRI Bulletin No. 203. Rotorua, New Zealand, Forest Research Institute.
- Long SP, Humphries S & Falkowski PG (1994) Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45: 633–662.

- MAGRAMA. 2006. Anuario de estadística forestal 2006. Madrid, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
- Maruta T, Tanouchi A, Tmoi M, Yabuta Y, Yoshimura K, Ishikawa T y Shigeoka S (2010) Arabidopsis chloroplastic ascorbate peroxidase isoenzymes play a dual role in photoprotection and gene regulation under photooxidative stress. *Plant Cell Physiol* 51:190–200.
- McKenzie RL, Aucamp P.J, Bais AF, Björn LO, Ilyas M y Madronich, S. (2011). Ozone depletion and climate change: impacts on UV radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 10(2), 182-198.
- Mead, D.J. 2013. Sustainable management of Pinus radiata plantations. FAO Forestry Paper No. 170. Rome, FAO. 4-14.
- Pascual J, Cañal MJ, Escandón M, Weckwerth W, Meijón M y Valledor L.(2014) Systems biological analysis of UV-radiation adaptive mechanisms in Pinus radiata needles. Under review.
- Romero-Rodríguez MC, Pascual J, Valledor L y Jorrín-Novo J. (2014). Improving the quality of protein identification in non-model species. Characterization of *Quercus ilex* seed and *Pinus radiata* needle proteomes by using SEQUEST and custom databases. *Journal of proteomics*,105, 85-91.
- Romero-Rodríguez MC, Vázquez JP, Valledor L y Jorrín-Novo J. (2014). Improving the quality of protein identification in non-model species. Characterization of *Quercus ilex* seed and *Pinus radiata* needle proteomes by using SEQUEST and custom databases. *Journal of proteomics* 105: 85-91.
- Rossini S, Casazza AP, Engelmann ECM, Havaux M, Jennings RC, Soave C (2006) Suppression of both ELIP1 and ELIP2 in Arabidopsis does not affect tolerance to photoinhibition and photooxidative stress. *Plant Physiol* 141: 1264–1273.
- Sánchez-Rodríguez F, Rodríguez-Soalleiro R, España ., López C y Merino A (2002). Influence of edaphic factors and tree nutritive status on the productivity of *Pinus radiata* D. Don plantations in northwestern Spain. *Forest Ecology and Management*, 171(1), 181-189.
- Sims D y Gamon, J (2002). Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment*, 81(2-3), 337–354. doi:10.1016/S0034-4257(02)00010-X
- Sisson, WB, Caldwell MM. (1976) Photosynthesis, dark respiration, and growth of *Rumex patientia* L. exposed to ultraviolet irradiance (288 to 315) nanometers simulating a reduced atmospheric ozone column. *Plant Physiol*. 58: 563–568.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto E, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC.1 (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150 (1): 76-85.
- Sullivan JH, Teramura AH & Ziska LH. (1992) Variation in UV-B sensitivity in plants from a 3,000-m elevational gradient in Hawaii, *Am. J. Bot.* 79: 737–743.
- Tausz M, Bytnerowicz A, Arbaugh MJ, Wonish A, & Grill D. (2001) Multivariate patterns of biochemical responses of *Pinus ponderosa* trees at field plots in the San Bernardino Mountains, southern California. *Tree Physiol* 21: 329–336.
- Teramura AH. & Sullivan JH. (1994) Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants, *Photosynth. Res.* 39, 463–473.
- Valledor L, & Jorrín J. (2011). Back to the basics: Maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses. *Journal of Proteomics*, 74: 1–18.
- Valledor L, Cañal MJ, Pascual J, Rodríguez R y Meijón M. (2012). Early induced protein 1 (PrELIP1) and other photosynthetic, stress and epigenetic regulation genes are involved in *Pinus radiata* D. don UV-B radiation response. *Physiologia plantarum*, 146(3), 308-320.

- Valledor L, Furuhashi T, Hanak A y Weckwerth W. (2013). Systemic cold stress adaptation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 12(8), 2032-2047.
- Valledor L, y Weckwerth W. (2014). An improved detergent-compatible gel-fractionation LC-LTQ-Orbitrap-MS workflow for plant and microbial proteomics. In *Plant Proteomics* 347-358.
- Van, TK, Garrard LA. (1976) Effect of UV-B-radiation on net photosynthesis of some C3 and C4 plants. *Soil and Crop Science Society of Florida, Proceedings* 35: 1–3 .
- Vom Endt D, Kijne JW y Memelink J. (2002). Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators?. *Phytochemistry*, 61(2), 107-114.
- Zarter CR, Adams WW, Ebbert V, Cuthbertson DJ, Adamska I, Demmig-Adams B (2006). Winter down-regulation of intrinsic photosynthetic capacity coupled with up-regulation of Elip-like proteins and persistent energy dissipation in a subalpine forest. *New Phytol* 172: 272–282.
- Zinser C, Jungblut T, Heller W, Seidlitz HK, Schnitzler JP, y Ernst D (2000). The effect of ozone in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.): gene expression, biochemical changes and interactions with UV-B radiation. *Plant, Cell & Environment*, 23(9), 975-982.

Recursos web:

- <http://ambiente.usach.cl/uv/index.html>, Universidad de Santiago de Chile, Servicio de Información meteorological y ambiental. Consultada el 2 de Julio de 2014.
- <http://www.epa.gov/sunwise/es/capaozono.html>, Agencia de Protección Ambiental, Gobierno de los Estados Unidos de América. Consultada el 30 de Junio de 2014.
- <http://www.rivm.nl/en/RIVM>, Instituto Nacional de Salud Pública y de Medio Ambiente, Ministerio de Salud, Bienestar y Deporte, Gobierno de Holanda. Consultada el 30 de Junio de 2014.

