

BÚSQUEDA DE PROTEÍNAS NO VARIABLES EN *Zea mays* BAJO LOS EFECTOS DE ESTRÉS BIÓTICO OCASIONADO POR *Aspergillus flavus*

Daymile Pérez, Leandro Balzano, José G. Faks, Carolina Bernal, Iván Galindo-Castro y Nardy Diez

RESUMEN

El ataque de patógenos en plantas resulta en numerosas respuestas bioquímicas que determinan la habilidad de la planta para combatir la agresión. El mejoramiento del maíz (*Zea mays*) requiere de un manejo agronómico para el cual han sido importantes los estudios de la infección por el patógeno a nivel molecular, los que se han enfocado en el estudio de genes y proteínas inducidos por los patógenos. Sin embargo, no hay información sobre las proteínas presentes de forma no variable y su posible papel en la resistencia, ya que ellas pueden determinar el sostenimiento de la planta frente a la infección. En este trabajo se utilizaron herramientas proteómicas para identificar proteínas no variables en los perfiles proteicos de granos de una línea resistente y una susceptible de maíz bajo

estrés biótico tras ser inoculadas con el hongo *Aspergillus flavus*. Las manchas seleccionadas fueron sometidas a una digestión in situ con tripsina seguida de su posterior identificación por espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF. Se seleccionaron 20 proteínas presentes en todas las condiciones y tras su identificación a través de las bases de datos se determinó que el 50% de ellas podrían estar asociadas con el metabolismo (síntesis de isoprenoides, ruta del mevalonato y el ciclo celular), el 40% con condiciones de estrés (producción de especies reactivas de oxígeno, estrés hídrico y patogenicidad), y un 10% con proteínas hipotéticas de función desconocida. Estos resultados aportan más información al proteoma completo para facilitar futuras investigaciones.

Introducción

El maíz (*Zea mays* L.) es junto con el trigo (*Triticum aestivum* L.) y el arroz (*Oryza sativa* L.) uno de los cereales más importantes en todo el mundo. Para el año 2011 el consumo mundial de maíz era de $\sim 872 \times 10^6$ ton según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Venezuela es un gran productor y consumidor del grano, siendo la producción nacional para el 2010 de 3.378.400 ton (<http://faostat.fao.org/>).

Junto con las plantas modelo *Arabidopsis thaliana* y arroz, el maíz ha sido extensamente estudiado a nivel molecular y de proteínas mediante el uso de herramientas proteómicas (Vyroubalova *et al.*, 2009). Actualmente la combinación de

técnicas como los geles bidimensionales y nuevos métodos de procesamiento disponibles para la identificación rutinaria de proteínas extraídas a partir de dichos geles, con la espectrometría de masas han colaborado a lograr grandes avances en comprender cuáles proteínas interactúan en el metabolismo y de qué manera ello ocurre (Shevchenko *et al.*, 1996; Humphery-Smith *et al.*, 1997; Jungblut y Thiede, 1997).

El ataque de patógenos en plantas resulta en numerosas respuestas bioquímicas y la activación de algunas de ellas determina la capacidad de la planta de combatir las enfermedades. La planta de maíz es susceptible a ser infectada por varios patógenos como bacterias y hongos, y un ejemplo de ellos es el hongo *Aspergillus flavus*

(Abarca *et al.*, 2000). Este hongo posee los genes capaces de sintetizar aflatoxinas (Yu *et al.*, 2004) pero el que se dispare o no esta síntesis depende del cultivo al que se asocie; en maní y en algunas variedades de maíz produce aflatoxinas que son conocidas como metabolitos secundarios cancerígenos (Maggioni *et al.*, 1977).

En el caso del maíz, el estudio de las proteínas ha sido enfocado hacia aquellas que presentan una expresión diferencial y que se encuentran relacionadas con la resistencia a patógenos como *A. flavus* (Chen *et al.*, 1998, 2002) y *Fusarium verticilloides* (Campo *et al.*, 2004); además de condiciones de estrés abiótico, como el estrés hídrico (Riccardi *et al.*, 1998; Vienne *et al.*, 1999). Esa información ha sido utili-

zada para la creación de líneas híbridas mejoradas (FAO, 2007) y el desarrollo de germoplasmas resistentes al hongo y por ende a la producción de aflatoxinas (Brown *et al.*, 2001). Sin embargo, se desconocen aquellas proteínas que se presentan constantemente y los acontecimientos metabólicos globales en los que estas se encuentran implicadas.

El proteoma se está convirtiendo en un concepto importante de la era post-genómica. Herramientas de biología molecular tales como los marcadores de secuencias expresadas, microarreglos, etc. aún son limitados, ya que las secuencias de ADN y los niveles de ARNm no son suficientes como para predecir la estructura, función, cantidad y actividad de las proteínas en las células. El proteo-

PALABRAS CLAVE / Espectrometría de Masas / MALDI-TOF / Proteómica Comparativa / *Zea mays* /

Recibido: 09/01/2012. Modificado: 08/08/2013.- Aceptado: 02/09/2013.

Daymile Pérez. Licenciada en Biología, Universidad Central de Venezuela (UCV). Investigadora, Instituto Nacional de Nutrición, Venezuela. e-mail: Daymile@gmail.com

Leandro Balzano. Licenciado en Biología, UCV, Venezuela. Doctor en Biología Celular, Universidad Simón Bolívar (USB), Venezuela. Investigador, Instituto de Estudios

Avanzados (IDEA), Venezuela. e-mail: lbalzano@idea.gob.ve

José G. Faks. Licenciado en Biología y Doctor en Biología Celular, USB, Venezuela. Investigador, IDEA, Venezuela. e-mail: jfaks@idea.gob.ve

Carolina Bernal. Licenciada en Bioanálisis y Doctora en Biología Celular, UCV, Venezuela. Investigadora, IDEA, Venezuela. Dirección: Laboratorio de

Genómica y Proteómica, Unidad de Polimorfismos Genéticos, Centro de Biotecnología, Fundación IDEA carretera Baruta Hoyo de la Puerta Sector Monte Elena, Sartenejas, Caracas 1081, Venezuela. e-mail: cbernal@idea.gob.ve

