



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Aproximación proteómica de la respuesta a la infección por el virus de la hoja blanca en dos variedades de *Oryza sativa* L.

Nubia Farid Barrera Cobos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología
Bogotá, Colombia

2015

Aproximación proteómica de la respuesta a la infección por el virus de la hoja blanca en dos variedades de *Oryza sativa* L.

Nubia Farid Barrera Cobos

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Doctor en Biotecnología

Directores:

D.Sc. Luz Marina Melgarejo Muñoz

D.Sc. Julio César Calvo Mozo

Línea de Investigación:

Ciencias Agrícolas

Grupo de Investigación:

PROTEOMA UD

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología
Bogotá, Colombia

2015

*A Mi Dios,
A Valentina: Por todo el tiempo que te he
dejado de dar: mi hermosa hija
A Mi amada Madre: María Salome
A mi Padre: Por su paciencia, tolerancia
A mi Familia*

En la Brecha

¡Ah desgraciado, si el dolor te abate,
si el cansancio tus miembros entumece!
Haz como el árbol seco, reverdece.
y como el germen enterrado: late.

Resurge, alienta, grita, anda, combate,
vibra, ondula, retuena, resplandece...
Haz como el río con la lluvia: ¡Crece!
Y como el mar contra la roca: ¡Bate!

De la tormenta al iracundo empuje,
no has de balar, como el cordero triste,
sino rugir, como la fiera ruge...

¡Levántate!, ¡Revuélvete!, ¡Resiste!
Haz como el toro acorralado: ¡Muge!
O como el toro que no muge: ¡Embiste!

José de Diego

Agradecimientos

Deseo agradecer al Todopoderoso porque encaminó todas aquellas acciones para que este trabajo se realizara.

A mis directores: Julio César Calvo Mozo, quien desde el primer momento pensó que este trabajo era posible, y cuya culminación dio los resultados esperados; a Luz Marina Melgarejo Muñoz por sus consejos y su acierto en la hora de tomar decisiones.

Al Doctor Jesús Jorrín Novo, quién me acogió como su estudiante en el Laboratorio de Bioquímica y Porteómica Vegetal de la Universidad de Córdoba, Inmaculada Criado, Besma Shaier, José Valero, Raquel Gonzalez, Sira Echeverria por su acompañamiento durante mi estancia en la Universidad de Córdoba.

A la Dra. Maribel Cruz, al Dr. César Martínez, al Dr Mauricio Castaño, al Dr. Iván Lozano, y a todas las personas que colaboraron en la realización de los ensayos de infectividad en el Centro de Investigaciones en Agricultura Tropical (CIAT).

A Fanny Guzman Quimbayo de la Universidad Católica de Chile por su apoyo en la síntesis de péptidos y la generación de los sueros, una persona maravillosa de quien se puede aprender mucho en el campo de síntesis química de péptidos y quién se interesó por el trabajo que realizamos.

A Yolanda Silva de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) por la ayuda en los ensayos ELISA y por la ayuda en el diseño del ensayo, quién aportó su experiencia de más de 20 años en el desarrollo de ensayos ELISA con péptidos.

Agradezco enormemente a Nubia Marcela Orjuela Baquero, su amistad, su ayuda inmensa y apoyo en momentos difíciles en la realización de este trabajo, por ser esa personita en

constante crecimiento que ayuda desinteresadamente a los demás; a Carmen Tulia Guampe Potosí por su apoyo incondicional; a Rosa Elsa Pérez por sus sabios consejos; a Ricardo porque más de una vez me escuchó y me dio aliento para continuar.

Al Doctorado en Biotecnología, la Dra. Sonia Ospina, quien me alentó a continuar y no abandonar esta tarea, Raquel como asistente y los Docentes del Doctorado, siempre se aprende, continuamente estamos en proceso de adquirir nuevos conocimientos y reconocer personas detrás de sus títulos: Muchas gracias.

Sin ser menos importante: Mi Familia, Mis padres: María Salomé (q.e.p.d.) y José, quienes mantuvieron esa llama y animaban a terminar cada vez que me sentía sola, abandonada y sin ánimos de terminar el Doctorado, mi madre quién siempre me daba voces de aliento y de ternura, con quién compartí grandes momentos, quién me ayudó y me alentó cada vez que podía, Mi hija, la hermosa Valentina, quien tuvo paciencia ante mis quejas y reclamos, ante mis desafores de genio, quien con su voz y con sus palabras sabía acallar todos mis lamentos, te amo tanto hija, no sabes cuanto, y te veo crecer de forma inesperada; a mis hermanos, Raul, Fredy, José, Jesús y Orlando y mi hermana, Nohora, por creer que es posible.

Me llenó de felicidad el escribir todas estas palabras, sé que muchas personas deberían estar aquí, el espacio es muy corto para nombrarlas y acordarme de ellas, pero sé que, si en algún momento me crucé con ellas, muy seguramente aprendí muchas cosas.

Resumen

El virus de la hoja blanca (RHBV), transmitido por el insecto sogata (*Tagosodes orizicolus*), es una enfermedad que ataca a las plantas de arroz (*Oryza sativa*), generando pérdidas en Colombia entre el 15% y el 80% de la producción. Con el fin de evaluar la respuesta del arroz frente al vector y al virus, se seleccionaron las variedades Fedearroz 2000 y Colombia I, sometidas a tres tratamientos: control, insecto no portador del virus, e insecto portador del virus. En el análisis comparativo de los geles bidimensionales se caracterizaron 137 manchas para Fedearroz 2000, 143 para Colombia I y 96 comunes a las dos variedades. Se analizaron 155 manchas por espectrometría de masas, de las cuales se seleccionaron 5 con comportamientos diferenciales en las dos variedades entre los tratamientos. Para la predicción de la estructura tridimensional de las proteínas se usó el servidor I-TASSER y se diseñaron y sintetizaron péptidos dendriméricos con restricción conformacional a α -hélice y *loop*. Con estos se inmunizaron ratones Balb-c, y los sueros obtenidos se enfrentaron a sus respectivos péptidos y a extractos de hojas de los tres tratamientos. Los sueros de los ratones mostraron una muy fuerte reacción con los respectivos péptidos y reconocieron proteínas en los extractos de hojas. Estos resultados son muy prometedores para el diseño de métodos inmunoenzimáticos aplicados en la identificación de proteínas en el estudio diferencial de variedades de plantas de arroz.

Palabras clave: RHBV, DDC, *Tagosodes orizicolus*, péptidos estructurados, síntesis de péptidos.

Abstract

The rice hoja blanca virus (RHBV) transmitted by the planthopper insect (*Tagosodes orizicolus*), is a disease that attacks the rice and generates production losses in Colombia between 15% and 80%. In order to evaluate the response of rice against the virus and vector, we selected Fedearroz 2000 and Colombia I, which have a different resistance degrees, and were applied three treatments: neither vector or virus, vector not carrying the virus, and carrying the virus. In the 2DE comparative analysis were characterized 137 spots into Fedearroz 2000 line, 143 into Colombia I line and 96 for both lines; 155 spots were analyzed by mass spectrometry to identify proteins, and were selected differential spots in both lines. The I-TASSER server was used for 3D structure prediction of proteins and dendrimeric peptides with conformational restriction to α -helix and loop were designed and synthesized. Balb-c mice were immunized with those peptides. Sera from mice were tested against conformationally restricted peptides and leaf extracts from the three treatments. Sera from mice showed very strong reaction with peptides and recognized proteins into leaf extracts. These results are very promising for the design of immunoenzymatic methods applied in the identification of proteins in the differential study of varieties of rice plants.

Keywords: RHBV, peptide synthesis, DDC, *Tagosodes orizicolus*

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XIV
Lista de Símbolos y abreviaturas	XV
Introducción	1
1. Objetivos	3
1.1 Objetivo general.....	3
1.2 Objetivos específicos	3
2. Marco teórico	5
2.1 Introducción	5
2.2 Virus de la hoja blanca.....	5
2.3 Proteómica en arroz	6
2.4 Importancia agronómica de las variedades de estudio.....	9
2.5 Mimos conformacionales	10
2.6 Interactómica	11
3. Materiales y métodos	15
3.1 Material vegetal	15
3.1.1 Ensayo de infectividad	15
3.1.2 Ensayo confirmatorio de la presencia del virus.....	17
3.1.3 Colecta del material vegetal	18
3.2 Extracción y cuantificación de proteínas y SDS-PAGE	18
3.2.1 Extracción de proteínas.....	18
3.2.2 Cuantificación de proteínas	20
3.3 Análisis proteómico.....	20
3.3.1 Electroforesis SDS-PAGE	20
3.3.2 Electroforesis bidimensional (2 - DE)	21
3.3.3 Tinción de geles y análisis	22
3.3.4 Análisis estadístico.....	23
3.3.5 Identificación de proteínas	25
3.4 Selección de proteínas y análisis estructural	27
3.4.1 Interactómica de proteínas.....	28
3.4.2 Predicción de estructura tridimensional.....	28
3.4.3 Mimos conformacionales.....	29

4. Resultados y discusión	33
4.1 Material vegetal	33
4.1.1 Ensayo de infectividad	33
4.1.2 Ensayo de presencia del virus de la hoja blanca RHVB	36
4.2 Extracción de proteínas	36
4.3 Análisis de aproximación proteómica	38
4.3.1 Análisis SDS-PAGE del perfil de proteínas producidas por infección con RHBV	38
4.3.2 Análisis de electroforesis 2-DE del perfil de proteínas obtenidas en los diferentes tratamientos	40
4.3.3 Análisis de comparación de los patrones de perfiles de proteínas e identificación de proteínas (MS/MS)	47
4.3.4 Identificación de proteínas comunes a las variedades Fedearroz 2000 y Colombia I	50
4.3.5 Identificación de proteínas que aparecen únicamente en la variedad Fedearroz 2000 sometida a los tres tratamientos	67
4.3.6 Identificación de proteínas que aparecen únicamente en la variedad Colombia I sometida a los tres tratamientos	70
4.4 Selección de proteínas	78
4.4.1 Interactómica de proteínas	78
4.4.2 Predicción de estructura 3D	82
4.4.3 Diseño y síntesis de los péptidos	86
4.4.4 Validación de los péptidos en ensayos ELISA	89
5. Principales hallazgos de este estudio	92
5.1 Conclusiones	92
5.2 Recomendaciones	93
A. Anexo: Tabla de manchas identificadas con la secuencia de péptidos que se utilizo para el BLAST y el nombre	95
B. Identificación de las manchas seleccionadas en común para la variedad Fedearroz 2000	108
C. Identificación de las manchas seleccionadas de la variedad Colombia I	114
D. Anexo: Desviaciones estándar de las intensidades ópticas de las proteínas identificadas por MS/MS	125
E. Anexo: Predicción de estructura de las proteínas seleccionadas	131
F. Anexo: Interactómica de las proteínas seleccionadas	151
Bibliografía	155

Lista de figuras

	Pág.
Figura 3-1: Síntomas de Virus de la Hoja Blanca.....	16
Figura 4-1: Detalle de los síntomas producidos por RHBV.	34
Figura 4-2: Plantas de arroz, de las variedades Colombia I y Fedearroz 2000.	35
Figura 4-3: Comparación de métodos de extracción de proteínas arroz	37
Figura 4-4: Perfil electroforético de Fedearroz 2000 y Colombia I	39
Figura 4-5: Perfil de Electroforesis 2-DE de proteínas de hojas de arroz	46
Figura 4-6: Electroforesis 2-DE de la variedad Fedearroz 2000.....	46
Figura 4-7: Electroforesis 2-DE de la variedad Colombia I.....	47
Figura 4-8: Master gel obtenido en el experimento,	48
Figura 4-9: Diagrama de Venn de las manchas encontradas en las dos variedades: Fedearroz 2000 y Colombia I.	48
Figura 4-10: Análisis por agrupamientos y PCA I.....	50
Figura 4-11 Diagrama de barras de proteínas relacionadas con fotosíntesis	59
Figura 4-12 Diagrama de barras de las proteínas relacionadas con el sistema antioxidante	61
Figura 4-13 Diagrama de barras de las proteínas relacionadas con metabolismo	64
Figura 4-14 Diagrama de barras de las proteínas de defensa	65
Figura 4-15 Diagrama de barras de las proteínas FHA y Proteína S26 ribosomal 40S	66
Figura 4-16: Distribución de manchas de la variedad Fedearroz 2000.....	67
Figura 4-17: Diagrama de barras de: la variedad Fedearroz 2000.....	70
Figura 4-18: Distribución de manchas de la variedad Colombia I.....	71
Figura 4-19: Diagrama de barras de: la variedad Colombia I.....	75
Figura 4-20: Interactoma generado para la proteína FHA	82
Figura 4-21: Predicción de la estructura secundaria de FHA	83
Figura 4-22: Modelos de predicción de la estructura terciaria de FHA	84
Figura 4-23: Modelo de predicción de la estructura terciaria Ferredoxina y MUB4	85
Figura 4-24: Modelo de predicción de la estructura terciaria de anillo de zinc tapetum y alfa galactosidasaSER.....	85
Figura 4-25: Identificación de subestructuras en la proteína FHA	86
Figura 4-26: Modelo seguido para la síntesis del doble dímero	87
Figura 4-27: Espectros de Dicroísmo Circular de los péptidos con restricción conformacional a α -hélice.	90

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 4-1: Prueba de ELISA de variedades Fedearroz 2000 y Colombia I.	36
Tabla 4-2: Cantidad de bandas de las variedades Colombia I y Fedearroz 2000.	40
Tabla 4-3: Identificación de las bandas de la variedad Fedearroz 2000.	41
Tabla 4-4: Identificación de las bandas de la variedad Colombia I.	43
Tabla 4-5: Distribución de las manchas en las dos variedades	49
Tabla 4-6: Identificación de las manchas en común entre las dos variedades	52
Tabla 4-7: Identificación de las manchas de la variedad Fedearroz 2000	69
Tabla 4-8: Identificación de las manchas de la variedad Colombia I	72
Tabla 4-9: Proteínas diferenciales identificadas en las dos variedades	77
Tabla 4-10: Proteínas seleccionadas para el estudio de predicción de estructura y diseño de péptidos restringidos conformacionalmente	79
Tabla 4-11: Secuencias de péptidos identificados en las proteínas de arroz	87
Tabla 4-12: Péptidos diseñados y sintetizados	88
Tabla 4-13: Pesos moleculares de los dobles dímeros (DDC) sintetizados.	89
Tabla 4-14: Resultados de la inmunización con péptidos de la proteína FHA.	91
Tabla 4-15: Ensayo de identificación de proteínas en extractos de hojas de arroz	91

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>RHBV</i>	Virus de la hoja blanca
<i>DDC</i>	Double Dimer Construct
<i>RHBV</i>	Rice Hoja Blanca Virus
<i>RSV</i>	Rice Stripe Virus
<i>MStV</i>	Maize Stripe tenuiVirus
<i>WGSV</i>	Wheat Grassy Stunt Virus
<i>RGVS</i>	Rice Grassy Stunt Virus
<i>2-DE PAGE</i>	Electroforesis Bi dimensional
<i>IEF</i>	Isoelectroenfoque
<i>pI</i>	Punto isoeléctrico
<i>Mr</i>	Masa relative
<i>IPG</i>	Gradiente de pH inmovilizado

Introducción

La proteómica es el campo de estudio que abarca la estructura, función y expresión de todas las proteínas en el contexto bioquímico o biológico de un organismo. Mientras el genoma es el mismo en cada célula, el proteoma se presenta de forma diferente en cada célula de un mismo organismo, es muy variable en el tiempo y responde a múltiples factores que se presentan en la naturaleza, de índole fisiológico, metabólico, nutricional, farmacológico y ambiental. La proteómica ha permitido el descubrimiento de biomarcadores, conocer nuevos mecanismos en la patogenia de diferentes organismos, descubrir nuevos fármacos y estudiar las variaciones de proteínas que ocurren durante los procesos fisiológicos y patológicos. La respuesta de las plantas al estrés biótico o abiótico incluye cambios en la expresión de proteínas y la modificación post-transduccional de las proteínas para activar su sistema de defensa contra los desafíos, lo cual resulta útil en el estudio comparativo de especies con diferente resistencia ante la infección por diferentes patógenos (Deswal et al., 2013).

Adicional a la información en la expresión de proteínas, se puede hallar la información de la interacción de dichas proteínas, su estructura y la posibilidad de ser identificadas en muestras de diferentes variedades por métodos inmunoenzimáticos. Las interacciones proteína-proteína (IPP) son esenciales en muchos procesos biológicos fundamentales y usando información de redes genómicas, se han generado interacciones PP en algunas especies vegetales entre las que se tiene la de *Arabidopsis thaliana*, la cual se tomó como guía para llevar a cabo un enfoque similar para predecir el interactoma de arroz, con el fin de proporcionar una herramienta más para ampliar el conocimiento sobre los procesos biológicos que se llevan a cabo en el arroz (Ho Ch. et al., (2012).

Por otra parte, los péptidos sintéticos se han utilizado para generar anticuerpos dirigidos hacia sitios específicos de las proteínas, aunque los resultados obtenidos contra péptidos lineales no han sido muy exitosos, ya que son dependientes de la estructura que tiene dicha secuencia en la proteína nativa. Como las cavidades de unión de los anticuerpos

generados por las estructuras desordenadas de los péptidos deben reflejar este desorden, es de esperarse por lo tanto la no unión a las superficies de las proteínas nativas. Uno de los principales objetivos de la ingeniería de péptidos es construir moléculas basadas en estas observaciones y, así, sintetizar péptidos con acceso más restringido al espacio conformacional, con lo cual se logran incrementos en la especificidad y en la energía de unión. La base de este enfoque es que, péptidos restringidos a imitar la estructura tridimensional de fragmentos de proteínas de arroz, deben servir como mejores inmunógenos, toda vez que en las reacciones antígeno-anticuerpo se prevé que se mejoren significativamente cuando se alcance la complementariedad de las formas espaciales interactuantes (Calvo y Satterthwait, 2005).

En este trabajo se utilizaron métodos proteómicos con el fin de identificar proteínas en común en dos variedades de arroz que se cultivan en Colombia, Fedearroz 2000 y Colombia I, proteínas de las cuales aún no se conoce la estructura tridimensional, la cual fue predicha utilizando el servidor I-TASSER, basado en la predicción de estructura de lagunas de estas proteínas se seleccionaron fragmentos expuestos para ser sintetizados utilizando nuevos métodos de síntesis química de péptidos estructurados; frente a estos péptidos se obtuvieron sueros que reconocieron estas proteínas en extractos de hojas de las dos variedades de estudio.

Pregunta de investigación:

- ¿Cuáles grupos funciones de proteínas se presentan en respuesta a la infección del virus de la hoja blanca en las variedades Fedearroz 2000 y Colombia I?
- ¿Es posible que con el uso de péptidos que imiten fragmentos estructurados de proteínas se puedan generar anticuerpos que reconozcan estas proteínas en extractos de plantas?

Hipotesis

Utilizando métodos proteómicos es posible seleccionar proteínas con el fin de identificar plantas que han sido expuestas al virus de la hoja blanca, a través del uso de péptidos que imiten fragmentos estructurados de dichas proteínas.

Con base en los anteriores conceptos se plantearon los siguientes objetivos para desarrollar el presente trabajo de investigación:

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Evaluar perfiles proteicos en las variedades de *Oryza sativa* L. Colombia I y Fedearroz 2000, en respuesta a la infección por el virus de la hoja blanca (RHBV) mediante proteómica diferencial

1.2 Objetivos específicos

- Examinar los cambios en los perfiles proteicos en hojas de dos variedades de *Oryza sativa* L. post-infección con el virus de la hoja blanca mediante electroforesis bidimensional y análisis bioinformático.
- Identificar proteínas diferenciales en las hojas de las dos variedades de *Oryza sativa* L. post-infección por medio de espectrometría de masas y análisis bioinformático.
- Seleccionar al menos una proteína que pudiera ser utilizada en ensayos inmunoenzimáticos de identificación.

2.Marco teórico

2.1 Introducción

Dentro de las regiones de gran producción de arroz, las enfermedades causadas por virus restringen la producción por daño considerable en extensiones de cultivo; las pérdidas económicas causadas por este virus superan el 80% en cada plantación (Morales y Niessen, 1983).

2.2 Virus de la hoja blanca

Dentro de las regiones de gran producción de arroz, las enfermedades causadas por el virus de la hoja blanca restringen la producción por daño considerable en extensiones de cultivo; las pérdidas económicas causadas por este virus superan el 80% en cada plantación (Morales y Niessen, 1985). Este virus también se ha denominado rice hoja blanca tenuivirus y se ha presentado en Centro y Sur América (Jennings, 1963, Vargas, 1985; Morales & Jennings, 2010). Las plantas infectadas presentan esterilidad parcial o total de la inflorescencia, además de enanismo y bandas cloróticas y moteadas en las hojas. El virus es transmitido por el vector *Tagosodes orizicolus* Muir (Morales y Niessen, 1983).

El virus de la hoja blanca, (sigla en inglés RHBV: Rice Hoja Blanca Virus) , se encuentra clasificado dentro de los *Tenuivirus*, los cuales se reconocieron como un grupo de virus de plantas en 1987 (Gingery, 1987), poseen un genoma de cadena simple (ss) de RNA de cadena negativa) Dentro de este grupo se encuentran virus como el virus del enanismo del arroz (sigla en inglés RSV: Rice Stripe virus), virus del mosaico estriado del trigo (sigle en inglés WGSV: Wheat Grassy Stunt Virus), virus del rayado del maíz (sigla en inglés: MStV: Maize Stripe tenuiVirus), virus del rayado del arroz (RGVS: Rice Grassy Stunt virus).

(Morales y Niessen, 1983; 1985; RAmierz et al., 1992; Ramirez y Haenni, 1994; Espinoza, 1996).

Se ha encontrado que las partículas del virus de la hoja blanca tienen estructura de hebra fina filamentosa con una longitud entre 3 nm y 8 nm (Morales y Niessen (1985) y que forman agrupaciones en forma de anillos (Espinoza, 1992; 1993; Morales & Jennings, 2010).

2.3 Proteómica en arroz

El arroz es considerado un modelo de especies en genética molecular debido a su tamaño, genoma diploide que ha sido completamente secuenciado y que revela 466 Mega pares de bases con un estimado de 46000 a 55000 genes (Goff et al., 2002). Sin embargo, debido a las modificaciones postranscripcionales y postraduccionales, no siempre es posible predecir las funciones exactas de los genes que se encuentran involucrados en diferentes respuestas a múltiples condiciones (Wan et al., 2008; Romero et al., 2014), incluyendo el estrés biótico y abiótico (Song et al., 2001; Ahsan et al., 2008; Khan y Komatsu, 2004; VEtleno- Debout et al., 2004; Jongdee et al., 2006; Sun et al., 2008; Feng et al., 2008; Palulaitis y Carr, 2008; Saho et al., 2008; Ge et al., 2009; Shri et al., 2009; Nisha et al., 2012; Chen et al., 2012). Igualmente, el estudio del genoma del arroz ha permitido conocer extensas regiones de contenido génico conservado y ordenado, cuyos datos pueden ser utilizados para realizar diferentes estudios para el mejoramiento de este cultivo (Lamey, 1969; Goff et al., 2002; Yu et al., 2002).

En la década de los 70's, la técnica de electroforesis (2-DE PAGE) se desarrolló para separar mezclas de proteínas acorde a su carga (pI). Por isoelectroenfoque (IEF) en la primera dimensión y de acuerdo con su peso molecular (Mr) por SDS-PAGE en la segunda dimensión (O'Farrell, 1975). Después del desarrollo de gradientes de pH inmovilizados (IPG) para ser utilizados en proteómica (Bjellqvist et al., 1982), el método de 2-DE ha sido un método común en separación de proteínas con la utilización de varios rangos de IPGs para obtener una mejor resolución de las proteínas contenidas en una mezcla (Rogowska-Wrzesenska et al., 2013); esto desarrollado de forma pareja con el análisis por espectrometría de masas (Yates et al., 1998)

La técnica de identificación de proteínas referida como PMF (por su sigla en inglés: Peptide Mass Fingerprint), es particularmente aplicable para proteínas de todos los organismos cuyo genoma o cDNA ha sido secuenciado (Gervaert, 2000). Para la identificación de proteínas se utiliza la espectrometría en Tandem (MS/MS) (Havilio et al., 2003), electrospray o MALDI, para determinar la información de la secuencia de los péptidos obtenidos luego de la digestión con tripsina (Maldonado et al., 2008; Valledor y Jorrín, 2011).

El término proteoma se refiere al estudio de todas las proteínas expresadas en un tiempo, bajo unas condiciones específicas, en un organismo (Qing-Po, 2006; Gevarty et al., 2000). Término que no se restringe a la construcción de repertorios de proteínas, sino también al estudio de las propiedades de las proteínas (niveles de expresión, modificaciones pos-traduccionales, interacciones proteína – proteína, cantidad relativa, actividad específica, localización, estructura tridimensional, etc.); a gran escala, para obtener una visión global e integrada de los procesos y redes a nivel proteico. Propiedades que no pueden predecirse del genoma directamente (Norin y Sundström, 2002).

El análisis de proteínas es el método más directo para definir la función de los genes porque en general el genoma de un organismo es muy estable a través de muchas generaciones, mientras que el transcriptoma y el proteoma cambian durante el desarrollo, bajo condiciones de estrés biótico o abiótico o bajo otros estímulos, algunas veces rápida y dramáticamente, pero no proporcionalmente (Jorin et al., 2007, 2009; Yu et al., 2002).

El uso de la proteómica puede ser esencial en el establecimiento de una herramienta de diagnóstico para las nuevas variedades de arroz (Zhang et al., 2010), ya que la investigación en proteómica está dirigida a identificar nuevas proteínas en relación con su función y develar cómo se controla su expresión dentro de redes de regulación. Adicionalmente, muchos de los estudios proteómicos tienen como objetivo detectar cambios en las proteínas relacionadas con la influencia de factores ambientales (Hashiguchi et al., 2010; Komatsu et al., 1999; Rakwak y Komatsu, 2000).

Los análisis de proteómica han sido aplicados a varias plantas, entre los cuales, los estudios que involucran *Arabidopsis thaliana* (Luna-Valdez et al., 2014) y arroz son los

más prevalentes, debido a la accesibilidad de bases de datos de DNA y proteínas (Martins-de-Souza et al., 2014). Los estudios en arroz involucran diversos factores que se afectan en anteras de arroz (Imin et al., 2001), cambios bajo la influencia de *Magnaporthe grisea* (Konishi et al., 2001), cambios en condiciones como el estrés abiótico y biótico en diferentes células, tejidos, y estadios de desarrollo de la planta (Koller et al., 2002; Konishi et al., 2001); cambios en el proteoma de la hoja bandera del arroz durante el estrés por déficit hídrico (Salekdeh et al., 2002; Komatsu et al., 1999, 2004; Imin et al., 2001).

Proteómica en estrés abiótico: El análisis de respuestas a estrés en plantas (Xue, et al., 2014; Yamakawa et al., 2007; Yan et al., 2006; Qureshi et al., 2007) es una vía importante para encontrar los genes que confieren tolerancia a estrés y su uso en programas de mejoramiento. El análisis proteómico provee una visión amplia de las respuestas de plantas a estrés a nivel de proteínas. En años recientes este método ha incrementado su sensibilidad y poder de detección en la electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional (2-DE), detección y cuantificación de proteínas, huella peptídica y secuenciación parcial de proteínas por espectrometría de masa (MS/MS), bioinformática y métodos de aislamiento de genes. La electroforesis 2-DE produce información referente a cambios en concentración y movilidad electroforética, esto último reflejado en modificaciones postraduccionales, tales como fosforilación y ruptura por radicales libres (Ke et al., 2009).

Proteómica en estrés biótico: En respuesta a la infección producida por una gran variedad de patógenos, las plantas son inducidas para expresar un grupo de genes en niveles crecientes. Algunos de estos genes están asociados con respuesta de defensa en plantas, los cuales incluyen genes relacionados con patogénesis (PR) y genes antimicrobianos, los cuales han mostrado actividad biológica relacionada con resistencia a enfermedad (Scheideler et al., 2012). Las proteínas PR son conocidas como proteínas que pueden ser inducidas por patógenos y relacionadas con estrés abiótico (Kim et al., 2000, 2001, 2003, 2004; Lin et al., 2006).

Las plantas responden a varias condiciones ambientales tales como el ataque de patógenos o a condiciones inadecuadas de crecimiento, por medio de la modulación de los patrones de expresión génica (Agrios, 2005; Scheideler et al., 2002), de proteínas relacionadas con defensa (Bowles, 1990; Grover et al., 2003; Jwa et al., 2006; Akter et al.,

2015). La inducción de proteínas ha sido detectada en varias especies y se han clasificado en 17 familias con base en la similitud de la secuencia o propiedades enzimáticas (Van et al., 1999;). Los sistemas de defensa inducidos son generalmente activados por reconocimiento de elicitores, los cuales son moléculas secretadas por patógenos (Irfan et al., 2007; Hammond-Kosack y Jones, 2000).

Flor (1955) fue quien primero demostró esta relación con el concepto de gen por gen. De acuerdo a esta hipótesis, la planta hospedera contiene un gen R al cual corresponde un elicitador específico (ligando), codificado por un gen patógeno avr, donde la interacción produce una reacción incompatible o resistente al patógeno (Reymond, 2001; Ma y Berkowitz, 2012).

Se han utilizado técnicas de proteómica para analizar patrones de expresión de mezclas complejas y para explorar funciones génicas en diferentes tejidos o bajo condiciones de estrés, para lo cual se identifican los factores genéticos involucrados o asociados con mecanismos de defensa de plantas (Zivy et al., 2000; Bolton, 2009). Para obtener plantas resistentes a virus, se han desarrollado estrategias como producción de híbridos entre plantas con diferente resistencia y plantas transgénicas que pueden ser utilizadas hoy en día (Goldbach, R., et al., 2003; Kim et al., 2003; Sharma, R., et al., 2004; Wei, X., et al., 2009; Syller, J 2012).

2.4 Importancia agronómica de las variedades de estudio

La variedad Colombia I proviene de cruce ente la variedad japónica Takau Iku 18 y una variedad indica, sinedo progenitora en todos los cruces comerciales con resistencia a RHBV, y se ha utilizado como testigo resistente en evaluaciones del CIAT/FLAR hasta que apareció Fedearroz 2000. La variedad Colombia I tiene un alto potencial de rendimiento, alto macollamiento, excelente calidad molinera; se ha dejado de utilizar comercialmente debido a que tienen una alta susceptibilidad al daño por sogata y baja calidad al cocinar; las líneas resistentes y la variedad Colombia 1 dericadas de cureces con nuevos mateirales parentales fueron utilizadas extensivamente en recientes años como vías de resistencia a virus (Peter Jennings, 2010, datos no publicados)

La variedad Fedearroz 200, fue producida por Fedearroz en el año 2000, de ahí su nombre, se obtuvo a partir de un cruce entre dos variedades denominadas como 3084-F4-56-2-2/P y 3844-3-19-1-1B-X/CT8154-1-9-2; la variedad presenta resistencia a enfermedades y productividad mayor que algunas variedades que se encontraban posicionadas en el mercado como Fedearroz 50, rindiendo entre 9 y 10 toneladas/ha en promedio.

2.5 Mimos conformacionales

Con el fin de caracterizar algunas proteínas y su función se han realizado algunos estudios en mimos conformacionales que consisten en imitar regiones de las proteínas con estructura secundaria definida como alfa hélices, *loops*, vueltas beta (β turn) y hojas plegadas beta.

Síntesis de péptidos con estructura alfa hélice:

La síntesis de péptidos con restricción conformacional, es un método sintético que se utiliza para dar estructura a los péptidos y estabilizar péptidos en conformeros definidos, con el fin de explorar posibilidades de interacción entre la proteína o con otro tipo de moléculas y mejorar el uso que se les da. Los métodos actuales usados para dar cierta estructura a los péptidos incluyen la ciclización de los péptidos (Romanovskis, P. y Spatola, 1998). por reacciones de condensación amida (Alsina et al., 1994; Romanovslis 1998), por la formación de enlaces disulfuro (Alsina et al, 1994; Albericio et al., 1989; Calvo 1999) y el uso de sistemas anulares sustituidos para dar rigidez a estructuras en "turn" (Freidinger et al., 1980; Wilmot et al., 1988). Un método general para la estructuración química de péptidos puede surgir de la búsqueda de mimos covalentes de los puentes de hidrógeno. Se ha reportado que alrededor de un 60% de los aminoácidos en proteínas globulares forman puentes intramoleculares y, más aún, las estructuras secundarias de las proteínas se definen por un patrón de puentes de hidrógeno característico (Richardson, 1981; Wilmot y Thornton, 1988).

Inicialmente, Arrhenius y Satterthwait (Arrhenius y Satterthwait, 1989) desarrollaron una síntesis en fase líquida para reemplazar un puente de hidrógeno ($\text{NH} \rightarrow \text{O}=\text{C}(\text{R})\text{NH}$) de la cadena principal con un ligando de hidrazona ($\text{N}=\text{N}=\text{CH}-\text{CH}_2$). Sin embargo, la síntesis era dispendiosa, los rendimientos bajos y se presentaban problemas de solubilidad al trabajar

con péptidos totalmente protegidos. Estos problemas condujeron a buscar metodologías que permitieran introducir el enlace hidrazona en el péptido durante la síntesis en fase sólida, lo cual facilitaría la síntesis del péptido estructurado (Chiang et al., 1993; Chiang et al., 1994; Satterthwait et al., 1995; Cabezas, E y Satterthwait, 1999).

La inserción del enlace hidrazona en el péptido, durante la síntesis en fase sólida, requiere la preparación previa de los ligandos J (ácido 5,5-dimetoxipentanóico) y Fmoc-Z(Act) (ácido (1-metiletiliden-2-Fmoc) hidrazinoacético). Primero se introduce el ligando Z y por último el ligando J, siendo el paso más crítico la introducción del aminoácido en la amina secundaria de Z(Act). Para la síntesis en fase sólida de una "loop" o de una hélice se sigue una secuencia diferente en la síntesis. Para la construcción de una hélice, primero se sintetiza sobre la resina la secuencia con tendencia a hélice y luego se introduce un sitio de nucleación con la secuencia JLAZ. Para la síntesis de una "loop", primero se ancla en la resina el ligando Z, luego se introduce la secuencia con tendencia a "loop" y se termina con la introducción del ligando J. Para ciclar el péptido, ya se trate de una hélice o de una "loop", J es activado con ácido clorhídrico sobre el soporte sólido para dar un ión oxocarbonio, el cual conduce a una reacción rápida con Z para formar un enlace hidrazona (Cabezas, E & Satterthwait, 1999).

2.6 Interactómica

Para continuar con la caracterización y función de una proteína, en el análisis funcional de un organismo, un paso crítico es la comprensión de las interacciones entre las proteínas que codifica (Xenarios et al., 2002; von Mering et al., 2007). Por ello se han desarrollado un conjunto de métodos teóricos para abordar el problema de la predicción de interacciones entre proteínas a partir del análisis de sus secuencias, de la información de los genomas y de datos cristalográficos de complejos macromoleculares; así como de la conservación entre las secuencias, función y estructura e interacción de las proteínas con el fin de generar redes que pueden trasponerse entre diferentes organismos y que estén asociados con procesos biológicos de importancia en el experimento, utilizando la información recolectada de diversos organismos. Estos métodos han sido aplicados en muchos modelos de organismos tales como humanos, moscas de las frutas y arábidopsis (Yamada et al., 2012).

Las interacciones proteína – proteína están presentes en casi todos los procesos biológicos en los organismos vivos como la replicación del DNA y la transcripción, las reacciones metabólicas controladas por enzimas (Salanoubt et al., 2012), la transducción de señales, el transporte, degradación y regulación del ciclo celular (von Mering, 2007); por lo anterior, identificar las redes de interacción proteína-proteína puede ser de gran valor para entender los procesos biológicos. Algunos programas incluyen evidencias de co-expresión, co-localización, co-evolución, similitud de anotación, interacción de dominios e interacciones homólogas en otras especie, entre los cuales podemos mencionar los programas PRIN, STRING, REACTOME; estas interacciones creadas entre proteínas indican las relaciones que una proteína tiene en su entorno celular. En esta red las proteínas cercanas se encuentran entrelazadas en procesos fundamentales, mientras que aquellas que no presentan una interacción fuerte se observarán dispersas en el diagrama(von Mering, 2007, Yamada, 2012).

El interactoma de arroz se ha determinado basado en interacciones conservadas entre proteína-proteína de varias especies; se ha reportado que las interacciones involucran proteasas reguladoras, kinasas en el ciclo de vida celular, procesos de reparación de DNA y procesos de unión al RNA, las cuales están asociadas con procesos biológicos fundamentales (Ho et al, 2012; Zhu et al., 2011; Gu et al., 2011).

Teniendo en cuenta lo anterior, se plantearon los siguientes interrogantes: ¿Cuales grupos funciones de proteínas se presentan en respuesta a la infección del virus de la hoja blanca en las variedades Fedearroz 2000 y Colombia I? y ¿Es posible que con el uso de péptidos que imiten fragmentos estructurados de proteínas se puedan reconocer en extractos de plantas que han sido expuestas al virus?. Para responder estos interrogantes se usó la proteómica comparativa con el objetivo de identificar algunas de las proteínas que se encuentran en común entre las dos variedades de estudio, y los análisis de estructura tridimensional con el fin de obtener estructuras de las proteínas seleccionadas en el estudio, para analizar las estructuras secundarias dentro de las proteínas que tienen posibilidad de interactuar con otras proteínas para seleccionarlas como candidatos para aplicar nuevos métodos de síntesis de péptidos dendriméricos. Con los resultados obtenidos aquí, entontramos que las dos variedades generan proteínas categorizadas de acuerdo con su funció bioquímica en: metabolismo, fotosíntesis, defensa en plantas,

sistema antioxidante, etc, la selección de algunas de estas proteínas permitió generar péptidos dendriméricos utilizando un nuevo sitio de nucleación etc, etc.

3. Materiales y métodos

3.1 Material vegetal

Se evaluaron las variedades que se cultivan en Colombia, Fedearroz 2000 y Colombia I, las cuales han sido reportadas como variedades con diferente resistencia frente al virus RHBV, de acuerdo con investigaciones realizadas en el Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT (*Cruz et al.* Datos no publicados, 2009).

3.1.1 Ensayo de infectividad

El ensayo de infectividad de las plantas frente al virus RHBV se realizó en el CIAT, según la metodología descrita por Triana *et al* (2003); en donde se describe las condiciones bajo las cuales se deben establecer y mantener los insectos (*Tagosodes orizicolus*), tanto aquellos que están libres de virus como aquellos que son portadoras del virus. Los insectos en cualquiera de los dos casos se mantuvieron dentro de jaulas que contienen en su interior plantas de arroz para que el insecto se alimente de ellas (Triana et al., 2002).

Para realizar el ensayo se contó con insectos (*Tagosodes orizicolus*) denominados sogata (término utilizado para describir una plaga del arroz causada por el insecto), con capacidad de transmitir el virus y con sogatas que no portan el virus. En materas de 20 cm de diámetro y 15 cm de altura se sembraron semillas de cada una de las variedades seleccionadas (40 semillas de cada variedad por matera), se dejaron en invernadero en condiciones controladas de temperatura promedio de 25°C, humedad relativa del 77% y fotoperíodo 12/12h, se fertilizaron de acuerdo al protocolo seguido por el CIAT, durante 16 días, para posteriormente realizar el ensayo de infectividad. Se aisló cada una de las materas utilizando un cilindro de polipropileno cerrado en la parte superior con una malla de diámetro de ojo de 0.1 mm, luego se separaron cada una de las variedades sembradas por tratamiento, de la siguiente manera:

16 Aproximación proteómica de la respuesta a la infección por el virus de la hoja blanca en dos variedades de *Oryza sativa* L.

Control: plantas no infectadas, no expuestas al insecto y por lo tanto tampoco al virus.

Insecto: plantas sometidas al insecto, pero el insecto no porta el virus.

Virus: plantas expuestas al insecto que porta el virus.

Se realizaron 3 réplicas por cada uno de los tratamientos en cada una de las variedades. Para los tratamientos insecto y virus se colocaron ninfas de segundo instar, 4 ninfas de sogata (*Tagosodes orizicolus*) por planta (para un total de 160 sogatas por materia o réplica). Dadas las condiciones de mantenimiento de los insectos, se asegura que existan colonias no portadoras del virus y colonias portadoras del virus con el fin de realizar los tratamientos insecto y virus. En las colonias portadoras del virus los insectos deben tener un alto grado de virulencia con el fin de asegurar la respuesta de las plantas frente al virus. Las ninfas se dejaron alimentando sobre el respectivo material durante 3 días, al final de los cuales se aplicó agua a todas las plantas para eliminar los insectos adultos y evitar la eclosión de las posturas.

A los 30 días de retirados los insectos con agua se determinó el porcentaje de infectividad de cada una de las variedades (Triana et al, 2003); este se calculó a partir de la observación de las plantas que presentan síntomas en las hojas como bandas cloróticas paralelas a la nervación observadas en la Figura 3-1.

Figura 3-1: Síntomas de Virus de la Hoja Blanca, observados en plantas de arroz, se observan hojas cloróticas con marchitamiento en plantas de arroz sometidas a infección por virus RHBV.



La relación para la determinación del porcentaje de infectividad se realizó de la siguiente manera: la cantidad de plantas que a la observación presentaban síntomas de la

enfermedad como bandas cloróticas paralelas a la nervación, se dividió entre la cantidad de plantas sembradas y se multiplicó por cien.

3.1.2 Ensayo confirmatorio de la presencia del virus

Antes de ser colectadas las muestras para otros análisis, se realizó la prueba de ELISA de extractos de hojas de arroz, expuestas y no expuestas al virus, de las dos variedades, obtenidos por maceración de hojas con solución buffer fosfato, pH 7.4 y de acuerdo al protocolo estandarizado en el CIAT (Zeigler y Morales, 1990).

Se realizaron cortes de aproximadamente 3 cm de longitud de hojas frescas de plantas que presentaban síntomas de RHBV (clorosis, marchitamiento) y de aquellas que no los presentaban, de cada uno de los tratamientos y variedades. Se colocó el material vegetal de cada uno de los tratamientos y variedades dentro de soportes plásticos y se maceraron con buffer PBS 0,1 M (formado por fosfato de sodio 0.1 M y cloruro de sodio 0.15 M), pH 7.4 /Tween 20 0,05% hasta que el tejido quedó decolorado. El extracto obtenido por maceración, se filtró y se llevó a volumen final de 5 mL con el buffer PBS 0.1 M, pH 7.4. Se tomó el extracto final para realizar el ensayo ELISA (Zeigler y Morales, 1990).

Para el ensayo ELISA Sandwich se tomó una placa para ELISA y se cubrió con anti-conejo específico para RHBV diluido 1/4000 en buffer carbonato de sodio 0.05M pH 9.6, se dejó en incubación por 5 horas a 37 °C, se lavó tres veces durante 3 minutos con buffer PBS 0.1M pH 7.4/ Tween 20 0.05%. Una vez realizados los lavados, se colocaron 200 uL, por cada pozo, del extracto obtenido a partir del tejido macerado y se incubó toda la noche a 4° C, luego se eliminó el extracto y se lavó nuevamente con el buffer PBS 0.1 M /Tween 20, 0.05%, tres veces durante 3 minutos. Se adicionaron 50 uL de gamma globulina específica para RHBV, concentración 1:200, marcada con fosfatasa alcalina, y se dejó en incubación por 5 horas a 37°C, luego se eliminó, posteriormente se realizaron 3 lavados con buffer PBS 0.1M y se adicionó p-nitrofenil fosfato disódico 1 mg/mL, se incubó 15 minutos en cuarto oscuro y se leyó la absorbancia a 405 nm en un lector ELISA Dynex MRX.

3.1.3 Colecta del material vegetal

Luego de observada sintomatología de la enfermedad, determinado el porcentaje de infectividad, y realizado el ensayo ELISA para la corroboración de infección en cada uno de los tratamientos, se tomaron todas las hojas totalmente expandidas, de cada uno de los tratamientos y variedades. Las muestras se sumergieron en nitrógeno líquido, se liofilizaron y se almacenaron a -80°C. Las muestras colectadas se etiquetaron (fecha, tratamiento y variedad) para ensayos posteriores de determinación de contenido de proteínas, análisis proteómico y ensayos inmunoenzimáticos.

3.2 Extracción y cuantificación de proteínas y SDS-PAGE

3.2.1 Extracción de proteínas

Luego de la liofilización de las muestras vegetales y con el fin de determinar el mejor método de extracción de proteínas para la realización de electroforesis, se ensayaron varios protocolos (Sheroan et al., 2009; Cilia et al., 2009; Wei et al., 2009, Lin et al., 2008) sin buenos resultados en algunos de ellos (Datos no mostrados); es decir, el rendimiento de extracción y la calidad de los corridos electroforéticos fue muy baja. Por tal razón, se evaluaron otros protocolos tales como el método del fenol y el de TCA/acetona, se realizó extracción y se verificó rendimiento y calidad. Los ensayos se realizaron por triplicado.

- *Extracción de proteínas por el método del fenol*

Con base en lo descrito por el grupo de Jorrín (2012), se tomaron 0,2 gramos de muestras de hojas liofilizadas y se maceraron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, se adicionó solución de ácido tricloroacético (TCA) 10% en acetona pura fría y se agitó en vortex, posteriormente se centrifugó a 12000 revoluciones por minuto (rpm), 4°C, durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante; al precipitado se le adicionó 2 mL de acetato de amonio 0,1M en metanol 80%, se agitó en vortex y se volvió a centrifugar a 12000 rpm, 4°C, 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y al precipitado se le adicionó acetona 80%, se agitó en vortex y se volvió a centrifugar a 12000 rpm, 4°C, 10 minutos, se eliminó el sobrenadante, se dejó secar el precipitado

durante toda la noche, se añadió 600 uL de solución buffer SDS 2%-Fenol (1:1) en el cual se disuelven las proteínas del precipitado, se incubó sobre cama de hielo, durante 10 minutos se agitó en vortex y se volvió a centrifugar a 12000 rpm, 4°C, 10 minutos, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se le añadió buffer de precipitado SDS 2%-fenol (1:1), se dejó precipitar durante toda la noche, se centrifugó a 12000 rpm, 4°C, 10 minutos y se eliminó el sobrenadante, el precipitado se lavó con metanol 100%, se agitó en vortex y nuevamente se centrifugó a 12000 rpm, 4°C, 10 minutos, se descartó el sobrenadante y al precipitado se le adicionó acetona 80%, se centrifugó a 12000 rpm, 4°C, 10 minutos y se eliminó el sobrenadante, el precipitado se dejó secar toda la noche. El precipitado se solubilizó con solución de solubilización úrea 9M, CHAPS 4%, Triton X100 0,5%, DTT 100 mM (Jorrín *et al.*, 2007), y se dejó en agitación durante 2 horas en cuarto frío. Se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando para ello el kit de Sigma y albúmina sérica bovina (BSA) 1,5 ug/uL como patrón.

- *Extracción de proteínas por el método TCA/acetona*

Se tomaron 0,2 gramos de muestras de hojas liofilizadas y se maceraron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Este polvo fue suspendido en solución de TCA 10% en acetona con 0,07% de DTT y se dejó en incubación a -20°C durante toda la noche (Damerval *et al.*, 1986). Posteriormente, se centrifugó durante 10 minutos a 13200 rpm y 4°C, se descartó el sobrenadante y al precipitado se le realizaron lavados con acetona fría 100% para eliminar los pigmentos, este proceso se realizó hasta decoloración completa del tejido. El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente durante toda la noche para evaporar completamente la acetona. Una vez seco el precipitado se adicionó 500 µL de solución de solubilidad el cual contiene úrea 9M, CHAPS 4%, Triton X100 0,5%, DTT 100 mM (Jorrín *et al.*, 2007), y se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando para ello el kit de Sigma y albúmina sérica bovina (BSA) 1,5 ug/uL como patrón.

3.2.2 Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas, se utilizó el método de Bradford (1976), utilizando el Kit BioRad protein assay (BioRad, hercules, USA). En una caja de 96 pozos se agregó en cada pozo 25 μ L del extracto proteico obtenido por maceración del tejido liofilizado y tratado con buffer fosfato de sodio, posteriormente se adicionaron 200 μ L del reactivo de Bradford (Kit BioRad protein assay) y se realizó lectura de absorbancia a 595 nm; con cuyo resultado se interpoló en la curva de calibración realizada previamente, utilizando como concentración de albumina sérica bovina (BSA): 1,48 mg/mL, 0,74 mg/mL, 0,36 mg/mL, 0,18 mg/mL, 0,09 mg/mL, 0,045 mg/mL. La curva se realizó por triplicado.

3.3 Análisis proteómico

3.3.1 Electroforesis SDS-PAGE

Con el fin de comparar los dos métodos de extracción de proteínas utilizados, cuantificar y determinar el número de bandas presentes en cada una de las muestras extraídas se realizó electroforesis unidimensional SDS-PAGE (Laemmli 1970).

Se sembraron cantidades iguales de proteína (60 μ g) en cada carril del sistema electroforético, para ser separadas en gel de poliacrilamida (gel concentrador 5% y gel de separación 12%) de 18.5 cm x 20 cm de tamaño y 1 mm de espesor (Bio Rad, PROTEAN II xi cell), utilizando buffer de corrida formado por Tris/glicina/SDS (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%, pH 8.3). El sistema electroforético se colocó a 120 V durante 25 horas, las proteínas separadas fueron visualizadas con azul de coomassie coloidal CBB G-250, 0,05% (Bio-Rad). Para determinar el peso aproximado de las proteínas separadas se utilizó un marcador de peso de rango amplio (Miosina 200,00 kDa, β -galactosidasa 116,25 kDa, fosforilasa b 97,40 kDa, albúmina bovina 66,20 kDa, Ovalbúmina 45,00 kDa, anhidrasa carbónica 31,00 kDa, inhibidor de tripsina 21,50 kDa, Lisozima 14,40 kDa, Aprotinina 6,50 kDa, Bio – Rad), y se determinó el peso molecular aparente de cada una de las bandas observadas en cada uno de los extractos proteicos de las muestras obtenidas de los tratamientos. El SDS-PAGE se utilizó con el fin de separar proteínas por tamaño, su uso resulta en métodos más económicos y en este caso se utilizó como método inicial para

visualizar los cambios que ocurren en los diferentes tratamientos, con el fin de comparar posteriormente los resultados obtenidos en 2- DE; a su vez para determinar la calidad de cada una de las extracciones realizadas, y tomar decisiones frente a los posibles problemas que se pudiesen observar como degradaciones, resolución de bandas y calidad de la muestra. Las bandas que se observaron diferencialmente se cortaron manualmente y se analizaron por espectrometría de masas, en un espectrómetro MALDI-TOF/TOF (Bruker, CA, USA) del centro SCAI de la Universidad de Córdoba – España, con el fin de identificarlas y relacionarlas de acuerdo a los respectivos tratamientos.

