



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Postgrado de Biología Celular

Tesis Doctoral

**Evaluación de los mecanismos de resistencia a *Pyricularia grisea*
en arroz (*Oryza sativa*) a través de perfiles masivos de expresión de
ARNm y proteínas**

Tesis presentada ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, para
optar por el título de Doctor en Ciencias, Mención Biología Celular.

María Alejandra Franco G.

Caracas, Octubre 2011



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Postgrado de Biología Celular

Tesis Doctoral

**Evaluación de los mecanismos de resistencia a *Pyricularia grisea*
en arroz (*Oryza sativa*) a través de perfiles masivos de expresión de
ARNm y proteínas**

Dr. Iván Galindo-Castro

Tutor

Caracas, Octubre 2011

“La ciencia es más que un simple conjunto de conocimientos: es una manera de pensar”

Carl Sagan

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no se habría podido realizar sin la colaboración de muchas personas e instituciones que me brindaron su ayuda, apoyo y conocimientos, a las cuales quiero expresarles mi gratitud.

Antes de todo quiero agradecer a Dios, por guiarme y bendecirme cada día.

A mis maravillosos padres, Josefina González de Franco y José Franco, a quienes no tengo palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí y mis hermanos. Gracias por dedicarnos su vida, sus sacrificios, sus esfuerzos, por enseñarnos cada día a ser mejores personas, por demostrarnos que con trabajo y amor a lo que se hace se puede llegar lejos. Gracias por apoyarme, motivarme e inclusive a presionarme a dar siempre lo mejor de mí, sabiendo que podía dar más aunque ni yo misma lo creyese; en fin, gracias por creer en mí. Gracias a ustedes somos lo que somos, una hermosa familia de la cual no se puede estar más orgulloso, y es por eso que este logro es un regalo para ustedes.

A mis hermanos Graciela, Erika y Javier, quienes siempre son mi inspiración y mi motivación para ser mejor. Ustedes son mi orgullo, no sólo porque son unas personas con un corazón hermoso, sino porque también están comprometidos con lo que aman, siendo también un ejemplo a seguir para mí, es por eso que esto también es para ustedes.

A mis bellos abuelos Emilia García y Carlos González, quienes han esperado pacientemente por tener a su Doctora.

A mi amado esposo Ramón Archer. Gracias por todo tu apoyo, por motivarme y darme fuerzas cuando estas se desvanecían, por siempre tener una palabra de aliento que me llenara de energías para continuar, por comprenderme, por ser mi amigo y por apoyarme cuando la tesis ocupó la mayor parte de mi tiempo y esfuerzo.

A mi tutor, el Dr. Iván Galindo Castro por haber confiado en mi persona para desarrollar una tecnología pionera en país y poner en mi manos la responsabilidad de llevarla adelante, siendo un aporte invaluable no solo para la concreción de este trabajo, sino también en mi formación como investigadora.

A las doctoras Nardy Diez y Carolina Bernal por su apoyo en el desarrollo de los experimentos de proteómica, su asesoría y colaboración han sido fundamentales en la culminación de este trabajo.

A la Fundación IDEA, mi casa desde hace casi siete años, donde he crecido tanto profesional como personalmente formando parte de un gran equipo de trabajo en el Laboratorio de Genómica y Proteómica. Agradezco de forma especial al Lic. José Faks, un gran compañero y amigo con quien he compartido muchísimas discusiones tanto científicas como personales, todas ellas enriquecedoras y a la Lic. Mónica Rincón, con quien empecé este maravilloso camino de las plantas y las ómicas. A todos: Dr. José Luis Ramírez, Dra. Katherine Figarella, Lic. Jais Nieves, Lic. Ainhoa Bacaicoa, Lic. Leandro Balzano, Lic. Riward Campelo, Lic. María Gabriela Rojas, Lic. Marjorie Sayegh, Lic. Annamil Alvarez, Lic. Pedro Graterol, Lic. Daymile Perez, Lic. Irina Ochoa, Lic. Sabrina Marsiccobetre, Lic. Yuli Ortiz, Lic. Pedro Reyes, Lic. Carolina Fiol, T.S.U. Iraima Rojas, Elizabeth Berroteran, Bexi Neder y Deysi Perez, gracias, porque de una a otra forma han colaborado con este trabajo.

A la Fundación Danac, en especial al Dr. Alex González, Ing. Agr. Yorman Jayaro, Ing. Agr. Jesus Alezones, Dra. Erika Arnao, Dr. Eduardo Graterol y a todos los miembros de los laboratorios de Protección Vegetal y Biología Molecular, quienes siempre me ha recibido con los brazos abiertos dispuestos a enseñarme y ayudarme. Siempre serán mi segunda casa.

A la Dra. Pamela Ronald y su laboratorio, donde se realizó uno de los experimentos de microarreglos mostrados en este trabajo. Gracias también al Dr. Ki-Hong Jung y Dr. Randy Ruan, quienes gentilmente nos asesoraron en el análisis de los resultados. A la cPhD Janice Pfeiff quien nos asesoró en el desarrollo experimental. A cPhD. Juliana Gil y Msc. Oswaldo Ochoa quienes me adoptaron y me cuidaron durante mi estadía en UC Davis.

A mis amigos, Dra Mariana Hidalgo, Dra. Maryan Bruzual y Dr. Xenon Serrano, con quienes he recorrido un largo camino desde pregrado hasta ahora, gracias por siempre estar allí. A la Dra. Mayri y a la Lic. Pimali Filibertt, quienes hicieron más fácil y divertidos los análisis de las β -Clamp. A T.S.U. Meralys Gonzalez, a Lic. Carlos Sanz y Dr. Luis Luis, grandes amigos de la Fundación IDEA. A mi profesor el Doctor Alexis Mendoza León por siempre ser un gran amigo dispuesto a darme sus consejos.

A las “Nubes Flotantes” de Alexander Calder, cuya imagen ha servido de motivación para la culminación de este trabajo.

Y a todas aquellas personas que colaboraron o participaron en la realización de este trabajo, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

RESUMEN

El arroz es considerado un alimento de primera necesidad para el 50% de la población mundial, presentando además numerosas características de interés económico, entre las que destacan su productividad, calidad culinaria y resistencia a patógenos. En Venezuela, el hongo *Magnaporthe oryzae* (antes *Pyricularia grisea*) es una de las plagas responsables de la mayor cantidad de pérdidas en campo. En el genoma de arroz se han reportado algunos genes de resistencia, sin embargo para algunas de las proteínas codificadas por ellos se desconocen los mecanismos moleculares a través de los cuales la planta es capaz de responder de forma exitosa ante el ataque del patógeno. Actualmente, con el estudio masivo de la expresión de los genes y/o proteínas durante un determinado tratamiento, se facilita la dilucidación de las rutas a través de las cuales la planta desencadena dicha respuesta. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue identificar posibles genes de resistencia a *Magnaporthe oryzae* en plantas de arroz a través del uso de la Genómica y Proteómica. Los perfiles obtenidos permitieron comparar la respuesta de las plantas susceptibles y resistentes en el tiempo durante el ataque por *M. oryzae*. Al menos 320 genes mostraron un patrón de expresión diferencial, de los cuales se pre-seleccionaron aproximadamente 100 genes candidatos, mientras que 64 proteínas con expresión diferencial fueron identificadas por espectrometría de masas tipo MALDI-TOF. De acuerdo a sus funciones biológicas, cada uno de los genes y proteínas fueron agrupados y posteriormente asociados a las rutas donde ellos participan, encontrando alteraciones a nivel de la transcripción, respuesta a estrés, transporte, metabolismo, factores de transcripción, traducción, fotosíntesis y función desconocida, siendo esta última la que presenta mayor proporción. Estos resultados contribuyen a evidenciar la respuesta compleja que desarrolla la planta cuando es atacada por un patógeno, así como también la identificación de nuevos marcadores moleculares que puedan ser incorporados a los programas de mejoramiento de arroz en el país.

FINANCIAMIENTO

La realización de este trabajo fue posible gracias a través del financiamiento por los proyectos:

- Proyecto Bid-Fonacit 2004000658. Proteómica aplicada a la cadena agro productiva para contribuir al logro de la seguridad alimentaria.
- Proyecto Bid-Fonacit 2004000657. Agrogenómica: Aplicación de la Genómica en la cadena agro productiva.
- Proyecto Bid-Fonacit 2006000256. Plan de desarrollo de talento humano de alto nivel.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
2D	Dos dimensiones
aaUTP	UTP-amino-allyil
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ADNc-aa	ADNc-amino-allyil
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AVR	Avirulencia
BrEt	Bromuro de etidio
BSA	Albúmina sero bovina
Cy3	Cianina 3
Cy5	Cianina 5
DMSO	Dimetil sulfoxido
ET	Etileno
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
GA	Giberilinas
Gen R	Gen de Resistencia
h	Horas

hpi	Horas post-inoculación
HR	Respuesta Hipersensible
IEF	Isoelectroenfoque
IRRI	<i>Internacional Rice Research Institute</i>
IVT	Transcripción <i>in vitro</i>
JA	Ácido jasmónico
Kpb	Kilo pares de base
M	Molaridad
<i>MALDI-OTOF-MS</i>	Desorción/ionización láser asistida por matriz con detector de iones ortogonal acoplado al tiempo de vuelo
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
mg	Miligramos
mg/ml	Miligramos por mililitro
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MOPS	3 - (N-morfolino) propanosulfónico
Mpb	Mega pares de base
NBS	Región central unidora de nucleótidos
ng	Nanogramos
Nm	Nanomolar
NO	Oxido nítrico
°C	Grados centígrados
Os	<i>Oryza sativa</i>
p/v	Peso/volumen
p/v	Peso por volumen
PAL	Fenilalanin amonio liasa

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PR	Proteína relacionada con la patogénesis
QTL	<i>Quantitative trait loci</i>
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphism</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SA	Ácido salicílico
SAR	Respuesta sistémica adquirida
seg	Segundos
SSR	<i>Simple Sequence Repeats</i>
TIGR	<i>The Institute for Genomic Research</i>
Tween20	Polisorbato 20
UTP	Uracil trifosfato
UV	Luz ultravioleta
V/cm	Voltios por centímetro
xg	Gravedad
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µg/µL	Microgramos por microlitros
µg/mL	Microgramos por mililitros

ÍNDICE DE CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.	Origen del arroz y su clasificación taxonómica	2
1.1.	<i>Indica</i>	3
1.2.	<i>Japónica</i>	3
2.	Morfología del arroz	3
3.	<i>Magnaporthe oryzae</i> (antes <i>Pyricularia grisea</i>) y la enfermedad piricularia	5
4.	Selección asistida por marcadores y <i>Quantitative trait loci</i> (QTL)	7
5.	Mecanismos moleculares de resistencia	8
6.	Fitohormonas y la respuesta de defensa	12
7.	Era genómica y post-genómica	15
7.1.	<i>Microarreglos</i>	15
7.2.	<i>Proteómica</i>	20
II.	OBJETIVO GENERAL	22
III.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	24
1.	Material biológico	24
1.1.	<i>Oryza sativa</i>	24
1.2.	<i>Magnaporthe oryzae</i>	25
2.	Métodos	25
2.1.	<i>Siembra de las plántulas</i>	25
2.2.	<i>Preparación del inóculo</i>	25
2.3.	<i>Inoculación de <u>Magnaporthe oryzae</u></i>	26
2.4.	<i>Toma de la muestra</i>	27
2.5.	<i>Esquema experimental</i>	27
2.6.	<i>Aislamiento de ARN total</i>	29

2.7	<i>Determinación de la calidad y cantidad de ARN</i>	29
2.8	<i>Hidrolisis del ADN genómico y purificación del ARN</i>	30
2.9	<i>Marcaje del ADNc con los fluoróforos Cy3 y Cy5</i>	30
2.9.1	<u>Transcripción reversa para la síntesis de la primera hebra de ADNc</u>	31
2.9.2	<u>Síntesis de la segunda hebra de ADNc</u>	31
2.9.3	<u>Purificación del ADNc</u>	32
2.9.4	<u>Transcripción <i>in vitro</i> para la síntesis de ARNa modificado (IVT)</u>	32
2.9.5	<u>Purificación y cuantificación del ARNa</u>	32
2.9.6	<u>Incorporación de fluoróforo y purificación del ARNa marcado.</u>	33
2.10	<i>Descripción de los arreglos</i>	34
2.11	<i>Bloqueo de los microarreglos</i>	35
2.12	<i>Hibridación de los arreglos</i>	35
2.13	<i>Lavados post-hibridación</i>	36
2.14	<i>Obtención de imagen</i>	36
2.15	<i>Análisis de los datos de microarreglos</i>	36
2.16	<i>Confirmación de los perfiles de expresión a través de qRT-PCR.</i>	39
2.16.1	<u>Diseño de cebadores</u>	39
2.16.2	<u>Transcripción reversa</u>	39
2.16.3	<u>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).</u>	40
2.17	<i>Asociación de locus de los genes identificados como posibles genes de resistencia con QTLs previamente reportados</i>	40
2.18	<i>Extracción de proteínas</i>	42
2.19	<i>Cuantificación de proteínas</i>	42
2.20	<i>Verificación de la concentración e integridad de las proteínas</i>	42
2.21	<i>Electroforesis bidimensional</i>	43
2.21.1	<u>Primera dimensión o isoelectroenfoque (IEF)</u>	43
2.21.2	<u>Segunda dimensión en SDS-PAGE</u>	44
2.21.3	<u>Revelado de los geles a través de la tinción con plata</u>	44

2.22	<i>Análisis de los geles en 2 dimensiones</i>	45
2.23	<i>Corte de los spots</i>	45
2.24	<i>Digestión in situ de los spots</i>	46
2.25	<i>Obtención del mapa peptídico mediante MALDI-OTOF-MS.</i>	46
V.	RESULTADOS	48
1.	Evaluación de la infección de <i>M. oryzae</i> en hojas de arroz inoculadas vía hisopo	48
2.	Identificación de posibles genes de resistencia a través de la comparación de los perfiles de expresión de plantas susceptibles versus resistentes inoculadas con <i>M. oryzae</i> a través del uso de microarreglos.	48
2.1	<i>Manejo de los datos de microarreglos.</i>	49
2.2	<i>Regulación diferencial de los genes candidatos durante la infección de <u>M. oryzae</u>.</i>	51
2.3	<i>Análisis de clúster de los datos de microarreglos.</i>	51
2.4	<i>Análisis de ontología de los genes seleccionados.</i>	58
2.5	<i>Validación de los resultados de microarreglos a través de RT-PCR</i>	63
3.	Identificación de posibles genes de resistencia a través de la comparación de los perfiles de expresión ARNm en plantas susceptibles y resistentes inoculadas con el patógeno versus las plantas sin inocular a través del uso de microarreglos	65
3.1	<i>Manejo de los datos de microarreglos.</i>	65
3.2	<i>Regulación diferencial de los genes candidatos durante la infección de <u>M. oryzae</u>.</i>	66
3.3	<i>Análisis de clúster de los datos de microarreglos.</i>	67
3.4	<i>Análisis de ontología de los genes seleccionados</i>	74
4.	Identificación de la función putativa de los genes desconocidos.	75
5.	Genes candidatos y su relación con QTLs.	78
6.	Identificación de posibles proteínas de resistencia a través de la comparación de los perfiles de expresión de plantas susceptibles versus resistentes inoculadas con el patógeno a través del uso de la proteómica.	80

6.1	<i>Análisis entre los proteomas de plantas resistentes y susceptibles sin inocular con <u>M. oryzae</u>.</i>	82
6.2	<i>Comparación entre los proteomas de plantas resistentes y susceptibles durante la infección por <u>M. oryzae</u>.</i>	82
6.3	<i>Análisis de los proteomas de plantas resistentes y susceptibles durante la infección por <u>M. oryzae</u>.</i>	84
6.4	<i>Identificación de las proteínas relacionadas con la resistencia a <u>M. oryzae</u> a través de MALDI-OTOF MS.</i>	88
6.5	<i>Identificación de la función putativa de las proteínas desconocidas</i>	94
VI.	DISCUSIÓN	97
1.	Inoculación <u>M. oryzae</u> en hojas de arroz.	97
2.	Análisis de microarreglos para identificar posibles genes de resistencia en arroz a <u>M. oryzae</u> .	98
2.1	<i>Comparación de plantas de arroz resistentes versus susceptibles inoculadas con <u>M. oryzae</u> en el tiempo.</i>	100
2.2	<i>Comparación del curso temporal de la infección en plantas de arroz resistentes y susceptibles inoculadas versus plantas sin inocular con <u>M. oryzae</u>.</i>	109
3.	Genes candidatos y su relación con QTLs.	112
4.	Análisis de los perfiles de proteínas para identificar posibles genes de resistencia en arroz a <u>M. oryzae</u>	114
4.1	<i>Comparación entre los proteomas de plantas resistentes y susceptibles sin inocular.</i>	114
4.2	<i>Comparación entre los proteomas de plantas resistentes y susceptibles durante la infección por <u>M. oryzae</u>.</i>	114
4.3	<i>Análisis de los proteomas de plantas resistentes y susceptibles durante la infección por <u>M. oryzae</u>.</i>	115
4.4	<i>Identificación de las proteínas relacionadas con la resistencia a <u>M. oryzae</u> a través de MALDI-OTOF MS.</i>	116
5.	Correlación entre los perfiles de transcripción (transcriptoma) y los de proteínas (proteómica)	120
6.	Genes candidatos y su uso potencial como marcadores moleculares	124

VII.	CONCLUSIONES	125
VIII.	RECOMENDACIONES	127
IX.	BIBLIOGRAFÍA	128
X.	MATERIAL SUPLEMENTARIO	148

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Morfología de la planta de arroz	4
Figura 2: Ciclo de vida de <i>Magnaporthe oryzae</i>	6
Figura 3: Interacción entre las proteínas <i>avr</i> del patógeno y las proteínas R de la planta	9
Figura 4: Análisis de la expresión génica utilizando microarreglos	17
Figura 5. Esquema del diseño experimental	28
Figura 6. Lesiones generadas por infección de <i>Magnaporthe oryzae</i> sobre hojas de arroz 7 dpi por el método del hisopo	49
Figura 7. Expresión diferencial de los genes durante la infección de <i>M. oryzae</i> a plantas de arroz susceptible y resistente a 12, 24 y 36 hpi	52
Figura 8. Análisis de clúster de los genes expresados diferencialmente en respuesta al ataque del <i>M. oryzae</i> a las plantas de arroz susceptible y resistente al hongo a las 12, 24 y 36 hpi	53
Figura 9: Análisis de clúster de los 87 genes candidatos expresados diferencialmente en respuesta al ataque del <i>M. oryzae</i> a las plantas de arroz susceptible y resistente al hongo a las 12, 24 y 36 hpi	54
Figura 10. Clúster jerárquico (k-means) de los perfiles de expresión de los 87 genes candidatos expresados diferencialmente en respuesta al ataque del <i>M. oryzae</i> a las plantas de arroz susceptible y resistente al hongo a las 12, 24 y 36 hpi.	56
Figura 11. Distribución por categorías funcionales de los genes candidatos identificados al comparar los perfiles de expresión de plantas resistentes vs susceptibles inoculadas con <i>M. oryzae</i>	62

Figura 12. RT-PCR para verificar los patrones de expresión diferencial de algunos de los genes seleccionados a partir de los resultados obtenidos de los microarreglos.	64
Figura 13. Expresión diferencial de los genes durante la infección de <i>M. oryzae</i> a plantas de arroz susceptible y resistente a 24 y 36 hpi	68
Figura 14. Análisis de clúster de los genes expresados diferencialmente en respuesta al ataque del <i>M. oryzae</i> a las plantas de arroz susceptible y resistente inoculadas 24 y 36 hpi	69
Figura 15. Análisis de clúster de los 100 genes candidatos expresados diferencialmente en respuesta al ataque del <i>M. oryzae</i> a las plantas de arroz resistente y susceptible al hongo a las 12, 24 y 36 hpi.	70
Figura 16. Distribución por categorías funcionales de los genes candidatos identificados al comparar los perfiles de expresión de plantas resistentes y susceptibles inoculadas con <i>M. oryzae</i> vs plantas sin inocular	74
Figura 17 Distribución de las homologías de las proteínas desconocidas identificadas por microarreglos	75
Figura 18: Distribución de los QTLs asociados a estrés de tipo biótico en 88 de los 133 locus considerados para el análisis	80
Figura 19: Mapa físico de los genes candidatos y los QTLs de estrés biótico asociados	81
Figura 20. Geles 2D representativos del perfil de expresión de proteínas foliares de plantas resistentes y susceptibles a <i>M. oryzae</i> sin inocular	83
Figura 21. Porcentaje de proteínas con expresión diferencial significativa en plantas de arroz resistentes vs susceptibles durante la infección de <i>M. oryzae</i> .	84
Figura 22. Porcentaje de proteínas con expresión diferencial significativa durante la infección de <i>M. oryzae</i> en plantas de arroz susceptibles y resistentes	85
Figura 23. Comparación de la variación en las intensidades de las proteínas comunes entre las plantas resistentes y susceptibles con expresión diferencial significativa identificadas por MALDI-OTOF durante la	93

infección con *M. oryzae*. Los puntos que se salen de las graficas representan los spots ausente.

Figura 24. Distribución de las homologías de las proteínas desconocidas identificadas por MALDITOF. En el diagrama de Veen se muestran las distribuciones de las funciones putativas luego de analizar las secuencias de proteínas a través de BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). 94

Figura 25. . Modelo propuesto de respuesta de *Oryza sativa* ante el ataque por *Magnaporthe oryzae*. Las proteínas señaladas en azul fueron identificadas a través del transcriptoma, las rojas por proteómica y las naranja por ambas aproximaciones; en las estrellas verde se indican algunos procesos involucrados en la respuesta 123

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de los daños ocasionados por las especies reactivas de oxígeno (ROS) al interactuar con lípidos, proteínas y ADN	10
Tabla 2. Cebadores para ser utilizados en la RT-PCR para verificar los patrones de expresión diferencial de algunos de los genes seleccionados a partir de los resultados obtenidos de los microarreglos	41
Tabla 3. Manejo de los datos de microarreglos utilizados correspondientes a la versión TIGR V3 45K array	50
Tabla 4. Genes asociados a resistencia con una respuesta diferencial durante los tiempos post inoculación estudiados en respuesta al ataque del <i>M. oryzae</i> en plantas de arroz susceptible y resistente inoculadas con el hongo.	59
Tabla 5. Manejo de los datos de microarreglos utilizados correspondientes a la versión TIGR V2 20K array.	66
Tabla 6. Genes asociados a resistencia con una respuesta diferencial durante los tiempos post inoculación estudiados en respuesta al ataque de <i>M. oryzae</i> en plantas de arroz susceptibles y resistentes inoculadas versus plantas sin inocular a 12, 24 y 36 hpi.	71
Tabla 7. Homología de las proteínas desconocidas identificadas por microarreglos. Las secuencias de proteínas fueron analizadas a través de BLASTP (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov).	76
Tabla 8. Lista de <i>spots</i> con niveles de expresión mayor o igual en 2 veces con relación al gel control en plantas resistentes a <i>M. oryzae</i> .	86
Tabla 9. Lista de <i>spots</i> con niveles de expresión mayor o igual en 2 veces con relación al gel control en plantas susceptibles a <i>M. oryzae</i> .	87
Tabla 10. Identificación de proteínas con expresión diferencial en plantas	90

resistentes durante la infección por *M. oryzae*.

Tabla 11. Identificación de proteínas con expresión diferencial en plantas susceptibles durante la infección por *M. oryzae*. 91

Tabla 12. Identificación de proteínas comunes entre plantas resistentes y susceptibles con expresión diferencial durante la infección por *M. oryzae*. 92

Tabla 13: Homología de las proteínas desconocidas identificadas por MALDITOF. Las secuencias de proteínas fueron analizadas a través de BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). 95

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos autótrofos, y en consecuencia productores primarios de la cadena alimentaria por lo que son explotadas por una amplia variedad de especies como fuente de nutrientes. Los seres humanos durante millones de años han utilizado a las plantas con diferentes aplicaciones abarcando su uso desde materia prima para las viviendas hasta su explotación como fuente de alimento. Es por ello que el crecimiento y desarrollo de la raza humana han estado íntimamente ligados a las prácticas de la agricultura y el mejoramiento de las mismas. El origen de la agricultura permitió la domesticación de numerosas especies de plantas y su explotación como recurso natural, mostrando un gran incremento en la tasa de producción a partir del año 1960, como consecuencia de la denominada revolución verde (Khush 2001).

Una de las familias más importantes de monocotiledóneas por su gran interés agronómico son las *Gramineae*, la cual incluye rubros como maíz, trigo, cebada, caña de azúcar, sorgo y arroz. Este último es una de las especies más importantes para la humanidad, debido a que representa uno de los alimentos de primera necesidad para el 50% de la población mundial (Khush 2005).

Para el año 2009, la producción de arroz fue la tercera en el mundo después caña de azúcar (1.661.251.480 T) y maíz (818.823.434 T), alcanzando un valor de 685.240.469 T, mostrando una distribución en al menos 117 países del mundo en todos los continentes (exceptuando la Antártica) según lo reportado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés; tomado de FAO, 2011).

En Venezuela, el cultivo de arroz se desarrolla en torno a dos grandes zonas: la Región Central, en el estado Guárico y la Región de los Llanos

Occidentales que incluye principalmente los estados Portuguesa, Barinas y Cojedes, además de otros aportes a la producción nacional como el estado Delta Amacuro, aunque en menor proporción (Paez y Romero 2004).

1. Origen del arroz y su clasificación taxonómica

Debido a la importancia que tiene el arroz en la cultura asiática, numerosos autores han señalado al continente Asiático como posible origen, señalando de forma específica países como China y la India, sin embargo, estudios filogenéticos sugieren África como el lugar de origen para este cereal. El género *Oryza* probablemente se originó cerca de 130 millones de años atrás en Gondwana, y las diferentes especies se distribuyeron en los diferentes continentes luego de su separación (Khush 1997).

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Clase: *Monocotiledóneas*

Origen: *Glumiflorales*

Familia: *Poaceas o Gramineae*

Subfamilia: *Panicoides*

Tribu: *Oriceas*

Género: *Oryza*

Especie: *Oryza sativa L.*

Grupos (razas ecogeográficas): *Indica, Japonica, Javanica*

Las especies de *Oryza sativa* pueden ser clasificadas en seis grupos con base en su afinidad genética, sin embargo, las variedades más conocidas son

indica (grupo I) y japónica (grupo VI), las cuales mantienen características morfológicas que las diferencian.

1.1. *Indica*

Los arroces del grupo *Indica* son plantas autóctonas de las regiones húmedas tropicales y subtropicales de Asia, y se caracterizan por ser plantas con un alto porte, denso macollamiento, hojas color verde claro y grano de mediano a largo, siendo éstas las de mayor tradición de siembra en el trópico.

1.2. *Japónica*

Los arroces de este grupo corresponden a las zonas templadas y subtropicales y se caracterizan por ser plantas de menor altura y menor capacidad de macollamiento, poseen hojas erectas de color verde oscuro, con granos cortos y anchos.

2. Morfología del arroz

El arroz es una gramínea de ciclo anual, de tallos redondos y huecos compuestos por nudos y entrenudos, hojas de lámina plana unidas al tallo por la vaina y su inflorescencia es en panícula. Las partes de una planta de arroz las podemos clasificar como: órganos vegetativos (raíces, tallos y hojas) y órganos florales (panícula terminal; Moldenhaver y Gibbons 2002; ver fig. 1).

El arroz ha sido usado como modelo de la familia de los cereales principalmente por el tamaño de su genoma cuando se le compara con otros miembros de la familia *Gramineae*. *O. sativa* tiene un genoma de ~445 Mpb del cual se conoce toda su secuencia (Goff et al. 2002, Yu et al. 2002, Yuan et al. 2005), siendo aproximadamente la mitad del contenido de ADN del *Sorghum bicolor* (sorgo; 760 Mpb) y 17%, 8,8% y 2,7% menor que el contenido de ADN de *Triticum aestivum* (trigo; 15.966 Mpb) *Hordeum vulgare* (cebada; 4.873 Mpb) y *Zea mays* (maíz; 2.504 Mpb) respectivamente. Esta diferencia en el tamaño del genoma es atribuida en mayor parte a la diploidía natural de la planta,

acompañado del reducido contenido de ADN repetitivo en comparación con otras especies de gramíneas (Yuan et al. 2001). Sin embargo, a pesar de las diferencias tan grandes en el tamaño de los genomas, estos cereales tienen esencialmente los mismos genes, conservando además la sintenia entre ellos, es decir, el orden y la localización relativa entre los genes dentro del mismo cromosoma (Goff et al. 2002), lo cual ha permitido la posibilidad de comparar y extrapolar la información obtenida en arroz con las distintas especies del grupo para así identificar genes ortólogos (Chen H. et al. 2003).

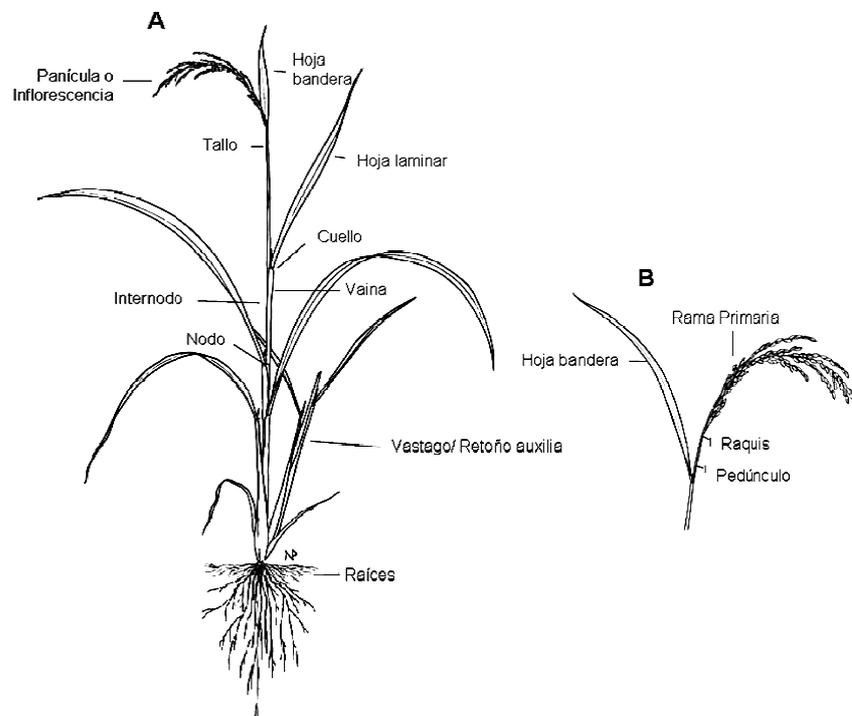


Figura 1: Morfología de la planta de arroz. A) Partes de la planta de arroz organizados en: órganos vegetativos (raíces, tallos y hojas) y órganos florales (panícula terminal). B) Detalle de la panícula terminal de arroz señalando sus partes. Modificado de <http://gramene.org>.

El arroz presenta numerosas características de interés económico, entre las que resaltan su productividad, calidad culinaria y resistencia a patógenos, las cuales han significado durante muchos años retos para los mejoradores

agrícolas. La resistencia a patógenos ha recibido una importancia especial, ya que una gran parte de los cultivares de todo el mundo se ven afectados continuamente por diferentes plagas. Se ha estimado que las pestes y las enfermedades reducen el rendimiento máximo teórico de los cultivares de arroz en un 50% (Ronald 1997), siendo las que producen la mayor cantidad de pérdidas las producidas por el hongo *Magnaporthe oryzae* (Chen et al. 1999) y por la bacteria *Xanthomonas oryzae* (Ronald 1997).

3. *Magnaporthe oryzae* (antes *Pyricularia grisea*) y la enfermedad piricularia

La piricularia es la enfermedad causada por el hongo filamentoso *Pyricularia oryzae*, el cual en su estadio sexual es conocido como *Magnaporthe oryzae*. Esta enfermedad se desarrolla en las partes aéreas de la planta, sin embargo, es en las hojas donde se presentan la mayoría de las infecciones, causando lesiones con forma de diamante de color gris o blanco en el centro (Paez y Romero 2004; ver fig. 2). Esta enfermedad fue reportada por primera vez hace tres siglos atrás en Asia y actualmente se encuentra presente en alrededor de 85 países del mundo como producto del intercambio de semillas infectadas (Ronald 1997).

Siendo esta enfermedad una de las más perjudiciales para las plantaciones de arroz en todo el mundo, el uso de fungicidas juega un papel fundamental en la prevención y control de la misma. Sin embargo, los fungicidas son compuestos altamente tóxicos tanto para el ambiente como para los productores, por lo que la mayoría de las investigaciones en biotecnología agrícola van dirigidas a la búsqueda de alternativas menos perjudiciales, más amigables para el medio ambiente y económicas.

Una de estas alternativas ha sido el desarrollo de variedades resistentes a las enfermedades, siendo ésta una opción atractiva para el agricultor ya que no requiere de costos adicionales y además es mucho más segura para el ambiente (Leung et al. 2003). Es por ello que el mejoramiento genético para la

resistencia a enfermedades es un objetivo persistente en los programas de mejoramiento llevados a cabo por los centros de investigación internacionales de agricultura como por ejemplo el *Internacional Rice Research Institute* (IRRI por sus siglas en inglés; <http://www.irri.org>), o compañías como Monsanto (<http://www.monsanto.com>), entre otros. Sin embargo, la mayoría de las variedades son resistentes a un pequeño grupo de patógenos ya que contienen muy pocos genes de resistencia, y aunado a la uniformidad genética de los cultivares, son mucho más susceptibles a epidemias debido a la rápida adaptación de los patógenos. Esto trae finalmente como consecuencia una disminución en el rendimiento de los cultivares (Leung et al. 2003). En este sentido, una de las estrategias ha sido la piramidación de genes, es decir, la incorporación de más de un gen de resistencia a un mismo cultivar, lo cual le permite incrementar el espectro de resistencia a diferentes patógenos (Huang et al. 1997, Kongprakhon et al. 2009, Kottapalli et al. 2010).

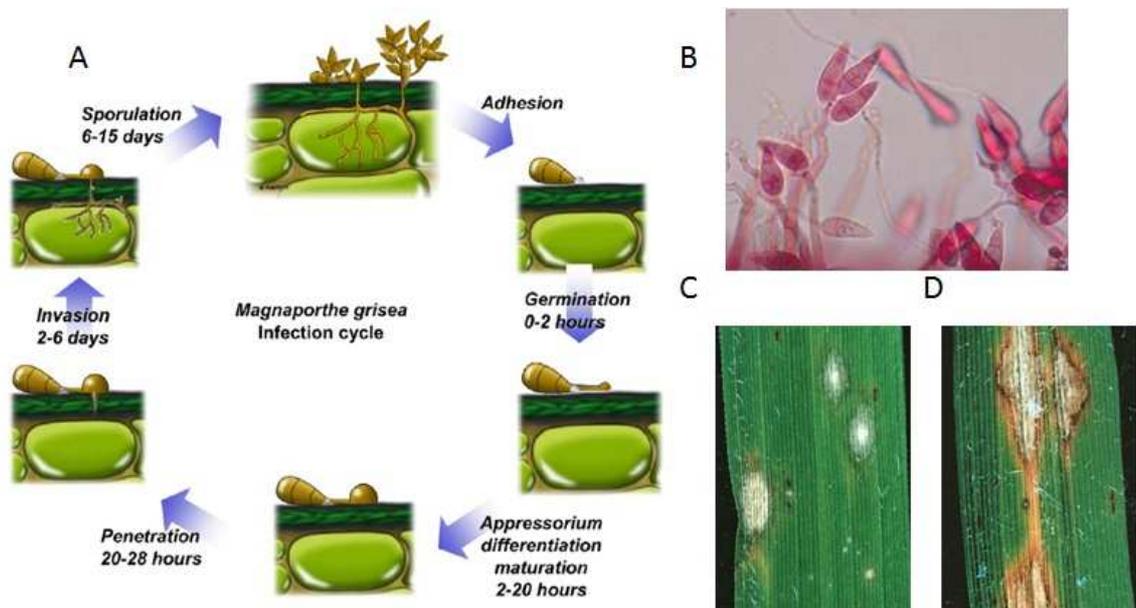


Figura 2: Ciclo de vida de *Magnaporthe oryzae*. A) Ciclo de vida del patógeno agente causal de la pircularia en arroz. B) esporas o conidios de *M. oryzae*. C y D) lesiones generadas por *M. oryzae* sobre la hoja de arroz. Ciclo de vida tomado de Ribot et al. (2008); Fotografías cortesía de <http://www.apsnet.org/>.

4. Selección asistida por marcadores y Quantitative trait loci (QTL)

El advenimiento de la era genómica y la secuenciación de los genomas de algunas de las plantas de interés agronómico ha permitido desarrollar nuevas tecnologías para la incorporación de genes R como es el uso de marcadores moleculares. Actualmente existen varias metodologías que se basan en la amplificación del ADN o parte del mismo a través de PCR, como en el caso de los ADN polimórficos amplificados al azar (RAPD, *Random Amplified Polymorphism*) o en la generación de sitios de corte en la secuenciación del ADN, como en el caso de los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism* por sus siglas en inglés). Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado el uso de microsatélites o *Simple Sequence Repeats* (SSR por sus siglas en inglés) en el estudio de los polimorfismos. Los SSR son unidades de secuencias de menos de 5 nucleótidos de largo que se forman como resultado de errores durante la replicación del ADN pudiendo variar en el número de repetidos en la secuencia. En vista que la variabilidad de cada locus depende esencialmente del número de repeticiones, la variabilidad puede ser fácilmente detectada a través de la amplificación por PCR a través de los cambios en los tamaños de los fragmentos amplificados a partir del genoma, permitiendo comparar los perfiles polimórficos entre diferentes líneas (Farooq y Azam 2002).

El polimorfismo de un determinado marcador en un cultivar puede ser asociado a la presencia del gen de interés mediante su correlación con una característica fenotípica de interés agronómico particular, como puede ser la resistencia a un patógeno.

Estos marcadores moleculares se ubican homogéneamente a lo largo de los cromosomas de la planta a intervalos de distancia de aproximadamente 18 Kb y su presencia puede relacionarse con la expresión de un determinado fenotipo (Asíns 2002). Estas regiones del genoma son conocidas como *Quantitative Trait Loci* (QTLs por sus siglas en inglés) ya que son los loci responsables de las variaciones cuantitativas de los caracteres agronómicos complejos. Es por ello que el mejoramiento agrícola va dirigido a incorporar los QTLs de interés en el *background* genético de la planta a través de los

programas de mejoramiento. Con el uso de la selección asistida por marcadores, es posible conjugar la variabilidad fenotípica y genotípica como fuente de información de la variabilidad y utilizar como criterio de selección una variable genética, permitiendo de este modo dirigir el mejoramiento más rápidamente con un menor efecto del ambiente, ya que el uso de la PCR permite detectar la presencia del gen o del QTL de interés en las líneas evaluadas en generaciones más tempranas e individuos jóvenes.

5. Mecanismos moleculares de resistencia

Un primer paso durante la respuesta de la planta ante el ataque de cualquier patógeno implica la detección del mismo para iniciar la respuesta de defensa. A nivel molecular, el sistema de defensa depende de la combinación específica del producto del gen de resistencia (R) en la planta y su correspondiente gen de avirulencia (*avr*) en el patógeno, lo cual conduce a una interacción incompatible (ver fig. 3a; Flor 1971). Usualmente, el producto del gen *avr* son moléculas ejecutoras, las cuales son compuestos de señalización que actúan a bajas concentraciones y que le proveen a la planta información para activar su mecanismo de defensa (Boller 1995). Uno de los modelos propuestos para el reconocimiento del patógeno por parte de la planta es el de receptor-ejecutor, donde el gen R es un receptor de membrana capaz de detectar la presencia de *avr* (ver fig. 3b). El otro modelo propuesto es el denominado “guardián”, donde la proteína R actúa como un vigilante o guardián, detectando los cambios en los blancos del hospedador generados por los ejecutores del patógeno luego que estos son translocados al interior de la célula de la planta (ver fig. 3c; Dangl y Jones 2001).

Luego del reconocimiento del patógeno por parte de la célula, esta inicia una serie de cascadas de señalización que activan de forma orquestada algunos de los mecanismos de defensa que tiene la planta. La respuesta hipersensible (HR) es uno de estos mecanismos y esta definida como la muerte de las células del hospedador unas horas después que las mismas tuvieron contacto con el patógeno (Hammond-Kosack y Jones 1996). Sin embargo, una definición más

precisa de HR incluye todos los procesos de respuesta de defensa de la planta los cuales involucran el reconocimiento del patógeno, la muerte de la célula vegetal, la acumulación de compuestos antimicrobianos e inhibición del crecimiento del patógeno (Mur et al. 2008). La HR juega un papel muy importante en el fenómeno de resistencia, ya que le permite a la planta privar al patógeno del acceso a los nutrientes y restringir su localización en la planta (Mur et al. 2008).

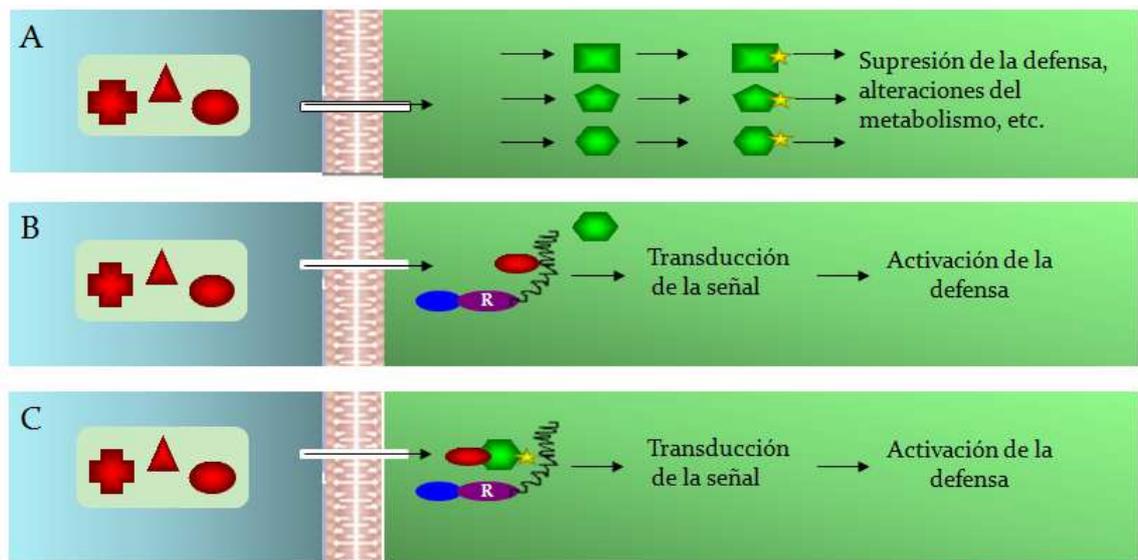


Figura 3: Interacción entre las proteínas *avr* del patógeno y las proteínas R de la planta. Un patógeno (cuadro azul) puede atacar a una planta expresando un arsenal de proteínas de virulencia (rojo). Estas proteínas son translocadas al interior de la célula de la planta. Una vez adentro, ellas atacan las proteínas del hospedador para tomar el control de los mecanismos de defensa, metabolismo o cualquier otro proceso de la planta que pueda afectar la virulencia del patógeno. A) En este caso la planta no posee la proteína R por lo que no es capaz de expresar la proteína de virulencia y por lo tanto no es capaz de detectar la presencia del patógeno de manera eficiente, generándose de esta forma la enfermedad. B) En este caso se observa el modelo receptor – ejecutor, donde la proteína R se une directamente con la proteína Avr. Este evento de reconocimiento activa una compleja señal de transducción que dispara la respuesta de defensa. C) En este último se observa el modelo guardián, donde la proteína R (guardián) detecta los niveles de la proteína del hospedador (caja verde con estrella), con lo cual activa una compleja señal de transducción que dispara la respuesta de defensa. Modificado de (McDowell y Woffenden 2003).

La producción de enormes cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) en muy poco tiempo es otra de las estrategias de

defensa de las plantas ante la presencia de un patógeno. Estas ROS son habitualmente generadas en bajos niveles en plantas que no están sometidas a ningún tipo de estrés en organelos como los cloroplastos y las mitocondrias, así como también en el citoplasma y por enzimas extracelulares (Mittler et al. 2004, Wojtaszek 1997). Uno de los principales roles propuesto para ROS es el de participar directamente como compuestos tóxicos contra el patógeno en vista de su alta reactividad (Nanda et al. 2010), siendo capaces de interactuar con los lípidos, proteínas y ADN (ver tabla 1).

Tabla 1: Resumen de los daños ocasionados por las especies reactivas de oxígeno (ROS) al interactuar con lípidos, proteínas y ADN*.

Daño oxidativo contra lípidos

- Reacciona con los lípidos de la membrana plasmática ocasionando la ruptura de la misma y en consecuencia la muerte celular.

Daño oxidativo contra proteínas

- Modificaciones a aminoácidos
- Fragmentación de las cadenas peptídicas
- Altera la carga eléctrica de las proteínas
- Incrementa la susceptibilidad a la proteólisis
- La oxidación de los centros Fe-S por $\cdot\text{O}_2^-$ genera pérdida de las funciones enzimáticas.

Daño oxidativo contra el ADN

- Mutaciones, fragmentación y traslocación sobre el ADN
 - Degradación de bases nitrogenadas y ruptura de la doble cadena.
 - Afecta la unión entre proteínas y ADN
-

* Tomado de (Scandalios 2005)

El óxido nítrico (NO) es una molécula pequeña que se encuentra en estado gaseoso y que puede ser soluble en lípidos y agua, lo que le permite difundir a través del citoplasma y a su vez atravesar libremente la membrana plasmática. A esta molécula también se le han atribuido funciones como molécula señalizadora en el fenómeno de resistencia a patógenos en plantas (Wilson et al. 2008). En un trabajo publicado por Delledonne et al. (1998) se

reportó la inducción de la síntesis de NO en igual proporción que el H₂O₂ durante una infección incompatible entre soya y *Pseudomonas syringae*, induciendo posteriormente la muerte celular, además de observarse una activación de la expresión de los genes que codifican para las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL) y chalcon sintetasa (CHS), las cuales participan en las rutas de síntesis de fitoalexinas y por lo tanto forman parte del mecanismo de defensa. Asimismo en un trabajo posterior los autores determinaron que es necesaria una determinada proporción entre estas dos moléculas para que ocurra la muerte celular, indicando que el NO juega un papel fundamental en la activación de la HR (Delledonne et al. 2001). Por otro lado, también se ha reportado la inducción de la síntesis del NO por citoquininas, hormonas que además de participar en procesos de división celular, senescencia y de-etiolación, también han sido propuestas como inductoras de la muerte celular programada en plantas (Carimi et al. 2003).