Iván Galindo-Castro. Licenciado en Biología, UCV, Venezuela. Doctor en Biología Celular, Universidad Simón Bo-

lívar, Venezuela. Investigador, IDEA, Venezuela. e-mail: igalindo@idea.gob.ve

Nardy Diez. Licenciada en Biología, UCV, Venezuela. Doctora en Biología, Universidad de Alcalá de Henares, España. Investigadora, IDEA, Venezuela. e-mail: ndiez@idea.gob.ve

SEARCH OF INVARIANT PROTEIN IN *Zea mays* UNDER BIOTIC STRESS CAUSED BY *Aspergillus flavus*

Daymile Pérez, Leandro Balzano, José G. Faks, Carolina Bernal, Iván Galindo-Castro and Nardy Diez

SUMMARY

Plant pathogen attacks result in numerous biochemical responses that determine the plant ability to fight the aggression. Maize (*Zea mays*) crop improvement requires an agronomic management in which the studies of infection by the pathogen at the molecular level are important, having focused on the study of genes and proteins induced by the pathogen. However, the invariant proteins present and their possible role in resistance, as they can determine the maintenance of the plant against infection, have not been characterized. Proteomic tools were used to identify invariant proteins in protein profiles of grains from resistant and susceptible corn lines under biotic stress after being inoculated with the fungus *Aspergillus flavus*.

Selected spots were subjected to *in situ* digestion with trypsin followed by subsequent identification by MALDI-TOF mass spectrometry. Twenty proteins were selected that were present in all conditions and after identification through databases it was determined that 50% of them may be associated with metabolism (isoprenoid synthesis, mevalonate pathway and cell cycle), 40% with stress conditions (production of reactive oxygen species, water stress and pathogenicity), and 10% with hypothetical proteins of unknown function. These results provide more complete proteome information to facilitate future research.

BUSCA DE PROTEÍNAS NÃO VARIÁVEIS EM *Zea mays* SOB OS EFEITOS DE ESTRESSE BIÓTICO OCASIONADO POR *Aspergillus flavus*

Daymile Pérez, Leandro Balzano, José G. Faks, Carolina Bernal, Iván Galindo-Castro e Nardy Diez

RESUMO

O ataque de patógenos em plantas resulta em numerosas respostas bioquímicas que determinam a habilidade da planta para combater a agressão. O melhoramento do milho (*Zea mays*) requer de um manejo agrônomico para o qual tem sido importantes os estudos da infecção pelo patógeno a nível molecular, os que se têm focado no estudo de gens e proteínas induzidos pelos patógenos. No entanto, não há informação sobre as proteínas presentes de forma não variável e seu possível papel na resistência, já que elas podem determinar o sustento da planta diante a infecção. Neste trabalho se utilizaram ferramentas proteômicas para identificar proteínas não variáveis nos perfis proteômicos de grãos de uma linha resistente e uma suscetível de milho sob estresse biótico depois de ser inoculadas com o fun-

go *Aspergillus flavus*. As manchas selecionadas foram submetidas a uma digestão *in situ* com tripsina seguida de sua posterior identificação por espectrometria de massas de tipo MALDI-TOF. Selecionaram-se 20 proteínas presentes em todas as condições e depois da sua identificação através das bases de dados se determinou que 50% delas poderiam estar associadas com o metabolismo (síntese de isoprenóides, rota do mevalonato e o ciclo celular), 40% com condições de estresse (produção de espécies reactivas de oxigênio, estresse hídrico e patogenicidade), e 10% com proteínas hipotéticas de função desconhecida. Estes resultados fornecem mais informação ao proteoma completo para facilitar futuras investigações.

ma ahora puede ser objeto de análisis a gran escala debido a los avances en las técnicas de identificación de las proteínas extraídas de geles bidimensionales (Vienne *et al.*, 1999).

La electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2D-PAGE) ha sido aplicada con éxito para estudiar cambios en los patrones de las proteínas en tejidos de plantas en respuesta a estrés biótico y abiótico (Campo *et al.*, 2004), como es el caso del maíz, en donde el interés principal ha estado en las proteínas que presentan expresión diferencial y que se encuentran relacionadas con los mecanismos de defensa contra el ataque de patógenos y condiciones de estrés. Pero solo en el caso de análisis completo de los pro-

teomas se ha prestado atención a aquellas proteínas que no varían en su expresión.

El presente trabajo hace énfasis en las proteínas que se encuentran constantemente presentes en una línea resistente y una susceptible de maíz blanco, sin inocular e inoculadas con el hongo, con la finalidad de comprender las respuestas bioquímicas del grano de maíz y de esta forma complementar la información existente en las bases de datos y aportar información al proteoma completo para facilitar futuras investigaciones.

Materiales y Métodos

Germoplasma

El material vegetal utilizado fue granos de maíz blanco de

una línea resistente (397) y una línea susceptible (448), sin inocular e inoculados con *Aspergillus flavus*, los cuales fueron recolectados, seleccionados y tratados. La susceptibilidad o resistencia de los granos de estas líneas fue previamente determinada por investigadores de la Fundación DANAC, Venezuela (Alezones, 2007), utilizando una modificación del ensayo KSA (siglas de *kernel screening assay*; Chen *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 2003) Las líneas de maíz utilizadas en este estudio son genéticamente muy cercanas y esto se determinó en base a un estudio del pedigrí de las mismas, a fin de asegurarse de la cercanía de sus genomas, realizado en la mencionada institución (Alezones, 2007).

Extracción de proteínas

La extracción de proteínas de los granos se realizó utilizando una modificación del protocolo de Campo *et al.* (2004). Para ello se utilizó la harina de los granos, obtenida por molienda en un molino de café. Se tomaron 100mg de la harina y se incubaron con tampón de extracción básica (Tris-HCl a pH 7,5; 50mmol·l⁻¹ de NaCl y 0,1% de 2-mercaptoetanol y cóctel de inhibidores de proteasas (GE Health Care, Amersham), se incubó durante 1h a 37°C y 1000rpm. Luego las muestras se centrifugaron a 4°C y 12000rpm, se descartó el precipitado y se tomó el sobrenadante para precipitar las proteínas durante toda la noche con etanol 70%

.Luego de centrifugar a 4°C y 12000rpm, por 10min se descartó el sobrenadante. Las proteínas extraídas que se encontraban en el precipitado se guardaron a -70°C para su posterior uso.

Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas de los extractos se determinó mediante una modificación del ensayo de Bradford (1976), utilizando el reactivo BioRad, Alemania, y un estándar de albúmina bovina de la misma casa.

Geles de poliacrilamida

La separación de las proteínas se realizó a través de PAGE-SDS realizados según el protocolo de Laemmli (1970). Los extractos de proteínas fueron disociados calentando a 90°C por 5min en presencia de tampón desnaturalizante (Tris-HCl 20mM pH 8,6 con SDS 1%, glycerol 8,3% y 2-mercaptoethanol 0,5%) y separadas en geles de poliacrilamida al 12%.

Geles bidimensionales (2-DE)

Los geles en dos dimensiones fueron realizados según O'Farrell (1975). La separación se realiza en base a dos criterios de las proteínas: la primera dimensión en base al punto isoelectrico (pI) y la segunda dimensión en base a la masa molecular (MM). Para la primera dimensión se utilizaron tiras de gradiente de pH IpG (General Electric, EEUU), con un intervalo de pH distribuido linealmente entre 3 y 10, de 7cm de longitud, en tres pasos: rehidratación, enfoque y equilibración, según especificaciones del fabricante (GE Health Care, Amersham). Para la segunda dimensión, las tiras fueron acopladas a geles de poliacrilamida al 12% y de 1mm de espesor con agarosa 0,5% y se realizó la electroforesis en una cámara Mini-protean II BioRad, utilizando tampón Tris-glycine-SDS a 200V. Las manchas (o puntos, del inglés

spots) fueron visualizados con tinción de plata PlusOne™ (Amersham Bio-Sciences).

Análisis de imágenes

Una vez teñidos los geles se llevó a cabo un análisis para lo que fueron fotografiados con un equipo Perkin Elmer (Waltham, MA, EEUU) modelo ProXCISION. Las imágenes digitales obtenidas fueron analizadas empleando el programa Phoretix 2D versión 2004. Se determinó la presencia de perfiles comunes y no comunes para cada variedad, así como las manchas no variables.

Se utilizaron valores teóricos de pI y MM como criterios que permitieron ubicar las zonas de las imágenes de los geles donde se ubicarían las proteínas de interés.

Preparación de muestras para espectrometría de masas

Luego de seleccionados las manchas no variables, éstas fueron cortadas del gel para realizar una digestión *in situ* con tripsina, siguiendo los pasos que se describen a continuación para cada uno de ellos. 1) Reducción y alquilación: se incubaron las manchas contenidas en pequeñas piezas de gel con una solución de DTT 10mmol·l⁻¹ en bicarbonato de amonio 100mmol·l⁻¹ por 30min a 56°C. Luego se incubaron con una solución de iodoacetamida 55mmol·l⁻¹ en bicarbonato de amonio 100mmol·l⁻¹ por 20min en oscuridad y a temperatura ambiente. 2) Digestión con tripsina: se realizaron dos lavados con acetonitrilo 50% en NH₄HCO₃ 50mmol·l⁻¹ por 20min a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó un lavado con acetonitrilo puro durante 5min a temperatura ambiente y los geles fueron secados a 50°C por ~45min en un termo-bloque Eppendorf. Se rehidrataron las piezas de gel con una solución de tripsina en tampón de digestión y se incubaron en hielo durante 1h. Posteriormente se colocó un volumen de tampón de digestión y se

incubaron a 37°C por 12-16h. El tampón de digestión se recuperó de este proceso y en él están presentes los péptidos tripticos que fueron eluidos de la matriz de los geles.

Estas muestras se colocaron en una placa de acero inoxidable junto con una matriz de ácido α -hidroxi-cinámico y un estándar de varios péptidos sintéticos de masa conocida (PerkinElmer) fue incluido para la calibración del equipo.

Obtención de la huella peptídica por MALDI-TOF

Se utilizó el espectrómetro de masas tipo MALDI pro-TOF 2000 de PerkinElmer. La placa con las muestras se colocó en el sistema de vacío del equipo y se obtuvieron las masas de cada péptido con una intensidad de láser del 70%, los espectros de los péptidos o huellas peptídicas (*fingerprinting*) se procesaron utilizando el programa informático TOF Works de PerkinElmer, para obtener un grupo de péptidos de masa/carga conocida, los cuales sirvieron para la identificación a través de bases de datos.

Análisis de bioinformática

La huella peptídica obtenida fue comparada con otras teóricas que se encuentran en bases de datos. En este caso se utilizó el motor de búsqueda Matrix Science MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) en la opción 'huella peptídica' (del inglés *peptide mass fingerprint*). Se utilizaron dos bases de datos para esta identificación: la del *National Center for Biotechnology Information* o NCBIInr (www.ncbi.nlm.nih.gov) y la del *Swiss Institute of Bioinformatics* o Swiss-Prot (www.expasy.org/sprot/). Las secuencias de las proteínas que no obtuvieron coincidencias con maíz, fueron introducidas en BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) para alinear dichas secuencias con las bases de datos existentes de maíz. Se seleccionó la identificación de la proteína candidata de acuerdo al porcentaje de ho-

mología que presenta y qué tanto se parecen las secuencias de péptidos introducidas a las secuencias reportadas en las bases de datos. Finalmente, se investigó la función de cada una de las proteínas identificadas.

Resultados y Discusión

Perfiles proteicos

Los perfiles de los granos de la línea resistente (397) y de la línea susceptible (448) sin inocular, y los perfiles de los granos de la línea resistente (397) y de la línea susceptible (448) inoculados con el hongo *Aspergillus flavus* se aprecian en la Figura 1.