3.3.2 Electroforesis bidimensional (2 - DE)

Una vez seleccionado el mejor método de extracción y que se han logrado las condiciones óptimas para obtención de los perfiles electroforéticos de cada una de las variedades y sus respectivos tratamientos, se realizó electroforesis bidimensional.

Se utilizaron tiras de pH de rango entre 3 – 10 y geles de poliacrilamida 12% de 7 cm de longitud, con el fin de identificar en qué rango de pH se encuentra el mayor número de manchas, su resolución y así utilizar una tira de pH de rango específico para poder resolver las proteínas que se encuentran en la muestra; las condiciones de la electroforesis fueron 40 µg de proteína, 120 V y 90 minutos (Shaier-Hammami et al, 2009; 2012; Jorrín et al., 2009).

Una vez finalizada la electroforesis bidimensional en el rango amplio (pH 3-10), se realizó otro ensayo de electroforesis bidimensional en un rango específico utilizando tiras IPG 5-8. Se calculó el volumen de muestra que contuviera 400 µg de proteína de cada uno de los extractos obtenidos, y a éste volumen de proteína se le adicionó solución de rehidratación (azul de bromofenol, anfolitos 2%, DTT 100 mM, CHAPS 4%, tiourea 2M y úrea 7M), de forma que el volumen final fuera 400 µL, éste volumen se colocó en tiras de IPG (17 cm, gradiente lineal 5 – 8; Bio-Rad) las cuales fueron colocadas en un sistema Bio-Rad protean IEF cell; dejando en rehidratación activa, 50 V/h, durante 15 horas. Una vez transcurrido este tiempo, las tiras se colocaron en un programa para isoelectroenfoco a 20°C, utilizando un voltaje creciente (250 – 10000 V), hasta alcanzar 50000 V/h. Terminado el isoelectroenfoco, las tiras se colocaron en buffer de equilibrio I (Tris-HCl 50

mM, pH 8,8; úrea 7 M; glicerol 20% v/v; SDS 2% w/v; DTT 65 mM) por 15 min, y posteriormente colocadas en buffer de equilibrio II (úrea 6 M, glicerol 30% p/v, SDS 2% p/v, tris-HCl 0,05 M pH 8,6 y iodoacetamida 135 mM) por 15 min. La segunda dimensión SDS-PAGE fue realizada en geles de poliacrilamida 12% de 18.5 cm x 20 cm de tamaño y 1,5 mm de espesor, utilizando el sistema Protean Dodeca Cell de Bio – Rad, se corrieron a 80 V hasta que el colorante alcanzó una distancia de 17 cm aproximadamente (Jorrín et al., 2009). Para este ensayo se realizaron 3 replicas biológicas con sus correspondientes réplicas técnicas para cada tratamiento.

3.3.3 Tinción de geles y análisis

Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie coloidal CBB G-250, 0,05% (Bio Rad) por 20 h. Las imágenes fueron tomadas utilizando un densitómetro GS-800 calibrado (Bio Rad, Hercules, USA) y analizadas con el software PDQuest 7,1 (Bio Rad, Hercules, USA). El análisis de los geles implicó el tratamiento de las imágenes utilizando las herramientas del software que permiten cortar todos los geles del mismo tamaño y en el mismo rango de pixel, basándose en un punto que se encuentre en todos los geles como punto de referencia, con el fin de que el programa logre hacer el análisis correspondiente. Se utilizó el filtro gaussiano para minimizar el ruido de fondo y se normalizaron todas las imágenes con el fin de generar un gel maestro que contiene todas las manchas que se encuentran dentro de cada muestra; se adicionó manualmente las manchas que no se lograron detectar de forma automática para comparar los geles y realizar el emparejamiento.

Posteriormente, se realizó el análisis por densitometría con lo cual se obtuvieron medidas de intensidad de cada una de las manchas, para realizar análisis cuantitativo de diferencias en intensidad de las manchas, cualitativas de presencia/ausencia de la mancha, y una prueba t-student para comparar la acumulación diferencial de manchas entre los diferentes geles con un nivel de significancia del 95%.

Se utilizó un criterio de limpieza de 10 veces para presencia/ausencia para el método de detección de manchas de proteínas, fijación de un punto identificado en cada uno de los geles y filtro para las imágenes, igualmente se realizó emparejamiento de las manchas y

la normalización del tamaño y la intensidad de las manchas para minimizar los efectos de los factores experimentales. La normalización fue realizada utilizando el método de regresión local del software PDQuest en el cual el factor de normalización fue calculado a partir de una curva en el scatter plot que minimiza la distancia de todos los puntos en el mapa. La lista de todos los valores de las manchas obtenidas se encuentra en el material complementario en la tabla A1, que se encuentra en el CD anexo a este documento. Se realizó una verificación visual de cada una de las manchas para incrementar el proceso de emparejamiento (Jorrín et al., 2009).

El punto isoeléctrico (pI) experimental fue determinado utilizando una escala lineal de 5-8 sobre la longitud total de la tira IPG. Los valores de peso molecular Mr fueron calculados por comparación de movilidad con los marcadores de proteína estándar de rango amplio descritos anteriormente, corridos en un carril separado del gel.

3.3.4 Análisis estadístico

Se realizó para poder seleccionar las manchas de proteínas a identificar y determinar por su presencia/ausencia entre las dos variedades y en cada una de ellas además, para conocer cuáles proteínas se detectan en cada uno de los tratamientos y observar las diferencias entre las dos variedades, Fedearroz 2000 y Colombia I. El experimento se realizó mediante un diseño de bloques completos aleatorios con tres réplicas biológicas, cada réplica de 40 plantas, para un total de 120 plantas por tratamiento, dos variedades y tres tratamientos. Se tomaron las hojas de cada una de las réplicas biológicas para realizar el análisis proteómico.

Para el experimento de análisis proteómico se utilizaron de cada réplica biológica 3 réplicas técnicas para obtener 9 geles bidimensionales por variedad y por cada uno de estos tratamientos, tres réplicas técnicas, posteriormente se realizó el análisis estadístico con base en lo descrito por Valledor y Jorrin (2011) y se seleccionaron las manchas diferenciales.

El análisis estadístico fue realizado con el software SPSS v17.0 y Excel. Las variaciones diferenciales en las abundancias de las manchas entre cada uno de los tratamientos fueron

24 Aproximación proteómica de la respuesta a la infección por el virus de la hoja blanca en dos variedades de *Oryza sativa* L.

probadas con el test ANOVA ($\alpha=0,05$) para cada uno de los tratamientos; las manchas inconsistentes, aquellos que sólo se presentaban una sola vez en cualquier tratamiento no se tomaron en cuenta para las comparaciones y fueron removidos de la base de datos. Los promedios de las manchas significativos fueron comparados con el test de Tukey. Cuando la presencia o ausencia de manchas se identificaba con un tratamiento, estas manchas no fueron sometidos a tratamiento estadístico y su presencia/ausencia fue considerada significativa ($P<0.05$). (Valero et al., 2012)

En total 375 manchas fueron obtenidos por emparejamiento del experimento realizado en el invernadero, estos emparejamientos se realizaron de forma manual. En el programa PDQUEST v. 8.0.1 se usó una normalización de las imágenes de los geles, los valores erróneos provenientes de las manchas con intensidades muy bajas no se detectaron o no se encontraron en los geles 2-DE. En los casos donde no se obtuvieron datos el valor asignado fue de cero. En los casos donde se encontraron 2 datos se tomó el valor promedio de los datos obtenidos para colocarlo en la última casilla.

Se realizó un análisis ANOVA de dos vías, utilizando el programa Minitab v.17, en cada mancha separadamente para extraer aquellas que diferían entre los grupos basado en el siguiente modelo general de efectos lineales

$$\gamma_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde $i = 1,2$; $j = 1,2,3$; y $k = 1,2,3,4$; “ α ” es el tiempo del efecto promedio de los tratamientos, “ β ” es el efecto del tratamiento promedio en el tiempo, “ γ ” es el efecto de la interacción y “ ε ” es la variación dentro de cada grupo de réplicas, $\varepsilon_{ijk} \sim N(0, \sigma_{ij})$. La variable de respuesta “ γ ” es el valor del mancha específico.

De otra parte se realizó el análisis de cluster o agrupamientos en donde todas las variables que se encontraron en el estudio se agrparon de acuerdo a su similitud, indcando que grupo o grupos eran más parecidos y cuales no y un análisis PCA que es una técnica de análisis multivariado estaístico que tiene en cuenta un grupo de variables con el fin de

enfocarse en una variable en el tiempo, se utilizó para encontrar alguna estructura en los dtos seleccionados después de realizar los análisis ANOVA. Una matriz de covarianza donde cada grupo de manchas era una variable y cada gle una observación se utilizó para obtener los componentes principales, para mejorar el PCA se emovieron varios spot de la base de datos.

3.3.5 Identificación de proteínas

- Digestión de proteínas: Las bandas de la electroforesis unidimensional fueron cortadas manualmente, y las manchas de la electroforesis bidimensional fueron cortados automáticamente mediante un sistema *Exquest spot cutter*. Posteriormente, las bandas y las manchas se transfirieron a una caja de 96 pozos donde se lavaron con agua destilada deionizada 1 vez. Luego fueron desteñidos realizando dos lavados con solución de bicarbonato de amonio 200 mM/ acetonitrilo 40% (v/v) por 30 min a 37°C, luego se realizaron tres ciclos consecutivos de deshidratación/rehidratación durante 10 minutos en cada ciclo, con acetonitrilo puro y bicarbonato de amonio 25 mM/ acetonitrilo al 40%, finalmente se secaron a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, se utilizó el protocolo de Schevchenko y colaboradores (Schevchenko et al., 1996), las bandas cortadas fueron rehidratadas en solución de bicarbonato de amonio 25 mM que contenía 12,5 µg/µL de tripsina porcina (grado secuenciación, Promega) utilizando una estación de digestión (Genomics solution) e incubadas a 37°C durante toda la noche.

Los péptidos fueron extraídos utilizando 10 µL de ácido trifluoroacético 1% con agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego purificados con una columna ZipTip 175 µ C18 (Millipore Bedford, MA, USA) de acuerdo a las indicaciones del fabricante, con el fin de eliminar las sales y otros contaminantes presentes, usando como eluyente ácido fórmico al 5 %, antes de su análisis por MALDI-TOF/TOF. Para este análisis se utilizó como matriz ácido α -ciano hidroxicinámico en concentración de 5 µg/µl en acetonitrilo 70% y TFA 0,1%.

Las muestras fueron analizadas en un 4700 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF Mass Spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), en el rango 800-4000

m/z, con un voltaje de aceleración de 20 kV, en modo reflectrón y con un retraso de extracción establecido en 120 ns. El espectrómetro fue calibrado usando los picos de autólisis de la tripsina $m/z = 842.51$ and $m/z = 2211.10$ como estándar interno. Los iones más abundantes fueron luego analizados por MS/MS (Sghaier-Hammami et al., 2009; Sghaier-Hammami et al., 2012).

El análisis proteómico por espectrometría de masas MALDI-TOF, fue llevado a cabo en el UCO-SCAI proteomic facility, miembro de la Carlos III Networked proteomics platform ProteoRed ISCIII, Universidad de Córdoba, Córdoba - España. El análisis se realizó con base en lo descrito por Schevchenko 1996; Sghaier-Hammami et al. 2009; y Sghaier-Hammami et al. 2012.

- Identificación de proteínas por espectrometría MS/MS: Los péptidos obtenidos de la digestión de cada una de las manchas fueron analizadas haciendo una búsqueda (MS y MS/MS), utilizando el software GPS Explorer TM v. 3.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y la base de datos NCBI nr, combinando la huella peptídica (MS) de la digestión con las fragmentaciones resultantes (MS-MS) de los péptidos (hasta 12) de cada mancha según la calidad del espectro MS, usando MASCOT v 1.9 (Matrix Science Ltd., London; <http://www.matrixscience.com>) como motor de búsqueda. Se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: restricciones al motor de búsqueda Viridiplantae, una ruptura por pérdida, tolerancia de 10 ppm en masa para el espectro MS y 0.5 Da para los datos MS/MS, carbamidometilación de cisteína como modificación fija y oxidación de metionina como modificación variable. La confiabilidad en la masa del péptido emparejado por huella peptídica ($p < 0,05$) se basó en el algoritmo de MOWSE y confirmado por solapamiento de los péptidos emparejados con los picos más elevados del espectro de masas.

De acuerdo con la base de datos seleccionada, Viridiplantae (<ftp://ncbi.nih.gov/blast/db/FASTA>), se analizó si las proteínas seleccionadas de arroz estaban clasificadas como no nombradas, desconocidas o hipotéticas.

El programa generó una lista de 10 posibles proteínas organizadas de forma descendente de acuerdo con los puntajes más altos de la huella peptídica y entre las cuales es más probable que se encuentre la proteína analizada. De la lista se seleccionó la proteína más probable teniendo en cuenta los valores mayores al 95% y la cercanía entre los pesos moleculares y los puntos isoelectricos experimentales y los de las proteínas que se obtienen de la lista.

En algunos casos se generaron listas de proteínas a las que no se ha comprobado su existencia, es decir son proteínas hipotéticas, pero que se encuentran en la base de datos de arroz con código de identificación y para las cuales es posible obtener información acerca de su probable función. También se hizo un análisis en Blast, en el cual se hizo un alineamiento de secuencias y se compararon las secuencias de los péptidos identificados con aquellas que se reportan en la base de datos del NCBI.

3.4 Selección de proteínas y análisis estructural

Una vez analizado el conjunto de proteínas identificadas en las dos variedades en cada una de las réplicas de cada tratamiento realizado, se sintetizó este gran conjunto de datos en un diagrama de venn para observar en cada variedad las proteínas comunes o no comunes en las regiones de contacto para grupo: control, insecto y virus. De estas proteínas se tomaron en cuenta algunas que permitieron identificar o caracterizar los diferentes grupos.

Mediante el uso del software de predicción de estructura I-TASSER V 4.1 se predijo la estructura secundaria y terciaria de las proteínas seleccionadas utilizando los algoritmos del paquete informático con el fin de establecer fragmentos para el diseño de péptidos de múltiple antígeno (MAP), por la estrategia Double Dimer Construct DDC (Calvo et al., 1998), y así obtener macromoléculas con múltiples copias de antígeno con y sin restricción conformacional (patente en curso).

3.4.1 Interactómica de proteínas

Las redes de proteínas se han generado utilizando los programas de interactómica como STRING (von Mering et al., 2007), PANTHER, DAVID y REACTOME, para nuestro estudio utilizamos el primero y el último, STRING y REACTOME. Los parámetros para la generación de la red fueron métodos de predicción activa (vecindad, fusión de genes, co-ocurrencia, co-expresión, ensayo de minimización, experimentos y bases de datos, puntaje de confianza, redes de profundidad, factor de escala de borde). Esta configuración implica la obtención de una red de interacciones con un alto nivel de confiabilidad. El análisis funcional de las predicciones se realizó mediante la búsqueda de anotaciones en las bases de datos Uniprot (www.uniprot.org). La metodología implica el uso de redes computacionales en red en donde se ingresa la proteína que se obtuvo en el análisis proteómico y se generan las interacciones in silico de esta proteína dentro de una célula utilizando el análisis de diferentes genomas que se han estudiado ampliamente.

El análisis de redes de interacción entre proteínas es una de las principales aproximaciones en la caracterización funcional de las proteínas, ya que permite asignar funciones a proteínas aún no descritas o nuevas funciones a proteínas conocidas. El sistema de análisis STRING 8.0 (Jensen et al., 2009) fue utilizado para construir una red de interacciones a partir de proteínas identificadas mediante proteómica de hojas de arroz infectadas y no infectadas con el virus de la hoja blanca.

3.4.2 Predicción de estructura tridimensional

El servidor de I-TASSER es una herramienta en línea para la predicción de la estructura 3D de alta calidad y función de las proteínas a partir de su secuencia de aminoácidos. En una primera etapa, I-TASSER trata de hallar plantillas de proteínas con plegamientos o estructuras supersecundarias similares, a partir de la biblioteca de la base de datos de proteínas PDB (por sus siglas en inglés). En una segunda etapa los fragmentos excluidos de las plantillas se vuelven a introducir en los modelos y se identifican los estados de baja energía. En la tercera etapa se elimina la incompatibilidad estérica y se afina la topología global del grupo y se seleccionan las estructuras de energías más bajas.

Para predecir la función biológica de la proteína, el servidor I-TASSER busca hacer coincidir los modelos 3D predichos con proteínas en 3 bibliotecas independientes: número de clasificación de proteínas EC (por sus siglas en inglés), el vocabulario de ontología de genes GO, y los sitios de unión al ligando. Los resultados de la función de predicción a partir de un grupo de plantillas coincidentes y la similaridad entre el modelo y las plantillas fueron evaluadas por TM-score, en donde un valor alto indica una estructura con mayor margen de confianza en la predicción

3.4.3 Mimos conformacionales

- Selección de secuencias: Una vez determinada la estructura tridimensional, se analizaron las sub-estructuras expuestas de la misma, con el fin de llevar a cabo una selección preliminar de algunos fragmentos expuestos. A continuación, para los fragmentos con tendencia helical, se analizó la anfipaticidad y la distribución de los residuos de aminoácidos en la hélice. Con base en estos resultados, se llevó a cabo la selección final de las secuencias para el diseño y síntesis química de los mimos conformacionales de fragmentos de las proteínas seleccionadas en el presente estudio. Para los fragmentos en conformación a “loop”, solo se tuvo en cuenta su anfipaticidad y su relativa exposición (Calvo et al., 2008).
- Diseño y síntesis de los péptidos: Una vez conocida la secuencia y la estructura de las proteínas seleccionadas se realizó un análisis en donde se determinaron los elementos estructurales como alfa hélices y las *loops*. Según el modelo de Satterthwait, para la construcción de una hélice, primero se sintetiza sobre la resina la secuencia con tendencia a hélice y luego se introduce un sitio de nucleación con la secuencia JLAZ; para la síntesis de una “loop”, primero se ancla en la resina el ligando Z, luego se introduce la secuencia con tendencia a “loop” y se termina con la introducción del ligando J. Para ciclar el péptido, ya se trate de una hélice o de una “loop”, J es activado con ácido clorhídrico sobre el soporte sólido para dar un ion oxocarbonio, el cual conduce a una reacción rápida con Z para formar un enlace hidrazona (Calvo & Satterthwait, 2005).

En este trabajo se implementó un modelo alternativo, en el cual se usaron ligandos que también denominamos J y Z con diferentes características químicas y variación en la

secuencia del sitio de nucleación. Para la construcción de una hélice, primero se sintetiza sobre la resina la secuencia con tendencia a hélice y luego se introduce un sitio de nucleación con la secuencia JAZ; para la síntesis de una "loop", primero se ancla en la resina el ligando Z, luego se introduce la secuencia con tendencia a "loop" y se termina con la introducción del ligando J (Patente en proceso).

Los péptidos se sintetizaron siguiendo el método de síntesis múltiple en bolsitas. Para la síntesis de péptidos en fase sólida se utilizaron los siguientes aminoácidos, protegidos en el α -amino por el grupo Fmoc (fluorenilmetoxicarbonilo): Fmoc-Ala, Fmoc-Asn, Fmoc-Asp(OtBu), Fmoc-Cys(Trt), Fmoc-Glu, Fmoc-Gly, Fmoc-Ile, Fmoc-Leu, Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Phe, Fmoc-Pro, Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Thr(tBu), Fmoc-Val, Fmoc-Tyr(tBu). Se usaron los solventes diclorometano (DCM), dimetilformamida (DMF), N-metil pirrolidona (NMP), acetato de etilo, acetonitrilo, éter etílico y el ácido trifluoroacético (TFA)(Merck).

Los péptidos se prepararon por síntesis en fase sólida usando 100 mg de una resina "Rink amida MBHA" con una sustitución de 0,12 meq/g de resina, para un total de 0,012 meq reactivos; la resina tiene un grupo amino activo, el cual viene protegido con Fmoc. Las reacciones se llevaron a cabo introduciendo las bolsas en frascos nalgene y la eliminación de los solventes y soluciones se llevó a cabo por filtración simple; inicialmente, la resina se solvató dejándole sumergida en DMF por 25 minutos, luego de lo cual se eliminó el exceso de solvente. El ciclo de acople de cada aminoácido incluyó los siguientes pasos: Se dejó en reacción con 2 mL de piperidina al 20% en DMF una vez por 5 minutos, y luego por 10 minutos; posteriormente, se lavó 7 veces con 2 mL de DMF por 1 minuto; la reacción de acople aminoácido/ oxima / (1-[bis(dimetilamino)metilen] - 1H-1,2,3-triazol [4,5-B] piridinio-3-oxo-hexafluorofosfato) / Disopropiletilamina(a.a./oxima/HATU/DIEA) en proporción 1:1:1:2 miliequivalentes, 5 veces la cantidad de equivalentes con respecto a la sustitución de la resina, disueltos en NMP. Se dejó en reacción por 45 minutos, una vez; posteriormente se lavó 2 veces con 2 mL de DMF por 1 minuto una vez. La síntesis se monitoreó con solución de azul de metileno en DMF con el fin de verificar la reacción de acople; posteriormente se realizaron dos lavados con 2 mL de DMF, 1 minuto cada uno y se repitió el ciclo.

Después de introducir cada aminoácido, el grupo protector del alfa amino se retiró con piperidina al 20% en DMF, y a continuación se introdujo el siguiente aminoácido (Tam 1991; Calvo 1999). Una vez introducida toda la secuencia y acabada la síntesis, se llevó a cabo la desprotección del último aminoácido acoplado, se lavó el complejo péptido-resina con DCM y con éter, se dejó secar y quedó listo para el siguiente paso, la liberación del péptido a partir del complejo péptido-resina.

- Escisión del enlace péptido resina: Una vez sintetizados los péptidos, fue necesario retirarlos de la resina sobre la cual se sintetizaron y así utilizarlos en los demás ensayos. De esta forma el complejo péptido-resina se colocó en jeringas y se procedió a la desprotección de las cadenas laterales y a la liberación del péptido de la resina; con este fin se dejó en reacción el complejo péptido-resina con 2 mL de una disolución que contiene TFA/etanoditiol/agua/triisopropilsilano 94:2,5:2,5:1, durante 1 hora. El péptido se precipitó de la solución ácida por saturación de la solución por medio de la adición de éter etílico frío. El péptido crudo obtenido se caracterizó por RP-HPLC y por espectrometría de masas MALDI-TOF (Richardson 1989; Tam et al., 1991; Calvo 2003).
- Caracterización de los péptidos: Los productos crudos obtenidos se caracterizaron por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa, RP-HPLC a escala analítica, y por espectrometría de masas, para determinar si el producto obtenido de la síntesis es de un porcentaje aceptable de pureza y si contiene la especie peptídica que se desea obtener.
RP-HPLC: se utilizó una columna cosmosil C18 analítica de 4.6x150 mm de largo, con un gradiente de 0-70% del solvente B durante 45 minutos (el solvente A es 0.1% TFA en agua y el solvente B es 0.1% TFA en acetonitrilo), a una longitud de onda de 215 nm. El péptido se preparó en agua a una concentración de 1.0 mg/ml, se inyectaron 100 µl de solución del péptido y se corrió el programa con el gradiente descrito (Barrera et al., 2009)
- Espectrometría de masas: Este ensayo se realizó con el fin de determinar la masa experimental del producto obtenido y su similitud con la masa determinada en forma teórica utilizando programas de computación de libre adquisición. Los espectros de masas se tomaron en el modo reflector en un espectrómetro de masas Shimadzu.

32 Aproximación proteómica de la respuesta a la infección por el virus de la hoja blanca en dos variedades de *Oryza sativa* L.

- Validación por ELISA de los péptidos sintetizados. Los respectivos péptidos se inocularon en ratones BalbC. Se llevaron a cabo 5 inmunizaciones de 90 µg por dosis. Al final del ensayo se llevaron a cabo las correspondientes sangrías y los sueros se confrontaron contra sus respectivos péptidos para observar si podían reconocer el antígeno inoculado.

4. Resultados y discusión

4.1 Material vegetal

La selección de las variedades se realizó teniendo en cuenta las indicaciones de expertos del CIAT (FLAR, Cruz, M. Datos no mostrados, 2009) y ensayos anteriores que mostraron que las variedades Colombia I y Fedearroz 2000 presentaban diferencias en la sintomatología de la enfermedad, siendo sugerida como promisoría la variedad Fedearroz 2000 porque presenta un alto potencial de rendimiento, grano largo y pesado y se ha comprobado que no se ve afectada por el daño mecánico producido por *Tagosodes orizicolus* (Muir), además de un mayor rendimiento en grano.

4.1.1 Ensayo de infectividad

Una vez sembradas cada una de las variedades se dejaron hasta los 16 días de crecimiento, fecha en la cual se realizó el ensayo de infectividad (Figuras 4-1 y 4-2).

Después de 30 días del ensayo de infectividad se corroboraron los síntomas de la enfermedad junto con expertos del CIAT; se observaron síntomas como bandas de color claro en las hojas (clorosis intervenal), hojas atrofiadas y marchitez general en las plantas inoculadas con los insectos que eran portadores del virus RHBVen la Figura 4-1 y Figura 4-2. Igualmente se determinó el porcentaje de plantas que presentaban los síntomas de la enfermedad en el tratamiento con virus de cada una de las variedades; estos porcentajes fueron: 50% de plantas infectadas para la variedad Fedearroz 2000 y 85,5% de plantas infectadas para la variedad Colombia I; los tratamientos control e insecto, en las dos variedades no presentaron los síntomas de la enfermedad.

De acuerdo con las investigaciones realizadas en el CIAT (CIAT, 1988; Aponte *et al.*, 1992; Vivas y Astudillo, 2008) los daños en la hojas debido a la presencia de insectos genera

daño mecánico por la forma de alimentación del vector y a la ovoposición; sin embargo, el mecanismo por el cual algunas variedades presentan un bajo porcentaje de infectividad al compararse con otras no se ha aclarado. Por otra parte, los síntomas de la enfermedad son distintos dependiendo de la variedad de la planta y la edad, muriendo si la infección ocurre al inicio del desarrollo vegetativo (CIAT, 1988; Aponte *et al.*, 1992; Vivas y Astudillo, 2008).

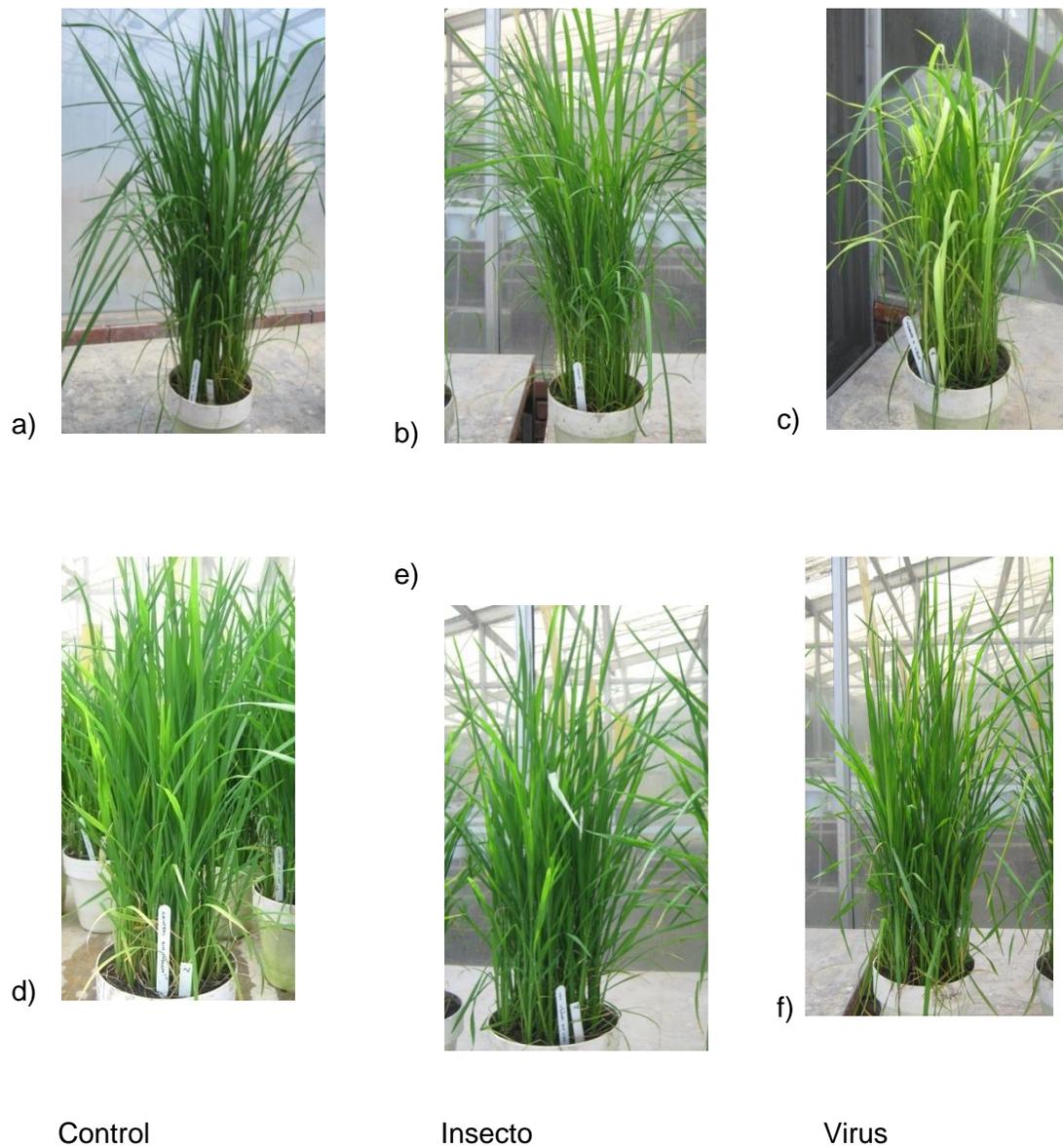
Figura 4-1: Detalle de los síntomas producidos por RHBV: clorosis, amarillamiento en las venas. (foto cedida por Maribel Cruz- FLAR- CIAT9)



De acuerdo a lo obtenido en el ensayo de infectividad las variedades descritas pueden sufrir la enfermedad, siendo más afectada la variedad Colombia I. Zeigler *et al.* (1988; 1994) reportaron que la incidencia de la enfermedad en las variedades analizadas aumenta cuando la infección ocurre en los primeros 20 días de edad de las plantas, como ocurrió en este ensayo.

Zeigler *et al.* (1988; 1994) reportaron que el porcentaje de infectividad puede aumentar dependiendo de las siguientes condiciones: a) más de tres insectos vectores por planta; b) plantas con menos de 10 días de edad; c) más de 5 días de exposición de las plantas a vectores. En el caso del presente trabajo, las plantas se colocaron en presencia del vector y del virus, a los 16 días de edad, y con 4 insectos por planta, lo cual probablemente influye en que se presentaran los síntomas en las dos variedades bajo condiciones controladas, a diferencia de lo que se encontraría en campo, donde la presión de insectos por planta es menor (Zeigler *et al.*, 1988; 1994).

Figura 4-2: Plantas de arroz, de las variedades Colombia I (a, b, c) y Fedearroz 2000 (d, e, f). En cada materia se sembraron 40 semillas y se dejaron en condiciones de invernadero. Cada ensayo se realizó por triplicado, 3 réplicas biológicas por cada uno de los tratamientos en cada una de las variedades. Ensayo realizado en el CIAT – Cali Colombia.



4.1.2 Ensayo de presencia del virus de la hoja blanca RHVB

El ensayo ELISA indicó la presencia del virus en el tratamiento virus de las dos variedades, mientras que con las plantas de los otros dos tratamientos (control e insecto) no se presentó reactividad (Tabla 4-1), confirmando que no hubo contaminación entre los tratamientos de las dos variedades, Fedearroz 2000 y Colombia I.

Tabla 4-1: Resultado en la prueba de ELISA de variedades Fedearroz 2000 y Colombia I.

Variedad	Control	Insecto	Virus
Fedearroz 2000	-	-	+
Colombia I	-	-	+

4.2 Extracción de proteínas

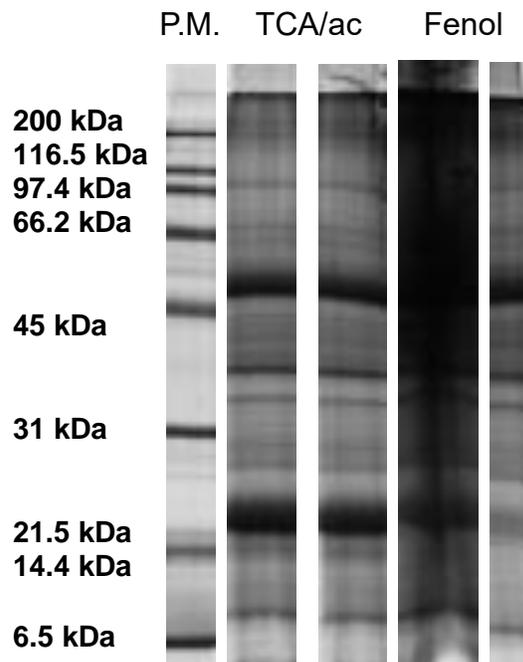
De los protocolos de extracción evaluados, se observó que el método en el cual se obtuvo un mayor contenido de proteínas y mayor rendimiento fue el método TCA/acetona, adicionalmente en el perfil electroforético se observó mejor resolución de bandas; mientras que en el método de Fenol se obtuvo un rendimiento menor y bandas poco definidas (Figura 4-3). Por lo cual se escogió el método TCA/acetona para realizar la extracción de proteínas de los tratamientos de cada una de las variedades y realizar la electroforesis.

La extracción eficiente de proteínas de una muestra de tejido depende de la calidad de la disrupción de la muestra. Se ha reportado que una desventaja del método de TCA/acetona es la cantidad de lavados que se realizan para que el precipitado final se decolore y se eliminen los contaminantes (Wang, W., et al., 2006; Wang et al., 2008; Maldonado et al.,

2008) que en el presente estudio fue de más de 7 lavados; comparado este método con el protocolo Fenol que puede arrastrar contaminantes que se detectan en la electroforesis SDS-PAGE y que interfieren en la diferenciación de las bandas, ya que el fenol disuelve proteínas y lípidos y excluye sustancias solubles en agua como carbohidratos, ácidos nucleicos en la solución acuosa, lo cual puede ser causante del barrido observado en el gel (Wang et al., 2003).

Figura 4-3: . a) SDS-PAGE. Comparación de métodos de extracción de proteínas de hojas de arroz. En donde: carril PM: marcadores de alto peso molecular; carriles 1 y 2: extracción de proteínas de hojas de arroz utilizando el método TCA/acetona; carriles 3 y 4: extracción de proteínas de proteínas de hojas de arroz utilizando el método Fenol. Tinción con coomassie G-250. b) Cuantificación de proteína para las muestras de *Oryza sativa*, utilizando los métodos TCA/acetona y Fenol. Extracción realizada por triplicado a partir de las muestras vegetales, 10µg de proteína por pozo y 5 µg de marcadores de peso molecular

a)



b)

<i>Muestra</i>	<i>total proteínas (µg)</i>	<i>Rendimiento %</i>
TCA	2256,98 ± 145,25	4,51 ± 0,29
Fenol	254,88 ± 136,17	0,51 ± 0,27

La extracción de proteínas de tejidos vegetales se dificulta debido a compuestos como polisacáridos, compuestos fenólicos, lípidos, ácidos orgánicos, pigmentos, proteasas y otros metabolitos secundarios que impiden una buena resolución en la electroforesis SDS-PAGE (Shaw et al., 2003; Görg et al., 2004), así mismo la edad de la planta influye en el proceso de extracción, debido a que existe un mayor número de compuestos no proteicos que hace difícil la extracción con otros protocolos que se utilizan para arroz.

4.3 Análisis de aproximación proteómica

4.3.1 Análisis SDS-PAGE del perfil de proteínas producidas por infección con RHBV

Posterior a la extracción de proteínas de hojas de arroz de cada una de las variedades, Fedearroz 2000 y Colombia I, y de cada uno de los tratamientos, se realizaron las electroforesis unidimensionales de cada uno de los extractos proteicos (Figura 4.4), estas electroforesis se analizaron utilizando el programa Quantity one V 4.6.6, para determinar la cantidad de bandas detectadas en cada uno de los tratamientos y su peso molecular aproximado.

Se observó diferencia en la intensidad óptica de las bandas de 21.5 KDa de los tratamientos control, insecto y virus de las dos variedades, siendo la mayor intensidad óptica observada en el tratamiento virus. El perfil electroforético de la variedad Fedearroz 2000 presentó bandas comprendidas entre 200 kDa y 6 kDa, con aparente disminución en intensidad de varias bandas comprendidas entre los 21,5 kDa y 35 kDa (Tabla 4-2; Figura 4-4), mientras que en la variedad Colombia I se observaron bandas entre 220 kDa y 6.5 kDa.

Un método alternativo al 2DE es el análisis directo de proteínas obtenidas de bandas de SDS-PAGE utilizando LC-MS/MS después de digestión proteolítica (Ramos et al., 2008); lo cual se realizó para la identificación de aquellas bandas que de forma visual no se encontraban en un tratamiento, pero no en otro. Se procedió a cortar las bandas que fueron seleccionadas como diferenciales para análisis por espectrometría de masas. El análisis

de estas bandas permitió clasificar las proteínas en los siguientes grupos: Fotosíntesis, sistema antioxidante, Metabolismo, y sin función definida (Tabla 4-3 y Tabla 4-4).

Figura 4-4: Perfil electroforético unidimensional de Fedearroz 2000 y Colombia I. Los extractos fueron separados en SDS-PAGE en un sistema que constó de gel concentrador 5% y gel separador al 12%, se corrieron a 120 V, se tiñeron con azul de Coomassie G - 250 coloidal. Se sembraron 5 µg de marcadores de peso molecular de alto rango (200 a 6,5 kDa de BIO-RAD) y 60µg de extracto proteico en cada carril. Carril 1: Marcadores de peso molecular de amplio rango; carriles 2 a 4: control; carriles 5 a 7: insecto; carriles 8 a 10: virus.

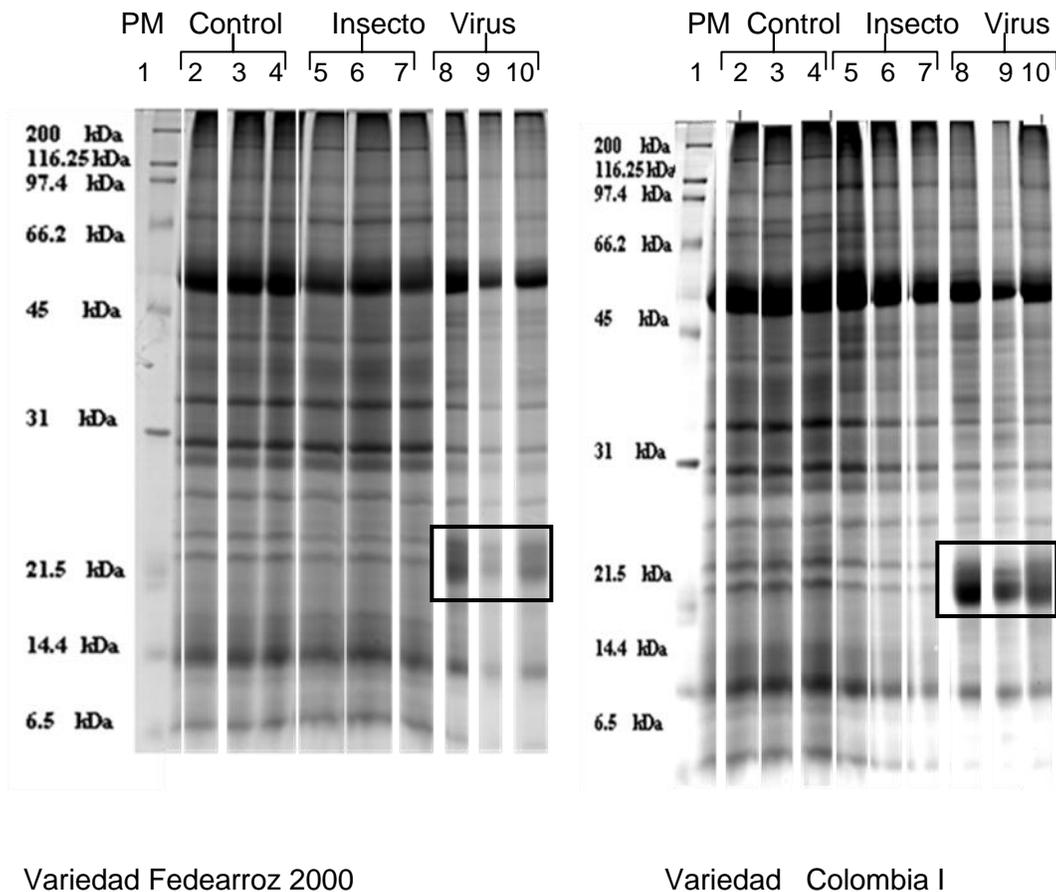


Tabla 4-2: Cantidad de bandas reconocidas por el software Quantity one en los geles unidimensionales de las variedades Colombia I y Fedearroz 2000.

TRATAMIENTO	COLOMBIA I	FEDEARROZ 2000
control	26	27
Insecto	27	28
Virus	35	24

De estas proteínas la que se encontró en mayor proporción fue RubisCO, la cual fue identificada en las dos variedades. Al evidenciar una mayor cantidad de bandas en la variedad Colombia I, se identificaron un mayor número de proteínas, que se clasificaron dentro del grupo de fotosíntesis, una proteína que se clasificó dentro del sistema antioxidante.

4.3.2 Análisis de electroforesis 2-DE del perfil de proteínas obtenidas en los diferentes tratamientos

Para determinar el rango óptimo de pH en el cual se encontraba la mayor cantidad de manchas se realizó un experimento preliminar con cada una de las variedades, en el cual se utilizaron tiras de rango de pH entre 3 – 10 (Figura 4-4); este experimento indicó que la mayoría de las manchas se encontraron en el centro del gel en un rango de pH aproximado de 5 – 8; por tanto, para el análisis proteómico se utilizaron tiras de pH entre 5 y 8 con el fin de aumentar la resolución de las manchas en el gel; es decir, una mejor separación de las mismas en un gel lineal al 12% en poliacrilamida (Figura 4-6 y Figura 4-7).

Con el protocolo establecido para electroforesis 2-DE, aproximadamente 4000 manchas se tiñeron con azul de coomassie G-250, los cuales se resolvieron de forma reproducible en todos los geles 2-DE utilizados en el análisis de comparación (Figura 4-6 y Figura 4-7).

Tabla 4-3: Identificación de las bandas seleccionadas de la variedad Fedearroz 2000.

^aNo. Accesion: Número de identificación de la proteína teniendo en cuenta lo reportado en el National Center for Biotechnology Information database.

^bC.I protein score %: Puntaje probabilístico de la proteína, entre más cercano a 100%, mejor es la identificación.

^c PM. Peso Molecular (kDa)

^d IP: Punto isoelectrico

PROTEINA	Especies	No. ACCESSION ^a	CI % ^b	PEPT COUNT	Experimental	Teórico	
					PM ^c (Da)	PM ^d (Da)	PI ^d (pH)
<u>Fotosíntesis</u>							
Rubisco	<i>Eriachne triodioides</i>	gi 13310805	100	17	55118	46829,1	6,22
Subunidad Alfa de ATPasa del cromosoma 10 de cloroplasto	<i>Oryza sativa Japonica</i>	gi 19920165	100	13	45550	55762,5	5,88
Subunidad Beta de ATP sintasa	<i>Strptocaeta angustifolia</i>	gi 150035733	100	11	38522	51784	5,22
anhidrasa carbónica	<i>Oryza sativa Japonica</i>	gi 3345477	99,913	4	27731	29497,9	8,41
Cadena Alfa de citocromo b559	<i>Oryza sativa Indica Group</i>	gi 42795499	100	4	7407	11803,9	4,61
Subunidad VI del centro de reacción del fotosistema I	<i>Oryza sativa Indica Group</i>	gi 149392485	100	4	8094	8769,7	9,46
Proteína 1 del complejo de oxígeno	<i>Oryza sativa</i>	gi 739292	100	14	33555	26603,4	5,13
Proteína de unión a clorofila a/b cosechador de luz tipo I	<i>Oryza sativa Japonica</i>	gi 218172	100	2	28180	28081,2	5,29
Receptor de luz azul (ISS)	<i>Ostreococcus tauri</i>	gi 116055620	99,988	16	22371	83646,1	5,87
Subunidad del centro de reacción del Fotosistema I	<i>Solanum lycopersicum</i>	gi 131166	99,994	6	21338	22961	9,71

42 **Aproximación proteómica de la respuesta a la infección por el virus de la hoja blanca en dos variedades de *Oryza sativa* L.**

Polipéptido de 23 kDa del cloroplasto del fotosistema II	<i>Oryza sativa Japonica</i>	gi 164375543	100	9	25703	20074,1	5,56
triosafosfato isomerasa	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	gi 553107	100	8	28180	27816,4	6,6
Fosfoglicerato kinasa	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	gi 46981258	100	8	44714	32482,4	9,93
Subunidad beta de CF1 de ATP sintasa	<i>Oryza nivara</i>	gi 50233978	100	14	55414	53978,1	5,38
Os12g0420200	<i>Oryza sativa Japonica</i>	gi 115488340	100	16	39151	41620,6	8,59
Os11g0171300	<i>Oryza sativa Japonica</i>	gi 115484401	100	9	37137	42207,6	6,38
Os08g0560900	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	gi 115477831	100	9	23996	22134,4	9,36
<u>Sistema antioxidante</u>							
2-cys peroxiredoxin bas1	<i>Oryza sativa Indica Group</i>	gi 149390991	100	4	15176	15403,9	5,13
Os03g0786100	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	gi 115455773	100	13	41581	40415,1	8,48
<u>Metabolismo</u>							
Os11g0171300	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	gi 115484401	100	7	37137	42207,6	6,38
OSIGBa0096P03.5	<i>Oryza sativa Indica Group</i>	gi 116309348	96,897	10	36101	45974,8	9,19

Tabla 4-4: Identificación de las bandas seleccionadas de la variedad Colombia I.

^aNo. Accesion: Número de identificación de la proteína teniendo en cuenta lo reportado en el National Center for Biotechnology Information database.

^bC.I protein score %: Puntaje probabilístico de la proteína, entre más cercano a 100%, mejor es la identificación.

^c PM. Peso Molecular (kDa)

^d IP: Punto isoeléctrico

PROTEINA	Especies	No. ACCESSION ^a	CI % ^b	PEPT COUN T	Experimenta l PM ^c (Da)	Teórico PM ^c (Da)	PI ^d (pH)
<u>Fotosíntesis</u>							
RubisCO	<i>Theligonum cynocrambe</i>	gi 1050842	100	16	43670	52445,3	5,91
Transcetolasa putativa	<i>Oryza sativa Japoniac</i>	gi 55296168	100	12	25.783	69406,6	5,43
Subunidad IV del centro de reacción de Fotosistema I	<i>Oryza sativa Indica</i>	gi 149392485	100	4	9320	8769,7	9,46
Subunidad VII del Fotosistema I	<i>Medicago truncata</i>	gi 153012160	100	6	7740	9376,3	6,51
Sub unidad beta de ATP sintasa	<i>Oryza sativa Japonica</i>	gi 19920171	100	12	46300	54008,2	5,38
Fosfoglicerato kinasa	<i>Oryza sativa Japonica</i>	gi 46981258	100	9	47.320	32482,4	9,93
Proteína 1 del complejo de oxígeno	<i>Oryza sativa</i>	gi 739292	100	4	36900	26603,4	5,13
poliproteina	<i>Oryza sativa Japonica</i>	gi 46981290	93,36 6	19	22600	224004, 6	9,19
Os07g0141400	<i>Oryza sativa Japonica</i>	gi 115470529	100	6	26080	27093,8	8,66

44 **Aproximación proteómica de la respuesta a la infección por el virus de la hoja blanca en dos variedades de *Oryza sativa* L.**

Os08g0560900	<i>Oryza sativa Japonica</i>	gi 115477831	100	11	23.000	22134,4	9,72
Os07g0141400	<i>Oryza sativa Japonica</i>	gi 115470529	99,99	6	9270	27093,8	8,66
<u>Sistema antioxidante</u>							
2-cys peroxiredoxina bas1	<i>Oryza sativa Indica</i>	gi 149390991	100	5	25900	15403,9	5,13
Os03g0786100	<i>Oryza sativa Japonica</i>	gi 115455773	100	14	41.820	40415,1	8,48
<u>Metabolismo</u>							
Fructose-bisphosphato aldolasa, precursor cloroplástico	<i>Oryza sativa Japonica</i>	gi 108864048	100	12	39500	41808	6,07
Epimerasa/deshidratasa NAD dependiente	<i>Ricinus communis</i>	gi 255542956	100	8	40000	42718,1	8,52
Os12g0291400	<i>Oryza sativa Japonica</i>	gi 115488238	100	12	15020	19714	8,87
Os11g0171300	<i>Oryza sativa Japonica</i>	gi 115484401	100	12	39500	42207,6	6,38
<u>Señalización y transporte intercelular</u>							
Proteína similar al precursor del receptor de kinasa serina/treonina	<i>Oryza sativa Japonica</i>	gi 28411832	100	8	24000	67601,5	5,91
<u>Sin función definida</u>							
Proteína hipotética Osl_20474	<i>Oryza sativa Indica</i>	gi 125552851	100	10	25900	30520,5	6,86
Proteína hipotética OsJ_28989	<i>Oryza sativa Japonica</i>	gi 222641394	100	4	29730	25074,7	9,61
Familia de proteínas hidantoinasa/carbamilasa	<i>Oryza sativa Japonica</i>	gi 108862916	99,99 8	14	26920	51797,4	5,41

Biosíntesis

Factor G de elongación, cloroplástico	<i>Glycine max</i>	gi 461999	96,51 9	14	23700	87244,3	5,53
transposon protein, putative, CACTA, En/Spm sub-clase	<i>Oryza sativa Japonica</i>	ij78708557	93,95	9	38400	25589	7,71

Figura 4-5: Perfil de Electroforesis 2-DE de proteínas extraídas de hojas de arroz mediante el protocolo TCA/acetona. Tinción con Coomassie azul G-250, IPG de amplio rango de pH (3-10) y gel SDS-PAGE 12% en poliacrilamida. Tamaño del gel: 12 cm. Imagen del Gel adquirida con scanner Bio Rad.