En plantas, muchos metabolitos secundarios son compuestos orgánicos, los cuales a pesar de no ser esenciales para el normal crecimiento y desarrollo en la planta, tienen como función principal servir como químicos de defensa ante el ataque de herbívoros y patógenos (Mao et al. 2007). Existen tres categorías de segundos mensajeros: fenólicos, compuestos de nitrógeno y terpenoides, cada uno de ellos con mecanismos de acción diferentes (Chen 2008). Algunos flavonoides son inhibidores de enzimas regulatorias como las ATPasas dependiente de calcio (Salunke et al. 2005) mientras que los fenoles como la lignina pueden fortalecer la pared celular (Schroeder et al. 2006).

De igual forma, la expresión de algunas proteínas como proteasas y lectinas también ha sido asociada a la respuesta de defensa en plantas. En maíz, la sobreexpresión de una cistein proteinasa redujo entre un 60 a 80 % el crecimiento del lepidóptero *Spodoptera frugiperda* como consecuencia de daños en su tracto digestivo (Pechan et al. 2002), mientras que para el caso de las lectina, a pesar de existir algunas sospechas en relación a su participación en la respuesta de defensa aun se desconocen los mecanismos de acción a través de los cuales ellas participan (Chen 2008).

6. Fito hormonas y la respuesta de defensa

En la planta, la activación de los procesos moleculares de defensa mencionados anteriormente viene dada por la regulación de algunas moléculas como el etileno (ET), el ácido jasmónico (JA), el ácido abscísico (ABA) y el ácido salicílico (SA), los cuales además de participar en procesos de crecimiento y desarrollo de la planta, como floración, senescencia, o germinación de semillas también están implicados en la activación de la expresión de algunos genes R.

El SA desempeña un papel crucial en la defensa de la planta, participando en la activación de la respuesta de defensa contra patógenos biotróficos y hemi-biotróficos, así como el establecimiento de la resistencia sistémica adquirida (SAR por sus siglas en inglés; Park et al. 2007). Además, se ha reportado que SA es capaz de inhibir la actividad catalasa, lo cual puede conducir a un incremento en el estrés oxidativo y la inducción en la expresión de algunos genes que codifican para proteínas relacionadas con la patogénesis (PR por sus siglas en inglés) entre las que se encuentran PR1, PR2 y PR5. Estos genes codifican para β -gluconasas y quitinasas, quienes presentan actividad hidrolítica capaz de degradar la pared celular de los hongos, siendo además considerados como marcadores bioquímicos de SAR en vista que sólo se expresan durante esta respuesta (Tchagang et al. 2010). Por otro lado, diferentes factores de transcripción están involucrados en los mecanismos de defensa mediados por SA, entre los que destaca la familia WRKY, quienes reconocen los motivos W, cuyo centro activo presenta la secuencia TGAC presente en los promotores del gen PR1 (Anderson et al. 2005).

El ET, por su parte, participa en la inducción de la expresión del gen Pti4, el cual es un factor de transcripción que regula la expresión del gen de resistencia Pto en tomate, y que codifica para una serin-treonin quinasa, la cual le confiere resistencia a la planta de tomate cuando esta es atacada por la cepa de *P. syringae* portadora del gen de avirulencia *avrPto* (Gu et al. 2000). El JA es capaz de activar la expresión de genes que codifican para proteínas fungicidas como la tionina, osmotina y la proteína inactivadora del ribosoma RIP60, además de modular la expresión de los genes que codifican para las proteínas de la pared celular como las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina y prolina, quienes

participan en la fortificación de la pared celular para desarrollar una barrera física contra la infección de patógenos (Glazebrook 2005).

Es importante destacar que la mayoría de los estudios realizados para determinar los mecanismos moleculares de resistencia en plantas han sido realizados utilizando a *Arabidopsis* sp. como modelo biológico, lo que ha hecho necesaria la validación de estas rutas en otras plantas, incluyendo el arroz. En este sentido algunos investigadores han realizado comparaciones entre los genomas de ambas plantas y han determinado que algunos genes involucrados en las respuesta de defensa en *Arabidopsis* sp. tienen homólogos putativos en arroz (Goff et al. 2002, Morey et al. 2011, Yuan et al. 2005). Un ejemplo de esta conservación son las vías de señalización de las MAPK quinasas en la respuesta de defensa (Rao et al. 2010).

Las cascadas MAPK son importantes mediadores en la transducción de señales desde el estímulo externo hasta la respuesta celular, estando además involucradas en procesos celulares como crecimiento, diferenciación y regulación del ciclo celular, además de participar en la respuesta a estrés y muerte celular programada (Wrzaczek y Hirt 2001). Las cascadas MAPK están formadas por tres módulos, MAPKKK, MAPKK y MAPK, donde la primera activa a la segunda y esta a su vez activa a la tercera. En *Arabidopsis* sp., una de las proteínas de la familia MAPKKK es codificada por el gen AtEDR1, un regulador negativo de la respuesta de defensa (Frye et al. 2001). En arroz, el gen OsEDR1 fue hallado a través de comparaciones de secuencia con el gen AtEDR1, identificado originalmente en *Arabidopsis* y, al igual que su homólogo, está implicado en las cascadas de señalización de la respuesta de defensa (Kim et al. 2003a). Más recientemente, Shen et al. (2011) demostraron que la supresión en la expresión del gen OsEDR1 incrementa la resistencia contra *X. oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), además de inducir la acumulación de JA y SA e inhibir la biosíntesis de ET, por lo que los autores sugieren que esta proteína promueve la síntesis de etileno y a la vez suprime la respuesta de defensa mediada por SA y JA.

Una de las rutas ampliamente caracterizadas en *Arabidopsis* es SAR, durante la cual el SA es capaz de inducir algunas proteínas de defensa, entre las

que destacan NPR1. NPR1 es una proteína de 66kD con un motivo tipo anquirina, que participa en las interacciones proteína-proteína (Cao et al. 1997). Un incremento en los niveles de SA provoca un cambio en el equilibrio REDOX del citoplasma, resultando en una reducción de los enlaces disulfuros que normalmente mantienen al AtNPR1 presente en el citoplasma en su forma oligomérica. Una vez que estos enlaces se reducen en cantidad, el AtNPR1, ahora en forma monomérica, es trasladado al núcleo donde activa la respuesta de defensa a través de su interacción con los factores de transcripción de la familia TGA, quienes finalmente son los responsables de la activación de los promotores de los genes de defensa (Kogel y Langen 2005, Mou et al. 2003, Spoel et al. 2010). Experimentos de sobreexpresión de AtNPR1 en arroz mostraron un incremento en la resistencia de la planta a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* indicando la presencia de rutas de defensa similares en arroz a las descritas en *Arabidopsis* (Chern et al. 2001).

Las vías de señalización del ET y JA también han sido ampliamente descritas en *Arabidopsis*. En el caso del JA, la presencia del mismo es detectado por el receptor COI1, el cual es una proteína que contiene 16 repeticiones ricas en leucina y un dominio *F-box* con funciones regulatorias (Devoto et al. 2002), el cual a su vez induce la expresión de la proteína de defensa tionina (Thi1.2; Vignutelli et al. 1998). Por otro lado, la percepción del ET ocurre a través de una familia de receptores de membrana (ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 y EIN4), y aguas abajo de estos receptores encontramos al regulador negativo a CTR1, el cual es una serin-treonin quinasa *Raf-like*, con alta similitud a la proteína mitogénica-activadora quinasa quinasa quinasa (MAPKKK). En un siguiente paso de inducción encontramos a la proteína con dominio transmembranal EIN2, quien es un regulador positivo de la vía e inductor de factores de transcripción EIN3. La familia de EIN3 en la cascada regulatoria estimula la transcripción de otros factores de transcripción como ERF1 (Chen Yi-Feng et al. 2005). Lorenzo et al. (2003) demostraron que el factor transcripcional EIN2 representa el eslabón entre ambas rutas, las cuales derivan en la inducción de la expresión del gen de resistencia PDF1.2, activando así la respuesta de defensa durante el ataque del patógeno.

Yau et al. (2004) reportaron la presencia de los genes OsERS1, OsERS2 y Os-ETR2 en arroz, los cuales fueron ubicados a través de la amplificación por PCR utilizando unos cebadores diseñados bajo la secuencia de *Arabidopsis*, mostrando además una alta similitud con la secuencia reportada para los receptores de etileno reportados para *Arabidopsis*, tomate y maíz, indicando entonces la homología que pudiera haber en esa ruta entre ambas plantas.

7. Era genómica y post-genómica

Durante las interacciones planta-patógeno se activan una amplia gama de respuestas como sistemas de defensa para evitar la infección del patógeno; sin embargo, a pesar de que muchas de éstas ya han sido descritas, la mayoría de los estudios han sido realizados bajo el modelo de *Arabidopsis*, limitando de este modo la extrapolación a otras plantas como monocotiledóneas de interés agronómico. Además, existen diferentes respuestas de las cuales no han podido identificarse completamente todos los componentes que en ella participan y cómo es la interacción entre las diferentes rutas para activar la respuesta. Es por ello que el enfoque en la era genómica y post-genómica a través del estudio masivo de la expresión de los genes y/o proteínas durante un determinado tratamiento, facilita la dilucidación de las rutas a través de las cuales la planta desencadena dicha respuesta.

7.1. Microarreglos

Una de las técnicas que permite estudiar los perfiles de expresión de cientos de genes simultáneamente durante un tratamiento, de forma de poder identificar diferencias y establecer asociaciones entre la respuesta de defensa de la planta y el perfil de expresión, es la técnica de microarreglos, con la cual se pueden identificar genes candidatos en las rutas implicadas.

Un microarreglo de ADN es una colección de sondas impresas a manera de puntos microscópicos, cada uno de los cuales representa un gen, organizados de forma matricial sobre una superficie sólida. La ventaja que representa este experimento es que un mismo ensayo permite comparar la

abundancia relativa de todos y cada uno de los ARNm presentes para dos tratamientos diferentes, como por ejemplo plantas inoculadas versus plantas sin inocular (ver fig. 4). Para ello se aísla el ARN total de las muestras a estudiar y se marcan por separado con los fluoróforos Cy3 y Cy5; una vez marcadas, las muestras son combinadas e hibridadas en el microarreglo. Después de la hibridación, se registran las intensidades emitidas por cada fluoróforo a través de un escáner y estas mediciones son utilizadas para determinar la relación y a su vez la abundancia relativa de los ARNm para cada muestra analizada. El análisis de las señales y la correlación entre ellas permite obtener valores de inducción o represión entre las muestras, que son luego representadas en matrices de expresión, donde se le asigna una escala de color de acuerdo a los niveles en la expresión, en el cual el color rojo indica inducción mientras que el color verde represión; en el caso donde ambas muestras tienen el mismo nivel de expresión de un determinado gen se le asigna el color negro.

La gran capacidad de generación de datos de esta técnica permite obtener una enorme cantidad de información a partir de la cual se pueden hacer una serie de inferencias con relación a:

- Expresión del genoma completo
- Correlación de un perfil de expresión con un fenotipo
- Determinación del efecto de un tratamiento sobre la expresión
- Identificación de genes involucrados en procesos de interés
- Identificación de la co -regulación de diferentes genes
- Determinación de la función de un gen desconocido.
- Asociación funcional de genes en distintas rutas metabólicas.

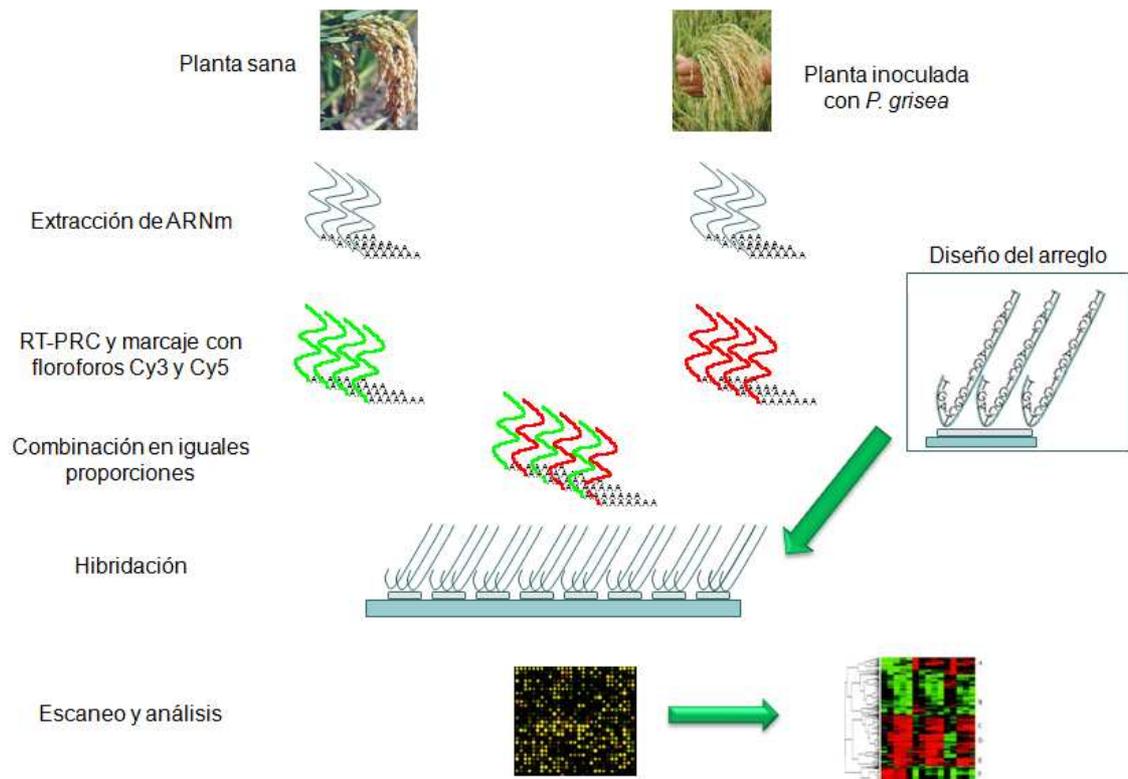


Figura 4: Análisis de la expresión génica utilizando microarreglos. El ARNm de plantas de arroz sanas e inoculadas con *M. oryzae* es extraído y marcado de forma diferencial con los fluoróforos Cy3 y Cy5, lo cual luego de combinarlos en las mismas proporciones permite diferenciarlos a la hora de analizar la imagen. Independientemente del marcaje, las secuencias de ARNm que representan a cada tratamiento van a hibridar de forma específica con la secuencia del gen correspondiente en la matriz. La abundancia relativa de las plantas inoculadas en comparación con las plantas sin inocular se refleja en una relación del rojo al verde, donde rojo representa inducción y verde represión.

De igual forma, esta técnica permite determinar la relación que puede haber entre las diferentes vías de señalización y así tener una visión completa de la respuesta de la planta durante la infección de un patógeno. Algunos de los primeros trabajos realizados en esta área utilizaron a *Arabidopsis* sp. como modelo biológico, tal y como se mencionó anteriormente. Un estudio de los perfiles de expresión en dicha planta luego de ser tratada con JA, ET y SA, demostró la existencia de una comunicación entre las diferentes cascadas de señalización que se activan durante la exposición a estas moléculas (Schenk et al. 2000). Estos experimentos corroboraron que tanto el ET como el JA inducen

la expresión del gen PDF1.2, el cual es el eslabón que une la cascada de señalización de ambas hormonas (Schenk et al. 2000).

Los perfiles de expresión masiva también han sido utilizados para estudiar SAR. Maleck et al. (2000) analizaron los perfiles de expresión de *A. thaliana* durante la iniciación de la respuesta de defensa local y SAR, monitoreando los cambios en la expresión de diferentes condiciones que incluían tanto inducción como represión de SAR. A partir de los patrones de expresión de los genes pudieron establecer grupos de regulación, siendo el más llamativo el que contiene el gen PR1, quien es un marcador de SAR. Dentro de este regulón también se encuentran genes que codifican para proteínas involucradas en la regulación redox como glutatión transferasa, peroxidasa C y otros genes de la familia PR (PR2 y PR4; Maleck et al. 2000). Un análisis de las secuencias promotoras de todos estos genes indicó que son ricas en cajas W (TTGAC), las cuales son reconocidas por la familia de factores de transcripción WRKY (Eulgem et al. 2000), y probablemente sean los encargados de la regulación de la expresión de todo el regulón (Maleck et al. 2000).

Cheong et al. (2002) estudiaron los perfiles de expresión de *Arabidopsis* sp. durante diferentes tipos de estrés como el ataque de un patógeno, el daño por herida, estrés abióticos y respuesta hormonal con la finalidad de determinar si existe algún tipo de interacción entre las cascadas de señalización. Los resultados de este trabajo evidenciaron que existe una comunicación entre diferentes cascadas de señalización, a través de la inducción de los genes que codifican para los factores de transcripción tipo WRYK y MYB, quienes a pesar de haber sido asociados con la regulación de la expresión de los genes PR, muestran inducción durante la expresión de los genes AP, quienes participan en la inducción de la familia ERF, actores claves en la cascada de señalización de las hormonas JA y ET (Cheong et al. 2002).

Por otro lado, el estudio de los perfiles de expresión no sólo permite establecer relaciones entre las diferentes respuestas de defensa, sino que también permite identificar nuevos actores que aun no han sido descritos y que juegan un papel fundamental en la regulación de la señal de defensa. Los factores de transcripción es una de las formas a través de la cual las plantas, al

igual que el resto de los organismos, pueden regular las respuestas. Chen et al. (2002) identificaron los factores de transcripción que están implicados en la respuesta de defensa a distintos tipos de estrés a los cuales puede estar sometida una planta logrando establecer 5 grupos de factores de transcripción que se expresan de forma diferencial de acuerdo al tipo de estrés al que esté sometida la planta. Aun cuando los resultados corroboran la información disponible con relación a la función de algunos de los factores de transcripción descritos previamente, como los miembros de las familias WRKY y MYB, también reportan algunos genes que codifican para proteínas con función desconocida, pero que contienen dominios descritos para factores de transcripción, entre las que se encuentran proteínas con dominios estructurales de unión al ADN con cierres de leucinas (bZIPs).

En arroz, la interacción con *M. oryzae* también ha sido objeto de intenso estudio desde el punto de vista de generación masiva de datos. Ya para el 2001, Kim S. et al. estudiaron los cambios en los perfiles de expresión de arroz durante la infección con *M. oryzae* a través del uso de una genoteca de ADNc, encontrando 221 genes no redundantes, distribuidos según sus funciones en metabolismo (32 %), defensa (29 %) y síntesis de proteínas (18 %) como las más relevantes, destacando la presencia de proteínas como PR1, PBZ y PR5 entre las descritas. Rauyaree et al. (2001), utilizando también la aproximación de genoteca de ADNc identificaron 124 genes, 19 % de los cuales mostraba una función desconocida, por lo que los autores destacan la importancia de este tipo de tecnologías en el descubrimiento de nuevos genes y su participación en la respuesta de defensa.

En el 2004, Shim et al. utilizaron microarreglos de ADNc para el estudio de los perfiles de expresión durante la invasión por *M. oryzae*, encontrando que en al menos 50 % de los genes identificados se desconoce su función, además de reportar la presencia de genes como tioredoxinas (TRX), Rubisco e inhibidores de cistein proteasas. Li et al. (2006) estudiaron los perfiles de expresión de arroz durante la invasión no sólo de *M. oryzae*, sino también por *X. oryzae*, encontrando 29 genes comunes durante las interacciones compatibles e incompatibles con ambos patógenos, dentro de las que se encuentran los genes que codifican para PR1, ERP y peroxidasa catiónica.

7.2. Proteómica

En la era post-genómica, la proteómica ha comenzado a ser una herramienta muy importante en el estudio de eventos como crecimiento, desarrollo, diferenciación, resistencia, etc., ya que permite relacionar una proteína directamente con su función (van Wijk 2001), así como también al evento que se esté estudiando. El estudio de los mecanismos de defensa en la planta también ha sido estudiado desde el enfoque de la proteómica. Recientemente, Mukherjee et al. (2010) estudiaron el perfil de expresión de proteínas de *Arabidopsis* sp. durante la infección con *Alternaria brassicicola*, encontrando que al menos 11 proteínas muestran diferencias en sus niveles de expresión cuando se las compara con plantas sanas, identificando una inducción en la expresión de proteínas como PR-4, glicosil hidrolasa, osmotina y algunos miembros de la familia glutatión transferasa (GST). Adicionalmente, los autores evaluaron los niveles de expresión por RT-PCR del gen SAG12, el cual codifica para una cistein proteasa marcadora de senescencia, encontrando una inducción durante la infección, lo cual sugiere que ambos procesos, muerte celular programada y la respuesta de defensa, pudieran tener vías en común (Mukherjee et al. 2010).

Kaffarnik et al. (2009) estudiaron las proteínas secretadas por *Arabidopsis* sp. durante su interacción con *P. syringae*, y reportaron la acumulación de 45 proteínas, cuya distribución funcional revela una mayor proporción de proteínas asociadas a la homeostasis REDOX (18 %) como TRX, GST, que se ve alterada de acuerdo a la interacción, compatible o incompatible, lo cual sugiere que hay una respuesta dinámica durante la interacción (Kaffarnik et al. 2009).

En arroz, la proteómica también ha sido usada como herramienta para determinar cuáles proteínas participan en la interacción con *M. oryzae*. Kim et al. (2003) estudiaron el proteoma de células de arroz en cultivo durante la infección con el patógeno, y demostraron que las proteínas PBZ1, PR-10 se encontraban en mayor proporción luego de la inoculación. En trabajos posteriores, el mismo grupo estudió el proteoma de la hoja de arroz durante la infección y observaron una expresión diferencial en las proteínas POX22.3, Glu1, Glu2, TLP, OsRLK,

PBZ1, y OsPR-10, donde las cuatro últimas mostraban una mayor y temprana inducción durante las interacciones incompatibles, sugiriendo que una activación temprana ofrece a la planta una mayor posibilidad de contener la infección (Kim et al. 2004).

En todos los casos, los estudios de perfiles de expresión, tanto génicos como proteicos, han permitido tener una visión general del fenotipo de resistencia y cómo se desarrolla la respuesta de la planta durante la infección. Por lo tanto, el poder utilizar este tipo de tecnologías en plantas de arroz tanto susceptibles como resistentes a *M. oryzae* permitiría determinar quiénes son los actores que participan en la respuesta de defensa y como ocurre la activación de la misma.

En este trabajo se evaluaron los mecanismos de resistencia a *Magnaporthe oryzae* en arroz (*Oryza sativa*) a través de perfiles masivos de expresión de ARNm y proteínas, logrando identificar al menos 320 genes con un patrón de expresión diferencial a través de la tecnología de microarreglos, de los cuales se pre-seleccionaron 100 genes candidatos. Por su parte, 64 proteínas con expresión diferencial fueron seleccionadas con base en su perfil de expresión visualizado a través de geles en 2D e identificadas por espectrometría de masas tipo MALDI-TOF. De acuerdo a sus funciones biológicas, cada uno de los genes y proteínas fueron agrupados y posteriormente asociados a las rutas donde ellos participan, encontrando alteraciones a nivel de transcripción, respuesta a estrés, transporte, metabolismo, traducción, fotosíntesis y con función desconocida, siendo esta última la que representa la mayor proporción de todas las proteínas y genes identificados. La información obtenida en este trabajo constituye una fuente de información importante para estudiar los mecanismos de resistencia en plantas de arroz durante el ataque por *M. oryzae*, sin embargo, la utilidad de esos resultados puede ir más allá, permitiendo la validación e incorporación de los genes y proteínas identificados a los programas de mejoramiento del arroz. Para ello resulta imperante la necesidad de validar la información obtenida en un grupo de materiales resistentes y susceptibles, con el fin de poder transferirla a los distintos programas de mejoramiento genético del país mediante una herramienta tangible de selección de plantas resistentes.

II. OBJETIVO GENERAL

- Identificar posibles genes de resistencia a *Magnaporthe oryzae* en plantas de arroz a través del uso de la Genómica y Proteómica.

III. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar los perfiles de expresión de plantas de arroz susceptibles y resistentes a *Magnaporthe oryzae* a través del análisis de microarreglos de oligonucleótidos, tomando en consideración el tiempo de exposición a dicho patógeno.
2. Identificar los genes que se expresan de forma diferencial en el tiempo en plantas de arroz susceptibles y resistentes a *M. oryzae* y su papel en la respuesta de defensa.
3. Comprobar la expresión diferencial de algunos de los genes que fueron identificados por análisis de microarreglos de oligonucleótidos a través de RT-PCR en tiempo real.
4. Comparar los perfiles de expresión proteica en el tiempo de plantas de arroz susceptibles y resistentes a *M. oryzae* a través del análisis de geles bidimensionales.
5. Identificar, a través de la huella peptídica por espectrometría de masa, las proteínas expresadas de forma diferencial en el tiempo en plantas susceptibles y resistentes a *M. oryzae* y su papel en la respuesta de defensa.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Para alcanzar los objetivos de este trabajo de investigación fue necesaria la combinación de la siembra de los materiales y las infecciones experimentales realizadas en casa de malla de la Fundación DANAC (San Felipe, Edo. Yaracuy), con los ensayos moleculares realizados en el laboratorio de Genómica y Proteómica de la Fundación IDEA (Valle de Sartenejas, Distrito Capital), además de la aplicación de algunas herramientas bioinformáticas.

1. Material biológico

1.1 *Oryza sativa*

Las plantas utilizadas en este trabajo fueron las isolíneas CT13432-55 (susceptible), CT13432-219 (resistente) y Fanny como (testigo internacional altamente susceptible). Tanto la isolínea susceptible como la resistente provienen del cruce de las plantas C 101 LAC x C 101 A51, donde la primera de ellas aportó los genes de resistencia Pi1 y Pi33, mientras que la segunda aportó el gen Pi2. De ese cruce (CT13432) se generaron 283 líneas isogénicas F7 con distintas combinaciones de los tres genes dentro de las cuales se encuentran las utilizadas en este trabajo: CT13432-55, con el gen Pi33 y la CT13432-219 con el gen Pi2.

Es importante destacar que estas plantas fueron seleccionadas fundamentalmente por el hecho de estar genéticamente emparentadas, lo cual implica que poseen un *background* genético muy similar. Esta característica nos resulta de gran importancia a la hora de controlar la mayor cantidad de variables

posibles, ya que de esta forma podemos asociar las diferencias en los niveles de expresión de los ARNm y proteínas al efecto del patógeno o fenotipo de resistencia directamente y no a la diferencia en el genotipo de ambas plantas.

Para realizar el ensayo de infección experimental las plantas fueron sembradas en materos con tierra abonada y mantenidas en invernaderos durante 15 días, luego de los cuales se realizó la inoculación con el aislado de *M. oryzae*.

1.2 *Magnaporthe oryzae*

El aislado de *Magnaporthe oryzae* utilizado en este trabajo fue el identificado con el número 39168. Este aislado fue colectado en Araure (campo experimental INIA), a partir de lesiones de piricularia en el cultivar D-Sativa en el año 2003 y ese mismo año se obtuvo el cultivo puro (monoconidial), mostrando una fuerte severidad sobre las plantas evaluadas por la Fundación DANAC (Jayaro; comunicación personal)

2. Métodos

2.1 Siembra de las plántulas

La tierra previamente esterilizada, fue colocada en los vasos de siembra. En cada vaso se colocaron 15 semillas, para asegurar la germinación de al menos 10 de ellas y luego se le colocó una capa fina de tierra hasta cubrirlas completamente. Estos vasos fueron mantenidos en la casa de malla durante 15 días hasta el momento de la inoculación.

2.2 Preparación del inóculo

El aislado de *M. oryzae* 39168 se creció en placas con medio agar salvado de arroz (ASA) e incubado por 8 días a 27 °C. Trascorrido este tiempo

de incubación, se realizó un barrido o poda del hongo utilizando una espátula de aluminio con la finalidad de esparcir todo el micelio por la placa y así estimular la producción de esporas. Finalmente, las placas fueron incubadas en la cámara de crecimiento a luz continua durante 8 días a una temperatura entre 23 y 27 °C

Para la preparación del inóculo, se tomaron 3 placas con el aislado y se procedió a la poda con la ayuda de una espátula de aluminio; el micelio fue diluido a razón de 1 mL por cada placa. Las esporas fueron separadas del micelio por filtración en una malla de poro fino, lo cual permite simular las condiciones de infección del hongo a la planta como ocurre naturalmente en campo. Una alícuota de la solución fue utilizada para cuantificar el título del cultivo a través de cámara de Neubauer, para de esta manera preparar un inóculo con un título de 5×10^6 esporas/mL. Finalmente, al inóculo se le agregaron dos gotas de Tween 20 con la finalidad de incrementar la adhesión de las esporas a la superficie de la hoja.

2.3 Inoculación de Magnaporthe oryzae

La inoculación del hongo en arroz se realiza tradicionalmente asperjando el inóculo sobre las plantas, ya que para fines del análisis fitopatológico este procedimiento es suficiente para observar las lesiones y evaluar los niveles de resistencia. Sin embargo, este tipo de metodología no asegura una inoculación homogénea sobre la superficie foliar, lo cual es muy importante a la hora de estudiar molecularmente la expresión genética de las células durante la infección. Adicionalmente, la formación de la lesión se inicia aproximadamente a los 4 días posteriores a la inoculación, por lo que durante la toma de la muestra en tiempos inferiores a esta, como las establecidas en este trabajo, se dificulta la selección de la zona de la hoja a procesar. En este sentido, fue necesario realizar la inoculación garantizando que todo el inóculo se encontrara distribuido a lo largo de toda superficie foliar, de tal forma que al momento de procesar la hoja fuera posible evaluar ante el ataque del patógeno aun sin ser evidente la lesión. En consecuencia se consideró que la inoculación directa sobre la superficie foliar a través de un hisopo podía resultar en una infección más homogénea sobre la hoja.

De esta manera, luego de transcurridos los 15 días post-siembra, las plantas fueron colocadas en pequeñas jaulas, donde se inocularon con el aislado de *M. oryzae* a través del frotamiento de sus hojas con un hisopo impregnado con el inóculo para garantizar que toda la hoja estuviese inoculada, y el exceso restante fue asperjado sobre las plantas en gotas muy finas simulando una especie de neblina. Al finalizar, las jaulas fueron cerradas durante 24 h para propiciar el microclima para el desarrollo del hongo.

Para la realización de este ensayo se inocularon 8 vasos de siembra con plantas resistentes (CT13432-219), 8 vasos de siembra con plantas susceptibles (CT13432-55) y 4 vasos de siembra con plantas testigo altamente susceptibles (Fanny). La planta testigo permitió verificar que el aislado no perdió su virulencia durante el proceso de activación en el laboratorio.

Es importante señalar que un número igual de vasos de siembra fueron mantenidos en una cámara húmeda independiente sin inóculo para utilizarlas como plantas control.

2.4 Toma de la muestra

Las hojas bandera de las plantas fueron cortadas de acuerdo al tiempo de infección y lavadas con agua corriente y luego con agua destilada para eliminar cualquier residuo de tierra y del hongo que pudiera interferir con las extracciones de ARNm y/o proteínas o degradar a las mismas. Se colectaron 100 mg de hojas para cada extracción, realizando tres réplicas para la extracción de proteínas y cuatro para la extracción de ARNm. Las muestras fueron pulverizadas con nitrógeno líquido y posteriormente congeladas a -20°C hasta el momento de la extracción.

2.5 Esquema experimental

En la elaboración del esquema experimental se consideraron básicamente tres aspectos: el tipo de material a comparar (resistente vs susceptible), el efecto del patógeno sobre la planta (inoculada vs sin inocular) y la evolución de la enfermedad en el tiempo, tal y como se muestra en la fig. 5.

Para el caso del estudio de los perfiles de expresión de génica se contó con dos réplicas biológicas al igual que para el estudio de los perfiles de expresión proteica.

La toma de muestra del tejido foliar a analizar se realizó a las 12, 24 y 36 horas post-inoculación (hpi) tanto para las plantas susceptibles como resistentes ya que en este punto el hongo ha ingresado en la célula vegetal (Ribot et al. 2008); asimismo, en estos mismos tiempos se tomaron muestras de plantas sin inocular para considerar el posible efecto del ciclo circadiano durante las comparaciones.

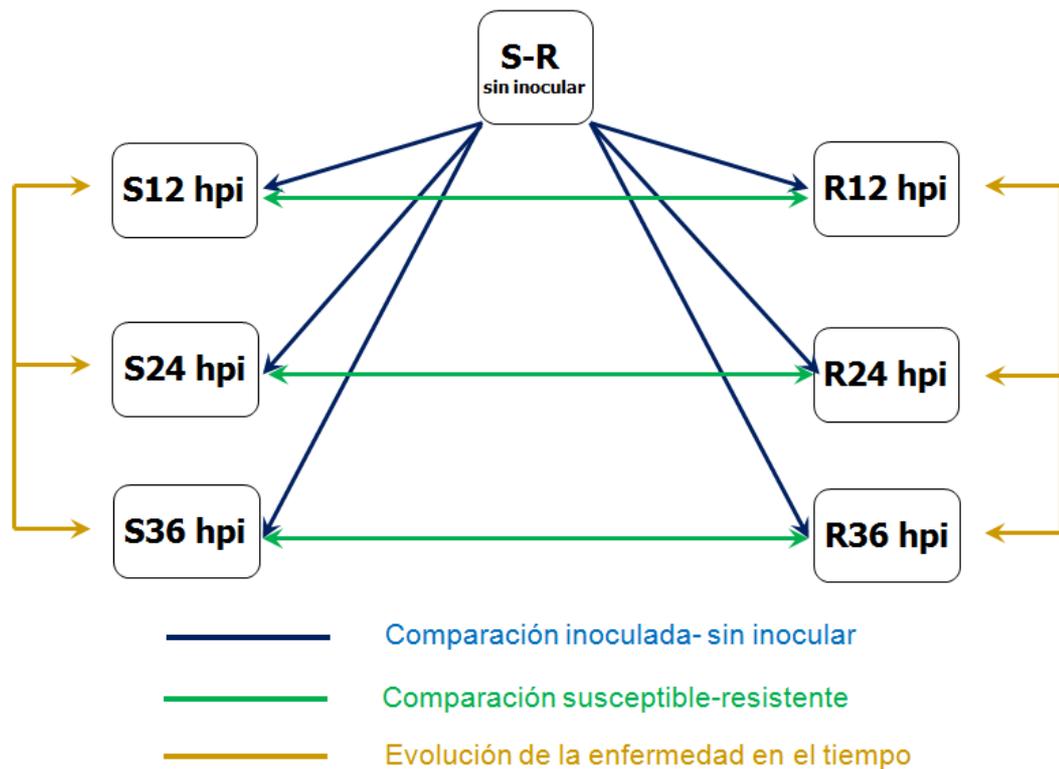


Figura 5. Esquema experimental. Las comparaciones abarcaron el análisis de resistente vs susceptible, el efecto del patógeno sobre la planta y evolución de la enfermedad. S: planta susceptible; R: planta resistente.

2.6 Aislamiento de ARN total

Para la purificación del ARN total se utilizó el reactivo Plant Trizol® (Invitrogen™) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se colocaron 500 µL del reactivo en 100 mg de tejido pulverizado y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Luego de transcurrido este tiempo las muestras fueron centrifugadas durante 2 min a 12.000 xg, y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo donde se le agregaron 100 µL de NaCl 5 M y 300 µL de cloroformo, se mezclaron por inversión y se centrifugaron durante 10 min a 12.000 xg a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a otro tubo, donde se le agregó un volumen equivalente de isopropanol. Luego de una incubación de 10 min a temperatura ambiente se centrifugaron durante 10 min a 12.000 xg a 4 °C. En caso de que la muestra tuviera que ser trasladada del campo al laboratorio, se agregaron 50 µL de etanol 100% al sedimento anterior y se transportaron en nitrógeno líquido. Ya en el laboratorio, las muestras fueron centrifugadas nuevamente durante 10 min a 12.000 xg a 4 °C y el sedimento fue lavado con 1 mL de etanol al 75%. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 12.000 xg a 4 °C y el sedimento, luego de secado, se resuspendió en 20 µL de agua destilada libre de ARNasas.

2.7 Determinación de la calidad y cantidad de ARN

Para la determinación de la calidad del ARN las muestras fueron evaluadas a través de geles de agarosa en condiciones desnaturizantes con formaldehído al 2,2 M. Para ello se mezclaron 2 µL de tampón de carga (Tampón MOPS 1 x, formaldehído 2,2 M, formamida 50%, bromuro de etidio 10 µg/mL) con la muestra a analizar, y se incubaron 5 min 70 °C y a continuación durante 10 min en hielo para luego proceder a cargar en el gel de agarosa al 1,2% con formaldehído al 2,2 M equilibrado con tampón MOPS 1 x. La electroforesis se corrió con el tampón de corrida MOPS 1x a 4 V/cm hasta que el frente de corrida alcanzó 1/3 de la longitud del gel. Por último, las bandas correspondientes a los ARN fueron visualizados en el transiluminador de UV GelDoc™ XR System (BioRad Laboratories).

Para la cuantificación del ARN se utilizó el nanoespectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies), el cual estima la concentración de la muestra basado en la absorbancia a 260nm utilizando la ecuación de Beer-Lambert y el coeficiente de extinción molar 40 ng-cm/ μ L para ARN.

2.8 Hidrolisis del ADN genómico y purificación del ARN

Luego de la extracción fue necesario eliminar el ADN genómico contaminante presente en la muestra de ARN que pudiera interferir con la hibridación del microarreglo y la amplificación por RT-PCR. Para ello se utilizó la enzima ADNasa, libre de ARNasa, (Qiagen) y se siguieron las indicaciones de la casa comercial. A un volumen no mayor de 87,5 μ L de la muestra se le agregaron 10 μ L de tampón RDD y 2,5 μ L de la enzima y luego se completó con agua libre de ARNasas hasta alcanzar un volumen final de 100 μ L. Esta reacción se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y posteriormente se procedió con el paso de purificación para eliminar los nucleótidos, la enzima y las sales de la muestra utilizando el kit RNeasy Mini (Qiagen), el cual es compatible con cantidades de ARN mayores a 100 μ g. A la muestra se le agregaron 350 μ L de tampón RLT, se mezcló bien y posteriormente se agregaron 250 μ L de etanol 100%. Inmediatamente se transfirió la muestra a la columna RNeasy mini spin colocada previamente en un tubo de colección y el conjunto fue centrifugado durante 15 s a 12.000 xg. El eluato fue descartado y se agregaron 500 μ L de tampón RPE y se centrifugó durante 15 s a 12.000 xg y luego se repitió este paso una vez más. Finalmente, la columna proporcionada por el kit fue colocada en un nuevo tubo y se agregaron 50 μ L de agua en el centro de la columna y se centrifugó durante 1 min a 12.000 xg para obtener el ARN purificado.

2.9 Marcaje del ADNc con los fluoróforos Cy3 y Cy5

Para la realización del marcaje del ADNc se utilizó el kit comercial Amino Allyl MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit (Ambion®) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Es importante destacar que este kit ofrece la ventaja de incrementar las cantidades de ARN luego de un paso de amplificación lineal para aumentar las cantidades de ARNm que pudieran encontrarse en

pequeñas cantidades. El marcaje se llevó a cabo en varias fases las cuales se describen a continuación:

2.9.1 Transcripción reversa para la síntesis de la primera hebra de ADNc

Este paso permitió incluir en el ADNc la secuencia del promotor del T7 a través del uso del cebador oligo (dT) T7. Para ello se colocó 1 µg de ARN más 1 µL del cebador oligo (dT) T7 y la mezcla se completó hasta 12 µL con agua libre de nucleasas; se incubó durante 10 min a 70 °C en el termociclador PTC-100™ (MJ Research, Inc.) y transcurrido este tiempo, las muestras fueron colocadas en hielo. A temperatura ambiente y en un tubo libre de ARNasa se preparó la mezcla de reacción de la transcriptasa reversa, para lo cual se agregaron por muestra: 2 µL del tampón primera hebra (10 X), 4 µL de la mezcla de nucleótidos, 1 µL de inhibidor de ARNasas y 1 µL de la enzima *ArrayScript*. Se mezclaron los componentes de la reacción suavemente y se transfirieron 8 µL de la mezcla a cada muestra y se incubaron a 42 °C durante 2 h, luego del cual, fueron colocadas en hielo para proceder inmediatamente con el siguiente paso.

2.9.2 Síntesis de la segunda hebra de ADNc

En este paso se combina la ADN polimerasa y la ARNasa H simultáneamente para degradar el ARN y sintetizar la segunda hebra del ADNc. En este sentido, se agregaron a cada muestra: 63 µL de agua libre de nucleasas, 10 µL de tampón segunda hebra (10 x), 2 µL de ADN polimerasa, 4 µL de la mezcla de nucleótidos y 1 µL se ARNasa H para luego ser incubadas en el termociclador PTC 100™ (MJ Research, Inc.) pre-enfriado a 16°C e incubados por 2 h. Al finalizar las muestras fueron colocadas en hielo para proceder inmediatamente con el siguiente paso.

2.9.3 Purificación del ADNc

Con la finalidad de remover el ARN, los cebadores, las enzimas y las sales que pudieran inhibir la transcripción *in vitro* se procedió a purificar el ADNc. A cada muestra se le agregaron 250 μL de tampón de unión a ADNc, se mezclaron bien y luego fueron transferidos a la columna filtradora de ADNc. Las muestras fueron centrifugadas durante 1 min a 10.000 xg, se descartaron los eluatos y se agregaron 500 μL de tampón de lavado para ser centrifugadas durante 1 min a 10.000 xg. Finalmente se agregaron 9 μL de agua libre de ARNasas pre-calentada a 55 °C y se centrifugaron durante 2 min a 10.000 xg. Este último paso se repitió una vez más para tener un volumen final de 18 μL . Al finalizar las muestras fueron colocadas en hielo para proceder inmediatamente con el siguiente paso.

2.9.4 Transcripción *in vitro* para la síntesis de ARNa modificado (IVT)

En este punto con la incorporación del UTPaa se realiza la síntesis de múltiples copias del ARNa modificado a partir del ADNc doble cadena, siendo éste el paso de amplificación. En hielo, se agregaron a cada muestra: 3 μL de UTPaa (50 mM), 12 μL de la mezcla de nucleótidos (25 mM), 3 μL UTP (50 mM), 4 μL tampón de reacción T7 (10 x) y 4 μL de la enzima T7. Se mezclaron todos los componentes suavemente y las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 14 h. Finalmente, se detuvo la reacción agregando 56 μL de agua libre de ARNasas y las muestras fueron colocadas en hielo hasta continuar con el siguiente paso.

2.9.5 Purificación y cuantificación del ARNa

Este paso de purificación se realiza con la finalidad de remover los nucleótidos no incorporados, las sales, enzimas y fosfatos inorgánicos que pudieran interferir con la estabilidad del ARNa y así facilitar el acoplamiento del éster NHS y las siguientes reacciones enzimáticas.

En cada muestra se agregaron 350 μL de tampón de unión a ARNa, se mezclaron y se añadieron 250 μL de etanol 100% y se transfirieron a la columna filtradora de ARNa para ser centrifugadas durante 1 min a 10.000 xg. Se

descartaron los eluatos y se agregaron 650 μL de tampón de lavado para ser centrifugados durante 1 min a 10.000 xg para eliminar el tampón de lavado. Luego de transferir la columna a un nuevo tubo, se agregaron en ella 100 μL de agua libre de ARNAsas pre-calentada a 55 °C y se centrifugaron durante 2 min a 10.000 xg. Las muestras fueron cuantificadas en el espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies). Al finalizar las muestras fueron colocadas a -20 °C hasta proceder con el siguiente paso.

2.9.6 Incorporación de fluoróforo y purificación del ARNa marcado.

En este paso se realizó el acoplamiento entre el residuo de UTPaa modificado y el grupo amina reactivo del fluoróforo. Justo antes de iniciar el marcaje, cada fluoróforo fue resuspendido en 11 μL de DMSO. Por otro lado, de 5 μg de ARNa fueron secados por centrifugación en el SpeedVac® (Thermo-Savant) para luego ser resuspendidos en 9 μL de tampón de acoplamiento. Seguidamente se combinaron tanto el ARNa con el fluoróforo y se dejaron incubar durante 30 min en total oscuridad y temperatura ambiente. Se detuvo la reacción de acoplamiento con la adición de 4,5 μL de hidroxilamina 4 M y se incubó nuevamente por 15 min en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Finalmente, se agregaron 5,5 μL de agua libre de ARNAsas para llevar la muestra a un volumen final de 30 μL .

Luego de completada la incorporación fue necesario retirar el exceso de fluoróforo, para lo cual se agregaron 105 μL de tampón de unión a ARNa a cada muestra y 75 μL de etanol 100% y cuidadosamente se mezcló con la pipeta. Las muestras fueron transferidas a una columna con filtro para ARNa marcado y se centrifugó por 1 min a 10.000 xg, se retiró el eluato y se agregaron 500 μL de tampón de lavado. Luego de centrifugar por 1 min a 10.000 xg, se retiró el eluato y se transfirió la columna a un nuevo tubo donde se agregaron 2 tandas de 10 μL de agua libre de ARNasa. La muestra purificada fue cuantificada en el espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies) el cual estima la concentración de los fluoróforos basados en la absorbancia a 550 y 650nm para Cy3 y Cy5 respectivamente utilizando la ecuación de Beer-Lambert y el coeficiente de extinción molar de 150000 L/mol-cm y 250000 L/mol-cm para Cy3

y Cy5 respectivamente. Finalmente las muestras fueron almacenadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en total oscuridad hasta proceder con el siguiente paso.