Selección de las proteínas no variables

En un primer análisis se compararon los perfiles proteicos de los granos de la línea resistente (397) sin inocular e inoculada, y los perfiles de la línea (448) sin inocular e inoculada (Figura 2). Como resultado, los perfiles de los granos de maíz de la línea resistente 397 (inoculados y sin inocular) tienen mayor cantidad de manchas totales (mancha 394 y 325, respectivamente) que los perfiles de la línea susceptible 448 (inoculados y sin inocular; manchas 382 y 252, respectivamente). Además, también se observó que los geles sometidos a una condición de estrés como es la inoculación con un patógeno, en este caso con *A. flavus*, obtuvieron un mayor número de manchas que los geles de los granos sin inocular, similar a lo obtenido por Campo *et al.* (2004) en su trabajo con *Fusarium verticilloides*. El grano en condiciones de estrés activa una serie de rutas metabólicas de defensa para volver a sus condiciones normales, en donde participan una mayor cantidad de proteínas que cuando el grano no se encuentra sometido a ningún tipo de estrés (Chen *et al.*, 1998; Ricardi *et al.*, 1998; Campo *et al.*, 2004).

Es pertinente señalar que la coincidencia de los perfiles de

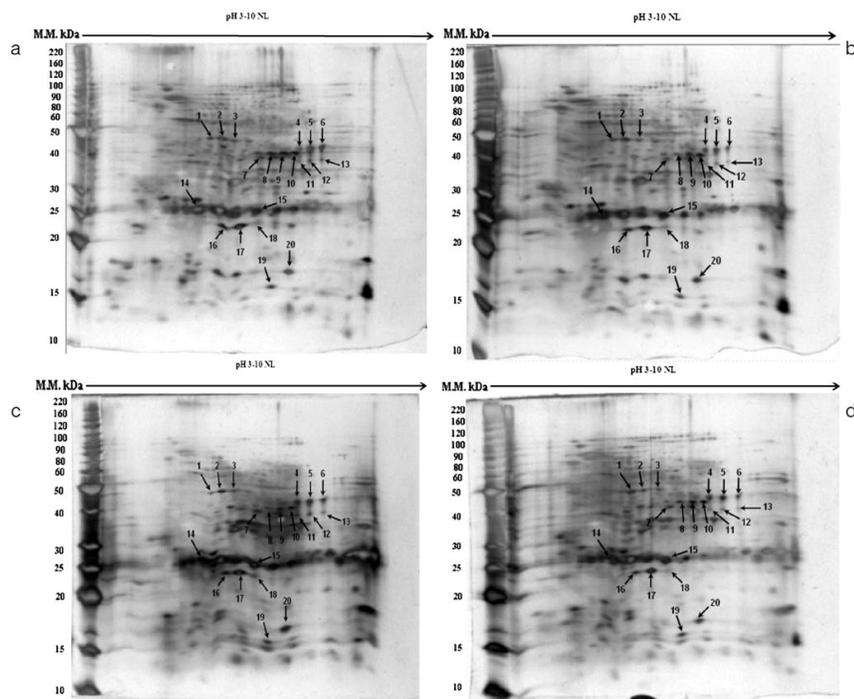


Figura 1. Análisis comparativo de los perfiles proteicos de los granos de la línea resistente 397 (a: sin inocular y c: inoculados) y susceptible 448 (b: sin inocular y d: inoculados) realizado con el programa Phoretix 2D v2004. Los 20 puntos proteicos no variables seleccionados con el análisis se encuentran señalados con flechas negras y numeradas del 1 al 20. El análisis se realizó en base al punto isoeléctrico (pI, eje de las X) y masa molecular (MM eje de las Y).

los granos de la línea resistente 397 obtuvo un número mayor de manchas no variables (93 coincidencias), en comparación con el análisis de los perfiles de los granos de la línea susceptible 448, el cual obtuvo un menor número (78 coincidencias; Figura 2). Esto se debe a que los granos de la línea resistente tienen manchas que los granos susceptibles no poseen. Estas proteínas hacen la diferencia entre ambas líneas y posiblemente son las responsables de la resistencia de una de ellas, tal como también ha sido reportado por Chen *et al.* (2002).

Se realizó una segunda comparación entre los perfiles de los granos de la línea resistente 397 sin inocular con el perfil de los granos de la línea susceptible 448 sin inocular, y entre los perfiles de los granos de la línea resistente 397 inoculada con los granos de la línea susceptible 448 inoculada. Como se muestra en el diagrama de Venn (Figura 2) los perfiles inoculados con el hongo poseen un

mayor número de proteínas no variables (50 coincidencias) en comparación con los perfiles sin inocular (20 coincidencias), lo cual es lógico ya que los perfiles inoculados poseen un mayor número de proteínas, lo cual se discutió anteriormente según lo reportado por Campo *et al.* (2004).

Finalmente, se realizó una comparación entre los perfiles promedio obtenidos de las líneas sin inocular y de las líneas inoculadas, en donde se compararon los valores de pI y MM de las proteínas que hicieron coincidencia en ambos casos y se verificó que además se encontraban ubicadas en las mismas coordenadas en todos los geles. Se encontró que las 20 proteínas no variables en los perfiles sin inocular (Figura 2) también se encontraron en los perfiles inoculados. Estas proteínas se muestran en la Figura 1, señaladas con flechas negras y numeradas del 1 al 20. Los valores de pI y MM de cada una de estas proteínas en los cuatro perfiles se encuentran en la Tabla I. Se pueden observar similitudes en los

cuatro perfiles tanto en la ubicación, forma e intensidad de cada mancha, así como también en sus valores de pI y MM. Es por ello que

se decidió seleccionar estas 20 proteínas para estudiarlas a profundidad e identificarlas. Este análisis tuvo la finalidad de tener un criterio de selección mucho más amplio que

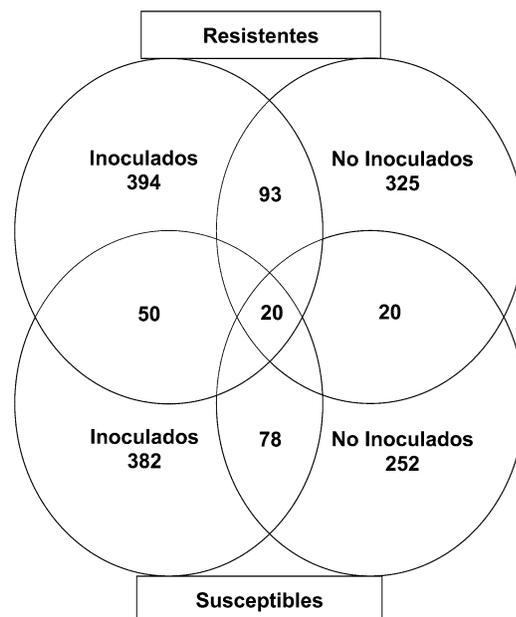


Figura 2. Diagrama de Venn de la comparación entre cepas susceptibles y resistentes inoculadas y sin inocular. Solo 20 manchas fueron seleccionadas como no variables (centro del diagrama).