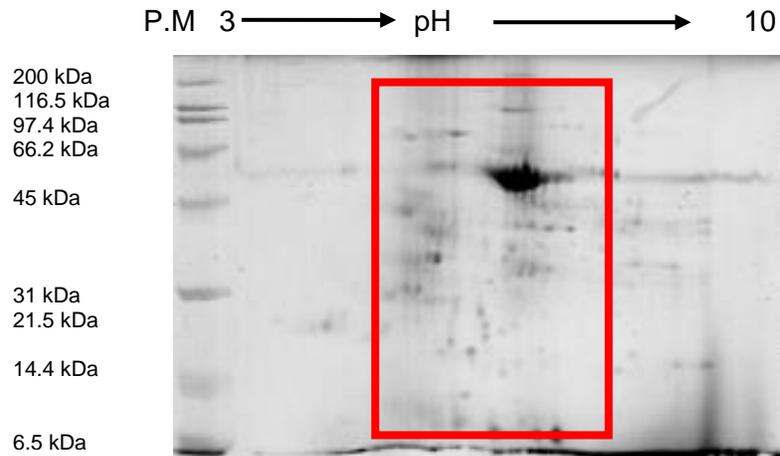


Figura 4-6: Electroforesis 2-DE de cada uno de los tratamientos realizados a la variedad Fedearroz 2000. Tinción con Coomassie azul G-250 para el 2-DE de proteínas de hojas de arroz separadas en una tira IPG de rango de pH 5-8 y gel SDS-PAGE 12% en poliacrilamida. Imagen del Gel adquirida con scanner Bio Rad. a) Control 1; b) Insecto 2; c) Virus. El recuadro A contiene manchas que aumentaron en intensidad, B son manchas presentes en un tratamiento. Se resalta en todos los geles la presencia de Rubisco.

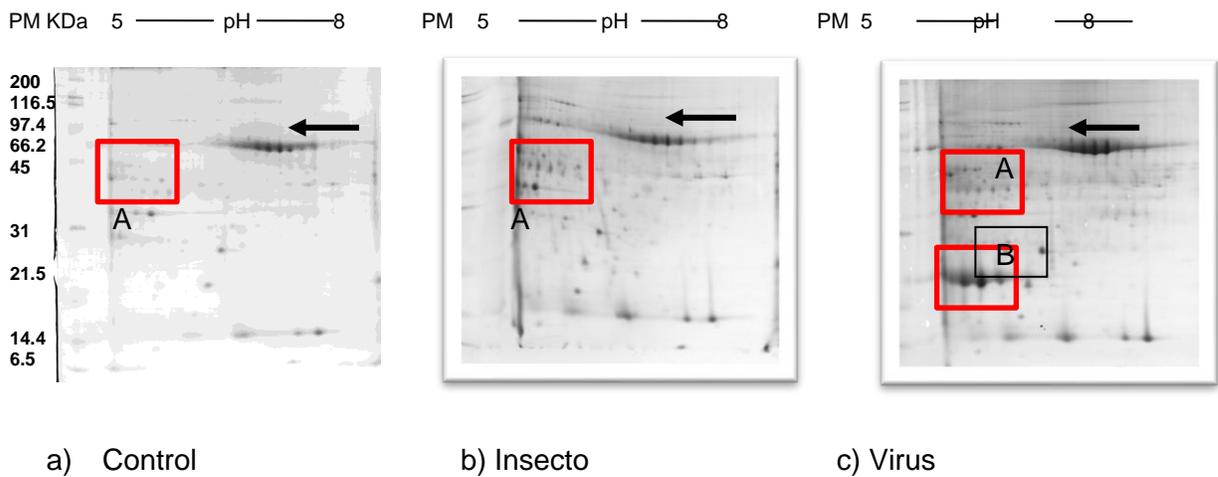
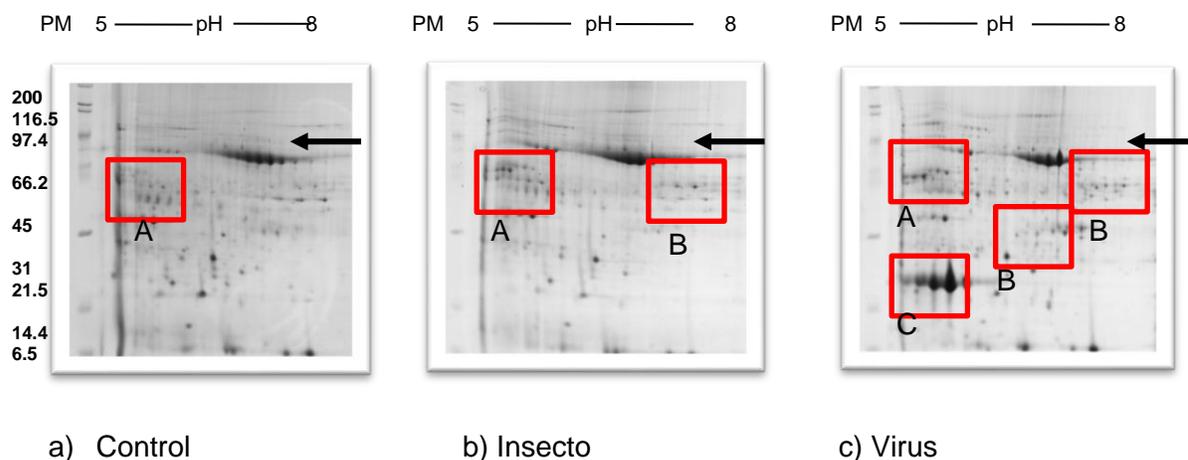


Figura 4-7: Electroforesis 2-DE de cada uno de los tratamientos realizados a la variedad Colombia I. Tinción con azul de Coomassie G-250 para el 2-DE de proteínas de hojas de arroz separadas en una tira IPG de rango de pH 5-8 y gel SDS-PAGE 12% en poliacrilamida. Imagen del Gel adquirida con scanner Bio Rad. a) Control; b) Insecto; c) Virus. El recuadro A son manchas que aumentaron en intensidad, B son manchas presentes en un tratamiento. C son manchas que no se observan en los tratamientos 1 y 2



4.3.3 Análisis de comparación de los patrones de perfiles de proteínas e identificación de proteínas (MS/MS)

Una vez obtenidos y teñidos los geles, fueron digitalizados y normalizados utilizando el programa PDQuest (BioRad, versión 8.0.1). Se creó un master gel (Figura 4-8), el cual contiene las manchas de todos los geles digitalizados; en este caso las manchas de cada una de las réplicas de los tratamientos correspondientes a cada una de las dos variedades del presente estudio. Luego se generó una tabla que contiene al menos 4000 datos referentes a las intensidades de las manchas que se lograron visualizar en todos los geles.

En total se obtuvieron 375 manchas que se emparejaron entre las replicas de los tratamientos y entre las dos variedades de estudio, Fedearroz 2000 y Colombia I. El análisis de comparación de las manchas de las dos variedades permitió determinar que: 96 manchas (25%) se encontraron en común en las dos variedades de estudio Colombia I y Fedearroz 2000, 137 manchas (37%) solo en la variedad Fedearroz 2000 y 143 manchas (38%) solo en la variedad Colombia I, como lo muestra el diagrama de Venn en la Figura 4-9 y Tabla

Figura 4-8: Master gel obtenido en el experimento, contiene las manchas de todos los tratamientos de las dos variedades (Fedearroz 2000 y Colombia I). Imagen creada con el programa de Bio Rad PdQuest, versión 8.0.1

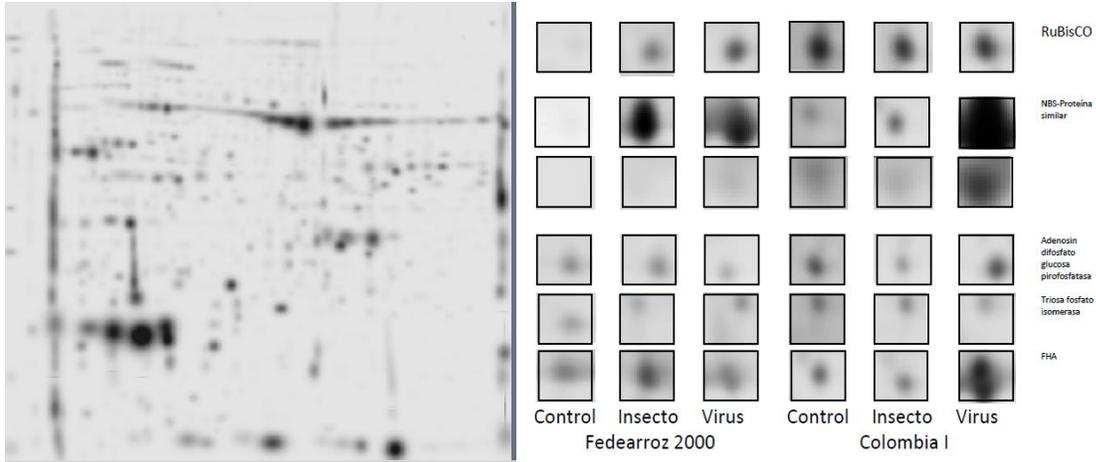


Figura 4-9: Diagrama de Venn de las manchas encontradas en las dos variedades: Fedearroz 2000 y Colombia I.

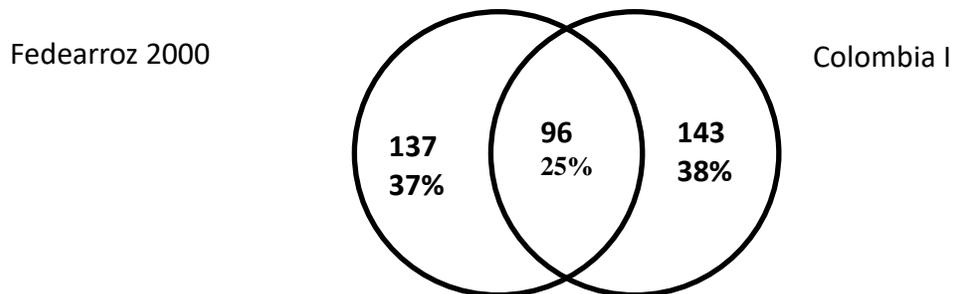


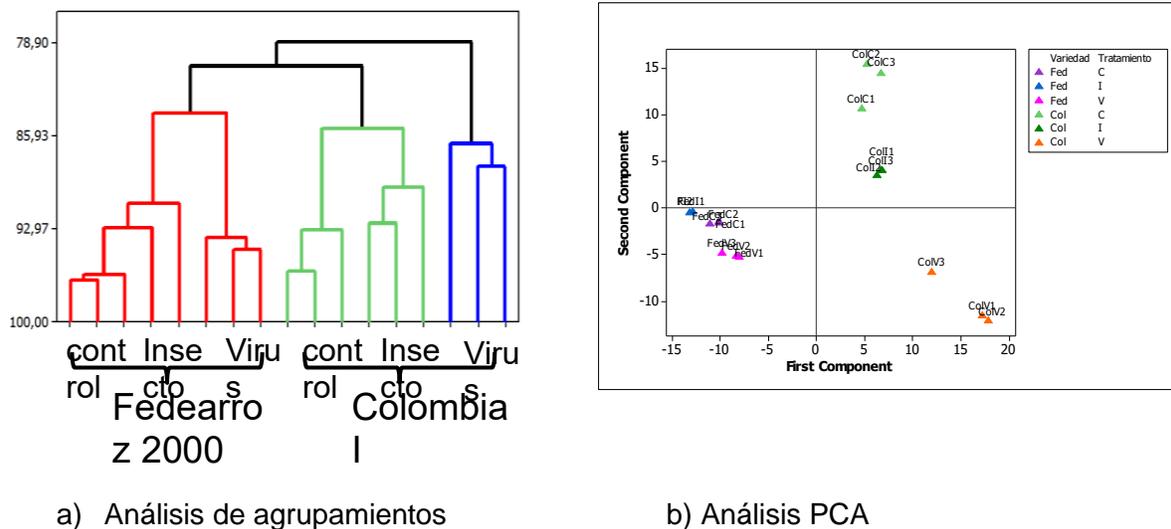
Tabla 4-5: Distribución de las manchas identificadas en las dos variedades de estudio, Fedearroz 2000 y Colombia I

Función	Fedearroz 2000	Común	Colombia I
Fotosíntesis	0%	26,5%	31,8%
Metabolismo	12%	26,5%	22%
Biosíntesis	11%	1,9%	4,5%
Defensa en plantas	0%	8,8%	4,5%
Sistema antioxidante	0%	17,6%	0%
Señalización celular	0%	0%	31,8%
Desconocida	77%	17,6%	5,45

El análisis de PCA de las manchas que presentaban triplicados entre los tratamientos de las dos variedades mostró que los tratamientos de la variedad Fedearroz 2000 se ubicaron en la misma región del plano cartesiano, mientras que la variedad Colombia I se localizó en el lado opuesto y en dos de los cuadrantes, en el cuadrante superior el control y en el inferior Insecto y virus (figura 4-10), indicando que hay similitud en los efectos de estas manchas sobre los componentes de los mismos; una distribución similar se observó en el análisis de agrupación, en donde el tratamiento virus de la variedad Colombia I se encontró separado de las dos ramas principales, indicando su diferencia con respecto tanto a las variedades como a los tratamientos.

La selección de las manchas para la identificación se realizó de acuerdo a regiones que visualmente presentaban mayor abundancia de los mismos. El análisis ANOVA de dos vías para las 155 manchas seleccionadas para las cuales la hipótesis nula fue que los grupos obtenidos presentaban diferencias en nivel de significancia, de estos solo un pequeño porcentaje de las manchas presentaban similitudes. Las otras manchas se agruparon de acuerdo con su relevancia en cuanto a tratamiento, interacción del tratamiento.

Figura 4-10: Análisis por agrupamientos y PCA de las manchas obtenidas por electroforesis 2DE. a) análisis por agrupamientos de las manchas relacionadas en las dos variedades y b) Análisis PCA de las manchas relacionadas en las dos variedades, Fedearroz 2000 y Colombia I



4.3.4 Identificación de proteínas comunes a las variedades Fedearroz 2000 y Colombia I

De las 96 manchas que se encontraron en común entre las dos variedades, se seleccionaron 57 para su identificación por espectrometría de masas; estas manchas presentaron diferencias en intensidades entre los tratamientos y entre las dos variedades de estudio (Fedearroz 2000 y Colombia I); sin embargo el análisis ANOVA no mostró diferencias significativas entre las manchas que se encontraron en los triplicados de cada tratamiento de las dos variedades, las manchas que se identificaron en un solo tratamiento se utilizaron para la diferenciación de cada una de las muestras analizadas. Una vez realizada la identificación de las manchas cortadas se procedió a agrupar los resultados obtenidos de acuerdo con el nombre de la proteína resultando 34 proteínas agrupadas de acuerdo a su función: Fotosíntesis, metabolismo, señalización celular, sistema antioxidante, biosíntesis y sin función conocida. Al realizar el análisis de los datos obtenidos se observó que el 40% de las manchas seleccionadas se identificaron con la misma proteína, con diferente peso molecular y punto isoeléctrico. Estos datos sugieren que el 40% de las

manchas identificadas pueden corresponder con formas modificadas postraduccionalmente, miembros de familias multigene, procesos de degradación proteica, bases de datos incompletas o productos de splicing alternativo (Pandey et al., 2009; Zhang et al., 2010, Rogowska et al., 2013). Las proteínas identificadas se encuentran en la Tabla 4-6.

Muchas de las manchas seleccionadas se identificaron como una misma proteína, los cuales presentaban diferencias en cuanto a peso molecular y punto isoeléctrico (PI), como ejemplo, la subunidad alfa de ATP sintasa CF1 (mancha 4703, 6702, 2703 y 3702) (Tabla 4.5), sugiriendo que es posible que se presenten modificaciones postraduccionales durante el proceso de defensa de la planta. Igualmente se observaron fragmentos de Ribulosa bifosfato carboxilasa/ oxigenasa activasa RbcL y diferente abundancia de los mismos sugiriendo que el proceso es dinámico y que las proteínas se sintetizan y/o degradan dentro de la célula dependiendo de la fisiología de la planta en determinado momento.

Identificación de proteínas diferencialmente determinadas: De acuerdo con la literatura, las funciones de las proteínas identificadas se relacionan con fotosíntesis, sistema antioxidante, metabolismo de carbohidratos, sistema de defensa en plantas, biosíntesis y transporte celular (Umeda y Uchimiya 1994; Mars 1996; Asada 1992; Agrios 1997; Versta 2003; Van et al., 1999). Todas estas proteínas han sido previamente reportadas como involucradas en la respuesta de varias especies de plantas frente a estres abióticos o bióticos (Lin et al., 2005, 2008; Lee et al., 2007, 2009, 2010; Han et al., 2009; Ahsan et al., 2007, 2008, 2010; Abeles et al., 1992; Laxalt et al., 1996; Bartling et al., 1993; Shen et al., 2003; Kim et al., 2004; Giulivi et al., 1994; Linthorst et al., 1990; Ke et al., 2009; Wen et al., 2010; Shri et al., 2009; Chakrabarty et al., 2009; Sun et al., 2008; Zang y Komatsu 2007; Wei et al., 2009; Sharma et al., 2004; Kim et al., 2003, Ma 2012), sugiriendo que existen sistemas de respuesta común en plantas. En el presente trabajo se encontraron algunas proteínas relacionadas con defensa, tanto en plantas de la variedad Fedearroz 2000 como en la variedad Colombia I (Jones, 1996).

Proteínas relacionadas con fotosíntesis:

En la figura 4-11 se observa la variación entre las proteínas relacionadas con fotosíntesis para las dos variedades: a. Variedad Fedearroz 2000 y b: Variedad Colombia I.

52 **Aproximación proteómica de la respuesta a la infección por el virus de la hoja blanca en dos variedades de *Oryza sativa* L.**

Tabla 4-6: Identificación de las manchas en común entre las dos variedades Fedearroz 2000 y Colombia I. ^aNCBI ID: Protein identification number in the National Center for Biotechnology Information database.

^bC.I protein score %: Puntaje probabilístico de la proteína, entre más cercano a 100%, mejor es la identificación.

^c MW. Peso Molecular (kDa)

^d IP: Punto isoeléctrico F: variedad Fedearroz 2000; C: control. I: insecto, V: virus. ↑: aumento; ↓ Disminución

PROTEINA	Especie	Número de acceso	CI %	PEPT COUN T	Experimental		Teórico			
					PM ^d (Da)	PI ^e (pH)	PM ^d (Da)	PI ^e (pH)		
<u>Fotosíntesis</u>										
Sub unidad alfa de ATP sintasa CF1	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	gi 11466784	100	26	92670	6,32	55687,5	5,95	↓FV - ↑CI	
Sub unidad beta de ATP sintasa CF1	<i>Oryza nivara</i>	gi 50233978	100	21	91890	5,08	5978,1	5,38	↑FV -↑ CIV	
Polipéptido de 23 kDa de fotosistema II del cloroplasto	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	gi 164375543	100	13	22310	5,99	20074,1	5,56	↓FV - ↓CIV	
Ribulosa bi fosfato carboxilasa/oxigenasa activasa	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	gi 108864712	100	22	59230	5,23	38690,2	5,36	↓FV - ↑CI	
Factor HCF-136 del fotosistema II	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	gi 75252730	100	19	57750	6,02	45498,2	9,02	↓FI - ↑CV	
Proteína del complejo 1 de evolución de oxígeno	<i>Oryza sativa indica Group</i>	gi 739292	100	16	40020	5	26603,4	5,13	↓FIV - ↓CIV	
Sub unidad IV del centro de reacción del fotosistema I	<i>Oryza sativa indica Group</i>	gi 125558131	100	8	17380	5,87	15440	9,64	↓FIV - ↓CIV	
RuBisCO	<i>Oryza sativa</i>	gi 56966763	100	11	17,03	7,3	15090,6	5,89	↓FIV - ↓CIV	
Proteína de unión a clorofila a/b tipo III	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	gi 115444841	100	9	28160	5,11	29191	6,92	↓FI - ↑CI	

<u>Sistema antioxidante</u>										
Catalasa	<i>Oryza sativa</i>	gi 20192	100	16	100920	7,22	57057,3	6,75	↑FI-↑CI	
Federroxina NADP(H) oxidoreductasa	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	gi 41052915	100	18	49180	6.13	41094,6	7,98	↑FI- ↓CIV	
Manganeso superoxido dismutasa	<i>Oryza sativa indica Group</i>	gi 601871	100	11	25350	6,19	25040,9	6,5	↓FV-↑C IV	
Superoxido dismutasa (Cu-Zn)	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	gi 115477837	100	6	11460	5,67	21402	5,79	↑FI-↓C IV	
Glicolato oxidasa	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	gi 115455773	100	20	63080	7.57	40415,1	8,49	↑FV-↓C I	
<u>Metabolismo</u>										
Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	gi 108864048	100	10	51040	5,03	41808,3	6,07	↑FI-↓CI	
Glutamina sintetasa	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	gi 115461066	100	9	70970	5.10	46955,6	5,96	↓FI↑V- ↑CIV	
Adenosina difosfato glucosa pirofosfatasa	<i>Triticum aestivum</i>	gi 21322655	100	3	21972	5.68	20552,7	6,01	↑FIV- ↓C I	
Triosa fosfato isomerasa	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	gi 553107	100	11	27790	5.24	27816,4	6,6	↓FV-↑C IV	
Proteína de la familia epimeras/deshidrata NAD-dependiente	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	gi 115488340	100	22	57000	6.49	41620,6	8,59	↑FI- ↓CIV	
Enzima lipolítica	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	gi 115466518	100	13	48570	7.47	37086,8	8,22	↓FV- ↓CV	
<u>Defensa en plantas</u>										
Quitinasa	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	gi 54291729	100	12	35420	6.17	32756,6	6,08	↓FIV- ↓C IV	
Proteína similar a Germina	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	gi 115476760	100	4	23520	6.05	22018,3	6,01	↑FI-↑C I	
Proteína similar a NBS que contiene resistencia	<i>Platanus x acerifolia</i>	gi 157283585	0	1	18940	5.41	19742	6,95	↓FI↑FV -↓C I↑CV	

54 **Aproximación proteómica de la respuesta a la infección por el virus de la hoja blanca en dos variedades de *Oryza sativa* L.**

<u>Biosíntesis</u>										
Proteína S26 ribosomal 40S	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	gij149390907	100	4	12694,5	5,09				↓FIV- ↑C I
<u>Señalización celular</u>										
FHA	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	gij108862123	100	6	16600	5,23	29719,2	8,96		↓FI-↓C IV
Peptidil-prolil cis-trans isomerasa	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	gij115461585	100	11	17080	7.12	26744,7	9,36		↑FI- ↑CC

La ATP sintasa del cloroplasto es un complejo con múltiples subunidades que cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP y ortofosfato acoplado con el potencial electroquímico de protones en la membrana del tilacoide, se ha encontrado que la eliminación de la subunidad CFo en cianobacteria es letal y se sugiere que la subunidad beta es esencial para la viabilidad celular y que la delección de una subunidad del complejo ATP sintasa afecta la acumulación de todo el complejo (Meng et al., 2013). Subunidad alfa y beta de la ATP sintasa: (manca 4703 y 2703) esta proteína cataliza la transferencia de protones de un lado de la membrana a otro dentro del cloroplasto. Se encontró que la subunidad alfa de la ATP sintasa se observa disminuida en el insecto, en tanto que en el virus aumenta en la variedad Fedearroz 2000; también se observa que dicha proteína aumenta significativamente en el tratamiento insecto de la variedad Colombia I. En tanto que la Subunidad beta de la ATP sintasa, disminuye en el tratamiento insecto de la variedad Fedearroz 2000, y aumenta en el tratamiento insecto como en el virus de la variedad Colombia I.

El polipéptido de 23 kDa del fotosistema II del cloroplasto (mancha 4103) es una proteína que se encuentra involucrada en procesos fotosintéticos de ensamble del fotosistema II y hace parte del complejo de evolución de oxígeno del fotosistema II; al parecer la proteína está relacionada con la concentración de calcio necesaria para el funcionamiento del fotosistema II (Ettinger & Theg, 1991). Esta proteína disminuye en el virus de la variedad Fedearroz 2000 y aparece en los tratamientos insecto y virus de la variedad Colombia I, aparentemente estaría relacionado con procesos de inhibición proteica o metabólica por parte del virus y efectos de hervivoría en el insecto.

Otra proteína relacionada con procesos fotosintéticos es la RUBISCO activasa (mancha 2501), proteína regula la actividad de la Rubisco. Para arroz se ha reportado cuatro isoformas que se encuentran en el rango de 42 a 47 kDa (To et al., 1999; Zhang y Komatsu 2000), dos de estas isoformas son más abundantes bajo condiciones de estrés. El papel específico de la RUBISCO activasa es liberar fosfatos inhibidores de azúcares tales como la ribulosa-1,5-bifosfato, de sitios activos de la RUBISCO (Jordan y Chollet 1983). Igualmente puede funcionar como fijador del CO₂ remanente en la célula disipando energía, o puede proteger la síntesis proteica del cloroplasto cuando hay estrés.

Esta proteína presenta un comportamiento variable en las dos variedades: disminuye en el insecto y virus de la variedad Fedearroz 2000, quizás implicado en una disminución de

estrés; mientras que en la variedad Colombia I, aumenta en el insecto, lo cual estaría directamente relacionado con disparar procesos de protección de síntesis proteica cuando el insecto se ha puesto en contacto con la planta, pero vuelve a sus niveles casi normales en presencia del virus, quizá como mecanismo del virus para permitir que la síntesis proteica no se vea afectada a favor del mismo patógeno.

Debido a la enorme cantidad de esta proteína en las hojas, el perfil de RuBisCO puede ser reflejado por su subunidad mayor (RbcL) (mancha 7302) la cual usualmente aparece como las manchas más ampliamente teñidas con un gran barrido en la imagen 2DE, figura 4.6 y 4.7 (Yang et al., 2006; Wan et al., 2008; 2012). Este barrido hace difícil cuantificar la RbcL ya que en algunos estudios se ha observado un aumento en algunas isoformas de la proteína al final del gel 2DE (Wang et al., 2012). Igualmente se encontraron isoformas parcialmente degradadas de RbcL, sensibles al virus, en la variedad Colombia I, las cuales no fueron detectadas en los tratamientos de la variedad Fedearroz 2000. El complejo RuBisCO necesita ser activado por la carbamilación reversible del residuo de lisina en RbcL (Lys201) seguido por la rápida unión a magnesio. Este proceso es regulado por la RuBisCO activasa (RCA). La proteína carbamilada también se detectó en los tres tratamientos de las dos variedades. El complejo de RuBisCO es el más abundante y mejor ejemplo estudiado y forma hetero oligomero con 8 subunidades pequeñas y 8 subunidades grandes. De otra parte, RCA se asocia con el complejo RuBisCO razón por la cual puede encontrarse con pesos moleculares mayores (Peltier et al., 2006).

La subunidad menor de RuBisCO disminuyó en el tratamiento virus de la variedad Fedearroz 2000 e igualmente aumento en el tratamiento virus de la variedad Colombia I, Zhao en 2005 relacionó la RuBisCO con un balance dinámico entre la síntesis y catabolismo de moléculas durante el crecimiento de las plantas, así como frente a la respuesta a estrés biótico como es nuestro caso.

La proteína de unión a clorofila a/b del PSI tipo III, disminuye en el insecto de la variedad Fedearroz 2000, mientras que no se observa un aumento significativo en el mismo tratamiento de la variedad Colombia I. Los estados de transición en la fotosíntesis se llevan a cabo por proteínas de unión a clorofila a/b, e involucra la fosforilación reversible de las proteínas de unión a clorofila a/b móviles, las cuales son reguladas por el estado redox de

la plastoquinona que media la transferencia de electrones entre el fotosistema I y el fotosistema II, este proceso involucra además otro tipo de proteínas en el estado de transición (Kargul & Barber, 2008).

El factor HCF136 de ensamble/estabilidad del fotosistema II, (mancha 4503) es una proteína que no se observa una disminución significativa en el insecto de la variedad Fedearroz 2000 y aumenta casi al doble en el virus de la variedad Colombia I. Esta proteína hidrofílica se ha encontrado como necesaria para el ensamble y/o estabilidad del fotosistema II (PSII) (Peng, et al., 2006), regulando la biogénesis del fotosistema, se encuentra localizada en el lumen del estroma del tilacoide. La variación entre la proteína de unión a clorofila a/b y el factor HCF136 puede relacionarse con una disminución en la eficiencia fotosintética en el PSII

La subunidad IV del centro de reacción del fotosistema I disminuye en los tratamientos 2 y 3 de la variedad Fedearroz 2000; pero disminuye en el insecto y aumenta en el virus de la variedad Colombia I. La disminución de esta proteína puede estar relacionada con la fijación de ATP y su posterior uso en el ciclo de calvin, disminuyendo la eficiencia del PSI y por lo tanto la captación de luz y la producción energética y como consecuencia la producción de moléculas necesarias para el proceso metabólico. (Diaz-Vivancos et al., 2008)

La disminución en la abundancia de proteínas fotosintéticas ha sido reportada en hojas de arroz en senescencia y bajo estrés abiótico; se ha sugerido que las subunidades grandes de RuBisCO pueden ser degradadas por las ROS. Varios reportes muestran que en respuesta a estrés hay un incremento en el número de manchas que corresponden a la subunidad mayor de Rubisco degradadas (Hajheidari et al., 2005). La ruptura de proteínas fotosintéticas en el estudio realizado por Bazargani (2011) sugirió la removilización de nutrientes como nitrógeno para desarrollar partes de las plantas, ya que la Rubisco puede servir como almacenamiento de nitrógeno en condiciones en las cuales se requiere menos proteína para asimilación de dióxido de carbono fotosintético.

En estados de estrés se puede incrementar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como resultado de la fotosíntesis, respiración y NADPH oxidasas, y como producto de la ruptura de los fotosistemas (Bazargani et al., 2011), razón por la cual la mayor cantidad

de subunidades de RuBisCO identificadas puede estar relacionado con el estrés generado por el virus y el insecto en las plantas de la variedad Colombia I.

El incremento en la fotosíntesis mejora el metabolismo de carbono y mejora el sistema de defensa antioxidante (Jithest et al., 2006) lo que podría contribuir al vigor en arroz en Fedearroz 2000. En el estudio de Zhang (Zhang et al., 2012) se observó un mayor número de proteínas relacionadas con fotosíntesis, glicólisis y defensa/ enfermedad en estadios de floración y llenado de grano de arroz para la línea LYP9.

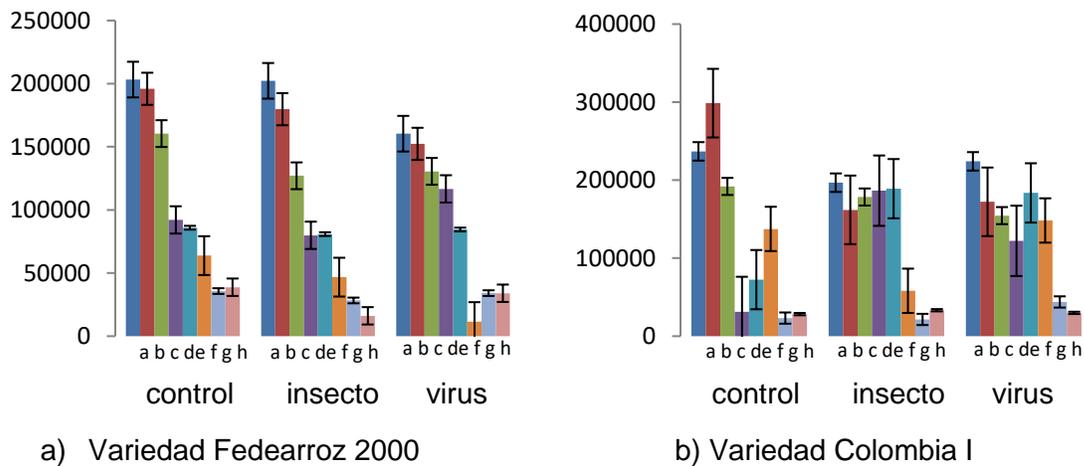
Yu et al. (2010) reportaron el papel de los cloroplastos en la defensa de plantas. La pérdida de integridad del aparato fotosintético, específicamente del RcbL puede ser la vía de respuesta hipersensitiva y puede conducir a limitar las cantidades de azúcares simples necesarias para la planta, entonces restringiendo el crecimiento del patógeno; sin embargo, es poco claro cómo las plantas regulan la destrucción del aparato fotosintético y aumento de resistencia sistémica al patógeno durante defensa. Dicho proceso probablemente se encuentra relacionado en la variedad Colombia I, en donde se observa la disminución de proteínas importantes frente al insecto y virus; mientras que en la variedad Fedearroz 2000 en algunas proteínas no se observa variación entre los tratamientos.

Proteínas relacionadas con el sistema antioxidante: en la figura 4-12 se observa la variación entre las proteínas relacionadas con sistema antioxidante para las dos variedades Fedearroz 2000 y Colombia I; se encontraron las siguientes enzimas del sistema antioxidante:

Catalasa (1.11.1.6): (mancha 4501) Se identificó únicamente en el insecto de la variedad Fedearroz 2000 y en el virus de la variedad Colombia I; es una de las enzimas más activas del sistema antioxidante, la principal función es descomponer peróxido de hidrógeno producido por actividad metabólica celular bajo condiciones normales y de estrés, a agua y oxígeno; la enzima también tiene actividad similar a oxidasa y peroxidasa (Kar et al., 1976). En arroz se han identificado tres genes de catalasa CatA, CatB y CatC, pero su expresión es específica de tejido y su patrón de expresión difiere durante el desarrollo de la planta. Se identificó catalasa en las dos variedades evaluadas, lo cual sugiere un proceso de

defensa que involucra la producción de ROS (Samaj y Thelen 2007; Morita et al, 1999; Tuzun y Somanchi, 2006).

Figura 4-11 Diagrama de barras de proteínas relacionadas con fotosíntesis en las variedades a) Fedearroz 2000 y b) Colombia I, en cada uno de los tratamientos. a- Polipéptido de 23 kDa del fotosistema II; b-Centro de reacción de la subunidad IV del fotosistema I; c-Complejo de oxígeno 1; d-ATP sintasa CF1 subunidad alfa; e-ATP sintasa CF1 subunidad beta; f-Ribulosa carboxilasa/oxigenasa activasa;g-Factor HCF 136 del fotosistema II;h-Proteína de unión a clorofila a/b tipo III PSI



Ferredoxina NADP(H) oxidoreductasa: (mancha 5402) aumentó en el insecto de la variedad Fedearroz 2000 y disminuyó a la tercera parte en el virus de la misma variedad. En la variedad Colombia I disminuyó en el insecto y virus. Esta proteína hace parte del sistema redox en el cloroplasto a nivel del fotosistema I (Higuchi et al., 2011; Wang et al., 2012) mediando la transferencia de electrones entre ferredoxina y NADP (H) en el estroma, por lo tanto, es una enzima clave que provee poder reductor utilizado en el ciclo de calvin. Otras proteínas que aceptan electrones de ferredoxina son: nitrito reductasa, sulfito reductasa, glutamato sintasa y Fd-tioredoxina reductasa (Takeuchi et al., 2011). Dicha proteína está involucrada en la reducción o control de ROS y en la regulación del estado celular redox para proteger las células de la toxicidad por ROS, tal como lo reportan Salekdeh et al (2002). También se ha ligado su delección a fijación de carbono y asimilación de nitrógeno (Vranova et al., 2002).

Manganeso superóxido dismutasa: (mancha 5102) proteína que disminuye en el virus de la variedad Fedearroz 2000 y aumenta en el insecto y virus de la variedad Colombia I. Esta proteína cataliza la ruptura de los radicales superóxido y es la primera línea de defensa en toxicidad por ROS, se ha involucrado en resistencia a estrés y longevidad, está distribuida en la célula en citoplasma, cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas (Vranová et al., 2002). Probablemente en la variedad Fedearroz 2000 se encuentra algún tipo de mecanismo que evita que se dañe la célula por lo cual no hay detección significativa de la proteína en el insecto y virus; mientras que en la variedad Colombia I, se observa aumento de la proteína una tercera parte, como respuesta antioxidante para controlar ROS.

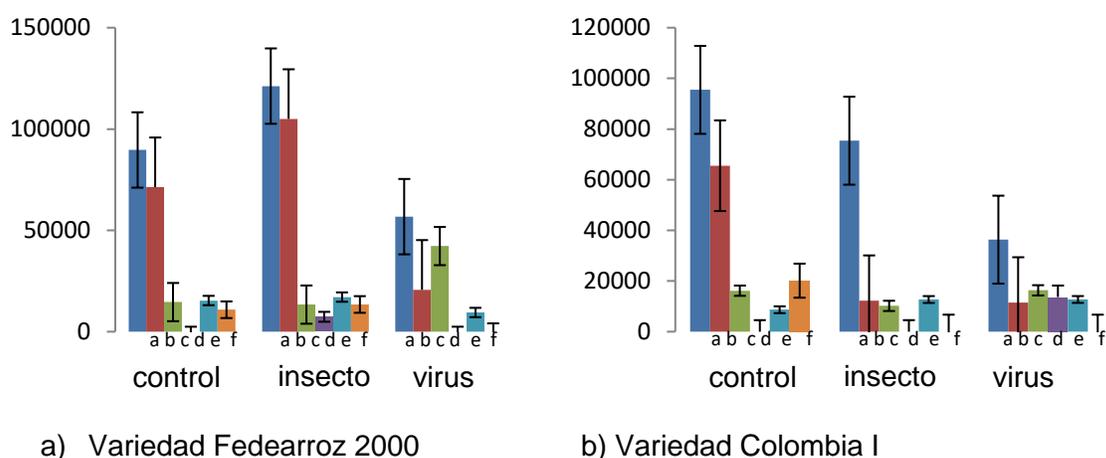
Superóxido dismutasa (Cu-Zn): (mancha 3002). Está involucrada en el proceso de oxidoreducción unido al sistema de los cloroplastos.

Peroxidasa: (mancha 6301) proteína con actividad antioxidante que no se detectó en el virus de la variedad Fedearroz 2000 ni en el insecto y virus de la variedad Colombia I, es probable existan otros mecanismos por los cuales esta proteína no se presente o puede ser que la proteína involucrada en la respuesta sea una de las isoformas reportadas. Las peroxidasas son una clase de enzimas antioxidantes codificadas por una gran familia multigen, con presencia de varias isoenzimas o isoformas. Los tejidos de las plantas usualmente contienen varias isoformas de peroxidasa que tienen diferentes valores de puntos isoeléctricos desde ácidos hasta básicos. Esta proteína se encontró en plantas tratadas con estrés salino (Guo et al., 2012); también se ha reportado relacionada con procesos en los cuales se induce la acumulación de ácido jasmónico, y en la expresión de genes POX después del tratamiento de estrés, indicando la necesidad de actividad de POX para defensa de la planta sobre el ataque por un patógeno o la exposición al medio ambiente estresado (Sasaki et al., 2004).

Las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, peroxidasa, catalasa y malonaldehído participan coordinadamente en la resistencia al virus del rayado del arroz; indicando su participación en procesos antioxidantes eficientes en la captación de ROS generados por estrés. Para el año 2010 se encontraron los genes de defensa PR1a, PAL y CHS relacionados con el vector y la presencia de enzimas del sistema antioxidante involucradas

en resistencia al daño oxidativo, (Hao et al, 2011); en el presente estudio se encontraron catalasa y peroxidasa con comportamientos similares en el tiempo a los que report Hao y colaboradores en 2011.

Figura 4-12 Diagrama de barras de las proteínas relacionadas con el sistema antioxidante en las variedades a) Fedearroz 2000 y b) Colombia I; a: Superoxido dismutasa (Zn-Cu); b: Ferredoxina-NADP(H); c: Glicolato oxidasa; d: Catalasa ; e: Superoxido dismutasa manganeso; f: Peroxidasa



Como lo sugiere Hao (2011), las diferencias entre la producción de peroxidasa en dos líneas de arroz con diferencias en resistencia al virus del rayado amarillo del arroz y su vector están relacionadas con una mejor eliminación de ROS en aquellas variedades resistentes al virus y por lo tanto un menor daño producido por agentes oxidantes

En este estudio, algunas proteínas del sistema antioxidante como catalasa y peroxidasa se encontraron distribuidas entre las dos variedades Fedearroz 2000 y Colombia I; lo cual indica un proceso de defensa que involucra la producción de ROS (Samaj y Thelen 2007; Morita et al, 1999) y que probablemente pueden actuar de manera separada (Tuzun y Somanchi, 2006).

Proteínas del Metabolismo de carbohidratos: en la figura 4-13 se observa la variación entre las proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos para las dos variedades, Fedearroz 2000 y Colombia I. La mayoría de las proteínas identificadas en este estudio

están involucradas con la producción de energía y metabolismo, indicando que el metabolismo energético en hojas de plantas de arroz se ve afectado por estrés por virus e incluso por solo la presencia del insecto (Li et al., 2009, 2010)

Fructosa bifosfato aldolasa (mancha 2402): proteína que aumentó en el insecto de Fedearroz 2000. En la variedad Colombia I disminuyó en el insecto. La enzima probablemente es una respuesta frente al desbalance de carbohidratos que se puede presentar frente al estrés biótico. Se ha reportado que las aldolasas forman homotetrámeros estromales, y las aldolasas que se encuentran fuera del cloroplasto forman dímeros (Peltier et al., 2006).

Triosa fosfato isomerasa: (mancha 3203) proteína que disminuye en el virus de la variedad Fedearroz 2000 y aumenta tres veces en la variedad Colombia I. Es una proteína relacionada con el metabolismo de carbohidratos tanto en la síntesis como en la degradación. Comparando la fructosa aldolasa y la triosa fosfato isomerasa, en la variedad Fedearroz 2000, las dos se comportan de la misma manera; en tanto que en la variedad Colombia I es diferencial.

GADPH: (EC 1.2.1.13). Es una enzima que está involucrada en el ciclo de Calvin y en la ruta de las pentosas fosfato, también está involucrada en protección contra estrés oxidativo.

Glutamina sintetasa: En hojas, la glutamina sintetasa (EC 6.3.1.2) (GS, mancha 2601) cataliza la síntesis de glutamina a partir de glutamato el cual es necesario para la biosíntesis de glutatión implicado en procesos de oxidoreducción (Lee et al., 2010), es una enzima importante en los procesos de asimilación de amonio. La enzima en Fedearroz 2000 está presente en todos los tratamientos, con un aumento casi del doble en el virus; en la variedad Colombia I se detectó en el insecto y virus, aumentando casi 4 veces. En otros estudios proteómicos (Devriese et al., 2001) se encontró que la actividad de esta enzima disminuye bajo estrés abiótico, aquí observamos un aumento en el tratamiento 3 de las dos variedades, indicando que la enzima tiene efectos importantes en los procesos de productividad por reciclaje de nitrógeno de los órganos senescentes y desarrollados

(Devriese et al., 2001). Esta proteína es vital para la asimilación de nitrógeno en los plastidios y está relacionada con glutamato sintasa y nitrito reductasa.

Adenosina bifosfato gluco pirofosfatasa: (mancha 5102) es una enzima ampliamente distribuida en plantas y animales que cataliza la ruptura hidrolítica de enlaces de pirofosfato y fosfodiéster de gran cantidad de nucleótidos. En arroz se ha encontrado que la enzima ejerce un efecto negativo en la acumulación de celulosa (Kaneco et al., 2014) lo cual se evidencia en la diferencial de crecimiento que se presenta entre las variedades evaluadas. Colombia I, por efecto del estrés se observó con un menor crecimiento en comparación con Fedearroz 2000.

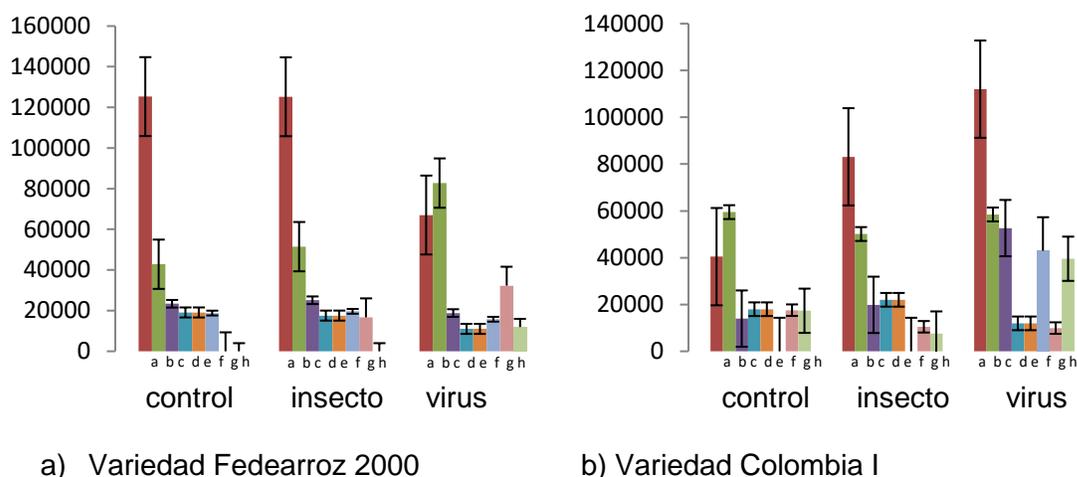
Proteína de la familia epimerasa/deshidratasa dependiente de NAD: (mancha 6504) aumenta en el tratamiento 2 de la variedad Fedearroz 2000 y disminuye en el insecto y virus de la variedad Colombia I. Es una proteína involucrada en el metabolismo de azúcares, siendo diferencial y dependiente de la variedad evaluada.

Proteína de la familia de enzimas lipolíticas: Proteína que disminuyó en las dos variedades en el virus, dentro de esta familia se encuentran enzimas que hidrolizan acilglicerol de cadena larga y esterases que son proteínas específicas para hidrolizar acilglicerol de cadena corta, para estas enzimas se ha reportado un papel importante en respuestas de estrés biótico y abiótico en plantas, incluyendo actividad de resistencia, incluso modulando la resistencia al estrés por alimentación de patógenos, su disminución en las dos variedades puede estar involucrada en la modulación del estrés tanto por insecto como por el virus. (Jiang et al., 2012).

Para las proteínas del metabolismo identificadas se observaron varias manchas que correspondían a la misma proteína, indicando que la dinámica celular genera diferentes isoformas que pueden corresponder con modificaciones postraduccionales u otros procesos dinámicos celulares.

Quitinasa: (mancha 5302) Proteína que disminuye en el insecto y virus de las dos variedades, Fedearroz 2000 y Colombia I; posee actividad hidrolasa, hidrolizando compuestos con enlace o-glicosídico. Son proteínas de defensa que protegen las plantas del ataque por enzimas hidrolíticas de los patógenos. (Wu et al., 2013).

Figura 4-13 Diagrama de barras de las proteínas relacionadas con metabolismo en las variedades a) Fedearroz 2000 y b) Colombia I. a: fructosa-bifosfato aldolasa; b: Adenosina bifosfato glucosa pirofosfatasa; c: Triosa fosfato isomerasa; d: Enzima lipolitica; e: Hidrolasa lipidica; f: GADPH; g: Epimerasa/deshidratasa dependiente de NAD; h: Pirofosfatasa inorgánica



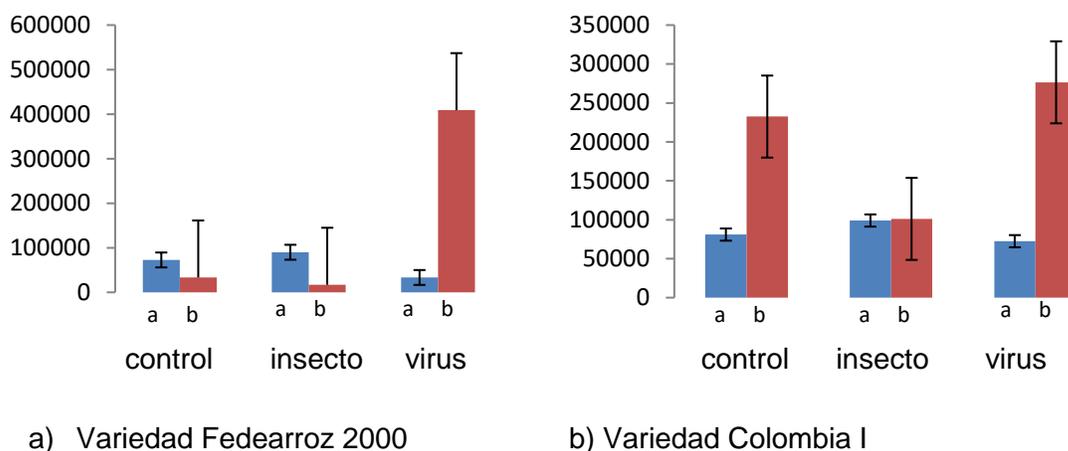
Proteínas de defensa: En la figura 4-14 se observan las proteínas identificadas en cada una de las variedades, Fedearroz 2000 y Colombia I.

Proteína similar a germina: (mancha 5102) Proteína que aumenta en el insecto de las dos variedades. La proteína "Similar to Germin-like protein 1 precursor", se identificó relacionada con patogénesis durante la respuesta de resistencia a infecciones virales y bacterianas en pimienta (Chang et al., 2004); los resultados aquí observados muestran que las dos variedades aumentan la proteína en respuesta al insecto, indicando que es una proteína importante en el proceso de defensa de la planta frente a herbivoría.

Proteína similar a NBS: (mancha 3101) en el virus de la variedad Fedearroz 2000 se observó aumento. En la variedad Colombia I disminuyó a la mitad en el insecto. Esta proteína se presenta cuando la respuesta defensiva inducible de las plantas es activada al ser infectada por patógenos, confiere resistencia frente a la enfermedad ya que es codificada por los genes R (Liu et al., 2013), igualmente contiene características típicas de

dominios de una gran familia de genes R de plantas, que incluyen el dominio de repeticiones ricas en leucina (LRR), sitios de unión a nucleótido y/o dominio de similitud a receptor de interleukina/toll (TIR) (Li et al., 2011).

Figura 4-14 Diagrama de barras de las proteínas de defensa en las variedades a) Fedearroz 2000 y b) Colombia I. a: Germina; b: proteína de resistencia NBS



Proteínas relacionadas con Biosíntesis:

Proteína gag-pol: (mancha 4501) Proteína que disminuye en el tratamiento 3 de la variedad Fedearroz 2000. También disminuye en el tratamiento 2 de la variedad Colombia I, pero aumenta en el tratamiento 3 de la misma variedad.

Como se observa, dentro de las proteínas que se encontraron en los tratamientos de las dos variedades están proteínas relacionadas con fotosíntesis, metabolismo, defensa en plantas, sistema antioxidante y algunas proteínas sin función conocida debido a que no se han reportado para arroz. La proteína NBS aumenta casi cuatro veces en el virus en la variedad Fedearroz 2000.