2.10 Descripción de los arreglos

Los arreglos utilizados en este trabajo fueron desarrollados por el consorcio *The Institute of Genetics Research* (TIGR), en colaboración con University of California at Davis (UCD) e Iowa State University (ISU) en el marco del proyecto *Rice Oligonucleotide Array Project* financiado por la *National Science Foundation*. Estos fueron: versión 1 (20k), el cual posee 22.000 genes aproximadamente ordenados en un solo arreglo, y el versión 2 (45k), el cual posee 2 arreglos (A y B) de 20.230 genes cada uno. Este último posee el doble de genes ya que para el diseño de los oligonucleótidos fue tomado en consideración el corte y empalme alternativo del ARNm que podía ocurrir para cada gen. Asimismo, dentro del arreglo se encuentran incluidos algunos controles internos, como los que se señalan a continuación:

- *Spots vacíos*: son *spots* donde no hay ningún tipo de muestra, por lo tanto el resultado del log (*ratio*) se espera que sea cero.
- Higromicina (gen de fosfotransferasa de higromicina, gen de resistencia a higromicina): este *spot* también es considerado un control interno. En el caso de plantas transgénicas, este control es positivo y de muy alta expresión, mientras que es un control negativo para plantas silvestres. En los arreglos de 20k solo tiene un *spot*, sin embargo en los arreglos de 45k está mucho más representado.
- Proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés, *green fluorescent protein*): es un control negativo y solo se encuentra presente en los arreglos de 45k.
- Sistema reportero de β -glucoronidasa (GUS): es un control negativo; en los arreglos de 20k solo tiene un *spot*, sin embargo en los arreglos de 45k está mucho más representado.

Estos genes, a pesar de resultar irrelevantes en este trabajo al no involucrar plantas transgénicas, resultan valiosos como controles de hibridación, ya que se espera que todos ellos generen una señal de similar magnitud a el *background* general.

2.11 *Bloqueo de los microarreglos*

Para el bloqueo de las microarreglos se siguieron las indicaciones del fabricante (TIGR). Brevemente, los microarreglos fueron sumergidos en tampón de lavado 1 (SDS 0,1%) durante 20 s a temperatura ambiente. Luego se repitió el mismo procedimiento con agua bidestilada. Al finalizar estos lavados, los microarreglos fueron sumergidos en tampón de pre-hibridación (SSC 0.05%, SDS 0.25% NaBH₄ (2.5 mg/ml)) a 42 °C durante 45 min en agitación. Después de transcurrido este tiempo, se sumergieron en agua bidestilada durante 20 s y finalmente fueron secados por centrifugación.

2.12 *Hibridación de los arreglos*

Para realizar la hibridación de los microarreglos se siguieron las indicaciones de la casa comercial. Para ello se combinaron en iguales proporciones los ARNa marcados con Cy3 y Cy5 para cada muestra respectivamente en un solo tubo, correspondiente a 500 ng de cada ARNa por muestra, cuantificada previamente en el espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies) tal y como se describió anteriormente. Las muestras fueron concentradas al vacío por centrifugación en el SpeedVac® (Thermo-Savant) hasta un volumen de 10 µl y se agregaron 100 µl de tampón de hibridación contenido en el kit de marcaje. Posteriormente se procedió a incubar las muestras durante 15 min a temperatura ambiente y luego 3 min a 95 °C para evitar la formación de estructuras secundarias que puedan interferir en la hibridación de las muestras al arreglo. Luego de colocar la solución sobre el arreglo, se colocó un cubreobjetos LifterSlip™ mSeries (Erie Scientific Company) garantizando que no se formaran burbujas entre ambas superficies, de manera de favorecer una hibridación homogénea a lo largo de todo el arreglo. Finalmente, el arreglo fue colocado en la cámara de hibridación Thermomixer comfort (Eppendorf) durante 14 h.

2.13 Lavados post-hibridación

Luego de transcurrido el tiempo de hibridación, los arreglos fueron lavados de la siguiente manera: se realizó un primer lavado con la solución SSC 1x, SDS 0,2% (p/v), previamente calentada a 55 °C durante 10 min con agitación. Luego de este lavado, los cubreobjetos fueron retirados de la solución y se realizaron dos lavados más con el tampón SSC 0,1x, SDS 0,2% (p/v) durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación se realizaron dos lavados de 1 min cada uno con el tampón SSC 0,1x a temperatura ambiente y finalmente, los microarreglos fueron sumergidos en agua destilada durante un máximo de 10 s y secados inmediatamente. Ya secos, los arreglos pudieron ser leídos por el escáner y posteriormente almacenados a temperatura ambiente.

2.14 Obtención de imagen

Para realizar la lectura de los microarreglos se utilizó el escáner GenePix® 4100 (Molecular Devices), siguiendo las indicaciones del software GenePix® Pro (versión 6). Brevemente, el microarreglo fue introducido en el interior del escáner y a continuación se presionó el icono *Preview Scan* para realizar una primera lectura, la cual permitió seleccionar la ganancia ideal de los láser para cada color en función de la intensidad y eficiencia de cada fluoróforo. Posteriormente se realizó el escaneo definitivo para cada arreglo seleccionando el botón *Data Scan*. Luego de finalizar el proceso, la imagen fue almacenada en formato TIFF.

Posteriormente fue necesario incorporar sobre la imagen del arreglo el mapa o *grid* del mismo, el cual tiene toda la información acerca de la identificación de cada *spot*. Luego sobreponer exactamente el mapa en la imagen, el programa realizó un análisis que permite asignarle a cada *spot* una etiqueta de bueno, malo o ausente de acuerdo a la coincidencia o no con el *grid*, valor que fue utilizado para análisis posteriores.

2.15 Análisis de los datos de microarreglos

El análisis de los datos de microarreglos se realizó utilizando el programa Acuity® (versión 4; Molecular Devices). Este programa de análisis es

completamente compatible con el programa del equipo de obtención de imagen, además que permite realizar la normalización y posterior selección de datos, así como también la generación de los clústeres para el análisis de los datos.

Considerando que la variación entre la intensidad de los *spots* puede verse afectada por diferentes variables como son: diferencias en la eficiencia de marcaje, diferentes propiedades químicas de los fluoróforos, la impresión del arreglo, la configuración del escáner (ganancia del láser) fue necesario someter a los datos a una normalización con la finalidad de corregir estas variaciones. Considerando que la mayoría de los genes en el arreglo no se expresan de forma diferencial, las medias aritméticas de las relaciones de todos los genes de un determinado arreglo deben ser igual a 1. Sin embargo, si la media aritmética no es igual a uno, se calcula el cociente de normalización, el cual es un valor que representa cuanto deben ser escalados los resultados para que el valor medio regrese a 1. Este análisis se realiza de forma automática por el *software* de análisis a través de la siguiente ecuación:

$$\bar{x} = \exp\left(\frac{1}{n} \sum \ln x\right)$$

Donde n representa el número de *spots* del arreglo y x el cociente entre la adquisición por ambos canales del escáner.

Solo en aquellos casos donde el factor de normalización fuera mayor a 1,3 o menor a 0,7 era necesario repetir la adquisición de datos a través del escaneo de la imagen.

Luego de finalizada la normalización de los datos se procedió a la construcción del conjunto de datos. Este procedimiento se realizó básicamente por dos razones:

1. Remover datos poco fiables del conjunto de datos, como por ejemplo, aquellos que son producto de defectos en el vidrio o que no tienen una forma definida por problemas durante la impresión.

2. Remover datos irrelevantes, como por ejemplo, aquellos que son utilizados sólo para el proceso de normalización, así como también algunos que no presenten cambios pero que hagan el análisis más complejo.

Estos criterios se traducen en una serie de condiciones numéricas que fueron incluidas durante el proceso de filtración de acuerdo a cada una de las condiciones o criterios establecidos y que se describen a continuación:

- *Spots* con un pequeño porcentaje de pixeles saturados.

$$F635 \% \text{ Sat.} < 3$$

$$F532 \% \text{ Sat.} < 3$$

- *Spots* que no hayan sido etiquetados como: malo, no hallado o ausente.

$$\text{Flags} \geq 0$$

- *Spots* intensidad relativamente uniforme y *background* uniforme. Para este caso, el programa sugirió que se utilizara un valor de 0,6 ya que valores menores a este incluía gran cantidad de datos incorrectos, mientras que valores mayores hacían el análisis mucho más estricto.

$$\text{Rgn R2}(635/532) > 0,6$$

- *Spots* que fueran detectables sobre el *background* para cada una de las longitudes de onda.

$$\text{SNR } 635 > 3$$

$$\text{SNR } 532 > 3$$

Una vez que el conjunto de datos fueron transformados y depurados se procedió a buscar los genes que se expresan de forma diferencial en función de la magnitud de la intensidad, para lo cual se utilizó la aproximación de dos veces más en valor absoluto para hacer ésta identificación. Estos datos fueron

organizados en un clúster utilizando el método jerárquico o *hierarchical clustering*.

2.16 Confirmación de los perfiles de expresión a través de qRT-PCR.

La qRT-PCR fue el análisis utilizado para confirmar los niveles de expresión diferencial de los genes seleccionados con base en sus funciones conocidas y/o en sus expresiones diferenciales durante el curso del tiempo de 12, 24 y 36 hpi.

2.16.1 Diseño de cebadores

Las secuencias de cada uno de los genes fueron obtenidas a partir de la base de datos *Rice Genome Annotation Project* (Ouyang et al. 2007, Yuan et al. 2005; <http://rice.plantbiology.msu.edu>). Para el diseño de los *cebadores* fue necesario seleccionar la secuencia del transcrito, preferiblemente hacia el extremo 5' ya que esta es mucho más conservada en los casos de corte y empalme diferencial del ARNm. El programa utilizado para dicho diseño fue *Primer3* (versión 4; Rozen et al. 2000) y la secuencia de los cebadores seleccionados se muestra en la tabla 2.

2.16.2 Transcripción reversa

La síntesis *in vitro* del ADNc se realizó mediante el kit Omniscript® Reverse Transcription (Qiagen) y se siguieron las indicaciones de la casa comercial. Las cantidades recomendadas de ARN fueron 5 µg para un óptimo rendimiento. Para llevar a cabo la reacción se mezclaron 2 µL del Tampón RT 10x, 2 µL dNTP mix (5 mM para cada nucleótido), 2 µL de oligo-dT 10 µM, 1 µL de inhibidor de ARNasas (10 unidades/µL), 1 µL transcriptasa reversa Omniscript® y se completó con agua libre de ARNasas hasta un volumen final de 20 µL. La reacción se incubó a 37 °C durante 1h. Al finalizar las muestras fueron colocadas a -20 °C hasta proceder con el siguiente paso.

2.16.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las PCR fueron preparadas en un volumen final de 20 μ L con las siguientes condiciones de reacción: Tris-HCl 20 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mM, KCl 10 mM, MgSO_4 2 mM, mezcla de nucleótidos 100 μ M cada uno, 125 nM de cada primer y 2 unidades de Taq polimerasa (New England Biolabs®). Además, se agregaron 0,8 μ L del ADNc para cada reacción tal y como lo sugiere la casa comercial. El programa utilizado para todos los pares de cebadores fue: un ciclo de 3 min a 94 $^{\circ}\text{C}$, 25 ciclos de 40 s a 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s a 50 $^{\circ}\text{C}$ y 30 s a 72 $^{\circ}\text{C}$, y finalmente un ciclo de extensión final de 10 min a 72 $^{\circ}\text{C}$. Es importante destacar que el número de ciclos utilizados se determinó en función de la estandarización de la reacción, considerando que el punto a analizar fuera en la zona exponencial de la curva de amplificación. Los fragmentos de ADN fueron observados por tinción con BrEt en el transiluminador de UV GelDocTM XR System (BioRad Laboratories). El gen que codifica para la ubiquitina (Os03g13170; Jung et al. 2005) fue usado como control interno para calcular la abundancia relativa de los transcriptos.

2.17 *Asociación de locus de los genes identificados como posibles genes de resistencia con QTLs previamente reportados.*

Para llevar a cabo este análisis se utilizó la información disponible en la base de datos de *Gramene* (<http://www.gramene.org/>) la cual es de acceso público y gratuito que se basa en los principios de código abierto para el análisis de genomas de gramíneas. En esta base de datos se encuentra centralizada la información de numerosos proyectos de investigación que involucran secuenciación de genomas, análisis de estructura y función de proteínas, mapeo físico y genético, interpretación de rutas bioquímicas, descripción de caracteres fenotípicos y localización de genes y QTLs, siendo esto último la herramienta que utilizamos para el análisis, contando con la colaboración del director de la base de datos *Gramene*, Dr. Ken Youens-Clark.

Tabla 2. Cebadores utilizados en la RT-PCR para verificar los patrones de expresión diferencial de algunos de los genes seleccionados a partir de los resultados obtenidos de los microarreglos. Se indica el tamaño del producto esperado.

Código	Nombre putativo	Forward	Reverse	Producto
TR038233	<i>Cytochrome P450 90D2*</i>	CCTCACCTGGATGGTCAAGT	GTACTTGGTTGCGAGGTGGT	451pb
TR035054	<i>Zinc finger, RING-type*</i>	GCTCGCTCTCCACAACATCAT	GTCTCTGGGACGAACGACTC	326pb
TR040586	<i>PPR repeat domain containing protein*</i>	CGTGCGGAAAGAAATATGGT	CATCGTCCACATCTGACAGG	380pb
TR033190	<i>STE_MEKK_ste11_MAP3K.7 - STE kinases **</i>	CCGGAGCGACACTGTAAAAT	CCCATTGACGCATGTACAAC	300pb
TR033660	<i>OsSAUR2 - Auxin-responsive SAUR gene family member**</i>	GGCGACGAGGTTTCTTGTTG	GCAGTCAGTTTGGCTGTTTG	208pb
TR065984	<i>Expressed protein</i>	AGGGCGACGGTTGGAGTAG	CACAACCCCTCCCTTCC	301pb
TR071346	<i>Chloroplast 30S ribosomal protein S3*</i>	TGGACTCAGGCTCAAGTTCC	GAGACGGCCTGCAATTTTTA	347pb
TR060847	<i>Pirin-like protein*</i>	GTCAACCTCTCCTCCACAA	CTCGAAGTCGTTGATGGTCA	462pb
TR072621	<i>Glycine-rich protein A3*</i>	ACCAGGGATACCCTCCTCAG	GTAACCACCAAAGCCTCCAT	371pb
TR046726	<i>Expressed protein</i>	CGAAGTTCTGTCCCATGGAT	GGCATGAGCCTTAAATTGGA	384pb
TR067609	<i>Dirigent**</i>	GGGATGACCAAGTTCAAGGT	ACGATGCTCATCTCCCTCAC	329pb
TR040603	<i>Pathogenesis-related Bet v I family protein*</i>	CATCCACCAACAGCTGGAC	CTCGTCCTTACCTCCACTC	395pb
TR038862	<i>Cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain containing</i>	TCGAAGCCGATCTACGTCTC	TGGAACCTTGGTCTCCAGTC	218pb
TR030613	<i>WRKY DNA-binding domain containing protein**</i>	GTCACGCTCGACCTCACC	CCCATGTAGGACGTGATCG	300pb
TR038686	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1**</i>	GGCTATGGTGATCAGGAGGA	TTCCTCCAGCTGTTGCTTCT	325pb
TR063115	<i>Disease resistance protein RGA4*</i>	ATTTGGTTGCCAGGACACTC	CGGCTCACTTGTCACTCGTA	352pb
TR039952	<i>Cysteine proteinase inhibitor precursor***</i>	CAGCAGCCTCGTCCTGTT	GTCGCCCTCCTCGTACAC	301pb
TR045740	<i>OsRR1 type-A response regulator**</i>	GCTTCTCAAAGCCATCAAGG	ACACCACAGGTTGAGGAAGC	457pb
TR046355	<i>C2 domain containing protein*</i>	GCCTCGAGAACACCGACTAC	GCTTCCATCCACCAATGTCT	381pb
TR056941	<i>U-box protein CMPG1*</i>	TCGTACGCGCCTACTACCTC	GCCTCTTGAGACCCTTGAAA	471pb
TR043827	<i>Expressed protein</i>	CTCCCACGTCCAGGCTGT	CGAAAATCATCCCAGGAAAA	411pb
TR040178	<i>Immediate-early fungal elicitor protein CMPG1*</i>	ACAAGAGCGTGTCCGAGAAG	TTGAGCCCTCTGAAATCCAC	382pb
TR033186	<i>STE_MEKK_ste11_MAP3K.4 - STE kinases **</i>	AGCCTCTGCGATAGGATCAA	GGTGCGTATGGACTGAGCTT	497pb
TR053176	<i>Membrane protein*</i>	GCCAGCTGATTGGTTATGGT	GGATGCTGATCGTGATGATG	315pb
TR038613	<i>Expressed protein</i>	CCTGTCCACCTGATGTCC	GTGGTGCTCCTCTCCTGGT	414pb
TR043095	<i>Expressed protein</i>	AGACATTTGGACGGTGGAAC	AAGCGTCTTCTTGATCAGG	206pb

* Putativa, expresada, ** expresada, *** putativa

2.18 *Extracción de proteínas*

Para extraer las proteínas se siguió el protocolo propuesto por Tsunetzuka et al. (2005). Brevemente, 100 mg del tejido foliar pulverizado fue resuspendido en 500 μ L de tampón de extracción (Urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4% (p/v), DTT 20 mM). El homogenato fue centrifugado a 9.000 xg durante 30 min a 4 °C; al finalizar, el sobrenadante fue colocado en un nuevo tubo y precipitado con acetona 100% durante toda la noche -20 °C. Posteriormente, se eliminó toda la acetona por centrifugación a 9.000 xg durante 20 min a 4 °C y se dejaron secar para ser transportadas en nitrógeno líquido desde la Fundación DANAC hasta la Fundación IDEA, en donde las muestras fueron resuspendidas en tampón de extracción y congeladas a -70 °C hasta la cuantificación de proteínas.

2.19 *Cuantificación de proteínas*

Para la estimación de la cantidad de proteínas en las muestras se utilizó el kit Bradford Quick Start™ protein assay (BioRad Laboratories) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Resumiendo, se colocaron 4 μ L de la muestra en 200 μ L del reactivo de Bradford, se incubaron durante 5 min y luego se realizó la estimación de la absorbancia a 595 nm en el equipo iMark™ Microplate Reader (BioRad Laboratories). Las concentraciones de las muestras fueron estimadas a partir de una curva de calibración con concentraciones conocidas de BSA.

2.20 *Verificación de la concentración e integridad de las proteínas*

Una vez estimadas la concentración de proteínas se preparó un gel de poliacrilamida al 12%. Entre 10 y 15 μ g de cada muestra con el tampón de carga a una concentración final de 1X (80 mM Tris-HCl pH 6,8, 100 mM DTT, 2 % SDS, 0,006 % azul de bromofenol) fueron hervidas durante 5 min, luego se sirvieron en cada carril del gel y se corrió por 45 min a 100 voltios constantes con tampón de corrida (Tris HCl 25 mM, glicina 198 mM y SDS 0,1% p/v). Los geles de poliacrilamida fueron incubados durante 10 min en una solución de azul de Coomassie y decolorados (ácido acético 10%) hasta que las bandas de las

proteínas se observaron claramente. Las imágenes de los geles fueron digitalizadas con el *ChemiDoc™ XRS System* (BioRad Laboratories).

2.21 *Electroforesis bidimensional*

La electroforesis en dos dimensiones (2D) consiste en la separación de las proteínas mediante dos propiedades: el punto isoeléctrico (pI) y la masa molecular, por lo que se utilizó el isoelectroenfoque y la electroforesis en geles de poliacrilamida para llevar a cabo esta separación.

2.21.1 Primera dimensión o isoelectroenfoque (IEF)

Para realizar la separación en base al punto isoeléctrico de las proteínas se utilizaron tiras de pH Immobiline™ DryStrip gels (GE Healthcare). Estas tiras contienen un gradiente de pH inmovilizado en geles de poliacrilamida prefabricados sobre un soporte de plástico. La muestra fue resuspendida en el tampón de rehidratación DeStreak™ (GE Healthcare) y anfolitos al 1% con el rango de pH correspondiente a la tira a utilizar para un volumen final de 180 µL. El rango de pH de las tiras utilizadas fue el de 3 a 10 no lineal, ya que al ser un rango amplio mostró todo el proteoma de la planta para cada condición, favoreciendo de esta forma la identificación global de la respuesta de la planta. La mezcla fue servida en un soporte acanalado sobre el cual se colocó la tira, luego de haberle retirado el acrílico de protección, evitando la formación de burbujas, y se dejó incubar de 16 a 20 h a temperatura ambiente.

Una vez que las tiras fueron rehidratadas se procedió a enfocarlas en el equipo Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare). Para ello las tiras fueron colocadas en el soporte acanalado de cerámica asegurándose que las mismas se mantuvieran sumergidas en aceite mineral y con la polaridad correcta. En los extremos de cada tira se colocaron mechas de papel de filtro previamente humedecidas con agua destilada, sobre las cuales se colocaron los electrodos respectivos. El programa de corrida de IEF utilizado para las tiras de amplio rango fue el recomendado por la casa comercial: 200 V × 20 min, 450 V × 15 min, 750 V × 15 min y 2000 V × 30 min. Luego del IEF las tiras fueron almacenadas a -70 °C hasta el momento de realizar la segunda dimensión.

2.21.2 Segunda dimensión en SDS-PAGE

Previo a la segunda dimensión fue necesario equilibrar las tiras provenientes del IEF. Para ello se realizó un primer lavado de 15 min con tampón para equilibrar (Tris 150 mM pH 8.8, urea 6M, glicerol 30%, SDS 2%, y trazas de azul de bromofenol) con DTT al 1%, y luego de transcurrido este tiempo se realizó un segundo lavado con el tampón para equilibrar con iodoacetamida al 4% durante 15 min. Luego de realizados ambos lavados, la tira fue colocada en el bolsillo de un gel de poliacrilamida al 12% preparado para tal fin; se colocó 2 μ L del marcador de masa molecular y se aseguró la tira con una solución de agarosa al 0,5%. Luego de haber solidificado la agarosa, se ensambló la cámara de electroforesis y se corrió la electroforesis a 200 V durante 45 min con tampón de corrida (Tris HCl 25 mM, glicina 198 mM y SDS 0,1% p/v). Finalmente, los geles fueron revelados con una solución de tinción con plata como se describe a continuación.

2.21.3 Revelado de los geles a través de tinción con plata

Para realizar el revelado de los geles se utilizó el kit PlusOne™ Silver Staining (GE Healthcare) compatible con el procedimiento de identificación posterior por MALDI-TOF. A tal efecto se procedió a hacer una primera incubación con la solución de fijación (etanol 40%, ácido acético glacial 10%) durante 30 min, luego de la cual se incubaron los geles en la solución de sensibilización (etanol 3%, glutaraldehído 125 mM, tiosulfato de sodio 200 mM, acetato de sodio 0,82 mM) durante 30 min. Al finalizar este paso se descartó la solución y se realizaron 3 lavados de 5 min con agua bidestilada y se procedió a incubar con la solución con plata (nitrato de plata 250 mM, formaldehído 4,8 mM) durante 20 min. Luego de los cuales se descartó nuevamente la solución y se realizaron dos lavados con agua destilada durante 1 min para retirar el exceso de plata. Finalmente, se agregó a la bandeja de tinción la solución de reveladora (carbonato de sodio 0,23 mM, formaldehído 7,5 mM) manteniendo la agitación en forma continua hasta revelar todas las proteínas del gel, punto en el cual se agregó la última solución para detener el revelado (EDTA-Na \cdot 2H $_2$ O 0,039 mM). Los geles fueron fotografiados inmediatamente con el ChemiDoc™ XRS System

(BioRad Laboratories) para obtener los registros fotográficos y almacenados en bolsas plásticas sumergidos en solución EDTA-Na·2H₂O 0,039 mM a 4 °C.

2.22 *Análisis de los geles en 2 dimensiones*

El análisis de las imágenes de los geles en 2D se realizó utilizando el programa Phoretix™ 2D (versión 2004; PerkinElmer™). Las imágenes en formato TIFF fueron analizadas siguiendo el procedimiento que sugirió el fabricante del programa. En primer lugar se realizó la detección de las proteínas, luego de lo cual se procedió a agregar los patrones de referencia, como lo son la masa molecular y el punto isoeléctrico en los ejes que correspondiera. Estos valores permitieron otorgarle a cada punto un valor de coordenada para que pudieran ser identificadas y correlacionadas con los otros geles. Posteriormente se procedió con el paso de comparación de los geles; en este punto el programa comparó las imágenes analizadas y asignó correspondencia de los *spots* entre las imágenes de acuerdo a sus coordenadas. Luego de ajustado este parámetro, el programa muestra los resultados correspondientes a la intensidad de *spots*, los cuales permiten determinar cuál de ellos está sobre o sub-expresado. En función de este valor se procedió a la selección de aquellas proteínas con perfiles de expresión relevantes para el estudio y que pudieran estar implicados en la respuesta de defensa.

2.23 *Corte de los spots*

Una vez seleccionadas las proteínas que mostraban diferencias significativas en su expresión entre las diferentes condiciones se procedió a cortarlas del gel. Para ello se utilizaron puntas de pipetas, a las cuales se les cortó el extremo más delgado con una tijera de manera que el diámetro de la misma coincidiera con el tamaño del *spot*. Posteriormente, el gel fue colocado sobre un transiluminador de luz blanca y se procedió a cortar el *spot* haciendo traspasar el gel con la punta previamente preparada. Las proteínas cortadas fueron colocadas en tubos Eppendorf identificados y reservados para el paso de digestión con tripsina.

2.24 Digestión in situ de los spots

Previo a la digestión fue necesario someter a los *spots* a dos pasos de reducción y alquilación. Para ello se incubaron los *spots* con 50 μL de DTT 10 M en NH_4HCO_3 100 mM durante 30 min a 56 $^\circ\text{C}$, luego de los cuales se les fue retirado el líquido. Inmediatamente se incubaron con 50 μL de iodoacetamida 55 mM en NH_4HCO_3 100 mM durante 20 min en oscuridad a temperatura ambiente y nuevamente se les fue retirado el líquido.

Para dar inicio a la digestión trípica los *spots* fueron lavados dos veces con acetonitrilo 50% / NH_4HCO_3 100 mM por 20 min a temperatura ambiente y luego de retirar el líquido se realizó un último lavado con acetonitrilo puro durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró el líquido y se secaron al vacío y por centrifugación en el SpeedVac® (Thermo-Savant). Luego, se agregaron 15 μL de Tripsina 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ / NH_4HCO_3 20 mM y se incubaron durante 10 min hasta que el gel se hidrató nuevamente a 4 $^\circ\text{C}$, para garantizar que la enzima se incorporara a la matriz de poliacrilamida y tuviera acceso a la proteína a digerir. Al finalizar el tiempo de incubación, 16 h a 37 $^\circ\text{C}$, se retiró el exceso de enzima y se agregaron 30 μL de NH_4HCO_3 20 mM. La muestra digerida fue almacenada a -20 $^\circ\text{C}$ hasta su posterior análisis.

2.25 Obtención del mapa peptídico mediante MALDI-OTOF-MS.

El análisis por MALDI-OTOF-MS (se denomina así por sus siglas en inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (desorción/ionización láser asistida por matriz) y OTOF por el detector de iones ortogonal en tiempo de vuelo que se acopla al MALDI y cuyo nombre procede también de sus siglas en inglés *Orthogonal-Time-Of-Flight*) se realizó en un equipo prOTOF™ 2000 (PerkinElmer™). 1 μL de cada muestra se combinó con 1 μL de matriz del tipo α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA; Sigma) y se depositaron manualmente sobre una placa porta-muestras con pozos marcados de 0,1 mm de profundidad, específica para el equipo, hasta secar sobre el mesón a temperatura ambiente. Una vez que la muestra y la matriz co-cristalizado, la placa fue colocada dentro del equipo para ser analizada.

A través del software TOFworks™ (versión 1.0; Perkin Elmer) se procedió a irradiar los péptidos con pulsos de láser de nitrógeno a fin de inducir la liberación de protones de la matriz e ionizar las macromoléculas de la muestra proteica. Las moléculas, en forma de gas ionizado entran en un campo eléctrico que las acelera u dirige al detector, de acuerdo a sus masas y cargas. El patrón de picos que se obtiene al final de la corrida representa la huella peptídica que es única para cada proteína. La calibración del equipo se realizó utilizando un patrón de péptidos sintéticos del kit Maldi Standard (PerkinElmer®).

Las huellas peptídicas obtenidas fueron analizadas vía Internet utilizando el programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>).

V. RESULTADOS

1. Evaluación de la infección de *M. oryzae* en hojas de arroz inoculadas vía hisopo

Con la finalidad de evaluar el método de inoculación de *M. oryzae* a través del uso de un hisopo se evaluaron las lesiones generadas sobre las hojas de arroz transcurridos 7 dpi. Tal y como se puede observar en la fig. 6a, las plantas susceptibles mostraron una lesión típica de *M. oryzae* afectando un gran porcentaje del área foliar, el cual corresponde a la clasificación de altamente susceptible. Es importante destacar la aparición y desarrollo de lesiones a lo largo de toda la superficie foliar, siendo este el principal objetivo a lograr con este método de inoculación; mientras que la planta resistente (fig. 6b) no mostró ningún tipo de lesión. Por su parte, la planta testigo mostró infección al igual que la planta susceptible (fig. 6c). En cada una de las evaluaciones realizadas se observó una distribución uniforme de la lesión a todo lo largo de la superficie foliar, siendo este uno de los principales objetivos al usar la inoculación por hisopo. Este resultado fue reproducible en todas las repeticiones del experimento realizadas al recolectar las muestras.

2. Identificación de posibles genes de resistencia a través de la comparación de los perfiles de expresión de plantas susceptibles versus resistentes inoculadas con *M. oryzae* a través del uso de microarreglos.

Considerando que las diferencias en la respuesta de defensa entre plantas resistentes (CT13432-219) y susceptibles (CT13432-55) durante la infección por *M. oryzae* pudiera ser producto de la expresión diferencial de algunos genes de resistencia se realizó el primer diseño experimental

comparando los perfiles de expresión de ARNm totales a través del ensayo de microarreglos de plantas resistentes y susceptibles inoculadas con el patógeno. Es por ello que para este análisis se contó con una matriz de datos conformada por los resultados obtenidos de la comparación de plantas resistentes vs susceptibles ambas inoculadas a las 12, 24 y 36 hpi. Igualmente es importante señalar que para este análisis se utilizaron los arreglos versión 2.

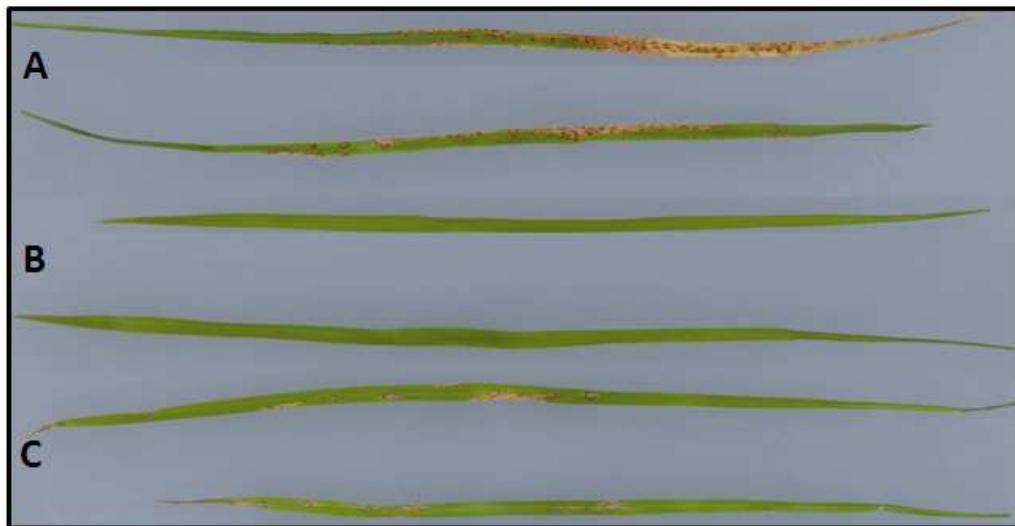


Figura 6. Lesiones generadas por infección de *Magnaporthe oryzae* sobre hojas de arroz 7 dpi por el método del hisopo. A: planta susceptible (CT13432-55). B: planta resistente (CT13432-219). C: planta testigo altamente susceptible (Fanny).

2.1. Manejo de los datos de microarreglos.

Considerando que los datos obtenidos provienen de la hibridación de dos arreglos por cada tiempo a analizar fue necesario analizar estos datos por separados con lo cual se hará referencia a ellos como arreglo A y B respectivamente. En primer lugar, con la finalidad de confirmar la calidad de las hibridaciones, a cada uno de los datos obtenidos por arreglo se les fueron verificados los valores de intensidad de los controles internos descritos previamente en los métodos, los cuales nos permiten determinar si hubo

hibridaciones inespecíficas. Este análisis mostró que las intensidades fueron similares al *background*.

A continuación fue necesaria la normalización de los datos a través del método basado en las diferencias del cociente a cada uno de los arreglos. Para cada una de ellas se obtuvo la corrección del factor de normalización, el cual se encontró en el rango entre 0,7 y 1,3, siendo este rango el recomendado por el programa Acuity®, por lo que los cambios de normalización de las gráficas en todos los casos fueron muy sutiles.

Tabla 3: Manejo de los datos de microarreglos utilizados correspondientes a la versión TIGR V3 45K array

	Arreglo A	Arreglo B
Número de <i>spots</i>	21.662	21.653
Conjunto de datos	6825	6368
Intensidad ($\geq 2 \text{ fold}$)	411	244
Presentes en todos los arreglos	210	110

Posteriormente se procedió a la construcción del conjunto de datos tal y como se mencionó en los métodos. A continuación, los resultados fueron depurados en función de la intensidad de dos veces más en valor absoluto y considerando además que el valor para cada uno de ellos estuviera presente en al menos uno de los conjuntos de datos correspondientes a cada hora de infección. En la tabla 3 se muestra como los datos que fueron considerados para el análisis luego de la construcción del conjunto de datos corresponden al 31,5 y 29,4 % respectivamente del total de *spots* incluidos en los arreglos. Cuando se analizaron esos datos a través del criterio de intensidad de ($\geq |2| \text{ fold}$) un 6 y 3,9 % de ellos respectivamente fueron resaltados, pero solo para el 50% de ellos aproximadamente se tenían todos los datos correspondientes a cada infección con lo cual fueron seleccionados como genes asociados a resistencia.

Adicionalmente se verificaron algunos genes que fueron excluidos del conjunto de datos por no mostrar diferencias significativas en sus niveles de expresión, representando controles de expresión internos del experimento,

dentro de los que destacan los genes que codifican para: ubiquitina, actina-1, hexoquinasa, glucosa 6 fosfato deshidrogenada, entre otras.

2.2. *Regulación diferencial de los genes candidatos durante la infección de M. oryzae.*

Para determinar la respuesta de la planta ante el ataque del patógeno se procedió a analizar los genes que se expresaron de forma diferencial durante la infección de *M. oryzae* a las plantas de arroz resistentes (CT13432-219) y susceptibles (CT13432-55), lo cual reveló cambios en los patrones de inducción y represión de algunos genes en el transcurso del tiempo. A las 12 hpi 73 genes mostraron una inducción en su expresión mientras que solo 10 genes fueron reprimidos en este tiempo; por su parte, durante las 24 hpi se identificaron la mayor cantidad de genes con expresión inducida con 184 y solo 8 genes reprimidos; finalmente a las 36 hpi se identificaron 149 y 9 genes con expresión inducida y reprimida respectivamente (Fig. 7).

2.3. *Análisis de clúster de los datos de microarreglos.*

A fin de detectar algún tipo de patrón de expresión diferencial entre los genes descritos anteriormente durante la infección del patógeno se procedió a analizar los datos obtenidos a través de un clúster tipo jerárquico. Un primer análisis de los patrones de expresión de los 321 genes con expresión diferencial (210 y 111 del grupo A y B, respectivamente) se muestran en la fig. 8. Este análisis reveló un cambio en los patrones de expresión de las plantas durante la infección del patógeno a lo largo del tiempo, mostrando además genes que parecen inducirse sólo en un momento determinado de la infección. Asimismo es importante destacar que el rango de expresión registrado en el clúster oscila en promedio entre -2 y 5 veces.

En vista de la gran cantidad de genes que se expresaron de forma diferencial, se procedió a hacer una pre-selección de posibles genes candidatos con la finalidad de tener una cantidad de información que fuera mucho más manejable pero a la vez representativa y así poder estudiarlos en mayor profundidad. El criterio utilizado para esta selección se basó fundamentalmente

en considerar aquellos cambios con sentido biológico y que tuvieran relación con el fenómeno en estudio como lo es la infección del patógeno y la respuesta de la planta ante dicho estrés. En este sentido fueron seleccionados un total de 86 genes, los cuales fueron analizados nuevamente a través de un clúster jerárquico utilizando el programa *MultiExperiment Viewer* (MeV, versión 4.5.1; (Saeed et al. 2006, Saeed et al. 2003).

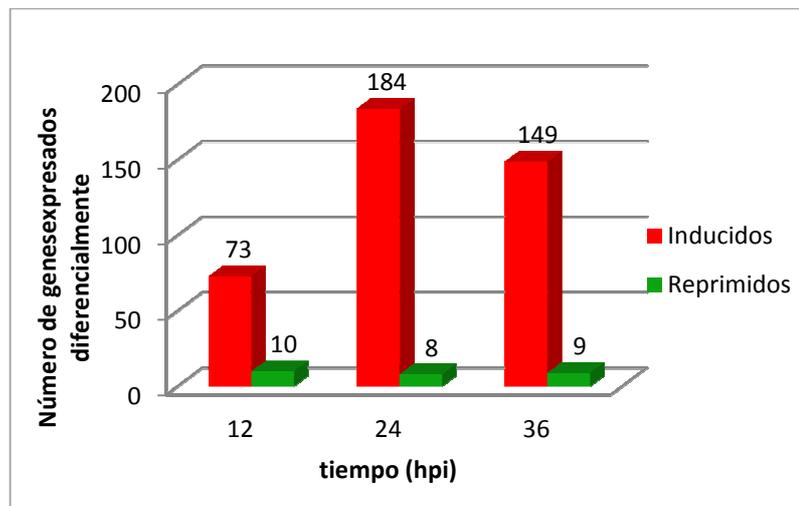


Figura 7. Expresión diferencial de los genes durante la infección de *M. oryzae* a plantas de arroz susceptible y resistente a 12, 24 y 36 hpi. La selección de los genes se hizo en base a aquellos cuyos niveles de expresión variaron en $\geq|2|$ durante al menos un punto en el tiempo analizado en respuesta a la inoculación con *M. oryzae*.

Tal y como se observa en la fig. 9, existe una clara expresión diferencial en el transcurso de la infección, mostrando la aparente activación gradual de la respuesta, definiendo de esta forma al menos tres grandes grupos de genes señalados con los corchetes. El primer grupo representa los genes que en su mayoría muestran una expresión inducida durante las primeras 12 hpi; el tercer grupo representa los genes que en su mayoría muestran expresión inducida durante las primeras 24 hpi y por último el segundo grupo representa los genes que en su mayoría muestran expresión inducida durante las 36 hpi. Sin embargo, cuando se estudia en mayor detalle cada uno de esos grupos es evidente que no todos ellos muestran un mismo patrón de expresión.

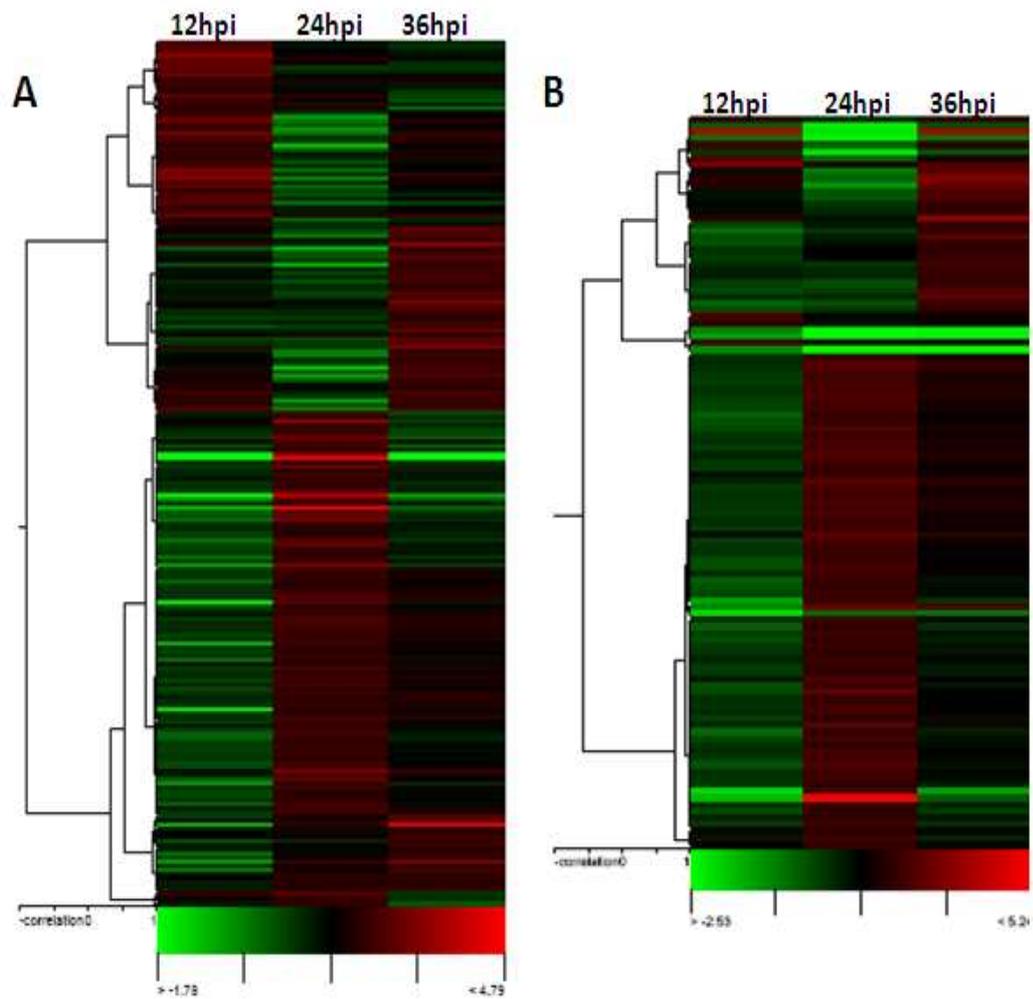


Figura 8. Análisis de clúster de los genes expresados diferencialmente en respuesta al ataque del *M. oryzae* a las plantas de arroz susceptible y resistente al hongo a las 12, 24 y 36 hpi. A: clúster obtenido del análisis de datos del arreglo A. B: clúster obtenido del análisis de datos del arreglo B. Los códigos de color son: el rojo más brillante representa inducción, el verde más brillante representa represión y el negro la misma proporción en la comparación.

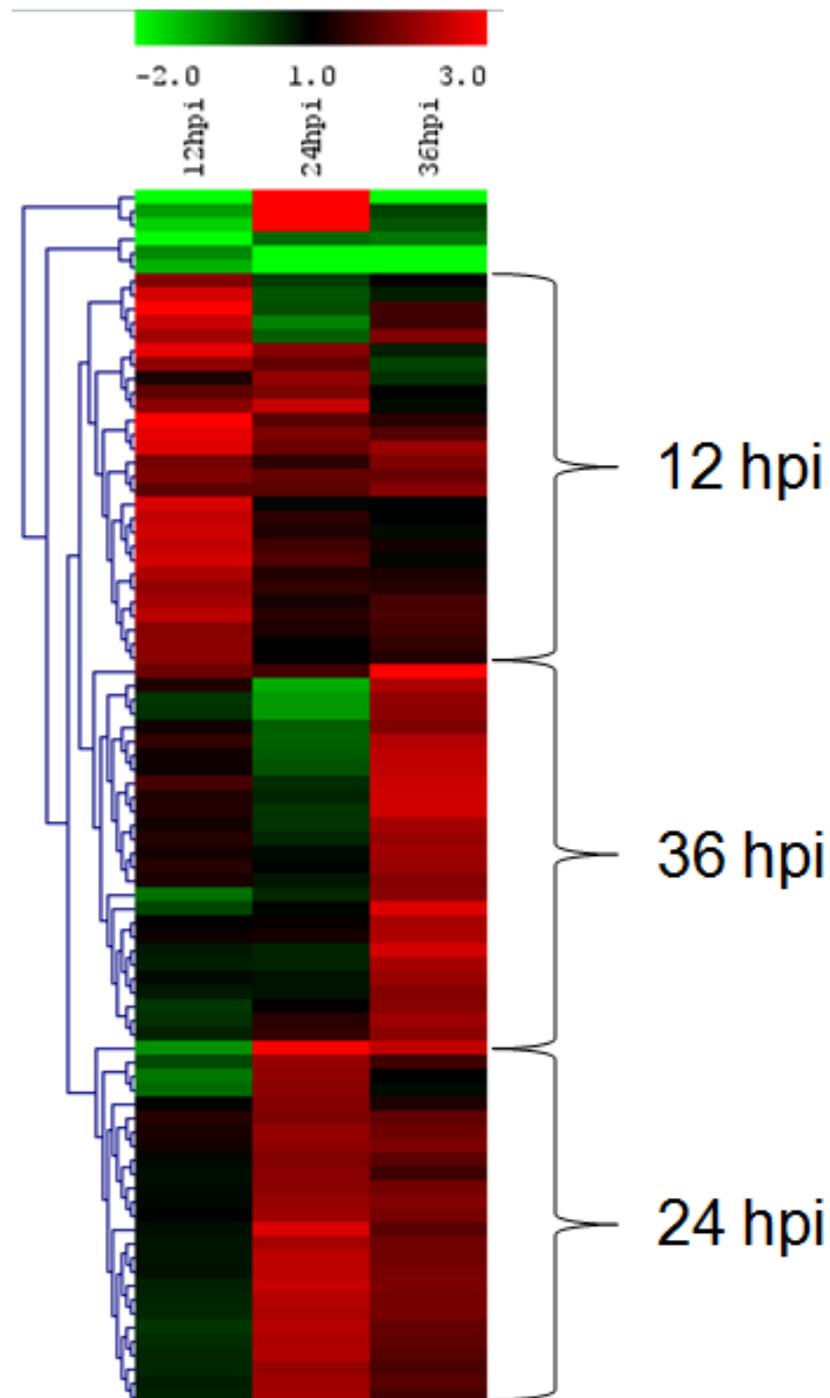


Figura 9: Análisis de clúster de los 86 genes candidatos expresados diferencialmente en respuesta al ataque del *M. oryzae* a las plantas de arroz susceptible y resistente al hongo a las 12, 24 y 36 hpi. Las barras verticales muestran los tres grandes grupos formados asociados a la respuesta temporal. Los códigos de color son: el rojo más brillante representa inducción, el verde más brillante representa represión y el negro la misma proporción en la comparación.