TABLA I
VALORES DE PUNTO ISOELÉCTRICO (pI) EN KDa REFERIDOS A pH Y MASA MOLECULAR (MM) DE LAS 20 PROTEÍNAS NO VARIABLES EN LOS PERFILES DE LOS GRANOS DE MAÍZ DE LAS LÍNEAS RESISTENTE Y SUSCEPTIBLE INOCULADAS Y SIN INOCULAR

Tratamiento	Sin Inocular				Inoculadas			
	397		448		397		448	
Variedades	pI	MM	pI	MM	pI	MM	pI	MM
Mancha								
1	5,9	47,4	5,6	48,3	5,7	47,3	5,5	47,4
2	6,2	47,0	5,9	49,2	5,9	47,3	5,7	47,4
3	6,5	46,3	6,2	49,6	6,3	47,3	6,0	47,7
4	8,1	43,3	7,9	44,6	7,9	43,1	7,8	45,5
5	8,4	42,6	8,2	44,6	8,2	42,7	8,1	45,2
6	8,7	43,3	8,6	45	8,5	43,8	8,5	45,8
7	7,1	39,5	6,8	40,4	6,9	39,3	6,7	24,5
8	7,4	41,1	7,1	41,7	7,2	41,5	7	43,9
9	7,7	41,1	7,4	41,7	7,5	41,5	7,3	43,6
10	8	41,1	7,8	42,1	7,8	40,8	7,6	43,6
11	8,1	38,4	7,9	39,5	7,9	38,3	7,8	41,3
12	8,4	38,4	8,2	39,5	8,5	39	8,5	41,6
13	8,7	39	8,6	39,7	8,2	38,5	8,1	41,3
14	5,5	26,2	5,3	27,1	6,3	26,3	6,1	27,2
15	7,1	26	6,8	26,0	6,7	26,8	6,4	27,8
16	6,2	23	5,9	24,3	6	23,5	5,8	24,2
17	6,6	23	6,4	24,3	6,5	23,7	6,2	24,7
18	7,1	23,4	6,8	23,4	6,9	24,1	6,7	24,5
19	7,1	39,5	6,8	40,4	6,9	39,3	6,7	24,5
20	7,8	16,2	7,6	16,8	7,7	17,1	7,5	17,8

LISTA DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS A PARTIR DEL PERFIL PEPTÍDICO EN DIFERENTES BASES DE DATOS DE PLANTAS UTILIZANDO MASCOT COMO MOTOR DE BÚSQUEDA. VALORES DE PUNTO ISOELÉCTRICO (pI) REFERIDOS A PH Y MASA MOLECULAR (MM) REFERIDOS EN KDa

Mancha	Base de datos	Proteína identificada	pI (pH)		MM (KDa)		Cobertura %	Homología %
			O/T	O/T	O/T	O/T		
1		Proteasoma subunidad alfa	5,5/5,7		47,5/27,5		35	100
2	<i>Zea mays</i>	Superoxidasa dismutasa mitocondrial	5,8/7,1		47,8/25,5		28	60
3	<i>Zea mays</i>	Aminoácido permeasa	6,0/11,8		47,5/23,0		52	100
4	<i>Zea mays</i>	(S)-adenosil-L-methionina:delta 24-esterol metiltransferasa	6,7/5,9		39,0/38,9		16	100
5	<i>Zea mays</i>	Transportador de potasio	7,7/5,5		42,0/136,5		10	61
6	<i>Zea mays</i>	Isopentenil transferasa IPT4	8,5/9,0		43,5/39,6		15	100
7	<i>Zea mays</i>	Proteína relacionada con retinoblastoma	8/9,8		38,0/27,9		27	62
8	<i>Glycine max</i>	Transportador de potasio	5,5/6,1		26,0/22,0		17	82
9	<i>Zea mays</i>	Proteína de unión ku70	6,0/7,0		23,0/23,0		18	100
10	<i>Solanum tuberosum</i>	Proteína desconocida	6,0/5,73		22,0/17,0		39	62
11	<i>Zea mays</i>	ATPasa catáptica tipo vacuolar subunidad A (fragm)	6,7/5,8		25,5/62,1		12	100
12	<i>Zea mays</i>	Proteína hipotética	7,0/8,9		24/43,4		17	100
13	<i>Zea mays</i>	Proteína hipotética	7,0/11,4		16,5/11,0		45	100
14	<i>Zea mays</i>	ARN Helicasa dependiente de ATP	7,4/6,2		42,0/48,1		19	97
15	<i>Populus trichocarpa</i>	Proteína de unión de oxiesteroles	8,0/8,2		43,5/76,2		18	40
16	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Oxidasa alternativa 1	8,5/8,5		40,0/40,1		23	64
17	<i>Medicago Sativa</i>	Manitol deshidrogenasa	8,0/7,1		39,0/39,4		16	96
18	<i>Ginkgo biloba</i>	Isopentenil pirofosfato isomerasa	8,0/5,9		42,0/36,9		27	85
19	<i>Solanum pennellii</i>	Proteína de transferencia de lípidos	7,0/8,3		15,0/12,2		30	100
20	<i>Glycine max</i>	Isoenzima catalasa	6,7/6,7		41,0/57,2		15	95

O: valor observado, T: valor teórico, cobertura: porcentaje de la secuencia original que completa la huella peptídica obtenida, y homología: porcentaje de similitud con la secuencia aminoacídica original.

permitiera asegurar que aquellas seleccionadas son realmente proteínas no variables en los cuatro casos, sin alterar su expresión; es decir, que no se sobreexpresaron ni se subexpresaron en ninguno de los perfiles.

Identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF

Luego de seleccionadas las manchas no variables por medio de los geles bidimensionales, estas fueron cortadas, procesadas e identificadas por espectrometría de masas tipo MALDI TOF. En la Tabla II se muestra una lista de algunas de las proteínas identificadas y de los criterios de búsqueda y selección que se establecieron en el análisis bioinformático de los datos (ver Materiales y Métodos).

Tras su identificación se investigó la posible función de cada una de ellas. Las proteínas identificadas se agrupan (Figura 3) según su función en: proteínas relacionadas con funciones metabólicas (50%), proteínas involucradas en condiciones de es-

trés (40%) y proteínas hipotéticas (10%).

Proteínas involucradas en el metabolismo

Como está representado en la Figura 3, las proteínas identificadas con funciones metabólicas del grano son las más abundantes. Entre ellas se encuentran:

Proteínas involucradas en transporte. Dos manchas fueron identificadas como transportadores de potasio (manchas 5 y 8). El potasio juega un papel importante en las funciones celulares básicas, así como en la regulación de la presión osmótica y el potencial de membrana (Su *et al.*, 2005). Los transportadores de este ión se activan cuando existe deficiencia del mismo, proporcionando un sistema eficiente de su obtención en la planta. Ashley *et al.* (2006) encontraron que el potasio representa el 10% del peso seco en el grano de maíz y contribuye con la rigidez de sus paredes. Una enzima que tiene como función el transporte de nutrientes es la aminoácido permea-

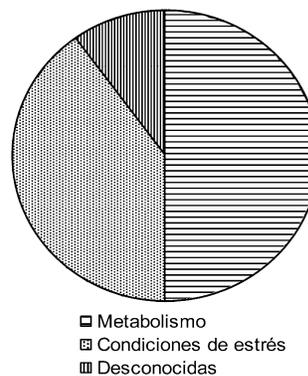


Figura 3. Clasificación funcional de las proteínas constantemente presentes en las líneas estudiadas.

sa encontrada en el análisis (mancha 3), la cual participa en el transporte activo de aminoácidos en plantas (Sauer, 1984), y además permite el transporte de nutrientes hacia el endospermo para un buen desarrollo de los embriones durante la embriogénesis (Svennerstam *et al.*, 2008). Cabe resaltar que el material vegetal estudiado son granos completos que incluyen endospermo y embrión, por lo cual no es de extrañar la presencia de esta enzima entre las identificadas.

Proteínas involucradas en la síntesis de isoprenoides y citoquininas. Se identificaron diferentes proteínas que participan en la síntesis de isoprenoides como los fitoesteroles. Su producción se inicia cuando el acetil-CoA es transformado a hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) y éste es posteriormente reducido por una HMG-CoA reductasa a mevalonato (Guo *et al.*, 1995). En la ruta metabólica del mevalonato actúa otra proteína identificada en el presente trabajo, la enzima isopentenil pirofosfato isomerasa (IPP isomerasa; mancha 18), la cual isomeriza el isopentenil pirofosfato (IPP) para producir dimetilalil pirofosfato (DMAPP), que junto con ATP o AMP es el sustrato para la enzima isopentenil transferasa (mancha 6), también identificada en la síntesis de citoquininas. Las citoquininas participan en procesos tales como el crecimiento y desarrollo de la planta, senescencia de las hojas, dominancia apical y competencia reproductiva (Kakimoto, 2001). El DMAPP también puede seguir por la vía de formación de isoprenoides mediante la adi-

ción de moléculas de isopentenil pirofosfato (Sapir-Mir *et al.*, 2008).

Una vía que conecta con la síntesis de isoprenoides es la que transforma el cicloartenol en 24-metilen cicloartenol y es mediada por una metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina (Grebenok *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2007), la que fue identificada en este trabajo (mancha 4). Los isoprenoides son importantes debido a sus distintas funciones en las plantas, como por ejemplo en forma de fitosteroles, que son componentes estructurales de las membranas. La proteína de unión de oxisteroles (mancha 15), también identificada, posee una alta afinidad por los miembros de esta familia de fitosteroles y su función, como su nombre lo indica, es favorecer la unión de esteroides a la membrana celular (Li *et al.*, 2008).

Se esperaba obtener proteínas que participan en el metabolismo y mantenimiento del grano de maíz, favoreciendo la ruta de la síntesis de citoquininas, las cuales permiten el desarrollo y crecimiento de la planta, y la biosíntesis de isoprenoides tales como los fitosteroles, que están involucrados en la estructura y rigidez de la pared del grano, la cual adicionalmente proporciona una barrera física contra los hongos patógenos (Chen *et al.*, 2004). Otra barrera física del grano la proporciona la cera contenida en el pericarpio, que está compuesta por un porcentaje de lípidos los cuales son movilizados entre las membranas mediante una proteína de transferencia de lípidos (Molina *et al.*, 1993), que también fue identificada en este trabajo (mancha 19), ya que los granos de maíz son semillas que presentan un alto contenido de aceite.

Proteínas involucradas en el ciclo celular. Se identificaron proteínas involucradas en el ciclo celular, una proteína relacionada con retinoblastoma (mancha 7) que tiene participación en procesos de prolife-

ración celular (Echevarría-Machado *et al.*, 2002) y una ARN helicasa dependiente de ATP (mancha 14), que es una proteína esencial en muchos procesos celulares importantes, que involucran el crecimiento y desarrollo de la planta (Tuteja *et al.*, 2010). Ambas proteínas son de importancia, ya que la división celular en las plantas es un proceso vital no solo para el crecimiento vegetal, sino también para el desarrollo. Durante esta etapa en la planta se originan cambios críticos que conducen a la diferenciación celular y también puede determinar la función de la progenie en el cuerpo de la planta (Echevarría-Machado *et al.*, 2002). Las proteínas involucradas en el ciclo celular siempre se encuentran en cualquier parte de la planta. Además, el que en el presente trabajo se utilizó el grano completo de maíz, incluyendo el embrión, es otra razón para encontrar este tipo de proteínas de expresión constitutiva.