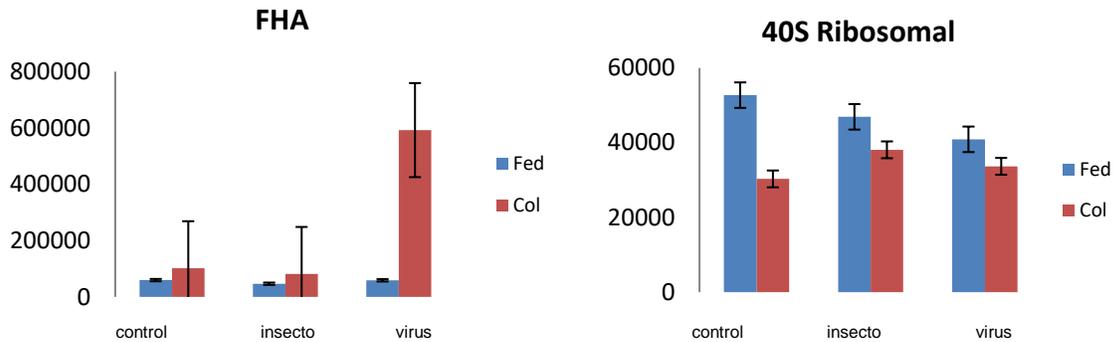
De otra parte, ya que la célula es un sistema dinámico, es posible que cada una de las proteínas identificadas tenga isoformas en los compartimentos celulares y que estas isoformas sean identificadas con diferente peso molecular y punto isoeléctrico.

Proteína S26 ribosomal 40S, (Figura 4-15) (mancha 3203) disminuye en el insecto y virus de Fedearroz 2000 mientras que aumenta en el insecto de Colombia I. No se presenta cambio significativo en los procesos de síntesis de proteínas en las dos variedades (Mizraei et al., 2003)

Peptidil-prolil cis-trans isomerasa, (mancha 8101) se detectó únicamente en el insecto de la variedad Fedearroz 2000 y en el control de la variedad Colombia I. Esta proteína está relacionada con una amplia variedad de funciones, dentro de las cuales se encuentran procesos biosintéticos de metionina, splicing de RNA, plegamiento de proteínas mediado por chaperonas, vía de las pentosas fosfato, ensamble del fotosistema II, isomerización, organización de la membrana del tilacoide, regulación negativa de respuestas de defensa, respuesta a quitina (Nigam et al., 2008). Teniendo en cuenta estos resultados es posible que una proteína con una amplia funcionalidad dentro de la célula pueda tener niveles vasales que no se detecten con el sistema de tinción empleado y que su detección se deba principalmente a un aumento de estos procesos antes mencionados, como consecuencia de un proceso de defensa frente al insecto o que su presencia en el control de la variedad Colombia I este relacionado con una alta tasa metabólica.

Proteínas de señalización celular: (Figura 4-15) (mancha 2101) FHA, es una proteína que no cambia en los tratamientos de la variedad Fedearroz 2000, sin embargo, en la variedad Colombia I aumenta drásticamente en el virus. El dominio FHA (forkhead-associated) se encuentra asociado a proteínas de diversa índole, está relacionado con interacciones proteína-proteína dependientes de fosforilación en un amplio rango de funciones, las cuales incluyen procesamiento de RNA, detenimiento del ciclo celular y reparación nuclear (Li et al., 2000, 2008, 2011).

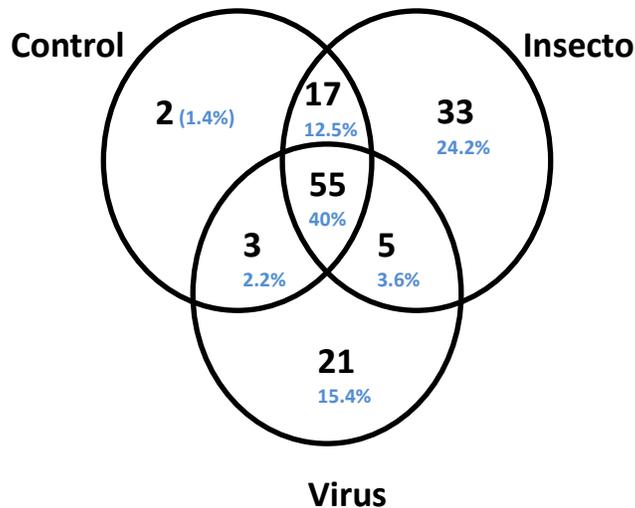
Figura 4-15 Diagrama de barras de las proteínas FHA y Proteína S26 ribosomal 40S de defensa en las variedades Fedearroz 2000 (Fed) y Colombia I (Col).



4.3.5 Identificación de proteínas que aparecen únicamente en la variedad Fedearroz 2000 sometida a los tres tratamientos

Las manchas detectados en la variedad Fedearroz 2000 se agruparon de la siguiente manera, 55 manchas en los tres tratamientos; 3 manchas en el control; 33 manchas en el insecto; 21 manchas en el virus; 17 manchas en común entre control e insecto; 5 manchas en común entre insecto y virus; y 3 manchas entre los tratamientos control y virus (Figura 4-16 y Tabla 4-6)

Figura 4-16: Distribución de manchas de la variedad Fedearroz 2000 en los diferentes tratamientos del experimento.



Se seleccionaron 22 manchas para ser identificados por espectrometría de masas, una vez identificadas, éste número se redujo a 9 proteínas (40%), las cuales se agruparon de la siguiente manera: Fotosíntesis, metabolismo y sin función conocida; las proteínas

identificadas se muestran en la tabla 4.6. De estas proteínas identificadas, se encontró en mayor proporción las proteínas relacionadas con metabolismo (33%). Estos datos sugieren que el 60% de los manchas identificados pueden corresponder a formas modificadas postraduccionalmente, a miembros de familias multigene, a procesos de degradación proteica o a productos de splicing alternativo (Pandey et al., 2009; Zhang et al., 2010, Rogowska et al., 2013).

Proteínas relacionadas con metabolismo: Figura 4-17. Transcetolasa 1: (mancha 2803) proteína que aumentó principalmente en el tratamiento con insecto; está relacionada con el ciclo de Calvin y la ruta de las pentosas fosfato. Manaa et al., (2011) detectaron un incremento en la actividad de transcetolasa bajo condiciones de estrés oxidativo y sal en plantas de maíz y en plantas de tomate. La importancia de la proteína se debe a que en la ruta de las pentosas fosfato produce NADPH necesario para diferentes sistemas recogedores de ROS.

Fosfoglicerato kinasa: (mancha 2504) se identificó únicamente en el virus. La ruta de las pentosas fosfato es una ruta para moléculas reductoras y carbohidratos con diferentes estructuras (Wang et al, 2012).

Proteínas relacionadas con biosíntesis: Figura 4-17. MUB4 (Proteína 4 de plegamiento ubiquitina de anclaje a membrana): (mancha 902) Se identificó en el control, disminuye en el insecto.

Tabla 4-7: Identificación de las manchas seleccionadas de la variedad Fedearroz 2000

^aNCBI ID: Protein identification number in the National Center for Biotechnology Information database.

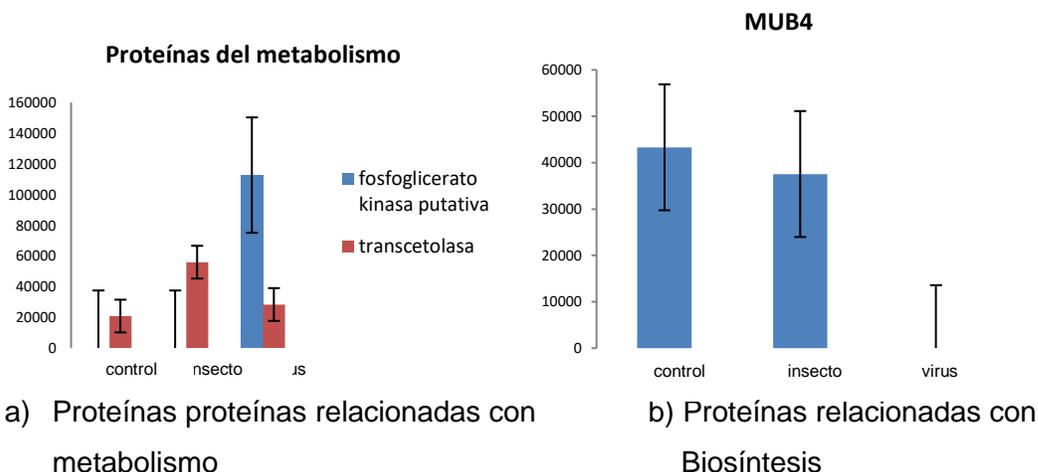
^bC.I protein score %: Puntaje probabilístico de la proteína, entre más cercano a 100%, mejor es la identificación.

^cMW. Peso Molecular (kDa)

^dIP: Punto isoelectrico. I: insecto, V: virus. ↑: aumento; ↓Disminución

PROTEINA	species	Número de acceso	CI %	PEPT COUNT	Experimental		Teórico		Tratamiento/
					PM ^d (Da)	PI ^e (pH)	PM ^d (Da)	PI ^e (pH)	
<u>Metabolismo</u>									
Transcetolasa 1	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	gi 55296168	100	17	1321840	5,37	69406,6	5,43	↑ Insecto
GADPH	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	gi 115458768	100	10	65820	6,8	43031,2	7,62	↑Insecto
Fosfoglicerato kinasa putativa	<i>Oryza sativa indica Group</i>	gi 46981258	100	11	67680	7,55	32482,4	6,9,93	↑Virus
<u>Biosíntesis</u>									
MUB4 (Proteína 4 de plegamiento ubiquitina de anclaje a membrana)	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	gi 55168239	90,848	16	154360	8	136945,7	9,27	↓Insecto Virus

Figura 4-17: Diagrama de barras de: a) Proteínas relacionadas con el metabolismo y b) Proteínas relacionadas con biosíntesis de la variedad Fededearroz 2000



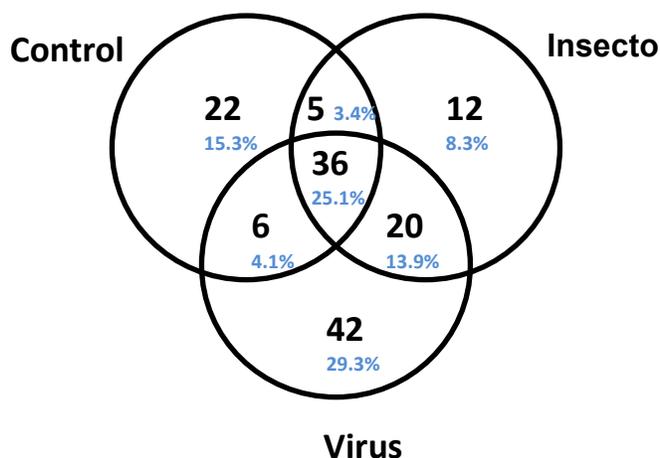
4.3.6 Identificación de proteínas que aparecen únicamente en la variedad Colombia I sometida a los tres tratamientos

Las manchas detectadas en la variedad Colombia I se agruparon de la siguiente manera; 36 manchas en común entre los tres tratamientos de la variedad; 22 manchas en el control; 12 manchas en el insecto; 42 manchas en el virus; 5 manchas entre control e insecto; 20 manchas entre insecto y virus; 6 manchas entre control y virus. En la Figura 4-18 se puede observar la distribución de las manchas diferenciales observados para los diferentes tratamientos

Se seleccionaron 78 manchas para ser identificadas por espectrometría de masas, realizada la identificación de las manchas se procedió a agrupar los resultados obtenidos de acuerdo con el nombre de la proteína, resultando en 22 proteínas organizadas de acuerdo a su función como: fotosíntesis, metabolismo, sistema antioxidante, biosíntesis y sin función conocida. Las proteínas identificadas se muestran en la Tabla 4-7

Como en Fedearroz 2000, en la variedad Colombia I se observa que el 71% de las manchas identificadas pueden corresponder a formas modificadas postraduccionalmente, a miembros de familias multigene, a procesos de degradación proteica, o a productos de splicing alternativo (Pandey et al., 2009; Zhang et al., 2010, Rogowska et al., 2013).

Figura 4-18: Distribución de manchas de la variedad Colombia I en los diferentes tratamientos del experimento.



Las proteínas identificadas que se encuentran en los tres tratamientos de la variedad Colombia I son: proteína de unión a clorofila a/b LHCII tipo I, proteína que contiene el dominio U-box, proteína de la familia hierro-azufre Rieske. En el tratamiento 1: Cadena A de alfa galactosidasa de arroz, hidroxipiruvato reductasa NADH dependiente. En el tratamiento 2: proteína L21 ribosoma 50S, sedoheptulosa-1,7-bifosfatasa. En el tratamiento 3: proteína de la familia de repetición armadillo/beta-catenina (Sharm et al., 2014), COG3321-proteínas relacionadas que modulan la policétido sintasa (ISS), proteína de resistencia a enfermedad (de la clase TIR-NBS-LRR), fructosa-bifosfatasa putativa citosólica, D-fructosa-1,6-bifosfato-1-fosfohidrolasa, proteína de la familia motor de kinesina. En los tratamientos 1 y 3: proteína de unión a zinc tapetum t-específica. En los tratamientos 2 y 3: precursor putativo de chaperonina 21, proteína similar a RNA helicasa.

Proteínas relacionadas con fotosíntesis:

La proteína de unión a clorofila a/b LHCII tipo I (mancha 2205) presentó variaciones en su intensidad, (Figura 4-19), esta proteína se ha encontrado en aumento en plantas de arroz tratadas con selenio (Wang et al., 2012). Es probable que los pigmentos acumulados puedan promover las reacciones fotoquímicas en el cloroplasto para producir más equivalentes

72 **Aproximación proteómica de la respuesta a la infección por el virus de la hoja blanca en dos variedades de *Oryza sativa* L.**

Tabla 4-8: Identificación de las manchas seleccionadas de la variedad Colombia I

^aNCBI ID: Protein identification number in the National Center for Biotechnology Information database.

^bC.I protein score %: Puntaje probabilístico de la proteína, entre más cercano a 100%, mejor es la identificación.

^cMW. Peso Molecular (kDa)

^dIP: Punto isoeléctrico I: tratamiento insecto, V: Tratamiento insecto portador del virus. ↑: aumento; ↓Disminución

PROTEINA	Especies	No. ACCESION	CI %	PEP T COUNT	Experimental		Teórico		Tratamiento
					PM ^d (Da)	PI ^e (pH)	PM ^d (Da)	PI ^e (pH)	
<u>Fotosíntesis</u>									
Proteína L21 ribosomal 50 S	<i>Zea mays</i>	gi 195649211	99,993	7	22901,4	9,34			↑ Insecto
Proteína clorofila a/b de unión a LHCII tipo I	<i>Vigna radiata</i>	gi 8954293	100	6	27,74	5	27900,1	5,29	↓ Insecto - Virus
<u>Metabolismo</u>									
Alfa galactosidasa de arroz	<i>Oryza sativa</i>	gi 33358179	100	15	66,1	6,25	40325,2	5,68	↓ Insecto - Virus
Proteína de la familia hierro-azufre Rieske	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	gi 115472727	100	6	15,72	6,42	24211,3	8,54	↓ Insecto - Virus
Fructosa-1,6-bifosfatasa	<i>Oryza sativa indica Group</i>	gi 152032435	100	14	55,99	5,82	37468	5,55	↑ Virus
Hidroxi piruvato reductasa dependiente de NADH	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	gi 115443619	100	14	66,11	6,51	42275,9	6,56	↓ Insecto - Virus
Sedoheptulosa-1,7-bifosfatasa	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	gi 115457386	100	20	60,97	5	42131,3	5,64	↑ Insecto
<u>Defensa en plantas</u>									

Proteína similar a la subunidad beta de la proteína de unión a nucleótido Guanina	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	gi 115439261	100	16	52,21	6,42	36665,1	5,97	↑ Virus
Proteína de resistencia a enfermedad (clase TIR-NBS-LRR)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 22328803	100	17	15,14	5,51	129792,8	8,56	↑Virus
<u>Biosíntesis</u>									
Proteína L1 de ribosoma 50S	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	gi 115463659	100	14	51,96	6,33	38926,9	6,86	↑ Virus
<u>Señalización y transporte intercelular</u>									
Chaperonina 21	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	gi 51090748	100	8	26,78	5	26330	7,71	↑ Insecto - Virus
Proteína de la familia armadillo/beta-catenina	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 145332008	100	8	26,38	6,52	36218,7	4,9	↑Virus
Proteína de la familia motor kinesina	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 15238979	100	13	14,88	6,67	124641,3	4,76	↑Virus
Proteína 1 anillo de zinc tapetum - específica	<i>Petunia x hybridatapetum-specific zinc finger protein 1</i>	gi 14522848	100	8	38,04	6,55	8003,8	5,09	↓Insecto
Proteína que contienen el dominio U-box	<i>Zea mays</i>	gi 226491219	100	8	28,9	5,07	44877,2	8,6	↑Insecto - Virus
COG3321: Policetido sintasa modulador y proteínas relacionadas (ISS)	<i>Ostreococcus tauri</i>	gi 118721415	100	48	14,79	5	1287903,6	8,65	↑Virus

reductores (ATP y NADPH) para fijación de carbono (Wang et al., 2012), indicando que posiblemente la planta está recuperándose del proceso de alimentación de los insectos y/o frente a la respuesta al virus, lo que equivale a que dicha proteína pudiera ser importante en el proceso de recuperación de la planta. Asada (2006) reportó que las proteínas que impiden el daño producido por ROS son importantes en el cloroplasto para proteger al aparato fotosintético.

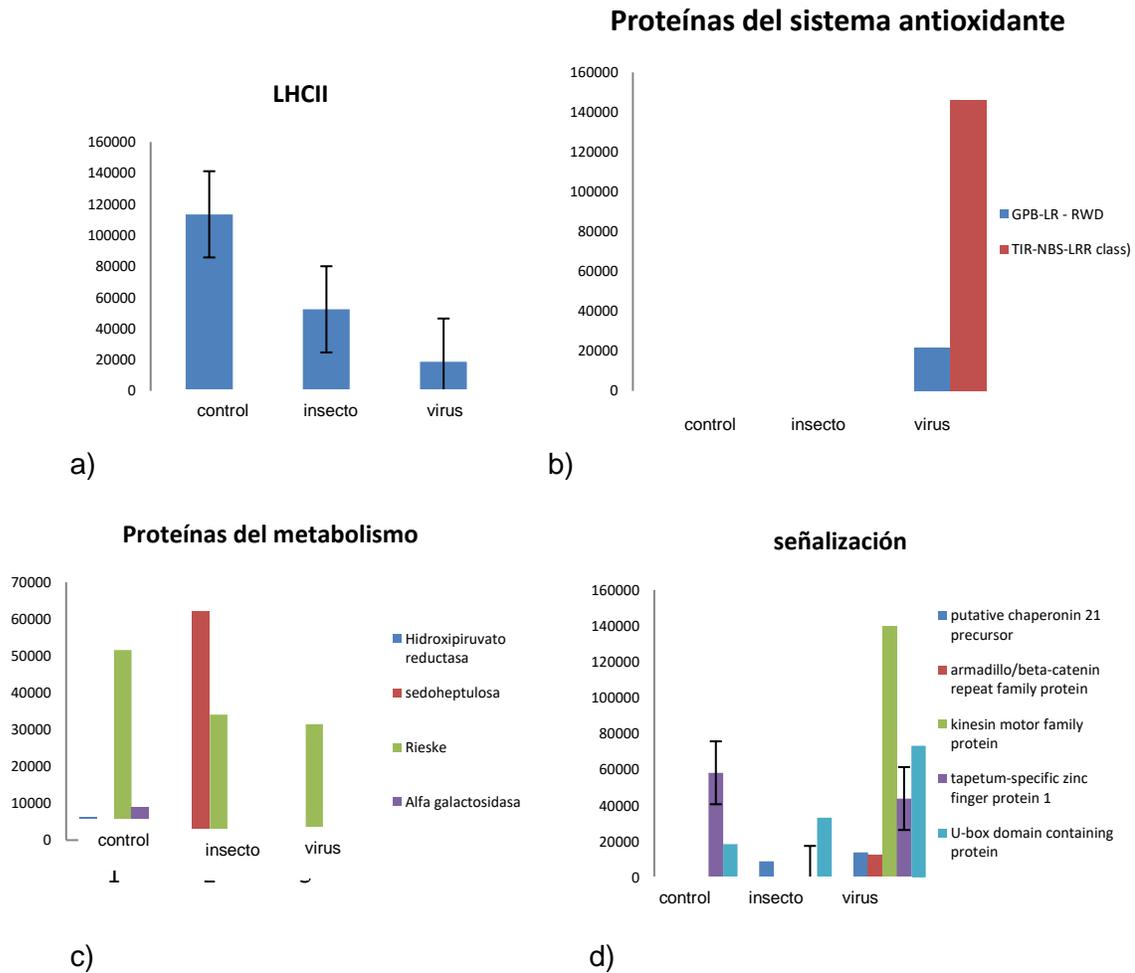
Proteínas del Metabolismo de carbohidratos:

Proteína de la familia hierro-azufre Rieske: (mancha 6102) Disminuye en el insecto y virus (Figura 4-19). Esta proteína es una de las subunidades catalíticas de la proteína citocromo c oxidoreductasa-ubiquinona, también conocida como complejo III (CIII) de la cadena de transporte de electrones; esta enzima es un homodímero que cataliza la transferencia de electrones de ubiquinona (coenzima Q) al citocromo. La disminución en esta proteína en los tratamientos puede indicar un daño en la transferencia electrónica que afecta la producción de ATP y NADPH+H y por lo tanto de la producción de azúcares.

Algunas de las proteínas encontradas en el presente estudio han sido reportadas por Brizard et al. (2006), quienes estudiaron la interacción del virus del moteado amarillo en el arroz, encontrando proteínas pertenecientes al metabolismo, glicólisis, fotosíntesis, aminoácidos, lípidos y metabolismo de pared celular; además proteínas relacionadas con síntesis de proteínas y traducción, proteínas de defensa, proteínas involucradas en ciclos que generan energía y que presumiblemente utiliza el virus para su beneficio, enzimas relacionadas con el sistema oxidoreductor de la célula compatibles con la replicación viral y proteínas relacionadas con traducción que presumiblemente también usa el virus para su beneficio.

En estrés se puede incrementar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como resultado de la fotosíntesis, respiración y NADPH oxidasas, y como producto de la ruptura de los fotosistemas (Bazargani et al., 2011), razón por la cual la mayor cantidad de subunidades de RuBisCO identificadas en el presente trabajo puede estar relacionado con el estrés generado por el virus en las plantas de la variedad Colombia I.

Figura 4-19: Diagrama de barras de: de la variedad Colombia I. a) Proteínas relacionadas con fotosíntesis y b) Proteínas relacionadas con defensa en plantas; c) proteínas del metabolismo; d) proteínas de señalización celular.



Los resultados arriba mostrados sugieren que la respuesta de la planta a RHBV está dada probablemente por varias vías de defensa, dentro de las cuales se encuentran el control de especies reactivas de oxígeno ROS por enzimas del sistema enzimático antioxidante, o la respuesta de enzimas relacionadas con el proceso fotosintético de la planta y el metabolismo de carbohidratos.

El estrés por insectos y virus causa reducción en la tasa de crecimiento probablemente debido a una inadecuada fotosíntesis en plantas. En este estudio se identificaron proteínas involucradas en fotosíntesis (Ribulosa bifosfato carboxilasa cadena pequeña, ribulosa-1,5-

bifosfato carboxilasa/oxigenasa, subunidad mayor, ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa subunidad pequeña, Rubisco activasa) y su abundancia cambió significativamente en los tratamientos 2 y 3. La RuBisCO es una enzima clave en el ciclo de Calvin y media la asimilación de dióxido de carbono catalizando la reacción de D-ribulosa-1,5-bifosfato y dióxido de carbono a dos moléculas de 3-fosfo-D-glicerato. Por otra parte, Yang et al (2012) reportaron la regulación de la RuBisCO activasa bajo condiciones de estrés. Las enzimas relacionadas con el ciclo de Calvin como la transcetolasa putativa y la sedoheptulosa-1,7-bifosfatasa se regularon bajo las mismas condiciones de estrés. Esto implica que la regulación negativa de la fijación de dióxido de carbono y las proteínas relacionadas con las reacciones fotoquímicas resultan en un decrecimiento en la asimilación de dióxido de carbono que disminuye por ende la habilidad de captura de luz en las plantas de arroz. Baja concentración intercelular de dióxido de carbono puede disminuir la actividad de las enzimas del ciclo de Calvin, lo cual puede explicar la clorosis y marchitamiento observado en las plantas de los tratamientos 2 y 3, además de disminución en su crecimiento.

El metabolismo de carbohidratos incluye la ruta de las pentosas fosfato, glicólisis y ciclo de los ácidos tricarboxílicos, ciclos que se alteran bajo las condiciones de estrés biótico aquí usadas. Para los procesos metabólicos es necesaria una gran cantidad de ATP con el fin de proveer energía para el crecimiento y desarrollo de las plantas bajo las condiciones de estrés (Wang et al., 2009). En este estudio se identificaron varias proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y con el metabolismo energético. Se observaron cambios en la triosafosfato isomerasa indicando que la ruta de las pentosas fosfato y la glucólisis cambia en relación con el estrés por el insecto y el virus y aparentemente se mantiene un largo tiempo después. El aumento en la actividad de la ruta de las pentosas fosfato genera más gliceraldehido-3-fosfato y glucosa-6-fosfato que van a la glucólisis, la cual es la ruta central para la producción de energía. Por lo tanto, el cambio en estas enzimas puede involucrar un cambio en la producción de ATP en la célula, lo cual afecta la forma como la planta puede responder a los patógenos.

Los cambios en los procesos fotosintéticos y los cambios morfológico-estructurales en la planta pueden deberse a la producción de ROS bajo condiciones de estrés, como lo indicó Barkla (2013). El sistema antioxidante es un mecanismo protector empleado para reducir

las ROS que se producen bajo condiciones de estrés biótico o abiótico (Mittler et al., 2004). El aumento de la actividad antioxidante se sugiere como el mecanismo para incrementar la capacidad de la planta para tolerar el estrés (Jithesh et al., 2006). Los resultados del análisis proteómico indicaron enzimas del sistema antioxidante que cambian bajo las condiciones de estrés biótico aquí presentado, y que su aumento o disminución está relacionado con la habilidad para remover las ROS que se producen como consecuencia del estrés oxidativo y daño celular.

Tabla 4-9: Proteínas diferenciales identificadas en las dos variedades de estudio en el tratamiento virus de las dos variedades.

	Fedearroz 2000	Colombia I
Metabolismo	Fosfoglicerato kinasa	Glutamina sintetasa
Sistema antioxidante	MUB4	
Defensa en plantas		Proteína Guanina nucleotido Proteína de resistencia (TIR-NBS-LLR)
Señalización celular		Chaperonina 21 Armadillo beta/catenina Kinesina Proteína anillo de zinc tapetum

La comparación del tratamiento virus en las dos variedades muestra proteínas relacionadas con diferentes procesos en las plantas como: metabolismo, sistema antioxidante, defensa en plantas, señalización celular (Tabla 4-8), identificándose una mayor cantidad de proteínas en la variedad Colombia I. Estos resultados pueden indicar que esta variedad puede presentar los síntomas de la enfermedad causada por el virus de la hoja blanca con mayor intensidad por un efecto tardío de la planta en la generación de proteínas de defensa y proteínas relacionadas con el metabolismo; proteínas que no se identificaron en la variedad Fedearroz 2000; para corroborar esta hipótesis es necesario realizar ensayos en el tiempo una vez que se ha realizado el ensayo de infectividad, identificando aquellas proteínas comunes y no comunes en las dos variedades.

4.4 Selección de proteínas

De acuerdo a los resultados presentados hasta el momento se seleccionaron proteínas tomando en cuenta su presencia/ausencia en variedad y tratamiento, con el fin de realizar el respectivo análisis bioinformático y el estudio de estructura 3D.

La tabla 4-10 muestra las proteínas seleccionadas teniendo en cuenta el criterio presencia/ausencia en las dos variedades de estudio, Fedearroz 2000 y Colombia I y en sus tratamientos:

4.4.1 Interactómica de proteínas

En este estudio, se generaron redes de interacciones proteína-proteína basados en funciones de proteínas conservadas entre diferentes organismos. Las interacciones proteína-proteína generan pasos en redes de señalización y redes reguladoras centrales hasta procesos biológicos fundamentales (Zhu et al., 2011).

Es posible predecir estas interacciones haciendo uso de interacciones determinadas para arroz y otras especies de las cuales se conocen las proteínas identificadas por espectrometría de masas. (Ho et al, 2012; Zhu et al., 2011; Gu et al., 2011). Los interactomas estudiados en procesos de enfermedad o presencia de virus como es el presente caso de estudio, podría revelar vías disfuncionales, su regulación y el posible papel que las proteínas acompañantes de la proteína en cuestión desempeñan en la enfermedad.

Tabla 4-10: Proteínas seleccionadas para el estudio de predicción de estructura y diseño de péptidos restringidos conformacionalmente

Proteína	Función	SECUENCIA DE LA PROTEÍNA SEGÚN PDB	Variedad / Tratamiento
FHA gi 108862123	Dominio de unión a fosfo péptidos, involucrado en vías de señalización protein kinasa similares a receptores	MSPEIALNTGQTTTILSPLIHKEIKKRTKKARHCISLPLLSSEHKSTQMEAAVATPSLLFSSP TPRRPSSCLSLPPPCSSSYASNGAKLQQPRLQFVSQLTSRNSNGSGRRSISILSLRCSSSGTDSA SSSATSERWVLEPAGDGDWRHIGYRVARPGGFQIASEAAVTVGRVPEQADIVLSVATAVSGTHARL EKKEGSLLVTDLESTNGTYINERRLSPGFPTPIDPGSLIFGDIHLAMFRVSKMVVDVPSDASGAEQ EAAETAQVSAAAQQTN	Fedearroz 2000 y Colombia I
Ferredoxina oxidoreductasa gi 41052915	Sistema Antioxidante	MATAVASQVAVSAPAGSDRGLRSSGIQGSNNISFSNKSWSVGTTLAWESKATRPRHANKVLCMSV QQASESKVAVKPLDLESANEPPLNTYKPKPYTATIVSVERIVGPKAPGETCHIVIDHGGNVPY WEGQSYGIIPPGENPKKPGAPHNVRLYSIASTRYGDSFDGRITSLCVRRAVYYPETGKEDPSKN FGVCSNFLCNSKPGDKVKVTGPGSGKIMLLPEEDPNATHIMIATGTGVAPFRGYLRRFMEDVPKY RFGGLAWLFLGVANTDSLLYDEEFTSYLKQYPDNFRYDKALSREQKNKAGKMYVQDKIEEYSDEI FKLLDGGAHYFCGLKGMPGIQDTLKKVAEQRGESWEQKLSQLKKNKQWHVEVY	Fedearroz 2000 y Colombia I
MUB4 gi 22331362	Proteínas involucradas en cascadas de	MPEEDLVELKFRLYDGSVDVGPQYSPTATVSMLKERIVSEWPKDKKIVPKSASDIKLINAGKI LENGKTVAQCKAPFDDLPKSVITMHVVVQLSPTKARPEKKIEKEEAPQRSFCSTIM	Fedearroz 2000 – Control e insecto

80 **Aproximación proteómica de la respuesta a la infección por el virus de la hoja blanca en dos variedades de *Oryza sativa* L.**

señalización en ubiquitina				
Proteína de zinc	anillo	Unión a zinc	<p>MDLLQDRESETESLPYPTQCKRYKRI INSRISDTHYNQFLSLERRRQQQQQYGKITEFPFVESE PVSSISDTSPPEDVANCLMMLSRDKWMTQENEVIDNSASYDEDVKTEDSVVVKVTTTRRGRGKYIC ETCNKVFRSYQALGGHRASHKKIKVSINETKNNGNVESEVQKDKIHECPVCYRVFSSGQALGGHKKR SHGIGVAATNVSLSTKIVSSRISGTMIDLNI PATLEDD EISQIEVSAVSDDEFVNP</p>	Colombia I - control y virus
Armadillo catenina	beta	Actividad ligasa - ubiquitina	<p>MEIQTAESNVICSIDIFESLSDSDVAKKLVESQESNEAESTTDLRSIEAGFEGVVKQMGETL QSIPESTFDEEYIGVVIQSLSNEMQNATIGDGSKSEMINNGQKISAKHTPDI VSEQMEEDLY PTDPEFSYSESYMMYSESQSQMTDIPDIPSKSTDVSRQRKHGNHSESQSLVTEPDIPSQSTNVSS QRKHGNLSKSSQSQSTEIPDIPSQSSNASSQRKYGNLSELSMLPQVTFMEPPYQAFICPLTKE IMEDPVTETGVTCEQAVIEWFDSFGNSDEINCPVTGQKLTTELSANVVLKTI IQEWKVRNEA ARIKVAHAALSLGGSSESMVIDALRDLQMTCEGKEYNKVQVREAGI IQLLDRYLTYRSKDVRFEL LKFLRTLADDEETDDGKEMIVKTIITMSCVIKLLGSSQVPRHAAQALLELSKSKQHACEKIGTARG AILMLVTAKYNRELDSEFASSETSQQILRNLEKCPENIKQMAESGLLEPLLGHLAEGSEETQVAMA AYLVEIDIGHEKKTYVAEKACPALIGLVQSENIDARRAAFKALAHISLYHPNNKILVEVGI IKI MVEEMFTKRVSFSDLMNSRNEAATILANILESGLEHETFEVNTHGHTLGSDYFVYNI IHMLKNSS PDDLNI DLIRILLSLSKSPRAMATIVSVIKETDASFAMIELINNPHEDELGVGALKLLIALTPYI GHTLSERLCKTRGQPENLIQCPVEANQITEKHAVSAKLLAKLPHQNLTNLALVNESIVSEILH AIHLIQRSGARTSRYATDFLEGLVGLVRFVTTTTLYEPQMMYLARNHDLTSVFVDLLMKTSSDEV QRLSATGLENLSSTMTLSRPPQPRSTKFMGSLMPSRFSLSRSSKKKQIEICAIHRGVCSAKNT FCLVEANAITKLLACLQSDKVEVVEALAAICTLLDDKVEVEKSLSMLSEMNAVQLI LNAVKEH KESLLQKAFWMIDKFIIRGGDKYASEISQDRMLSGLESEKILKVKRDKSHDWCAEISVERGDG GEIWGKIVWSGAVYKLDPLSHSFSVKVLHSASVHV</p>	Colombia I - Virus
Alfa galactosidasa		Hidroliza rafinosa y melobiosa	<p>MARASSSSPPSPRLLLLLLVAVAATLLPEAAALGNFTAESRGARWRSRRARRRAFENGLGRTPQ MGWNSWNHFYCGINEQI IRETADALVNTGLAKLGYQYVNI DDCAEYSRDSQGNFVFNRTFPSPG IKALADYVHAKGLKLG IYSDAGSQTC SNKMPGSLDHEEQDVKTFASWGVYDYLKYDNCNDAGR SVM ERYTRMSNAMKTYGKNIFFSLCEWGKENPATWAGRMGNSWRTTGDIADNWSMSTRADENDQWAA YAGPGGWNDPDMLEVGNGGMSAEYRSHFSIWALAKAPLLIGCDVRSMSQQTKNILSNSEVI AVN QDSLGVQGGKQVSDNGLEVWAGPLSNNRKAVVLWNRQSYQATITAHWSNIGLAGSVAVTARDLWA HSSFAAQGQISASVAPHDKMYVLT PN</p>	Colombia I - control

Hasta ahora no se han reportado procesos de interactómica en las variedades Fedearroz 2000 y Colombia I, expuestas y no expuestas al virus de la hoja blanca. Tratar de identificar aquellas interacciones o aquellas proteínas que se encuentran relacionadas con diversos procesos metabólicos en las plantas es esencial para identificar los puntos importantes dentro del proceso de respuesta y recuperación de la misma.

Dentro de las proteínas identificadas por espectrometría de masas se encontraron proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, con el proceso fotosintético, con biosíntesis, con el estrés oxidativo y con defensa.

La herramienta de la web STRING (Herramienta para la recuperación de genes/proteínas que interactúan), ha sido utilizada para analizar las proteínas diferenciales encontradas en los tratamientos de las dos variedades estudiadas, al igual que se ha utilizado la herramienta plant Reactome para identificar las rutas metabólicas en las cuales se encuentran ubicadas estas proteínas. Como puede verse en la figura 4.20 (con la proteína que contiene dominio de unión a FHA, seleccionada por análisis proteómico) el algoritmo de STRING propone varias interacciones entre proteínas. Es alto el número de líneas coloreadas que conectan dos proteínas. El grosor con el que se representan estas líneas sugieren evidencia de su interacción.

Se observa que la proteína que contiene dominio de unión a FHA, presenta algunas conexiones que se integran con algunas proteínas como la proteína de la familia Sir2, el punto de chequeo mitótico, la helicasa, la proteína de unión a zinc, la protein kinasas I de la familia calcio/calmodulina y la proteína de la familia fosfatasa. Son proteínas relacionadas con procesos de metabolismo celular en los cuales la planta está relacionando sus procesos de división y puntos de control, que están involucrados en el crecimiento de la planta y su desarrollo (Li et al., 2000). Figura 4-20. Para el presente trabajo encontrar proteínas que están relacionadas con crecimiento y desarrollo implica que los procesos de división celular y de crecimiento no se han visto alterados a la luz de la infección.

Para las demás proteínas seleccionadas (Tabla 4-10) se realizó el mismo proceso de interactómica, el cual se encuentra en el anexo A2.

La lista final del total de proteínas obtenidas de los datos proteómicos fue de 147 proteínas. Posteriormente, la lista de proteínas fue introducida a STRING. En unas pocas proteínas

STRING no encontró interacciones de alta confiabilidad, por lo tanto se eliminaron. Lo que es un indicativo que falta aún por determinar interacciones proteicas o que las proteínas aún no han sido reportadas en las bases de datos, su secuencia no se encuentra y por lo tanto crear una red no es posible.

4.4.2 Predicción de estructura 3D

De las proteínas seleccionadas se tomó como modelo de análisis la proteína FHA para mostrar el procedimiento realizado.

Se utilizó el software I-TASSER para obtener las estructuras 3D de cada una de las proteínas seleccionadas y establecer los fragmentos para ser sintetizados

Las variedades Fedearroz 2000 y Colombia I, cultivares con diferente respuesta frente al virus de la hoja blanca RHBV, presentaron la proteína FHA en los tres tratamientos del ensayo. Para el análisis estructural, el servidor I-TASSER (Zhang 2008) presentó la predicción de estructura secundaria que se muestra en la Figura 4-21.

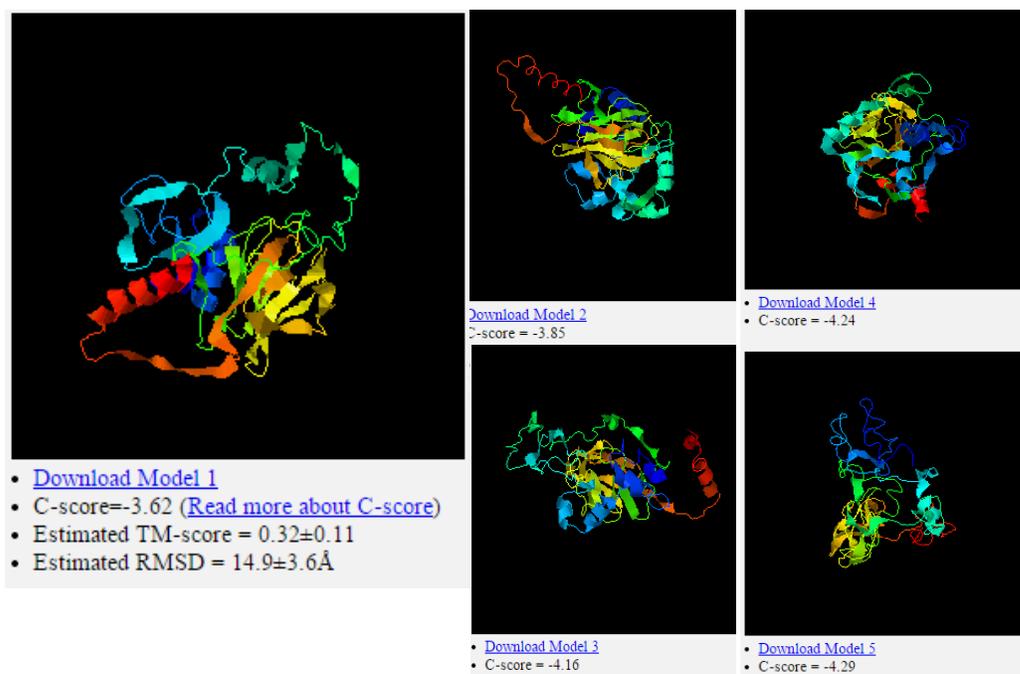
Realizados los ensayos 2DE y una vez identificadas las proteínas comunes y no comunes a los tratamientos, se seleccionaron algunas que permitan caracterizar los diferentes tratamientos. Las proteínas seleccionadas se encuentran en la Tabla 4-8, junto con su secuencia y la variedad y el tratamiento en el que fueron identificadas

La predicción de la estructura terciaria de la proteína FHA, usando el servidor I-TASSER, proporcionó 5 posibles modelos (Figura 4-22) con los siguientes valores de "C-score": de -3.62 (modelo 1), -3.85 (modelo 2), -4.16 (modelo 3), -4.24 (modelo 4) y -4.29 (modelo 5). El valor "C-score" es un valor de confianza para estimar la calidad del modelo predicho por I-TASSER, y es calculado con base en la tendencia de alineamiento con plantillas de otras proteínas y la cercanía con parámetros estructurales en las simulaciones de ensamblaje. El valor de "C-score" está en un rango entre -5 y 2, en donde el mayor valor significa que el modelo presenta un mayor margen de confianza (Ambbrish et al, 2012).

Figura 4-20: Interactoma generado para la proteína FHA (proteína seleccionada en el análisis proteómico). Diagrama generado utilizando el software STRING libre en la web.

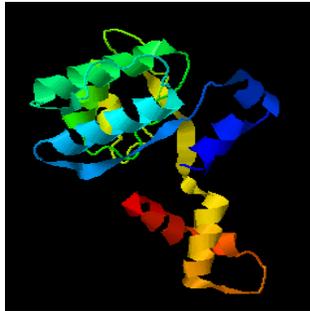
“RMSD” con un valor de $14.9 \pm 3.6 \text{ \AA}$. El “TM-score” y el “RMSD” son medidas de la similitud estructural entre dos estructuras, las cuales son usadas como referencia para medir el modelo con una estructura nativa conocida. Tomando como base el “C-score” se seleccionó el modelo 1, el cual presentaba el mayor valor de confianza en la predicción (Ambbrish et al, 2012).

Figura 4-22: Modelos de predicción de la estructura terciaria de la proteína FHA usando el servidor I-TASSER.

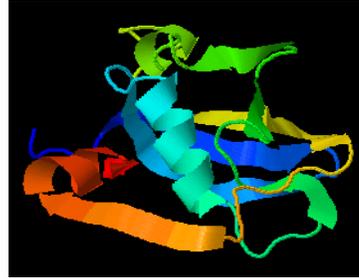


De la misma manera se procedió con las otras proteínas escogidas, procedentes de los tres tratamientos para las dos variedades Colombia I y Fedearroz 2000. Las estructuras seleccionadas para las otras proteínas se muestran en las Figuras 4-23 a Figura 4-24.

Figura 4-23: Modelo de predicción de la estructura terciaria de la proteína Ferredoxina y MUB4 usando I-TASSER

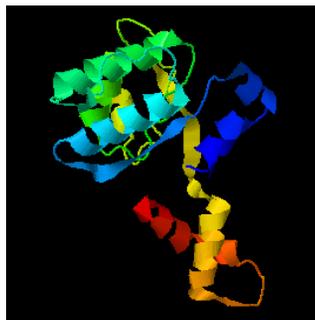


a) Ferredoxina

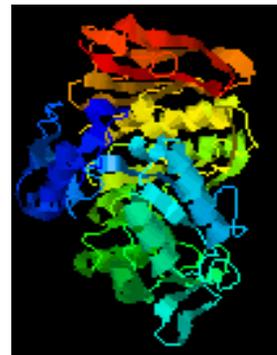


b) MUB4

Figura 4-24: Modelo de predicción de la estructura terciaria de las proteínas anillo de zinc tapetum y alfa galactosidasa utilizando el servidor I-TASSER



(a) Proteína Anillo de Zinc Tapetum

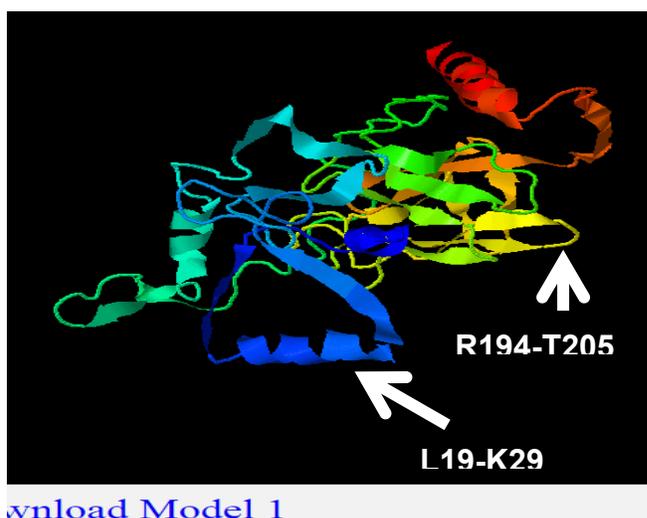


b) Alfa galactosidasa

A partir de las estructuras tridimensionales de las proteínas, se analizó en conjunto cada una de las proteínas para escoger los fragmentos para el diseño de los péptidos. Estas secuencias se seleccionaron teniendo en cuenta los siguientes puntos: a) Exposición de la secuencia, es decir, que esté en la superficie. b) Que sea una estructura bien definida: hélice, vuelta β , loop u hoja β . C) Que contenga una secuencia no hidrofóbica

Para la proteína FHA se seleccionaron dos subestructuras, una α -hélice comprendida entre los residuos de aminoácido Leu-19 y Lys-29 (LIHKEIKKRTK), y una “loop” comprendida entre los residuos Arg-194 y Thr-205 (RLEKKEGSLLVT), como se muestra en la Figura 4-26.

Figura 4-25: Identificación de subestructuras en la proteína FHA que se predijo en el servidor I-TASSER, las secuencias fueron utilizadas para el diseño de péptidos.



Siguiendo el mismo procedimiento, se seleccionaron subestructuras de las otras proteínas, como se muestra en la Tabla 4-11.

4.4.3 Diseño y síntesis de los péptidos.

Los péptidos lineales, es decir, los sintetizados por el acople de un aminoácido tras otro hasta completar una secuencia imitan en gran medida muy mal los fragmentos estructurados de las proteínas de donde provienen. Por ello, en este trabajo se ha utilizado un nuevo procedimiento para tratar de imitar las subestructuras seleccionadas en cada una de las proteínas. Para una secuencia con tendencia conformacional a hélice, se introdujo el sitio de nucleación JAZ al final de la secuencia, y para ciclar en forma de “loop” una

secuencia se colocó al inicio de la secuencia el ligando Z, y al finalizar el ligando J (En proceso de patente). (Tabla 4-12)

Tabla 4-11: Secuencias de péptidos identificadas en las proteínas de arroz seleccionadas

PROTEÍNA	POSICIÓN DE AMINOÁCIDOS	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
FHA	19-29 194-205	LIHKEIKKRTK RLEKKEGSLLV
Ferredoxina NAD oxidoreductasa	32-41	EDILRSMIKE
MUB 4	101-109	EKKIEKEEA
Anillo de zinc tapetum	190-198	QALGGHKRS
Alfa galactosidasa	195-205	MERYTRMSNAM

Se trató de hacer el péptido corto y en la forma de doble dímero, en el cual, los aminoácidos iniciales “-GC” era reemplazada por la “-KGC”, con el fin de sintetizar en cada brazo de la lisina (Lys, K) una secuencia completa, tal como se muestra en la Figura 4-27

Figura 4-26: Modelo seguido para la síntesis del doble dímero

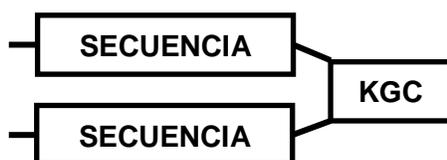


Tabla 4-12: Péptidos diseñados y sintetizados a partir de las estructuras obtenidas por predicción en el programa I-TASSER

PROTEÍNA	POSICIÓN	SECUENCIA	CONFORMACIÓN
FHA	19 – 29	JAZ-LIHKEIKKRTK-GC	Hélice
	19-25	LIHKEIKKRTK-GC	Lineal
	195-204	J-LEKKEGSLLV-Z-GC	Loop
	196-205	J-EKKEGSLLVT-Z-GC	Loop
	194-203	J-RLEKKEGSLL-Z-GC	Loop
Ferrodoxina NAD oxidoreductasa	32-41	JAZ-EDILRSMIKE-GC	Hélice
	32-41	EDILRSMIKE-GC	Lineal
MUB4	101-109	EKKIEKEEA-GC	Lineal
Anillo de zinc tapetum	190-198	JAZ-QALGGHKRS-GC	Hélice
	190-198	QALGGHKRS-GC	Lineal
Galactosidasa	195-205	JAZ-MERYTRMSNAM-GC	Hélice
	195-205	MERYTRMSNAM-GC	Lineal

Una vez sintetizado cada uno de los péptidos se procedió a corroborar el peso molecular utilizando un espectrómetro de masas; los pesos teóricos y los calculados se muestran en la Tabla 4-13.

Una vez confirmado el PM de las construcciones en doble dímero de las secuencias sintetizadas, se procedió a colocar el sitio de nucleación “-JAZ” a cada uno de los péptidos, para continuar con los ensayos de dicroísmo circular y confirmar su tendencia conformacional.

Dicroísmo Circular. Los espectros encontrados indican que todos los diseños con tendencia conformacional a α -hélice muestran dicha tendencia, caracterizada por un

máximo intenso a 191 nm y dos picos a 208 nm y 222 nm, tal como se puede observar en los espectros correspondientes a los péptidos 2052, 2053, 2054 y 2055 (Figura 4-28).

Tabla 4-13: Pesos moleculares de los dobles dímeros (DDC) sintetizados, sin JAZ.