Es por ello que se procedió a realizar un análisis de tipo clúster jerárquico (*k-means*) a los perfiles de expresión de los 86 genes. Este método permitió analizar los grupos de genes que se formaban de acuerdo a su similitud en los patrones de expresión. La selección del número de clústeres a formar se basó en la cantidad de ramas que mostró el resultado obtenido en la fig. 9, donde al menos pueden distinguirse 10 grupos de genes relacionados representando cada uno de ellos diferentes patrones de expresión.

Aunque los 10 clúster están muy bien definidos (ver fig.10), algunos de ellos muestran cambios similares en el tiempo. Los clústeres 1 (18 genes), 2 (7 genes) y 3 (3 genes) muestran una disminución en la expresión a las 24 hpi, sin embargo esta aumenta a las 36 hpi. Los clústeres 4 (3 genes), 8 (5 genes), 9 (22 genes) y 10 (4 genes) mostraron un incremento en su expresión a las 24 hpi la cual decae a las 36 hpi, aunque en el clúster 4 estos cambios en la expresión se observan mucho más marcados. Por otro lado, los clústeres 5 (14 genes) y 7 (5 genes) muestran un incremento gradual a medida que progresa la infección. Por último, el clúster 6 (6 genes) muestra un perfil de expresión único, donde los genes se mantienen inducidos durante todo el tiempo en estudio y no se observan cambios significativos. Como breve descripción de casa uno de los clústeres tenemos:

1. Clúster 1: en este clúster los genes se encuentran inducidos a las 12 hpi pero luego de este tiempo la expresión disminuye manteniéndose prácticamente constante entre las 24 y 36 hpi. Siendo este grupo tan amplio muestra también una gran diversidad en las funciones de los genes que lo conforman, resaltando la presencia de dos genes que codifican para proteínas tipo MAPKK, el gen que codifica para el factor de transcripción WRKY21, y el gen que codifica para la proteína CMPG1, así como también 5 genes que codifican para proteínas desconocidas.

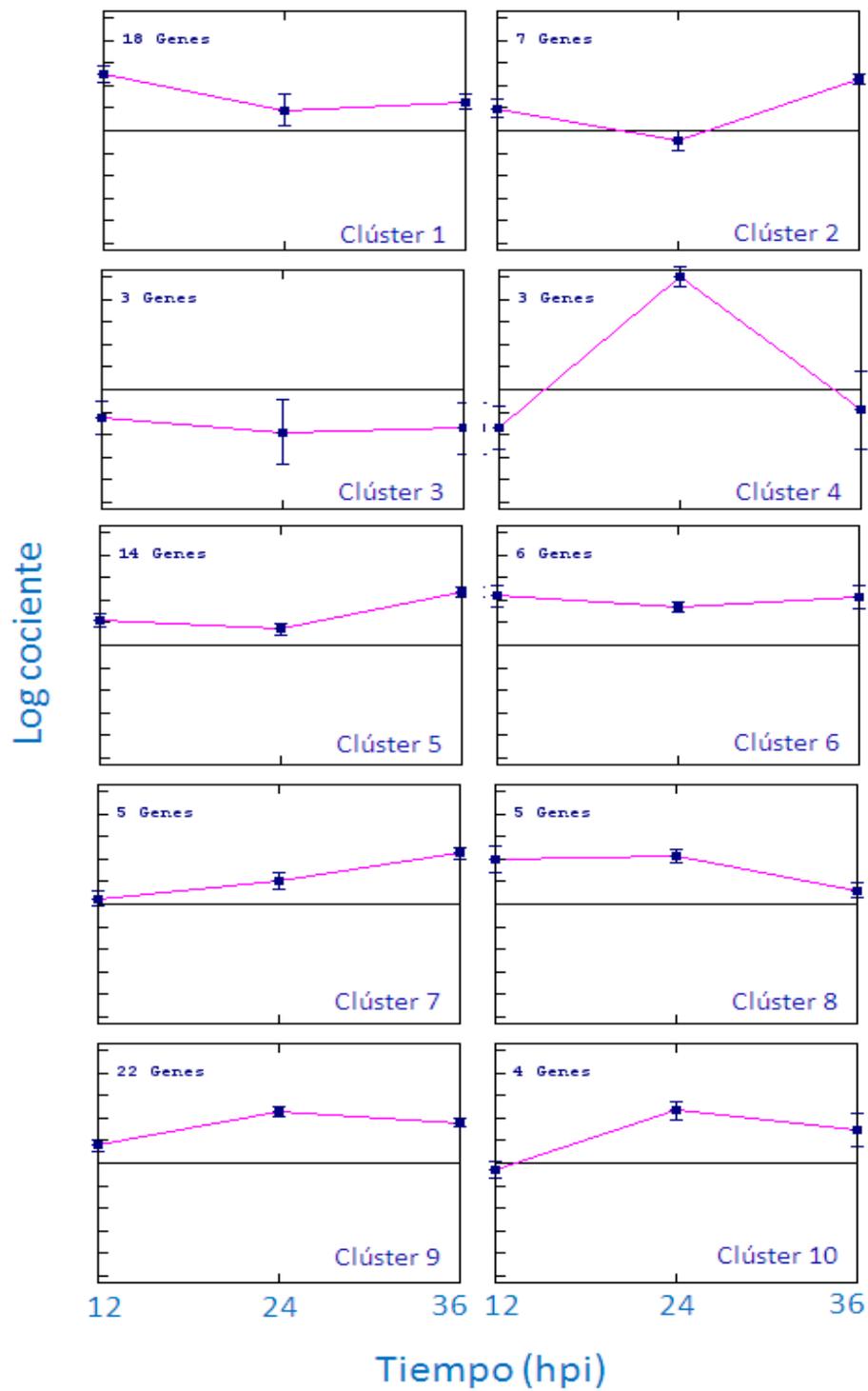


Figura 10. Clúster jerárquico (k-means) de los perfiles de expresión de los 87 genes candidatos expresados diferencialmente en respuesta al ataque del *M. oryzae* a las plantas de arroz susceptible y resistente al hongo a las 12, 24 y 36 hpi.

2. Clúster 2: los genes que se encuentran agrupados en este clúster muestran una ligera represión entre las 12 y 24 hpi, mostrando luego una fuerte inducción a las 36 hpi. Dentro de este grupo resalta la presencia de los genes que codifican para una proteína tipo pirin y para una proteína con un dominio tipo C3HC4.
3. Clúster 3: este grupo conformado por 3 genes, muestra una represión a lo largo del tiempo en estudio. Los genes que se encuentran en este grupo codifican para el citocromo P450, la proteína ribosomal 30S y adicionalmente para una proteína hipotética de función desconocida.
4. Clúster 4: este grupo conformado por 3 genes al igual que el anterior, muestra una inducción a las 24 hpi, la cual vuelve a disminuir a las 36 hpi. Aquí se incluyen a un gen que codifica para una metiltransferasa putativa además de dos proteínas desconocidas.
5. Clúster 5: los genes que se encuentran en ese grupo mantienen una ligera inducción tanto a las 12 como a las 24 hpi, la cual se hace más marcada a las 36 hpi. En este amplio grupo (14 genes) destaca la presencia de dos genes que codifican para proteínas quinasas dependientes de calcio, un gen que codifica para OsIAA25 quien responde a auxinas, además de 6 genes que codifican para proteínas desconocidas.
6. Clúster 6: dentro de este clúster se encuentran los genes que muestran una inducción continua durante todo el tiempo en estudio. Aquí encontramos el gen que codifica OsIAA2 quien responde a auxinas, el gen que codifica la proteína CMPG1, además de tres genes que codifican para proteínas desconocidas.
7. Clúster 7: este grupo conformado por 5 genes muestra una inducción de la expresión a medida que transcurre la infección. En este grupo encontramos un gen que codifica para una proteína rica en glicina de función desconocida, así como también un gen que codifica para una proteína *pirin* putativa.

8. Clúster 8: en este clúster encontramos 5 genes, los cuales se encuentran inducidos durante las 12 y 24 hpi, pero la inducción desaparece para las 36 hpi. En este grupo encontramos un gen que codifica para un factor de transcripción de la familia MYB y 3 proteínas desconocidas.
9. Clúster 9: este grupo es el más amplio ya que posee 22 genes, los cuales muestran una inducción a las 24 hpi, que luego disminuye ligeramente a las 36 hpi. Los genes que destacan en este grupo son: uno que codifica para un factor de transcripción de tipo WRKY, una proteína del tipo MAKKK, el precursor de un inhibidor de una cistein-proteasa, la proteína OsRR1 y la proteína de resistencia a enfermedades RGA41. Adicionalmente se encuentran 8 genes que codifican para proteínas desconocidas.
10. Clúster 10: este clúster está conformado por 4 genes cuya expresión para las 12 hpi se encontraba ligeramente reprimida y posteriormente aumenta significativamente a partir de las 24 hpi. En este grupo destaca la presencia del gen que codifica para la proteína PR1 y el que codifica para la proteína *dirigent*.

2.4. Análisis de ontología de los genes seleccionados.

A partir de la identificación TIGR de cada uno de los genes seleccionados se procedió a utilizar la base de datos donde se encuentra depositada toda la información del genoma de arroz (*Rice Genome Annotation Project Overview*, <http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>; Ouyang et al. 2007) con la finalidad de ubicar la ontología de cada uno de ellos. Según *The Gene Ontology Consortium* (2008) la ontología provee una descripción de los atributos de los genes y sus productos al otorgarles una clasificación dentro de los 3 dominios que comparten todos los seres vivos, como son: función molecular, componente celular y proceso biológico en el que participa. En este sentido, para llevar a cabo el análisis funcional de todos y cada uno de los genes seleccionados se utilizó la clasificación de proceso biológico en el que participa para hacer dicha descripción.

Tabla 4: Genes asociados a resistencia con una respuesta diferencial durante los tiempos post inoculación estudiados en respuesta al ataque del *M. oryzae* en plantas de arroz susceptible y resistente inoculadas con el hongo.

Identificación TIGR	Locus	Clúster	Nombre del producto del gen	Ontología
TR030613	LOC_Os01g09080	9	<i>WRKY DNA-binding domain containing protein, expressed</i>	Factor de transcripción
TR030637	LOC_Os01g09420	9	<i>Expressed protein</i>	Desconocida
TR031595	LOC_Os01g24710	2	<i>Jacalin-like lectin domain containing protein, expressed</i>	Respuesta a estrés
TR031668	LOC_Os01g25920	4	<i>Expressed protein</i>	Desconocida
TR032688	LOC_Os01g43410	5	<i>CAMK_CAMK_like.9, expressed</i>	Transductor de señal
TR033114	LOC_Os01g49470	5	<i>E3 ubiquitin ligase, putative, expressed</i>	Transductor de señal
TR033186	LOC_Os01g50370	5	<i>CAMK_CAMK_like.9, expressed</i>	Transductor de señal
TR033189	LOC_Os01g50410	1	<i>STE11_MAP3K.6, expressed</i>	Transductor de señal
TR033190	LOC_Os01g50420	1	<i>STE_MAP3K.7, expressed</i>	Transductor de señal
TR033660	LOC_Os01g56240	6	<i>OsSAUR2 - Auxin-responsive SAUR gene family member, expressed</i>	Desconocida
TR033674	LOC_Os01g56420	9	<i>Ctr copper transporter family protein, putative, expressed</i>	Transporte
TR034005	LOC_Os01g60640	1	<i>OsWRKY21 - Superfamily of rice TFs having WRKY and zinc finger domains, expressed</i>	Factor de Transcripción
TR034276	LOC_Os01g64200	1	<i>Transposon protein, putative, unclassified</i>	Desconocida
TR035054	LOC_Os01g74040	6	<i>Zinc finger, RING-type, putative, expressed</i>	Transductor de señal
TR035439	LOC_Os02g05320	2	<i>Phosphatidate cytidyltransferase family protein, putative, expressed</i>	Metabolismo
TR035515	LOC_Os02g06330	6	<i>AP2 domain containing protein, expressed</i>	Factor de Transcripción
TR037194	LOC_Os02g32814	5	<i>Heavy metal-associated domain containing protein, expressed</i>	Respuesta a estrés
TR037735	LOC_Os02g40540	1	<i>Hypothetical protein</i>	Desconocida
TR037771	LOC_Os02g41510	8	<i>MYB family transcription factor, putative, expressed</i>	Factor de Transcripción
TR038134	LOC_Os02g46210	1	<i>DUF581 domain containing protein, expressed</i>	Desconocida
TR038233	LOC_Os02g47470	1	<i>Cytochrome P450, putative, expressed</i>	Metabolismo
TR038484	LOC_Os02g50600	1	<i>Glycosyl transferase 8 domain containing protein, putative, expressed</i>	Metabolismo
TR038613	LOC_Os02g52170	8	<i>Expressed protein</i>	Desconocida
TR038686	LOC_Os02g53030	9	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1, putative, expressed</i>	Factor de transcripción

Tabla 4 (cont.): Genes asociados a resistencia con una respuesta diferencial durante los tiempos post inoculación estudiados en respuesta al ataque del *M. oryzae* en plantas de arroz susceptible y resistente inoculadas con el hongo.

Identificación TIGR	Locus	Clúster	Nombre del producto del gen	Ontología
TR038862	LOC_Os02g55060	9	<i>Cytochrome Heme/Steroid domain containing protein, expressed</i>	Desconocida
TR039944	LOC_Os03g11040	9	<i>Cyclin, putative, expressed</i>	Ciclo celular
TR039952	LOC_Os03g11160	9	<i>Cysteine proteinase inhibitor precursor, putative</i>	Metabolismo
TR040178	LOC_Os03g13740	6	<i>Immediate-early fungal elicitor protein CMPG1, putative, expressed</i>	Respuesta a estrés
TR040275	LOC_Os03g14915	8	<i>Expressed protein</i>	Desconocida
TR040403	LOC_Os03g16600	6	<i>Expressed protein</i>	Desconocida
TR040541	LOC_Os03g18130	8	<i>Asparagine synthetase, putative, expressed</i>	Metabolismo
TR040543	LOC_Os03g18150	1	<i>Protein phosphatase 2C, putative, expressed</i>	Respuesta a estrés
TR040586	LOC_Os03g18620	1	<i>PPR repeat domain containing protein, putative, expressed</i>	Traducción
TR040603	LOC_Os03g18850	10	<i>Pathogenesis-related Bet v I family protein, putative, expressed</i>	Respuesta a estrés
TR040682	LOC_Os03g19760	9	<i>HAD-superfamily hydrolase, subfamily IA, variant 3 containing protein, expressed</i>	Metabolismo
TR041285	LOC_Os03g28300	1	<i>Protein kinase domain containing protein, expressed</i>	Transductor de señal
TR041714	LOC_Os03g37170	5	<i>Hypothetical protein</i>	Desconocida
TR041843	LOC_Os03g39040	9	<i>Zinc knuckle family protein, expressed</i>	Desconocida
TR042768	LOC_Os03g51410	6	<i>Hypothetical protein</i>	Desconocida
TR042852	LOC_Os03g52410	1	<i>Expressed protein</i>	Desconocida
TR043095	LOC_Os03g55770	8	<i>Expressed protein</i>	Desconocida
TR043515	LOC_Os03g60810	9	<i>Lectin-like receptor kinase, putative, expressed</i>	Respuesta a estrés
TR043675	LOC_Os03g62790	2	<i>Pirin-like protein, putative, expressed</i>	Transductor de señal
TR043827	LOC_Os04g01330	1	<i>Expressed protein</i>	Desconocida
TR044264	LOC_Os04g09604	4	<i>O-methyltransferase, putative, expressed</i>	Metabolismo
TR045740	LOC_Os04g36070	9	<i>OsRR1 type-A response regulator, expressed</i>	Respuesta a estrés
TR045779	LOC_Os04g37540	9	<i>Expressed protein</i>	Desconocida
TR046355	LOC_Os04g44870	2	<i>C2 domain containing protein, putative, expressed</i>	Respuesta a estrés
TR046540	LOC_Os04g47140	2	<i>Expressed protein</i>	Desconocida
TR046726	LOC_Os04g49530	5	<i>Expressed protein</i>	Desconocida
TR047790	LOC_Os07g04930	2	<i>Retrotransposon protein, putative, expressed</i>	Desconocida

Tabla 4 (cont.): Genes asociados a resistencia con una respuesta diferencial durante los tiempos post inoculación estudiados en respuesta al ataque del *M. oryzae* en plantas de arroz susceptible y resistente inoculadas con el hongo.

Identificación TIGR	Locus	Clúster	Nombre del producto del gen	Ontología
TR049526	LOC_Os07g35340	5	<i>DUF26 kinases, expressed</i>	Respuesta a estrés
TR049740	LOC_Os07g38170	1	<i>Remorin, putative, expressed</i>	Respuesta a estrés
TR049821	LOC_Os07g39220	1	<i>BES1/BZR1 homolog protein, putative, expressed</i>	Factor de transcripción
TR050372	LOC_Os07g46440	5	<i>Ribosomal protein, putative, expressed</i>	Traducción
TR050699	LOC_Os08g01780	5	<i>OsIAA25 - Auxin-responsive Aux/IAA gene family member, expressed</i>	Respuesta a estrés
TR052718	LOC_Os08g35070	10	<i>Protein binding protein, putative</i>	Desconocida
TR052787	LOC_Os08g36090	5	<i>Conserved hypothetical protein</i>	Desconocida
TR053039	LOC_Os08g39430	7	<i>Thylakoid lumenal 19 kDa protein, putative</i>	Fotosíntesis
TR053089	LOC_Os08g40130	7	<i>Heavy metal-associated domain containing protein</i>	Desconocida
TR053143	LOC_Os08g40850	7	<i>Mitochondrial carrier protein, putative, expressed</i>	Fotosíntesis
TR053176	LOC_Os08g41280	5	<i>Membrane protein, putative, expressed</i>	Transductor de señal
TR053195	LOC_Os08g41520	2	<i>Zinc finger, C3HC4 type domain containing protein, expressed</i>	Transductor de señal
TR053633	LOC_Os10g03550	5	<i>Expressed protein</i>	Desconocida
TR054865	LOC_Os10g28700	5	<i>Expressed protein</i>	Desconocida
TR056941	LOC_Os06g13870	1	<i>U-box protein CMPG1, putative, expressed</i>	Respuesta a estrés
TR058908	LOC_Os06g48190	9	<i>Expressed protein</i>	Desconocida
TR059978	LOC_Os09g17610	9	<i>RING finger protein, putative, expressed</i>	Transductor de señal
TR060071	LOC_Os09g19340	9	<i>Conserved hypothetical protein</i>	Desconocida
TR060209	LOC_Os09g21340	9	<i>Nucleobase-ascorbate transporter, putative, expressed</i>	Transporte
TR060238	LOC_Os09g21710	9	<i>AN1-like zinc finger domain containing protein, expressed</i>	Respuesta a estrés
TR060847	LOC_Os09g31120	7	<i>Pirin, putative, expressed</i>	Transductor de señal
TR060854	LOC_Os03g11160	1	<i>Cysteine proteinase inhibitor precursor, putative</i>	Respuesta a estrés
TR061232	LOC_Os09g37770	9	<i>Hypothetical protein</i>	Desconocida
TR061622	LOC_Os05g03620	1	<i>TKL_IRAK_CR4L.4 - The CR4L subfamily has homology with Crinkly4, expressed</i>	Transductor de señal
TR062107	LOC_Os05g11200	9	<i>Hypothetical protein</i>	Desconocida

Tabla 4 (cont.): Genes asociados a resistencia con una respuesta diferencial durante los tiempos post inoculación estudiados en respuesta al ataque del *M. oryzae* en plantas de arroz susceptible y resistente inoculadas con el hongo.

Identificación TIGR	Locus	Clúster	Nombre del producto del gen	Ontología
TR063037	LOC_Os05g30500	10	<i>Expressed protein</i>	Desconocida
TR063115	LOC_Os05g31570	9	<i>Disease resistance protein RGA4, putative, expressed</i>	Respuesta a estrés
TR065984	LOC_Os12g26220	4	<i>Expressed protein</i>	Desconocida
TR067374	LOC_Os11g04710	3	<i>Cytochrome P450, putative, expressed</i>	Metabolismo
TR067609	LOC_Os11g07670	10	<i>Dirigent, putative, expressed</i>	Respuesta a estrés
TR070784	LOC_Os02g50960	9	<i>Auxin efflux carrier component, putative, expressed</i>	Transporte
TR071345	LOC_Os10g21348	3	<i>Hypothetical protein</i>	Desconocida
TR071346	LOC_Os10g21346	3	<i>Chloroplast 30S ribosomal protein S3, putative, expressed</i>	Traducción
TR072621	LOC_Os05g02780	7	<i>Glycine-rich protein A3, putative, expressed</i>	Desconocida

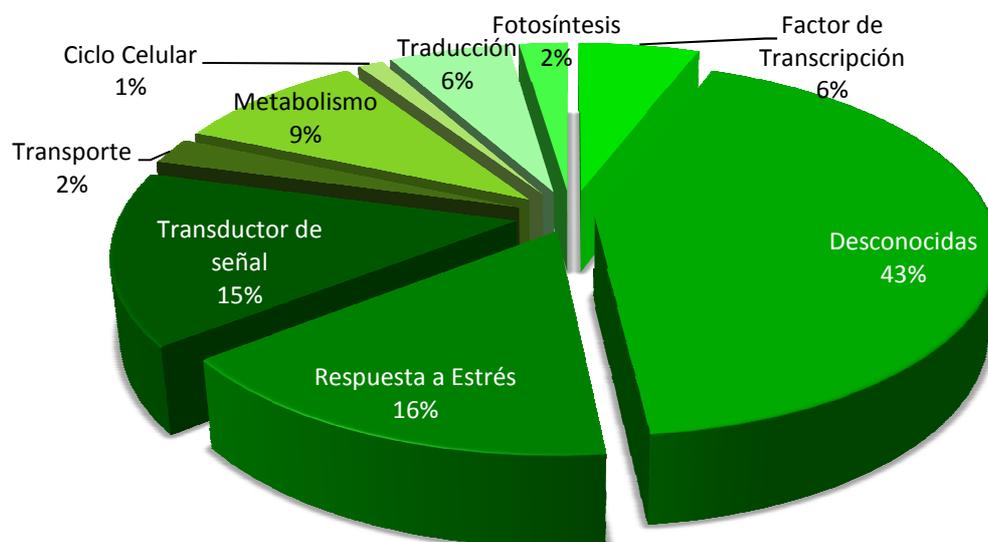


Figura 11. Distribución por categorías funcionales de los genes candidatos identificados al comparar los perfiles de expresión de plantas resistentes vs susceptibles inoculadas con *M. oryzae*. Los porcentajes de cada categoría se muestran en la gráfica.

En la tabla 4 se muestra la ontología funcional de cada uno de los genes, identificándose al menos 9 procesos cuyos componentes ven alterada su expresión durante la infección como son: fotosíntesis, factor de transcripción,

ciclo celular, traducción, transductor de señal, metabolismo, transporte, respuesta a estrés y finalmente un grupo de genes cuya función es desconocida. Este último grupo posee el 43% de los genes candidatos tal y como se puede observar en la fig. 11. Asimismo, los dos siguientes grupos mayormente representados son respuesta a estrés y transducción de señales con 16 y 15% respectivamente. El grupo metabolismo presenta un 9 % mientras que los factores de transcripción y traducción presentan un 6% cada uno. Finalmente, los procesos que se encuentran en menor proporción son transporte y fotosíntesis con un 2% cada uno y ciclo celular con solo 1%.

2.5. Validación de los resultados de microarreglos a través de RT-PCR

Con la finalidad de confirmar la expresión diferencial de los 87 genes candidatos asociados a resistencia diferencialmente en respuesta al ataque de *M. oryzae* a las 12, 24 y 36 hpi identificados a través de los microarreglos se procedió a realizar un análisis de RT-PCR semi-cuantitativa cuyos resultados se muestran en la fig. 12. La selección de los genes a ser sometidos a verificación se basó en la consideración de al menos un representante de cada uno de los clústeres identificados, seleccionando así un total de 26 genes (tabla 2) de los cuales solo para 11 de ellos fue posible su estandarización para la obtención de un producto de amplificación con el tamaño esperado. Aquellos genes donde no fue posible su estandarización fueron retirados del análisis, siendo el gen que codifica para una *expressed protein* (TR65984) un ejemplo de esto (fig. 12).

En este punto es importante recordar que el resultado obtenido a partir del experimento de microarreglos es relativo, ya que deriva de la comparación de abundancia de ARNm entre dos muestras, siendo en este caso las plantas resistentes y susceptibles inoculadas con el patógeno. Por otra parte, el resultado que se obtiene a partir de la RT-PCR representa en valor absoluto la expresión de cada gen ya que depende única y exclusivamente de la transcripción reversa y posterior amplificación de los ARNm de cada muestra por separado. Es por ello que a la hora de analizar los resultados de la RT-PCR como validación de los experimentos de microarreglos es necesario correlacionar los resultados obtenidos de las plantas resistentes y susceptibles inoculadas con el hongo.



Figura 12. RT-PCR para verificar los patrones de expresión diferencial de algunos de los genes seleccionados a partir de los resultados obtenidos de los microarreglos. El tiempo en estudio fueron las 12, 24 y 36 hpi. El gen de ubiquina fue usado como referencia interna para calcular la abundancia relativa de los transcritos (Os03g13170; (Jung et al. 2005). Los códigos de color son: el rojo más brillante representa inducción, el verde más brillante representa represión y el negro la misma proporción en la comparación.

Con base en lo anteriormente expuesto los resultados pudieron ser organizados en tres grupos; el primero de ellos corresponde con aquellos genes cuya cuantificación en la expresión por RT-PCR coincidió con la obtenida a través del experimento de microarreglos y estos son: *Expressed protein* (TR043095), *Cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain containing* (TR038862), *Immediate-early fungal elicitor protein CMPG1* (TR040178), *Dirigent* (TR067609) y *OsSAUR2 - Auxin-responsive SAUR gene family member* (TR033660); el segundo grupo incluye aquellos genes cuya cuantificación en la expresión por RT-PCR coincidió en al menos dos tiempos con la obtenida a través del experimento de microarreglos e incluyen los genes: *Expressed protein* (TR046726), *Glycine-rich protein A3* (TR072621), *PPR repeat domain containing protein* (TR040586) y *Zinc finger, RING-type* (TR035054); y finalmente el tercer grupo incluye a los genes cuya cuantificación en la expresión coincidió en al menos un tiempo: *Membrane protein* (TR053176) y *Pathogenesis-related Bet v I family protein* (TR040603). En este sentido es importante destacar que en ninguno de los genes estudiados se encontró una cuantificación de su expresión

por RT-PCR que no coincidiera con los resultados obtenidos en el experimento de microarreglos.

3. Identificación de posibles genes de resistencia a través de la comparación de los perfiles de expresión ARNm en plantas susceptibles y resistentes inoculadas con el patógeno versus las plantas sin inocular a través del uso de microarreglos.

Considerando que la activación de la expresión de los genes de defensa responde a la presión que ejerce la presencia del hongo y que dicha respuesta debe ser diferencial entre las plantas resistentes (CT13432-219) y susceptibles (CT13432-55) se realizó el segundo diseño experimental, el cual se basó en la comparación de los perfiles de expresión de ARNm totales de plantas inoculadas con *M. oryzae* contra plantas sin inocular. En ese sentido se contó con una matriz de datos conformada por los resultados obtenidos de la comparación de plantas resistentes y susceptibles inoculadas vs sin inocular a las 12, 24 y 36 hpi. Asimismo es importante señalar que para este análisis se utilizaron los arreglos versión 1, inicialmente descritos en materiales y métodos.

3.1. Manejo de los datos de microarreglos.

Al igual que en el experimento anterior fue necesario confirmar la calidad de las hibridaciones, por lo que a cada uno de los datos obtenidos por arreglo se les verificó los valores de intensidad de los controles internos descritos previamente en los métodos. Este análisis mostró que las intensidades fueron similares al *background*.

A continuación fue necesaria la normalización de los datos a través del método basado en las diferencias del cociente de cada uno de los arreglos. Para todos los arreglos hibridados se obtuvo la corrección del factor de normalización, el cual se encontró en el rango entre 0,7 y 1,3, excepto para la muestra susceptible inoculada 12 hpi, cuyos valores se salieron del rango, razón por la cual estos resultados no fueron considerados en el análisis. En este sentido, y

para facilitar la comparación, se decidió retirar igualmente del análisis los resultados obtenidos para plantas resistentes inoculadas 12 hpi.

A partir del conjunto de datos, se filtraron los resultados en función de dos veces más la intensidad, en valor absoluto, sobre el control y considerando además que el valor para cada uno de ellos estuviera presente en al menos uno de los conjuntos de datos correspondientes a cada hora de infección. En la tabla 5 se muestra como el conjunto de datos tomados en consideración para el análisis corresponden al 57,1% del total de *spots* incluidos en los arreglos. Cuando se analizaron los datos a través del criterio de intensidad de ($\geq|2| \text{ fold}$) se identificó un 50,4% de genes, pero sólo para el 5,8% de ellos se tenían todos los datos correspondientes a cada infección con lo cual fueron seleccionados como potenciales genes candidatos.

Tabla 5: Manejo de los datos de microarreglos utilizados correspondientes a la versión TIGR V2 20K array.

	Arreglo C
Número de <i>spots</i>	20.231
Conjunto de datos	11.552
Intensidad ($\geq 2 \text{ fold}$)	5824
Presentes en todos los arreglos	339

Para este caso también fueron analizados un conjunto de genes considerados controles internos de expresión, como por ejemplo los genes que codifican para ubiquitina, actina-1, hexoquinasa, glucosa 6 fosfato deshidrogenada, entre otras, corroborándose que la expresión no se ve afectada de forma significativa por efecto del *background* genético ni por el patógeno

3.2. Regulación diferencial de los genes candidatos durante la infección de M. oryzae.

Con la finalidad de determinar la respuesta de la planta durante la infección por el patógeno se procedió a analizar los genes que se expresaron de forma diferencial durante la infección de *M. oryzae* a las plantas de arroz

resistentes (CT13432-219) y susceptibles (CT13432-55) al ser comparadas con un control sin inocular. En la fig.13a se muestra la expresión diferencial de los genes en las plantas susceptibles inoculadas; registrándose para las 24 hpi la cantidad de 242 genes inducidos, mientras que solo 28 mostraron una expresión reprimida; sin embargo, para las 36 hpi la cantidad de genes inducidos bajó a 11 mientras la cantidad de genes cuya expresión se encuentra reprimida aumenta levemente a 35; los resultados para 12 hpi no fueron incluidos por lo expuesto anteriormente. Por su parte, en la fig. 13b se muestra la expresión diferencial de los genes en las plantas resistentes; a las 24 hpi se registraron 126 genes sobre-expresados y 69 reprimidos; finalmente, a las 36 hpi se registró una disminución considerable en la cantidad de genes inducidos hasta 27, mientras que se observó un incremento en cantidad de genes reprimidos a 253. Los resultados de las 12 hpi no fueron incluidos para facilitar la comparación y análisis, como ya fue explicado.

3.3. *Análisis de clúster de los datos de microarreglos.*

Con la finalidad de determinar la presencia de algún tipo de patrón de expresión diferencial entre los genes descritos anteriormente durante la infección del patógeno se procedió a analizar los datos obtenidos a partir del experimento de microarreglos a través de un clúster tipo jerárquico. Un primer análisis de los patrones de expresión de los 339 genes con expresión diferencial se muestra en la fig. 14.

En este clúster se muestran los resultados de las expresiones diferenciales obtenidas para cada gen en las plantas tanto resistentes como susceptibles en el tiempo. Tal y como se observa en la fig. 14, la mayoría de los genes presentan cambios significativos en el transcurso del tiempo e incluso entre las plantas susceptibles y resistentes, sin embargo, por la densidad de información fue necesario reducir la cantidad de genes a un número mucho más manejable. De esta manera se seleccionaron aquellos genes que mostraron cambios significativos en el tiempo y entre ambos fenotipos y que permitían ser asociados a la respuesta de la planta durante la infección del patógeno. En este sentido fueron seleccionados un total de 100 genes, los cuales fueron analizados

nuevamente a través de un clúster utilizando el programa *MultiExperiment Viewer* (MeV, versión 4.5.1; Saeed et al. 2006, Saeed et al. 2003.; ver fig. 15).

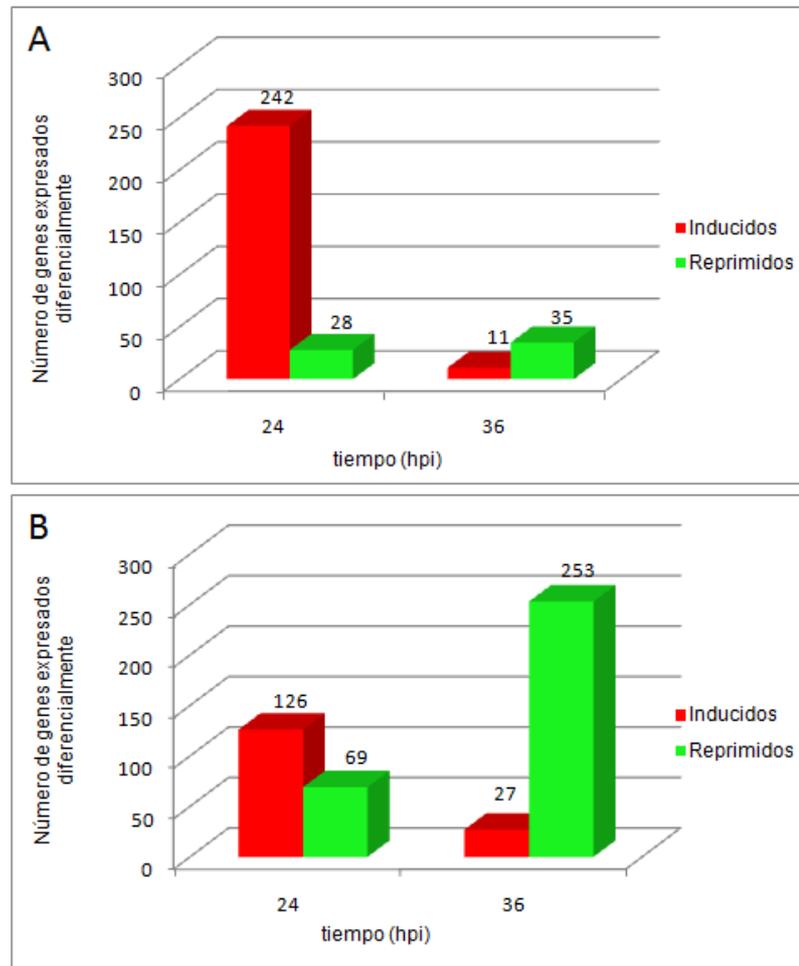


Figura 13. Expresión diferencial de los genes durante la infección de *M. oryzae* a plantas de arroz susceptible y resistente a 24 y 36 hpi. A: plantas susceptibles. B: plantas resistentes. La selección de los genes se hizo en base a aquellos cuyos niveles de expresión variaron en $\geq|2|$ durante al menos un punto en el tiempo analizado en respuesta a la inoculación con *M. oryzae*.

En los resultados mostrados en la fig. 15 se observan los cambios en la expresión global de los genes seleccionados como respuesta de la planta ante el ataque del patógeno tanto para las plantas resistentes como en las susceptibles, destacando que a pesar de que las plantas son isóneas, la respuesta en el

tiempo es diferente. En ese sentido resaltan los nodos a, b, c y d (ver fig.15, cuyos genes muestran una marcada diferencia en los niveles de expresión.

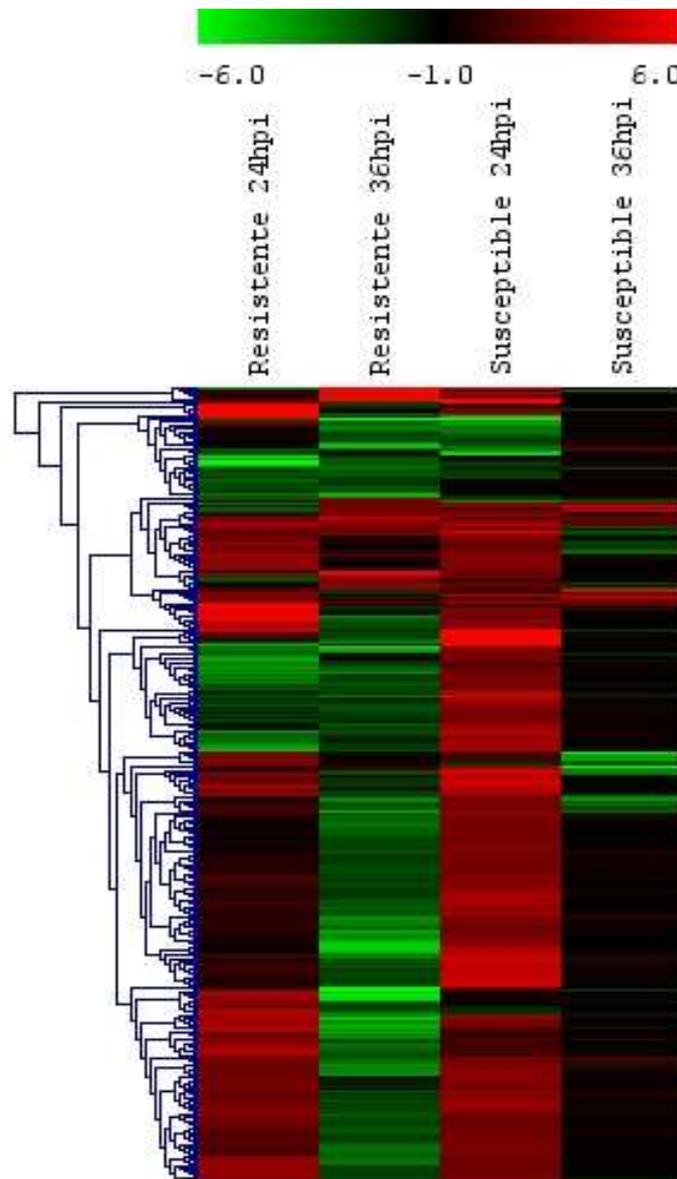


Figura 14. Análisis de clúster de los genes expresados diferencialmente en respuesta al ataque del *M. oryzae* a las plantas de arroz susceptible y resistente inoculadas 24 y 36 hpi. Los códigos de color son: el rojo más brillante representa inducción, el verde más brillante representa represión y el negro la misma proporción en la comparación.

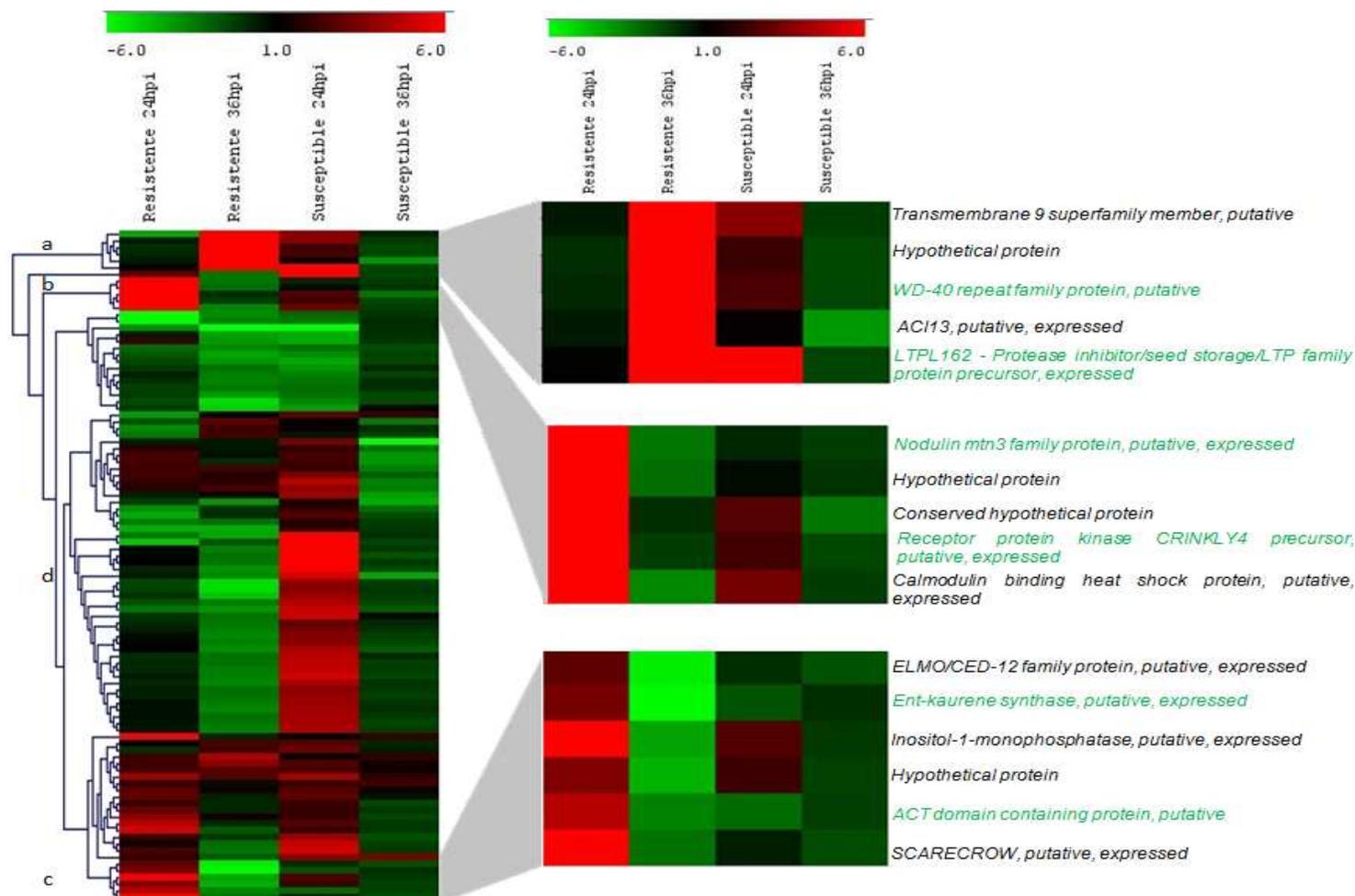


Figura 15. Análisis de clúster de los 100 genes candidatos expresados diferencialmente en respuesta al ataque del *M. oryzae* a las plantas de arroz resistente y susceptible al hongo a las 12, 24 y 36 hpi. Los nodos a, b y c fueron ampliados del lado derecho para ver en más detalle la expresión. El nodo d incluye los genes cuya expresión se muestran inducidas en el susceptible a las 24 hpi. Los códigos de color son: el rojo más brillante representa inducción, el verde más brillante representa represión y el negro la misma proporción en la comparación.

Tabla 6: Genes asociados a resistencia con una respuesta diferencial durante los tiempos post inoculación estudiados en respuesta al ataque de *M. oryzae* en plantas de arroz susceptibles y resistentes inoculadas versus plantas sin inocular a 12, 24 y 36 hpi.

Identificación TIGR	Locus	Nombre del producto del gen	Ontología
TR000284	LOC_Os01g05694	<i>Expressed protein</i>	Desconocida
TR000288	LOC_Os01g05790	<i>SLT1 protein, putative, expressed</i>	Desconocida
TR000590	LOC_Os01g11054	<i>Phosphoenolpyruvate carboxylase, putative, expressed</i>	Metabolismo
TR000686	LOC_Os01g12710	<i>Oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase, expressed</i>	Metabolismo
TR000704	LOC_Os01g12900	<i>Ras-related protein, putative, expressed</i>	Desconocida
TR000853	LOC_Os01g15490	<i>Phosphoadenosine phosphosulfate, putative, expressed</i>	Metabolismo
TR000967	LOC_Os01g18220	<i>Expressed protein</i>	Desconocida
TR000992	LOC_Os01g18800	<i>CAMK_KIN1/SNF1/Nim1_like.9, expressed</i>	Transductor de señal
TR001194	LOC_Os01g24450	<i>Hypothetical protein</i>	Desconocida
TR001213	LOC_Os01g24920	<i>Poly synthetase 2-B, putative, expressed</i>	Respuesta a estrés
TR002274	LOC_Os01g49960	<i>Hypothetical protein</i>	Desconocida
TR002416	LOC_Os01g52260	<i>Serine acetyltransferase protein, putative, expressed</i>	Respuesta a estrés
TR003448	LOC_Os01g68850	<i>Hypothetical protein</i>	Desconocida
TR004405	LOC_Os02g19680	<i>Conserved hypothetical protein</i>	Desconocida
TR004857	LOC_Os02g34730	<i>Transposon protein, putative, expressed</i>	Desconocida
TR004878	LOC_Os02g35010	<i>STE_MEKK_MAP3K.9 - STE, expressed</i>	Transductor de señal
TR005043	LOC_Os02g40010	<i>Phosphoribosyl transferase, putative, expressed</i>	Metabolismo
TR005760	LOC_Os02g55110	<i>Expressed protein</i>	Desconocida
TR006140	LOC_Os03g02860	<i>Heavy metal-associated domain containing protein, expressed</i>	Transporte
TR006218	LOC_Os03g04060	<i>CHIT16, expressed</i>	Respuesta a estrés
TR007256	LOC_Os03g19690	<i>Expressed protein</i>	Desconocida
TR007580	LOC_Os03g27030	<i>RNA recognition motif containing protein, expressed</i>	Metabolismo
TR007628	LOC_Os03g28300	<i>Protein kinase domain containing protein, expressed</i>	Transductor de señal
TR008365	LOC_Os03g50330	<i>CAMK_KIN1/SNF1/Nim1_like.18 - expressed</i>	Transductor de señal
TR008447	LOC_Os03g51650	<i>Membrane protein, putative, expressed</i>	Desconocida
TR008492	LOC_Os03g52390	<i>PIII1 - Proteinase inhibitor II family protein precursor, expressed</i>	Desconocida
TR009102	LOC_Os03g62550	<i>Retrotransposon protein, putative, expressed</i>	Desconocida
TR009112	LOC_Os03g62670	<i>Expressed protein</i>	Desconocida
TR009404	LOC_Os04g06830	<i>Hypothetical protein</i>	Desconocida
TR011072	LOC_Os04g52230	<i>Ent-kaurene synthase, putative, expressed</i>	Respuesta a estrés
TR011453	LOC_Os04g58880	<i>Exo70 exocyst complex subunit, putative, expressed</i>	Transporte
TR011906	LOC_Os05g35460	<i>Patellin protein, putative, expressed</i>	Transporte
TR012245	LOC_Os05g51140	<i>Expressed protein</i>	Desconocida

Tabla 6 (cont.): Genes asociados a resistencia con una respuesta diferencial durante los tiempos post inoculación estudiados en respuesta al ataque de *M. oryzae* en plantas de arroz susceptibles y resistentes inoculadas versus plantas sin inocular a 12, 24 y 36 hpi.