Proteínas involucradas en condiciones de estrés

Otro grupo importante de proteínas identificadas fueron las que participan en condiciones de estrés, entre las que se encuentran:

Proteínas involucradas en estrés oxidativo. La producción de especies reactivas de oxígeno aumenta bajo condiciones de estrés y si la reducción completa de estas especies no ocurre, el resultado puede ser un estado de estrés elevado, provocando la oxidación de biomoléculas tales como lípidos, proteínas y ADN, o incluso muerte celular (Campo *et al.*, 2004). Proteínas identificadas en este trabajo, como la superoxidasas dismutasa (mancha 2), catalasa (mancha 20), oxidasa alternativa (mancha 16) y la subunidad alfa del proteosoma (mancha 1), bajo condiciones fisiológicas normales son enzimas que juegan un papel central en las líneas de defensa de protección de la célula de sufrir daño oxidativo

(Campo *et al.*, 2004). La superoxidasas dismutasa (mancha 2) degrada las especies reactivas de oxígeno O_2^- en O_2 y H_2O_2 , pero este H_2O_2 resultante puede reaccionar con iones metálicos generando compuestos altamente tóxicos, por lo que la catalasa (mancha 20) lo degrada en O_2 y H_2O (Moller, 2001). La subunidad alfa del proteosoma (mancha 1) reconoce los residuos hidrofóbicos de las proteínas oxidadas y las degrada, siendo este un mecanismo de defensa selectivo contra el estrés oxidativo (Basset *et al.*, 2002). Por otro lado, la oxidasa alternativa (mancha 16) en ausencia de oxígeno activa una ruta alternativa de incorporación del mismo a los tejidos vegetales, reduciendo así los efectos perjudiciales del estrés oxidativo (Polidoros *et al.*, 2005).

Proteínas involucradas en estrés hídrico. Otras proteínas incluidas en este grupo son la ATPasa de tipo vacuolar (mancha 11), la que participa en procesos de osmorregulación (Domgall *et al.*, 2002), la enzima manitol deshidrogenasa (mancha 17), que regula la acumulación de manitol en las plantas (Abebe *et al.*, 2003) y al igual que la ATPasa de tipo vacuolar, también participa en procesos de osmorregulación. Estas enzimas, conjuntamente con la oxidasa alternativa (mancha 16) y la catalasa (mancha 20), además de poseer la función anteriormente señalada, también participan en condiciones de estrés hídrico, actuando como osmoprotectores (Scandalios, 2005). La presencia de estas proteínas podría estar relacionada con el hecho que al momento de inocular los granos con el hongo en ambos tratamientos, sin inocular e inoculados, fueron colocados en presencia de agua y en una solución de esporas respectivamente durante 10 min, y posteriormente se les retiró el líquido y fueron colocados en bandejas individuales en una cámara con 100% de humedad relativa durante 20h, tiempo suficiente para activar

la señal de defensa de los granos contra el estrés hídrico y la de la germinación.

Proteínas involucradas en choque térmico. También se identificó en este grupo, una proteína de choque térmico, la proteína de unión ku70 (mancha 9), que actúa como chaperona previniendo la agregación irreversible de proteínas desnaturalizadas por calor o por condiciones de estrés (Campo *et al.*, 2004). Las proteínas de este tipo son abundantes en tejidos vegetales y su presencia en este caso podría estar relacionada adicionalmente a que en el proceso de infección de los granos, ambos tratamientos, granos infectados y sin infectar, fueron sometidos a altas temperaturas (60°C) para estimular la proliferación del hongo en los granos infectados.

Proteínas relacionadas con patogenicidad

Se logró identificar una proteína de patogenicidad en papa (*Solanum tuberosum* L.), mas su función en maíz se desconoce. Las plantas siempre poseen de este tipo de proteínas en condiciones basales y son las que más cambian entre una condición normal y una condición de estrés biótico causada por un patógeno, en este caso *A. flavus*. Su presencia invariable podría deberse a que el tiempo de incubación con el patógeno no fue suficiente para observar una expresión diferencial, sin embargo, es probable que niveles basales de esta proteína se encuentren en el grano para la activación de algún mecanismo de señalización para la defensa de la planta.

Proteínas hipotéticas

Se identificaron dos proteínas hipotéticas de maíz, pero se desconoce su función. Aunque el genoma completo del maíz fue secuenciado recientemente, no se conocen las funciones del total de genes y proteínas.

Cabe señalar que de 20 proteínas seleccionadas, cor-

tadas y procesadas, 18 de ellas dieron un espectro de masas de proteínas candidatas identificadas en maíz, lo cual constituye un alto porcentaje, ya que en la mayoría de este tipo de trabajos es posible tener hasta el 50% de proteínas hipotéticas (Chen *et al.*, 2002; Campo *et al.*, 2004), debido a que aun no se conoce la función de todos los genes depositados en las bases de datos.

Conclusiones

Los avances alcanzados con este estudio permiten obtener una visión holística de las rutas metabólicas al comparar con otros estudios realizados y colaboran con el entendimiento de los genomas de rubros tan importantes como es en este caso del maíz. Todos los avances en este sentido pueden ayudar en la búsqueda de marcadores para el mejoramiento genético, reduciendo considerablemente los tiempos de dicho mejoramiento respecto a los métodos tradicionales. En cuanto al papel de las proteínas de expresión constitutiva reportadas en este trabajo, intervienen en un 50% en el metabolismo, en un 40% en condiciones de estrés y 10% son hipotéticas, tal como se esperaba. Las primeras cumplen en su mayoría funciones metabólicas en el grano; sin embargo, en conjunto también pueden estar asociadas a un importante rol de defensa tanto en condiciones de estrés biótico como abiótico.