PROTEÍNA	PÉPTIDO	SECUENCIA	PM Calc.	PM Exp.
FHA	2052	(LIHKEIKKRTK) ₂ -KGC	3057.84	3057.82
Ferredoxina NAD oxidoreductasa	2054	(EDILRSMIKE) ₂ -KGC	2737.22	2736.51
MUB4	2079	(EKKIEKEEA) ₂ -KGC	2478.78	2476.29
Anillo de zinc tapetum	2055	(QALGGHKRS) ₂ -KGC	2176.42	2176.17
Galactosidasa	2053	(MERYTRMSNAM) ₂ -KGC	3049.70	3011.28

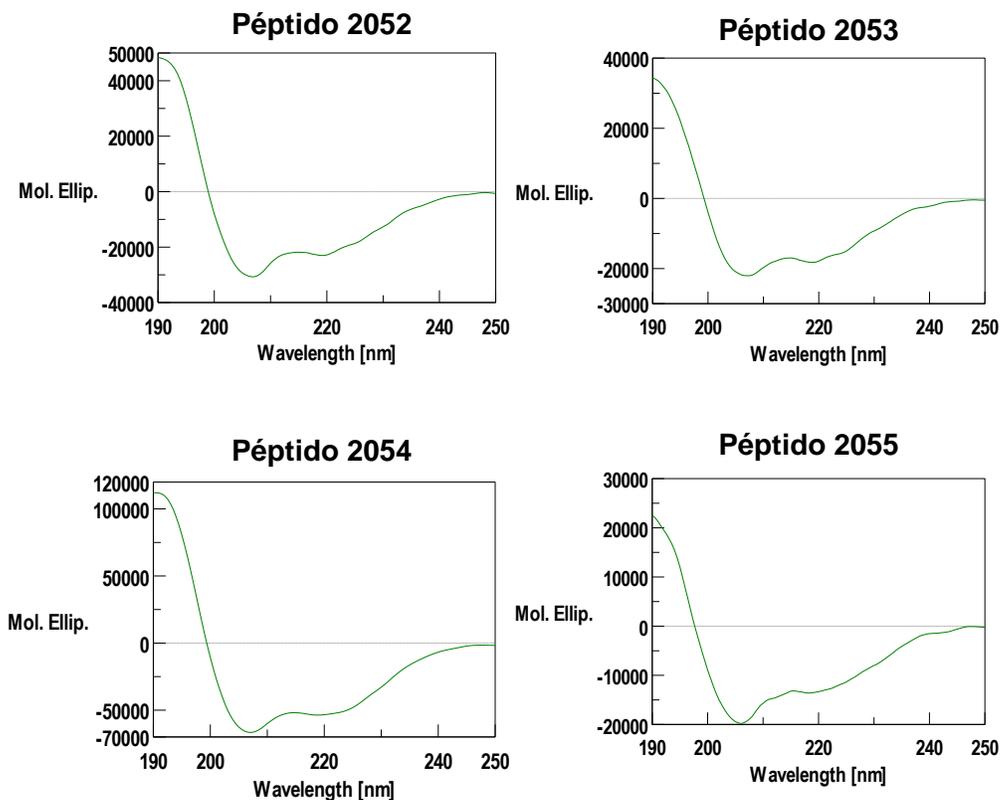
Podemos afirmar, a partir de los valores de masas (ver anexo de caracterización de los péptidos) y de los espectros de Dicroísmo Circular, que la nueva estrategia de usar el sitio de nucleación JAZ- es útil en la síntesis de péptidos con restricción conformacional a α -hélice. Este sitio de nucleación tiene como ventajas su bajo costo con respecto a su antecesor, JLAZ-, propuesto por el grupo de Satterthwait (Calvo et al., 2003).

4.4.4 Validación de los péptidos en ensayos ELISA

Una de las preguntas con respecto a los péptidos sintetizados es si es capaz o no de generar una respuesta inmune, es decir, si es inmunogénico. Un antígeno es aquella sustancia que es reconocida por las moléculas o las células del sistema inmune. Un inmunógeno es aquella sustancia capaz de desarrollar una respuesta por parte del sistema inmune. Todo inmunógeno es antígeno, mas no todo antígeno es inmunógeno (Calvo & Satterwaith, 2005). A partir de estas premisas, se quería saber si los péptidos sintetizados son o no inmunógenos.

Los péptidos diseñados a partir de las proteínas fueron inoculados en ratones, se esperaba que pudieran generar anticuerpos que reconocieran la secuencia lineal (Tabla 4-11) y la secuencia con restricción conformacional (Tabla 4-12) que imita un fragmento de la proteína. Los sueros se confrontaron contra sus respectivos péptidos para observar

Figura 4-27: Espectros de Dicroísmo Circular de los péptidos con restricción conformacional a α -hélice. Ver tabla 4.11 para información de los respectivos péptidos.



si podían reconocer el antígeno inoculado. En la Tabla 4-14 se presentan los resultados obtenidos de la inmunización con péptidos de la proteína FHA.

Los títulos de anticuerpos hallados para los péptidos lineales (sin el sitio de nucleación JAZ-) y con restricción conformacional α hélice (con el sitio de nucleación JAZ-), en la presentación de doble dímero, presentaron títulos de anticuerpos muy altos (Calvo et al., 2003), indicando que eran inmunogénicos al inocularlos en ratones y su alta reacción

antígeno-anticuerpo indicaron una alta afinidad. Una vez realizadas las inoculaciones de todos los péptidos, el paso final y definitivo en un trabajo posterior será el de tratar de reconocer las proteínas en un extracto de hojas de arroz con los sueros antipéptido; si esto se logra comprobar, se habrá dado un gran paso para el diseño de un nuevo camino para la detección en campo de las proteínas de arroz.

Tabla 4-14: Resultados de la inmunización con péptidos de la proteína FHA. DDC: Double Dimer Construct.

# PÉPTIDO	# RATÓN	TÍTULO DE ANTICUERPOS
2052 Hélice DDC	53	> 25600
	54	> 25600
	55	> 25600
2078 Lineal DDC	56	1:25600
	57	> 25600
	58	1:25600

Los péptidos y los sueros fueron confrontados en un ensayo ELISA para determinar si había reacción cruzada, es decir si había reconocimiento de los péptidos en extractos de plantas de arroz a los cuales se habían realizado los tratamientos de este estudio. Los resultados se muestran en la tabla 4-15.

Tabla 4-15: Ensayo de identificación de proteínas en extractos de hojas de plantas de arroz usando sueros de ratones anti-péptido con restricción conformacional

Variedad	Tratamiento	Suero 2053 (Galactosidasa)	Suero 2054 Ferredoxina	Suero 2055 Tapetum
Fedearroz 2000	Control	+		
	Insecto	+	+	
	Virus			
Colombia I	Control	+	+	+
	Insecto			
	Virus			+

5. Principales hallazgos de este estudio

5.1 Conclusiones

1. La ocurrencia de RHBV resultó en aumento y/o disminución de proteínas en hojas de arroz. Los cambios en los perfiles proteicos de hojas de las variedades Colombia I y Fedearroz 2000, indicaron que bajo las condiciones de estrés generadas en el presente estudio se obtuvo un mayor número de manchas correspondientes a proteínas en la variedad Colombia I que en la variedad Fedearroz 2000. Estos cambios en la cantidad de manchas posiblemente están relacionados con los procesos de antixenosis que se han postulado para la variedad Fedearroz 2000 por lo cual se indujeron un menor número de proteínas en respuesta al virus y en respuesta al insecto portador del virus.
2. Los perfiles proteicos de hojas muestran, bajo las condiciones de estrés generadas en el presente estudio, 136 manchas características para la variedad Fedearroz 2000, 143 para la variedad Colombia I y 96 comunes a las dos variedades. De 219 manchas analizadas por espectrometría de masas, se identificaron 77 proteínas cuya función está relacionada con biosíntesis, fotosíntesis, metabolismo, sistema antioxidante y/o defensa vegetal
3. Se seleccionaron 6 proteínas y se obtuvo la predicción de su estructura tridimensional por medio del servidor I-TASSER. Para cada una de estas se escogieron fragmentos para diseñar mimos conformacionales.
4. La estrategia sintética de introducir el sitio de nucleación JAZ al final de las secuencias seleccionadas de cada proteína produjo péptidos con tendencia conformacional a alfa hélice, confirmadas por dicroísmo circular.
5. Los péptidos con y sin restricción conformacional inoculados en ratones BalbC, generaron anticuerpos que reaccionaron con altos títulos con sus respectivos antígenos y reconocieron proteínas en los extractos de hojas de los diferentes tratamientos.

5.2 Recomendaciones

- Para proteínas diferenciales sintetizar los DDC, generar los antisueros correspondientes y generar un posible kit de reconocimiento.
- Utilizar esta metodología para el reconocimiento de estas proteínas en ensayos en campo
- Complementar este trabajo con estudios en fisiología vegetal e inmunohistoquímica
- Realizar el mismo ensayo una vez que se han retirado los insectos de las variedades de arroz y comparar con los resultados de este estudio con el fin de poder identificar aquellas proteínas que son importantes a nivel de defensa en la variedad Colombia I y Fedearroz 2000 y las rutas emtabólicas involucradas.

A. Anexo: Tabla de manchas identificadas con la secuencia de péptidos que se utilizó para el BLAST y el nombre

Rango	Protein score	Cl %	PROTEINA	especie	masa	PI	Accesión	PEPT COUNT	TOTAL ION SCORE	TOTAL ION C.I%	SECUENCIA DE PEPTIDOS ENCONTRADOS
2	895	100	ATP synthase CF1 beta subunit	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	54037.2	5,47	gi 11466794	20	707	100	Peptide IGLFGGAGVGK LSIFETGIK SAPAFIELDTK VVDLLAPYRR VVDLLAPYRR AHGGVSVFGGVGER AHGGVSVFGGVGER IVGNEHYETAQR IVGNEHYETAQR FVOAGSEVSALLGR FVOAGSEVSALLGR VGLTALTMAEYFR VGLTALTMAEYFR VGLTALTMAEYFR + Oxidation (M) VGLTALTMAEYFR + Oxidation (M) VALVYGMNEPPGAR VALVYGMNEPPGAR + Oxidation (M) VALVYGMNEPPGAR + Oxidation (M) TNPTTSRPGVSTIEEK MRVGLTALTMAEYFR + Oxidation (M) MRVGLTALTMAEYFR + 2 Oxidation (M) QINVTCEVQQLGNNR DVNKQDVLFLDNIFR GIYPAVDPLDSTSTMLOPR GIYPAVDPLDSTSTMLOPR + Oxidation (M) GIYPAVDPLDSTSTMLOPR + Oxidation (M) GMEVIDTGAPLSVPVGGATLGR GMEVIDTGAPLSVPVGGATLGR GMEVIDTGAPLSVPVGGATLGR + Oxidation (M) TNPTTSRPGVSTIEEKSTGR MPSAVGYQPTLSTEMGSLQER MPSAVGYQPTLSTEMGSLQER + Oxidation (M) NLEESKVALVYGMNEPPGAR MPSAVGYQPTLSTEMGSLQER + 2 Oxidation (M) MPSAVGYQPTLSTEMGSLQER + 2 Oxidation (M) NLEESKVALVYGMNEPPGAR + Oxidation (M)

										DTDGKQINVTCEVQQLGNRR DTDGKQINVTCEVQQLGNRR IFNVLGEPVDNLGPVDTSATFPIHR IFNVLGEPVDNLGPVDTSATFPIHR
										Peptide IPTAYIK ALRLEDLR ALRLEDLR DTDILAAFR DTDILAAFR LTYYTPEYETK LTYYTPEYETK LEDLRIPYAIK LEDLRIPYAIK TFQGPPIHGIQVER TFQGPPIHGIQVER YGRPLLGCITIKP YGRPLLGCITIKP DRFLFCAEAIYK TFQGPPIHGIQVERDK TFQGPPIHGIQVERDK EYKLTYYTPEYETK LTYYTPEYETKDTDILAAFR LTYYTPEYETKDTDILAAFR VTPOPGVPPEEAGAAVAESSTGTWTTWTDGLSLDR
1	234	100	auxin-binding protein ABP20 precursor	<i>Zea mays</i>	20552,7	6,01	gij195616892	3	218	100
										Peptide FSTVIHER VFAYADTQR VFAYADTQR SHVQEWYR SHVQEWYR SPGAQTPVIVR SWAPDRQER ATIHKQNDFK ATIHKQNDFK FPDVIHAFKPNPR GPILLEDYHLIEK GPILLEDYHLIEK LGPNYMLPVPNAPK + Oxidation (M) HAPPTPITPRPVVGR HAPPTPITPRPVVGR HMDGFGVNTYTFVTR + Oxidation (M) DGIKFPDVIHAFKPNPR DGIKFPDVIHAFKPNPR TTTTNAAPWINDNEALTVGPR GFEETHDVTDTICADFLR NHSHATODLYDSIAAGNFPPEWK VSPELRAIWNVYLSQCDESLGVK VSPELRAIWNVYLSQCDESLGVK
1	286	100	catalase	<i>Oryza sativa</i>	57057,3	6,75	gij20192	16	170	100

1	601	100	chloroplast 23 kDa polypeptide of photosystem II	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	20074,1	5,56	gij164375543	13	461	100	Peptide WNPFSKER EFPQGVLR EFPQGVLR QYYSVTLTR QYYSVTLTR YGEAANVFGKPK LLIPSKWNP SK LLIPSKWNP SK KFVESAASSFSVA TNTEFIAYSGEGFK TNTEFIAYSGEGFK HQLITATVNDGKLYICK TADGDEGKHLITATVNDGK TADGDEGKHLITATVNDGK YEDNFDANSNVSVIINPTTK YEDNFDANSNVSVIINPTTK YEDNFDANSNVSVIINPTTK TDSEGGFESDAVATANILESSAPVVGK TDSEGGFESDAVATANILESSAPVVGK QAYSGKTDSEGGFESDAVATANILESSAPVVGK
1	215	100	fructose 1,6-bisphosphate aldolase, chloroplast precursor putative expressed	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	41808,3	6,07	gij108864048	10	152	100	Peptide ANSLAQLGK ANSLAQLGK AAQDALLR TWGGQPENVK YTSDGEAAEAK EAAYYQGAR EAAYYQGAR KIVDILTEQK ATPSEQVSDYTLK LASIGLENTEANR LASIGLENTEANR TVVSIFNGPSELAVK TVVSIFNGPSELAVK RLASIGLENTEANR
1	43	0	hypothetical protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	16045,4	9,41	gij62321098	3			Peptide QGQLGQGR DIAKEFIDR EMYVLPVCEKLDPNGYIR + Oxidation (M) EMYVLPVCEKLDPNGYIR + Oxidation (M)
1	474	100	hypothetical protein Osl_02088	<i>Oryza sativa indica Group</i>	35097,8	6,1	gij218188287	13	366	100	Peptide NAPPEFQK VPFLFTIK VPFLFTIK RLTFDEIQSK RLTFDEIQSK FCLEPTSFTVK FCLEPTSFTVK FCLEPTSFTVK KFCLEPTSFTVK GGSTGYDNAVALPAGGR DGIDYAAVTVOLPGGER DGIDYAAVTVOLPGGER FCLEPTSFTVKAEGVAK GTGTANQCPTVEGGVDSFAFK GTGTANQCPTVEGGVDSFAFK NLVATGKPESFGGPFVPSYR NLVATGKPESFGGPFVPSYR NLVATGKPESFGGPFVPSYR FEEKDGIDYAAVTVOLPGGER SKPETGEVIGVFESVQPSDTDLGAK SKPETGEVIGVFESVQPSDTDLGAK SKPETGEVIGVFESVQPSDTDLGAKVPK

1	356	100	hypothetical protein OsI_025804	<i>Oryza sativa</i> <i>indica Group</i>	15440	9,64	gij125558131	8	273	100	Peptide EPAAAKPPPIGPK EPAAAKPPPIGPK EPAAAKPPPIGPKR EPAAAKPPPIGPKR VNYAGVSTNNYALDEIQEVK VNYAGVSTNNYALDEIQEVK ESYWYNGTGSVTVDDPNTR ESYWYNGTGSVTVDDPNTR RESYWYNGTGSVTVDDPNTR FAKVNYAGVSTNNYALDEIQEVK AEEEEAAPPPPPAAEKEPAEAEAAVATK ESYWYNGTGSVTVDDPNTRYPVVVR ESYWYNGTGSVTVDDPNTRYPVVVR Peptide EPAAAKPPPIGPK EPAAAKPPPIGPK EPAAAKPPPIGPKR EPAAAKPPPIGPKR VNYAGVSTNNYALDEIQEVK VNYAGVSTNNYALDEIQEVK ESYWYNGTGSVTVDDPNTR ESYWYNGTGSVTVDDPNTR RESYWYNGTGSVTVDDPNTR FAKVNYAGVSTNNYALDEIQEVK ESYWYNGTGSVTVDDPNTRYPVVVR ESYWYNGTGSVTVDDPNTRYPVVVR
1	661	100	hypothetical protein OsI_032171	<i>Oryza sativa</i> <i>japonica Group</i>	32790,9	6,96	gij125564498	22	424	100	Peptide TFDVCFK FVGGNWK FVGGNWK AAYALSQNVK TNVSPEVASGIR TNVSPEVASGIR EAGKTFDVCFK TFDVCFKQMK + Oxidation (M) IEVSAQNWWIGK HVIGEDDQFIGK VIACIGELLEER VIACIGELLEER EDIDGFLVGGASLK GPDFATIINSVTSK HVIGEDDQFIGK HVIGEDDQFIGK RHVIGEDDQFIGK KEDIDGFLVGGASLK VATPEQAEVHA AVR VATPEQAEVHA AVR VATPEQAEVHA AVR IYGGSVNAANCAELAK VIACIGELLEEREAGK VIACIGELLEEREAGK NSLTDRIEVSQNWIGK NSLTDRIEVSQNWIGK VATPEQAEVHA AVRDLK VATPEQAEVHA AVRDLK GGAYTGEISAEQLVDIGCQWVILGHSER LVTELNAATLEPDVDDVAPPFIYIDQVK GGAYTGEISAEQLVDIGCQWVILGHSERR

1	300	100	hypothetical protein Osl_19472	<i>Oryza sativa</i> <i>indica</i> Group	25038,9	6,75	gij218196558	12	187	100	Peptide ALEQLDAAVAK HHATYVANYNK HHATYVANYNK GDAPAIHLQSAIK GDAPAIHLQSAIK TLA AAAARPLAAAAAAR TLA AAAARPLAAAAAAR NVRPDYLSNIWK NVRPDYLSNIWK LSVETTANQDPLVTK KLSVETTANQDPLVTK LGWAIDEDFGSFEALVK LHHQKHHATYVANYNK KMSAEGAALQSGVWVWLADK + Oxidation (M) ALEQLDAAVAKGDAPAIHLQSAIK FNGGGVNHHSIFWNNLKPISGGGEPHAK FNGGGVNHHSIFWNNLKPISGGGEPHAK
1	674	100	hypothetical protein Osl_22738	<i>Oryza sativa</i> <i>japonica</i> Group	173243	7,1	gij222636266	24	531	100	Peptide IQNMGWR IQNMGWR + Oxidation (M) NGGNTWFPR NGGNTWFPR RIQNMGWR RIQNMGWR + Oxidation (M) RIQNMGWR + Oxidation (M) FGFILDVGYR FGFILDVGYR ADGGLWLLVR GYVLGNDGVLLR AADNIAANLYSVK AAVQETVSATLNR SIPSAEDEDFNRYR SIPSAEDEDFNRYR SKDEAWAAGGSGVLLK SKDEAWAAGGSGVLLK DKAADNIAANLYSVK IPLSAQLPGNMVYIK IPLSAQLPGNMVYIK + Oxidation (M) GSGITEDFEEASVQSR GSGITEDFEEASVQSR DVHYLNDESNNYER FLGDNKGYYLGNLGVLLR FLGDNKGYYLGNLGVLLR VKELISGVKPSQCISGDPK TVSSGISGASYTGTFTVNR TVSSGISGASYTGTFTVNR TVSSGISGASYTGTFTVNR AGCMVDSAIONKDVLENINK + Oxidation (M) ATGEQSAEMVTDEGAIYVTSNR ATGEQSAEMVTDEGAIYVTSNR + Oxidation (M) ATGEQSAEMVTDEGAIYVTSNR + Oxidation (M) GNFYLTWEPGQPFWQPHNR GNFYLTWEPGQPFWQPHNR EAAGMDVTSKTPCPSLPLTK + Oxidation (M) SIPSAEDEDFNRYRFSVFMGK EGWIIGKPAILLHTSDAGDSWER SIPSAEDEDFNRYRFSVFMGK + Oxidation (M) SIPSAEDEDFNRYRFSVFMGK + Oxidation (M) TVSSGISGASYTGTFTVNRSPDGR

1	45	0	hypothetical protein OsJ_03591	<i>Oryza sativa</i> <i>japonica</i> Group	38535,3	5,59	gij125572156	6			Peptide KATELHGAISSMEETK + Oxidation (M) VVSGYREYLLEHPELK FGEACVAKMVGFDVAVLAALK + Oxidation (M) FGEACVAKMVGFDVAVLAALK + Oxidation (M) MVGFDVAVLAALKLVHAPPEK VLITHQTTQAITFDAMENALFRK + Oxidation (M) VLITHQTTQAITFDAMENALFRK + Oxidation (M) RVLITHQTTQAITFDAMENALFR + Oxidation (M)
1	348	100	hypothetical protein OsJ_20187	<i>Oryza sativa</i> <i>japonica</i> Group	40119,1	8,12	gij222634989	14	228	100	Peptide VVVDFLASK FNYNNNAR FNYNNNAR FGLPFLPPSK FGLPFLPPSK FNDLSTNHNQLK FNDLSTNHNQLK CCDGRVVVDFLASK KFNDLSTNHNQLK IMYADFYSYGVYDMVR IMYADFYSYGVYDMVR + Oxidation (M) IMYADFYSYGVYDMVR + Oxidation (M) GANMAITGATAMDANFFR IMYADFYSYGVYDMVR + 2 Oxidation (M) IMYADFYSYGVYDMVR + 2 Oxidation (M) GANMAITGATAMDANFFR + Oxidation (M) GANMAITGATAMDANFFR + Oxidation (M) GANMAITGATAMDANFFR + 2 Oxidation (M) GANMAITGATAMDANFFR + 2 Oxidation (M) KGANMAITGATAMDANFFR + 2 Oxidation (M) QITDGLWLNOPYCSPAILHS QITDGLWLNOPYCSPAILHS SARIMYADFYSYGVYDMVR NPGNYGFSTVFETCCSGGGK CGMSGASACSNPASHLWDGIHLTEAAYK + Oxidation (M) NPGNYGFSTVFETCCSGGGKFNYYNNAR
1	399	100	hypothetical protein OsJ_22738	<i>Oryza sativa</i> <i>japonica</i> Group	173243	7,1	gij222636266	21	306	100	
1	225	100	hypothetical protein OsJ_28291	<i>Oryza sativa</i> <i>japonica</i> Group	20622,5	5,79	gij125604340	6	179	100	Peptide QIPLSGPNSVVGR QIPLSGPNSVVGR GGHELSTLSTGNAGGR AFVWHELEDDLK HAGDLGNVANAEGVAEATVDK GTSQVEGVTLTQDDGGPTTVNVR AFVWHELEDDLKGGHELSTLSTGNAGGR AFVWHELEDDLKGGHELSTLSTGNAGGR
3	42	0	legume lecitin family protein	<i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i>	30416,2	8,49	gij15219173	6			Peptide GVERHEIWDWTFQN AIFTTPTIFKPNASALYPFK VVSVITGLAHLKKNRPLEAK MKIQILCFITLFLAIFTSQVTTYAK IQILCFITLFLAIFTSQVTTYAK SLGDMNDNHVGDINSVDSVSVKSGYVMTR + Oxidation (M)

1	42	0	NBS-containing resistance like protein	<i>Platanus x acerifolia</i>	19742	6,95	gij157283585	1	38	99,349	Peptide VFELLKER VFELLKER
1	954	100	Os01g0501800	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	35067,8	6,1	gij115436780	15	818	100	Peptide NAPPEFQK VPFLFTIK VPFLFTIK VPFLFTIK LTFDEIQSK IQGVWYAQLE RLTFDEIQSK RLTFDEIQSK FCLEPTSFTVK FCLEPTSFTVK FCLEPTSFTVK KFCLEPTSFTVK GGSTGYDNAVALPAGGR DGIDYAAVTQLPGGER DGIDYAAVTQLPGGER GTGTANQCPTVEGGVDSFAFK GTGTANQCPTVEGGVDSFAFK NLVATGKPESFGGPFVPSYR NLVATGKPESFGGPFVPSYR LTYTLDEIEGPLEVSSDGTIK FEEKDGIDYAAVTQLPGGER GGSTGYDNAVALPAGGRGDEEELAK SKPETGEVIGVFESVQPSDTDLGAK SKPETGEVIGVFESVQPSDTDLGAK
1	283	100	Os02g0197600	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	29191	6,92	gij115444841	9	207	100	Peptide QLWFASK QYFLGLEK QYFLGLEK AEATPPAKQGADR WLAYGEVFNGR QGADRQLWFASK FQDWYTPGSMGK + Oxidation (M) FQDWYTPGSMGK + Oxidation (M) RFQDWYTPGSMGK RFQDWYTPGSMGK + Oxidation (M) RFQDWYTPGSMGK + Oxidation (M) TAMMGVGMVAPPELLGK + Oxidation (M) TAMMGVGMVAPPELLGK + 2 Oxidation (M) TAMMGVGMVAPPELLGK + 3 Oxidation (M) YLAGSGEPAYPGGPLFNPLGFGTK YLAGSGEPAYPGGPLFNPLGFGTK
1	244	100	Os02g0704900	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	24372,3	5,56	gij115448167	13	126	100	Peptide LQEIRR YPPAALNER YPPAALNER DIKEIPPHR EIPPHRLQEIR IAVCADDPEYR IAVCADDPEYR AIGLMPMIDQGEK + 2 Oxidation (M) APLGSRYPPAALNER AIGLMPMIDQGEKDDK + Oxidation (M) AIGLMPMIDQGEKDDK + 2 Oxidation (M) YSMDLYGAYIIESLRK YSMDLYGAYIIESLRK + Oxidation (M) YSMDLYGAYIIESLRK + Oxidation (M) EVAVNEFLPAEDAINAIK VLYSSVYYPHNYGFIPR VLYSSVYYPHNYGFIPR VDRVLYSSVYYPHNYGFIPR HVAAHPWHDLIEIGPGAPAVFNCVVEIPR

1	153	100	Os02g0735200	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	39404,5	5,51	gij115448531	8	106	100	Peptide NDGGYEIHK EHSAYGEGNER EHSAYGEGNER SMRNDGGYEIHK + Oxidation (M) SFRDRIVDSHYK HKEHSAYGEGNER HKEHSAYGEGNER IAEYIWIGGSGMDLR + Oxidation (M) HETADINTFSWGVANR HETADINTFSWGVANR GNNILVMCCDYTPAGEIPTNKR + Oxidation (M)
1	594	100	Os03g0786100 - Os03g57220	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	40415,1	8,49	gij115455773	20	402	100	Peptide ILFRPR ILFRPR LARPFPR LARPFPR NVVEQLVR NVVEQLVR AIALTVDTPR AHYTDADR IPVYLDGGVR IPVYLDGGVR FFQLYVYK FVLPYLTLK FVLPYLTLK DRNVVEQLVR IPVYLDGGVRR IPVYLDGGVRR MAHPDGEYATAR MAHPDGEYATAR + Oxidation (M) MAHPDGEYATAR + Oxidation (M) FFQLYVYKDR FFQLYVYKDR AGFKAIALTVDTPR WLQSITSLPILVK ISMPIMIAPSAMQK + 2 Oxidation (M) ISMPIMIAPSAMQK + 3 Oxidation (M) SNDSGLASYVAGQIDR SNDSGLASYVAGQIDR MGEITNMEYQAIK + Oxidation (M) LAVHSGAAGIIVSNHGAR LAVHSGAAGIIVSNHGAR QLDYVPATISALEEVTAAAGR MIYDYASGAEDEWTLKENR + Oxidation (M) Peptide SGGPNGSVR FVAVGLGPR FVAVGLGPR SEFQSSIK LTFVDAAIK DCRPWVEK DKFVAVGLGPR DKFVAVGLGPR QRSEFQSSIK QRSEFQSSIK INYEAYTYPK INYEAYTYPK QDTQEPDPEGR TDYEVDLITLTK LIADKDCRPWVEK LIADKDCRPWVEK TLYSAYGNSNGWGLFDK GGPIAFADLIQFAAQSALK QDTQEPDPEGRVPOWSK QLAVMSVFLGPDQAATEER QLAVMSVFLGPDQAATEER QLAVMSVFLGPDQAATEER + Oxidation (M) QLAVMSVFLGPDQAATEER + Oxidation (M) ETVSRTDYEVDLITLTK TDYEVDLITLTKLSSLGOK LSAEISRPENSGLSAAVDLLVEAK
1	396	100	Os04g0602100	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	38442,9	8,67	gij115460338	18	233	100	Peptide SGGPNGSVR FVAVGLGPR FVAVGLGPR SEFQSSIK LTFVDAAIK DCRPWVEK DKFVAVGLGPR DKFVAVGLGPR QRSEFQSSIK QRSEFQSSIK INYEAYTYPK INYEAYTYPK QDTQEPDPEGR TDYEVDLITLTK LIADKDCRPWVEK LIADKDCRPWVEK TLYSAYGNSNGWGLFDK GGPIAFADLIQFAAQSALK QDTQEPDPEGRVPOWSK QLAVMSVFLGPDQAATEER QLAVMSVFLGPDQAATEER QLAVMSVFLGPDQAATEER + Oxidation (M) QLAVMSVFLGPDQAATEER + Oxidation (M) ETVSRTDYEVDLITLTK TDYEVDLITLTKLSSLGOK LSAEISRPENSGLSAAVDLLVEAK

1	235	100	Os04g0659100/ Glutamine synthetase, chloroplastic	<i>Oryza sativa</i> <i>japonica Group</i>	46955,6	5,96	gij115461066	9	184	100	Peptide AILNLSLR AILNLSLR GKGYLEDR AAQVFSDPK SMREDGGFEVIK + Oxidation (M) TISKPVEDPSELPK TISKPVEDPSELPK HDLHISAYGEGNER HDLHISAYGEGNER HDLHISAYGEGNER HDLHISAYGEGNER MEQLLNMDTTPFTDK + 2 Oxidation (M) GGNNILVMCDTYTPAGEPIPTNKR + Oxidation (M)
1	253	100	Os05g0103200	<i>Oryza sativa</i> <i>japonica Group</i>	26744,7	9,36	gij115461585	11	147	100	Peptide TPWLDGR TPWLDGR TFKDENFK GFGYKGSFHR GFGYKGSFHR VYFDISIGNPVGK VIKDFMIQGGDFDK + Oxidation (M) MIESQETDRGDRPK HVVFQGVIEGMDIVK MIESQETDRGDRPK + Oxidation (M) MIESQETDRGDRPK + Oxidation (M) HVVFQGVIEGMDIVK + Oxidation (M) HVVFQGVIEGMDIVK + Oxidation (M) ITNKVYFDISIGNPVGK VVIGLYGDDVPQTAENFR VVIGLYGDDVPQTAENFR LPSSAVFGGFTPALSAHSRAR LPSSAVFGGFTPALSAHSRAR LVHTGPGVVSANAGPNTNGSQFFICTVK + Oxidation (M)
1	64	98,41	Os06g0157000	<i>Oryza sativa</i> <i>japonica Group</i>	37086,8	8,22	gij1154665128	4	41	99,152	Peptide FGLPFLPPSK FGLPFLPPSK IMYADFYSVYDMVR IMYADFYSVYDMVR + Oxidation (M) IMYADFYSVYDMVR + Oxidation (M) GANMAITGATAMDANFFR IMYADFYSVYDMVR + 2 Oxidation (M) IMYADFYSVYDMVR + 2 Oxidation (M) GANMAITGATAMDANFFR + Oxidation (M) GANMAITGATAMDANFFR + Oxidation (M) GANMAITGATAMDANFFR + 2 Oxidation (M) GANMAITGATAMDANFFR + 2 Oxidation (M) QITDGLWLNOPYCSPAILHS
1	403	100	Os07g0141400	<i>Oryza sativa</i> <i>japonica Group</i>	27093,8	8,66	gij115470529	10	317	100	Peptide EFPQVLR EFPQVLR QYYSVTVLR QYYSVTVLR KFVESAASSFSVA TNTEFIAYSGEGFK TNTEFIAYSGEGFK MASTSCFLHQSTARVAAR TADGDEGKHKQLITATVNDGK YEDNFDANSNVSIINPTTK TITEFGSPEEFLAQVDFLLGK YEDNFDANSNVSIINPTTK TDEGGFESDAVATANILESSAPVVGK TDEGGFESDAVATANILESSAPVVGK

2	247	100	Os08g0460000	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	22018,3	6,01	gij115476760	4	223	100	Peptide VTFLDDAQVK VTFLDDAQVK VTFLDDAQVKK VTFLDDAQVKK AAVTPAFVGGQFPVGNLGISAAAR AAVTPAFVGGQFPVGNLGISAAAR ASVGAGDFAYHGLAAAGNTSNLIK Peptide TFEVAQK EAAWGLAR ANSLAQLGK AAQDALLR AAQDALLR IVDILTEQK TWGGQPENVK YTSDEAAEAK EAAYYQQGAR EAAYYQQGAR KIVDILTEQK ATPEQVSDYTLK ATPEQVSDYTLK LASIGLENTEANR LASIGLENTEANR MASATLLKSSFLPK TVVSIPNGPSELAVK TVVSIPNGPSELAVK RLASIGLENTEANR GILAMDESNAATCGKR GILAMDESNAATCGKR + Oxidation (M) YAAISQDNGLVPIVEPEILLDGEHGIDR Peptide QDFDFVK VLHLKGDR FIGVFLSR FIGVFLSR NILVMGGTR QVFNISGAK NILVMGGTR + Oxidation (M) YVTFDGLAR YVTFDGLAR EGHQVTLFTR EGHQVTLFTR LETESLLETR DQHFFASIEK GDRQDFDFVK GDRQDFDFVK GFDVVDINGR GFDVVDINGR GKLETESLLETR DLATAFVLALGNPK AADFTTDDMILGKK + Oxidation (M) LLVKEGHQVTLFTR AGGFPEPEIVHYNPK AGGFPEPEIVHYNPK SDLLPHFETDAVDPK TSLAAKGFVDVVDINGR AFFFRDQHFFASIEK AGRPIVPGAGNQITQLGHVK AGRPIVPGAGNQITQLGHVK APITQQLPGESDAEYAEFSSK GKAPITQQLPGESDAEYAEFSSK
1	560	100	Os11g0171300	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	42207,6	6,38	gij115484401	16	430	100	Peptide VTFLDDAQVK VTFLDDAQVK VTFLDDAQVKK VTFLDDAQVKK AAVTPAFVGGQFPVGNLGISAAAR AAVTPAFVGGQFPVGNLGISAAAR ASVGAGDFAYHGLAAAGNTSNLIK Peptide TFEVAQK EAAWGLAR ANSLAQLGK AAQDALLR AAQDALLR IVDILTEQK TWGGQPENVK YTSDEAAEAK EAAYYQQGAR EAAYYQQGAR KIVDILTEQK ATPEQVSDYTLK ATPEQVSDYTLK LASIGLENTEANR LASIGLENTEANR MASATLLKSSFLPK TVVSIPNGPSELAVK TVVSIPNGPSELAVK RLASIGLENTEANR GILAMDESNAATCGKR GILAMDESNAATCGKR + Oxidation (M) YAAISQDNGLVPIVEPEILLDGEHGIDR Peptide QDFDFVK VLHLKGDR FIGVFLSR FIGVFLSR NILVMGGTR QVFNISGAK NILVMGGTR + Oxidation (M) YVTFDGLAR YVTFDGLAR EGHQVTLFTR EGHQVTLFTR LETESLLETR DQHFFASIEK GDRQDFDFVK GDRQDFDFVK GFDVVDINGR GFDVVDINGR GKLETESLLETR DLATAFVLALGNPK AADFTTDDMILGKK + Oxidation (M) LLVKEGHQVTLFTR AGGFPEPEIVHYNPK AGGFPEPEIVHYNPK SDLLPHFETDAVDPK TSLAAKGFVDVVDINGR AFFFRDQHFFASIEK AGRPIVPGAGNQITQLGHVK AGRPIVPGAGNQITQLGHVK APITQQLPGESDAEYAEFSSK GKAPITQQLPGESDAEYAEFSSK
1	799	100	Os12g0420200	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	41620,6	8,59	gij115488340	22	582	100	Peptide VTFLDDAQVK VTFLDDAQVK VTFLDDAQVKK VTFLDDAQVKK AAVTPAFVGGQFPVGNLGISAAAR AAVTPAFVGGQFPVGNLGISAAAR ASVGAGDFAYHGLAAAGNTSNLIK Peptide TFEVAQK EAAWGLAR ANSLAQLGK AAQDALLR AAQDALLR IVDILTEQK TWGGQPENVK YTSDEAAEAK EAAYYQQGAR EAAYYQQGAR KIVDILTEQK ATPEQVSDYTLK ATPEQVSDYTLK LASIGLENTEANR LASIGLENTEANR MASATLLKSSFLPK TVVSIPNGPSELAVK TVVSIPNGPSELAVK RLASIGLENTEANR GILAMDESNAATCGKR GILAMDESNAATCGKR + Oxidation (M) YAAISQDNGLVPIVEPEILLDGEHGIDR Peptide QDFDFVK VLHLKGDR FIGVFLSR FIGVFLSR NILVMGGTR QVFNISGAK NILVMGGTR + Oxidation (M) YVTFDGLAR YVTFDGLAR EGHQVTLFTR EGHQVTLFTR LETESLLETR DQHFFASIEK GDRQDFDFVK GDRQDFDFVK GFDVVDINGR GFDVVDINGR GKLETESLLETR DLATAFVLALGNPK AADFTTDDMILGKK + Oxidation (M) LLVKEGHQVTLFTR AGGFPEPEIVHYNPK AGGFPEPEIVHYNPK SDLLPHFETDAVDPK TSLAAKGFVDVVDINGR AFFFRDQHFFASIEK AGRPIVPGAGNQITQLGHVK AGRPIVPGAGNQITQLGHVK APITQQLPGESDAEYAEFSSK GKAPITQQLPGESDAEYAEFSSK

1	90	100	predicted protein	<i>Physcomitrella patens subsp patens</i>	63227,4	5,75	gij168055816	8	62	99,992	Peptide LMDLLKER + Oxidation (M) LMDLLKER + Oxidation (M) EALLRTAATIR LEENTSTNNLK LEENTSTNNLK DPMISGHQFTK + Oxidation (M) DYGGTKEEVLSR SQHEALMEEKR METKVLDDGSAYAR + Oxidation (M) VKPVAGPLPEVSNEKMGELSK + Oxidation (M)
1	283	100	putative chitinase	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	32756,6	6,08	gij54291729	12	187	100	Peptide CVFPDQR LGVMLTATAR + Oxidation (M) WMAAYPQSR WMAAYPQSR + Oxidation (M) IHVKVFGDGR IHVKVFGDGR NTDQLEGLSR LQAAALSTGLFSR LQAAALSTGLFSR VLVGVVASPEADR VLVGVVASPEADR LPNYGGIMVWNR LPNYGGIMVWNR + Oxidation (M) LEDISGHTVSAVGPDIK EELEKWWAAYPQSR + Oxidation (M) VLVGVVASPEADRGGVYSHK VLVGVVASPEADRGGVYSHK CVFPDQRLQAAALSTGLFSR
1	464	100	putative ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	41094,6	7,98	gij41052915	18	312	100	Peptide MYIQTR + Oxidation (M) FRLDFAVSR FRLDFAVSR DGIDWLDYKK YRPKEPYTGR YRPKEPYTGR KSEQWNVVY KSEQWNVVY DNTYVYMCSLK DNTYVYMCSLK LVYTNDQGEIVK DNTYVYMCSLK + Oxidation (M) EGQSIGVIPDGIDK MYIQTRMAEYK + 2 Oxidation (M) RLVTNDQGEIVK RLVTNDQGEIVK LYSIASSAIGDFADSK LYSIASSAIGDFADSK EQTNAAGEKMYIQTR + Oxidation (M) GVCSNFLCDLKPQSDVK GVCSNFLCDLKPQSDVK LRLYSIASSAIGDFADSK DPNATIIMLGTGTGIAPFR DPNATIIMLGTGTGIAPFR DPNATIIMLGTGTGIAPFR + Oxidation (M) DPNATIIMLGTGTGIAPFR + Oxidation (M) EGQSIGVIPDGIDKNGKPHK EGQSIGVIPDGIDKNGKPHK ITGDDAPGETWHMVFSTDGEIPYR EMLMPKDPNATIIMLGTGTGIAPFR + 2 Oxidation (M) ITGDDAPGETWHMVFSTDGEIPYR + Oxidation (M)

3	56	90,85	putative gag-pol polyprotein	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	90215,4	6,6	gij29788830	13	Peptide YGCKPIGCK SCKQTILTR KVTPEEWER VTPFEWERK VLSRFCYSDCK YFMTLIDDCTR + Oxidation (M) DATFFNEFPMK LSRFVSNPGDDHWHALER GDEGGITFVQYHYVVKVLSR NLAPLELVHSDLCENMGVLTk + Oxidation (M) NLAPLELVHSDLCENMGVLTk + Oxidation (M) LGPKTVDCVFLGYAIHSMGYR EWWGEAILTACHVLIHNIPTKHK ELLMDLPVVEKPVPAIMMNCNQTv + Oxidation (M) ELLMDLPVVEKPVPAIMMNCNQTv + 2 Oxidation (M) ELLMDLPVVEKPVPAIMMNCNQTv + 3 Oxidation (M) ELLMDLPVVEKPVPAIMMNCNQTv + 3 Oxidation (M)		
1	682	100	ribulose bishosphate carboxylase /oxygenase activase, chloroplast precursor, putative expressed	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	38690,2	5,36	gij108864712	22	468	100	Peptide VYDDEVr FYWAPTR FYWAPTR VYDDEVrK NFMTLPNIK YREAADIK NFMTLPNIK + Oxidation (M) VPLILGIWGGK VPLILGIWGGK EGPPEFEQPK SFQCELVFAK SFQCELVFAK LMEYGYMLVK + Oxidation (M) FYWAPTRDDR FYWAPTRDDR WVSDTGVENIGKR WVSDTGVENIGKR MCCLFINDLDAGAGR MCCLFINDLDAGAGR GIFRTDNVPDEDIVK LVNSREGPPPEFEQPK MCCLFINDLDAGAGR + Oxidation (M) MCCLFINDLDAGAGR + Oxidation (M) EGPPEFEQPKMTIEK + Oxidation (M) IVDSFFGQSIDFFGALR IVDSFFGQSIDFFGALR GKMCCLFINDLDAGAGR GKMCCLFINDLDAGAGR + Oxidation (M) VPIIVTGNDFSTLYAPLIR VPIIVTGNDFSTLYAPLIR MGINPIMMSAGELESGNAGEPAK MGINPIMMSAGELESGNAGEPAK + Oxidation (M) MGINPIMMSAGELESGNAGEPAK + 2 Oxidation (M) TYDFDNTMGGFYIAPAFMDK + 2 Oxidation (M) VQLAEQYLSEAAALGDANS DAMK + Oxidation (M) MGINPIMMSAGELESGNAGEPAK + 3 Oxidation (M) EDNPRVPIIVTGNDFSTLYAPLIR

1	494	100	triosephosphate isomerase	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	27816,4	6,6	gi 553107	11	403	100	Peptide FFVGGNWK FFVGGNWK VAYALSQGLK KFFVGGNWK IYGGSVTGANCK IYGGSVTGANCK VIACVGETLEQR VIACVGETLEQR SLLGESNEFVGDK WLAANVSAEVAESTR WLAANVSAEVAESTR VATPDQAQEVHDGLR VATPDQAQEVHDGLR VATPDQAQEVHDGLR VATPDQAQEVHDGLR VATPDQAQEVHDGLR SOLRPEIQVAAQNCWVK SOLRPEIQVAAQNCWVK FFVGGNWKNGTTDQVDK
---	-----	-----	---------------------------	------------------------------------	---------	-----	-----------	----	-----	-----	---

B. Identificación de las manchas seleccionadas en común para la variedad Fedearroz 2000

Rango	Protein score	CI %	PROTEINA	species	M W	PI	No. ACCESSION	PEPT COUNT	TOTAL ION SCORE	TOTAL ION C.1%	SECUENCIA DE PEPTIDOS ENCONTRADOS
1	791	100	ATP synthase CF1 beta subunit	<i>Oryza nivara</i>	5978,1	5,38	gil50233978	21	586	100	Peptide IGLFGGAGVGK LSIFETGIK SAPAFIELDTK VVDLLAPYRR VVDLLAPYRR GKGIGLFGGAGVGK AHGGVSVFGGVGER AHGGVSVFGGVGER IVGNEHYETAQR IVGNEHYETAQR FVQAGSEVSALLGR FVQAGSEVSALLGR VGLTALTMAEYFR VGLTALTMAEYFR TREGNDLYMEMK VGLTALTMAEYFR + Oxidation (M) VGLTALTMAEYFR + Oxidation (M) TREGNDLYMEMK + Oxidation (M) VALVYQMNPPGAR VALVYQMNPPGAR + Oxidation (M) VALVYQMNPPGAR + Oxidation (M) MRVGLTALTMAEYFR + Oxidation (M) MRVGLTALTMAEYFR + 2 Oxidation (M) QINVTCEVQQLGNRR DVNKQDVLLFIDNIFR GIYPVAVDPLDSTSTMLQPR GIYPVAVDPLDSTSTMLQPR + Oxidation (M) GIYPVAVDPLDSTSTMLQPR + Oxidation (M) GMEVIDTGAPLSVPVGGATLGR GMEVIDTGAPLSVPVGGATLGR GMEVIDTGAPLSVPVGGATLGR + Oxidation (M) MPSAVGYQPTLSTEMGSLQER MPSAVGYQPTLSTEMGSLQER + Oxidation (M) NLEESKVALVYQMNPPGAR MPSAVGYQPTLSTEMGSLQER + 2 Oxidation (M) MPSAVGYQPTLSTEMGSLQER + 2 Oxidation (M) NLEESKVALVYQMNPPGAR + Oxidation (M) DTDGKQINVTCEVQQLGNRR

2	44	0	auxin-binding protein ABP20 precursor	<i>Zea mays</i>	23277	5,89	gil195650881	1			DTDGKQINVTCEVQQLGNRR IFNVLGEPVDNLGPVDTSATFPIHR IFNVLGEPVDNLGPVDTSATFPIHR KGSITSIQAVVPPADLTDPAATTFAHLDAATTVLSR Peptide ISLGSAVVTTFFPGLNGLGISAAR ISLGSAVVTTFFPGLNGLGISAAR Peptide FSLAPLVPR FSLAPLVPR FSLAPLVPR IGVIESLLEK RPFAAIVGGSK RPFAAIVGGSK LSELLGIQVTK VILSSHLGRPK AAIPTIQYLIK ELDYLVGAVSSPK ELDYLVGAVSSPK SVGDLTAAADLEGKR FLKPSVAGFLLQK FLKPSVAGFLLQK GVSLLLPSDVIIADK LVSELPNGSVLLENVR LVSELPNGSVLLENVR LASLADLYVNDAFGTAHR LASLADLYVNDAFGTAHR LASLADLYVNDAFGTAHR ADLNVPLDDNQNTDDTR ADLNVPLDDNQNTDDTR KLASLADLYVNDAFGTAHR ADLNVPLDDNQNTDDTRVR Peptide FNYNNNAR FNYNNNAR FNYNNNAR FGLPFLPPSK FGLPFLPPSK FGLPFLPPSK FNDLSTNHNNQLK CCDGRVVDFLASK IMYADFYSGVYDMVR + Oxidation (M) IMYADFYSGVYDMVR + 2 Oxidation (M) IMYADFYSGVYDMVR + 2 Oxidation (M) GANMAITGATAMDANFFR + Oxidation (M) GANMAITGATAMDANFFR + Oxidation (M) GANMAITGATAMDANFFR + 2 Oxidation (M) GANMAITGATAMDANFFR + 2 Oxidation (M) QITDGWLNQPCSPAILHS NPGNYGFSTVFETCCGSGGGK NPGNYGFSTVFETCCGSGGGKFNYNNNAR Peptide NAPPEFQK VPFLFTIK VPFLFTIK RLTDFEIQSK RLTDFEIQSK FCLEPTSFTVK FCLEPTSFTVK FCLEPTSFTVK GGSTGYDNAVALPAGGR DGIDYAAVTVQLPgger DGIDYAAVTVQLPgger GTGTANQCPTVEGGVDSFAPK GTGTANQCPTVEGGVDSFAPK LAGFALATSALLVSGASAEGVPR NLVATGKPEFSGGPFVPSYR NLVATGKPEFSGGPFVPSYR FEEKDGIDYAAVTVQLPgger SKPETGEVIGVFESVQPSDTDLGAK
1	696	100	hypothetical protein OsI_20474	<i>Oryza sativa indica</i> Group	30520,5	6,86	gil125552851	15	556	100	
1	138	100	hypothetical protein OsJ_20187	<i>Oryza sativa japonica</i> Group	40119,1	8,12	gil222634989	9	78	100	
1	323	100	Os010501800	<i>Oryza sativa japonica</i> Group	35067,8	6,1	gil115436780	11	233	100	

1	241	100	Os03g0129300	<i>Oryza sativa japonica</i> Group	47537,4	6,22	gil115450493	11	173	100	Peptide VAINGFGR VAINGFGR AVALVLPQLK YDSMLGTFK + Oxidation (M) ILDEEFGIVK IVDDQTSVDGK TGITADDVNAEFR TGITADDVNAEFR AAALNIVPTSTGAAK TGITADDVNAEFRK GTMTTTHSYTGDOR GTMTTTHSYTGDOR + Oxidation (M) GTMTTTHSYTGDOR + Oxidation (M) ENSPLEVVVVNDSSGGVR ENSPLEVVVVNDSSGGVR NASHLLKYDSMLGTFK
1	264	100	Os04g0459500	<i>Oryza sativa japonica</i> Group	43031,2	7,62	gil115458768	10	193	100	Peptide VAINGFGR VAINGFGR AVALVLPNLK TLAEEVNQAQFR TLAEEVNQAQFR AAALNIVPTSTGAAK KTLAEEVNQAQFR GTMTTTHSYTGDOR GTMTTTHSYTGDOR + Oxidation (M) GTMTTTHSYTGDOR + Oxidation (M) GDSPLDVIAINDTGGVK GDSPLDVIAINDTGGVK VIAWYDNEWGYSQR GILEVCDVPLVSVDFR YDSTLGIFDADVKPVGDNVIAISVDGK Peptide AILNLSLR AILNLSLR GKGYLEDR TGRGTSQFR AAQVFSDPK TISKPVEDPSELPK HDLHISAYGEGNER HDLHISAYGEGNER HDLHISAYGEGNER LTGLHETASIDNFSWGVANR VVSQVPWFQIEQETLLQR VVSQVPWFQIEQETLLQR RLTGLHETASIDNFSWGVANR RLTGLHETASIDNFSWGVANR GGNNILVMCDTYTPAGEPIPTNKR GGNNILVMCDTYTPAGEPIPTNKR GGNNILVMCDTYTPAGEPIPTNKR + Oxidation (M) GGNNILVMCDTYTPAGEPIPTNKR + Oxidation (M)
1	273	100	Os04g0659100 / Glutamine synthetase, chloroplastic	<i>Oryza sativa japonica</i> Group	46955,6	5,96	gil115461066	11	201	100	Peptide AILNLSLR AILNLSLR GKGYLEDR TGRGTSQFR AAQVFSDPK TISKPVEDPSELPK HDLHISAYGEGNER HDLHISAYGEGNER HDLHISAYGEGNER LTGLHETASIDNFSWGVANR VVSQVPWFQIEQETLLQR VVSQVPWFQIEQETLLQR RLTGLHETASIDNFSWGVANR RLTGLHETASIDNFSWGVANR GGNNILVMCDTYTPAGEPIPTNKR GGNNILVMCDTYTPAGEPIPTNKR GGNNILVMCDTYTPAGEPIPTNKR + Oxidation (M) GGNNILVMCDTYTPAGEPIPTNKR + Oxidation (M)