Identificación TIGR	Locus	Nombre del producto del gen	Ontología
TR012886	LOC_Os07g05480	<i>Photosystem I reaction center subunit, putative, expressed</i>	Desconocida
TR014187	LOC_Os07g38260	<i>Insulin-degrading enzyme, putative, expressed</i>	Metabolismo
TR015023	LOC_Os08g04500	<i>Terpene synthase, putative, expressed</i>	Respuesta a estrés
TR015422	LOC_Os08g14930	<i>Hypothetical protein</i>	Desconocida
TR016001	LOC_Os08g32620	<i>ES43 protein, putative, expressed</i>	Transcripción
TR016284	LOC_Os08g38690	<i>Retrotransposon protein, putative,</i>	Desconocida
TR016585	LOC_Os08g43890	<i>Carrier, putative</i>	Desconocida
TR016646	LOC_Os08g45190	<i>PGR5, putative, expressed</i>	Desconocida
TR017340	LOC_Os10g20550	<i>DEFL70 - Defensin and Defensin-like DEFL family, expressed</i>	Desconocida
TR017982	LOC_Os10g35930	<i>Osplim2c - LIM domain protein, expressed</i>	Desconocida
TR019277	LOC_Os12g08760	<i>Carboxyvinyl-carboxyphosphonate phosphorylmutase, putative, expressed</i>	Desconocida
TR019278	LOC_Os12g08770	<i>Photosystem I reaction center subunit N, putative, expressed</i>	Fotosíntesis
TR019392	LOC_Os12g13100	<i>WW domain containing protein, expressed</i>	Desconocida
TR020281	LOC_Os12g42570	<i>Expressed protein</i>	Desconocida
TR000664	LOC_Os12g42570	<i>Receptor-like protein kinase, putative</i>	Metabolismo
TR001111	LOC_Os01g21970	<i>Protein kinase, putative, expressed</i>	Modificación de proteínas
TR001412	LOC_Os01g32460	<i>Expressed protein</i>	Desconocida
TR001489	LOC_Os01g33920	<i>Hypothetical protein</i>	Desconocida
TR001883	LOC_Os01g42470	<i>Acetyltransferase, GNAT family, putative, expressed</i>	Metabolismo
TR001895	LOC_Os01g42670	<i>Hypothetical protein</i>	Desconocida
TR002599	LOC_Os01g55040	<i>1,3-beta-glucan synthase component, putative, expressed</i>	Metabolismo
TR003071	LOC_Os01g62570	<i>ATP/GTP/Ca⁺⁺ binding protein, putative</i>	Desconocida
TR005889	LOC_Os02g57160	<i>ELMO/CED-12 family protein, putative, expressed</i>	Desconocida
TR005545	LOC_Os02g51920	<i>Hypothetical protein</i>	Desconocida
TR006580	LOC_Os03g09930	<i>Sulfate transporter, putative, expressed</i>	Transporte
TR007424	LOC_Os03g22590	<i>Nodulin mtn3 family protein, putative, expressed</i>	Desconocida
TR008402	LOC_Os03g50900	<i>Transposon protein, putative expressed</i>	Desconocida
TR008780	LOC_Os03g57160	<i>Zinc ion binding protein, putative, expressed</i>	Desconocida
TR007430	LOC_Os03g22670	<i>Triacylglycerol Lipase, putative, expressed</i>	Metabolismo
TR007024	LOC_Os03g16580	<i>Expressed protein</i>	Desconocida
TR007251	LOC_Os03g19640	<i>Hypothetical protein</i>	Desconocida
TR009135	LOC_Os03g63050	<i>Hypothetical protein</i>	Desconocida
TR009564	LOC_Os04g12620	<i>Hypothetical protein</i>	Desconocida
TR009830	LOC_Os04g25560	<i>Ossc23 - Putative Serine Carboxypeptidase homologue, expressed</i>	Metabolismo

Tabla 6 (cont.): Genes asociados a resistencia con una respuesta diferencial durante los tiempos post inoculación estudiados en respuesta al ataque de *M. oryzae* en plantas de arroz susceptibles y resistentes inoculadas versus plantas sin inocular a 12, 24 y 36 hpi.

Identificación TIGR	Locus	Nombre del producto del gen	Ontología
TR011851	LOC_Os05g20050	<i>Ras-related protein, putative, expressed</i>	Desconocida
TR011934	LOC_Os05g36150	<i>Yip1 domain containing protein, expressed</i>	Desconocida
TR010163	LOC_Os04g35080	<i>Protein kinase domain containing protein, expressed</i>	Respuesta a estrés
TR010638	LOC_Os04g44620	<i>Hus1-like protein, expressed</i>	Desconocida
TR010783	LOC_Os04g46880	<i>Transporter, putative, expressed</i>	Transporte
TR012497	LOC_Os06g06410	<i>Rrna-processing protein FCF, putative, expressed</i>	Desconocida
TR012931	LOC_Os07g06570	<i>Receptor protein kinase CRINKLY4 precursor, putative, expressed</i>	Respuesta a estrés
TR013109	LOC_Os07g09330	<i>Inositol-1-monophosphatase, putative, expressed</i>	Metabolismo
TR013599	LOC_Os07g23990	<i>Tetrapeptide repeat domain containing protein, putative, expressed</i>	Desconocida
TR013683	LOC_Os07g27040	<i>Hypothetical protein</i>	Desconocida
TR015027	LOC_Os08g04570	<i>Hypothetical protein</i>	Desconocida
TR015528	LOC_Os08g17784	<i>Purple acid phosphatase, putative, expressed</i>	Desconocida
TR015723	LOC_Os08g25700	<i>Expressed protein</i>	Desconocida
TR015811	LOC_Os08g28480	<i>Hypothetical protein</i>	Desconocida
TR015836	LOC_Os08g28980	<i>Exonuclease, putative, expressed</i>	Desconocida
TR013790	LOC_Os07g29794	<i>Calmodulin binding heat shock protein, putative, expressed</i>	Metabolismo
TR014821	LOC_Os07g49090	<i>WD-40 repeat family protein, putative</i>	Transductor de señal
TR017152		<i>ACI13, putative, expressed</i>	Desconocida
TR016595	LOC_Os08g44150	<i>Transmembrane 9 superfamily member, putative</i>	transporte
TR016270	LOC_Os08g38460	<i>Zinc finger, C3HC4 type domain containing protein, expressed</i>	desconocida
TR017558	LOC_Os10g26740	<i>Hypothetical protein</i>	Desconocida
TR017907	LOC_Os10g34790	<i>Terpene synthase, putative, expressed</i>	Metabolismo
TR014938	LOC_Os08g02500	<i>ACT domain containing protein, putative</i>	Desconocida
TR013963	LOC_Os07g33730	<i>NB-ARC domain containing protein, expressed</i>	Respuesta a estrés
TR018602	LOC_Os11g11500	<i>Serpin domain containing protein, putative, expressed</i>	Desconocida
TR018829	LOC_Os11g40530	<i>LTPL162 - Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein precursor, expressed</i>	Desconocida
TR018892	LOC_Os11g42540	<i>Oxidoreductase, aldo/keto reductase family protein, putative, expressed</i>	Transporte
TR020363	LOC_Os12g44360	<i>Sodium/hydrogen exchanger 7, putative, expressed</i>	Respuesta a estrés
TR019657	LOC_Os12g25450	<i>O-methyltransferase, putative, expressed</i>	Metabolismo
TR019837	LOC_Os12g32450	<i>Expressed protein</i>	Desconocida
TR020065	LOC_Os12g38490	<i>SCARECROW, putative, expressed</i>	Respuesta a estrés

3.4. Análisis de ontología de los genes seleccionados.

A partir de la identificación TIGR de cada uno de los genes seleccionados se procedió a utilizar la base de datos online donde se encuentra depositada toda la información del genoma de arroz (*Rice Genome Annotation Project Overview*, <http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>; Ouyang et al. 2007) con la finalidad de ubicar la ontología de cada uno de ellos considerando el proceso biológico en el que participa.

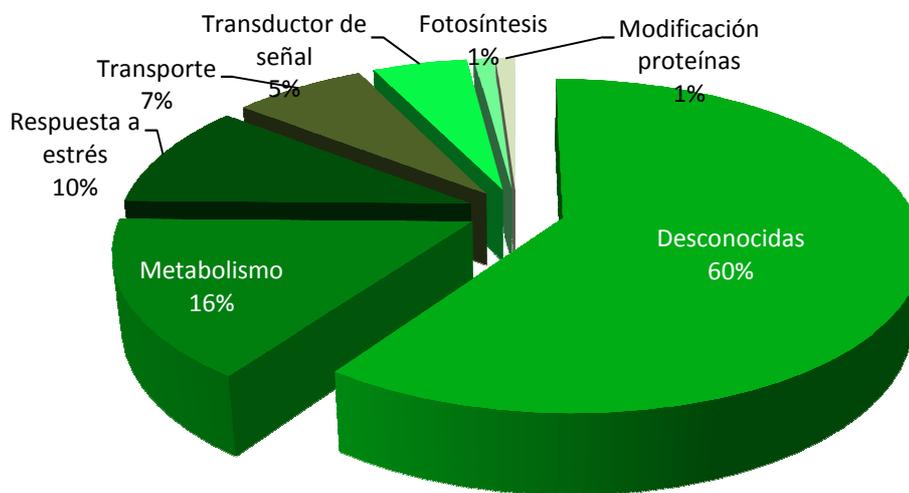


Figura 16. Distribución por categorías funcionales de los genes candidatos identificados al comparar los perfiles de expresión de plantas resistentes y susceptibles inoculadas con *M. oryzae* vs plantas sin inocular. Los porcentajes de cada categoría se muestran en la gráfica.

En la tabla 6 se muestra la ontología funcional de cada uno de los genes seleccionados con base en su expresión diferencial, identificándose 8 procesos biológicos cuyos componentes ven alterada su expresión siendo estos: metabolismo, respuesta a estrés, transductor de señal, transporte, transcripción, fotosíntesis, modificación de proteínas y finalmente un grupo de genes cuyas funciones son desconocidas. Este último grupo posee el 60% de los genes potencialmente candidatos tal y como se puede observar en la fig. 16. Asimismo, por orden de abundancia, le sigue el grupo metabolismo en segundo lugar con un 16%, luego respuesta a estrés con un 10%, transporte con 7%, transductor de señal con 5% y finalmente, la fotosíntesis y modificación de proteínas con un 1% cada una. Es

importante destacar que a pesar de haber una diferencia entre los resultados mostrados en la fig. 11 con los resultados obtenidos en este experimento, a nivel de distribución de la proporciones, son prácticamente los mismos procesos que se ven afectados en ambos experimentos, haciendo especial atención en el grupo de proteínas con función desconocida, que en ambos casos es el grupo con mayor representación.

4. Identificación de la función putativa de los genes desconocidos.

Con la finalidad de determinar la función de algunas de las proteínas clasificadas como desconocidas se procedió a realizar una comparación de las secuencias traducidas a aminoácidos de cada gen contra la base de datos disponible a través del uso de la herramienta BLASTP para determinar si tienen alguna homología con alguna proteína de otro organismo o algún dominio que pudiera dar indicios de su función. Para ello se seleccionaron no solo aquellos genes que mostraban una función desconocida a través de la ontología, sino que además los otros dominios, función molecular y componente celular, fueran también desconocidos.

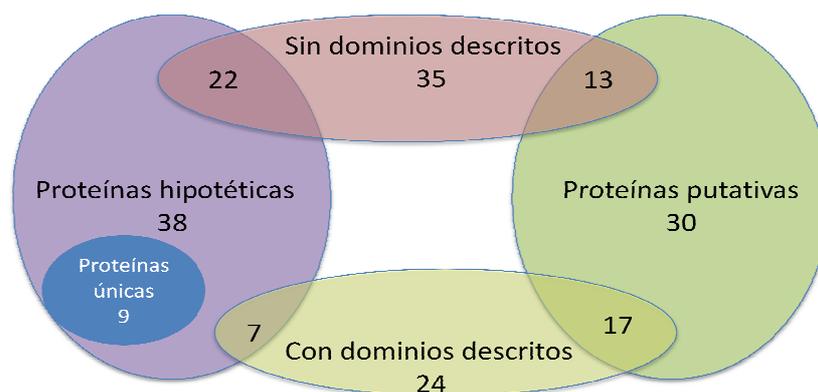


Figura 17 Distribución de las homólogas de las proteínas desconocidas identificadas por microarreglos. En el diagrama de Venn se muestran las distribuciones de las funciones putativas luego de analizar las secuencias de proteínas a través de BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Tabla 7: Homología de las proteínas desconocidas identificadas por microarreglos. Las secuencias de proteínas fueron analizadas a través de BLASTP.

Identificación TIGR	Nombre del producto del gen	Homología				
		N° acceso	Nombre de la proteína	Especie	Ident (%)	Dominio
TR040275	<i>Expressed protein</i>	CBJ30166.1	<i>Tyrosine Transport protein</i>	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	86	<i>Tryptophan/tyrosine permease family</i>
TR003071	<i>ATP/GTP/Ca++ binding protein, putative</i>	ABR67417.1	<i>ATP/GTP/Ca++ binding protein</i>	<i>Cucumis melo</i>	99	<i>Miro2 subfamily, Rho (Ras homology) family, GTPase SAR1 and related small G proteins.</i>
TR003448	<i>hypothetical protein</i>	BAD87668.1	<i>Stachyose synthase-like protein</i>	<i>Oryza sativa</i>	72	No tiene
TR008402	<i>Transposon protein, putative, expressed</i>	XP_002268503.1	<i>Similar to FHY3</i>	<i>Vitis vinifera</i>	98	<i>FAR1 DNA-binding domain, MULE transposase domain, SWIM zinc finger, FHY3,</i>
TR008492	<i>PIII1 - Proteinase inhibitor II family protein precursor, expressed</i>	NP_177351.1	<i>Potato type II proteinase inhibitor family</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	98	<i>Potato type II proteinase inhibitor family</i>
TR010638	<i>hus1-like protein, expressed</i>	AAD55626.1	<i>F6D8.25</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	99	<i>Hus1-like protein</i>
TR011934	<i>Yip1 domain containing protein, expressed</i>	NP_001147666.1	<i>yip1 domain family member 6</i>	<i>Zea mays</i>	99	<i>yip1 domain family member 6</i>
TR012497	<i>rRNA-processing protein FCF, putative, expressed</i>	XP_002512911.1	<i>Protein C14orf111, putative</i>	<i>Ricinus communis</i>	93	<i>Fcf1, PIN Large family of predicted nucleotide-binding domain</i>
TR013599	<i>Tetratricopeptide repeat domain containing protein, putative, expressed</i>	XP_002889374.1	<i>Tetratricopeptide containing protein</i>	<i>Arabidopsis lyrata</i>	99	<i>Tetratricopeptide repeat domain</i>
TR013683	<i>Hypothetical protein</i>	ACM89574.1	<i>Serine/threonine protein kinase-like protein</i>	<i>Glycine max</i>	40	No tiene
TR014938	<i>ACT domain containing protein, putative</i>	NP_172704.1	<i>ACR8; amino acid binding</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	99	<i>ACT domain, PII uridylyl-transferase</i>
TR016646	<i>PGR5, putative, expressed</i>	NP_001105792.1	<i>pgr5 protein</i>	<i>Zea mays</i>	95	No tiene
TR017152	<i>ACI13, putative, expressed</i>	AAY97863.1	<i>ACI13</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	97	No tiene
TR017982	<i>OsPLIM2c - LIM domain protein, putative actin-binding protein and transcription factor, expressed</i>	XP_002530411.1	<i>Pollen-specific protein SF3</i>	<i>Ricinus communis</i>	99	<i>LIM domain</i>
TR018829	<i>LTPL162 - Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein precursor, expressed</i>	NP_177519.1	<i>Protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	90	<i>nsLTP2</i>

Tabla 7 (cont.): Homología de las proteínas desconocidas identificadas por microarreglos. Las secuencias de proteínas fueron analizadas a través de BLASTP.

Identificación TIGR	Nombre del producto del gen	Homología				
		Nº acceso	Nombre de la proteína	Especie	Ident (%)	Dominio
TR040275	<i>Expressed protein</i>	CBJ30166.1	<i>Tyrosine Transport protein</i>	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	86	<i>Tryptophan/tyrosine permease family</i>
TR003071	<i>ATP/GTP/Ca++ binding protein, putative</i>	ABR67417.1	<i>ATP/GTP/Ca++ binding protein</i>	<i>Cucumis melo</i>	99	<i>Miro2 subfamily, Rho (Ras homology) family, GTPase SAR1 and related small G proteins.</i>
TR003448	<i>hypothetical protein</i>	BAD87668.1	<i>Stachyose synthase-like protein</i>	<i>Oryza sativa</i>	72	No tiene
TR008402	<i>Transposon protein, putative, expressed</i>	XP_002268503.1	<i>Similar to FHY3</i>	<i>Vitis vinifera</i>	98	<i>FAR1 DNA-binding domain, MULE transposase domain, SWIM zinc finger, FHY3,</i>
TR008492	<i>PIII1 - Proteinase inhibitor II family protein precursor, expressed</i>	NP_177351.1	<i>Potato type II proteinase inhibitor family</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	98	<i>Potato type II proteinase inhibitor family</i>
TR010638	<i>hus1-like protein, expressed</i>	AAD55626.1	<i>F6D8.25</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	99	<i>Hus1-like protein</i>
TR011934	<i>Yip1 domain containing protein, expressed</i>	NP_001147666.1	<i>yip1 domain family member 6</i>	<i>Zea mays</i>	99	<i>yip1 domain family member 6</i>
TR012497	<i>rRNA-processing protein FCF, putative, expressed</i>	XP_002512911.1	<i>Protein C14orf111, putative</i>	<i>Ricinus communis</i>	93	<i>Fcf1, PIN Large family of predicted nucleotide-binding domain</i>
TR013599	<i>Tetratricopeptide repeat domain containing protein, putative, expressed</i>	XP_002889374.1	<i>Tetratricopeptide containing protein</i>	<i>Arabidopsis lyrata</i>	99	<i>Tetratricopeptide repeat domain</i>
TR013683	<i>Hypothetical protein</i>	ACM89574.1	<i>Serine/threonine protein kinase-like protein</i>	<i>Glycine max</i>	40	No tiene
TR014938	<i>ACT domain containing protein, putative</i>	NP_172704.1	<i>ACR8; amino acid binding</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	99	<i>ACT domain, PII uridylyl-transferase</i>
TR016646	<i>PGR5, putative, expressed</i>	NP_001105792.1	<i>pgr5 protein</i>	<i>Zea mays</i>	95	No tiene
TR017152	<i>ACI13, putative, expressed</i>	AAY97863.1	<i>ACI13</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	97	No tiene
TR017982	<i>OsPLIM2c - LIM domain protein, putative actin-binding protein and transcription factor, expressed</i>	XP_002530411.1	<i>Pollen-specific protein SF3</i>	<i>Ricinus communis</i>	99	<i>LIM domain</i>
TR018829	<i>LTPL162 - Protease inhibitor precursor, expressed</i>	NP_177519.1	<i>Protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	90	<i>nsLTP2</i>
TR038134	<i>DUF581 domain containing protein, expressed</i>	NP_565167.1	<i>Senescence-associated protein-related</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	74	<i>DUF581</i>

En ese sentido se analizaron 68 proteínas correspondiente a los genes con expresión diferencial identificados en las dos aproximaciones, dentro de las cuales 9 de ellas muestran identidad sólo con proteínas putativas e hipotéticas de *O. sativa*, mientras que las 59 restantes mostraron identidad con proteínas de otras plantas (*Sorghum bicolor*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata*, entre otros), sin embargo, sólo 30 de ellas presentan alguna función putativa (ver fig. 17).

Dentro del grupo de proteínas con funciones putativas encontramos que algunas de ellas, a pesar de no estar descrita su función, el nombre con el cual fueron descritas mantiene relación con la proteína con quien muestra una alta identidad, pero más llama la atención aquellas que a pesar de ser reportadas en *O. sativa* como hipotéticas o desconocidas ya han sido descritas en otras plantas (ver tabla 7). Un ejemplo de esto lo encontramos con *hypothetical protein* TR013683, quien a pesar de no tener una aparente función en arroz, cuando se compara contra el banco de datos muestra identidad con *serine/threonine protein kinase-like protein*, la *expressed protein* TR053633, muestra identidad con la proteína *stress inducible protein coi6.1* y *retrotransposon proteín* TR047790 muestra identidad con el precursor de *vegetative cell wall protein gp1* (ver tabla 7)

5. Genes candidatos y su relación con QTLs.

Tradicionalmente los programas de mejoramiento genético han estado dirigidos hacia el uso de marcadores moleculares para la identificación de QTLs y su incorporación a las líneas elite a pesar de desconocerse por completo cuáles son los genes que se encuentran ubicados dentro de esas regiones. Considerando que en este trabajo se han identificado genes que pudieran estar relacionados con el fenotipo de resistencia, el siguiente paso fue determinar si había alguna relación entre los genes identificados y algún QTL previamente en la literatura.

Para la búsqueda de los QTLs en la base de datos de *Gramene* se consideraron un total de 133 genes de los cuales 83 de ellos fueron los obtenidos a partir del análisis de los microarreglos comparando plantas susceptibles y resistentes inoculadas con el patógeno, y los 47 restantes obtenidos a partir del análisis de los microarreglos donde se comparó plantas susceptibles y resistentes inoculadas contra plantas sin inocular con *M. oryzae*. Del total de genes, 3 de ellos no presentaron ninguna asociación con algún QTLs, mientras que para los genes restantes se pudieron asociar 7606 QTLs. Estos QTLs abarcan diversos rasgos de interés agronómico como por ejemplo tamaño de la panícula, biomasa total, contenido de amilosa, contenido de clorofila, días de floración, entre muchos otros, donde además se incluyen aquellos que están relacionados con estrés de tipo biótico y abiótico.

Siendo el interés de este trabajo el estudio de la respuesta de la planta ante el ataque del patógeno se procedió a filtrar la información con base en la búsqueda de aquellos QTLs que estuvieran asociados a estrés. En este sentido, 19 genes fueron excluidos del análisis por no cumplir con dicho requisito, resultando en 111 genes asociados a 480 QTLs de estrés (46% de tipo abiótico y 54% de tipo biótico). Por otra parte, cuando se excluyen del análisis todos aquellos genes que hayan sido asociados a QTLs de estrés abiótico únicamente, obtenemos un total de 88 genes con 199 QTLs asociados a 6 plagas, tal y como se muestra en la fig. 18. El detalle de los genes se muestra en el material suplementario S1.

El mapa físico con el solapamiento de los loci y algunos de los QTLs asociados se muestran en la fig. 19. Los 88 genes candidatos asociados a QTLs se encuentran distribuidos en todos los cromosomas exceptuando el cromosoma 11, para el cual no se encontró ningún gen cuya expresión variara de forma significativa en presencia del patógeno. Un total de 25 genes se encuentran relacionados con 1 sólo QTL, mientras que 30 y 33 genes se encuentran asociados a dos o más QTLs respectivamente. Los QTLs descritos para resistencia en *M. oryzae* se localizan prácticamente en todos los cromosomas, exceptuando el cromosoma 10, donde sólo se encontraron locus asociados a QTLs de resistencia a *N. lugens*. Finalmente, los cromosomas con mayor

diversidad de QTLs son el 3 y el 12, aun cuando en ninguno de los dos se encuentran presentes QTLs de resistencia a RYMV.

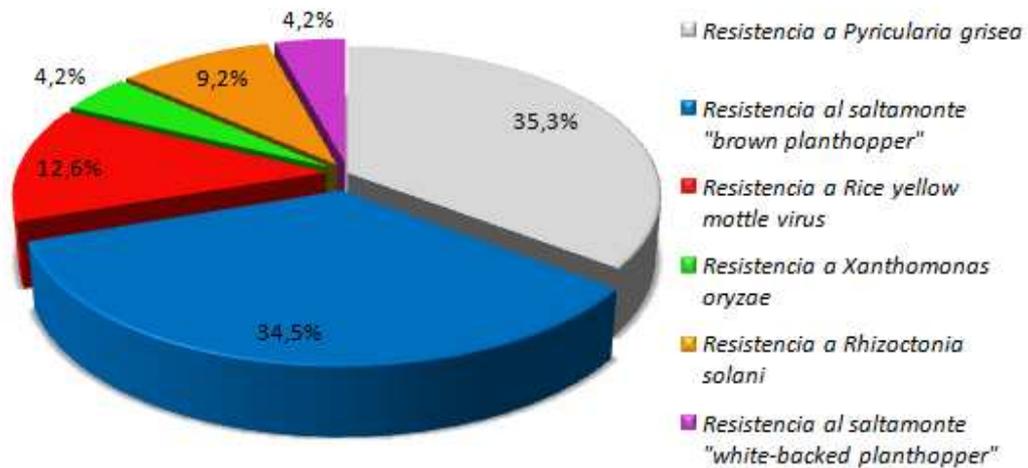


Figura 18: Distribución de los QTLs asociados a estrés de tipo biótico en 88 de los 133 locus considerados para el análisis. En la gráfica se observan 2 enfermedades causadas por hongos (*Magnaporthe oryzae* y *Rhizoctonia solani*), 2 por insectos (*Nilaparvata lugens* y *Sogatella furcifera*, 1 por bacteria (*Xanthomonas oryzae pv oryzae*) y una por virus (*Rice yellow mottle virus*).

6 Identificación de posibles proteínas de resistencia a través de la comparación de los perfiles de expresión de plantas susceptibles versus resistentes inoculadas con el patógeno a través del uso de la proteómica.

El estudio de los perfiles de expresión de proteínas también representa una alternativa a la hora de estudiar los cambios en la célula de la planta de arroz durante el ataque por *M. oryzae*. En ese sentido, la separación de las proteínas en geles de dos dimensiones y su posterior identificación a través de la espectrometría de masas representa una herramienta a la hora de identificar las proteínas implicadas en la respuesta de defensa.

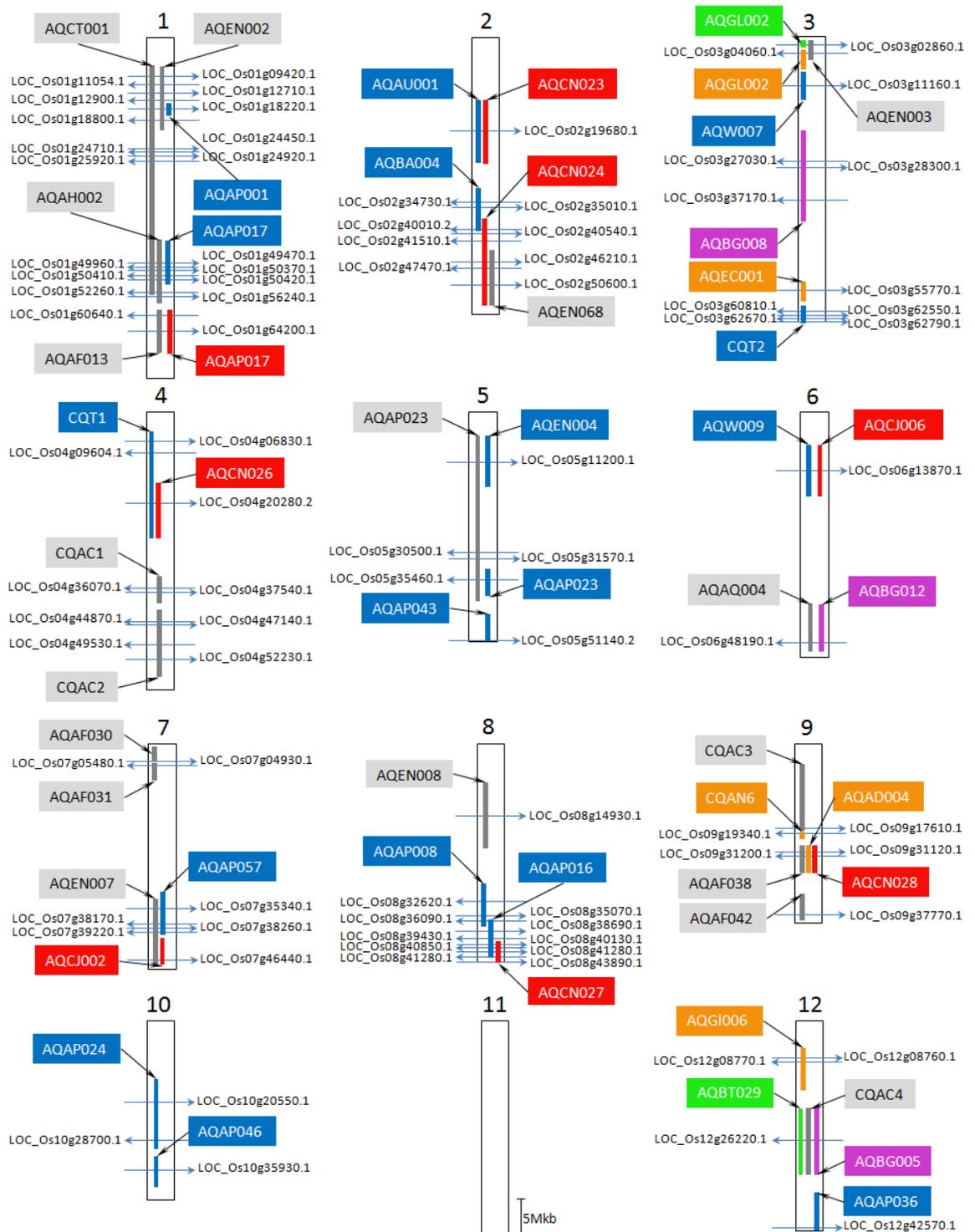


Figura 19: Mapa físico de los genes candidatos y los QTLs de estrés biótico asociados. El tamaño de los cromosomas se muestran en la escala (millones de pares de base), basados en la información suministrada por las bases de datos *Rice Genome Annotation Project* y *Gramene* (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml> y <http://www.gramene.org>) para los genes y QTLs respectivamente. Los nombres de los locus se muestran a ambos lados de cada cromosoma. Las posiciones de algunos de los QTLs se indican con barras en el interior de cada cromosoma. Los cuadros de colores representan la característica para cual fueron descritos, ya sea resistencia a *M. oryzae* (gris), a *R. solani* (naranja), a *X. oryzae pv oryzae* (verde), a *RYMV* (rojo), a *N. lugens* (azul) o *S. furcifera* (morado).

6.1 *Análisis entre los proteomas de plantas resistentes y susceptibles sin inocular con M. oryzae.*

Con la idea de determinar si existían diferencias significativas entre los perfiles de expresión de las isolíneas resistente y susceptible en ausencia del patógeno se realizó un primer análisis del extracto de proteínas foliares en geles de 2D de 7 cm en un rango amplio de pH. En la fig. 20 se muestran dos imágenes representativas de los geles obtenidos.

Sobre la base de estas imágenes se contabilizaron aproximadamente 69 proteínas en los perfiles de expresión en tejido foliar de plantas resistentes y 65 proteínas en los perfiles de expresión correspondientes a las plantas susceptibles, manteniendo en común un total de 53 proteínas; asimismo se registraron 16 y 11 proteínas únicas en los perfiles de expresión de plantas resistentes y susceptibles respectivamente (ver fig.20c).

6.2 *Comparación entre los proteomas de plantas resistentes y susceptibles durante la infección por M. oryzae.*

Con el objeto de determinar las diferencias en los niveles de expresión de las proteínas entre plantas resistentes y susceptibles como respuesta al ataque del patógeno se procedió a comparar las imágenes de los perfiles de expresión para cada uno de los tiempos en estudio (12, 24 y 36 hpi). En la fig. 21 se muestran los porcentajes de proteínas con expresión inducida y reprimida en las plantas resistentes cuando se las compara con los perfiles de plantas susceptibles considerando las proteínas comunes entre ambos. Tal y como se puede observar, en todos y cada uno de los tiempos estudiados se registró una mayor proporción de proteínas inducidas que reprimidas. Entre las 12 y 24 hpi no parece haber cambios significativos en cuando a la expresión de las proteínas inducidas, sin embargo, a las 36 hpi se registra un incremento considerable. Por su parte, las proteínas con expresión reprimida muestran un comportamiento similar, ya que entre las 12 y 24 hpi no parecen haber cambios significativos en

la expresión, lo cual se revierte a las 36 hpi, registrándose un incremento en el número de proteínas.

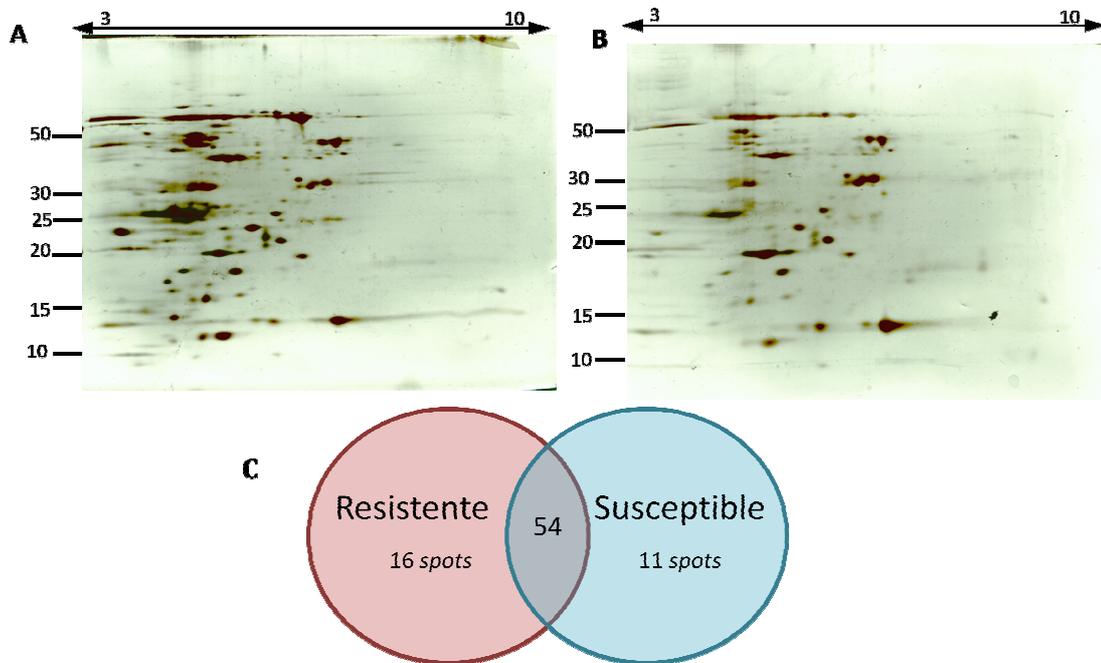


Figura 20. Geles 2D representativos del perfil de expresión de proteínas foliares de plantas resistentes y susceptibles a *M. oryzae* sin inocular. A: perfil en 2D de planta resistente (CT13432-219). B: perfil en 2D de planta susceptible (CT13432-55). C: diagrama de Venn presentando la distribución de los spots para cada una de las plantas. El IEF se realizó en tiras de 7cm no lineales en un rango de pH de 3-10. La corrida electroforética fue realizada en geles de acrilamida al 12%. Los geles fueron teñidos con nitrato de plata.

En la fig. 21 también se puede observar como la mayor diferencia entre proteínas con expresión inducida y reprimida se registra a las 24 hpi, sin embargo es a las 36 hpi donde se registra la mayor cantidad de proteínas para ambos grupos.

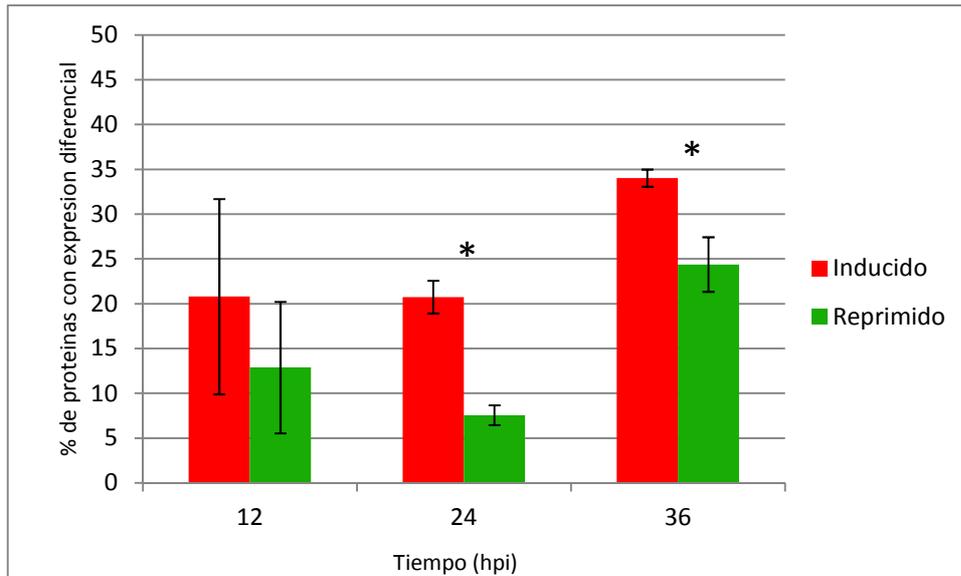


Figura 21. Porcentaje de proteínas con expresión diferencial significativa en plantas de arroz resistentes vs susceptibles durante la infección de *M. oryzae*. Las barras de error indican desviación estándar (n=3; * $P < 0,05$)

6.3 Análisis de los proteomas de plantas resistentes y susceptibles durante la infección por *M. oryzae*.

A fin de determinar las diferencias en los perfiles de expresión de las plantas tanto resistentes como susceptibles durante el ataque del patógeno se procedió a analizar las imágenes obtenidas durante las 12, 24 y 36 hpi usando como referencia el perfil de la planta sin inocular. En la fig. 22b se observan los resultados obtenidos al analizar las plantas susceptibles, encontrando que para todos los tiempos estudiados hay una mayor proporción de proteínas con expresión inducida con relación a las reprimidas, mostrando además entre las 12 y 24 hpi un incremento en el número de ellas, resultado que se revierte a las 36 hpi, donde se reduce no sólo la cantidad de proteínas, sino también el diferencial entre inducidas y reprimidas.

Por su parte, al analizar los resultados de la comparación de las plantas resistentes al patógeno (ver fig. 22a) se observa, que al igual que lo observado en las plantas susceptibles, el registro de proteínas con expresión inducida es superior en todos los tiempos a las proteínas reprimidas. Entre las 12 y 24 hpi se

registra un leve incremento en la cantidad de proteínas con expresión diferencial, las cuales en contra posición a las plantas susceptibles, no parece disminuir luego de las 36 hpi. Adicionalmente es importante mencionar que la proporción de proteínas es siempre mayor en las plantas resistentes que en la susceptibles.

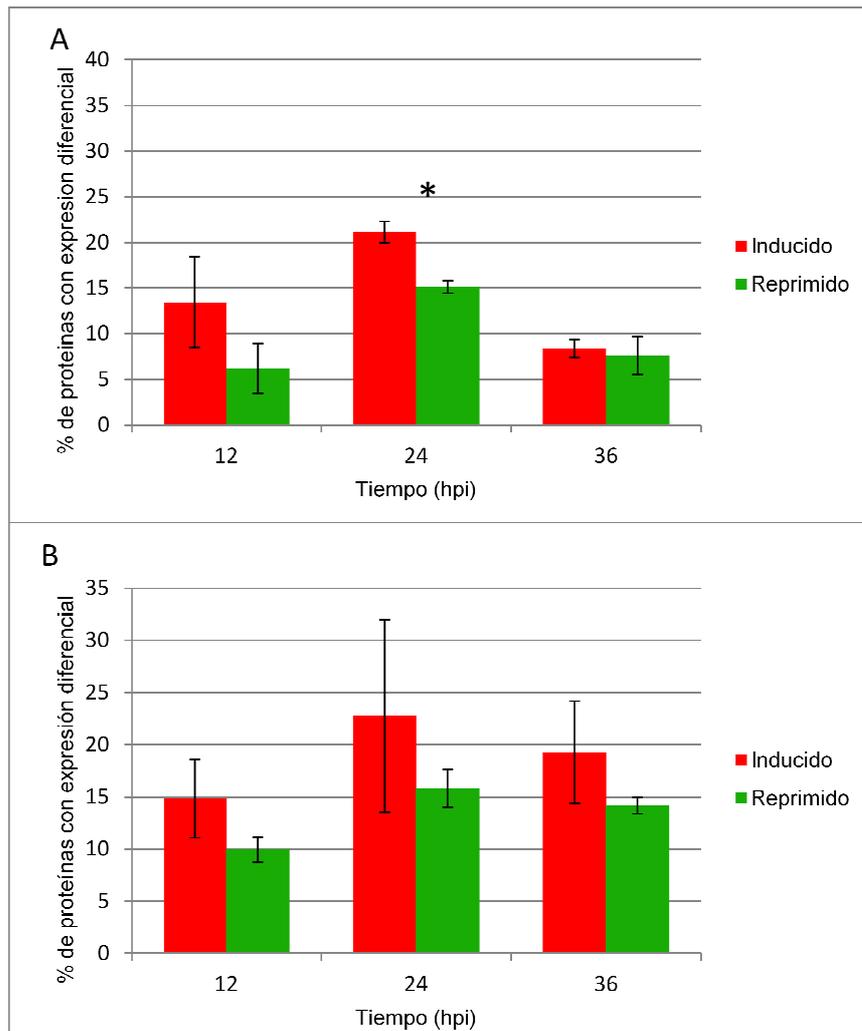


Figura 22. Porcentaje de proteínas con expresión diferencial significativa durante las infecciones de *M. oryzae* en plantas de arroz susceptibles y resistentes A: perfil de planta resistente (CT13432-219). B: perfil de planta susceptible (CT13432-55). Las barras de error indican desviación estándar (n=3; * $P < 0,05$)

Tabla 8: Lista de *spots* con niveles de expresión mayor o igual en |2| veces con relación al gel control en plantas resistentes a *M. oryzae*.

Nº Spot	12 hpi	24 phi	36 hpi
1	-	1,067	-2,86
2	1,131	-4,118	-2,488
3	-1,542	-3,01	-1,344
4	1,504	-	-1,189
5	1,589	-	2
6	-	-4,609	-2,172
7	-2,434	-3,048	1,245
8	1,838	-2,304	1,243
9	-3,69	-32,902	1,533
10	-	1,88	7,54
11	2,919	-	2,089
12	1,954	2,457	-2,006
13	1,256	1,778	-5,005
14	-4,307	-4,127	-2,781
15	4,643	2,719	2,296
16	2,284	-	-5,427
17	1,876	1,54	-3,641
18	1,419	1,242	-2,506
19	-	-1,365	-
20	-1,334	-2,474	-1,188
21	1,392	-	-1,356
22	-1,069	-	1,174
23	1,387	-	-1,104
24	-	-	-
25	-2,162	-	-1,143
26	-	-	-
27	-	-	3,987
28	-	4,353	6,083
29	1,374	1,947	-1,023
30	3,617	4,468	-
31	4,045	8,923	-
32	-	5,031	-
33	1,315	1,55	-2,762
34	-	-	-
35	1,662	-	-
36	-	-	-
37	-	-	-
38	1,301	-1,278	-6,709

Nota: Aquellos geles donde el *spot* se encontraba ausente se señalo con un guion (-)

Tabla 9: Lista de *spots* con niveles de expresión mayor o igual en |2| veces con relación al gel control en plantas susceptibles a *M. oryzae*.

Spot Tesis	12 hpi	24 hpi	36 hpi
1	-1,909	-3,036	-1,244
2	1,059	-	-1,105
3	-1,349	-2,725	1,03
4	4,64	1,818	2,136
5	-1,514	-	1,384
6	-1,847	1,746	1,349
7	-2,139	-1,648	-1,504
8	1,247	1,257	1,134
9	-	-	-
10	1,098	1,092	1,639
11	1,546	-1,29	-1,945
12	-	-	-1,26
39	-	1,323	-12,124
40	1,357	2,302	1,83
41	1,443	3,902	-
42	-	1,533	-1,502
43	-	4,725	-1,01
44	3,802	-1,167	-1,422
45	1,322	1,196	-1,225
46	-2,188	-2,427	1,376
47	-2,181	-2,363	-1,271
48	2,608	1,108	4,065
49	3,21	-	-1,313
50	-	-	-1,355
51	-1,341	-2,011	1,24
52	1,111	-	-1,063
53	-1,395	1,655	1,137
54	1,22	1,497	-1,524
55	1,054	-1,146	-2,547
56	-	4,042	-
57	-1,304	-1,049	-2,568
58	2,613	1,497	-2,352
59	2,56	1,143	-3,804
60	1,787	7,633	-1,16
61	1,434	1,714	-
62	1,205	1,901	-1,904
63	5,899	3,34	2,256
64	-1,824	-	1,442

Nota: Aquellos geles donde el *spot* se encontraba ausente se señalo con un guion (-)

Producto de este análisis, se seleccionaron entonces un total de 76 *spots*, distribuidos en 38 provenientes de plantas resistentes y 38 obtenidas de plantas susceptibles, tomando en consideración aquellos en los que su nivel de

expresión variara en |2| veces con respecto al gel control sin inocular en al menos uno de los tiempos estudiados, con la intención de identificarlos por espectrometría de masas. En las tablas 8 y 9 se muestran los *spots* seleccionados para las plantas resistentes y susceptibles respectivamente, indicando el número de identificación, así como también el valor de la intensidad de la señal de ser normalizada.