REFERENCIAS

- Abarca ML, Bragulat MR, Castellá G, Accensi F, Cabañes FJ (2000) Hongos productores de micotoxinas emergentes. *Rev. Iberoam. Micol.* 17: 63-68.
- Abebe T, Guenzi A, Martin B, Cushman J (2003) Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiol.* 131: 1748-1755.
- Alezones J (2007) *Monitoreo de Germoplasma Tropical de Maíz para Resistencia a Aspergillus flavus y a la Producción de Aflatoxinas en Grano*. Tesis. Universidad Central de Venezuela. 52 pp.
- Ashley MK, Grant M, Grabov A (2006) Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins. *J. Exp. Bot.* 57: 425-436.
- Basset G, Raymond P, Malek L, Brouquisse R (2002) Changes in the expression and the enzymic properties of the 20S proteasome in sugar-starved maize roots. Evidence for an in vivo oxidation of the proteasome. *Plant Physiol.* 128: 1149-62.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann. Biochem.* 72: 278-284.
- Brown RL, Chen ZY, Menkir A, Cleveland TE, Cardwell K, Kling J, White DG (2001) Resistance to aflatoxin accumulation in kernels of maize inbreds selected for ear rot resistance in West and Central Africa. *J. Food Prot.* 64: 396-400.
- Brown RL, Chen ZY, Menkir A, Cleveland TE (2003) Using biotechnology to enhance host resistance to aflatoxin contamination of corn. *Afr. J. Biotechnol.* 2: 557-562.
- Campo S, Cascarral M, Coca M, Abián J, San Segundo B (2004) The defense response of germinating maize embryos against fungal infection: A proteomics approach. *Proteomics* 4: 383-396.
- Chen ZY, Brown RL, Lax AR, Guo BZ, Cleveland TE, Russin JS (1998) Resistance to *A. flavus* in corn kernels is associated with a 14-kDa protein. *Phytopathology* 88: 276-281.
- Chen ZY, Brown RL, Damann KE, Cleveland TE (2002) Identification of unique or elevated levels of kernel proteins in aflatoxin resistant maize genotypes through proteome analysis. *Phytopathology* 92: 1084-1094.
- Chen ZY, Brown RL, Damann KE, Cleveland TE (2004) Identification of a maize kernel stress-related protein and its effect on aflatoxin accumulation. *Phytopathology* 94: 938-945.
- Domgall I, Venzke D, Ulrich L, Ratajczak R, Ttcher B (2002) Three-dimensional map of a plant V-ATPase based on electron microscopy. *Am. Soc. Biochem. Mol. Biol.* 277: 13115-13121.
- Echevarría-Machado I, Loyola-Vargas V, Hernandez-Sotomayor T (2002) La proteína del retinoblastoma en las plantas. *J. Mex. Chem. Soc.* 46: 17-22.
- Grebenok RJ, Galbraith DW, Penna DD (1997) Characterization of *Zea mays* endosperm C-24 sterol methyltransferase: one of two types of sterol methyltransferase in higher plants. *Plant Mol. Biol.* 34: 891-896.
- Guo D, Venkatramesh M, Nes D (1995) Developmental regulation of sterol biosynthesis in *Zea mays*. *Lipids* 30: 203-219.
- Humphery-Smith I, Cordwell SJ, Blackstock WP (1997) Proteome research: complementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds. *Electrophoresis* 18: 1217-1242.
- Jungblut P, Thiede B (1997) Protein identification from 2-DE gels by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 16: 145-162.
- Kakimoto T (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol.* 42: 677-685.
- Laemmli U (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Li C, Xie W, Bai W, Li Z, Zhao Y, Liu H (2008) Calmodulin binds to maize lipid transfer protein and modulates its lipids binding ability. *FEBS J.* 275: 5298-5308.
- Magoon K, Gupta K, Venkatasubramanian A (1977) Biosynthesis of aflatoxins. *Bacteriol. Rev.* 41: 822-855.
- Moller IM (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 561-591.
- Molina A, Segura A, Garcia-Olmedo F (1993) Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* 316: 119-122.
- O'Farrell PH (1975) High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021.
- Polidoros AN, Mylona PV, Pasentis K, Scandalios JG, Tsafaris AS (2005) The maize alternative oxidase 1a (Aox1a) gene is regulated by signals related to oxidative stress. *Redox Reports* 10: 71-78.
- Riccardi F, Gazeau P, Vienne D, Zivy M (1998) Protein changes in response to progressive water deficit in maize. *Plant Physiol.* 117: 1253-1263.
- Sapir-Mir M, Mett A, Belausov E, Tal-Meshulam S, Frydman A, Gidoni D, Eyal Y (2008) Peroxisomal localization of Arabidopsis isopentenyl diphosphate isomerases suggests that part of the plant isoprenoid mevalonic acid pathway is compartmentalized to peroxisomes. *Plant Physiol.* 148: 1219-1228.
- Sauer N (1984) A general amino-acid permease is inducible in *Chlorella vulgaris*. *Planta* 161: 425-431.
- Scandalios JG (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Rev.* 38: 995-1014.
- Shevchenko A, Jensen O, Podtelejnikov A, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, Mortensen P, Shevchenko A, Boucherie H, Mann M (1996) Linking genome and proteome by mass spectrometry: large scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 14440-14445.
- Su YH, North H, Grignon C, Thibaud JB, Sentenac H, Véry AA (2005) Regulation by external K⁺ in a maize inward shaker channel targets transport activity in the high concentration range. *Plant Cell* 17: 1532-1548.
- Svennerstam H, Ganeteg U, Näsholm T (2008) Root uptake of cationic amino acids by Arabidopsis depends on functional expression of amino acid permease 5. *New Phytol.* 180: 620-630.
- Tuteja N (2010) A method to confer salinity stress tolerance to plants by helicase overexpression. *Meth. Mol. Biol.* 587: 377-387.
- Vienne D, Leonardi A, Damerval C, Zivy M (1999) Genetics of proteome variation for QTL characterization: application to drought-stress responses in maize. *J. Exp. Bot.* 50: 303-309.
- Vyroubalova S, Vaclavikova K, Tureckova V, Novak O, Smehilova M, Hluska T, Ohnoutkova L, Frebort I, Galuszka P (2009) Characterization of new maize genes putatively involved in CK metabolism and their expression during osmotic stress in relation with cytokinin levels. *Plant Physiol.* 151: 433-447.
- Wang S, Frey P (2007) S-adenosylmethionine as an oxidant: the radical SAM superfamily. *Cell. Mol. Life Sci.* 65: 228-236.
- Yu J, Chang P, Ehrlich K, Cary J, Bhatnagar D, Cleveland T, Payne GA, Linz JE, Woloshuk CP, Bennett JW (2004) Clustered Pathway Genes in Aflatoxin Biosynthesis. *Microbiology* 70: 1253-1262.