1	441	100	Os06g0107700	<i>Oryza sativa japonica</i> Group	40381,4	8,72	gij115465942	17	309	100	Peptide MYIQTR DGIDWADYKK YRPKEPYVGK KGEQWNVVY LVYTNDQGEIVK LVYTNDQGEIVK DHTYVVMCGLK MFFEKYDDYK + Oxidation (M) DHTYVVMCGLK + Oxidation (M) MYIQTRMAEYK + 2 Oxidation (M) APENFRVDYAVSR KDHTYVVMCGLK + Oxidation (M) RLVYTNDQGEIVK RLVYTNDQGEIVK LYSIASSALGDFGDSK LYSIASSALGDFGDSK VDYAVSREQTNAQGEK VDYAVSREQTNAQGEK EQTNAQGEKMYIQTR + Oxidation (M) GVCNFDLCKPGSDVK GVCNFDLCKPGSDVK DPNANIIMLATGTGIAPFR DPNANIIMLATGTGIAPFR + Oxidation (M) DPNANIIMLATGTGIAPFR + Oxidation (M) EMLMPKDPNANIIMLATGTGIAPFR + 3 Oxidation (M)
4	68	99,436	Os110170200	<i>Oryza sativa japonica</i> Group	99943,7	4,92	gij11548493-gij115484393	12			Peptide VEKLETEK AMEQQLEGAK AMEQQLEGAK MLEAVEGIR LVEQQTIANLGR ELSSAAGKLVCEQK ELSSAAGKLVCEQK SLEAQLQSAHADIGK KSLEAQLQSAHADIGK NASLDDQVNHLDLALK LSLERDLSNEAAETASK LSLERDLSNEAAETASK IALGQADQLDAERGSALQLESK IALGQADQLDAERGSALQLESK LLVNSEIAKLGTVNDLECDAAK VQLDASCDALMAANNKLAELQMFNLANESK + Oxidation (M)
1	435	100	Os11g0171300	<i>Oryza sativa japonica</i> Group	42207,6	6,38	gij115484401	15	315	100	Peptide EAAWGLAR AAQDALLR AAQDALLR IVDILTEQK TWGGQPENVK EAAYYQQGAR EAAYYQQGAR KIVDILTEQK ATPEQVSDYTLK ATPEQVSDYTLK LASIGLENTEANR LASIGLENTEANR MASATLLKSSFLPK TVVSIPIPNPSELAVK TVVSIPIPNPSELAVK RLASIGLENTEANR DRATPEQVSDYTLK GILAMDESNAATCGKR + Oxidation (M) GLVPLAGSNNESWCOGLDGLASR YAAISQDQNLVPIVEPEILLDGEHGIDR

1	369	100	OSIGBa0130B08	<i>Oryza sativa indica</i> Group	39812,1	6,22	gij116310328	17	225	100	Peptide YFNYYK YFNYYK VQYGLCIR VQYGLCIR LVFVTNNSTK DVGAVVVGFDK VYVIGEDGILK RLVFVTNNSTK LVFVTNNSTKSR ENPGCLFIATNR ENPGCLFIATNR LIDGVPETLDMLR + Oxidation (M) LIDGVPETLDMLR + Oxidation (M) LDTDILFGQNGGCK LDTDILFGQNGGCK FGITTSQICMVGDR FGITTSQICMVGDR + Oxidation (M) IELKPGFYMEHDK + Oxidation (M) GDKLIDGVPETLDMLR + Oxidation (M) ELELAGFOYLGGPSDGDK ELELAGFOYLGGPSDGDK QEPLVVGKPSFMMDYLAK + 2 Oxidation (M) QEPLVVGKPSFMMDYLAKK Peptide LMDLLKER + Oxidation (M) LMDLLKER + Oxidation (M) EALLRTAATIR LEENTSTNNLK DPMSIGHOFTK + Oxidation (M) DYGGTKEEVLRS DYGGTKEEVLRS SQHEALMEEKR EMENLSHYTRK METKVLDDGSAYAR + Oxidation (M) VKPVAGPLPEVSNEKMGELSK + Oxidation (M)
1	93	99,998	predicted protein	<i>Physcomitrella patens</i> <i>subsp patens</i>	63227,4	5,75	gij168055816	9	64	99,995	Peptide LMDLLKER + Oxidation (M) LMDLLKER + Oxidation (M) EALLRTAATIR LEENTSTNNLK DPMSIGHOFTK + Oxidation (M) DYGGTKEEVLRS DYGGTKEEVLRS SQHEALMEEKR EMENLSHYTRK METKVLDDGSAYAR + Oxidation (M) VKPVAGPLPEVSNEKMGELSK + Oxidation (M)
2	210	100	Putative trasnketolase 1 (<i>Oryza sativa Japonica</i> Group)	<i>Oryza sativa japonica</i> Group	69406,6	5,43	gij55296168	17	76	100	Peptide FAEYEKK NPYWFNR NPYWFNR KRPSVLALSR NGNDGYDEIR NGNDGYDEIR ESVLPEAVTAR YTPESPADATR VTTTIGFGSPNK NPYWFNRDR NPYWFNRDR VSLEAGSTLGWQK ANSYSVHGSALGTK AIGDKFGASAPAGK LAQLPGTSIEGVEK FEALGWHTWVK MFGDFQKDTPEER MFGDFQKDTPEER + Oxidation (M) HVPQGAAFEADWNAK HVPQGAAFEADWNAK IQEYGITAEVNIATAK AMPNILMLRPADGNETAGAYK AMPNILMLRPADGNETAGAYK + Oxidation (M) AMPNILMLRPADGNETAGAYK + 2 Oxidation (M) AMPNILMLRPADGNETAGAYK + 2 Oxidation (M)
1	77	99,926	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	<i>Alstonia macrophylla</i>	21212,8	7	gij270156132	6	22	21,492	Peptide ACYECLR ALRLEDLR DTDILAAFR DTDILAAFR LTYTPEYETK LEDLRIPPAYIK TFQPPHGIQVER TFQPPHGIQVER

1	56	90,848	UNKNOWN PROTEIN	<i>Oryza sativa japonica</i> Group	136945,7	9,27	gij55168239	16	DMPDDVSW/S + Oxidation (M) VFTEDAIRR AAPLSLVSATAR CYLDGGSPVAVK RPTSPSAPNLLR CYLDGGSPVAVKK GGGGACLAWMDKR + Oxidation (M) GGGGACLAWMDKR + Oxidation (M) HNIKVFTEDAIR TQRAISHNIFDR KVGYQTAMIAAYK + Oxidation (M) RITNNYNIPIPR LLVCIATNLLLSMMAMIIRSR + 2 Oxidation (M) TQEIEDDGLIGAFTSVGDKLASAILK SDMKSSMVVIVLIHNSASAMICLGK NSHHGIGKGGSTHASWTSAMSSFMLK + 2 Oxidation (M) EWHGQEVGVLASASATAATRHLRLR
---	----	--------	-----------------	---------------------------------------	----------	------	-------------	----	--

C. Identificación de las manchas seleccionadas de la variedad Colombia I

Rango	Protein score	CI %	PROTEINA	species	M W	PI	No. ACCESSION	PEPT COUNT	TOTAL ION SCORE	TOTAL ION C.I%	SECUENCIA DE PEPTIDOS ENCONTRADOS
1	488	100	Os09g0535000 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	32790,9	6,96	gi 115480367	15	357	100	Peptide TFDVCFK FFVGGNWK FFVGGNWK AAYALSQNVK TNVSPEVASGIR TNVSPEVASGIR EAGKTFDVCFK HVIGEDDQFIGK VIACIGELLEER VIACIGELLEER GPDFATIINSVTSK HVIGEDDQFIGKK HVIGEDDQFIGKK RHVIGEDDQFIGK KEDIDGFLVGGASLK VATPEQAQEVHAAVR VATPEQAQEVHAAVR IYGGSVNAANCAELAK VIACIGELLEEREAGK NSLTDRIEVSQNVWIGK Peptide MEAMQSQTVDVVK VMNHASSDDAEIR + Oxidation (M) MEAMQSQTVDVVKR + Oxidation (M) MEAMQSQTVDVVKR + Oxidation (M) GLVVLPGEDALPPDVASK ALNLLQYLLQEDDSR KALNLLQYLLQEDDSR QLVDLLWSICYNEPSSLR SIATGLGFPRVMHASSDDAEIR + 2 Oxidation (M)
3	60	96,752	armadillo/beta-catenin repeat family protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	36218,7	4,9	gi 145332008	8			

1	538	100	ATP synthase CF1 alpha subunit	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	55687,5	5,95	gi 11466784	26	298	100	Peptide VGIENIGR QMSLLR QMSLLR + Oxidation (M) TSNQLAR FLDELK IEQYNRK KVGIENIGR VVQVGDGIAR EAIQEQLER LIESPAPGIISR LIESPAPGIISR VINALAKPIDGR VINALAKPIDGR TAVATDILNOK HTLIYDDLK GYLDSEIGQVK LIESPAPGIISR IAQIPVSEAYLGR IAQIPVSEAYLGR GYLDSEIGQVKK EAYPGDVFYHLSR EAYPGDVFYHLSR ERHTLIYDDLK DTKPQFQEIISSSK HLKDTKPFQEIISSSK HTLIYDDLKQQAQYR IIGLGEIMSGELVEFAEGTR + Oxidation (M) VINALAKPIDGRGEIVASESR VINALAKPIDGRGEIVASESR SVYEPLOTGLAIDSMPIGR + Oxidation (M) LELAQFAELQAFQFASALDK QSQANPLPVEEQIATYIGTR QSQANPLPVEEQIATYIGTR Peptide AVVLWNR AVVLWNR QTFPSGIK KAVVLWNR ENPATWAGR APLLIGCDVR APLLIGCDVR DSQGNFVFNRR DSQGNFVFNRR SHFSWALAK SHFSWALAK TFASWGVGYLK TTGDIADNWGSMISR TTGDIADNWGSMISR + Oxidation (M) VQSDNGLEWVWAGPLSNRR DSQGNFVFNRRQTFPSGIK DSQGNFVFNRRQTFPSGIK VQSDNGLEWVWAGPLSNRR KVQSDNGLEWVWAGPLSNRR LGYQYVNIDDCWAEYSR NILSNSEVIQVQSLGVQGK NILSNSEVIQVQSLGVQGK
1	324	100	Chain A, Crystal structure of rice alpha galactosidase	<i>Oryza sativa</i>	40325,2	5,68	gi 33358179	15	192	100	Peptide AVVLWNR AVVLWNR QTFPSGIK KAVVLWNR ENPATWAGR APLLIGCDVR APLLIGCDVR DSQGNFVFNRR DSQGNFVFNRR SHFSWALAK SHFSWALAK TFASWGVGYLK TTGDIADNWGSMISR TTGDIADNWGSMISR + Oxidation (M) VQSDNGLEWVWAGPLSNRR DSQGNFVFNRRQTFPSGIK DSQGNFVFNRRQTFPSGIK VQSDNGLEWVWAGPLSNRR KVQSDNGLEWVWAGPLSNRR LGYQYVNIDDCWAEYSR NILSNSEVIQVQSLGVQGK NILSNSEVIQVQSLGVQGK

1	517	100	chain O, crystal structure and functional analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from <i>Oryza sativa</i>	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	36429,8	6,67	gi 256032543	16	380	100	Peptide LTGMSFR + Oxidation (M) IGINGFGR IGINGFGR AASYDAIK VLPDLNGK IKINGFGR YDTVHGQWK YDTVHGQWK AGIALNDFVK AGIALNDFVK TVDGPSSKDWK TVDGPSSKDWK AASFNIIPSTGAAK AASFNIIPSTGAAK DAPMFVCGVNEK VPTVDVSVVDTLTVR TLLLEKPVTVFGIR TLLLEKPVTVFGIR VLPDLNGKLTGMSFR + Oxidation (M) LVAWYDNEWGYSNR LVAWYDNEWGYSNR GIIGYVEEDLVSTDFVGDSR VIHDNFGIIEGLMTTVHAITATQK + Oxidation (M)
3	273	100	Chain S, crystal structure of activated rice rubisco complexed with 2-carboxyarabinitol -1,5-bisphosphate	<i>Oryza sativa</i>	15090,6	5,89	gi 56966763	11	157	100	Peptide SPGYDGR SPGYDGR YWTMWK + Oxidation (M) IIGFDNVR IIGFDNVR AYPDAFVR AYPDAFVR KAYPDAFVR KAYPDAFVR WVPCLEFSK WVPCLEFSK VGFVYRENHR VGFVYRENHR SKWVPCLEFSK LPMFGCTDATQVLK + Oxidation (M) LPMFGCTDATQVLK + Oxidation (M) SPGYDGRYWTMWK + Oxidation (M) QVQLISFIAYKPPGCEESGGN Peptide EFPQVLR EFPQVLR QYYSVTVLR TNTEFIAYSGEGFK TNTEFIAYSGEGFK TADGDEGGKHLITATVNDGK
1	88	99,994	chloroplast 23 kDa polypeptide of photosystem II	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	20074,1	5,56	gi 164375543	4	63	99,993	Peptide EFPQVLR EFPQVLR QYYSVTVLR TNTEFIAYSGEGFK TNTEFIAYSGEGFK TADGDEGGKHLITATVNDGK

1	70	99,66	COG3321: Polyketide synthase modules and related proteins (ISS)	<i>Ostreococcus tauri</i>	1287903,6	8,65	gij118721415	48	100	Peptide NANQMTAKR NANQMTAKR QVNSIVASSVK ARVMAVGLNFR ARVMAVGLNFR LKPARQMCSK + Oxidation (M) LVPQTLHMRK + Oxidation (M) VHTCVSHPQIR TSLVCSAVGMLSR + Oxidation (M) TSLVCSAVGMLSR + Oxidation (M) SDRMWDSNHAR SSAFTAPNGLSQQR LGLPAGVNHISER GDVTAMEVAELRR + Oxidation (M) GDVTAMEVAELRR + Oxidation (M) YMHGLIEPLTVVR + Oxidation (M) DNQNKQIHPNAFK LNNEASTLAETMLR EIGVVQQFSMEER + Oxidation (M) EIGVVQQFSMEER + Oxidation (M) ENTTISISRFNSR LYSVHWYACPVK SMLNGGLGIGSRITK KPILATDSAFSVVPGR YGSFIREVDIFDAK EKTSPEVGNLSDVR WLVDPSLDIHTHR VTNALSELGMLSPDGR + Oxidation (M) QLYISGTHVELSSR LVVVYNTSRCELSR RCLWELSHYTVLK AMALELAVDGINVNER IGIYHIAPAIASIR EVSPDHLSDTSPSNKK EVSPDHLSDTSPSNKK SMDSQQRDLLLHALK NPQPPFFVQTVHAFSR NPQPPFFVQTVHAFSR STMTLFAVAGMLADDGR + 2 Oxidation (M) SCSLRFHVCGAHAHR ISIQWGAWVDLPGMMK + Oxidation (M) ISIQWGAWVDLPGMMK + Oxidation (M) LPLTLAFDFSSCVDAAR MGHSECAAGMGGICTLR EPRNLVWVGENGQVHLK IPTDRWDVDDTSTVHTIR DIILSPFVDSAMLSVNIQR + Oxidation (M) FASNTVAKTASAWQSHHSVK AVSFPNRVHMNVGTSFDLR + Oxidation (M) AIACAYSVLASPCVQDASVR AIACAYSVLASPCVQDASVR IMLNILGTGPEFHSARMTK + Oxidation (M) CEFQLSFDGLHSLYMLDHR + Oxidation (M) QAINDAFCVNLTAVSMFDHPTVR SGPIGQMNAQNTRHQDOLLNESK SGPIGQMNAQNTRHQDOLLNESK VYHCAGILHDALIPFQTASTCMR + Oxidation (M) SIVGHGEAASGILSIHFVIESQHR + Oxidation (M) Peptide LQGLPTGMSK + Oxidation (M) LQGLPTGMSK + Oxidation (M) LDMENCERLR + Oxidation (M) LWGGTKNLEVLK LENVSSNQDHR VQVNNLIYDVGLK DVPDQNLLELSMK EFQEKFFGLLEK FVDASNSQSLEHKK EIRESEGGYEDVK YCENLRSLPQLPR KGVSVFASEDSASDDR LPFCFFIFYEHR LPFCFFIFYEHR ARVSVVIFSENFASSK
1	67	99,29	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative	<i>Arabidopsis thaliana</i>	129792,8	8,56	gij22328803	17		

1	231	100	Fructose-1,6-biphosphatase, cytosolic; D-fructose-1,6-bisphosphate-1-phosphohydrolase	<i>Oryza sativa indica Group</i>	37468	5,55	gi 152032435	14	112	100	<p>DLPMGMSNMKYLAVLK ESEQGYEDVKAINLDTSNLPFK ITLSCSQVLLNVDLQYSPNIEK EFPSTLLETLSSEVLLDLENCKK</p> <p>Peptide YVLNEQSR YVLNEQSR YIGSMVADVHR LDVLSNEVFVK YIGSMVADVHR + Oxidation (M) YIGSMVADVHR + Oxidation (M) KLDVLSNEVFVK ALDLVPTKIHER TLLYGGVFLYPADK YVLNEQSRNPEAR YVLNEQSRNPEAR GDLTLLSHVILGCK TLLYGGVFLYPADKK TLLYGGVFLYPADKK SPIFLGSFEDVEEIK IYSVNEGNAKNWDEPTAK TCVLVSEEEDEATFVDPALR TCVLVSEEEDEATFVDPALR SPIFLGSFEDVEEIKGLYAAQAK VLYEVFPMSFLMEQAGGQSFTGK + 2 Oxidation (M)</p> <p>Peptide FSLAPLVPR FSLAPLVPR IGVIESLLEK RPFAAIVGGSK RPFAAIVGGSK VILSSHGRPK AAIPTIQYLIK AAIPTIQYLIK ELDYLVGAVSSPK ELDYLVGAVSSPK SVGDLTAADLEGKR FLKPSVAGFLLQK FLKPSVAGFLLQK GVSLLLPSDVIADK LVSELPNGSVLLENVR LVSELPNGSVLLENVR LASLADLYVNDAFGTAHR ADLNVPDDNQNTDTR ADLNVPDDNQNTDTR KLASLADLYVNDAFGTAHR</p> <p>Peptide LDEDATSRDK LDDPERGTVVEK AENEDMEISIPAAK AENEDMEISIPAAK AENEDMEISIPAAK + Oxidation (M) AENEDMEISIPAAK + Oxidation (M) FPWNQRIGLYQK FAMDDIFCYIQK MPKEMFGLSLLPR + 2 Oxidation (M) AENEDMEISTPAEK TIDVNAKPETYELTLK IEYLMSTMHTAEQQQSPSFR + Oxidation (M) TYFFLLFKGDPDYVYMEVELR + Oxidation (M) SPHWFESLEVSNTSPTWRVMQTK ETDSTEASQEKLQVAANGQYSSSDFER ETDSTEASQEKLQVAANGQYSSSDFER NSDLEIGPSVEAQESQESVNEEEQMKNEER + Oxidation (M)</p>
1	638	100	hypothetical protein Osl_20474	<i>Oryza sativa indica Group</i>	30520,5	6,86	gi 125552851	13	524	100	<p>Peptide LDEDATSRDK LDDPERGTVVEK AENEDMEISIPAAK AENEDMEISIPAAK AENEDMEISIPAAK + Oxidation (M) AENEDMEISIPAAK + Oxidation (M) FPWNQRIGLYQK FAMDDIFCYIQK MPKEMFGLSLLPR + 2 Oxidation (M) AENEDMEISTPAEK TIDVNAKPETYELTLK IEYLMSTMHTAEQQQSPSFR + Oxidation (M) TYFFLLFKGDPDYVYMEVELR + Oxidation (M) SPHWFESLEVSNTSPTWRVMQTK ETDSTEASQEKLQVAANGQYSSSDFER ETDSTEASQEKLQVAANGQYSSSDFER NSDLEIGPSVEAQESQESVNEEEQMKNEER + Oxidation (M)</p>
1	62	97,951	kinesin motor family protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	124641,3	4,76	gi 15238979	13			<p>Peptide LDEDATSRDK LDDPERGTVVEK AENEDMEISIPAAK AENEDMEISIPAAK AENEDMEISIPAAK + Oxidation (M) AENEDMEISIPAAK + Oxidation (M) FPWNQRIGLYQK FAMDDIFCYIQK MPKEMFGLSLLPR + 2 Oxidation (M) AENEDMEISTPAEK TIDVNAKPETYELTLK IEYLMSTMHTAEQQQSPSFR + Oxidation (M) TYFFLLFKGDPDYVYMEVELR + Oxidation (M) SPHWFESLEVSNTSPTWRVMQTK ETDSTEASQEKLQVAANGQYSSSDFER ETDSTEASQEKLQVAANGQYSSSDFER NSDLEIGPSVEAQESQESVNEEEQMKNEER + Oxidation (M)</p>

2	104	100	LHCII type I chlorophyll a/b binding protein	<i>Vigna radiata</i>	27900,1	5,29	gi 8954293	6	70	99,999	Peptide ELEVIHSR FGEAVWFK FGEAVWFK LAPSAPEVGR NRELEVIHSR NRELEVIHSR QVSSGSPWYGPDR QVSSGSPWYGPDRVK Peptide EVVPEHLVNAFYEV EKPTENFFDLSIQMVSLTG + Oxidation (M) VLVVLDISNVTQLDLLIGR REKPTENFFDLSIQMVSLTG + Oxidation (M) VLVVLDISNVTQLDLLIGRR Peptide ISGFSYAG IWDLESK LWNLTGCEK IYKISGFSYAG LWDLSTGVITTR LWDLSTGVITTR DVLSVAFSVDNR TVKVNLTNCK LWDLSTGVITTR LWDLSTGVITTR YWLC AATQDSIK TIKLWNTLGECK DGVTLWDLAEGKR HIVQDLKPEIPVSK HIVQDLKPEIPVSK FSPNTFQPTIVSGSWDR FSPNTFQPTIVSGSWDR FVGHDKDLSVAFSVDNR FVGHDKDLSVAFSVDNR LYSLDAGSIHSLCFSPNR YTIGGDLGGEGHNGWVSCVR YTIGGDLGGEGHNGWVSCVR Peptide GQTVGVIGAGR IVEADQFMR IVEADQFMR + Oxidation (M) IVEADQFMR + Oxidation (M) ANGEQPVTWK FVTAYGQFLK FVTAYGQFLK TTYHLINPER TTYHLINPER RIVEADQFMR RIVEADQFMR + Oxidation (M) ANGEQPVTWKR NAVVPHIASASK EGMATLAALNVLGK GPVIDEVALVEHLK GPVIDEVALVEHLK MNLIYYDLYQSTR MNLIYYDLYQSTR MNLIYYDLYQSTR + Oxidation (M) MNLIYYDLYQSTR + Oxidation (M) LLADNDCRLEICTETK AGGTAFSNMAVGYNNDVEAANR AGGTAFSNMAVGYNNDVEAANR AGGTAFSNMAVGYNNDVEAANR + Oxidation (M) AGGTAFSNMAVGYNNDVEAANR + Oxidation (M) EADVISLHPVLDKTTYHLINPER EADVISLHPVLDKTTYHLINPER
5	40	0	NBS-contaninig resistance like protein	<i>Corylus avellana</i>	17748,5	6,86	gi 225348922	5		100	
1	402	100	Os01g0686800	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	36665,1	5,97	gi 115439261	16	266	100	
1	379	100	Os02g0101500	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	42275,9	6,56	gi 115443619	14	270	100	

1	501	100	Os04g0234600	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	42131,3	5,64	gi 115457386	20	308	100	Peptide LINYYVK MFSPGNLR MFSPGNLR + Oxidation (M) MFSPGNLR + Oxidation (M) VINNLDER ATPDKNLR VNTARSLPSSGR FEETLYGSSR FEETLYGSSR LLICMGEAMR ATFDNPEYDK LLICMGEAMR + Oxidation (M) LLICMGEAMR + Oxidation (M) LLICMGEAMR + 2 Oxidation (M) LLICMGEAMR + 2 Oxidation (M) GIFTNVTSPYAK GIFTNVTSPYAK TVVAYGSKNEIIR TVVAYGSKNEIIR TVVAYGSKNEIIR EKGIFTNVTSPYAK LLFEALEYSHVCK YTGGMVDPVNIIVK QSVLDKVINNLDER YTGGMVDPVNIIVK + Oxidation (M) YTGGMVDPVNIIVK + Oxidation (M) METVAAASYTRGAATR + Oxidation (M) DCPPTHEFLLLDGCK NEIRFEETLYGSSR LTGVTGGDQVAAAMGIYGPR LTGVTGGDQVAAAMGIYGPR + Oxidation (M) LTGVTGGDQVAAAMGIYGPR + Oxidation (M) ATFDNPEYDKLINYYVK TASCGGTACVNSFGDEQLAVDMLADK Peptide LLDASHR VAINGFGR VAINGFGR IGRNFLR GKLNIALR AVALVLPNLK TLAEENVQAFR TLAEENVQAFR AAALNIVPTSTGAAK KTLAEENVQAFR KTLAEENVQAFR VVDLADIVANQWK VVDLADIVANQWK GTMTTTHSYTGDQR GTMTTTHSYTGDQR + Oxidation (M) GTMTTTHSYTGDQR + Oxidation (M) GDSPLDVIANDTGGVK GDSPLDVIANDTGGVK VPTPNVSVVDLVQVSKK VIAWYDNEWGYSOR VIAWYDNEWGYSOR GILEVCDVPLVSVDFR VPTPNVSVVDLVQVSKK VPTPNVSVVDLVQVSKK TLAEENVQAFRDSAANELK FGIKGTMTTTHSYTGDQR + Oxidation (M) FGIKGTMTTTHSYTGDQR + Oxidation (M) CSDVSTIDASLSMVMGDDMVK + Oxidation (M) CSDVSTIDASLSMVMGDDMVK + 2 Oxidation (M) CWHGRGDSPLDVIANDTGGVK GDSPLDVIANDTGGVKQASHLLK YDSTLGIFDADV KPVGDNAISVDGK YDSTLGIFDADV KPVGDNAISVDGK
1	793	100	Os04g0459500	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	43031,2	7,62	gi 115458768	21	589	100	

1	291	100	Os05g0388500	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	38926,9	6,86	gi 115463659	14	199	100	Peptide RFLEIQK YNDQQLR YNDQQLR TGVHHPFGK FVESAEAHFR FVESAEAHFR GPAFTPTTRPR EHDVPTAISLVK VDKTGIVHHPFGK TAYLCSMGPFSK + Oxidation (M) IAVLTQGEKIDQAR IAVLTQGEKIDQAR MNLDPKYNDQQLR + Oxidation (M) AAGADIVGGDLLIDQIK AAGADIVGGDLLIDQIK AGTVSPNITQAEFFK AGTVSPNITQAEFFK VDFPEEDLIANFMAVVR + Oxidation (M) GGFMEFDKLIASPDMMPK + 3 Oxidation (M)
1	503	100	Os06g0598500	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	48412,4	6,95	gi 115468792	23	271	100	Peptide IPPTYSK NHGMHFR AMHAVIDR NHGMHFR + Oxidation (M) NHGMHFR + Oxidation (M) AMHAVIDR + Oxidation (M) MSPQTETK + Oxidation (M) ACYECLR ALRLEDLR DTDILAAFR QKNHGMHFR QKNHGMHFR + Oxidation (M) QKNHGMHFR + Oxidation (M) DNGLLLHIHR DNGLLLHIHR FVFCAEAYK NHGMHFRVLAK LTYTPEYETK LTYTPEYETK LEDLRIPPTYSK DDENVNSQPFMR NYGRACYECLR TFGPPPHGIQVER TFGPPPHGIQVER MSGGDHIHAGTVVGK + Oxidation (M) YGRPLLGTIKPK YGRPLLGTIKPK VMKLSQQLANGVLN + Oxidation (M) TFGPPPHGIQVERDK GHYLNATAGTCEEMIK GHYLNATAGTCEEMIK + Oxidation (M) GHYLNATAGTCEEMIKR GHYLNATAGTCEEMIKR + Oxidation (M) GGLDFTKDDENVNSQPFMR + Oxidation (M) GGLDFTKDDENVNSQPFMR + Oxidation (M)
1	168	100	Os07g0556200	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	24211,3	8,54	gi 115472727	6	131	100	Peptide TGDNPWWA GDPTYLVVEADK LGNDVLAEEWLK VLFVWVETDFR VLFVWVETDFR DKLGNVLAEEWLK DKLGNVLAEEWLK FICPCHGSQYNNQGR FICPCHGSQYNNQGR

1	482	100	Os11g0171300	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	42207,6	6,38	gi 115484401	16	351	100	Peptide TFEVAQK EAAWGLAR ANSLAQLGK AAQDALLR AAQDALLR IVDLTEQK TWGGQPENVK YTSDGEAAEAK EAAYYQGGAR EAAYYQGGAR KIVDLTEQK ATPEQVSDYTLK ATPEQVSDYTLK LASIGLENTEANR LASIGLENTEANR MASATLLKSSFLPK TVVSIPNGPSELAVK TVVSIPNGPSELAVK RLASIGLENTEANR GILAMDESATCGKR GILAMDESATCGKR + Oxidation (M) YAAISQDNGLVPIVEPEILLDGEHGIDR
1	457	100	Os12g0420200	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	41620,6	8,59	gi 115488340	18	294	100	Peptide FIGVFLSR FIGVFLSR NILVMGGTR QVFNISGAK NILVMGGTR + Oxidation (M) YVTFDGLAR YVTFDGLAR EGHQVTLFTR EGHQVTLFTR GDRQDFDFVK ASKQVFNISGAK GFDVYDINGR GFDVYDINGR GKLETESLLETR AADFTTDDMILGKK AADFTTDDMILGKK + Oxidation (M) LLVKEGHQVTLFTR LLVKEGHQVTLFTR AGGFPEPEIVHYNPK AGGFPEPEIVHYNPK SDLLPHFETDAVDPK SDLLPHFETDAVDPK AFPFRDQHFFASIEK AFPFRDQHFFASIEK QVFNISGAKYVTFDGLAR AGRPIPVPGAGNQITQLGHVK AGRPIPVPGAGNQITQLGHVK AGGFPEPEIVHYNPKDFDFGK GKAPITQQLPGESDAEYAEFSSK GKAPITQQLPGESDAEYAEFSSK
3	219	100	oxygen-evolving complex protein 1	<i>Oryza sativa</i>	26603,4	5,13	gi 739292	7	146	100	Peptide NAPPEFQK VPFLTIK VPFLTIK RLTFDEIQSK RLTFDEIQSK FCLEPSTFTVK KFCLEPSTFTVK DGIDYAAVTQLPGGER NLVATGKPESFGGPFVPSYR NLVATGKPESFGGPFVPSYR

1	242	100	putative chaperonin 21 precursor	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	26330	7,71	gi 51090748	8	180	100	Peptide YTSLKPLGDR YTSLKPLGDR GADGTNYIVLR GADGTNYIVLR YAGTEVQFNDTK YAGTEVQFNDTK SSVQLSGAGVAVAFTK VAEAEKTAGGLILTETTK YAGSEFKGADGTNYIVLR EKPSIGTVVAVGPGPLDDEGKR TVGGILLPSTAQSKPQGGEVAVGEGR
1	149	100	putative ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	41094,6	7,98	gi 41052915	15	43	99,366	Peptide LDFAVSR FRLDFAVSR DGIDWLDYKK YRPKEPYTGR KSEQWNEVY DNTYVVMCGLK LVYTNDQGEIVK DNTYVVMCGLK + Oxidation (M) EGQSIGVIPDGIDK KDNTYVVMCGLK KDNTYVVMCGLK + Oxidation (M) RLVYTNDQGEIVK LYSIASSAIGDFADSK MAEYKDELWELLK + Oxidation (M) GVCNSFLCDLKPQSDVK DPNATIIMLGTGTGIAPFR + Oxidation (M) DPNATIIMLGTGTGIAPFR + Oxidation (M) EGQSIGVIPDGIDKNGKPHK
1	134	100	putative peroxidase	<i>Oryza sativa japonica Group</i>			gi 51038244	8		100	Peptide RVNTHHY LIFHDCFVR LIFHDCFVR LTAPPEQILPGYR LTAPPEQILPGYR DLPDSTFTISELIR KFELDNSYHHNLLAR KFELDNSYHHNLLAR

1	644	100	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	<i>Thamnocalamus spathiflorus</i>	52729,4	6,32	gi 144583418	26	381	100	<p>Peptide</p> <p>NHGMHFR + Oxidation (M)</p> <p>AMHAVIDR + Oxidation (M)</p> <p>ACYECLR</p> <p>ALRLEDLR</p> <p>DTDILAAFR</p> <p>DTDILAAFR</p> <p>VALEACVQAR</p> <p>QKNHGMHFR + Oxidation (M)</p> <p>DNGLLLHIHR</p> <p>DNGLLLHIHR</p> <p>FVFCAEAIYK</p> <p>FVFCAEAIYK</p> <p>EMTLGFVDLLR + Oxidation (M)</p> <p>AIKFEPVVDK</p> <p>LYYTPEYETK</p> <p>LEDLRIPPTYSK</p> <p>DDENVNSQPFMR</p> <p>TFGGPPHGIQVER</p> <p>TFGGPPHGIQVER</p> <p>MSGGDHIIHAGTVVVGK + Oxidation (M)</p> <p>YGRPLLGCTIKPK</p> <p>YGRPLLGCTIKPK</p> <p>DRFVFCAEAIYK</p> <p>WSPELAAACEIWK</p> <p>TFGGPPHGIQVERDK</p> <p>LEGEREMTLGFVDLLR + Oxidation (M)</p> <p>EMTLGFVDLLRDFIEK + Oxidation (M)</p> <p>GGLDFTKDDENVNSQPFMR</p> <p>GGLDFTKDDENVNSQPFMR</p> <p>GGLDFTKDDENVNSQPFMR + Oxidation (M)</p> <p>GGLDFTKDDENVNSQPFMR + Oxidation (M)</p> <p>LYYTPEYETKDTDILAAFR</p> <p>LYYTPEYETKDTDILAAFR</p> <p>ELGVPIVMHDYLTGGFTANTTLAHYCR</p> <p>VTPQPGVPEEAGAAVAESSTGTWTVWTDGLTSLDR</p> <p>Peptide</p> <p>FLTDGVLIR</p> <p>FLTDGVLIR</p> <p>LEIVLQYLTKYIPKPVVR</p> <p>VNESEESDLKILGNMFLFK</p> <p>LLMKDYLSLTMCASIDAEK + 2 Oxidation (M)</p> <p>VMSGYGSLEANTLAMIDSTGAK + 2 Oxidation (M)</p> <p>DMLTAMKELLMIMELDTSK + Oxidation (M)</p> <p>LNRCNLEYVSMQSVWIAR</p> <p>ESFLNLLVHPTINGSETSIASR</p>
1	37	100	RNA helicase like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	111232,1	8,15	gi 2832651	8			<p>Peptide</p> <p>ALGGHMRI + Oxidation (M)</p> <p>ALGGHMRI + Oxidation (M)</p> <p>GFSSGKALGGHMR + Oxidation (M)</p> <p>GFSSGKALGGHMR + Oxidation (M)</p> <p>VDYQDLQVMSGTLWIQLK</p> <p>VDYQDLQVMSGTLWIQLK</p> <p>VDYQDLQVMSGTLWIQLK + Oxidation (M)</p> <p>VDYQDLQVMSGTLWIQLK + Oxidation (M)</p>
	37		tapetum-specific zinc finger protein 1	<i>Petunia x hybridatapetum-specific zinc finger protein 1</i>			gi 14522848	8			<p>Peptide</p> <p>ALGGHMRI + Oxidation (M)</p> <p>ALGGHMRI + Oxidation (M)</p> <p>GFSSGKALGGHMR + Oxidation (M)</p> <p>GFSSGKALGGHMR + Oxidation (M)</p> <p>VDYQDLQVMSGTLWIQLK</p> <p>VDYQDLQVMSGTLWIQLK</p> <p>VDYQDLQVMSGTLWIQLK + Oxidation (M)</p> <p>VDYQDLQVMSGTLWIQLK + Oxidation (M)</p>
1	57	93,37	U-box domain containing protein	<i>Zea mays</i>	44877,2	8,6	gi 226491219	8			<p>Peptide</p> <p>CPISLDVMR</p> <p>CPISLDVMR + Oxidation (M)</p> <p>CPISLDVMR + Oxidation (M)</p> <p>AGGAAETVAVSLRR</p> <p>QMTSELLKIFR</p> <p>ILEADAGSPSQALR</p> <p>ILEADAGSPSQALR</p> <p>AEMVRLGAVPAVR + Oxidation (M)</p> <p>RAVAAAAACESGLTK</p> <p>AAVCESAGSAVPAVVSMMMK</p> <p>LAAFLSDDDDVDFDKNALAR</p> <p>LAAFLSDDDDVDFDKNALAR</p>

D. Anexo: Desviaciones estándar de las intensidades ópticas de las proteínas identificadas por MS/MS

Proteína	Variedad 2			Variedad 3		
	Control	Insecto	Virus	Control	Insecto	Virus
PAR1 complex component	71098,1 ± 2325,1	69327 ± 4601	59485,3 ± 7509,4	46990 ± 10352,3	36168,2 ± 20388,2	57105,4 ± 26117
ribulose bishosphate carboxylase /oxygenase activase, chloroplast precursor, putative expressed	63793,7 ± 3865,2	46744 ± 11502,5	11573 ± 2531,7	31881 ± 1657,1	76599,3 ± 21101,5	14605,7 ± 2390,6
ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit	25382,9 ± 3615,8	20218 ± 2888,6	10828,7 ± 5319,6	81544 ± 27031,2	18931,8 ± 4940,7	48556,7 ± 25537
triosephosphate isomerase	23373 ± 1699,8	25108 ± 4371,7	18807,2 ± 4021,9	13967 ± 4920,2	19847,4 ± 3407	52649,7 ± 31514
40S ribosomal protein S26	52742,3 ± 2993,4	46931 ± 302,6	40915,8 ± 3421,9	30317 ± 4007,9	38103,7 ± 9454,7	33681,5 ± 13915
ATP synthase CF1 beta subunit	85895 ± 11045	80845 ± 32668,4	84463 ± 747,6	72470 ± 8364,6	189041 ± 67960,2	183629 ± 17395

adenosine diphosphate glucose pyrophosphatase	42820,1	±	2475,2	51473	±	1916,6	82759,3	±	60977	59475	±	9545,5	50114	±	14049,8	58462,4	±	14495
ATP synthase CF1 alpha subunit	92091	±	20846,1	79878	±	12934,4	116662	±	13403	26571	±	10147,9	142495	±	47873,6	41146	±	13377
chloroplast 23 kDa polypeptide of photosystem II	203232	±	9855,4	202234	±	4932,9	160366	±	24642	236859	±	27569,3	196755	±	6766	224097	±	2126,1
254 aa Similar to 23 kDa polypeptide of photosystem II	52833,1	±	10838,5	49410	±	3114,3	69700,4	±	3646,9	83091	±	3800,5	76470,2	±	5114,7	77952,3	±	3890,1
Fructose-bisphosphate aldolase, chloroplast precursor putative expressed	105292	±	4185,3	126015	±	13003,6	72113	±	3530,1	95467	±	6815	72388	±	19686,2	95663	±	23693
oxygen evolving complex protein 1	160462	±	3854,2	127030	±	28403	130555	±	5643	191942	±	14627	178408	±	20453,7	154528	±	11541
putative photosystem I reaction center subunit IV	195933	±	7338,6	179781	±	9488,1	152334	±	23868	298681	±	52720,9	161865	±	14796,8	172204	±	11007
manganese superoxide dismutase	15369,2	±	2394,69	17078	±	2089,6	9463,6	±	3805,5	8664,8	±	1760,34	12704,6	±	3368,41	12715,5	±	489,61
Photosystem II stability/assembly factor HCF136; chloroplastic; flags precursor	35735,7	±	7407,8	28293	±	1523,1	34089,3	±	8323,5	23205	±	1349,3	21449,6	±	3040,4	43868,4	±	15448
Os06g0157000	19097,9	±	214,74	17556	±	3387,15	11032,8	±	1602,8	17978	±	2563,75	21999,7	±	3147,6	11933,9	±	1781,9
Superoxido dismutasa (Zn- Cu)	89662	±	7763,99	121180	±	4420,4	56762	±	7443,9	95461	±	2384,75	75400	±	5011,32	36330	±	8262,8
FHA	59530	±	5258	46599	±	3214	58857	±	3078	101675	±	14530	81325	±	5407	592347	±	258483
NBS-containing resistance like protein	33330	±	9526	16980	±	1683	408995	±	130158	232499	±	89615	101140	±	15156	276492	±	138281
333 aa Similar to Photosystem II oxygen- evolving complex protein 1 (Fragment)	279748	±	7605,2	269116	±	3605,7	184576	±	15259	227848	±	20226,8	220634	±	2085,5	219851	±	3519
171 aa Similar to PSI type III chlorophyll a/b-binding protein	38776,3	±	2683,9	16129	±	1501	33991,8	±	5684,7	28281	±	10173,4	33270	±	3017,7	29864,9	±	16584
369 aa "Similar to Glycolate oxidase (EC	14609,8	±	1692,94	13367	±	1295,75	42256,3	±	5645	16177	±	1481,39	10180,1	±	810,17	16331,4	±	1935,4

1.1.3.15) fragment - 369 aa Peroxisomal (S)-2- hydroxy-acid oxidase GLO1; Glycolate oxidase 1; Short chain alpha-hydroxy acidoxidase GLO1; GOX 1; OsGLO1oxidase GLO1; GOX 1; OsGLO1																			
341 aa Lipolytic enzyme, G-D-S-L family protein;	19097,9	±	214,74	17556	±	3387,15	11032,8	±	1602,8	17978	±	2563,75	21999,7	±	3147,6	11933,9	±	1781,9	
213 aa "Similar to Germin- like protein 1 precursor;	72727,9	±	12401,9	90006	±	5462,7	33384,6	±	7892,5	80991	±	16079,7	99041,3	±	16791,6	72488,8	±	15637	
388 aa Fructose- bisphosphate aldolase, chloroplast precursor (EC 4.1.2.13) (ALDP)	125304	±	12333,1	125214	±	354,9	67032	±	5272,3	40442	±	8020,3	83113	±	6238,6	112020	±	24087	
376 aa NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein	19905,1	±	2816,6	18399	±	3149,1	10479,5	±	4297,5	81073	±	25401,1	27077,4	±	4340,5	28583,6	±	9920,7	
putative chitinase	52364,8	±	3428,69	43056	±	3110,5	17594,6	±	2967,4	44623	±	5751,42	41870,5	±	8475,08	27728,5	±	6272,4	
catalase	ND			7347,6	±	1694,15	ND			ND						13662,8	±	1436,2	
214 aa Similar to Inorganic pyrophosphatase-like protein contains InterPro domain	ND			ND			11964	±	2749,8	17322	±	2039,14	7582,4	±	1388,06	39535,8	±	7784,7	
250 aa Peptidyl-prolyl cis- trans isomerase, cyclophilin type domain containing protein;	ND			16659	±	1732,35	ND			28192	±	4134,45	ND			ND			
predicted protein	ND			ND			360614	±	23241	ND			ND			545427	±	150689	
428 aa Glutamine synthetase shoot isozyme, chloroplast precursor (EC 6.3.1.2) (Glutamate-- ammonia ligase) (Clone lambda-GS31);	24340,1	±	7560,5	13036	±	3666	55041,6	±	18705	ND			25068,5	±	8664,2	96914,9	±	19610	
hypothetical protein	155031	±	79462,6	38499	±	12832,9	ND			ND			51705	±	174,4	ND			

hypothetical protein OsJ_03591	28751,5	±	124,8	58183	±	7035,7	ND		34070	±	10395,2	37918,5	±	4003,8	25015,8	±	5088
353 aa Haem peroxidase family protein	10828	±	1876,1	13430	±	1838,5	ND		20140	±	4105,05	ND			ND		
hypothetical protein Osl_032171	40211	±	4918,4	38964	±	12988	36767,3	±	5160,2	ND		35133,6	±	3699,5	33553	±	6437,3
356 aa Glutamine synthetase shoot isozyme (EC 6.3.1.2); (Glutamate-- ammonia ligase) (Clone lambda-GS28); (Glutamate--ammonia ligase) (Clone lambda- GS28)	13471,4	±	1615,01	13036	±	3666	9468	±	2327,4	ND		11322,5	±	1680,11	21110,6	±	1943,1
putative ferredoxin- NADP(H) oxidoreductase	71325	±	5918,3	104991	±	8400,5	20699	±	8565,2	65527	±	17303,9	ND		ND		
402 aa Similar to GADPH (383 AA) (Fragment)	18799,2	±	3379,8	19653	±	486,9	15758,8	±	4041,8	ND		ND			42970,1	±	13944

Para la variedad Fedearroz 2000

Proteína	Control		Insecto		Virus		F	p-value			
hypothetical protein OsJ_20187	22064,5	±	3306,43	16146,5	±	2460,45	16108,6	±	1959,17	1,64	ns
1383 aa	132634	±	66685,1	21695	±	10333,4	79540	±	34337,1	1,1	ns
Putative trasnketolase 1 (Oryza sativa Japonica Group)	20914,2	±	6958,6	56015,3	±	15456,6	28440,4	±	12441,2	2,3	ns
MUB4	43307	±	9696,1	37545,1	±	8310,35	ND			0,17	ns
auxin-binding protein ABP20 precursor - Germin and germin-like protein	18636,3	±	2590,92	26977,2	±	1321,15	ND			5,72	ns

901 aa "Protein of unknown function DUF869, plant family protein	ND	ND	483562	±	44670,9
predicted protein	ND	ND	275979	±	66767,4
predicted protein	ND	ND	508404	±	47608,2
fosfoglicerato kinasa putativa 444 aa Similar to Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.13) (Fragment)	ND	ND	112734	±	24232,3
	ND	ND	21347,5	±	2110,3

Para la variedad Colombia I

Proteína	Control	Insecto	Virus	F	p-value
LHCII type I chlorophyll a/b binding protein	113532 ± 75015,1	52436 ± 10124,9	18822 ± 1758,1	1,21	ns
255 aa "Rieske iron-sulfur protein family protein	51569,8 ± 11665,2	34028,5 ± 11222,1	31440,9 ± 8384,6	1,08	ns
376 aa NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein	57608,5 ± 15591,3	35494,4 ± 6048,6	27259,3 ± 5953	2,35	ns
ribulose-1,5-bisphosphae carboxylase/oxygenase large subunit	137463 ± 35718,9	58185 ± 10437,8	148302 ± 33521,8	2,89	ns
ribulosebiphosphate carboxylase	31979,6 ± 11539,1	16019,7 ± 6403,3	57794 ± 17782,1	2,72	ns
U-box domain containing protein	18531,5 ± 2907,1	33270 ± 3017,7	73172,4 ± 50888,6	0,92	ns
304 aa "Similar to Triosephosphate isomerase, chloroplast precursor (EC 5.3.1.1) (TIM) (Triose-phosphate isomerase)	ND	46732 ± 18649,9	20944 ± 3200,9	1,86	ns
putative chaperonin 21 precursor	ND	8958 ± 405,63	13982,3 ± 1946,59	6,38	ns

chain O, crystal structure and functional analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from <i>Oryza sativa</i>	ND			33880,2	±	9022,19	37833,3	±	8283,38	0,1	ns
Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplast precursor putative expressed	ND			41286	±	10102,3	14911,3	±	4813,8	5,55	ns
RNA helicase like protein	ND			14558,4	±	215,1	92632,9	±	37822,3	4,26	ns
hypothetical protein Osl_20474	ND			150132	±	42952,6	120972	±	15467,4	0,41	ns
Chain A, Crystal structure of rice alpha galactosidase	9080,33	±	2481,2	ND			ND				
386 aa "Similar to NADH-dependent hydroxypyruvate reductase (EC 1.1.1.29) (Fragment)	6389,8	±	2109,54	ND			ND				
tapetum-specific zinc finger protein 1	58221,2	±	24700,8	ND			43908,9	±	25063,5	0,17	ns
armadillo/beta-catenin repeat family protein	ND			ND			12721,1	±	2322,66		
COG3321: Polyketide synthase modules and related proteins (ISS)	ND			ND			59959,2	±	9204,49		
disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative	ND			ND			145961	±	24655,7		
Fructose-1,6-biphosphatase, cytosolic; D-fructose-1,6-bisphosphate-1-phosphohydrolase	ND			ND			15640,8	±	1715,01		
kinesin motor family protein	ND			ND			139785	±	35727		
334 aa "Guanine nucleotide-binding protein beta subunit-like protein (GPB-LR) (RWD)	ND			ND			21758,2	±	4104,78		
359 aa "Similar to 50S ribosomal protein L1;	ND			ND			8909,03	±	1673,77		
50 S ribosomal protein L21	ND			25475,3	±	7926,26	ND				
392 aa "Similar to Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplast precursor (EC 3.1.3.37) (Sedoheptulose-bisphosphatase) (SBPASE) (SED(1,7)P2ASE);	ND			62247,1	±	4192,8	ND				
putative peroxidase	ND			55344,7	±	33165,6	ND				