Cuando se revisa en detalle las tablas 8 y 9 encontramos que para el caso de las plantas resistentes, al menos 15 *spots* se mantienen presentes en todos los tiempos estudiados, mientras que 15 y 4 *spots* están solo presentes en dos y uno de los tiempos analizados respectivamente. Sólo para el caso de cinco *spots*, su presencia se restringe única y exclusivamente en ausencia del patógeno (ver tabla 8).

Por otro lado, cuando se revisa la distribución de los *spots* seleccionados en las plantas susceptibles encontramos que la mayor proporción la representa aquellos que se encuentran presentes en todos los tiempos estudiados, mientras que sólo 9 y 3 *spots* se encuentran presentes en dos y una de las horas consideradas en este estudio; sólo un *spot* (34) se encuentra presente únicamente en ausencia del patógeno.

6.4 Identificación de las proteínas relacionadas con la resistencia a M. oryzae a través de MALDI-OTOF MS.

Con el propósito de identificar las proteínas con expresión diferencial, los *spots* fueron preparados según la metodología descrita y los péptidos obtenidos fueron analizados utilizando MALDI-OTOF MS. De los 76 *spots* sometidos a este análisis (ver tablas 8 y 9), no fue posible obtener una huella peptídica para diez de ellas.

Las huellas peptídicas obtenidas fueron comparadas contra la información disponible en la bases de datos de NCBI y *swissprot* gestionadas a través del motor de búsqueda MASCOT, y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 10 para las plantas resistentes y tabla 11 para las plantas susceptibles. En ellas se indican los puntos isoeléctricos y masa molecular

determinadas de forma experimental, así como también su posible función biológica de acuerdo a la ontología señalada por la base de datos Uniprot (<http://www.uniprot.org/>; The UniProt Consortium 2011)

Adicionalmente, también se identificaron 12 proteínas comunes entre las plantas resistentes y susceptibles, resultados que se muestran en la tabla 12, donde al igual que para los casos anteriores también se muestran los puntos isoelectricos y sus masas moleculares experimentales, así como su posible función biológica. En vista de la relevancia de estas proteínas comunes a la hora de analizar la respuesta diferencial entre las plantas resistentes y susceptibles ante el ataque de *M. oryzae*, se procedió a graficar los niveles de expresión de cada una de ellas. En la fig. 23 se muestran las variaciones en los niveles de expresión de cada una de las proteínas comunes identificadas, donde se pueden observar cambios considerables en la inducción – represión de cada uno de ellos. Resulta interesante como en el caso de *Monothiol glutaredoxin-S8* y *Ribose-phosphate pyrophosphokinase 3* no se registran variaciones significativas en las plantas susceptibles, a diferencia de las plantas resistentes, donde se registra una inducción a las 36 hpi para el caso de *Monothiol glutaredoxin-S8*, y una represión a las 24 hpi para *Ribose-phosphate pyrophosphokinase 3*. Por su parte, la proteína correspondiente al *spot 10* identificada como *hypothetical protein* no muestra variaciones en su perfil de expresión en las plantas resistentes, a diferencia de las susceptibles, donde se observa un incremento en la expresión a medida que transcurre la infección. Por último, es importante destacar el perfil correspondiente al *spot 9*, proteína identificada como *Os08g0265350*, la cual aún cuando muestra una represión en su expresión en las plantas resistentes a las 24 hpi, sólo puede identificarse en la planta susceptible sin inocular.

De acuerdo a la distribución de las proteínas identificadas, tal y como se puede observar, en las tablas 10 y 11, la mayor proporción tanto para plantas resistentes como susceptibles recae sobre la clasificación de *desconocidas* con un 58 y 42 % respectivamente, encontrando también proteínas relacionadas con defensa, metabolismo, fotosíntesis y señalización en menor proporción.

Tabla 10: Identificación de proteínas con expresión diferencial en plantas resistentes durante la infección por *M. oryzae*.

Función	Spot nº	Nombre de la proteína	Masa (kDa)	pI	No acceso	Score	Cobertura (%)
Transporte	13	<i>Coatomer subunit epsilon-2</i>	39,11	7,20	COPE2_ORYSI	37/48	48
Desconocida	14	<i>Hypothetical protein osi_04526</i>	40,44	7,00	gi 125528465	51/64	27
Desconocida	15	<i>Os08g0543200. Transferase family protein.</i>	23,78	5,02	gi 297726627	31/64	35
Defensa	16	<i>Cysteine proteinase inhibitor 1</i>	20,38	6,94	CYT1_ORYSJ	29/48	29
Desconocida	17	<i>Zinc finger CCCH domain-containing protein 32</i>	97,13	5,51	C3H32_ORYSJ	43/48	25
Desconocida	19	<i>Zinc finger CCCH domain-containing protein 32</i>	97,13	5,51	C3H32_ORYSJ	43/48	25
Metabolismo	20	<i>Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase</i>	16,81	5,27	gi 78708910	67/64	27
Desconocida	21	<i>Hypothetical protein osj_30806</i>	15,12	5,25	gi 125574112	51/64	48
Desconocida	22	<i>Os10g0395400</i>	15,15	5,47	gi 115481870	28/64	15
Desconocida	23	<i>Hypothetical protein osi_14403</i>	15,40	4,12	gi 218194144	48/64	92
Desconocida	24	<i>Unnamed protein product (Vitis vinifera)</i>	10,60	5,21	gi 297738131	49/72	61
Desconocida	25	<i>Os01g0791033</i>	29,71	7,19	gi 297720471	35/64	28
Desconocida	26	<i>Zinc finger CCCH domain-containing protein 32</i>	97,13	5,51	C3H32_ORYSJ	43/48	25
Desconocida	27	<i>Osjnba0017p10.1</i>	21,92	5,57	gi 32487673	50/64	52
Desconocida	28	<i>Os08g0222800</i>	25,99	5,41	gi 297726159	31/64	25
Desconocida	30	<i>Hypothetical protein osj_03042</i>	58,22	5,45	gi 222619064	74/64	41
Transcripción	31	<i>Maturase K (Ozothamnus diosmifolius)</i>	55,75	5,38	gi 21629826	40/72	18
Transporte	32	<i>Putative potassium transporter 8</i>	79,57	5,39	HAK8_ORYSJ	28/48	18
Metabolismo	33	<i>Hexokinase-4</i>	76,87	5,69	HXK4_ORYSJ	43/48	18
Desconocida	34	<i>Hypothetical protein SELMODRAFT_230312 (Selaginella moellendorffii)</i>	79,33	5,48	gi 302761244	61/72	25
Desconocida	35	<i>Os02g0586400</i>	21,73	3,91	gi 115446975	43/64	28
Desconocida	36	<i>Os01g0501800</i>	32,00	5,07	gi 115436780	73/64	42
Señalización	37	<i>Probable protein phosphatase 2C 77</i>	57,71	4,18	P2C77_ORYSJ	36/48	27
Transcripción	38	<i>Homeobox protein knotted-1-like 8</i>	45,92	4,83	KNOS8_ORYSJ	24/48	22

Tabla 11: Identificación de proteínas con expresión diferencial en plantas susceptibles durante la infección por *M. oryzae*.

Función	Spot nº	Nombre de la proteína	Masa (kDa)	pI	No acceso	Score	Cobertura (%)
Síntesis de ATP	42	<i>ATP synthase subunit beta</i>	56,61	5,55	ATPB_ORYSA	99/48	54
División celular	44	<i>Cyclin-dependent kinase B2-1</i>	46,22	5,09	CKB21_ORYSJ	25/48	22
Defensa	47	<i>18.1 kda class I heat shock protein</i>	18,69	5,93	HS181_ORYSJ	25/48	27
División celular	48	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 6</i>	15,47	4,38	KRP6_ORYSJ	18/48	40
Transcripción	49	<i>Protein mago nashi homolog</i>	15,55	5,23	MGN_ORYSJ	19/48	24
Desconocida	50	<i>Hypothetical protein osi_15754</i>	12,63	6,37	gi 125548155	59/64	45
Desconocida	52	<i>Hypothetical protein osi_26072</i>	8,60	5,13	gi 125558400	46/64	59
Desconocida	53	<i>Os07g0112700</i>	20,58	6,17	gi 115470293	44/64	34
Desconocida	55	<i>Os02g0595700</i>	44,12	5,40	gi 297721387	51/64	34
Metabolismo	56	<i>Beta-glucosidase 12</i>	74,77	5,63	BGL12_ORYSJ	34/48	20
Desconocida	57	<i>Hypothetical protein osj_22176</i>	45,35	5,37	gi 222635997	39/64	25
División celular	58	<i>Cyclin-dependent kinase B2-1</i>	46,22	5,09	CKB21_ORYSJ	25/48	22
Síntesis de ATP	60	<i>ATP synthase CF1 beta subunit</i>	51,91	5,65	gi 11466794	75/64	47
Desconocida	61	<i>Hypothetical protein osi_17569.</i>	82,50	5,75	gi 125549880	70/64	29

Tabla 12: Identificación de proteínas comunes entre plantas resistentes y susceptibles con expresión diferencial durante la infección por *M. oryzae*.

Función	Spot nº	Nombre de la proteína	Masa (kDa)	pI	Nº acceso	Score	Cobertura (%)
Transcripción	1	<i>AP2/ERF and B3 domain-containing protein Os01g0693400</i>	36,28	5,57	Y1934_ORYSJ	25/48	22
Desconocida	2	<i>Hypothetical protein osi_22157</i>	21,22	6,16	gi 218197800	44/64	44
Desconocida	3	<i>Hypothetical protein</i>	19,83	5,55	gi 58737171	31/64	37
Desconocida	4	<i>Hypothetical protein osi_18237</i>	39,11	5,62	gi 125550625	68/64	33
Traducción	5	<i>Pentatricopeptide repeat protein (Diplophyllum albicans)</i>	18,99	5,15	gi 190612711	36/72	30
Transcripción	6	<i>Ethylene-responsive transcription factor ERF008 (Arabidopsis thaliana)</i>	19,83	6,17	ERF08_ARATH	40/57	52
Metabolismo	8	<i>Ribose-phosphate pyrophosphokinase 3</i>	23,66	6,73	KPRS3_ORYSJ	34/57	17
Desconocida	9	<i>Os08g0265350</i>	12,74	6,09	gi 297726241	36/64	46
Desconocida	10	<i>Hypothetical protein</i>	20,99	5,52	gi 53791888	47/64	55
Metabolismo	11	<i>Pyridoxal biosynthesis protein PDX2 (Arabidopsis thaliana)</i>	30,16	5,02	PDX2_ARATH	48/57	43
Fotosíntesis	12	<i>Ribulose biphosphate carboxylase large chain</i>	54,53	4,08	RBL_ORYSA	50/48	27
Defensa	7	<i>Monothiol glutaredoxin-S8</i>	11,86	7,11	GRXS8_ORYSJ	25/48	50

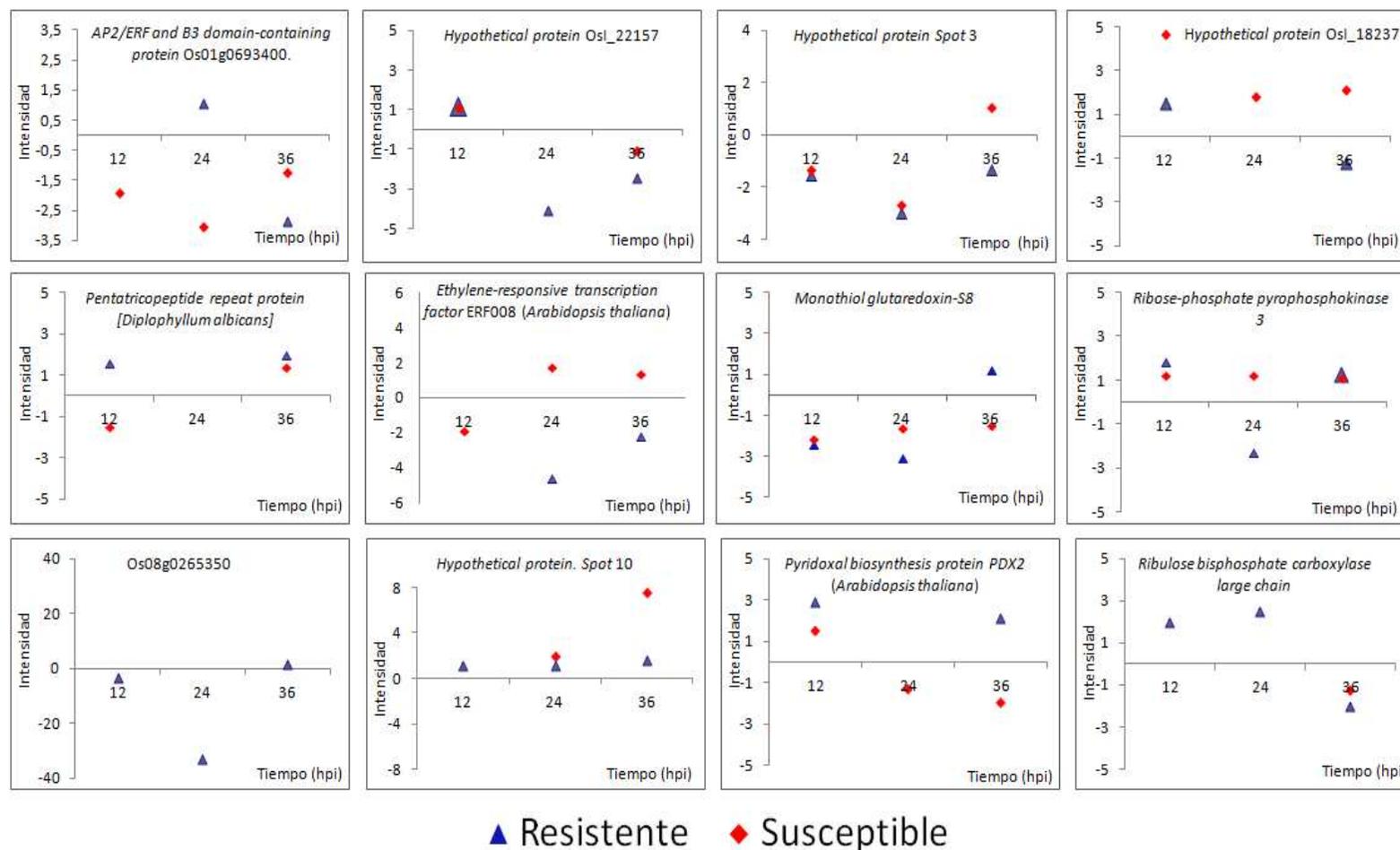


Figura 23. Comparación de la variación en las intensidades de las proteínas comunes entre las plantas resistentes y susceptibles con expresión diferencial significativa identificadas por MALDI-OTOF durante la infección con *M. oryzae*. Los puntos que se salen de las graficas representan los spots ausente.

6.5 Identificación de la función putativa de las proteínas desconocidas

En vista de la gran proporción de proteínas con función desconocida identificadas, se procedió a compararlas contra la base de datos disponibles a través del uso de la herramienta BLASTP, y así determinar si mostraban identidad con alguna proteína ya reportada de otro organismo o algún dominio que pudiera dar indicios de su función. En este sentido se analizaron 26 proteínas, siete de las cuales son hipotéticas y sin dominio descrito previamente, donde cuatro de ellas solo muestran identidad con secuencias sólo de arroz (ver fig. 24).

Las 19 proteínas restantes analizadas muestran identidad con alguna proteína reportada previamente para otras plantas. En la tabla 6 se muestra en detalle el nombre de la proteína y la especie a la que pertenece, destacando *hypothetical protein SORBIDRAFT_03g027350* de *S. bicolor* con dominio TRX, *ras-related protein Rab-2-A* y *oxygen-evolving enhancer protein 1* de *Z. mays* y *GCN5-related N-acetyltransferase-like* de *O. sativa*, las cuales muestran un 100 % de identidad con las respectivas proteínas.

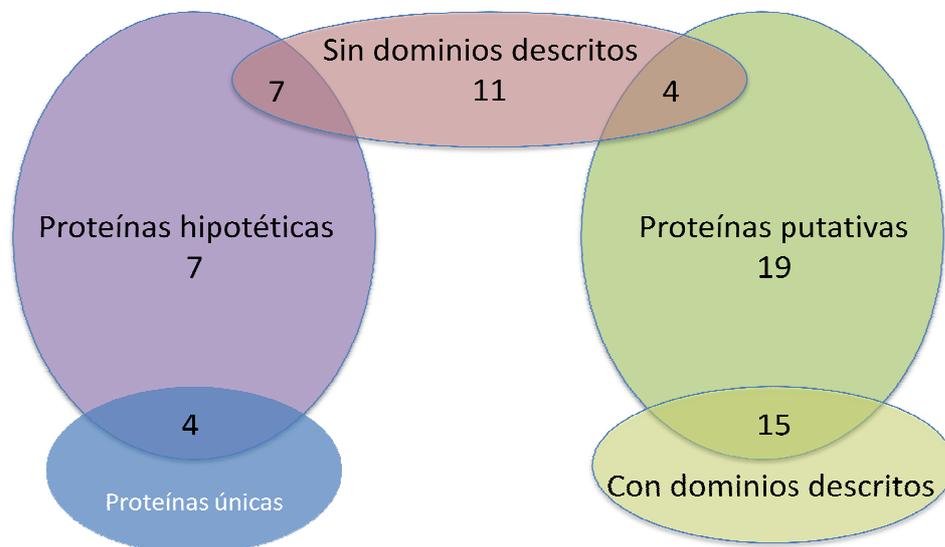


Figura 24. Distribución de las relaciones de similitud entre las proteínas desconocidas identificadas por MALDITOF. En el diagrama de Venn se muestran las distribuciones de las funciones putativas luego de analizar las secuencias de proteínas a través de BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Tabla 13: Homología de las proteínas desconocidas identificadas por MALDITOF. Las secuencias de proteínas fueron analizadas a través de BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Nº Spot	Nombre de la proteína	Homología					
		Nº acceso	Nombre de la proteína	Especie	Ident (%)	Dominio descrito	Función putativa
4	<i>Hypothetical protein osi_18237</i>	GI:195611398	<i>Splicing factor, arginine/serine-rich 7</i>	<i>Zea mays</i>	92	<i>RNA recognition motif;</i>	Traducción
10	<i>Hypothetical protein</i>	GI:254382515	<i>Glutamyl-trna reductase</i>	<i>Streptomyces sp.</i>	55	-	Traducción
14	<i>Hypothetical protein osi_04526</i>	GI:37936234	<i>Sorting nexin 1</i>	<i>Brassica oleracea</i>	80	<i>PX domains bind to phosphoinositides</i>	Señalización
16, 17 y 18	<i>Zinc finger CCCH domain-containing protein 32</i>	GI:323388897	<i>C3H-related transcription factor</i>	<i>Oryza sativa</i>	79	-	Factor de transcripción
22	<i>Os10g0395400</i>	GI:55741086	<i>Bronze-2 protein</i>	<i>Zea mays</i>	83	<i>Glutathione S-transferase (GST) family</i>	Defensa
23	<i>Hypothetical protein osi_14403</i>	GI:162457926	<i>Protein akinbetagamma-2 kinase</i>	<i>Zea mays</i>	90	<i>CBS domain</i>	Señalización
24	<i>Unnamed protein product (Vitis vinifera)</i>	GI:54291834	<i>Putative RNA polymerase II</i>	<i>Oryza sativa</i>	58	<i>DNA-directed RNA polymerase subunit A</i>	Traducción
25	<i>Os01g0791033</i>	GI:47604680	<i>Rubisco large subunit</i>	<i>Yucca aloifolia</i>	88	<i>Ribulose bisophosphate carboxylase</i>	Fotosíntesis
27	<i>Osjnba0017p10.1</i>	GI:50253sa239	<i>Pr1-like protein</i>	<i>Oryza sativa</i>	33	-	Defensa
30	<i>Hypothetical protein osj_03042</i>	GI:162462751	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor</i>	<i>Zea mays</i>	96	<i>ATP synthase subunit beta</i>	Metabolismo
34	<i>Hypothetical SELMODRAFT_230312 protein</i>	GI:21280321	<i>ZLL/PNH homologous protein</i>	<i>Oryza sativa</i>	95	<i>protein argonaute</i>	Traducción
35	<i>Os02g0586400</i>	GI:195605404	<i>Ras-related protein Rab-2-A</i>	<i>Zea mays</i>	100	<i>ras-related protein Rab-2-A</i>	Señalización
36	<i>Os01g0501800</i>	GI:195619938	<i>Oxygen-evolving enhancer protein 1</i>	<i>Zea mays</i>	100	<i>photosystem II oxygen-evolving enhancer protein 1</i>	Fotosíntesis
49	<i>Protein mago nashi homolog</i>	GI:195612480	<i>Protein mago nashi</i>	<i>Zea mays</i>	84	<i>Mago nashi protein;</i>	Traducción
53	<i>Os07g0112700</i>	GI:226500368	<i>Heat shock protein3</i>	<i>Zea mays</i>	76	<i>Blue copper-like protein, Plastocyanin-like domain</i>	Defensa

Tabla 13 (cont.): Homología de las proteínas desconocidas identificadas por MALDITOF. Las secuencias de proteínas fueron analizadas a través de BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Nº Spot	Nombre de la proteína	Homología					
		Nº acceso	Nombre de la proteína	Especie	Ident (%)	Dominio descrito	Función putativa
55	Os02g0595700	GI:226508704	<i>Elongation factor Tu</i>	<i>Zea mays</i>	39	<i>elongation factor Tu, Translation initiation factor 2</i>	Traducción
57	<i>Hypothetical protein osj_22176</i>	GI:51534983	<i>GCN5-related acetyltransferase-like</i>	N- <i>Oryza sativa</i>	100	-	Metabolismo
61	<i>Hypothetical protein osi_17569.</i>	GI:22208478	<i>Receptor-like kinase</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	94	<i>Bulb-type mannose-specific lectin</i>	Señalización
21	<i>Hypothetical protein osj_30806</i>	GI:242053557	<i>Hypothetical protein SORBIDRAFT_03g027350</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	100	<i>Thioredoxin (TRX) domain</i>	Defensa

VI. DISCUSIÓN

1 Inoculación de *M. oryzae* en hojas de arroz.

El proceso de desarrollo e invasión del hongo sobre la hoja de arroz se inicia con la germinación de la espora y la diferenciación del apresorio (Ribot et al. 2008). Una vez que el hongo ha conseguido atravesar la barrera mecánica que representa la pared celular de la célula epidérmica, las hifas comienzan a ramificarse rápidamente iniciando así la colonización hacia las células adyacentes (Berruyer et al. 2006). El proceso, entre la germinación de la espora y la penetración a la hoja transcurre en un tiempo de 2- 30 hpi (Ribot et al. 2008), resultando determinante lo que ocurra en las células adyacentes en este tiempo para lograr una respuesta de defensa, razón por la cual se consideraron los tiempos de 12, 24 y 36 hpi para el estudio.

Por otra parte, tal y como señalan Jia et al. (2003), es muy poco lo que se ha documentado con relación a la inoculación experimental de *M. oryzae* en arroz. Tanto Jia et al. (2003) como Koga et al. (2004), sugieren que el mejor protocolo para evaluar la infección por *M. oryzae* en hojas de arroz es a través del uso de fragmentos de hoja previamente cortadas de la planta. Sin embargo, estas condiciones podrían no ser similares a la que se enfrenta la planta en campo, aunado al hecho de que este tipo de metodología podría iniciar la activación de la respuesta de defensa en la planta por el daño mecánico que ha sufrido y que podría enmascarar la respuesta por el ataque del hongo *per se*. Berruyer et al. (2006) evaluaron cuatro métodos de inoculación, simulando las condiciones de campo, sin comprometer la estructura de la planta, realizando inoculaciones tanto por nebulización como por inmersión de las hojas en el inóculo, mostrando una distribución homogénea de la lesión en toda la superficie foliar. Ambas metodologías son similares a las aplicadas en este trabajo ya que no solo se ajustan a las condiciones naturales de infección, sino que además no interfieren con la pregunta biológica a responder, lo cual se registra en la fig. 6. De igual forma, los resultados obtenidos con relación a la distribución homogénea de las lesiones son similares en ambos trabajos.

2 Análisis de microarreglos para identificar posibles genes de resistencia en arroz a *M. oryzae*.

La técnica de microarreglos ha sido ampliamente utilizada en el análisis de la expresión genética global para el estudio de diversos procesos biológicos, dentro de los que destacan el estudio de los mecanismos de defensa, permitiendo la identificación de una gran cantidad de genes e incrementando el conocimiento de las vías de defensa en plantas. Sin embargo, a pesar que en muchas ocasiones los resultados de estos trabajos son un tanto difíciles de comparar debido a las diferencias en el diseño experimental y al material biológico utilizado, algunos elementos resultan comunes, donde podemos destacar que exceptuando los clásicos genes de resistencia descritos, como por ejemplo las proteínas PR, existe solo un 18% de solapamiento entre los genes identificados que se expresan de forma diferencial durante la infección por *M. oryzae* (Vergne et al. 2007), lo cual revela el poco conocimiento que se tiene de las rutas de defensa en arroz y lo lejos que estamos de conocerlas por completo.

En ese sentido, en este trabajo se abordó el estudio de microarreglos desde dos ópticas, la primera de ellas comparando plantas resistentes y susceptibles inoculadas, y la segunda comparando las plantas inoculadas contra plantas sin inocular; estudiando de esta forma la respuesta diferencial entre las isolíneas durante el ataque del patógeno para el primer caso y evaluando la evolución de la enfermedad en las plantas por efecto del patógeno para el segundo caso. Estas diferencias experimentales quedan claramente registradas cuando se observa la cantidad de genes con expresión diferencial en cada uno de ellos. Cuando se comparan los perfiles de expresión de ambas plantas inoculadas el número de genes con expresión diferencial corresponde aproximadamente al 2% (ver tabla 3), mientras que la diferencia se hace mucho más amplia al comparar entre plantas inoculadas y sin inocular, donde se registra un 26% de genes (ver tabla 5). Esto se debe a que al comparar entre isolíneas, las discrepancias entre los perfiles de expresión es consecuencia en su mayoría al efecto del fenotipo de resistencia o susceptibilidad de cada una de ellas, ya que las alteraciones que sean comunes no serán detectables por esta estrategia, corroborando así la similaridad entre el *background* genético de ambas plantas; mientras que al comparar los perfiles de expresión de las plantas inoculadas contra las sin inocular, las diferencias son mucho mayores ya que allí queda evidenciada la respuesta general que desarrolla la planta durante la infección. Este último resultado, es superior a lo reportado en algunos trabajos; por ejemplo Li et

al. (2006), obtuvieron un 12,2% de genes con expresión diferencial producto de la infección por *M. oryzae*, sin embargo, el arreglo utilizado en ese trabajo fue de ADNc y contaba con solo 9240 *EST*, por lo que con toda seguridad se está subestimando el número de genes con expresión asociadas a la resistencia.

Por otra parte, cuando se evaluó la cantidad de genes inducidos o reprimidos para cada una de las aproximaciones realizadas en este trabajo se obtuvo que al comparar las isolíneas infectadas con el patógeno entre si, la cantidad de genes inducidos era considerablemente superior que los reprimidos en todos los tiempos estudiados (ver fig. 7), mientras que cuando se contabilizaron estos mismos parámetros en los resultados obtenidos al comparar inoculadas versus sin inocular encontramos que tanto para las 12 como las 24 hpi se registra una mayor cantidad de genes inducidos, resultado que se invierte a las 36 hpi, tanto para las plantas resistentes como las susceptibles. Estos resultados difieren a los obtenidos por Restrepo et al. (2005) y Moy et al. (2004) en la interacción papa-*Phytophthora infestans* y soya-*Phytophthora sojae* respectivamente, sin embargo, esto no es de sorprenderse, ya que la activación de los sistemas de defensa en plantas varía en función del patógeno que inicie la respuesta. Li et al. (2006) quienes compararon los perfiles de expresión de arroz durante la infección de *M. oryzae* y *X. oryzae* sugieren con base en sus resultados que aparentemente la activación de la respuesta por la bacteria esta mediada por etileno, no así para el hongo, pudiendo ese resultado explicar las diferencias entre los resultados obtenidos en este trabajo y los reportados en la literatura.

A pesar de ello, cuando se revisa en detalle la distribución funcional de cada uno de los productos de los genes con expresión diferencial encontramos en ambos enfoques proteínas relacionadas con metabolismo, respuesta a estrés, y transducción de señales, además de la gran proporción de genes con función desconocida (ver fig. 11 y 16). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Li et al. (2006) en arroz durante la infección por *M. oryzae* y *X. oryzae*, así como también con los obtenidos por Swarbrick et al. (2008) quienes estudiaron el perfil de expresión global durante la interacción arroz- *Striga hermonthica* quien es una planta parasítica. Tanto esos resultados como los mostrados en este trabajo revelan los cambios dinámicos que ocurren a nivel transcripcional durante la respuesta de defensa a hongos, bacterias e incluso otras plantas que pudieran comprometer la viabilidad de la planta del arroz a pesar de las diferencias en el mecanismo de activación inicial de la respuesta.

2.1 Comparación de plantas de arroz resistentes versus susceptibles inoculadas con *M. oryzae* en el tiempo.

El estudio de la evolución de la enfermedad parece ser un punto crítico a la hora de utilizar los microarreglos como herramienta de análisis, probablemente por la gran cantidad de información que se genera de estos experimentos, y en consecuencia muy pocos autores desarrollan este tipo de comparaciones en sus publicaciones. Li et al. (2006) realizaron el estudio temporal solo en aquellos genes que sometieron al análisis de confirmación a través de qPCR; mientras que Restrepo et al. (2006) aun cuando realizaron dicho análisis, no hacen ningún señalamiento al clúster en su conjunto. Sin embargo, en este trabajo el análisis de clúster jerárquico mostró un resultado en el cual se observan 3 grandes grupos de genes que parecen mostrar una activación gradual de la respuesta (ver fig. 9). Este comportamiento sugiere que la activación de la respuesta viene dada probablemente por la activación/desactivación de cascadas de señalización lo cual es consistente con lo obtenido en la distribución de categorías funcionales mencionadas anteriormente (ver fig. 11 y 17).

En este punto es importante señalar que se logró validar los datos obtenidos por microarreglos a través de RT-qPCR para algunos de los genes seleccionados, otorgando así una excelente confianza en los resultados obtenidos.

En el clúster jerárquico mostrado en la fig. 10 se logró desglosar los genes más detalladamente en función de los cambios de expresión. Aquellos cuyas expresiones se encontraron inducidas durante las 12 hpi se agruparon en los clústeres 1 y 8 para un total de 23 genes, sin embargo, sólo el primer grupo mantiene la inducción durante las 12 primeras horas, mientras que los genes que forman parte del clúster 8 mantienen la inducción hasta las 24 hpi. Dentro del primer clúster destacan las proteínas MAP3K.6 y MAP3K.7, las cuales son activadas por la proteína serin/treonin quinasa OXI1, induciendo y/o activando a su vez diferentes genes encargados de controlar los niveles de especies reactivas de oxígeno (Mittler et al. 2004).

Dentro de este grupo también encontramos el gen que codifica para la proteína de respuesta a estrés *remorin*, asociada no solo a la respuesta de estrés por salinidad tanto en arroz, tomate y *Arapidopsis* sp. (Nohzadeh-Malakshah et al. 2007), sino también aparentemente juega un rol importante en la respuesta de defensa y en la regulación del proceso de simbiosis en legumbres (Lefebvre et al. 2010). A pesar que

se desconoce el mecanismo a través del cual ocurre la interacción, Raffaele et al. (2009) encontraron que dicha proteína está anclada en la cara interna de la membrana plasmática, así como también en los plasmodesmos, interrumpiendo el movimiento de *Potato virus X* a través de las células de la planta de tomate (Raffaele et al. 2009).

Otro gen interesante encontrado en este grupo es el que codifica para la proteína *U-box protein CMPG1*, la cual es uno de los componentes (E3) del complejo de ligasas de ubiquitina. La ubiquitinación en la célula está implicada en diferentes procesos de señalización celular, basados en la alteración de la localización, actividad e interacción de las proteínas (Hochstrasser 2009). González-Lamothe et al. (2006) encontraron que la sobreexpresión de CMPG1 en plantas de tomate potencia la intensidad de la respuesta hipersensible luego de la inducción por *Avr9*, mientras que el silenciamiento del mismo gen reduce la respuesta aumentando así la susceptibilidad. Esto sugiere que CMPG1 es esencial para defensa y resistencia en plantas, probablemente por regulación positiva, ya sea por activación de algún factor de transcripción o por degradación de reguladores negativos (González-Lamothe et al. 2006). Por otro lado, Bos et al. (2010), demostraron que el inductor *Avr3* de *Phytophthora infestans*, quien es esencial para su virulencia, es capaz de estabilizar a CMPG1 y en consecuencia suprimir la señal de defensa. De esta forma logra prosperar la infección, demostrando que CMPG1 potencialmente previene la muerte celular como parte de la respuesta hipersensible durante la infección del patógeno. Por tanto esta proteína es de acción temprana ya que es necesaria durante los inicios de la invasión, por lo que tiene sentido se induzca a las 12 hpi tal como ocurre en arroz ante el ataque de *M. oryzae*.

En este grupo también se encuentra el gen que codifica para *cysteine proteinase inhibitor*. La presencia de estos inhibidores en la planta ha sido asociada como mecanismo de defensa a insectos con el propósito de neutralizar la actividad de las enzimas proteolíticas liberadas durante el ataque, expresión que es regulada también por el estímulo del JA (Botella et al. 1996). Asimismo, Solomon et al. (1999) reportaron que el inhibidor junto con la cistein proteinasa juega un rol importante en la regulación de la muerte celular programada (MCP) en plantas activadas por estrés oxidativo, sugiriendo una mayor plasticidad en la regulación de la respuesta. Este último eslabón podría tener relación con la proteína desconocida TR038134, cuya búsqueda en la base de datos mostró homología con *senescence-associated protein-related* de *Arabidopsis* sp. (ver tabla 7). La senescencia es un tipo de MCP que ocurre de forma muy lenta y con una muy alta tasa de reciclaje de nutrientes que son

translocados desde la hoja senescente hasta otras partes de la planta como hojas jóvenes, flores y/o frutos en desarrollo u órganos de almacenaje, lo que muestra una alta coordinación a nivel molecular, bioquímico, celular y fisiológico (Munné-Bosch y Alegre 2004). Al igual que otros tipos de MCP, la senescencia puede ser activada en respuesta a factores ambientales (estrés) y factores endógenos (hormonas y ROS). Maleck et al. (2000) reportaron en *Arabidopsis* sp. la presencia dos genes de senescencia en el regulón PR1, durante la interacción incompatible con el patógeno *Peronospora parasítica*, así como también con el tratamiento por SA, mientras que Schenk et al. (2005) reportaron la conexión entre la senescencia y la respuesta de defensa en plantas. Esta relación entre ambas rutas pudiera estar asociada a los factores de transcripción de tipo WRKY, ya que algunos de los miembros de esta familia se encuentran involucrados en la regulación de la respuesta de defensa, estrés y senescencia (Ross et al. 2007).

Dentro del clúster 8, donde se encuentran los genes que mantienen su inducción hasta las 24 hpi se ubica un factor de transcripción de tipo MYB. Estos factores de transcripción han sido propuestos como reguladores del metabolismo de los fenilpropanoides, que influyen la formación de la pared celular, diferenciación celular, respuesta por señales hormonales y defensa (Kranz et al. 1998). Boter et al. (2004) reportaron dos factores de transcripción de tipo MYB como miembros del sistema de regulación de la respuesta de defensa en plantas mediada por JA. La activación de este tipo de factores de transcripción en algunos casos viene mediada por la interacción con los factores de transcripción de la familia ERF como mecanismo de regulación de la respuesta, actuando aguas abajo del proceso de señalización (Boter et al. 2004). Adicionalmente, algunas de las rutas de defensa que se activan durante esta interacción están asociada a la biosíntesis de alcaloides del tipo indol terpenoides, moléculas del metabolismo secundario en plantas (van der Fits y Memelink 2000). Dentro de este clúster también encontramos la enzima *asparagine synthetase*, la cual participa en la ruta de síntesis de la asparagina a partir del aspartato. Lo que llama la atención de esta enzima es no solo el hecho que está asociada al metabolismo de aminoácidos sino que también se encuentra involucrada en el transporte de nitrógeno en la planta, mostrando una gran relevancia durante la senescencia en base a la inducción de su expresión durante dicho proceso (Buchanan-Wollaston 1997, Colebatch et al. 2002).

Aquellos genes que mostraron una inducción a las 24 hpi se encuentran agrupados en los clústeres 4, 9 y 10. Para el caso del clúster 4, esa inducción se

registra únicamente a las 24 hpi, ya que antes y después de ese momento los genes se encuentran reprimidos. Dentro de este grupo encontramos sólo 3 genes, dos de los cuales presentan función desconocida, siendo TR065984 único en arroz. Por su parte, el gen desconocido TR031668 mostró homología con la enzima *raucaffricine-O-beta-D-glucosidase*, la cual participa en la ruta de biosíntesis de metabolitos secundarios del tipo terpenoides e indoles que juegan un rol importante en la defensa de la planta. La acumulación de terpenoides ha sido asociada con el incremento de la resistencia en cultivares de arroz susceptibles y parcialmente resistentes a *M. oryzae* (Dillon et al. 1997), así como también en otras plantas como es el caso del árbol picea de Noruega (*Picea abies*) contra la infección por el hongo *Ceratocystis polonica* (Zeneli et al. 2006). Más aún, Rodrigues et al. (2004) reportaron la potenciación de la resistencia en arroz contra *M. oryzae* por efecto del silicio a través de la acumulación de fitoalexinas tipo diterpenoides.

Dentro del clúster 9 encontramos genes cuya expresión se induce a las 24 hpi y se mantiene hasta las 36 hpi. Dentro de este grupo destacan genes miembros de familias que ya fueron descritos anteriormente como un factor de transcripción de la familia WRKY, y el precursor del inhibidor de la cistein proteínasa, lo cual evidencia la continuidad en la respuesta. Además, encontramos algunas proteínas de respuesta a estrés como por ejemplo *lectin-like receptor kinase*; en *Arabidopsis* sp. estas proteínas han sido extensamente estudiadas y caracterizadas con base en su secuencia, dominios y perfiles de expresión, logrando asociarlas a determinados tejidos y estadio del desarrollo, así como también a una amplia gama de señales que van desde la respuesta a estímulos hormonales hasta interacción con inductores durante el ataque de patógenos, con la subsecuente activación de las cascadas de señalización aguas abajo (Bouwmeester y Govers 2009). En arroz ha sido caracterizada una *lectin-like receptor kinase* tipo B, la cual confiere resistencia contra un aislado de *M. oryzae* (Chen et al. 2006). Estos autores, además de localizar la proteína en la membrana plasmática, caracterizaron un bolsillo hidrofóbico dentro del dominio de lectina, el cual es capaz de unirse a ligandos hidrofóbicos como fitohormonas o inclusive a moléculas hidrofóbicas derivadas del patógeno (Chen et al. 2006). Estas moléculas podrían ser productos liberados a consecuencia de la actividad de las enzimas hidrolíticas del patógeno o moléculas patógeno-específicas liberadas durante la infección, lo cual activaría la respuesta de defensa en la planta aun cuando todavía se desconoce la ruta involucrada.

Otra de las proteínas de respuesta a estrés ubicada en este grupo es *disease resistance protein* RGA4, la cual es una isoenzima de la shikimato quinasa, quien cataliza la fosforilación de la molécula de shikimato con el gasto de una molécula de ATP (EC 2.7.1.71). La vía de shikimato es la responsable de la biosíntesis de los compuestos aromáticos en plantas, bacterias, hongos y apicomplexas, donde el último compuesto de la ruta, el corismato, es el eslabón común entre las rutas de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano; Kasai et al. 2005) siendo su regulación a nivel de expresión génica, a diferencia de bacterias y hongo donde ocurre por inhibición (Schmid y Amrhein 1995). En plantas superiores, los aminoácidos aromáticos producidos por esta ruta son utilizados en su mayoría como precursores de algunos metabolitos secundarios como son el ácido indolacético (auxina), fenilpropanoides y flavonoides (Kasai et al. 2005). La expresión del gen, así como también la actividad enzimática de esta proteína en arroz fue verificada por Kasai et al. (2005) durante el desarrollo de la panícula. Estos autores también mostraron una inducción en los niveles de expresión por efecto de un análogo de la quitinasa, sugiriendo que esta proteína puede contribuir a la respuesta de defensa en arroz. El producto final de la vía del shikimato, el corismato, es convertido a isocorismato por la enzima isocorismato sintasa (ICS). Esta última también ha sido asociada a defensa en plantas ya que es una de las enzimas que participa en la biosíntesis del SA, mediador de la respuesta sistémica adquirida (SAR por su siglas en inglés; Wildermuth et al. 2001). Estos autores también señalan que el tiempo de inducción de esta enzima es similar a la acumulación del SA luego del ataque de un patógeno, y que también se encuentra correlacionado con la expresión de la proteína PR1, quien es un marcador de SAR (Wildermuth et al. 2001). Estos resultados son consistentes con los obtenidos en este trabajo, ya que PR1 se encuentra inducida a las 24 hpi (clúster 10). Wildermuth et al. (2001) también reportaron el enriquecimiento de cajas W en la región promotora de la enzima ICS, así como regiones de unión a MYB, lo cual sugiere que este gen está altamente regulado, probablemente con varios puntos de control. Dentro del clúster 9 también encontramos un gen que codifica para *auxin efflux carrier component*, lo que sugiere que efectivamente hay una activación de la vía del shikimato con una subsecuente producción de auxinas como respuesta al ataque del patógeno, y que además, esta respuesta es mucho mayor en plantas resistentes que en las susceptibles.

Dentro del clúster 10, donde se agrupa la proteína PR1, también encontramos dos genes con función desconocida y el gen que codifica para la proteína *dirigent* (DIR). Esta última está involucrada en el proceso de biosíntesis de lignanos a través

de la formación de la molécula precursora (+)-pinoresinol a partir del alcohol coniferílico, reacción que es catalizada tanto por una oxidasa como por dicha enzima (Davin y Lewis 2000). Los lignanos son polifenoles derivados del metabolismo de la fenilalanina que están asociados a la defensa en plantas gracias a su actividad biocida y antioxidante (Davin y Lewis 2000). Ralph et al. (2006) reportaron la inducción de la expresión de los genes que codifican para las proteínas de la familia DIR tanto por efecto del ataque por insectos como por heridas causadas de forma mecánica en *Sitka spruce*. Asimismo, los autores señalan que el rol de estas proteínas en la defensa de la planta está asociado en primer lugar a la producción constitutiva de metabolitos secundarios tipo fenólicos y en segundo lugar a la generación de precursores de lignina y lignanos con la finalidad de reparar las células dañadas luego de un ataque y/o fortalecer las paredes de forma de servir como barrera mecánica contra futuros ataques (Ralph et al. 2006). En arroz, esta proteína sólo ha sido identificada durante el proceso de dehiscencia de las anteras bajo estrés por calor, donde a pesar de no mostrar diferencias significativas en los niveles de expresión entre plantas tolerantes y altamente susceptibles, los autores asocian la presencia de la proteína con bajos niveles de polen (Jagadish et al. 2010).

Finalmente, los genes que se encuentran inducidos a las 36 hpi se agrupan en los clústeres 2, 5 y 7. Dentro del clúster 2 y 7 encontramos 2 genes que codifican para *pirin protein* (TR043675 y TR060847). Esta proteína ha sido descrita en humanos como un factor de transcripción, sin embargo, en plantas cumple una función diferente, interaccionando con la sub-unidad α de la proteína G (Lapik y Kaufman 2003). Esta interacción podría constituir un punto de regulación de la activación de la respuesta de defensa, considerando que la proteína G ha sido asociada con la resistencia a *M. oryzae* en arroz, a través de la activación de la sub-unidad α (Assmann 2005). Dentro del clúster 2 también encontramos al gen que codifica para *zinc finger, C3HC4 protein*. Esta proteína, quien también es un componente (E3) del complejo de ligasas de ubiquitina (Joazeiro y Weissman 2000), ha sido identificada durante la interacción de arroz y *M. oryzae*, sin embargo los autores no señalan el mecanismo a través del cual esta proteína pudiera participar en la resistencia (Vergne et al. 2007). En este mismo clúster encontramos el gen que codifica para *E3 ubiquitin ligase*, quien sumado al gen que codifica para la proteína CMPG1 inducido a las 12 hpi, lo cual sugiere que efectivamente la planta está recurriendo a la ubiquitinación como mecanismo de señalización ante el ataque de *M. oryzae*.

Dentro del clúster 2 encontramos al gen que codifica para *jacalin-like lectin domain containing protein*. Tal y como se mencionó anteriormente, las proteínas tipo lectinas son un grupo altamente heterogéneo y están asociadas con una gran variedad de procesos metabólicos mediados a través de su interacción con carbohidratos específicos, siendo su función central ser mediadores en la transferencia de la información a través de la interacción con glicoproteínas, glicolípidos y oligosacáridos (Ma et al. 2010, Raval et al. 2004). Ma et al. (2010) evaluaron la sobreexpresión de *jacalin-like lectin gene* de trigo en plantas de tabaco, encontrando un incremento significativo en la resistencia a bacterias, hongos y virus, por lo que los autores sugieren que esta proteína otorga resistencia de amplio espectro, aun cuando probablemente la activación de la respuesta no se deba a la interacción directa entre la proteína y los diferentes patógenos, sino que ocurra a través de la activación de la vía del JA. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Chisholm et al. (2000), quienes sugieren que la presencia de esta proteína bloquea el movimiento del *Tobacco etch virus* en tabaco, ya sea por la interacción de la lectina tipo jacalina con las proteínas del virus requeridas para el movimiento o por el establecimiento de una respuesta sistémica, con lo cual la proteína estaría potencialmente involucrada con la recepción, generación o transporte de la señal a nivel sistémico (Chisholm et al. 2000). En arroz, esta proteína ha sido identificada al estudiar el secretoma de células en cultivo luego de ser expuestas contra *M. oryzae*, sin embargo los autores no hacen ningún señalamiento en relación al rol que pudiera jugar esta proteína en la defensa de la planta (Kim et al. 2009). En el mismo trabajo, también se identificó la proteína con dominio *Duf26*, la cual forma parte de una familia conformada por proteínas no caracterizadas, como consecuencia de la gran cantidad de información derivada de la secuenciación de genomas (Kim et al. 2009). Kim et al. (2009) evaluaron no solo la presencia de la proteína en el secretoma sino que también verificaron la expresión en hojas de plantas resistentes y susceptibles inoculadas con *M. oryzae* a través de RT-PCR, encontrando que los niveles de expresión incrementaban a lo largo del tiempo, alcanzando un máximo a las 48 hpi. Esos resultados son consistentes con los obtenidos en el presente trabajo, donde se identificó al gen que codifica para la proteínas *DUF26 kinases* a las 36 hpi (clúster 5). La función de esta proteína aun no ha sido descrita, sin embargo, en trabajos previos del mismo grupo se ha determinado la inducción del gen *Duf26* luego de la exposición con el JA (Kim et al. 2004, Kim et al. 2003), lo cual sugiere que la activación de dicha proteína puede ser a través de la vía JA.

En el clúster 5, encontramos al gen que codifica para la proteína *Os/AA25*, la cual es miembro de la familia Aux/IAA conformados por represores transcripcionales que modulan la respuesta a las señales por auxinas (Kim et al. 1997). En el modelo de señalización por auxinas, las proteínas Aux/IAA se unen a las proteínas ARF (por sus siglas en inglés *auxin response factor*) en las regiones promotoras, reprimiendo la expresión en niveles bajos de auxinas; sin embargo, cuando los niveles aumentan también lo hace la afinidad del complejo multiproteico SCF, el cual es una ligasa de ubiquitina tipo E3, por los factores Aux/IAA, conduciendo así a su ubiquitinación y posterior degradación, dejando libre a ARF para poder activar la expresión génica (Calderon-Villalobos et al. 2010, Remington et al. 2004). Este resultado, y la presencia de proteínas tipo E3 en el mismo clúster le dan fortaleza a la hipótesis que sugiere una regulación de la respuesta de defensa asociada a la ubiquitinación durante el ataque por *M. oryzae*.

En el clúster 7 encontramos al gen que codifica para *glycine-rich protein A3*. Las proteínas de esta familia han sido relacionadas tanto con estrés de tipo abiótico en *Arabidopsis* sp. y arroz (Kim et al. 2010) como biótico entre el modelo arroz-*Rhizoctonia solani* (Zhao et al. 2008). Sin embargo aun cuando en ambos trabajos se indica la relevancia de dicha proteína, en ninguno se señala el mecanismo a través del cual pudiera estar asociada la resistencia para ambos tipos de estrés. No obstante, Liu et al. (2008) identificaron en lirio (*Lilium formosanum*) la inducción de proteínas de esta familia durante la infección por el hongo *Botrytis elliptica*, asociando la activación de dicha respuesta vía SA. Una proteína tipo *glycine-rich* fue aislada a partir de semillas de guayaba (*Psidium guajava*), identificándose una actividad inhibitoria del crecimiento en bacterias gram-negativas (Pelegri et al. 2008), sugiriendo que efectivamente puede participar como proteína de defensa en plantas. En este trabajo, la expresión de este gen fue uno de los seleccionados para ser verificado a través de RT-PCR, encontrándose que los niveles de ARNm son considerablemente mayores en plantas resistentes que susceptibles, con lo cual podríamos sugerir que esta proteína está probablemente asociada con el fenotipo de resistencia.

Adicionalmente a los clústeres ya descritos, encontramos al 6 y 3, los cuales mantienen su inducción y represión respectivamente, a lo largo de todo el tiempo de estudio. Dentro del primer clúster están agrupados seis genes, tres de los cuales ya se ha mencionado anteriormente su relevancia dentro del establecimiento de la respuesta de defensa como son: el gen que codifica para una la proteína de respuesta a auxina, el gen que codifica para la proteína *zinc finger*, *RING-type* y el gen que codifica para la

proteína CMPG1. Asimismo, encontramos al gen que codifica para *AP2 domain containing protein*, el cual es un factor de transcripción de la familia APETALA2, quienes además de tener un rol central en el proceso de floración (Kim et al. 2006), también están asociados a la regulación de la expresión de algunos genes de resistencia tipo PR a través de la unión a la caja GCC presente en las regiones promotoras de dichos genes (Singh et al. 2002).

En ese mismo grupo encontramos dos proteínas desconocidas, TR040403 y TR042768. Ambas secuencias mostraron identidad con proteínas reportadas para otros organismos. En el caso de TR040403, la identidad mostrada fue contra la proteína RTFL5. Miembros de esta familia han sido asociados con la polaridad del crecimiento y proliferación celular durante el crecimiento de la hoja en *Arabidopsis* sp. (Narita et al. 2004), sin embargo, no ha sido reportada ninguna asociación con resistencia. Por su parte, el producto del gen TR042768 mostró identidad con *tripartite motif-containing protein 9*. Las proteínas de esta familia TRIM/RBCC deben su nombre por la presencia de tres dominios unidores de zinc en su secuencia (RING, caja-B y región *coiled-coil*) y están involucradas en diferentes procesos biológicos en animales como neurogénesis, inmunidad innata, tumorigénesis y respuesta viral (Reymond et al. 2001, Song et al. 2011). Específicamente, TRIM9 exhibe una actividad ligasa de ubiquitina tipo E3 en *Caenorhabditis elegans* (Song et al. 2011), sin embargo, aun cuando aparentemente estas proteínas no se encuentran en *Arabidopsis* sp.; sí han sido descritas las interacciones de proteínas con dominios unidores de zinc como los que se mencionan, en diferentes rutas como el proceso de regulación luz-dependiente, lo cual sugiere que los mecanismos pudieran ser similares (Datta et al. 2008). Pese a esto, no hay ningún reporte de proteínas de este tipo asociados a mecanismos de resistencia, a excepción de los dominios ya mencionados.

El clúster 3 agrupa los genes cuyos niveles de expresión se mantienen reprimidos durante todo el estudio. En él encontramos sólo 3 genes, resultando interesante el que codifica para *cytochrome P450*. Las proteínas de esta familia son responsables de varias reacciones oxidativas, y en plantas superiores juegan un rol crucial en la biosíntesis de una gran variedad de compuestos lipofílicos como ácidos grasos, esteroides, fenilpropanoides, terpenoides, fitoalexinas y giberilinas (Narusaka et al. 2004).

2.2 Comparación del curso temporal de la infección en plantas de arroz resistentes y susceptibles inoculadas versus sin inocular con *M. oryzae*.

La comparación entre plantas inoculadas y sin inocular nos da una referencia de la respuesta de la planta ante el ataque del patógeno. Es por ello que aquellos genes donde las diferencias en los perfiles de expresión sean más marcadas entre plantas resistentes y susceptibles, podrían estar asociados al fenotipo de resistencia. Dentro de los nodos con expresión inducida para las plantas resistentes y reprimidas en susceptibles encontramos un total de diecinueve genes (ver fig.15). Uno de los genes identificados es el que codifica para *WD-40 repeat family protein*. Las proteínas pertenecientes a este grupo han sido asociadas con la organización de los microtúbulos durante la división de la pared celular en *A. thaliana* (Zeng et al. 2009). Kiss et al. (2009) identificaron en *Medicago truncatula* y *Lotus japonicus* a la proteína LIN, la cual está asociada a la infección por rizobios en legumbres. El análisis de la secuencia de esta proteína sugiere que presenta una actividad tipo ligasa de ubiquitina E3, con lo cual los autores proponen que esta proteína es un regulador de la transducción de señales en el proceso de nodulación a través de la eliminación de componentes claves como factores de transcripción a través de la ubiquitinación (Kiss et al. 2009). Por su parte, Lee et al. (2010) reportaron una proteína tipo WD-40, BnSWD1, en *Brassica napus* que está involucrada en el estrés por salinidad, y cuya activación parece ser dependiente de la vía del ABA.

Otro de los genes identificados fue el que codifica para la proteína *LTPL162*, la cual es miembro de la familia de las proteínas de transferencia de lípidos (LTP por sus siglas en inglés). Las proteínas de este grupo han sido implicadas en diferentes procesos del desarrollo en plantas como son transporte de cutina y distensión de la pared celular. En tabaco, proteínas miembros de esta familia han sido asociadas, no solo al proceso de extensión de la pared celular en meristemas (Nieuwland et al. 2005), sino también con el incremento de la resistencia contra *Phytophthora parasitica* a través de la interacción ligando proteína modulando así la respuesta a través de la vía JA (Buhot et al. 2004). Estudios realizados por Sarowar et al. (2009) demuestran que la respuesta de defensa a través de LTP1 está asociada a la activación de la respuesta de resistencia inducida, con lo cual esta proteína estaría implicada en la señalización sistémica de la planta. Krasikov et al. (2011) estudiaron las proteínas del xilema de plantas de tomate, encontrando un descenso en la abundancia de la proteína XSP10 durante la infección por *Fusarium oxysporum*, la cual muestra similitud estructural con la familia LTP. La sobreexpresión de esta proteína en el

xilema de raíces y tallos aumenta la resistencia de la planta ante el ataque del patógeno, aparentemente por su actividad antimicrobiana, sin embargo, el silenciamiento del gen causa que la planta no muestre síntomas de la enfermedad, por lo que los autores sugieren que XSP10 es necesaria para una completa susceptibilidad, probablemente como proteína blanco del hongo o como componente de la vía de señalización implicada en la activación de la defensa.

Dentro del segundo grupo de genes encontramos 5 cuya expresión se encuentra inducida en las plantas resistentes durante las 24 hpi, no así en las plantas susceptibles. Dentro de este grupo destaca la presencia del gen que codifica para *receptor protein kinase CRINKLY4*. Esta proteína es un *receptor-like* quinasa (RLK por sus siglas en inglés) que media la diferenciación celular durante el desarrollo del endospermo y plántula de forma análoga como lo hacen los receptores de factores de crecimiento en animales iniciando cascadas de fosforilación que conducen a un cambio en la actividad de la célula (Becraft et al. 1996, Becraft et al. 2001). Lo interesante de esta familia de proteínas es que han sido agrupadas en dos categorías: la primera incluye las RLK que están involucradas en el control del crecimiento y desarrollo de la planta como es el caso de *CRINKLY4* y la segunda categoría contiene las RLK involucradas en la interacción planta-microbio y respuesta de defensa, siendo Xa21 uno de sus miembros (Shiu et al. 2004). En este sentido sería interesante indagar porque aun cuando *CRINKLY4* aparentemente está involucrada con el crecimiento y desarrollo de la planta, su expresión se ve alterada ante el ataque de *M. oryzae*.

Otro de los genes ubicados en este grupo es el que codifica para *nodulin mtn3 family protein*. Los miembros de esta familia han sido extensamente estudiados en legumbres por su participación en el crecimiento, desarrollo y formación de nódulos durante el proceso de simbiosis (El Yahyaoui et al. 2004, Ren et al. 2005). Adicionalmente, Chu et al. (2006) identificaron al gen Xa13, el cual codifica para una proteína desconocida que muestra homología con *mtn3* (50 %) y que en condición de homocigoto recesivo otorga resistencia en arroz contra *X. oryzae* a través de un mecanismo diferente al cual lo hace Xa21. En un trabajo posterior, el mismo grupo encontró que a pesar que el producto de ambos genes es idéntico, una delección en la región promotora del gen recesivo evita su expresión durante la infección, haciendo a la planta resistente (Chu et al. 2006b). Esos resultados se contradicen con los obtenidos en este trabajo, donde se observa una inducción de la expresión en plantas resistentes, sin embargo, a pesar de haber una identidad del 70 % entre ambas

secuencias (datos no mostrados), podríamos sugerir que esta proteína juega un papel diferente durante la interacción por *M. oryzae*, lo cual es apoyado por Li et al. 2006, quienes señalan que la vía de activación de la respuesta de defensa para bacterias y hongos es diferente.

En el tercer grupo encontramos 6 genes, cuya expresión se induce a las 24 hpi, dentro del que destaca el gen que codifica para *ent-kaurene synthase*, enzima que participa en la ruta de biosíntesis de giberilinas (GA). Las giberilinas son fitohormonas que juegan un papel importante en el crecimiento de la planta, además de ser requeridas durante la germinación de la semilla y formación y desarrollo de anteras, semillas, flores y frutos (Tanaka et al. 2006). La ruta de biosíntesis, así como su catabolismo y regulación está ampliamente descrita en la literatura (Grennan 2006, Hedden y Kamiya 1997, Olszewski et al. 2002). Traw y Bergelson (2003) encontraron que tanto el GA como el JA tienen un efecto sinérgico sobre la formación de tricomas, células especializadas que tienen entre sus funciones otorgar resistencia ante el ataque de insectos. Por su parte, Tanaka et al. (2006) reportaron en plantas mutantes enanas insensibles al GA (*gid1* por sus siglas en inglés) la sobreexpresión del gen de resistencia PBZ1, quien no solo muestra una inducción por la infección con *M. oryzae* en plantas silvestres sino también por aplicación exógena del GA, resultados que sugieren que la expresión de PBZ1 es regulada tanto por el estímulo a estrés como por la señal del GA. Adicionalmente, Peters (2006) señala que el arroz produce un gran número de fitoalexinas en respuesta al ataque por *M. oryzae*, las cuales forman parte de la familia de los diterpenos tipo labdano. Xu et al. (2007) caracterizaron funcionalmente la familia de genes *ent-kaurene synthase* en arroz y encontraron que varias de estas enzimas están involucradas en la biosíntesis de fitoalexinas. Así mismo, al analizar las regiones promotoras de dichos genes encontraron dominios específicos conservados que pudieran estar implicados en la regulación transcripcional durante la respuesta de defensa en arroz (Xu et al. 2007).

En ese mismo grupo también encontramos al gen que codifica para la proteína con función desconocida *ACT domain containing protein*, quien muestra un 99 % de identidad con la proteína ACR8 de *A. thaliana*. Los dominios ACT son dominios estructuralmente conservados que están involucrados en la unión a pequeños ligando como aminoácidos (Hsieh y Goodman 2002). Hsieh y Goodman (2002) caracterizaron molecularmente algunas proteínas tipo ACT, encontrando que los niveles de ARNm de ACR8 incrementan de forma drástica y temprana por efectos del tratamiento con ABA y por estrés salino. Por su parte, Verhagen et al. (2004) estudiaron el transcriptoma de

plantas de *Arabidopsis* sp. con resistencia sistémica inducida por rizobacterias durante la infección con *P. syringae* encontrando una inducción en la expresión de 81 genes dentro de los que se encuentra el que codifica para *ACT domain-containing protein*, sin embargo, los autores no hacen ninguna referencia a cómo esta proteína pudiera estar implicada con la respuesta de defensa (Verhagen et al. 2004).

En el cuarto y último grupo tenemos 29 genes cuya expresión se encuentra inducida en las plantas susceptibles a las 24 hpi, pero sin variaciones significativas en las plantas resistentes para el mismo tiempo. La mayoría de genes presentes en este grupo codifican para genes con función desconocida (18), seguido del metabolismo con seis (6) representantes. Según Ribot et al. (2008), el disparo de la respuesta de defensa durante las interacciones compatibles representa más de la mitad de los genes inducidos en plantas sometidas a interacciones incompatibles pero con mucha menor intensidad. De hecho, los resultados obtenidos por Jantasuriyarat et al. (2005) muestran que la respuesta transcripcional de las plantas susceptibles a las 24 hpi es mucho más parecida a la respuesta de las plantas resistentes a las 6 hpi. En este sentido pudiera resultar interesante comparar la información obtenida a las 24 hpi en plantas susceptibles con tiempos más tempranos de plantas resistentes y así corroborar el posible retraso en la activación de la respuesta de defensa, la cual es imposible de determinar con los datos disponibles.

3 Genes candidatos y su relación con QTLs.

La gran devastación en los cultivos provocada por una gran diversidad de plagas ha servido por muchos años como estímulo a los mejoradores agrícolas para buscar fuentes de resistencia durables en la planta, para así prescindir en lo posible de los controles químicos usados en campo. En este sentido, en arroz ha habido un considerable progreso en la búsqueda de genes de resistencia, cuya caracterización y análisis han proporcionado una gran cantidad de herramientas como marcadores moleculares que han sido incorporados a los programas de mejoramiento. Así mismo, estos marcadores moleculares han sido utilizados con la finalidad de ubicar QTLs que otorguen la tan codiciada resistencia de amplio espectro que podría otorgarle a la planta la capacidad de responder el ataque de cualquier patógeno o insecto. Sin embargo, la desvinculación entre el QTL y el conocimiento de quien lo integra es lo que ha retrasado los potenciales aportes que tiene para ofrecer este tipo enfoque. En ese mismo orden de ideas, algunos investigadores han tratado ir un paso más allá y

abordar los QTLs no sólo desde el punto de vista agronómico sino a través de la identificación de potenciales genes candidatos (Hu et al. 2008).

Inspirados en esa idea, en este trabajo quisimos integrar los resultados obtenidos por el análisis de microarreglos y relacionar los potenciales genes candidatos con la información disponible en la base de datos de QTLs en *Gramene* (<http://www.gramene.org/>). La búsqueda de los QTLs de estrés biótico asociados a los locus de los genes identificados permitió identificar 199 QTLs asociados con resistencia a *M. oryzae*, *R. solani*, *X. oryzae pv oryzae*, RYMV, *N. lugens* y *Sogatella furcifera*, tal y como se observa en la fig. 17 donde la mayor proporción está representada por el patógeno estudiado en este trabajo.

El solapamiento de los locus de los genes identificados sobre los cromosomas mostró regiones altamente concentradas como las que se observan en los cromosomas 1, 3 y 8 (ver fig. 18). Esta concentración de genes de resistencia ya ha sido reportada previamente por algunos autores, quienes señalan que la distribución de algunos genes de resistencia se concentra en ciertas regiones de los cromosomas, particularmente en el 6, 11 y 12 (The Rice Chromosomes 11 and 12 Sequencing Consortia 2005, Monosi et al. 2004). Sin embargo, la búsqueda de los genes de resistencia en estos trabajos está sesgada hacia ciertos genes como por ejemplo los miembros de la familia NBS-LRR, mientras que los resultados mostrados en la fig. 18 son producto del análisis de los perfiles de expresión totales de la planta durante la respuesta a *M. oryzae*. Esta visión general sobre la respuesta de la planta permite además identificar nuevos actores que hasta ahora no habían sido asociados a la respuesta por estrés biótico. Esta opinión es compartida por Ballini et al. (2008), quienes explican que esa colocación pudiera ser resultado de la descripción de alelos del mismo gen en diferentes cultivares, descripción del mismo gen en diferentes estudios, o inclusive una pobre resolución de mapeo.

Finalmente, resulta interesante que más del 70 % de los loci identificados estén asociados a 2 o más QTLs de estrés biótico, no sólo a *M. oryzae*, sino también de resistencia a otros patógenos e insectos indicando que posiblemente estos genes pudieran estar asociados a más de un tipo de respuesta.

4 Análisis de los perfiles de proteínas para identificar posibles proteínas de resistencia en arroz a *M. oryzae*

En la era post-genómica, la proteómica ha ido incrementando su importancia, debido a que juega un papel esencial en el análisis sistemático del patrón de expresión de proteínas de un determinado tejido, estado del desarrollo o condición. Al igual que para el caso de microarreglos, la proteómica ha sido utilizada para determinar cuáles proteínas están asociadas a la respuesta de defensa en plantas, permitiendo estudiar el complejo entramado de señalización y respuesta ante el ataque de *M. oryzae* (Kim et al. 2004, Kim et al. 2003, Kim et al. 2009), por lo que más allá de resultar redundantes, han ido contribuyendo a generar más conocimiento acerca de los mecanismos moleculares de resistencia, como consecuencia del uso de una gran diversidad de material biológico tanto de la planta como de los patógenos utilizados.

4.1 Comparación entre los proteomas de plantas resistentes y susceptibles sin inocular.

Un primer análisis de los perfiles de expresión de proteínas foliares de plantas de arroz tanto resistentes como susceptibles sin inocular mostró pequeñas diferencias entre ellos (ver fig.20). Estos resultados son consistentes con lo esperado, ya que al trabajar con plantas isolíneas, se espera que su *background* genético sea similar. Este material biológico resulta ideal para el análisis masivo de perfiles de expresión de genes y proteínas como los que se muestran en este trabajo, ya que reduce la complejidad del experimento al hacer más evidente aquellos genes y proteínas producto de la interacción planta-patógeno.

4.2 Comparación entre los proteomas de plantas resistentes y susceptibles durante la infección por *M. oryzae*.

Para el estudio de los perfiles de expresión de proteínas de las plantas resistentes y susceptibles, el abordaje del análisis de los resultados está enmarcado en el diseño experimental mostrado en la fig.5. En este sentido, al igual que para el ensayo de microarreglos, la comparación de los perfiles de expresión de proteínas está enmarcada en dos enfoques, la primera entre plantas inoculadas resistentes versus susceptibles, y la segunda en plantas tanto susceptibles como resistentes inoculadas versus sin inocular. De esta forma podemos obtener información en cuanto al diferencial en la respuesta de defensa entre resistentes y susceptibles a partir de la

primera comparación, así como también determinar cómo cambia el patrón de expresión de proteínas por efecto del patógeno y la evolución de la enfermedad a partir de la segunda comparación.

El análisis de los perfiles de expresión de proteínas en el tejido foliar de las plantas resistentes comparadas con los perfiles de las susceptibles mostró un incremento en la cantidad de proteínas con expresión diferencial a medida que transcurre el tiempo, revelando además para todos los casos, una mayor proporción de proteínas con expresión inducida que reprimida (ver fig. 21). Esto sugiere una respuesta diferencial por inducción entre ambas plantas a la presencia del patógeno. De igual manera, estos resultados son consistentes con los obtenidos por Mahmood et al. (2006) quienes al estudiar interacciones compatibles e incompatibles de arroz con *X. oryzae*, encontraron que la mayor proporción de proteínas con expresión diferencial se obtenían en las interacciones incompatibles, por lo que los autores sugieren un reordenamiento en las vías relacionadas con el metabolismo y la obtención de energía durante la respuesta de defensa en la planta. Estas variaciones en el perfil de proteínas durante la infección por *M. oryzae* también han sido reportadas por Tsunozuka et al. (2005) en plantas de arroz mutantes *cdr2* y en los trabajos de Ventelon-Debout et al. (2004) al estudiar el proteoma de plantas de arroz inoculadas con RYMV, lo cual sugiere que en la planta ocurren cambios dinámicos a nivel del proteoma durante la respuesta tanto a hongos, como virus y bacterias. No obstante, es necesario identificar dichas proteínas para determinar con exactitud que vías metabólicas o de señalización están siendo alteradas durante la infección por *M. oryzae*.

4.3 Análisis de los proteomas de plantas resistentes y susceptibles durante la infección por *M. oryzae*.

Desde el segundo enfoque se procedió a comparar las imágenes de los geles obtenidos para los diferentes tiempos contra el respectivo control sin inocular tanto para las plantas resistentes como susceptibles. Tal y como se observa en las fig. 22a y 22b, en todos los tiempos estudiados tanto en plantas susceptibles como resistentes hay una mayor proporción de proteínas con expresión inducida que reprimidas, destacando que para el caso de las plantas resistentes esta magnitud es mayor en número de proteínas, lo que constituye una evidencia de la respuesta diferencial entre las plantas ante el ataque del patógeno.

Con base en las diferencias en los perfiles de expresión, 76 *spots*, 38 de ellos correspondientes a las plantas resistentes y 38 a las susceptibles fueron seleccionados con la intención de identificarlos a través de espectrometría de masas tipo MALDITOF, diferencias que en algunos casos se reflejó inclusive en su desaparición con respecto al control (ver tablas 8 y 9), esto con la finalidad, tal y como se mencionó anteriormente, de identificar con exactitud que vías metabólicas o de señalización están siendo alteradas durante la infección por *M. oryzae*.

4.4 Identificación de las proteínas relacionadas con la resistencia a *M. oryzae* a través de MALDI-OTOF MS.

A partir de los *spots* seleccionados se lograron obtener las huellas peptídicas para 36 de las 38 muestras analizadas, encontrando que más de la mitad de ellas mostraba coincidencia con proteínas de función desconocida (58,4%), mientras que el restante se encuentra distribuido en funciones como defensa, metabolismo, transporte y fotosíntesis.

Dentro de las proteínas con función conocidas identificadas encontradas únicamente en las plantas resistentes destaca la presencia de *cysteine proteinase inhibitor 1*, la cual también fue identificada a través de microarreglos, mostrando en ambos experimentos una inducción a las 12 hpi con una posterior represión durante las 24 y 36 hpi. Esta proteína, tal y como se mencionó anteriormente ha sido asociada al mecanismo de defensa a insectos con el propósito de neutralizar la actividad de las enzimas proteolíticas liberadas durante el ataque, expresión que es regulada también por el estímulo del JA (Botella et al. 1996).

En este grupo también se identificó la proteína *maturase K*, involucrada en el corte y empalme de los intrones tipo II de los ARNm, regulando así la transcripción génica en cloroplastos (Zoschke et al. 2010). Garavaglia et al. (2010) evaluaron el efecto de una molécula tipo péptido natriurético del patógeno *X. axonopodis* pv. *citri* sobre el proteoma de plantas de naranja (*Citrus sinensis*), encontrando que el mismo actúa de forma antagónica al ABA, siendo capaz de reprimir la expresión de factores de corte y empalme como la proteína *maturase K*, lo cual se relaciona con los resultados obtenidos en este trabajo, donde aun cuando hay una inducción en la expresión de la proteína durante las primeras 24 hpi, dicha expresión se reprime por completo para las 36 hpi probablemente por efecto del ataque del patógeno. No obstante, aun cuando la expresión de esta proteína se ha encontrado alterada en otras

plantas durante la respuesta de defensa (Xingquan et al. 2010), ésta aun no ha sido asociada al mecanismo de resistencia *per se*.

Por otra parte, para aquellas proteínas que mostraron una función desconocida se realizó una comparación de sus secuencias aminoacídicas contra las disponibles en el banco de NCBI accediendo través de BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Esta comparación permitió identificar algunas proteínas con las cuales asociar una determinada función. Dentro de las proteínas identificadas por esta aproximación destaca la correspondiente al *spot 21*, la cual muestra una identidad del 100 % con la proteína desconocida de *Sorghum bicolor* con dominio tipo *thioredoxin* (TRX). La proteína TRX, quien cataliza las reacciones de oxidoreducción, tiene como función el mantener la homeostasis redox celular, por lo que constituye la mayor defensa contra el estrés oxidativo (Meyer et al. 2009), y además ha sido implicada en la regulación de los niveles de ROS durante la defensa (Nanda et al. 2010). Rivas et al. (2004) encontraron que la proteína *Cf-9-interacting thioredoxin* (CITRX por sus siglas en inglés) regula de forma negativa a la proteína *Cf-9* en ausencia del patógeno, sin embargo, en presencia del inductor *avr9*, la regulación negativa ejercida por CITRX se disipa por una disminución en su expresión y posterior desaparición, provocando la acumulación de ROS, activación de la expresión de genes PR y en consecuencia la activación de la respuesta de defensa. Nekrasov et al. (2006) señalan que CITRX funciona como una proteína adaptadora que mantiene unido a *Cf-9* con la proteína quinasa AC1K1 en ausencia del inductor. Esos resultados son consistentes con los obtenidos en este trabajo, donde se registra una represión en la expresión de la proteína *hypothetical protein osj_30806* correspondiente al *spot 21*, lo cual podría sugerir que en la célula se está activando el estrés oxidativo como mecanismo de defensa.

En este mismo grupo también se logró identificar al *spot 22*, quien comparte un 83 % de identidad con *bronze-2 protein*, la cual es una *glutathione S-transferase* (GST) responsable de la catálisis del último paso en la biosíntesis de las antocianinas en maíz (Marrs et al. 1995). Campo et al. (2004) reportaron la expresión diferencial de algunas enzimas antioxidantes durante el estudio del proteoma de embriones de maíz infectados con *Fusarium verticillioides*, entre las que destaca la proteína GST, sugiriendo que probablemente esté implicadas en la protección de la célula durante el estrés oxidativo generado como mecanismo de defensa. Este resultado, aunado a la presencia de la enzima TRX, sugiere que efectivamente la planta está respondiendo ante el ataque del patógeno con la generación de ROS como respuesta de defensa.

Entre las proteínas desconocidas también se logró identificar al *spot 27*, cuya secuencia muestra identidad con la proteína *PR1-like* también de arroz, presentando además una sobreexpresión a las 36 hpi. La proteína PR1 se ha descrito ampliamente como un marcador de SAR, siendo descrita su presencia y expresión durante diferentes tipos de estrés ambientales y tratamientos químicos (Mitsuhara et al. 2008). Este resultado, obtenido a través de esta aproximación es consistente con lo observado por microarreglos, donde la inducción en la expresión del gen que codifica para PR1 se registra entre las 24 y 36 hpi.

Adicionalmente se identificaron los *spots 25* y *36*, quienes muestran un alto porcentaje de identidad con las proteínas *rubisco large subunit* y *oxygen-evolving enhancer protein 1* respectivamente, ambas implicadas en la fotosíntesis, mostrando represión en sus niveles de expresión cuando se las compara contra las plantas resistentes sin inocular. Estos resultados son consistentes con los mostrados en la literatura (Ribot et al. 2008, Shim et al. 2004, Vergne et al. 2007), donde se sugiere que una disminución en la tasa de fotosíntesis podría representar otro de los mecanismos de defensa de la planta orientados hacia la restricción en la disponibilidad de nutrientes para el patógeno durante la invasión.

Por su parte, a partir de la identificación de las proteínas con expresión diferencial identificadas en los proteomas de las plantas susceptibles se lograron obtener 26 huellas peptídicas de las 36 muestras analizadas, encontrando que el 42 % de ellas mostraba coincidencia en proteínas de función desconocida, mientras que el restante se encuentra distribuido en funciones como defensa, metabolismo y síntesis de ATP. Dentro el grupo de proteínas con función conocida destacan los *spots 42* y *60*, los cuales fueron identificados como *ATP synthase CF1 beta subunit* y *ATP synthase subunit beta* respectivamente. Además de los resultados obtenidos en este trabajo, la alteración en la expresión de estas proteínas ha sido reportada previamente durante la interacción compatible *Arabidopsis* sp. – *P. syringae* (Jones et al. 2006), la interacción compatible arroz – *X. oryzae* (Mahmood et al. 2006), interacción de mutantes *spl2* – *M. oryzae* (Kang et al. 2007) y en plantas de arroz como consecuencia del estrés por calor (Lee et al. 2007), lo cual sugiere que la obtención de ATP resulta comprometida durante el estrés, tanto biótico como abiótico. Kang et al. (2007) sugieren que la reducción en los niveles de estas enzimas es consecuencia de los daños provocados en la membrana del tilacoide durante el estrés oxidativo generado por ROS al momento de la respuesta de defensa.

Dentro de este grupo también se identificó al *spot 47* como *18.1 kDa class I heat shock protein*, y al *spot 53*, el cual aun cuando fue identificado como proteína desconocida mostró homología con *heat shock protein3* de *Z. mays* ambas de la familia *heat shock proteins*. Algunas proteínas miembros de esta familia han sido asociadas con la respuesta de defensa de la planta ante el ataque del patógeno (Kumar et al. 2009, Van Ooijen et al. 2010, Wang et al. 2011), por lo que considerando que ambas proteínas muestran una represión en los niveles de expresión, pudiera entonces asociarse con el fenotipo de susceptibilidad.

Por otro lado, al comparar los proteomas de las plantas resistentes y susceptibles se lograron identificar 12 proteínas comunes para ambas (ver tabla 12), mostrando además diferencias en los niveles de expresión entre ellas (ver fig.23). En este grupo encontramos a *pentatricopeptide repeat protein* (PPRP por sus siglas en inglés; *spot 5*), la cual muestra una inducción en la expresión en las plantas resistentes en comparación con las susceptibles, manteniendo la misma tendencia en el tiempo. A pesar que la familia PPRP en *Arabidopsis* sp. está conformada por aproximadamente 450 proteínas, es poco lo que se conoce con respecto a su función (Lurin et al. 2004). Algunas evidencias señalan que estas proteínas juegan un rol esencial en la regulación de algunos procesos post-transcripcionales como edición, corte y empalme, y traducción del ARNm dentro de cloroplastos y mitocondrias (Schmitz-Linneweber y Small 2008). Laluk et al. (2011) reportaron un aumento en los niveles de expresión de la proteína PPR *PNG* en *Arabidopsis* sp. como respuesta a la infección por *A. brassicicola*, mientras que la pérdida de la función provocaba un aumento en la susceptibilidad. Por otro lado, Kobayashi et al. (2007) demostraron que la proteína PPR *LOL1* localizada en la mitocondria puede unirse a ácidos nucleídos de cadena sencilla, sugiriendo una posible regulación post-transcripcional en la biosíntesis de isoprenoides, relacionados con la respuesta ante el estrés biótico.

Otra de las proteínas comunes en este grupo es la correspondiente al *spot 8*, identificada como *ribose-phosphate pyrophosphokinase 3*, la cual es una de las enzimas que participa en la vía de las pentosas fosfatos. A través de esta ruta metabólica se biosintetiza la ribosa necesaria para la síntesis de ácidos nucleicos y otros intermediarios de la vía del shikimato, así como también es la mayor fuente generadora de poder reductor a través del NADPH, el cual es utilizado por la célula durante la generación de ROS (Scharte et al. 2009). Cuando se comparan los niveles de expresión tanto de las plantas resistentes como de las susceptibles se observa que para estas últimas no hay cambios significativos en la expresión de la enzima, a

diferencia de las plantas resistentes. Esto podría sugerir que la activación en la producción de ROS en las plantas resistentes no está ocurriendo de forma efectiva.

Por último, otra de las proteínas comunes identificadas fue *monothiol glutaredoxin-S8 (spot 7)*, una oxidoreductasa que media la reducción reversible de los puentes disulfuro de sus proteínas sustrato en presencia de glutatión, y por tanto juega un rol importante en la protección de las células durante el estrés oxidativo (Cheng et al. 2006). En arroz, Garg et al. (2010) estudiaron la secuencia, distribución y filogenia de 48 glutaredoxinas de arroz. Entre otras cosas, estos autores encontraron que los niveles de expresión de algunos de estos genes se veía afectado por diferentes condiciones como fitohormonas, estrés biótico y abiótico, por lo que sugieren que estas proteínas participan en la respuesta a estos estímulos (Garg et al. 2010). En los resultados mostrados en la fig.23 se puede observar cómo los niveles en la expresión de *monothiol glutaredoxin-S8* en las plantas susceptibles no mostró cambios en el tiempo, mientras que para las plantas resistentes se observa un incremento en la expresión a las 36 hpi, robusteciendo la hipótesis de que efectivamente en las plantas resistentes hay una activación de ROS como respuesta de defensa ante el ataque del patógeno, fenómeno que a su vez requiere la presencia de proteínas implicadas en la protección contra este estrés oxidativo. En el caso de las plantas susceptibles, el no mostrar cambios en los niveles de expresión de estas proteínas indica que aun no ha ocurrido la activación de ROS, por lo tanto no es necesario la protección que puede ofrecer la proteína *monothiol glutaredoxin*.

5 Correlación entre los perfiles de transcripción (transcriptoma) y los de proteínas (proteoma).

Durante el ataque de un patógeno es necesario que la planta despliegue un arsenal de respuestas, que en su conjunto puedan combatir y restringir dicha invasión. El estudio de estos mecanismos de defensa ha servido como una herramienta para el mejoramiento de los cultivos desde el punto de vista biotecnológico, pudiendo así prescindir de compuestos con actividad fungicida, herbicidas, etc., los cuales son sumamente costosos y con un alto perjuicio sobre el productor y el ambiente. En este sentido, la identificación de las proteínas y genes responsables de la respuesta de defensa ha representado un reto para los investigadores.

Tradicionalmente, el estudio de las rutas de defensa era realizado actor por actor utilizando como modelo biológico a *Arabidopsis* sp., resultados que luego eran

extrapolados a otras plantas. Con el advenimiento de la era genómica, la gran cantidad de información disponible ha hecho posible desarrollar nuevas tecnologías que permiten analizar la respuesta global de una célula bajo una determinada condición. Uno de estos experimentos es el ensayo de microarreglos, que hace posible estudiar y comparar simultáneamente las variaciones en la expresión de todos los genes bajo una determinada condición simultáneamente. Sin embargo, este tipo de estudios masivos no se ha restringido única y exclusivamente a los genes, por el contrario, tecnologías como la separación de proteínas en geles de 2D y su identificación mediante espectrometría de masas ofrece un conjunto de información, proteoma, sobre el comportamiento de la célula. Ambas tecnologías son complementarias, permitiendo obtener una gran cantidad de eventos regulatorios involucrados en el proceso de resistencia. Es por ello que uno de los propósitos de este trabajo fue vincular los resultados obtenidos a través del estudio de los niveles de expresión de genes y proteínas con la finalidad de generar una visión completa de cómo arroz está respondiendo ante el ataque de *M. oryzae*.

La información obtenida en este trabajo permitió proponer un modelo sobre el mecanismo molecular de la respuesta de *O. sativa* ante el ataque del patógeno (ver fig.25), complementando así la información disponible hasta ahora en la literatura y sugiriendo una mayor atención a algunos genes y proteínas, cuya función no había sido asociada a la respuesta de defensa y cuáles mecanismos pudieran estar involucrados.

En primer lugar, 2 de las proteínas de membrana identificadas en este trabajo, *remorin* y *lectin-like receptor kinase*, han sido previamente asociadas al fenotipo de resistencia (Bouwmeester y Govers 2009, Lefebvre et al. 2010, Nohzadeh Malakshah et al. 2007), sin embargo se desconoce en detalle cual mecanismo pudiera estar involucrado, mientras que la proteína *CRINKLY4*, hasta ahora no ha sido asociada a la defensa (Shiu et al. 2004).

Algunas proteínas asociadas al proceso de senescencia fueron identificadas, por lo que es posible que formen parte del proceso de señalización de activación de la respuesta hipersensible, la cual, al igual que la senescencia es un tipo de muerte celular programada, por lo que este proceso forma parte de los mecanismos de respuesta de defensa (Munné-Bosch y Alegre 2004). Adicionalmente, parte del proceso de muerte celular involucra la degradación de proteínas a través del proteosoma mediada por la activación de ligasas de ubiquitinas (Hochstrasser 2009),

algunas de las cuales fueron identificadas en este trabajo. El proceso de ubiquitinación puede además por su parte ser el responsable en la activación de algunas proteínas o en la degradación de reguladores negativos de la respuesta de defensa (González-Lamothe et al. 2006).

La generación de especies de oxígeno reactivas también queda evidenciada gracias a la descripción no sólo de una de las enzimas de la vía de las pentosas fosfato, su principal fuente poder reductor a través de NADPH, sino también por la presencia de proteínas asociadas con su regulación. Así mismo, la vía de las pentosas fosfato también provee de metabolitos intermediarios a la vía del shikimato, responsable de la biosíntesis de precursores de algunos metabolitos intermediarios asociados a resistencia, así como también del SA (Scharte et al. 2009).

La activación de la respuesta sistémica adquirida está mediada por las moléculas de señalización SA y JA, la cual a su vez es capaz de activar una compleja respuesta de defensa que involucra, entre mucho otros eventos, la activación del gen que codifica para la proteína PR1 (Mitsuhara et al. 2008, Wildermuth et al. 2001), también identificada en este trabajo. Por su parte, la expresión del gen que codifica para *glycine-rich protein A3* también ha sido asociada con SAR, sin embargo se desconoce a través de que ruta es activada (Zhao et al. 2008).

Los genes que codifican para las proteínas, *jacalin-like lectin* y *Duf26*, también muestran cambios en los niveles de expresión por efecto del patógeno, sin embargo aun no es conocido como pudieran estar asociados con la defensa (Kim et al. 2004, Kim et al. 2009), al igual que ocurre para las proteínas *maturase K* (Garavaglia et al. 2010, Xingquan et al. 2010), *PPR* (Kobayashi et al. 2007, Laluk et al. 2011), *nodulin nmt3* (Chu et al. 2006a, Chu et al. 2006b) y *ACT* (Hsieh y Goodman 2002, Verhagen et al. 2004) .

La participación de la vía de síntesis de las giberilinas también queda evidenciada con la presencia de una de las enzimas de la ruta (Grennan 2006, Olszewski et al. 2002), proporcionando tanto metabolitos secundarios como intermediarios para la biosíntesis de fitoalexinas, ambos involucrados con la respuesta de defensa (Xu et al. 2007).

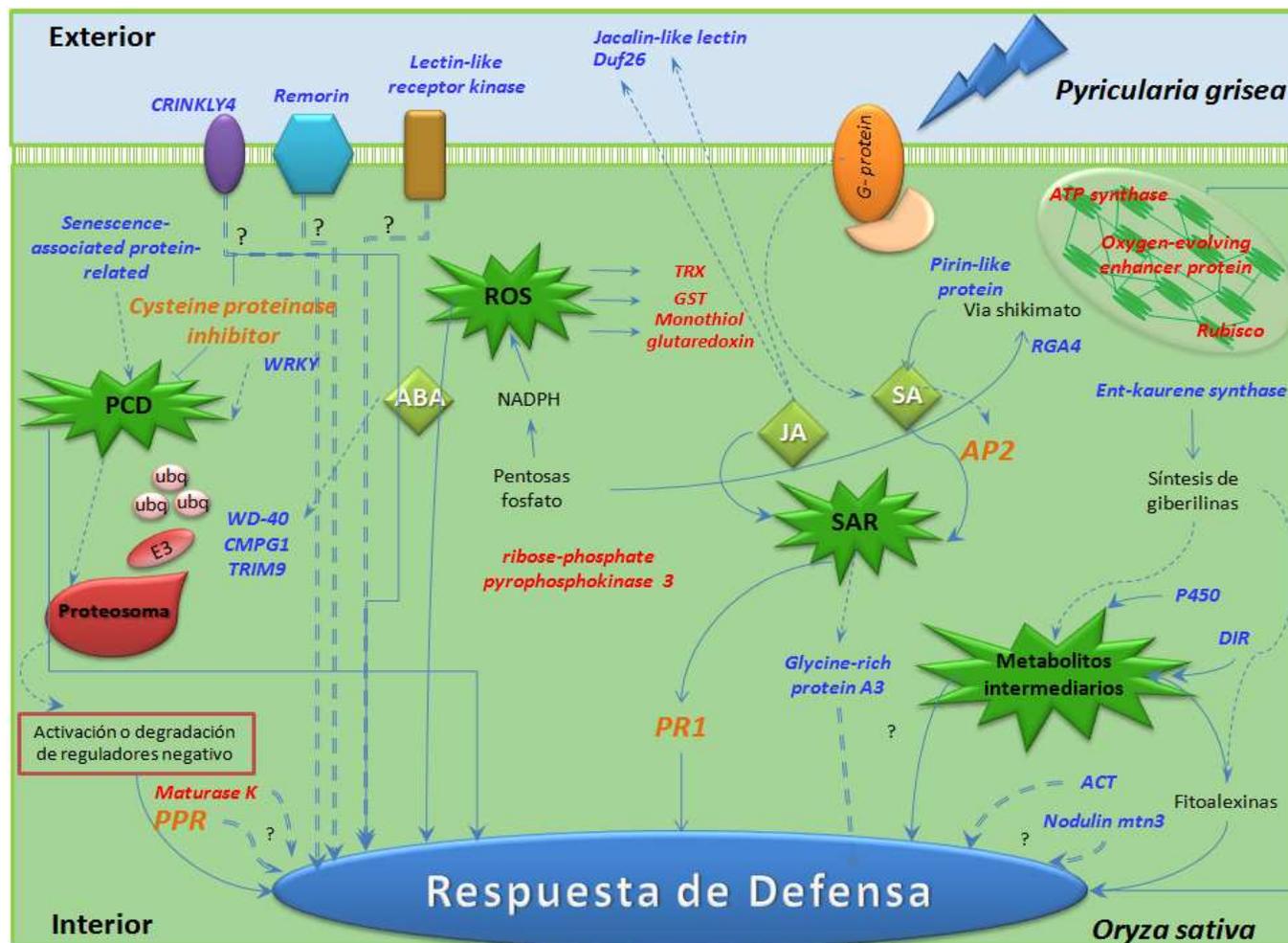


Figura 25. Modelo propuesto de respuesta de *Oryza sativa* ante el ataque por *Magnaporthe oryzae*. Las proteínas señaladas en azul fueron identificadas a través del transcriptoma, las rojas por proteómica y las naranjas por ambas aproximaciones; en las estrellas verdes se indican algunos procesos involucrados en la respuesta.