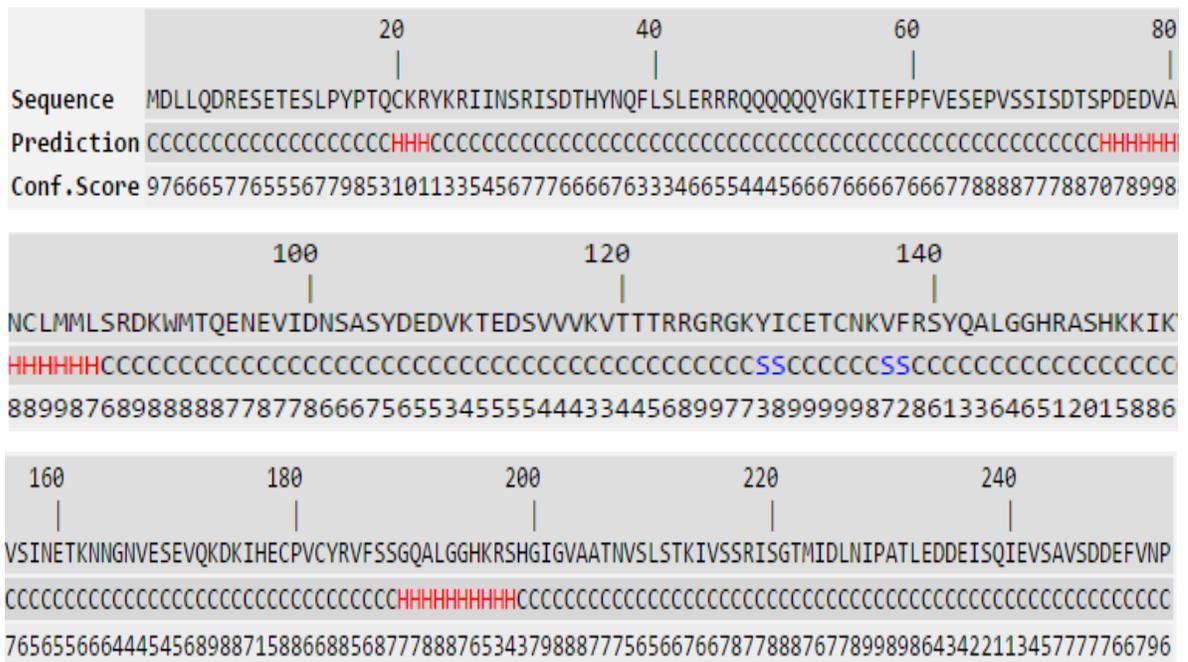
E. Anexo: Predicción de estructura de las proteínas seleccionadas

Predicción de estructura :

1. Proteína tapetum-specific zinc finger protein 1, usando el servidor I-TASSER:

MDLLQDRESETESLPYPTQCKRYKRIINSRISDTHYNQFLSLERRRQQQQQQYGKITEFP
 FVESEPVSSISDTSPEDEVANCLMMLSRDKWMTQENEVIDNSASYDEDVKTEDSVVVKVTTTRRGR
 GKYICETCNKVFRSYQALGGHRASHKKIKVSINETKNNGNVESEVQDKIHECPVCYRVFSSGQAL
 GGHKRSHGIGVAATNVSLSTKIVSSRISGTMIDLNI PATLEDEDEISQI
 EVSAVSDDEFVNP

Figura A 2.1. Predicción de la estructura secundaria de la proteína tapetum-specific



zincfingerprotein 1

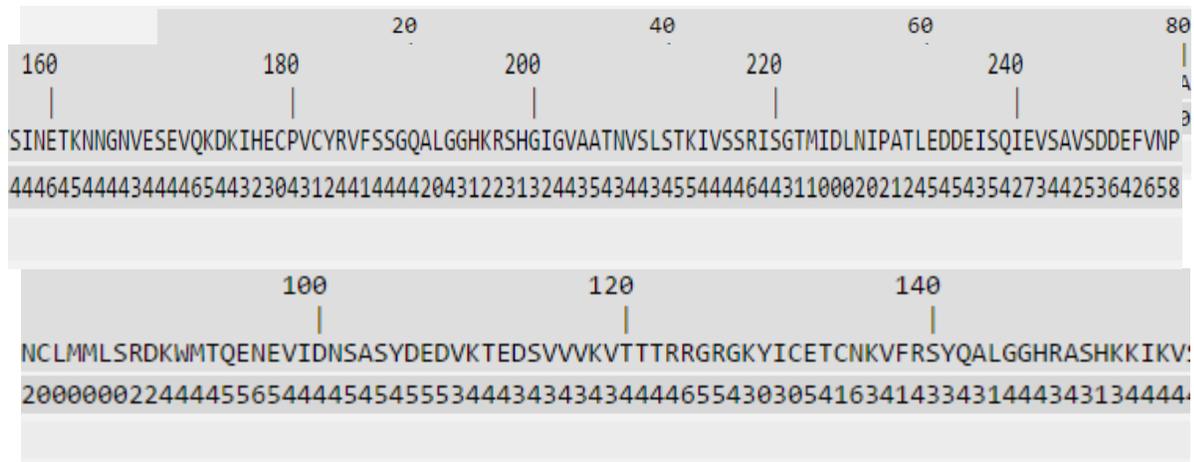


Figura A2.2. Predicción de la accesibilidad a solvente para la proteína tapetum-specific zinc finger protein 1

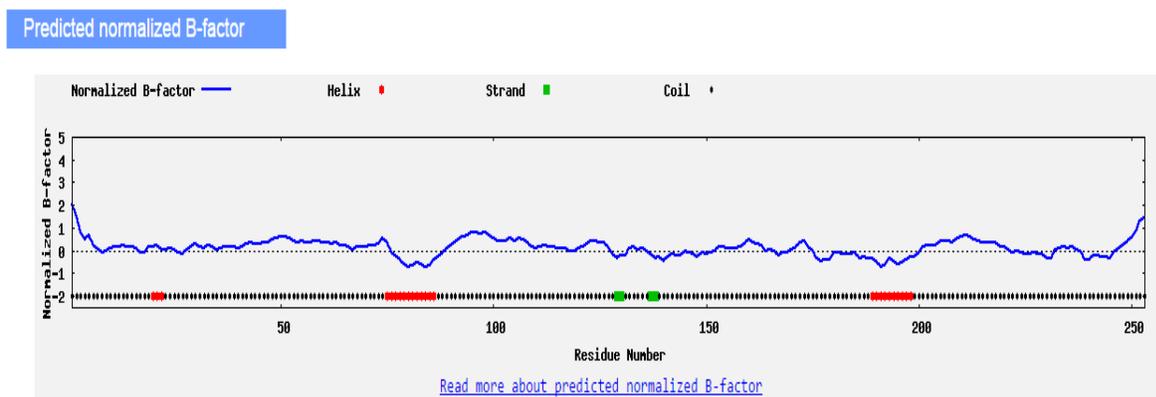


Figura A2.3. Factor B Normalizado Predicho

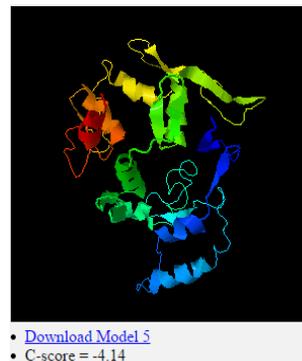
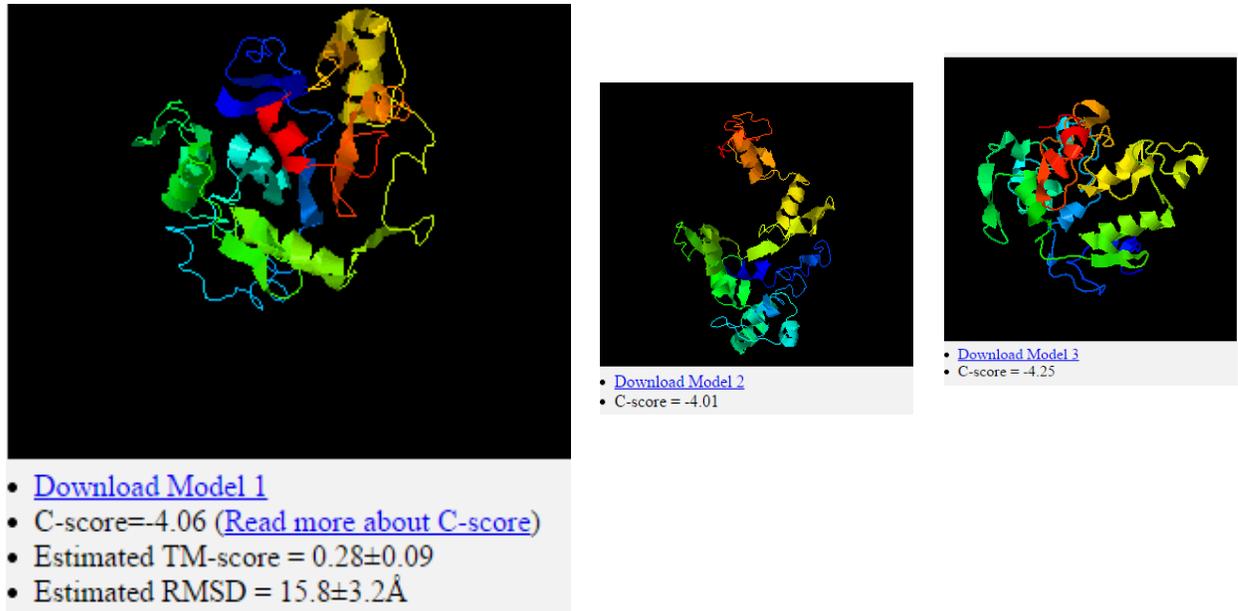


Figura A2.4. Modelos que resultaron de la predicción de estructura terciaria de la proteína tapetum-specific zinc fingerprotein 1. Usando el servidor I-TASSER para la proteína Tapetum –specifig finger zinc protein.

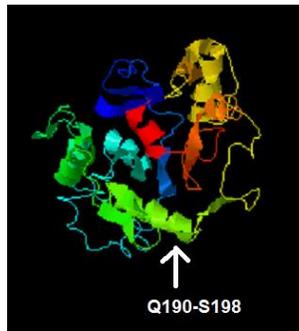


Figura A2.5. Secuencias seleccionadas a partir del análisis de la estructura tridimensional de la proteína tapetum-specific zinc fingerprotein 1.

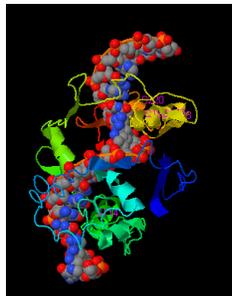


Figura A 2.6. Predicción de sitio de Unión proporcionado por el servidor de I-TASSER. Para la proteína tapetum-specific finger zinc protein

Proteína MUB4:

MPEEDLVELKFRLYDGSVDVGFQYSPTATVSMLEKERVSEWPKDKKIVPKSASDIKLINAGKILEN
GKTVAQCKAPFDDLPKSVITMHVVVQLSPTKARPEKKIEKEEAPQRSFCSTIM

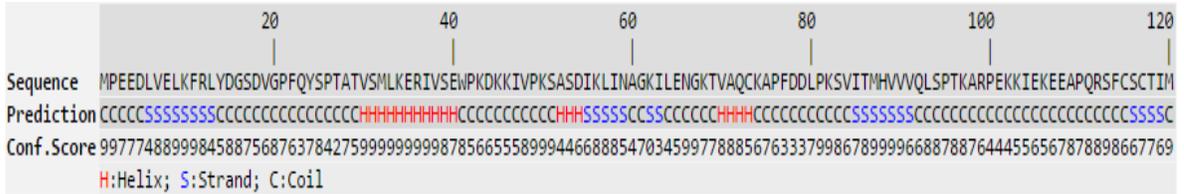


Figura A2.7. Predicción de la estructura secundaria de la proteína MUB4.

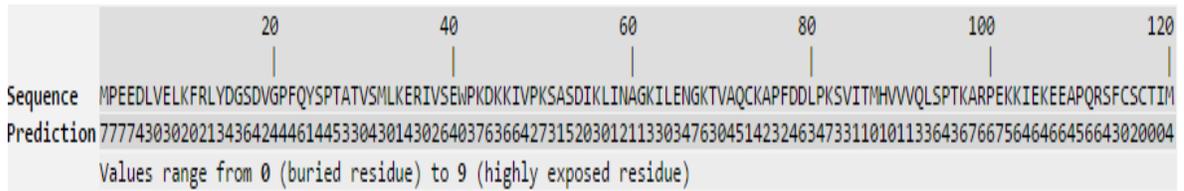


Figura A2.8. Predicción de la accesibilidad a solvente para la proteína MUB4.

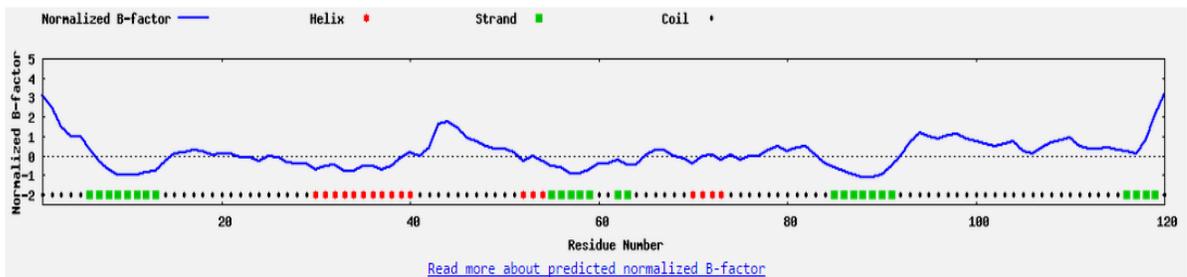


Figura A2.9. Factor B Normalizado Predicho

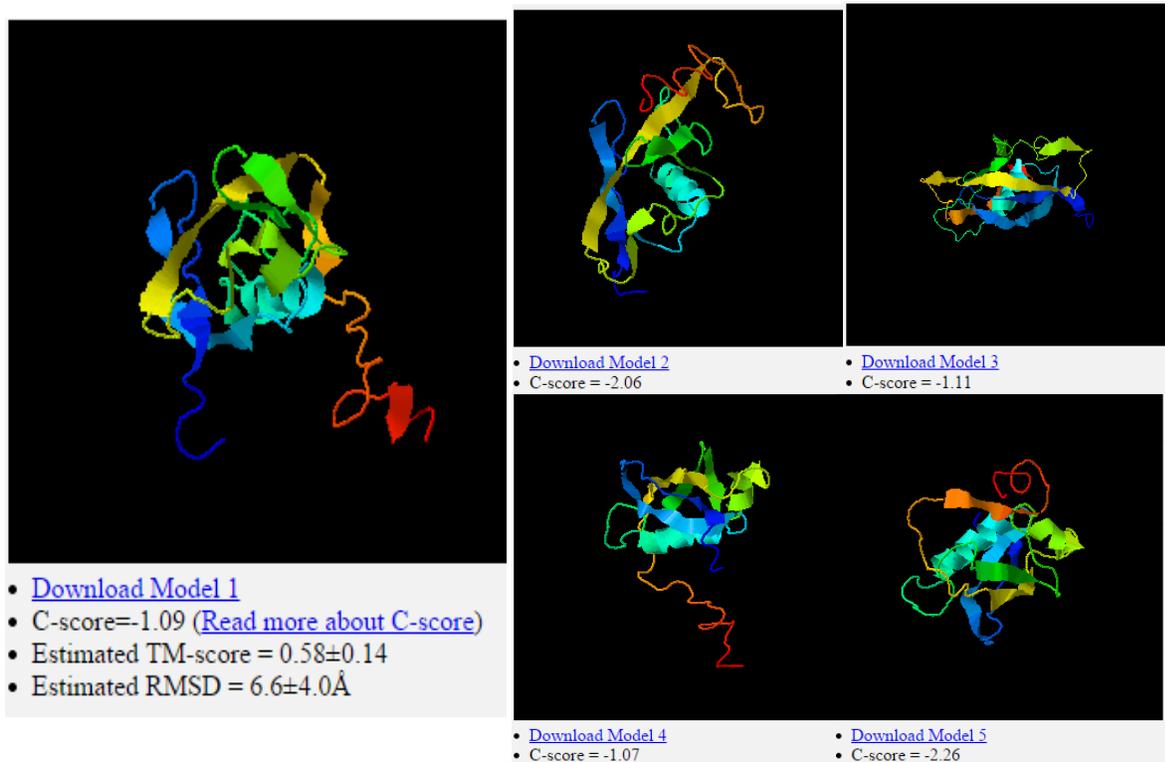


Figura A2.10. Modelos que resultaron de la predicción de estructura terciaria de la proteína MUB4 Usando el servidor I-TASSER.

Se seleccionó una subestructura lineal comprendida entre los residuos de aminoácido Glu-101y Ala-109 (EKKIEKEEA), como se muestra en la figura x5.

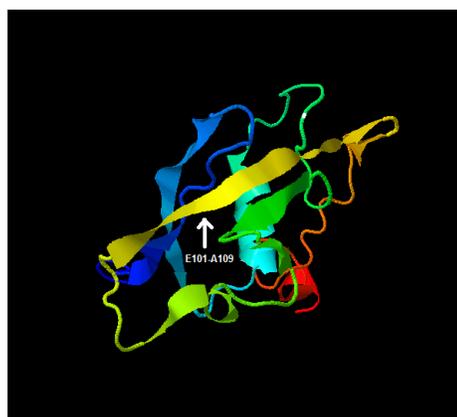


Figura A2.11. Secuencias seleccionadas a partir del análisis de la estructura tridimensional de la proteína MUB4.

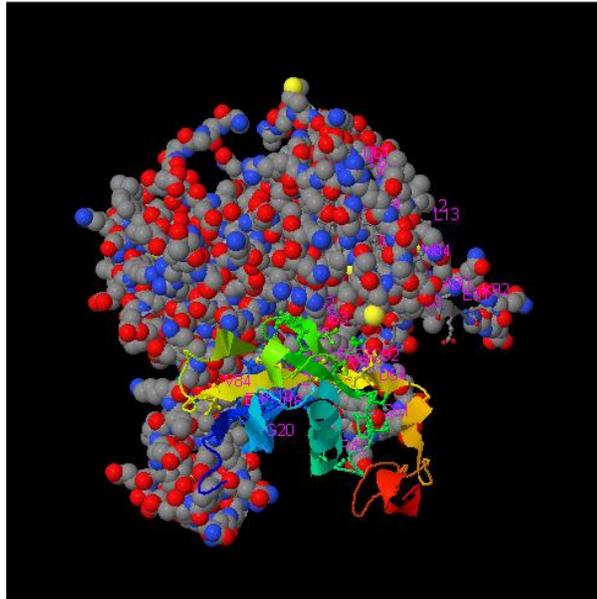


Figura A2.12. Predicción de sitio de Unión proporcionado por el servidor de I-TASSER.

2. Armadillo/beta-cateninrepeatfamilyprotein:

```

MEIQTAESNVICSIDIFESLSDSVDVAKKLVKESQESNEAESTDRLRSIEAGFEGVVKQMGETLQS
IPESTFDEEEYIGVVIQSLSNEMQNATIGDGSKSEMINNGQKISAKHTPDIVSEQMEEDLYPTDP
EFSYESYMMYSESQSQMTDIPDIPSKSTDVSRQRKHGHNHSESQSLVTEIPDIPSQSTNVSSQRKHG
NLSKSQSQSTEIPDIPSQSSNASSQRKYGNLSELSMLPQVTQFMPEPPYQAFICPLTKEIMEDPVT
TETGVTCTERQAVIEWFDSFGNSDEINCPVTGQKLTTTELSANVVLKTI IQEWKVRNEAARIKVAHAA
LSLGGSESMVIDALRDLQMTCEGKEYNKVQVREAGIIQLLDRYLTYRSKDVRFELLKFLRTLADDEE
TDDGKEMIVKTIITMSCVIKLLGSSHQPVRHAAQALLELSKSKQHACEKIGTARGAILMLVTAKYNR
ELDSFASETSDQILRNLEKCPENIKQMAESGLLEPLLGHLAGSEETQVAMAAYLVEIDIGHEKKT
YVAEKACPALIGLVQSENIDARRAAFKAHAHISLYHPNNKILVEVGI IKIMVEEMFTKRVFSDLMN
SRNEAATILANILESGLEHETFEVNTHGHTLGSDYFVYNI IHMLKNSSPDDLNIIDLIRILLSLSKS
PRAMATIVSVIKETDASFAMIELINNPDELGVGALKLLIALTPYIGHTLSERLCKTRGQPENLIQ
CPVEANQITEKHAWSAKLLAKLPHQNLTLNLALVNESIVSEILHAIHLIQRSGARTSRYATDFLEG
LVGILVRFRTTTLYEPQMMYLARNHDLTSVFDLLMKTSSDEVQRLSATGLENLSSTTMTLSRPPQP
RSTKFMGSLSMPRFSFLRSSKKKQIEICAIHRGVCSAKNTFCLVEANAITKLLACLQSDKVEEVES
ALAAICTLLDDKVEVEKSLSMLESEMNAVQLILNAVKEHKKESLLQKAFWMIDKFIIRGGDKYASEI
SQDRMLSGLESEKILKVKRDKSHDWCAEISVERGDGGEIWGKIVWVGAVYKLDPLSHSFSVKVLHS
ASVHV

```

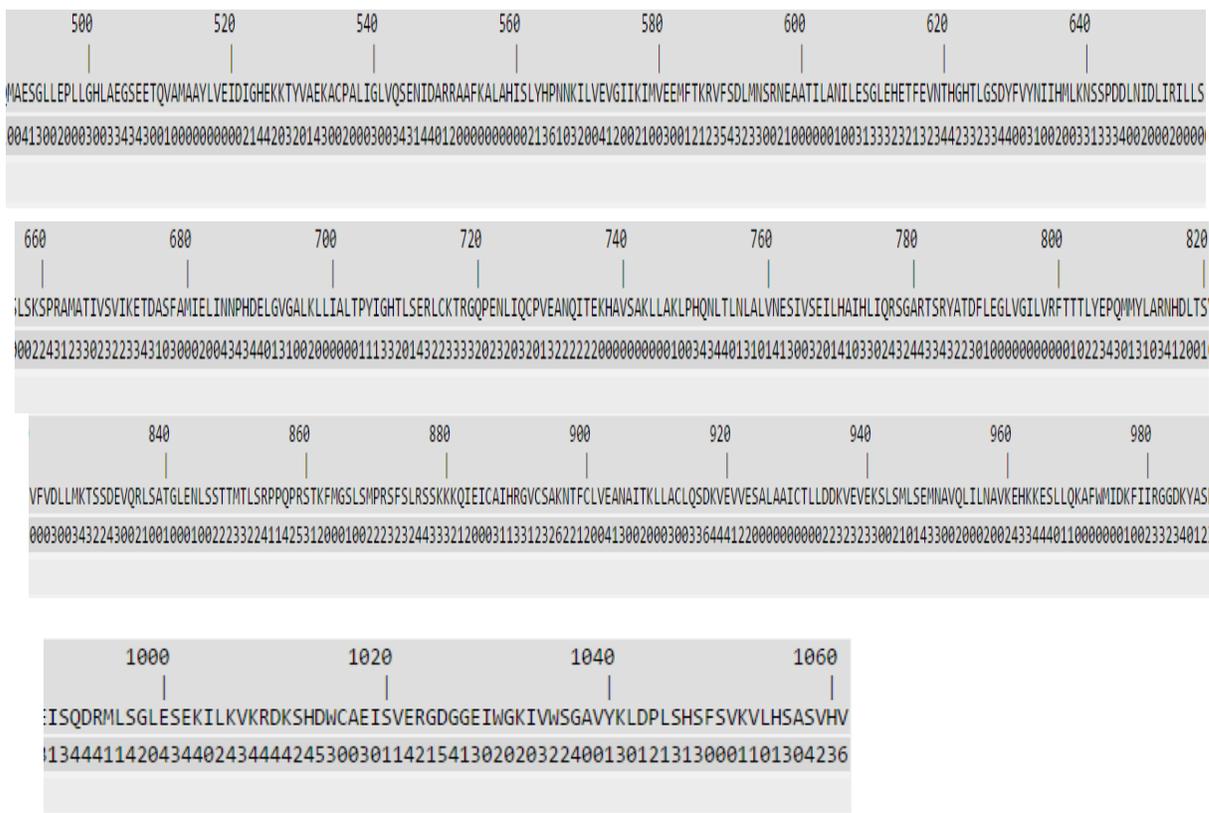



Figura A2.14. Predicción de la accesibilidad a solvente para la proteína Armadillo/beta-cateninrepeatfamilyprotein.

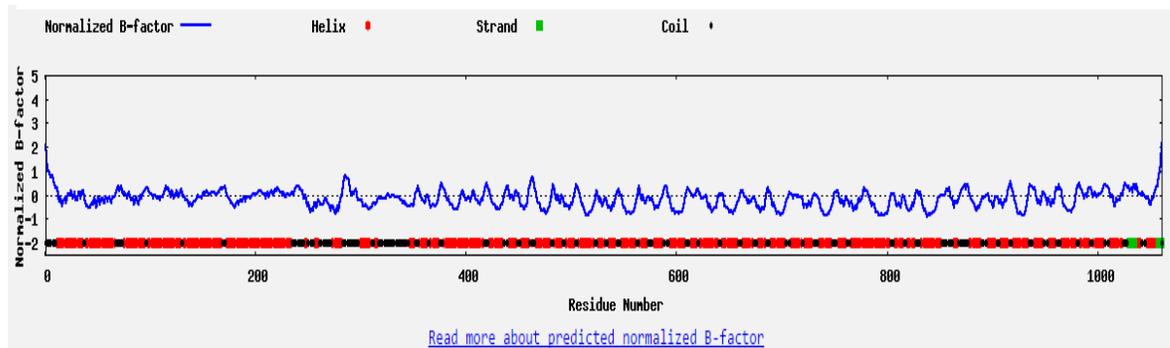
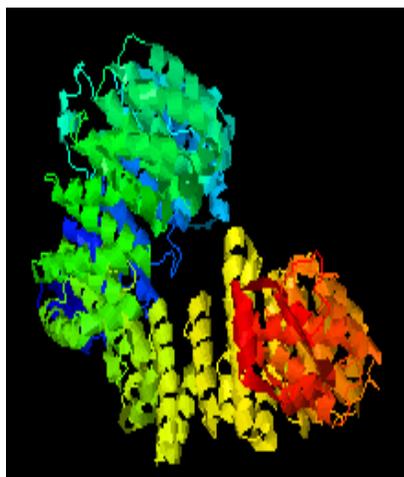
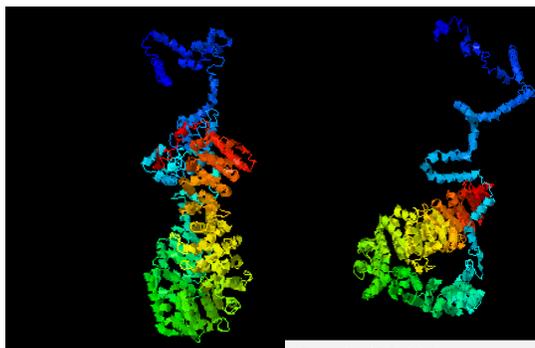


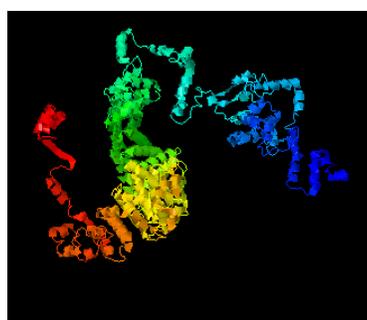
Figura A2.15. Factor B Normalizado Predicho



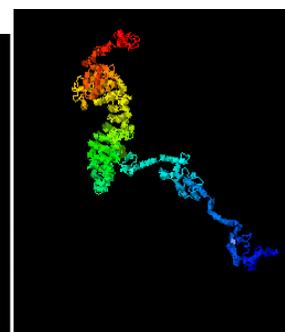
- [Download Model 1](#)
- C-score=-0.69 ([Read more about C-score](#))
- Estimated TM-score = 0.63 ± 0.14
- Estimated RMSD = $10.7 \pm 4.6 \text{ \AA}$



- [Download Model 2](#)
- C-score = -1.61
- [Download Model 3](#)
- C-score = -1.49



- [Download Model 4](#)
- C-score = -1.94



- [Download Model 5](#)
- C-score = -1.92

Figura A2.16. Modelos que resultaron de la predicción de estructura terciaria de la proteína Armadillo/beta-cateninrepeatfamilyprotein. Usando el servidor I-TASSER.

El valor de “C-score” está en un rango entre -5 y 2, en donde el mayor valor significa que el modelo presenta un mayor margen de confianza (Ambrish et al, 2012). Tomando como base el “C-score” se seleccionó el modelo 1, el cual presentaba el mayor valor de confianza en la predicción (Ambrish et al, 2010, 2012).

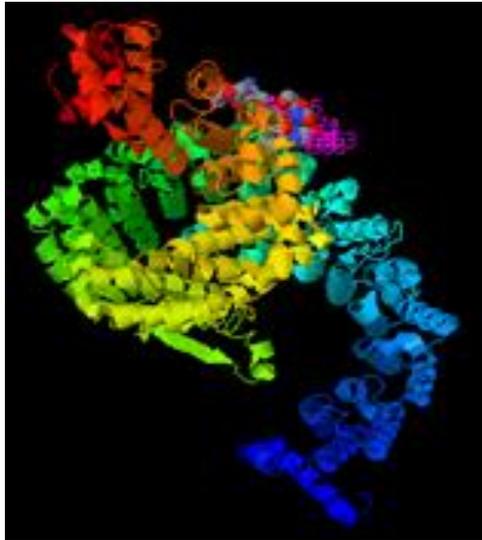


Figura A2.17. Predicción de sitio de Unión proporcionado por el servidor de I-TASSER.

3. NBS-contaning resistance like protein:

TTLVTKVYSDQSVKRQFDYWAWISVSQTYGVEDILRSMIKEFLQAKQVVVPSNLGSMTYR
 QLVEMLINYLHQNRYLVLDDVWSIDLWSKIRGAFPNRRCGSRIILTRNENVASSVGIG
 SRVHRLEPLQENDAWALFCKKAFWNDPDRSCPKEQLALAHIMKKCE



Figura A2.18. Predicción de la estructura secundaria de la proteína NBS-contaning resistance like protein.

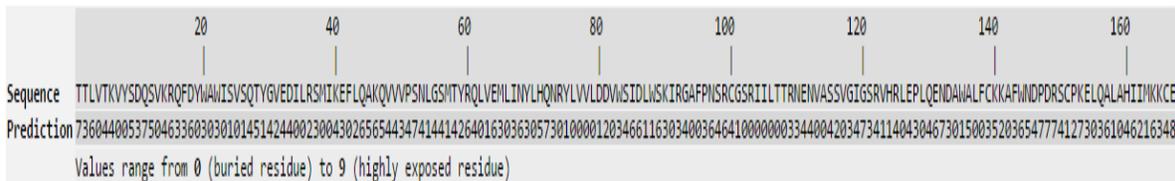


Figura A2.19. Predicción de la accesibilidad a solvente para la proteína NBS-contaning resistance like protein.

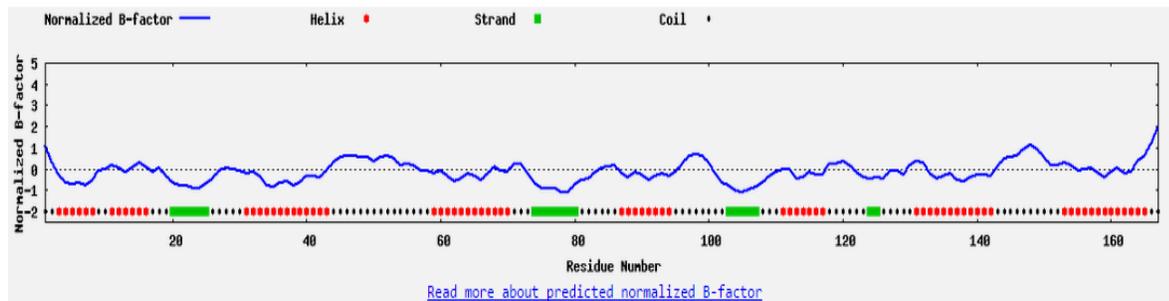


Figura A2.20. Factor B Normalizado Predicho para la proteína NBS-containing resistance like protein.

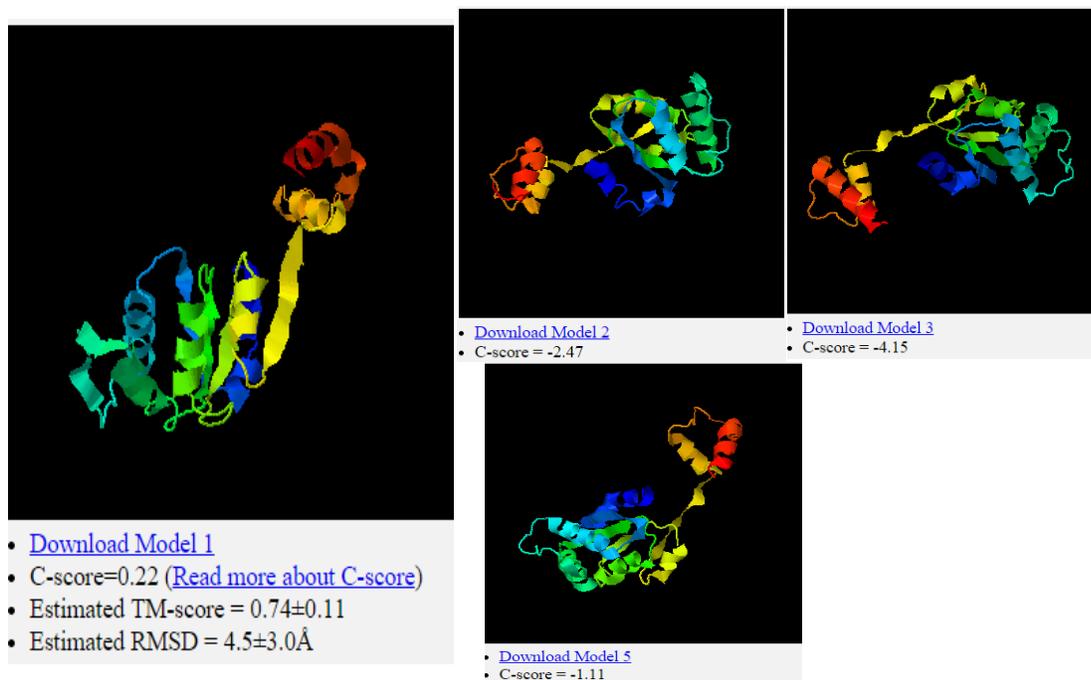


Figura A2.21. Modelos que resultaron de la predicción de estructura terciaria de la proteína NBS-containing resistance like protein. Usando el servidor I-TASSER.

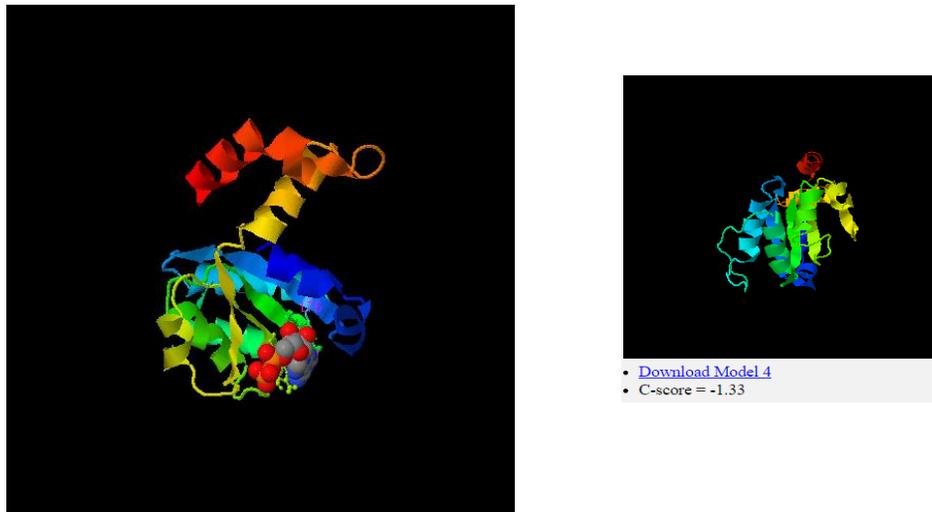


Figura A2.22. Predicción de sitio de Unión proporcionado por el servidor de I-TASSER.

4. Dominio FHA:

MSPEIALNTGQTTSILSPLIHKEIKKRTKKARHCISLPLLSSEHKSQTQMEAAVATPSLLFSSPTP
 RRPSSCLSLPPPCSSSYASNGAKLQQPRLQFVSQQLTSRNSNGSGRRSISILSLRCSSSGTDSASSS
 ATSERWVLEPAGDGDWRHIGYRVARPGGFQIASEAAVTVGRVPEQADIVLSVATAVSGTHARLEKK
 EGSLLVTDLESTNGTYINERRLSPGFPTPIDPGSLLIFGDIHLAMFRVSKMVVDVPSDASGAEQEA
 AETAQVSAAAQQTN

	20	40	60	80	100	120
Sequence	MSPEIALNTGQTTSILSPLIHKEIKKRTKKARHCISLPLLSSEHKSQTQMEAAVATPSLLFSSPTPRRPSSCLSLPPPCSSSYASNGAKLQQPRLQFVSQQLTSRNSNGSGRRSISILSLR					
Prediction	CCHHHHHHCCCCCCHHHHHHHHHHCCCCSSSSCC					
Conf.Score	9704523325652114634668775331113113405535665655443432225676545788888988899999877777776544578755565657888776566677755666					
	H:Helix; S:Strand; C:Coil					

Figura A2.23. Predicción de la estructura secundaria de la proteína FHA domain containing protein expressed.

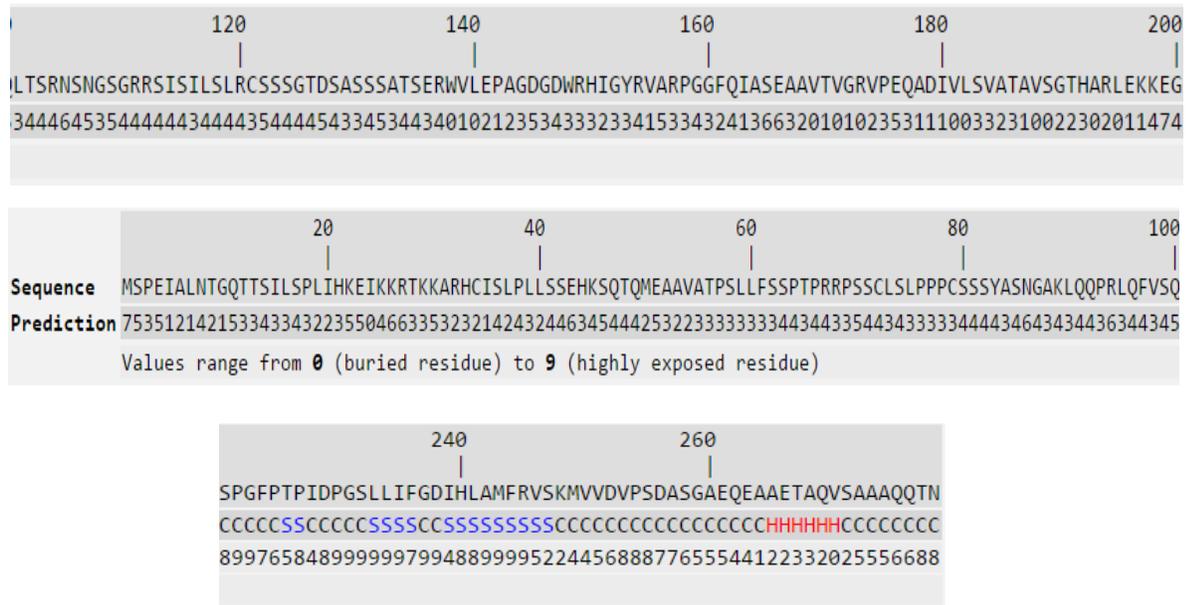


Figura A2.24. Predicción de la accesibilidad a solvente para la proteína FHA domain containing protein expressed.

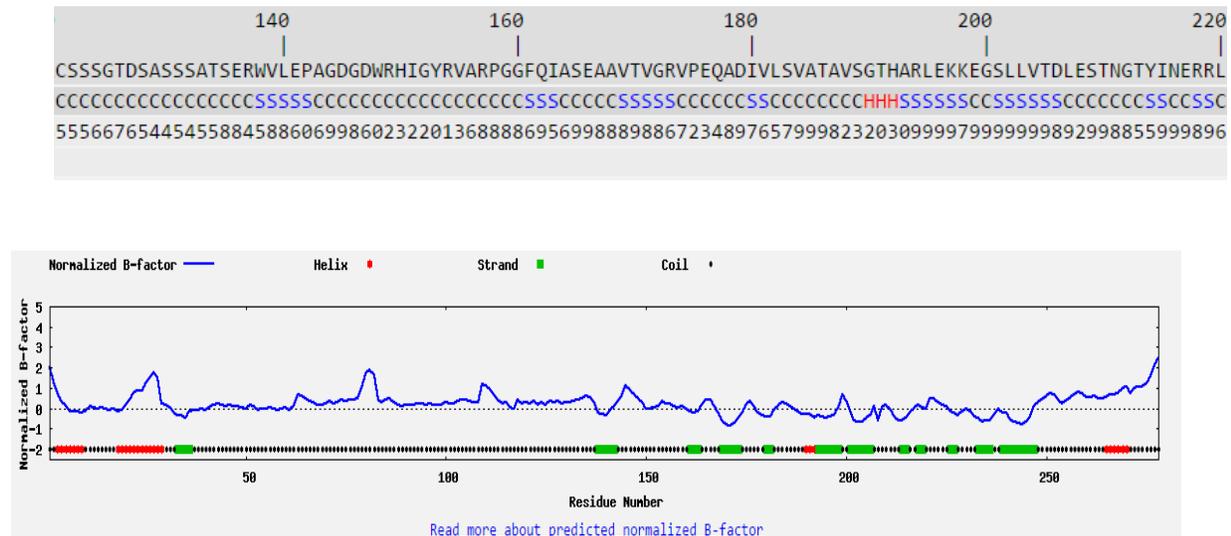


Figura A2.25. Factor B Normalizado Predicho para la proteína FHA

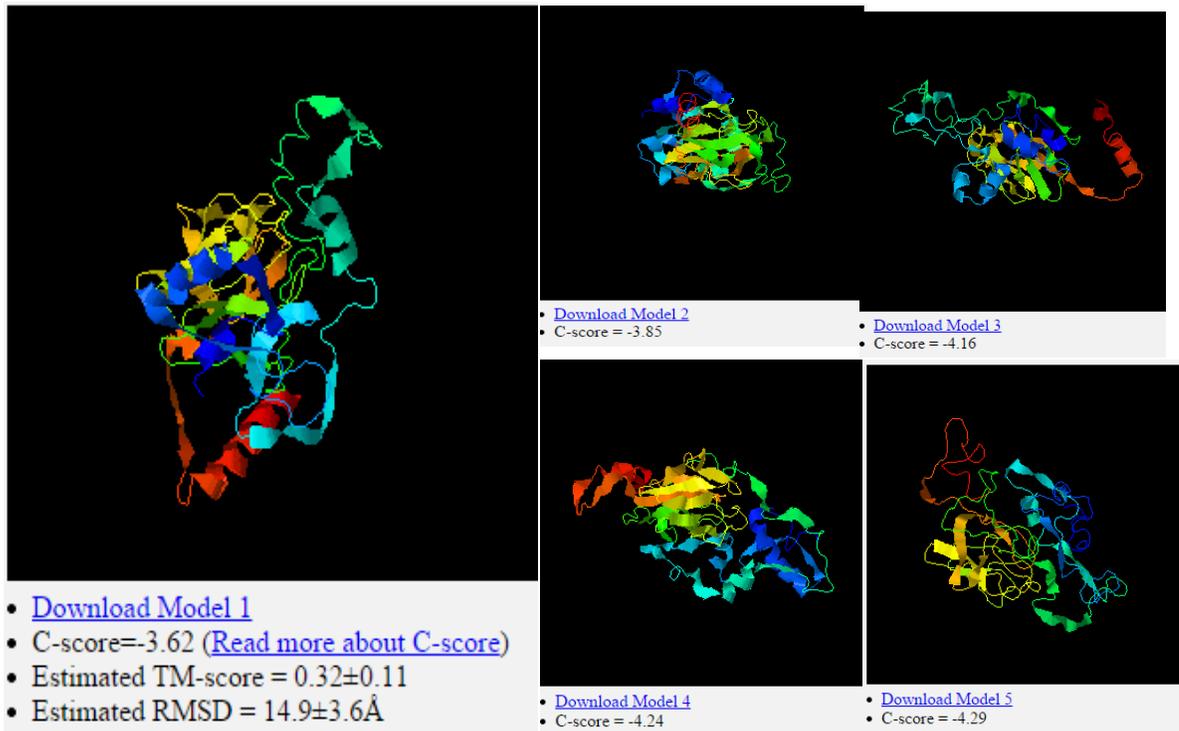


Figura A2.26. Modelos que resultaron de la predicción de estructura terciaria de la proteína FHA domain containing protein expressed. Usando el servidor I-TASSER.

El valor de “C-score” está en un rango entre -5 y 2, en donde el mayor valor significa que el modelo presenta un mayor margen de confianza (Ambrish et al, 2012). Tomando como base el “C-score” se seleccionó el modelo 1, el cual presentaba el mayor valor de confianza en la predicción (Ambrish et al, 2010).

A partir de las estructuras tridimensionales de las proteínas, se analizó en conjunto cada una de las proteínas para escoger los fragmentos para el diseño de los péptidos. Estas secuencias se seleccionaron teniendo en cuenta los siguientes puntos:

- Exposición de la secuencia, es decir, que esté en la superficie.
- Que sea una estructura bien definida: hélice, vuelta β , loop u hoja β .
- Que contenga una secuencia no hidrofóbica.

Se seleccionaron dos subestructuras, una α -hélice comprendida entre los residuos de aminoácido Leu-19 y Lys-29 (LIHKEIKKRTK), y una “loop” comprendida entre los residuos Arg-194 y Thr-205 (RLEKKEGSLLVT), como se muestra en la figura A2-27.

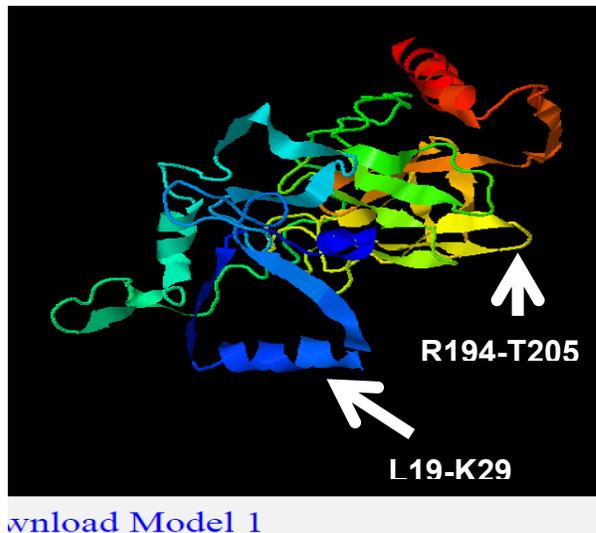


Figura A2.27. Secuencias seleccionadas a partir del análisis de la estructura tridimensional de la proteína FHA.

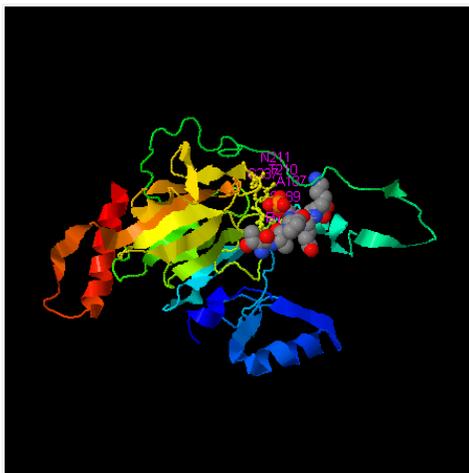


Figura A2.28. Predicción de sitio de Unión proporcionado por el servidor de I-TASSER.

5. Galactosidasa:

MARASSSSPPSPRLLLLLVAVAAATLLPEAAALGNFTAESRGARWRSRRARRRAFENGL
GRTPQMGNWSWNHFYCGINEQIIRETADALVNTGLAKLGYQYVNIDDCWAEYSRDSQGNFVVPNRQT
FPSGIKALADYVHAKGLKLG IYSDAGSQTCSNKMPGSLDHEEQDVKTFASWGV DYLKYDNCNDAGR
SVMERYTRMSNAMKTYGKNIFFSLCEWGKENPATWAGRMGNSWR TTGDIADNWGSM T SRADENDQW
AAYAGPGGWNDPDMLEVGNGGMSEAEYRSHFSIWALAKAPLLIGCDVRSMSQQTKN ILSNSEVIAV
NQDSLGVQGKKVQSDNGLEWAGPLSNRKA VV LWN RQSYQATITAHWSNIGLAGSVAVTARDLWA
HSSFAAQGQISASVAPHDCKMYVLT PN

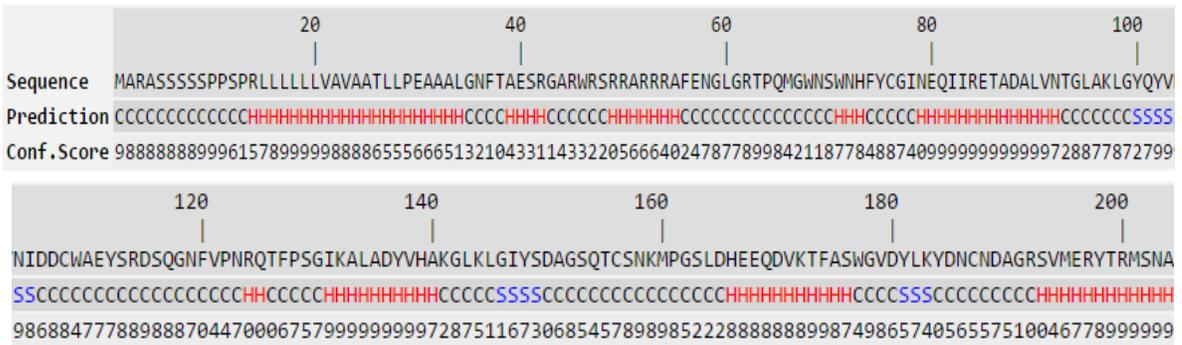
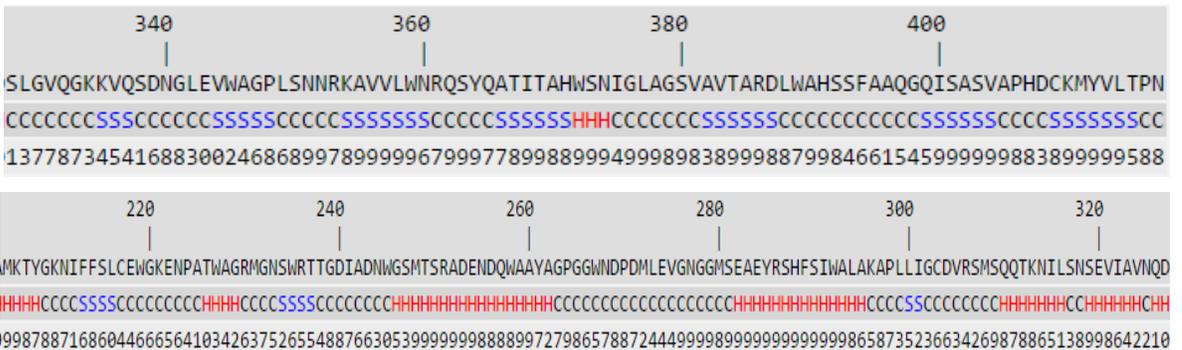


Figura A2.29. Predicción de la estructura secundaria de la proteína Galactosidasa.

Figura A2.30. Predicción de la accesibilidad a solvente para la proteína Galactosidasa:



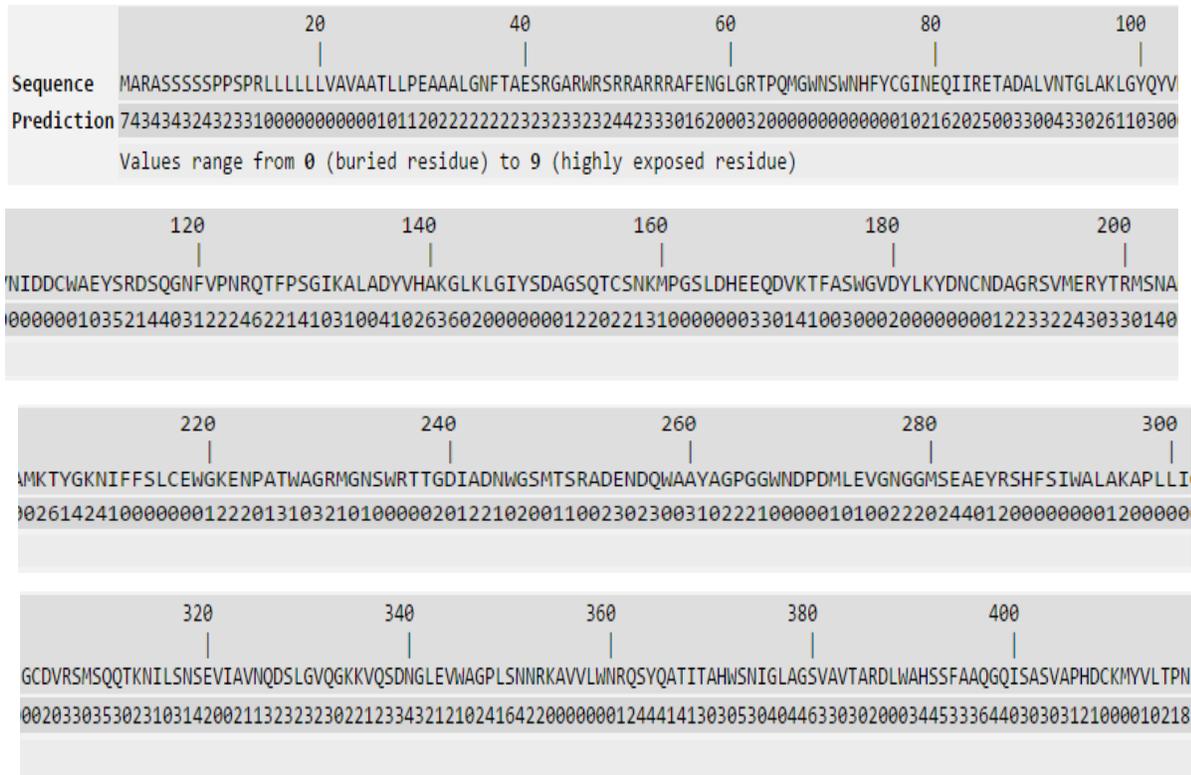


Figura A2.31. Factor B Normalizado Predicho para la proteína Galactosidasa.

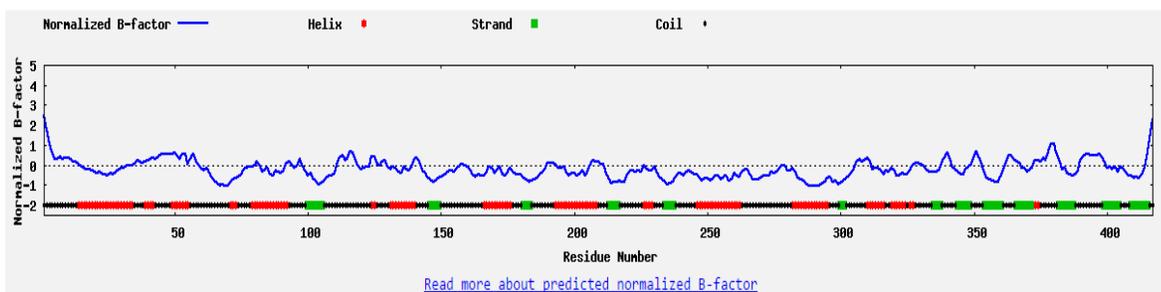


Figura A2.32. Factor B Normalizado Predicho para la proteína Galactosidasa

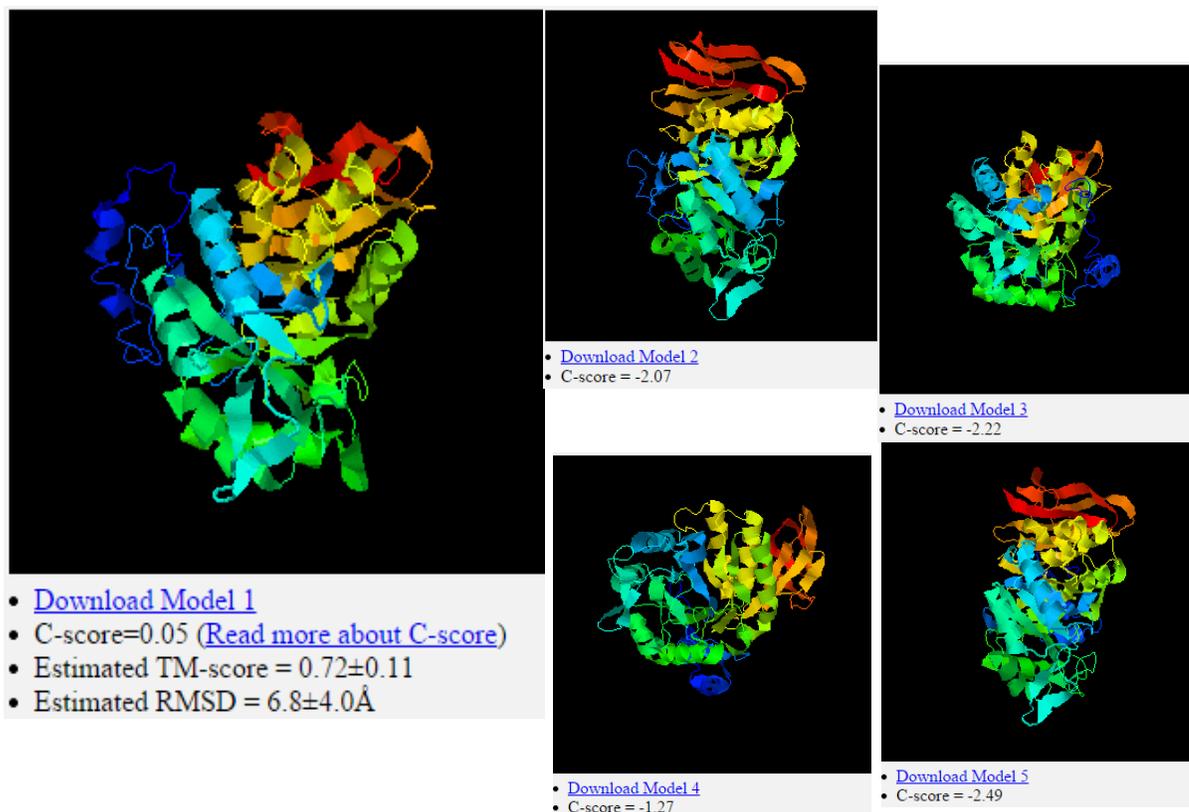


Figura A2.33. Modelos que resultaron de la predicción de estructura terciaria de la proteína Galactosidasa. Usando el servidor I-TASSER.

El valor de “C-score” está en un rango entre -5 y 2, en donde el mayor valor significa que el modelo presenta un mayor margen de confianza (Ambrish et al, 2012). Tomando como base el “C-score” se seleccionó el modelo 1, el cual presentaba el mayor valor de confianza en la predicción (Ambrish et al, 2010).

A partir de las estructuras tridimensionales de las proteínas, se analizó en conjunto cada una de las proteínas para escoger los fragmentos para el diseño de los péptidos. Estas secuencias se seleccionaron teniendo en cuenta los siguientes puntos:

- Exposición de la secuencia, es decir, que esté en la superficie.
- Que sea una estructura bien definida: hélice, vuelta β , loop u hoja β .
- Que contenga una secuencia no hidrofóbica.

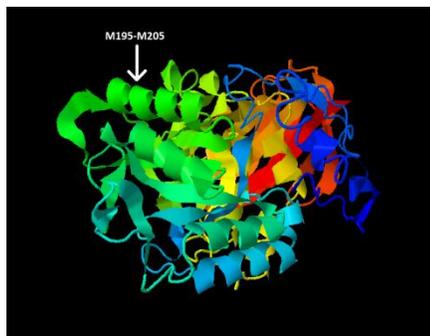


Figura A2.34. Secuencias seleccionadas a partir del análisis de la estructura tridimensional de la proteína Galactosidasa.

Se seleccionó una subestructura, una α -hélice comprendida entre los residuos de aminoácido Met-195 y Met-205 (MERYTRMSNAM), como se muestra en la figura A2-34.

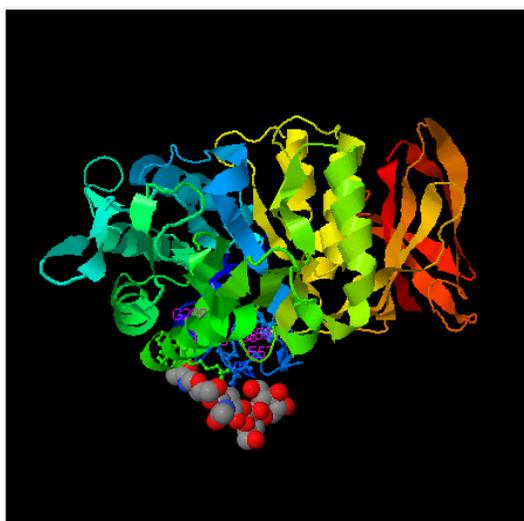
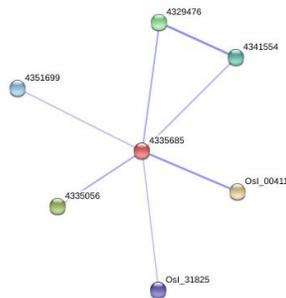
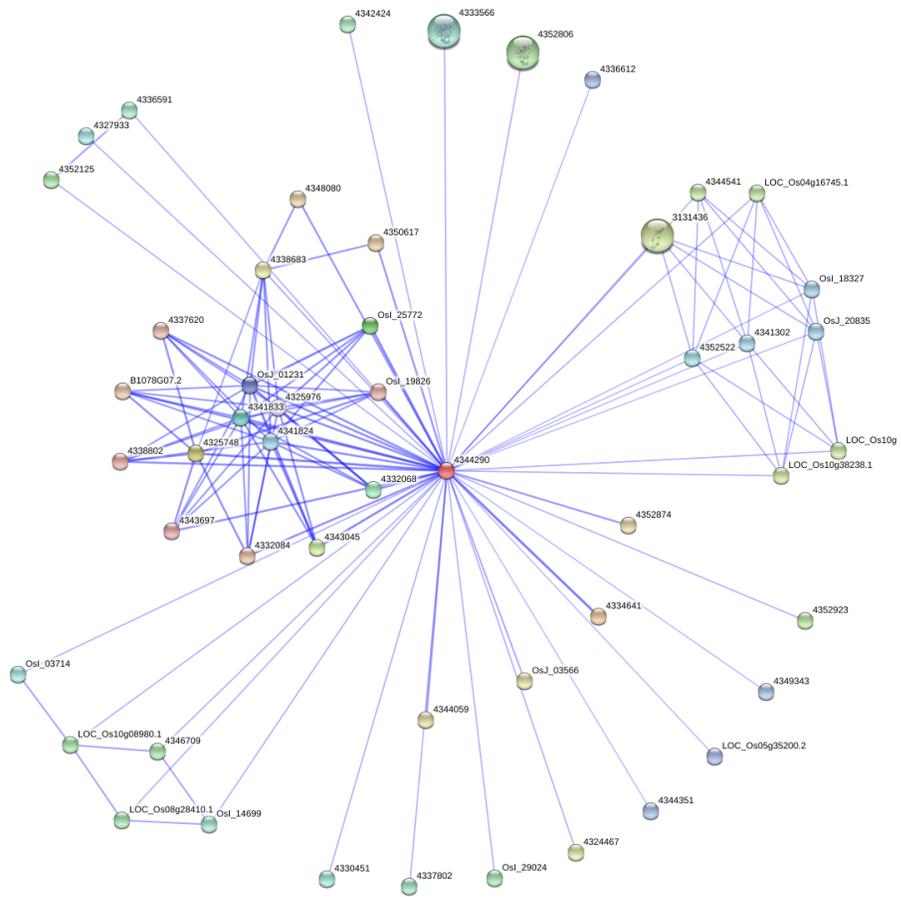


Figura A2.35. Predicción de sitio de Unión proporcionado por el servidor de I-TASSER.

F. Anexo: Interactómica de las proteínas seleccionadas



MUB4 (Proteína 4 de plegamiento ubiquitina de anclaje a membrana)



Alfa galactosidasa de arroz

Bibliografía

Agrios GN (2005) Plant Pathology.5th Ed. Amsterdam. Elsevier Academic Press.

Ahsan, N., Lee, D., Lee, S., Kang, K., Lee, J., Kim, P., Yoon, H., Kim, J., Lee, B. (2007). Excess copper iduced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. *Chemosphere*. 67: 1182-1193

Ahsan, N., Lee, S., Lee, D., Lee, H., Lee, S., Bahk, J., Lee, B. (2007). Physiological and protein profiles alternation of germinating rice seedlings exposed to acute cadmium toxicity. *C.R. Biologies*. 330: 735 – 746.

Ahsan, N., Lee, D., Lee, K., Alam, I., Lee, S., Bahk J., Lee, B. (2008) Glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves reveled by proteomic approach. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46: 1062 – 1070.

Ahsan, N., Lee, D., Kim, K., Alam, I., Lee, S., Lee, K., Lee, H., Lee, B. (2010). Analysis of arsenic stress-induced differentially expressed proteins in rice leaves by two-dimensional gel electrophoresis coupled with mass spectrometry. *Chemosphere*. 78: 224 – 231.

Albericio, F., Andrew, D., Giralt, E.,Navalpotro, C., Pedroso, E., Ponsati, B., Ruiz-Gallo, M. (1989). Use of the Npys thiol protection in solid phase peptide synthesis. Application to direct peptide-protein conjugation through cysteine residues.*Int. J. Pept. Res.* 34, 124-128.

Alsina, J., Rabanal, F., Giralt, E. Albericio, F. (1994). Solid phase synthesis of “head-to-tail” cyclic peptides *via* lysine side-chain anchoring. *Tetrahedron Lett*. 35: 9633-9636.

Amrish Roy, Alper Kucukural, Yang Zhang (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*. 5: 725-738

Ambrish Roy, Jianyi Yang, Yang Zhang. (2012). COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. *Nucleic Acids Research*, 40: W471-W477.

Arrhenius, T., Satterthwait, A.C. (1989). The substitution of an amide-amide backbone hydrogen bond in an alpha-helical peptide with a covalent hydrogen bond mimic. En: *Peptides: chemistry, structure and biology; Proceedings of the 11th A.P.S. Rivier, J. & Marshall, G. (Eds.), ESCOM, Leiden, 1990, pp. 870-872.*

Akter S., Huang, J., Waszczak, C., Jacques, S., Gevaert, K., Van Breusegem, F., Messens, J. (2015). Cysteines under ROS attack in plants a proteomics view. *J. Exp. Bot.* 66(10): 2935-2944

Barkla, F.J., Castellanos, T., Díaz de León, J.L., Matros, A., Mock, H., Perez, F., Zorb, c. (2013). Elucidation of salt stress defense and tolerance mechanisms of crop plants using proteomics-current achievements and perspectives. *Proteomics*. 13: 1885-1900

Bazargani, M.M., Sarhadi, E., Bushehri, A.S., Matros, A., Mock, H.P., Naghavi, M., Hajihoseini, V., Mardi, M., Hajirezaei, M., Moradi, F., Ehdaie B., Salekdeh, G.H.(2011). A proteomics view on the role of drought-induced senescence and oxidative stress defense in enhanced stem reserves remobilization in wheat. *J. Proteomics*. 74(10): 1959-1973

Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P.G., Giananza, E., Wesermeier, R. (1982). Isoelectric focusing in immobilized pH gradients-principle, methodology and some applications. *J Biochem Bioph Meth*.6: 317-339

Bolton, M. (2009). Primary metabolism plant defence fuel for the fire. *Current Review*. 22(5): 487-497 <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-22-5-0487>

Bowles, D.J (1990). Defense-related proteins in higher plants. *Annu Rev Biochem*. 59: 873-907

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

Brizard, J.P., Cerapito, C., Delalande, F., Van Dorsselaer, A., Brugidou, C. (2006) Proteome analysis of plant-virus interactome. *Molecular & Cellular Proteomics*. 5:2279-2297.

Cabezas, E., Satterthwait, A.C. (1999). The hydrogen bond mimic approach: solid-phase synthesis of a peptide stabilized as an α -helix with a hydrazone link. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 3862-3875.

Calvo, J.C.; Barrera, N.F., Garcia, J.A.; Guzman, F., Espejo, F. y Patarroyo M.E. (1999). Síntesis de la oxitocina en fase sólida usando terbutoxicarbonilo y fluorenilmetoxicarbonilo derivados. *Rev. Colomb. Quim.* 28 (1), 19-25.

Calvo, J.C., Satterthwait, A. (2005). Imitando epitopes en proteínas: uso de ligando hidrazona para la restricción conformacional. *Revista científica.UDFJC*. 27-40

Chakrabarty, D., Trivedi, P., Misra, P., Tiwari, M., Shri, M., Shukla, D., Kumar, S., Rai, A., Pandey, A., Nigam, D., Tripathi, R., Tuli, R. (2009) Comparative transcriptome analysis of arsenate and arsenite stresses in rice seedlings. *Chemosphere*. 74: 688 -702.

Chen Y., Chi, W., Huang, T., Lin, C., Nguyeh, T., Hsiung, T., Chia, L., Huang, H., H. (2012). Mercury-induced biochemical and proteomic changes in rice roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 55: 23-32

Chiang, L.C. Cabezas, E.; Calvo, J.C.; Satterthwait, A.C. (1993). The conformational restriction of synthetic peptides to the alpha helix, reverse turn and loops with covalent hydrogen bond mimics. En: *Peptides: Biology and Chemistry; Proceeding of the Chinese*

Peptide Symposium 1992. Du, Y.C., Tam, J.P. & Zhang, Y.S.(Eds.), ESCOM, Leiden, 1993, pp. 204-206

Chiang, L.C.; Cabezas, E.; Calvo, J.C.; Satterthwait, A.C. The synthesis of peptide secondary structure mimetics with covalent hydrogen bond mimics on solid support. En: *Peptides: Chemistry, structure and biology; Proceedings of the 13th American Peptide Symposium*. Hodges, R.S. & Smith, J.A. (Eds.), ESCOM, Leiden, 1994, pp. 278-280.

Cilia, M., Fish, T., Yang, X., Mclaughlin, M., Thannhauser, T.W., Gray, S. (2009) A comparison of protein extraction methods suitable for Gel-based proteomic studies of aphid proteins. *J. Biomol Tech.* 20: 201 –215.

Damerval, C., de Vienne, D., Zivy, M., Thiellement, H. (1986). Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, 7: 52-54

Deswal, V. K., Kumar, P. (2013). Plant growth promoting activity of pseudomonads in Rice crop. *Int.J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2(11): 152-157

Espinoza, A.M., Hernadez, M. Pereira, R., Falk, b., Medina, V., (1992): In situ immunogold labeling analysiis of the rice hoja blanca virus nuceloprotein and major non capsid protein. *Virology*. 19182): 619-627

Espinoza, A.M., Pereira, R., Macaya-Lizcano. A.V., Hernandez, M., Goulden, M., Rivera, C. (1993). Comparative light and electron microscopy analyses of tenuivirus major noncasid rptein (NCP) inclusión bodies in infected plants, of the NCP in vitro. *Virology*. 195: 156-166

Ettinger, W. & Theg, S. (1991). Physiological active chloroplasts contain pools of unassembled ettrinsic proteins of the photosynthetic oxygen-evolving enzyme complex in thylakoid lumen. *J. Cell. Biology*. 115(2): 321-328

Feng, Y., Komatsu, S., Furukawa, T., Koshiba, T., Kohno, Y. (2008). Proteome analysis of proteins responsive to ambient and elevated ozone in rice seedlings. *Agriculture, Ecosystems and environment*. 125: 255 – 265

Flor, H.H., (1955). Host-parasite interactions in flax—its genetics and other implications. *Phytopathology* 45: 680–85

Freidinger, R.M.; Veber, D.F.; Perlow, D.S.; Brooks, J.R.; Saperstein, R. (1980). Bioactive conformation of luteinizing hormone-releasing hormone evidence from a conformationally constrained analog. *Science*. 210, 656-658.

Ge, C., Wang, Z., Wan, D., Ding, Y., Wang, Y., Shang, Q., Luo, S. (2009). Proteomic study for responses to cadmium stress in rice seedlings. *Rice Science*. 16 (1): 33 – 44

Gevaert, K., Vanderkerckhove, J. (2000). Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis*. 21: 1145-1154

Gingery, R. E. (1987). The rice stripe virus group. In the Filamentous Plant viruses. 9 297-329 Edited by R.G. Milne. New York. Plenum Press

Goff, S, Ricke, D., Lan, T., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H., Hadley, D., Hutchison, D., Martin, C., Katagiri, F., Lange, M., Moughamer, T., Xia, Y., Budworth, P., Zhong, J., Miguel, T., Paszkowski, U., Zhang, S., Colbert, M., Sun, W., Chen, L., Cooper, B., Park, S., Wood, T., Mao, L., Quail, M., Wing, R., Dean, R., Yu, Y., Zharkikh, A., Shen, R., Sahasrabudhe, S., Thomas, A., Cannings, R., Gutin, A., Pruss, D., Reid, J., Tavtigian, S., Mitchell, J., Eldredge, G., Scholl, T., Miller, R., Bhatnagar, S., Adey, N., Rubano, T., Tusneem, N., Robinson, R., Feldhaus, J., Macalima, T., Oliphant, A., Briggs, S. (2002). A draft sequence of rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science*, 296 (5565): 92-100

Goldbach, R., Bucher, E., Prins, M. (2003). Resistance mechanism to plant viruses: an overview. *Virus Research*, 92(2): 207-212

Görg A, Weiss W, Dunn M J. (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 4: 3665-3685.

Grover, A., and Grwthama, R. 2003. Strategies for development of fungus-resistant transgenic plants. *Curr Sci*. 84: 330-340

Gu, H., Zhu, P., Jiao, Y., Meng, Y., Chen, M. (2011) PRIN: a predicted rice interactome network. *BMC Bioinformatics*. 12:161-183

Guo, B., Liang, Y.C., Zhu, Y.G., Zhao, F.J. (2007) Role of salicylic acid in alleviating oxidative damage in rice roots (*Oryza sativa*) subjected to cadmium stress. *Environmental Pollution*. 147: 743 – 749

Guo, G., Ge, P., Ma, C., Li, X., Lv, D., Wang, S., Ma, W., Yan, Y. (2012). Comparative proteomic analysis of salt response proteins in seedling roots of two wheat varieties. *J. Proteomics*. 75: 1867 – 1885

Hajheidari, M., Abdollahian-Noghabi, M., Askari, H., Heidari, M., Sadeghian, S.Y., Ober, E.S., Salekdeh, G.H. (2005) Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics*. 5(4): 950 -960

Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G. (2000). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773–1791

Hao, Z., Wang, L., Tao, R. (2009). Expression patterns of defence genes and antioxidant responses in a rice variety that is resistant to leaf blast but susceptible to neck blast. *Physiological and molecular plant pathology*. 74: 167-174

Hao, Z., Wang, L., He, Y., Liang, Y., Tao, R. (2011) Expression of defense genes and activities of antioxidant enzymes in rice resistance to rice stripe virus and small brown planthopper. *Plant Physiology and Biochemistry* 49: 744 - 751

Hashiguchi, A., Ahsan, N., Komatsu, S. (2010). Proteomics application of crops in the context of climatic changes. *Food research international*. 43: 1803-1813

Havilio, M., Haddad, Y., Smilansky, Z. (2003). Intensity-Based Statistical Scorer for Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 75: 435-444

Higuchi Takeuchi, M., Ichikawa, t., Kondou, Y., Matsui, K., Hasegawa, Y., Kawashima, M., Sonoike, K., Mori, M., Hirochika, H., Matsui, M. (2011). Functional analysis of two isoforms of leaf-type ferredoxin-NADP(+)-oxidoreductase in rice using the heterologous expression system of Arabidopsis. *Plant Physiol*. 2011 157(1):96-108. doi: 10.1104/pp.111.181248.

Ho, Ch., Wu, Y., Shen, H., Provart, N., Geisler, M. (2012). A predicted protein interactome for rice. *Rice*. 5:1-15

Imin, N., Kerim, T., Weinman, J J., Rolfe, B.G. 2001. Characterization of rice anther proteins expressed at the young microspore stage. *Proteomics*. 1: 1149-1161

Irfan, M., Qadir, S., Zolla, L. (2007). Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. *J of plant physiology*. 164: 1239 – 1260

Jennings, P. R., (1963). Estimating yield loss in rice caused by hoja blanca. *Phytopathology* 53: 492.

Jensen, L.J., Kuhn, M., Satrk, M. (2009). STRING 8-a global view on proteins and their functional interactions in 630 organism. *Nucleic Acids Res*. 37: 412-416

Jiang, Y., Chen, R., Dong, J., Xu, Z., Gao, X. (2012). Analysis of GDSL lipase (GLIP) family genes in rice (*oryza sativa*). *Plant omics*. 5(4): 351-358

Jithest, M.N., Prashanth, S.R., Sivaprakas, K.R., Parida, A.K., (2006). Antioxidative response mechanisms in halotypes: their role in stress defence. *J. of Gen*. 85: 237-254

Jones, D.A., Jones, J.D.G. (1996). The roles of leucine rich repeats in plant defences. *Adv. Bot.*

Jongdee, B., Pantuwan, G., Fukai, S., Fischer, K. (2006). Improving drought tolerance in rainfed lowland rice: an example from Thailand. *Agricultural Water Management*. 80: 225 – 240

Jorrín, J., Maldonado, A., Castillejo, A. (2007) Plant proteome analysis: A 2006 update. *Proteomics*. 7: 2947 – 2962

Jorrín-Novo, J.; Maldonado, A.; Echevarría-Zomeño, S.; Castillejo, M.; Curto, M.; Valero, J.; Sghaier, B.; Donoso.; Redondo, I.; Valledor, L. (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. *J. of Proteomics* 72 285– 314.

Jwa, N., Agrawal, G., Tamogami, S., Yonekura, M., Han, O., Iwahashi, H., Rakwal, R. (2006). Role of defense/stress-relate marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanism. *Plant Physiology and Biochemistry*. 44(6): 261-273

Kar, M., Mishra.D. (1976). Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant physiol.* 57: 315 – 319

Kargul, J. & Barber, J. (2008). Photosynthetic acclimation: Structural reorganisation of light harvesting antenna – role of redox-dependent phosphorylation of major and minor chlorophyll *a/b* binding proteins. *FEBS J.* 275(6): 1056-1068

Khan, M. K., Komatsu, S. (2004) Rice proteomics: recent developments and analysis of nuclear proteins. *Phytochemistry*. 65: 1671 – 1681

Ke, Y., Han, G., He, H., Li, J. (2009) Differential regulation of proteins and phosphoproteins in rice under drought stress. *Biochemical and biophysical research communications*. 379: 133 – 138

Kim, S.S., Lee, S.E., Kim, O.W., Kim, D.C. (2000) Physicochemical characteristics of chalky kernels and their effects on sensory quality of cooked rice. *Cereal Chemistry*. 77: 376 – 379

Kim, S.T., Cho, K.S., Jang, Y. S., Kang, K.Y. (2001).Two-dimensional electrophoresis of rice proteomics by polyethylene glycol fraction for protein arrays. *Electrophoresis* 22: 2103-2109.

Kim, S.T., Cho, K.S., Yu, S., Kim, S.G., Hong, J. C., Han, C. D., Bae, D.W., Nam, M.H., Kang, K.Y. (2003). Proteomic analysis of differentially expressed proteins induced by rice blast fungus and elicitor in suspension-cultured rice cells. *Proteomics* 3: 2368-2378

Kim, C.H., Liu, Y., Thorne, T.E., Yang, H., Fukushige, H., Gassmann, W., Hildebrand, D., Sharp, E.R., Zhang, S. (2003) Activation of a Stress-Responsive Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade Induces the Biosynthesis of Ethylene in *Plants The Plant Cell*. 15: 2707–2718

Kim, J.K., Jang, I.C., Wu, R., Zuo, W.N., Boston, R.S., Lee, Y.H., Ahn, I.P., Nahm, B.H. (2003). Co-expression of a modified maize ribosome-inactivating protein and a rice basic chitinase gene in transgenic rice plants confers enhanced resistance to sheath blight. *Transgenic Res*.12: 475-84

Kim, S., Kim, S., Hwang, D., Kang, S., Kim, H., Lee, B., Lee J., Kang K. (2004).Proteomic analysis of pathogen-responsive proteins from rice leaves induced by rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Proteomics*. 4(11): 3569-3578

Koller, A., Washburn, M., Lange, M., Andon, N., Deciu, C., Haynes, P., Hays, L., Schieltz, D., Ulaszek, R., Wei, J., Wolters, D., Yates III J. (2002).Proteomic survey of metabolic pathways in rice. *PNAS*. 99 (18): 11969 – 11974

Komatsu, S., Muhammad, A., Rakwal, R. (1999) Separation and characterization of proteins from green and etiolated shoots of rice (*Oryza sativa*L.): Towards a rice proteome. *Electrophoresis*. 20 (3): 630–636

Komatsu, S., Kojima, K., Suzuki, K., Ozaki, K., Higo, K. (2004) Rice proteome databased on two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis: its status in 2003. *Nucleic acids research*. 32. DOI: 10.1093/nar/gkh020

Konishi, H., Ishiguro, K., Komatsu, K. (2001). A proteomics approach towards understanding blast fungus infection of rice grown under different levels of nitrogen fertilization. *Proteomics*. 1: 1162-1171.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature*. 227: 5259: 680-685

Lamey, H. A. (1969). Varietal resistance to hoja blanca. *in* The virus diseases of the rice plant. pp. 293-311. Johns Hopkins Press, Baltimore, MD.

Lee, D., Ahsan, N., Lee, S., Kang, K., Lee, J., Lee, B. (2007). An approach to identify cold-induced low-abundant proteins in rice leaf. *C.R. Biologies*. 330: 215 -225

Lee, D., Ahsan, N., Lee, S., Kang, K., Bahk, J., Lee, I., Lee, B. (2007). A proteomic approaching analysing heat-responsive proteins in rice leaves. *Proteomics* 7: 3369 -3383

Lee, D., Ahsan, N., Lee, S., Lee, J., Bahk J., Kang, K., Lee, B. (2009). Chilling stress-induced proteomic changes in rice roots. *Journal of plant physiology*. 166: 1 – 11

Lee, K., Bae, D., Kim, S., Han, H., Liu, X., Parck, H., Lim, Lee, S., Chung, W. (2010). Comparative Proteomic analysis of the short - term responses of rice roots and leaves to cadmium. *Journal of Plant physiology*. 167: 161 – 168

Li, J., Lee, G-I., Van Doren, S.R., Walker, J.C. (2000). The FHA domain mediates phosphoprotein interactions. *J Cell Sci* 113: 4143-4149

Li, K., Xu, Ch., Zhan, J. (2011). Proteome profile of maize (*Zea mays* L.) leaf tissue at the flowering stage after long term adjustment to rice black-streaked dwarf virus infection. *Gene*. 485 (2): 106-113

Li, Z., Xiong, J., Li, Z., Qi, X., Chen, H., Shao, C., Wang, J., Liang, Y., Lin, W. (2008). Analysis of differential expression of proteins in rice leaf sheath during grain filling. *Acta Agronomica sinica*. 34 (4): 619 – 626

Li, Z., Xiong, J., Qi, X., Wang, J., Chen, H., Zhan, Z., Huang, J., Liang, Y., Lin, W. (2009) Differential expression and function analysis of proteins in flag leaves of rice during grain filling. *Acta Agronomica Sinica*. 35(1): 132 -139

Li, X., Yang, M., Chen, H., Qu, L., Chen, F., Shen, S. (2010) Abscisic acid pretreatment enhance salt tolerance of rice seedlings: Proteomic evidence. *Biochimica et Biophysica acta*. 1804(4): 929-940

Lin, S., Chang, M., Tsai, Y., Lur, H. (2005) proteomic analysis of the expression of proteins related to rice quality during caryopsis development and the effect of high temperature on expression. *Proteomics*. 5: 2140 – 2156

Lin, J-J. & Ekramoddoullah, K.M.A. (2006). The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *PMPP*. 68: 3 – 13

Lin, Y., Chen, H., Kao, R., Chang, S., Chang, S., Lai, E. (2008). Proteomic analysis of rice defense response induced by probenazole. *Phytochemistry*. 69: 715 -728

Liu, Y., Liu, B., Zhu, X., Yang, J., Bordeos, A., Wang, G., Leach, J.E., Leung, H. (2013). Fine-mapping and molecular marker development for Pi56(t), a NBS-LRR gene conferring

broad-spectrum resistance to *Magnaporthe oryzae* in rice. *Theor. Appl. Genet.* 126(4):985-98. doi: 10.1007/s00122-012-2031-3.

Luna-Valdez, .A., Martínez-Batallar, A.G., Hernández-Ortiz, M., Encarnación-Guevara, S., Ramos-Vega, M., López-Bucio, J.S., León, P., Guevara-García, A.A. (2014) Proteomic analysis of chloroplast biogenesis (clb) mutants uncovers novel proteins potentially involved in the development of *Arabidopsis thaliana* chloroplast. *Journal of Proteomics.* 111(5): 148-164

Ma. Y. & Berkowitz, G. (2012) En CAB International. Plant Stress Physiology.Ed. S Sahabala. Pg 291

Ma, Y., Walker. R., Zhao. Y., Berkowitz. G. (2012). Linking ligand perception by PEPR pattern recognition receptors to cytosolic Ca²⁺ elevation and downstream immune signaling in plants. *PNAS.* 109(48): 19852-29857

Maldonado, A., Echeverría-Zomeño, S., Jean-Baptiste, S., Hernández, M., Jorrín-Novo, J. (2008). Evaluation of three different protocols of protein extraction for *Arabidopsis thaliana* leaf proteome analysis by two-dimensional electrophoresis. *J. Proteomics,* 7(1): 461-472

Martins-de-Souza., D. (2014). Proteomics, metabolomics, and protein interactomics in the characterization of the molecular features of major depressive disorder. *Translational Research.* 63-73

Meng, K., Fen, W., Zhong, Y., Hua, M. (2013). ATPG is required for the accumulation and function of chloroplast ATP synthase in *Arabidopsis*. *Chin. Sci. Bull.* 59(26): 3224-3232 doi: 10.1007/s11434-013-5916-x

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science.* 4: 427-435

- Morales, F.J. & Niessen, A.I. (1983). Association of spiral filamentous viruslike particles with rice hoja blanca. *Phytopathology*.73, 971-974.
- Morales, F.J. & Niessen, A.I. (1985). Rice hoja blanca virus. *AAB. Descriptions of Plant Viruses*, no. 299
- Morales & Jennings (2010). Rice Hoja blanca: a complex plant-virus-vector pathosystem. *CAB Reviews*. 5 (043):1-16
- Nisha, S., Revathi, K., Chandrasekaran, R., Kirubakaran, S., Sathish-Narayanan, S., Stout, M.J., Senthil-Nathan, S. (2012) Effect of plant compounds on induced activities of defense-related enzymes and pathogenesis related protein in bacterial blight disease susceptible rice plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 80: 1-9
- Norin, M. & Sundström M., (2002). Structural proteomics: developments in structure-to-function predictions. *TRENDS in Biotechnology*. 20 (2): 79 – 84
- O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*. 250: 4007-4021
- Palukaitis, P., Carr, J.P. (2008). Plant resistance responses to viruses. *J. Plant Pathology*. 90 (2): 153 -171
- Pandey, A., Rajamani, U., Verma, J., Subba, P., Chakraborty, N., Datta, A., Chakraborty, S., Chakraborty N. (2009) Identification of extracellular matrix proteins of rice (*Oryza sativa* L.) involved in dehydration-Responsive network: a proteomic approach. *J Proteome Res*. 9: 3443-3464
- Peltier, J.B., Cai, Y., Sun, Q., Zabrouskov, V., Giacomelli, L., Rudella, A., Ytterberg, J., Rutschow, H., van Wijk, K. (2006). The oligomeric stromal proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Mol. & Cell. Prot*. 5:114-133

- Peng, L., Ma, J., Chi, W., Guo, J., Zhu, S., Lu, Q., Lu, C., Zhang, L. (2006). LOW PSII ACCUMULATION1 Is Involved in Efficient Assembly of Photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 18(4): 955–969.
- Qing-Po, L., Qing-Zhong, X. (2006) Genome sequencing and identification of gene function in rice. *Acta Genetica Sinica*. 33 (8): 669 – 677
- Qureshi, M.I., Qadir, S., Zolla, L. (2007) Proteomics- based dissection of stress-responsive pathways in plants. *J. plant Phys*. 164: 1239-1260
- Ramirez, B.C., Macaya, G., Calvert, L., Haenni, A.L. (1992). Rice hoja blanca virus genome characterization and expression in vitro. *J. Gen Virol*. 73: 1457 -1464
- Ramirez, B.C. & Haenni, A.L. (1994). Molecular biology of tenuiviruses, a remarkable group of plant viruses. *J Gen Virol*. 75: 467-475
- Ramos, Y., Gutierrez, E., Machado, Y., Sanchez, A., Castellanos-Serra, L., González, L., Fernández de Cossio, J., Pérez-Riverol, Y., Betancourt, L., Gil, J., Padrón, G., Besada, V. (2008). Proteomics Based on peptide fractionation by SDS-Free PAGE. *J. Proteome Res*. 7 (6), pp 2427–2434
- Reymond, P. (2001). DNA microarrays and plant defense. *Plant Physiol Biochem*. 39: 313-321
- Richardson, J.S. (1981). The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Protein Chem*. 34, 167-339.
- Rogowska-Wrzesenska, A., Le Bihan, M-C., Thaysen-Andersen, M., Roepstorff, P. (2013). 2D gels still have a niche in proteomics. *J Proteomics*. 88: 4-13
- Romanovskis, P. & Spatola, A.F. (1998). Preparation of head-to-tail cyclic peptides via side-chain attachment: implications for library synthesis. *J. Pept. Res*. 52, 356-374.

Romero L.E., Lozano, I., Garavito, A., Carabali, S., Triana, M., Villareal, N., Reyes, L., Duque, M., Martínez, C., Calvert, L., Lorieux, M. (2014): Major QTLs control resistance to Rice Hoja Blanca Virus and its vector *Tagosodes orizicolus*. *Genetics*, 4: 133- 142

Salanoubat, M., Patil, K., Weissenbach, J., Bork, P. (2012) Prediction and identification of sequences coding for orphan enzymes using genomic and metagenomic neighbours. *Molecular Systems Biology* 8:581

Salekdeh, G., Siopongco, J., Wade, L.J., Ghareyazie, B., Bennett, J. (2002) A proteomic approach to analyzing drought- and salt responsiveness in rice. *Field Crops Research*. 76: 199 – 219

Sasaki, K., Iwai, T., Hiraga, S., Kuroda, K., Seo, S., Mitsuhara, I., Miyasaka, A., Iwano, M., Ito, H., Matsui, H., Ohashi, Y. (2004). Ten rice peroxidases redundantly respond to multiple stresses including infection with rice blast fungus. *Plant cell physiol.* 45(10): 1442 – 1452

Satterthwait, A.C; Cabezas, E.; Calvo, J.C.; Chen, S.Q.; Wu, J.X.; Wang, P.L.; Xie, Y.L.; Stura, E.A.; Kaslow, D.C.(1995) A peptide mimetic as antigen and immunogen. En: *Peptides: Biology and chemistry; Proceedings of the Chinese Peptide Symposium 1994*. Lu, G. (Ed.), ESCOM, Leiden. 229-233

Schevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. 695, *Anal Chem* 68:850–858.

Sghaier-Hammami, B.; Drira, N.; Jorrín-Novo, J. (2009). Comparative 2-DE proteomic analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) somatic and zygotic embryos. *Journal of proteomics*, 73, 161-167.

Sghaier-Hammami, B.; Castillejo, M.A.; Najib, M.; Drira, N.; Jorrín-Novo, J.; Namsi, A.; Gargouri-Bouزيد, R. (2012). Proteomics analysis of date palm leaves affected at three characteristic stages of brittle leaf disease. *Planta*, DOI 10.1007/s00425-012-1713-z

Scheideler, M, Schlaich, N.L., Fellenberg, K., Beissbarth, T., Hauser, N.C., Vingron, M., Slusarenko, A.J., Hoheisel, J.D.2002. Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defense metabolism in *Arabidopsis thaliana* using cDNA arrays. *J Boil Chem.* 277: 10555-10561

Shao, C., Liu, G., Wang, J., Yue, C., Lin, W. (2008) Differential proteomic analysis of leaf development at rice (*Oryza sativa*) seedling state. *Agricultural Sciences in China.* 7 (9): 1153 – 1160.

Sharma, M., Jamieson, C., Lui, C., Henderson, B.R. (2014). The hydrophobic rich N- and C-terminal tails of beta-catenin facilitate nuclear import of beta-catenin. *Biol. Chem.* pii: jbc.M114.603209.

Sharma, R., Komatsu, S., Noda, H. (2004) Proteomic analysis of brown planthopper: application to the study of carbamate toxicity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 34: 425 – 432

Shaw, M.M, Riederer, B. M. (2003). Sample preparation for two dimensional gel.Electrophoresis. *Proteomics*, 3, 1408-1417

Sheroan, I., Ross, A., olson, D., Sawheny, V. (2009). Compatibility of plant protein extraction methods with mass spectrometry for proteome analysis. *Plant science.* 176: 99 - 104

Shri, M., Kumar, S., Chakrabarty, D., Trivedi, P., Mallick, S., Misra, P., Shukla, D., Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R., Tuli, R. (2009). Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72: 1102 – 1110

Song, F., Goodman, R. (2001). Molecular biology of disease resistance in rice, *Physiological and molecular plant pathology.* 59: 1-11

- Sun, Y., Li, Z., Guo, B., Chu, G., Wei, C., Liang, Y. (2008). Arsenic mitigates cadmium toxicity in rice seedlings. *Environmental and Experimental Botany*. 64: 264 – 270
- Syller, J. (2012) Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infection. *Mol. Plant Pathol.*13(2): 204-216
- Triana, M., Cruz, M., Meneses, R., Calvert, L. (2003). Metodologías para la cría y evaluación de *Tagosodes orizicolus* (Muir). Manual Técnico. CIAT.
- Valero, J., Valledor, L., González R., Navarro R., Jorrín-Novo, J. (2012) Proteomic analysis of Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *Ballota* [Desf.] Samp.) pollen. *J. Proteomics*, 2736-2744
- 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. *J. Proteomics*. 74: 1-18
- Vargas, J. P., 1985 La hoja blanca: descalabro de CICA-8. *Arroz* 34: 18–19
- Ventelon-Debout. M., Delalande, F., Brizard, J.P., Diemer, H., Van Dorsselaer, A., Crugidou, C. (2004). Proteome analysis of cultivar-specific deregulations of *Oryza sativa indica* and *O. sativa japonica* cellular suspensions undergoing rice yellow mottle virus infection. *Proteomics*. 4: 216 – 225
- Vivas, L., Astudillo, D. (2008). Enfermedades virales transmitidas por la familia Delphacidae con énfasis en el insecto sogata (*Tagosodes orizicolus*). INIAHOY. <http://www.inia.gov.ve>
- Von Mering, C., Jensen, L., Chafron, S., Doersk, T., Krüger, B., Snel, B., Bork, P. (2007) STRING 7—recent developments in the integration and prediction of protein interactions. *Nucleic Acid Res.* 35
- Vranová, E., Inze, D., Van Breusegem, F. (2002). Signal transduction during oxidative stress. *J. Exper. Botany*. 53(372): 1227-1236

Wan XY, Liu JY. (2008) Comparative proteomics analysis reveals an intimate protein network provoked by hydrogen peroxide stress in rice seedling leaves. *Mol Cell Proteomics*;7: 1469–88.

Wang, W., Scali, M., Vignani, R., Spadafora, A., Sensi, E., Mazzuca, S., Cresti.(2003). Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis*. 14: 2369-2375

Wang, W., Tai, F., Chen, S. (2008). Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. *J. Sep. Sci.* 31: 2032-2039

Wang, W., Vignani, R., Scali, M., Cresti, M. (2006). A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis*. 27: 2782 – 2786

Wang, W., Tai, F. Chen, S. (2008). Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. *J. Sep. Sci.* 31, 2032 – 2039

Wang, Y., Wang, X., Wong, Y. (2012). Proteomics analysis reveals multiple regulatory mechanisms in response to selenium in rice. *J. Proteomics*. 7 (5): 1849-1866.

Wei, Z., Hu, W., Lin, Q., Cheng, X., Tong, M., Zhu, L., Chen, R., He, G. (2009). Understanding rice plant resistance to the Brown Planthopper (*Nilaparvata lugens*): a proteomic approach. *Proteomics*. 9: 2798 – 2808

Wen, F., Zhang, Z., Bai, T., Xu, Q., Pan, Y. (2010). Proteomics reveals the effects of gibberellic acid (GA3) on salt-stressed rice (*Oryza sativa* L.) shoots. *Plant Science*. 178: 170 – 175

Wilmot, C.M., Thornton, J.M. (1988). Analysis and prediction of the different types of beta turn in proteins. *J. Mol. Biol.* 203, 221-232.

Wu, J., Wang, Y., Kim, S., Kim, S., Kang, K. (2013). Characterization of a newly identified rice chitinase-like protein (OsCLP) homologous to xylanase inhibitor. *BMC. Biotechnology*. 13:4

Xenarios, I., Salwinski, L., Duan, X.J., Higney, P., Kim, S.M., Eisenbert, D. (2002). DIP, the Database of Interacting Proteins a research tool for studying cellular networks of protein interactions. *Nucleic Acid Res.* 30: 303-305

Xue, D., Jiang, H., Deng, X., Zhang, X., Wang, H., Xu, X., Hu, J., Zeng, D., Guo, L., Qian, Q. (2014). Comparative proteomic analysis provides new insights into cadmium accumulation in rice grain under cadmium stress *Journal of Hazardous Material*. Volume 280, 15 September 2014, Pages 269-277

Yamakawa, H., Hirose, T., Kuroda, M., Yamaguchi, T. (2007). Comprehensive expression profiling of rice grain filling-related genes under high temperature using DNA microarray. *Plant Physiology*. 144: 258 – 277

Yan SP, Zhang QY, Tang ZC, Su WA, Sun WN. (2006) Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. *Mol Cell Proteomics*;5:484–96

Yates, J.R. III. (1998). Mass spectrometry and the age of the proteome. *J Mass Spectrometry* 33: 1-19

Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, G., Li, S., Liu, B., Deng, Y., Dai, L., Zhou, Y., Zhang, X., Cao, M., Liu, J., Sun, J., Tang, J., Chen, Y., Huang, X., Lin, W., Ye, C., Tong, W., Cong, L., Geng, J., Han, Y., Li, L., Li, W., Hu, G., Huang, X., Li, X., Li, J., Liu, Z., Li, L., Liu, J., Qi, Q., Liu, J., Li, L., Li, T., Wang, X., Lu, H., Wu, T., Zhu, M., Ni, P., Han, H., Dong, W., Ren, X., Feng, X., Cui, P., Li, X., Wang, H., Xu, X., Zhai, W., Xu, Z., Zhang, J., He, S., Zhang, J., Xu, J., Zhang, K., Zheng, X., Dong, J., Zeng, W., Tao, L., Ye, J., Tan, J., Ren, X., Chen, X., He, J., Liu, D., Tian, W., Tian, C., Xia, H., Bao, Q., Li, G., Gao, H., Cao, T., Wang, J., Zhao, W., Li, P., Chen, W., Wang, X., Zhang, Y., Hu, J., Wang, J., Liu, S., Yang, J., Zhang, G., Xiong, Y., Li, Z., Mao, L., Zhou, C., Zhu, Z., Chen, R., Hao, B., Zheng, W., Chen, S.,

Guo, W., Li, G., Liu, S., Tao, M., Wang, J., Zhu, L., Yuan, L., Yang H.(2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. *spp. Indica*).*Science*. 296 (5565): 79-92

Yu, C., Yan, S., Wang, C., Hu, H., Sun, W., Yan, C., Chen, J., Yang, L. (2008) Pathogenesis-related proteins in somatic hybrid rice induced by bacterial blight. *Phytochemistry*. 69: 1989-1996

Zang, X. & Komatsu, S. (2007). A proteomics approach for indentifying osmotic-stress-related proteins in rice. *Phytochemistry*. 68 (4): 426 -437

Zeigler, R. S., & Morales, F.J. (1990). Genetic determination of replication of Rice hoja blanca virus within its p planthopper vector, *Sogatodes orizicola*. *Phytopathology* 80: 559–566

Zeigler, R. S., Rubiano, M., Pineda, A. (1988). A field screening method to evaluate rice breeding lines for resistance to the hoja blanca virus. *Ann. Appl. Biol.* 112: 151- 158.

Zhang, Z.L., Komatsu, S. (2000). Molecular cloning and characterization of cDNAs encoding two isoforms of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Biochemistry* 128: 383–38

Zhang Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9:40

Zhang, A., Lu, Q., Yin, Y., Ding, S., Wen, X., Lu. C. (2010). Comparative proteomic analysis provides new insights into regulation of carbon metabolism during leaf senescence of rice grown under field condition. *J. Plant Phys.* 167(16):1380-1389.

Zhang, Ch., Yin, Y., Zhang, A., Lu, Q., Wen, X., Zhu, Z., Zhang, L., Lu, C. (2012) Comparative proteomic study reveals dynamic proteome changes between superhybrid rice LYP9 and its parents at different developmental stages. *J. Plant Phys.* 169: 387-398

Zhu, P., Gu, h., Jiao, Y., Huang, D., Chen. M. (2011). Computational identification of rice PPI by PRIN. *Genomics proteomics bioinformatics*, 2011 Oct; 9(4-5): 128 – 137

Zivy, M., de Vienne D. 2000. Proteomics: a link between genomics, genetics and physiology. *Plant Mol Boil.* 44: 575-580