6 Genes candidatos y su uso potencial como marcadores moleculares

Las técnicas de mejoramiento tradicional están basadas en la evaluación fenotípica de la resistencia a través de la inoculación experimental y la respuesta de la planta, sin embargo, factores macro y micro ambientales puede afectar la severidad de las enfermedades generando resultados poco consistentes (Pinson et al. 2005). En ese sentido, el uso de técnicas de biología molecular aplicada y su correlación con los programas de mejoramiento clásico han permitido la localización de genes de resistencia y loci asociados a caracteres cuantitativos (QTLs) en regiones cromosómicas específicas, permitiendo generar variedades con fenotipos de resistencia mucho más durable (Tabien et al. 2000). Sin embargo, el desconocimiento sobre los genes localizados en estas regiones retrasa los aportes de este tipo de enfoque por lo que la identificación y uso de genes asociados directamente con la resistencia al patógeno tendrían un impacto más efectivo sobre la generación de nuevos materiales resistentes

Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen una importante fuente de información a la hora de estudiar los mecanismos de resistencia en plantas de arroz durante el ataque por *M. oryzae*, sin embargo, su utilidad puede ir más allá. Algunas de las proteínas y genes identificados mostraron patrones de expresión diferenciales entre plantas resistentes y susceptibles, siendo claros ejemplos de esto el gen que codifica para la *U-box protein CMPG1* (ver fig. 9), el gen que codifica para *nodulin mtn3 family protein* (ver fig. 15) o la proteína *ribose-phosphate pyrophosphokinase 3* (ver fig. 23) siendo probablemente actores de la respuesta de defensa, podrían resultar sumamente útiles como marcadores de la misma. En consecuencia, la identificación y uso de genes asociados directamente con la resistencia al patógeno tendrían un impacto más efectivo sobre la generación de nuevos materiales resistentes. En ese sentido, la validación de estos genes de resistencia en materiales elite podría permitir su incorporación en los programas de mejoramiento de arroz para ser usados directamente como indicadores de resistencia.

VII. CONCLUSIONES

Se caracterizaron las respuestas de defensa de las isolíneas susceptible (CT13432-55) y resistente (CT13432-219) de *Oryza sativa* durante el ataque por el aislado número 39168 de *Magnaporthe oryzae* a través del estudio de los perfiles de expresión génica y proteica, siendo el presente trabajo el primer reporte en el país en el cual se abordan ambas tecnologías, transcriptómica y proteómica, para dilucidar los mecanismos moleculares de resistencia durante el ataque de un patógeno.

La identificación de 187 genes candidatos a través de microarreglos, de los cuales más del 50 % corresponde a proteínas desconocidas confirma la gran complejidad de los mecanismos de defensa en el arroz y el poco conocimiento que aun tenemos sobre los mismos. Los perfiles de expresión de algunos de estos genes fue confirmada por RT-PCR.

La comparación de los perfiles de expresión de las plantas resistentes y susceptibles inoculadas versus las plantas sin inocular sugiere un retraso en la respuesta de defensa en las plantas susceptibles, sin embargo se ameritan estudios en tiempos tempranos para corroborar esta hipótesis.

La asociación de algunos QTLs para estrés abiótico con los loci de los genes candidatos identificados en este trabajo ratifica su participación en el fenotipo de resistencia, no sólo en las isolíneas utilizadas en este trabajo, sino también en los materiales reportados en la literatura.

Las diferencias en el proteoma y transcriptoma de las plantas inoculadas con el patógeno, tanto resistentes como susceptibles, contribuyen a evidenciar los cambios dinámicos que ocurren a nivel celular en la planta como respuesta al ataque del patógeno, involucrando una serie de proteínas de procesos relevantes como *rubisco large subunit* (fotosíntesis), *monothiol glutaredoxin-S8* (estrés oxidativo), *ribose-phosphate pyrophosphokinase 3* (vía de las pentosas fosfato), *U-box protein CMPG1*

(ubiquitinación), *cysteine proteinase inhibitor* (muerte celular programada), *ent-kaurene synthase* (síntesis de giberilinas) y PR1 (respuesta de defensa).

Se combinó la información obtenida a través del estudio del transcriptoma y el proteoma con la cual se construyó un modelo preliminar que permite ilustrar la respuesta de *O. sativa* a nivel celular durante el ataque por *M. oryzae*, evidenciando no solo rutas descritas previamente en la literatura (muerte celular, generación de estrés oxidativo, síntesis de compuestos con actividad antimicrobiana, activación de la respuesta sistémica adquirida) sino también hace un aporte en la identificación de nuevas proteínas, algunas de ellas poco estudiadas o totalmente desconocidas hasta la fecha.

VIII. RECOMENDACIONES

Validar los genes de resistencia en materiales elite de arroz contra *Magnaporthe oryzae*

Aun cuando el uso de aislíneas en este trabajo fue una ventaja metodológica, no necesariamente el comportamiento de estos genes debe ser el mismo en líneas elite, por lo que evaluar la expresión de los genes candidatos identificados en este trabajo le otorgaría mayor robustez a los resultados, además de la posibilidad de ser usados directamente en los programas de mejoramiento, contribuyendo así no solo a la generación de conocimiento, sino también proporcionando una respuesta biotecnológica, lo cual sin duda representaría un valor agregado del presente trabajo.

Estudiar el retraso en la respuesta de defensa de las plantas susceptibles

Algunos autores sugieren que el fenotipo de susceptibilidad es una consecuencia del retraso en el despliegue de la respuesta de defensa durante el ataque del patógeno. Los resultados en este trabajo parecieran mostrar indicios de ello, sin embargo sería interesante incorporar al estudio los niveles de expresión de los genes en horas más tempranas a las aquí mostradas, con lo cual se podría comprobar dicha hipótesis.

Caracterización de actividad tipo cistein proteinasa.

Tanto a través de la transcriptómica como por proteómica fue posible la identificación de inhibidores tipo cistein proteinasa, aparentemente involucrados en la respuesta de defensa, por lo que el estudio de la actividad proteolítica de los extractos foliares a través de zigmogramas pudiera revelar patrones diferenciales entre plantas resistentes y susceptibles y de esta forma sugerir algún posible mecanismo de acción durante la respuesta de defensa.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Anderson JP, Thatcher LF, Singh KB. 2005. Plant defence responses: conservation between models and crops. *Functional Plant Biology* 32: 21-34.

Asíns MJ. 2002. Present and future of quantitative trait locus analysis in plant breeding. *Plant Breeding* 121: 281-291.

Assmann SM. 2005. G protein regulation of disease resistance during infection of rice with rice blast fungus. *Science STKE 2005*: 1-3

Ballini E, Morel JB, Droc G, Price A, Courtois B, Notteghem JL, Tharreau D. 2008. A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 21: 859-868.

Becraft PW, Kang SH, Suh SG. 2001. The Maize CRINKLY4 Receptor Kinase Controls a Cell-Autonomous Differentiation Response. *Plant Physiology*. 127: 486-496.

Becraft PW, Stinard PS, McCarty DR. 1996. CRINKLY4: A TNFR-like receptor kinase involved in maize epidermal differentiation. *Science*: 1406-1409.

Berruyer R, Poussier S, Kankanala P, Mosquera G, Valent B. 2006. Quantitative and qualitative influence of inoculation methods on in planta growth of rice blast fungus. *Phytopathology* 96: 346-355.

Boller T. 1995. Chemoperception of Microbial Signals in Plant Cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46: 189-214.

Bos J.I.B., Armstrong M.R., Gilroy E.M., Boevink P.C., Hein I., Taylor R.M., Zhendong T., Engelhardt S., Vetukuri R.R., Harrower B., Dixelius C., Bryan G., Sadanandom A., Whisson S.C., Kamoun S., Birch P.R.J. 2010. Phytophthora infestans effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by

stabilizing host E3 ligase CMPG1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107: 9909-9914.

Botella M.A., Xu Y., Prabha T.N., Zhao Y., Narasimhan M.L., Wilson K.A., Nielsen S.S., Bressan R.A., Hasegawa P.M. 1996. Differential Expression of Soybean Cysteine Proteinase Inhibitor Genes during Development and in Response to Wounding and Methyl Jasmonate. *Plant Physiology* 112: 1201-1210.

Boter M, Ruíz-Rivero O, Abdeen A, Prat S. 2004. Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and Arabidopsis. *Genes & Development* 18: 1577-1591.

Bouwmeester K, Govers F. 2009. *Arabidopsis* L-type lectin receptor kinases: phylogeny, classification, and expression profiles. *Journal of Experimental Botany* 60: 4383-4396.

Buchanan-Wollaston V. 1997. The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 48: 181-199.

Buhot N., Gomes E., Milat M.-L., Ponchet M., Marion D., Lequeu J., Delrot S., Coutos-Thevenot P., Blein J.-P. 2004. Modulation of the Biological Activity of a Tobacco LTP1 by Lipid Complexation. *Molecular Biology of the Cell* 15: 5047-5052.

Calderon-Villalobos LI, Tan X, Zheng N, Estelle M. 2010. Auxin Perception—Structural Insights. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2. 1-16

Campo S, Carrascal M, Coca M, Abian J, San Segundo B. 2004. The defense response of germinating maize embryos against fungal infection: a proteomics approach. *Proteomics*.4: 383-396.

Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, Volko S, Dong X. 1997. The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* 88: 57-63.

Carimi F, Zottini M, Formentin E, Terzi M, Lo Schiavo F. 2003. Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta* 216: 413-421.

Chen DH, dela Viña M, Inukai T, Mackill DJ, Ronald PC, Nelson RJ. 1999. Molecular mapping of the blast resistance gene, Pi44(t), in a line derived from a durably resistant rice cultivar. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1046-1053.

Chen H, Wang S, Xing Y, Xu C, Hayes PM, Zhang Q. 2003. Comparative analyses of genomic locations and race specificities of loci for quantitative resistance to *Pyricularia grisea* in rice and barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100: 2544-2549.

Chen M-S. 2008. Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Science* 15: 101-114.

Chen W., Provart N.J., Glazebrook J., Katagiri F., Chang H.-S., Eulgem T., Mauch F., Luan S., Zou G., Whitham S.A., Budworth P.R., Tao Y., Xie Z., Chen X., Lam S., Kreps J.A., Harper J.F., Si-Ammour A., Mauch-Mani B., Heinlein M., Kobayashi K., Hohn T., Dangl J.L., Wang X., Zhu T. 2002. Expression Profile Matrix of *Arabidopsis* Transcription Factor Genes Suggests Their Putative Functions in Response to Environmental Stresses. *The Plant Cell* 14: 559-574.

Chen X., Shang J., Chen D., Lei C., Zou Y., Zhai W., Liu G., Xu J., Ling Z., Cao G., Ma B., Wang Y., Zhao X., Li S., Zhu L. 2006. A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance. *The Plant Journal* 46: 794-804.

Chen Y-F, Etheridge N, Schaller GE. 2005. Ethylene Signal Transduction. *Annals of Botany* 95: 901-915.

Cheng N-H, Liu J-Z, Brock A, Nelson RS, Hirschi KD. 2006. AtGRXcp, an *Arabidopsis* Chloroplastic Glutaredoxin, Is Critical for Protection against Protein Oxidative Damage. *Journal of Biological Chemistry* 281: 26280-26288.

Cheong YH, Chang H-S, Gupta R, Wang X, Zhu T, Luan S. 2002. Transcriptional Profiling Reveals Novel Interactions between Wounding, Pathogen, Abiotic Stress, and Hormonal Responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 129: 661–677.

Chern MS, Fitzgerald HA, Yadav RC, Canlas PE, Dong X, Ronald PC. 2001. Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1-mediated signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 27: 101-113.

Chisholm ST, Mahajan SK, Whitham SA, Yamamoto ML, Carrington JC. 2000. Cloning of the *Arabidopsis* RTM1 gene, which controls restriction of long-distance movement of tobacco etch virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 489-494.

Chu Z, Fu B, Yang H, Xu C, Li Z, Sanchez A, Park Y, Bennetzen J, Zhang Q, Wang S. 2006a. Targeting *xa13*, a recessive gene for bacterial blight resistance in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 455-461.

Chu Z., Yuan M., Yao J., Ge X., Yuan B., Xu C., Li X., Fu B., Li Z., Bennetzen J.L., Zhang Q., Wang S. 2006b. Promoter mutations of an essential gene for pollen development result in disease resistance in rice. *Genes & Development* 20: 1250-1255.

Colebatch G, Kloska S, Trevaskis B, Freund S, Altmann T, Udvardi MK. 2002. Novel Aspects of Symbiotic Nitrogen Fixation Uncovered by Transcript Profiling with cDNA Arrays. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 411-420.

Dangl JL, Jones JDG. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*. 411: 826-833.

Datta S, Johansson H, Hettiarachchi C, Irigoyen ML, Desai M, Rubio V, Holm M. 2008. LZFI/SALT TOLERANCE HOMOLOG3, an *Arabidopsis* B-Box Protein Involved in Light-Dependent Development and Gene Expression, Undergoes COP1-Mediated Ubiquitination. *The Plant Cell* 20: 2324-2338.

Davin LB, Lewis NG. 2000. Dirigent Proteins and Dirigent Sites Explain the Mystery of Specificity of Radical Precursor Coupling in Lignan and Lignin Biosynthesis. *Plant Physiology* 123: 453-462.

Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C. 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*. 394: 585-588.

Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C. 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98: 13454-13459.

Devoto A., Nieto-Rostro M., Xie D., Ellis C., Harmston R., Patrick E., Davis J., Sherratt L., Coleman M., Turner J.G. 2002. COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 32: 457-466.

Dillon VM, Overton J, Grayer RJ, Harborne JB. 1997. Differences in phytoalexin response among rice cultivars of different resistance to blast. *Phytochemistry* 44: 599-603.

El Yahyaoui F., Küster H., Ben Amor B., Hohnjec N., Pühler A., Becker A., Gouzy J., Vernié T., Gough C., Niebel A., Godiard L., Gamas P. 2004. Expression Profiling

in *Medicago truncatula* Identifies More Than 750 Genes Differentially Expressed during Nodulation, Including Many Potential Regulators of the Symbiotic Program. *Plant Physiology* 136: 3159-3176.

Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE. 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Science* 5: 199-206.

Farooq S, Azam F. 2002. Molecular markers in plant breeding-II. Some pre-requisites for use. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 5: 1141-1147.

Flor HH. 1971. Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology* 9: 275-296.

Frye CA, Tang D, Innes RW. 2001. Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 98: 373-378.

Garavaglia BS, Thomas L, Zimaro T, Gottig N, Daurelio LD, Ndimba B, Orellano EG, Ottado J, Gehring C. 2010. A plant natriuretic peptide-like molecule of the pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* causes rapid changes in the proteome of its citrus host. *BMC Plant Biology* 10: 51.

Garg R, Jhanwar S, Tyagi AK, Jain M. 2010. Genome-Wide Survey and Expression Analysis Suggest Diverse Roles of Glutaredoxin Gene Family Members During Development and Response to Various Stimuli in Rice. *DNA Research* 17: 353-367.

Glazebrook J. 2005. Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43: 205-227.

Goff S.A., Ricke D., Lan T.H., Presting G., Wang R., Dunn M., Glazebrook J., Sessions A., Oeller P., Varma H., Hadley D., Hutchison D., Martin C., Katagiri F., Lange B.M., Moughamer T., Xia Y., Budworth P., Zhong J., Miguel T., Paszkowski U., Zhang S., Colbert M., Sun W.L., Chen L., Cooper B., Park S., Wood T.C., Mao L., Quail P., 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.M., Bhatnagar S., Adey N., Rubano T., Tusneem N., Robinson R., Feldhaus J., Macalma T., Oliphant A., Briggs S. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* 296: 92-100.

González-Lamothe R, Tsitsigiannis DI, Ludwig AA, Panicot M, Shirasu K, Jones JDG. 2006. The U-Box Protein CMPG1 Is Required for Efficient Activation of Defense

Mechanisms Triggered by Multiple Resistance Genes in Tobacco and Tomato. *The Plant Cell* 18: 1067-1083.

Grennan AK. 2006. Gibberellin Metabolism Enzymes in Rice. *Plant Physiology* 141: 524-526.

Gu Y-Q, Yang C, Thara VK, Zhou J, Martin GB. 2000. Pti4 Is Induced by Ethylene and Salicylic Acid, and Its Product Is Phosphorylated by the Pto Kinase. *The Plant Cell* 12: 771-786.

Hammond-Kosack KE, Jones JD. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773-1791.

Hedden P, Kamiya Y. 1997. Gibberellin Biosynthesis: Enzymes, Genes and Their Regulation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 431-460.

Hochstrasser M. 2009. Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* 458: 422-429.

Hsieh M-H, Goodman HM. 2002. Molecular Characterization of a Novel Gene Family Encoding ACT Domain Repeat Proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology* 130: 1797-1806.

Hu K-M, Qiu D-Y, Shen X-L, Li X-H, Wang S-P. 2008. Isolation and Manipulation of Quantitative Trait Loci for Disease Resistance in Rice Using a Candidate Gene Approach. *Molecular Plant* 1: 786-793.

Huang N, Angeles ER, Domingo J, Magpantay G, Singh S, Zhang G, Kumaravadivel N, Bennett J, Khush GS. 1997. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 313-320.

Jagadish SVK, Muthurajan R, Oane R, Wheeler TR, Heuer S, Bennett J, Craufurd PQ. 2010. Physiological and proteomic approaches to address heat tolerance during anthesis in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* 61: 143-156.

Jantasuriyarat C., Gowda M., Haller K., Hatfield J., Lu G., Stahlberg E., Zhou B., Li H., Kim H., Yu Y., Dean R.A., Wing R.A., Soderlund C., Wang G.-L. 2005. Large-Scale Identification of Expressed Sequence Tags Involved in Rice and Rice Blast Fungus Interaction. *Plant Physiology* 138: 105-115.

- Jia Y, Valent B, Lee FN.** 2003. Determination of Host Responses to *Magnaporthe grisea* on Detached Rice Leaves Using a Spot Inoculation Method. *Plant Disease* 87: 129-133.
- Joazeiro CA, Weissman AM.** 2000. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102: 549-552.
- Jones AME, Thomas V, Bennett MH, Mansfield J, Grant M.** 2006. Modifications to the Arabidopsis Defense Proteome Occur Prior to Significant Transcriptional Change in Response to Inoculation with *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiology* 142: 1603-1620.
- Jung KH, et. al.** 2005. Rice Undeveloped Tapetum1 is a major regulator of early tapetum development. *Plant Cell* 17: 2705-2722.
- Kaffarnik FAR, Jones AME, Rathjen JP, Peck SC.** 2009. Effector Proteins of the Bacterial Pathogen *Pseudomonas syringae* Alter the Extracellular Proteome of the Host Plant, *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & Cellular Proteomics* 8: 145-156.
- Kang SG, Matin MN, Bae H, Natarajan S.** 2007. Proteome analysis and characterization of phenotypes of lesion mimic mutant spotted leaf 6 in rice. *Proteomics* 7: 2447-2458.
- Kasai K, Kanno T, Akita M, Ikejiri-Kanno Y, Wakasa K, Tozawa Y.** 2005. Identification of three shikimate kinase genes in rice: characterization of their differential expression during panicle development and of the enzymatic activities of the encoded proteins. *Planta* 222: 438-447.
- Khush G.** 2005. What it will take to Feed 5.0 Billion Rice consumers in 2030. *Plant Molecular Biology* 59: 1-6.
- Khush G.** 2001. Green revolution: the way forward. *Nature Reviews Genetics*. 2: 815-822.
- Khush G.** 1997. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant Molecular Biology* 35: 25-34.
- Kim J, Harter K, Theologis A.** 1997. Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 11786-11791.

Kim J.-A., Agrawal G.K., Rakwal R., Han K.-S., Kim K.-N., Yun C.-H., Heu S., Park S.-Y., Lee Y.-H., Jwa N.-S. 2003. Molecular cloning and mRNA expression analysis of a novel rice (*Oryza sativa* L.) MAPK kinase kinase, OsEDR1, an ortholog of *Arabidopsis* AtEDR1, reveal its role in defense/stress signalling pathways and development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300: 868-876.

Kim JY, Kim WY, Kwak KJ, Oh SH, Han YS, Kang H. 2010. Glycine-rich RNA-binding proteins are functionally conserved in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* during cold adaptation process. *Journal of Experimental Botany* 61: 2317-2325.

Kim S, Ahn IP, Lee YH. 2001. Analysis of genes expressed during rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Molecular Plant Microbe Interactions* 14: 1340-1346.

Kim S, Soltis PS, Wall K, Soltis DE. 2006. Phylogeny and Domain Evolution in the APETALA2-like Gene Family. *Molecular Biology and Evolution* 23: 107-120.

Kim ST, Cho KS, Yu S, Kim SG, Hong JC, Han C-d, Bae DW, Nam MH, Kang KY. 2003. Proteomic analysis of differentially expressed proteins induced by rice blast fungus and elicitor in suspension-cultured rice cells. *Proteomics* 3: 2368-2378.

Kim ST, Kang YH, Wang Y, Wu J, Park ZY, Rakwal R, Agrawal GK, Lee SY, Kang KY. 2009. Secretome analysis of differentially induced proteins in rice suspension-cultured cells triggered by rice blast fungus and elicitor. *Proteomics* 9: 1302-1313.

Kim ST, Kim SG, Hwang DH, Kang SY, Kim HJ, Lee BH, Lee JJ, Kang KY. 2004. Proteomic analysis of pathogen-responsive proteins from rice leaves induced by rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Proteomics* 4: 3569-3578.

Kiss E., Oláh B., Kaló P., Morales M., Heckmann A.B., Borbola A., Lózsa A., Kontár K., Middleton P., Downie J.A., Oldroyd G.E.D., Endre G. 2009. LIN, a Novel Type of U-Box/WD40 Protein, Controls Early Infection by Rhizobia in Legumes. *Plant Physiology* 151: 1239-1249.

Kobayashi K., Suzuki M., Tang J., Nagata N., Ohyama K., Seki H., Kiuchi R., Kaneko Y., Nakazawa M., Matsui M., Matsumoto S., Yoshida S., Muranaka T. 2007. LOVASTATIN INSENSITIVE 1, a Novel Pentatricopeptide Repeat Protein, is a Potential Regulatory Factor of Isoprenoid Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 48: 322-331.

Koga H, Dohi K, Nakayachi O, Mori M. 2004. A novel inoculation method of *Magnaporthe grisea* for cytological observation of the infection process using intact leaf sheaths of rice plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64: 67-72.

Kogel KH, Langen G. 2005. Induced disease resistance and gene expression in cereals. *Cell Microbiology* 7: 1555-1564.

Kongprakhon P, Cuesta-Marcos A, Hayes PM, Richardson KL, Sirithunya P, Sato K, Steffenson B, Toojinda T. 2009. Validation of rice blast resistance genes in barley using a QTL mapping population and near-isolines. *Breeding Science* 59: 341-349.

Kottapalli K, Lakshmi Narasu M, Jena K. 2010. Effective strategy for pyramiding three bacterial blight resistance genes into fine grain rice cultivar, Samba Mahsuri, using sequence tagged site markers. *Biotechnology Letters* 32: 989-996.

Kranz H.D., Denekamp M., Greco R., Jin H., Leyva A., Meissner R.C., Petroni K., Urzainqui A., Bevan M., Martin C., Smeekens S., Tonelli C., Paz-Ares J., Weisshaar B. 1998. Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16: 263-276.

Krasikov V, Dekker HL, Rep M, Takken FLW. 2011. The tomato xylem sap protein XSP10 is required for full susceptibility to *Fusarium* wilt disease. *Journal of Experimental Botany* 62: 963-973.

Kumar M, Busch W, Birke H, Kemmerling B, Nürnberger T, Schöffl F. 2009. Heat Shock Factors HsfB1 and HsfB2b Are Involved in the Regulation of Pdf1.2 Expression and Pathogen Resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 2: 152-165.

Laluk K, AbuQamar S, Mengiste T. 2011. The *Arabidopsis* mitochondrial localized pentatricopeptide repeat protein PGN functions in defense against necrotrophic fungi and abiotic stress tolerance. *Plant Physiology*. En prensa. DOI:10.1104/pp.111.177501.

Lapik YR, Kaufman LS. 2003. The *Arabidopsis* Cupin Domain Protein AtPirin1 Interacts with the G Protein α -Subunit GPA1 and Regulates Seed Germination and Early Seedling Development. *The Plant Cell* 15: 1578-1590.

Lee D-G, Ahsan N, Lee S-H, Kang KY, Bahk JD, Lee I-J, Lee B-H. 2007. A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves. *Proteomics* 7: 3369-3383.

- Lee S, Lee J, Paek K-H, Kwon S-Y, Cho H, Kim S, Park J.** 2010. A novel WD40 protein, BnSWD1, is involved in salt stress in *Brassica napus*. *Plant Biotechnology Reports* 4: 165-172.
- Lefebvre B., Timmers T., Mbengue M., Moreau S., Hervé C., Tóth K., Bittencourt-Silvestre J., Klaus D., Deslandes L., Godiard L., Murray J.D., Udvardi M.K., Raffaele S., Mongrand S., Cullimore J., Gamas P., Niebel A., Ott T.** 2010. A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107: 2343-2348.
- Leung H, Zhu Y, Revilla-Molina I, Fan JX, Chen H, Pangga I, Cruz CV, Mew TW.** 2003. Using Genetic Diversity to Achieve Sustainable Rice Disease Management. *Plant Disease* 87: 1156-1169.
- Li Q, Chen F, Sun L, Zhang Z, Yang Y, He Z.** 2006. Expression profiling of rice genes in early defense responses to blast and bacterial blight pathogens using cDNA microarray. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 68: 51-60.
- Liu Y-H, Huang C-J, Chen C-Y.** 2008. Evidence of Induced Systemic Resistance Against *Botrytis elliptica* in Lily. *Phytopathology* 98: 830-836.
- Lorenzo O, Piqueras R, Sanchez-Serrano JJ, Solano R.** 2003. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15: 165-178.
- Lurin C., Andrés C., Aubourg S., Bellaoui M., Bitton F., Bruyère C., Caboche M., Debast C., Gualberto J., Hoffmann B., Lecharny A., Le Ret M., Martin-Magniette M.-L., Mireau H., Peeters N., Renou J.-P., Szurek B., Taconnat L., Small I.** 2004. Genome-Wide Analysis of Arabidopsis Pentatricopeptide Repeat Proteins Reveals Their Essential Role in Organelle Biogenesis. *The Plant Cell* 16: 2089-2103.
- Ma Q-H, Tian B, Li Y-L.** 2010. Overexpression of a wheat jasmonate-regulated lectin increases pathogen resistance. *Biochimie* 92: 187-193.
- Mahmood T, Jan A, Kakishima M, Komatsu S.** 2006. Proteomic analysis of bacterial-blight defense-responsive proteins in rice leaf blades. *Proteomics* 6: 6053-6065.
- Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton KA, Dangl JL, Dietrich RA.** 2000. The transcriptome of Arabidopsis thaliana during systemic acquired resistance. *Nature Genetics* 26: 403-410.

Mao J, Burt AJ, Ramputh A-I, Simmonds J, Cass L, Hubbard K, Miller S, Altosaar I, Arnason JT. 2007. Diverted Secondary Metabolism and Improved Resistance to European Corn Borer (*Ostrinia nubilalis*) in Maize (*Zea mays* L.) Transformed with Wheat Oxalate Oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 2582-2589.

Marrs KA, Alfenito MR, Lloyd AM, Walbot V. 1995. A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2. *Nature* 375: 397-400.

McDowell JM, Woffenden BJ. 2003. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends in Biotechnology* 21: 178-183.

Meyer Y, Buchanan BB, Vignols F, Reichheld JP. 2009. Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. *Annual Review of Genetics* 43: 335-367.

Mitsuhashi I, Iwai T, Seo S, Yanagawa Y, Kawahigasi H, Hirose S, Ohkawa Y, Ohashi Y. 2008. Characteristic expression of twelve rice PR1 family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds (121/180). *Molecular and General Genomics* 279: 415-427.

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science* 9: 490-498.

Moldenhaver K, Gibbons J. 2002. Rice morphology and development in Smith W, Dilday R, eds. Rice: Origin, History, Technology, and Production. New Jersey: Editorial Hoboken.

Monosi B, Wisser R, Pennill L, Hulbert S. 2004. Full-genome analysis of resistance gene homologues in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1434-1447.

Morey C, Mookherjee S, G. R, Bansal M. 2011. DNA free energy based promoter prediction and comparative analysis of Arabidopsis and rice genomes. *Plant Physiology*. En prensa. DOI:10.1104/pp.110.167809.

Mou Z, Fan W, Dong X. 2003. Inducers of Plant Systemic Acquired Resistance Regulate NPR1 Function through Redox Changes. *Cell* 113: 935-944.

Moy P, Qutob D, Chapman BP, Atkinson I, Gijzen M. 2004. Patterns of Gene Expression Upon Infection of Soybean Plants by *Phytophthora sojae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 1051-1062.

- Mukherjee AK, Carp MJ, Zuchman R, Ziv T, Horwitz BA, Gepstein S.** 2010. Proteomics of the response of *Arabidopsis thaliana* to infection with *Alternaria brassicicola*. *Journal of Proteomics* 73: 709-720.
- Munné-Bosch S, Alegre L.** 2004. Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology* 31: 203-216.
- Mur LAJ, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E.** 2008. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany* 59: 501-520.
- Nanda AK, Andrio E, Marino D, Pauly N, Dunand C.** 2010. Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *Journal of Integrative Plant Biology* 52: 195-204.
- Narita NN, Moore S, Horiguchi G, Kubo M, Demura T, Fukuda H, Goodrich J, Tsukaya H.** 2004. Overexpression of a novel small peptide ROTUNDIFOLIA4 decreases cell proliferation and alters leaf shape in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 38: 699-713.
- Narusaka Y, Narusaka M, Seki M, Umezawa T, Ishida J, Nakajima M, Enju A, Shinozaki K.** 2004. Crosstalk in the responses to abiotic and biotic stresses in *Arabidopsis*: Analysis of gene expression in cytochrome P450 gene superfamily by cDNA microarray. *Plant Molecular Biology* 55: 327-342.
- Nekrasov V, Ludwig AA, Jones JDG.** 2006. CITRX thioredoxin is a putative adaptor protein connecting Cf-9 and the ACIK1 protein kinase during the Cf-9/Avr9-induced defence response. *FEBS Letters* 580: 4236-4241.
- Nieuwland J, Feron R, Huisman BA, Fasolino A, Hilbers CW, Derksen J, Mariani C.** 2005. Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco. *Plant Cell* 17: 2009-2019.
- Nohzadeh-Malakshah S, Habibi M, Heidari M, Hosseini G.** 2007. Proteomics Reveals New Salt Responsive Proteins Associated with Rice Plasma Membrane. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71: 2144-2154.
- Olszewski N, Sun T-p, Gubler F.** 2002. Gibberellin Signaling: Biosynthesis, Catabolism, and Response Pathways. *The Plant Cell* 14: S61-S80.

Ouyang S., Zhu W., Hamilton J., Lin H., Campbell M., Childs K., Thibaud-Nissen F., Malek R.L., Lee Y., Zheng L., Orvis J., Haas B., Wortman J., Buell C.R. 2007. The TIGR Rice Genome Annotation Resource: improvements and new features. *Nucleic Acids Res* 35: 883-887.

Paez O, Romero A. 2004. El cultivo de arroz en Venezuela. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Caracas- Venezuela 1ra Edición.

Park S-W, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF. 2007. Methyl Salicylate Is a Critical Mobile Signal for Plant Systemic Acquired Resistance. *Science* 318: 113-116.

Pechan T, Cohen A, Williams WP, Luthe DS. 2002. Insect feeding mobilizes a unique plant defense protease that disrupts the peritrophic matrix of caterpillars. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99: 13319-13323.

Pelegriani P.B., Murad A.M., Silva L.P., Dos Santos R.C., Costa F.T., Tagliari P.D., Bloch C., Jr., Noronha E.F., Miller R.N., Franco O.L. 2008. Identification of a novel storage glycine-rich peptide from guava (*Psidium guajava*) seeds with activity against Gram-negative bacteria. *Peptides* 29: 1271-1279.

Peters RJ. 2006. Uncovering the complex metabolic network underlying diterpenoid phytoalexin biosynthesis in rice and other cereal crop plants. *Phytochemistry* 67: 2307-2317.

Pinson SRM, Capdevielle FM, Oard JH. 2005. Confirming QTLs and Finding Additional Loci Conditioning Sheath Blight Resistance in Rice Using Recombinant Inbred Lines. *Crop Science*. 45: 503-510.

Raffaele S., Bayer E., Lafarge D., Cluzet S., Retana S.G., Boubekour T., Leborgne-Castel N., Carde J.-P., Lherminier J., Noirot E., Satiat-Jeunemaître B., Laroche-Traineau J., Moreau P., Ott T., Maule A.J., Reymond P., Simon-Plas F., Farmer E.E., Bessoule J.-J., Mongrand S. 2009. Remorin, a Solanaceae Protein Resident in Membrane Rafts and Plasmodesmata, Impairs Potato virus X Movement. *The Plant Cell*. 21:1541-1555

Ralph S, Park J-Y, Bohlmann J, Mansfield S. 2006. Dirigent Proteins in Conifer Defense: Gene Discovery, Phylogeny, and Differential Wound- and Insect-induced Expression of a Family of DIR and DIR-like Genes in Spruce (*Picea* spp.). *Plant Molecular Biology* 60: 21-40.

- Rao KP, Richa T, Kumar K, Raghuram B, Sinha AK.** 2010. In Silico Analysis Reveals 75 Members of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase Gene Family in Rice. *DNA Research* 17: 139-153.
- Rauyaree P, Choi W, Fang E, Blackmon B, Dean RA.** 2001. Genes expressed during early stages of rice infection with the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant Pathology* 2: 347-354.
- Raval S, Gowda SB, Singh DD, Chandra NR.** 2004. A database analysis of jacalin-like lectins: sequence-structure-function relationships. *Glycobiology* 14: 1247-1263.
- Remington DL, Vision TJ, Guilfoyle TJ, Reed JW.** 2004. Contrasting Modes of Diversification in the Aux/IAA and ARF Gene Families. *Plant Physiology* 135: 1738-1752.
- Ren M-Z, Chen Q-J, Li L, Zhang R, Guo S-D.** 2005. Functional Analysis of Nodulin-like Promoter in Transgenic Cotton Plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 47: 1254-1259.
- Restrepo S, Myers KL, del Pozo O, Martin GB, Hart AL, Buell CR, Fry WE, Smart CD.** 2005. Gene Profiling of a Compatible Interaction Between *Phytophthora infestans* and *Solanum tuberosum* Suggests a Role for Carbonic Anhydrase. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 913-922.
- Reymond A., Meroni G., Fantozzi A., Merla G., Cairo S., Luzi L., Riganeli D., Zanaria E., Messali S., Cainarca S., Guffanti A., Minucci S., Pelicci P.G., Ballabio A.** 2001. The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO Journal* 20: 2140-2151.
- Ribot C, Hirsch J, Balzergue S, Tharreau D, Notteghem JL, Lebrun MH, Morel JB.** 2008. Susceptibility of rice to the blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Journal of Plant Physiology* 165: 114-124.
- Rivas S, Rougon-Cardoso A, Smoker M, Schausser L, Yoshioka H, Jones JD.** 2004. CITRX thioredoxin interacts with the tomato Cf-9 resistance protein and negatively regulates defence. *EMBO Journal* 23: 2156-2165.
- Rodrigues FÁ, McNally DJ, Datnoff LE, Jones JB, Labbé C, Benhamou N, Menzies JG, Bélanger RR.** 2004. Silicon Enhances the Accumulation of Diterpenoid Phytoalexins in Rice: A Potential Mechanism for Blast Resistance. *Phytopathology* 94: 177-183.

- Ronald PC.** 1997. The molecular basis of disease resistance in rice. *Plant Molecular Biology* 35: 179-186.
- Ross CA, Liu Y, Shen QJ.** 2007. The WRKY Gene Family in Rice (*Oryza sativa*). *Journal of Integrative Plant Biology* 49: 827-842.
- Rozen S, Skaletsky H.** 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132: 365-386.
- Saeed A.I., Bhagabati N.K., Braisted J.C., Liang W., Sharov V., Howe E.A., Li J., Thiagarajan M., White J.A., Quackenbush J.** 2006. TM4 microarray software suite. *Methods Enzymology* 411: 134-193.
- Saeed A.I., Sharov V., White J., Li J., Liang W., Bhagabati N., Braisted J., Klapa M., Currier T., Thiagarajan M., Sturn A., Snuffin M., Rezantsev A., Popov D., Ryltsov A., Kostukovich E., Borisovsky I., Liu Z., Vinsavich A., Trush V., Quackenbush J.** 2003. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34: 374-378.
- Salunke BK, Kotkar HM, Mendki PS, Upasani SM, Maheshwari VL.** 2005. Efficacy of flavonoids in controlling *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: *Bruchidae*), a post-harvest pest of grain legumes. *Crop Protection* 24: 888-893.
- Sarowar S, Kim YJ, Kim KD, Hwang BK, Ok SH, Shin JS.** 2009. Overexpression of lipid transfer protein (LTP) genes enhances resistance to plant pathogens and LTP functions in long-distance systemic signaling in tobacco. *Plant Cell Reports* 28: 419-427.
- Scandalios JG.** 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38: 995-1014.
- Scharte J, Schön H, Tjaden Z, Weis E, von Schaewen A.** 2009. Isoenzyme replacement of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the cytosol improves stress tolerance in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106: 8061-8066.
- Schenk PM, Kazan K, Rusu AG, Manners JM, Maclean DJ.** 2005. The SEN1 gene of *Arabidopsis* is regulated by signals that link plant defence responses and senescence. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 997-1005.

- Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM.** 2000. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 11655-11660.
- Schmid J, Amrhein N.** 1995. Molecular organization of the shikimate pathway in higher plants. *Phytochemistry* 39: 737-749.
- Schmitz-Linneweber C, Small I.** 2008. Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends in Plant Science* 13: 663-670.
- Schroeder FC, del Campo ML, Grant JB, Weibel DB, Smedley SR, Bolton KL, Meinwald J, Eisner T.** 2006. Pinoresinol: A lignol of plant origin serving for defense in a caterpillar. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103: 15497-15501.
- Shen X, Liu H, Yuan BIN, Li X, Xu C, Wang S.** 2011. OsEDR1 negatively regulates rice bacterial resistance via activation of ethylene biosynthesis. *Plant, Cell & Environment* 34: 179-191.
- Shim K.S., Cho S.K., Jeung J.U., Jung K.W., You M.K., Ok S.H., Chung Y.S., Kang K.H., Hwang H.G., Choi H.C., Moon H.P., Shin J.S.** 2004. Identification of fungal (*Magnaporthe grisea*) stress-induced genes in wild rice (*Oryza minuta*). *Plant Cell Reports* 22: 599-607.
- Shiu S-H, Karlowski WM, Pan R, Tzeng Y-H, Mayer KFX, Li W-H.** 2004. Comparative Analysis of the Receptor-Like Kinase Family in *Arabidopsis* and Rice. *The Plant Cell* 16: 1220-1234.
- Singh K, Foley RC, Onate-Sanchez L.** 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current of Opinion on Plant Biology* 5: 430-436.
- Solomon M, Belenghi B, Delledonne M, Menachem E, Levine A.** 1999. The Involvement of Cysteine Proteases and Protease Inhibitor Genes in the Regulation of Programmed Cell Death in Plants. *The Plant Cell* 11: 431-444.
- Song S, Ge Q, Wang J, Chen H, Tang S, Bi J, Li X, Xie Q, Huang X.** 2011. TRIM-9 functions in the UNC-6/UNC-40 pathway to regulate ventral guidance. *Journal of Genetics and Genomics* 38: 1-11.

Spoel SH, Tada Y, Loake GJ. 2010. Post-translational protein modification as a tool for transcription reprogramming. *New Phytologist* 186: 333-339.

Swarbrick PJ, Huang K, Liu G, Slate J, Press MC, Scholes JD. 2008. Global patterns of gene expression in rice cultivars undergoing a susceptible or resistant interaction with the parasitic plant *Striga hermonthica*. *New Phytologist* 179: 515-529.

Tabien RE, Li Z, Paterson AH, Marchetti MA, Stansel JW, Pinson SRM, Park WD. 2000. Mapping of four major rice blast resistance genes from 'Lemont' and 'Teqing' and evaluation of their combinatorial effect for field resistance. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 1215-1225.

Tanaka N, Matsuoka M, Kitano H, Asano T, Kaku H, Komatsu S. 2006. *gid1*, a gibberellin-insensitive dwarf mutant, shows altered regulation of probenazole-inducible protein (PBZ1) in response to cold stress and pathogen attack. *Plant, Cell & Environment* 29: 619-631.

Tchagang A, Shearer H, Phan S, Bérubé H, Famili F, Fobert P, Pan Y. 2010. Towards a Temporal Modeling of the Genetic Network Controlling Systemic Acquired Resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Computational Intelligence in Bioinformatics and Computational Biology (CIBCB)* 1: 1-8.

The Gen Ontology Consortium. 2008. The Gene Ontology project in 2008. *Nucleic Acids Res* 36: D440-444.

The Rice Chromosomes 11 and 12 Sequencing Consortia. 2005. The sequence of rice chromosomes 11 and 12, rich in disease resistance genes and recent gene duplications. *BMC Biology*. 3: 20.

The UniProt Consortium. 2011. Ongoing and future developments at the Universal Protein Resource. *Nucleic Acids Research* 39: D214-D219.

Traw MB, Bergelson J. 2003. Interactive Effects of Jasmonic Acid, Salicylic Acid, and Gibberellin on Induction of Trichomes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133: 1367-1375.

Tsunezuka H, Fujiwara M, Kawasaki T, Shimamoto K. 2005. Proteome analysis of programmed cell death and defense signaling using the rice lesion mimic mutant *cdr2*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 18: 52-59.

van der Fits L, Memelink J. 2000. ORCA3, a Jasmonate-Responsive Transcriptional Regulator of Plant Primary and Secondary Metabolism. *Science* 289: 295-297.

Van Ooijen G, Lukasik E, Van Den Burg HA, Vossen JH, Cornelissen BJC, Takken FLW. 2010. The small heat shock protein 20 RSI2 interacts with and is required for stability and function of tomato resistance protein I-2. *The Plant Journal* 63: 563-572.

van Wijk KJ. 2001. Challenges and prospects of plant proteomics. *Plant Physiology* 126: 501-508.

Ventelon-Debout M, Delalande F, Brizard JP, Diemer H, Van Dorsselaer A, Brugidou 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.

Vergne E., Ballini E., Marques S., Sidi Mammam B., Droc G., Gaillard S., Bourot S., DeRose R., Tharreau D., Nottéghem J.L., Lebrun M.H., Morel J.B. 2007. Early and specific gene expression triggered by rice resistance gene Pi33 in response to infection by ACE1 avirulent blast fungus. *New Phytologist* 174: 159-171.

Verhagen BW, Glazebrook J, Zhu T, Chang HS, van Loon LC, Pieterse CM. 2004. The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Molecular of Plant Microbe Interaction* 17: 895-908.

Vignutelli A, Wasternack C, Apel K, Bohlmann H. 1998. Systemic and local induction of an *Arabidopsis* thionin gene by wounding and pathogens. *Plant Journal* 14: 285-295.

Wang G.-F., Wei X., Fan R., Zhou H., Wang X., Yu C., Dong L., Dong Z., Wang X., Kang Z., Ling H., Shen Q.-H., Wang D., Zhang X. 2011. Molecular analysis of common wheat genes encoding three types of cytosolic heat shock protein 90 (Hsp90): functional involvement of cytosolic Hsp90s in the control of wheat seedling growth and disease resistance. *New Phytologist*: 191: 418-431

Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM. 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414: 562-565.

Wilson ID, Neill SJ, Hancock JT. 2008. Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell Environment* 31: 622-631.

Wojtaszek P. 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemichal Journal* 322 (Pt 3): 681-692.

Wrzaczek M, Hirt H. 2001. Plant MAP kinase pathways: how many and what for? *Biology of the Cell* 93: 81-87.

Xingquan Z, Changyou W, Ali M, Hong Z, Xinlun L, Weiyan L, Wanquan J. 2010. Profiling gene expression patterns of stripe rust (*Puccinia striiformis* f.sp.*Tritici*) resistance gene in new wheat germplasm. *Pakistan Journal of Botany* 42: 13.

Xu M, Wilderman PR, Morrone D, Xu J, Roy A, Margis-Pinheiro M, Upadhyaya NM, Coates RM, Peters RJ. 2007. Functional characterization of the rice kaurene synthase-like gene family. *Phytochemistry* 68: 312-326.

Yau CP, Wang L, Yu M, Zee SY, Yip WK. 2004. Differential expression of three genes encoding an ethylene receptor in rice during development, and in response to indole-3-acetic acid and silver ions. *Journal of Experimental Botany* 55: 547-556.

Yu J., Hu S., Wang J., Wong G.K., 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., Li J., Liu Z., Qi Q., 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., Xu J., Zhang K., Zheng X., Dong J., Zeng W., Tao L., Ye J., Tan J., Chen X., He J., Liu D., Tian W., Tian C., Xia H., Bao Q., Li G., Gao H., Cao T., Zhao W., Li P., Chen W., Zhang Y., Hu 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., Tao M., Zhu L., Yuan L., Yang H. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* 296: 79-92.

Yuan Q., Ouyang S., Wang A., Zhu W., Maiti R., Lin H., Hamilton J., Haas B., Sultana R., Cheung F., Wortman J., Buell C.R. 2005. The institute for genomic research Osa1 rice genome annotation database. *Plant Physiology* 138: 18-26.

Yuan Q, Quackenbush J, Sultana R, Perteau M, Salzberg SL, Buell CR. 2001. Rice bioinformatics. analysis of rice sequence data and leveraging the data to other plant species. *Plant Physiology* 125: 1166-1174.

Zeneli G, Krokene P, Christiansen E, Krekling T, Gershenzon J. 2006. Methyl jasmonate treatment of mature Norway spruce (*Picea abies*) trees increases the accumulation of terpenoid resin components and protects against infection by *Ceratocystis polonica*, a bark beetle-associated fungus. *Tree Physiology* 26: 977-988.

Zeng CJT, Lee Y-RJ, Liu B. 2009. The WD40 Repeat Protein NEDD1 Functions in Microtubule Organization during Cell Division in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 21: 1129-1140.

Zhao C-J, Wang A-R, Shi Y-J, Wang L-Q, Liu W-D, Wang Z-H, Lu G-D. 2008. Identification of defense-related genes in rice responding to challenge by *Rhizoctonia solani*. *Theoretical and Applied Genetics* 116: 501-516.

Zoschke R, Nakamura M, Liere K, Sugiura M, Borner T, Schmitz-Linneweber C. 2010. An organellar maturase associates with multiple group II introns. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107: 3245-3250.