



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante
Dr. Christian Figueroa Caro
Instituto de Ecología y Evolución
Facultad de Ciencias

**CONSTRUCCIÓN DE UNA GENOTECA EST (Expressed Sequence Tag)
PARA ESTUDIAR EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL ENTRE
FENOTIPOS SUSCEPTIBLE Y RESISTENTE A INSECTICIDAS DEL
ÁFIDO *Myzus persicae* (Sulzer)**

Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y Título
Profesional de *Bioquímico*

FELIPE EDGARDO SEPÚLVEDA RETAMAL

VALDIVIA – CHILE

2007

“Dedicado a mi Dios y a los seres

que más amo en este mundo...

...Karen y mi familia”

AGRADECIMIENTOS

Durante estos años de formación universitaria son muchas las personas que han sido de gran ayuda y que me han apoyado desinteresadamente, a quienes, mediante estas líneas, deseo expresar toda mi gratitud.

En primer lugar agradezco al Dr. Christian Figueroa, no sólo por aceptar ser el docente patrocinante de mi trabajo de tesis, sino también por su incondicional apoyo, gentileza y disposición para guiarme en mi formación profesional de manera íntegra. A los investigadores pertenecientes al INRA (Instituto Científico de Investigación Agronómica) en Rennes, Francia, por apoyar esta investigación con su valiosa experiencia y conocimientos.

Quisiera agradecer también a mis profesores informantes: la Dra. Gudrun Kausel y el Dr. Jaime Figueroa, por haber aceptado formar parte de mi comisión evaluadora.

Por otra parte, quiero agradecer a todos mis amigos y compañeros, con quienes compartimos incontables horas de estudio. Debo un reconocimiento especial a Marco Cabrera y Elkin Suarez, por su amistad desinteresada y la gran lealtad que mostraron para conmigo.

A mis amados padres y hermanos, por su amor, comprensión y respaldo en todo momento. Agradezco, de todo corazón, a mi novia Karen, quien me ha brindado todo su amor y apoyo desde que llegó a mi vida. No podría haber llegado a estas instancias sin ellos.

Por último, quiero agradecer en forma general a todos quienes han aportado en mi formación profesional, directa o indirectamente, en algún momento determinado.

Esta tesis fue financiada por los proyectos: FONDECYT 3020051 y 1050644 a CCF, y DID UACH.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	1
1.1 SUMMARY	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 HIPÓTESIS.....	10
2.2 OBJETIVO GENERAL.....	11
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1 ÁFIDOS	13
3.2 EXTRACCIÓN DE RNA.....	13
3.3 PURIFICACIÓN DEL mRNA	14
3.4 PRECIPITACIÓN Y CONCENTRACIÓN DEL mRNA PURIFICADO	16
3.5 GENOTECA DE cDNA.....	17
3.5.1 SÍNTESIS DE cDNA	17
3.5.2 CLONAMIENTO DE LOS dscDNA EN BACTERIAS	
ELECTROCOMPETENTES	21
3.5.3 PURIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE cDNA ..	23
3.5.4 ANOTACIÓN DE ESTs EN BASE DE DATOS	26

4. RESULTADOS.....	29
4.1 PRODUCCIÓN DE ESTs Y CONTIGS.....	29
4.2 ANOTACIÓN FUNCIONAL	45
5. DISCUSIÓN.....	48
6. BIBLIOGRAFÍA	51
7. ANEXO.....	61

INDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Gel de agarosa-formaldehído al 1% teñido con bromuro de etidio, en condiciones libres de RNAsas: Muestras de RNA total.....15
- FIGURA 2:** Gel de Agarosa/Bromuro de Etidio (EtBr) al 1,1%: Muestras de ds cDNA amplificadas por LD-PCR.....19
- FIGURA 3:** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio: Productos PCR de las colonias de *E. coli* transformadas y crecidas, tomados al azar.....24
- FIGURA 4:** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio: Productos PCR purificados mediante columnas Sephadex G-50 comerciales (SigmaSpin Sigma).....25
- FIGURA 5:** Distribución de las 532 secuencias contigs por categoría funcional.....46

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: Similitud de las secuencias contig de <i>Myzus persicae</i> usando BlastX con aquellas encontradas en bases de datos públicas.....	30
TABLA 2: Secuencias de <i>Myzus persicae</i> putativamente involucradas en la detoxificación de las defensas de la planta y en la resistencia a insecticidas.....	47

INDICE DE ABREVIATURAS

M.persicae: *Myzus persicae*

RNA: Ácido ribonucleico

mRNA: RNA mensajero

rRNA: RNA ribosomal

rNTs: Ribonucleótidos

DNA: Ácido desoxirribonucleico

cDNA: DNA complementario

ss cDNA: cDNA de hebra simple

ds cDNA: cDNA de hebra doble

pb: pares de bases

ESTs: Expressed Sequence Tags

dbESTs: Bases de datos de ESTs

DDT: Dicloro-difenil-tricloroetano

GST: Glutación-S Transferasa

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

MOPS: Ácido 3-[N-morfolino] propanesulfónico

SA-PMPs: Partículas paramagnéticas acopladas a estreptavidina

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

LD-PCR: Long-distance PCR

EtBr: Bromuro de etidio

E.coli: *Escherichia coli*

1. RESUMEN

Los áfidos (Hemiptera: Aphididae), constituyen importantes plagas agrícolas, provocando enormes pérdidas económicas en todo el mundo, debido principalmente a su alta tasa de reproducción y por transmitir virus fitopatógenos. El manejo de estas plagas involucra principalmente tratamientos químicos, los cuales son contaminantes y cada vez más ineficientes desde que los áfidos han desarrollado múltiples mecanismos de resistencia a insecticidas.

Myzus persicae (Sulzer) es una de las especies de áfidos más importantes en el ámbito económico, ya que coloniza un amplio rango de plantas pertenecientes a diferentes familias, transmitiéndoles numerosos virus. Debido a esto, *M. persicae* ha sido combatido con masivos tratamientos de insecticidas, lo que ha ocasionado que desarrolle diversos mecanismos de resistencia a insecticidas.

En este trabajo de tesis, se construyó una librería de ESTs (Expressed Sequence Tags) a partir del transcriptoma (conjunto de mRNAs expresados en un momento determinado) del áfido *M. persicae*. Luego de clonar y secuenciar los cDNAs provenientes del transcriptoma se obtuvieron 959 secuencias anotadas como *contigs*, los que fueron agrupados en categorías de acuerdo con su función. El 63% se agrupó como proteínas involucradas en: metabolismo (26%), ribosomales (23%), estructurales (8%), de diferenciación (4%) y chaperoninas (2%). El 37% restante correspondió a proteínas “hipotéticas” (2%) y “sin función conocida” (35%). Ocho de los *contigs* fueron seleccionados como candidatos para estudios sobre resistencia a insecticidas.

1.1 SUMMARY

Aphids (Hemiptera: Aphidiae) constitute important agricultural pests, promoting enormous economic losses worldwide, mainly because to their high reproduction rate and the transmission of phytopathogenic viruses. Management of these pests mainly involves chemical treatments, which are pollutant and increasingly inefficient, since aphids have developed multiple insecticide-resistant mechanisms.

Myzus persicae (Sulzer) is one of the more important aphid species in the economic ambit, because colonizes a wide range of host plants belonging to different families, and transmits numerous plant viruses. Due to this, *M. persicae* has been fought with massive insecticide treatments, which has caused that it develops diverse mechanisms of resistance to insecticides.

In this thesis work, a ESTs (Expressed Sequence Tags) library was constructed from the aphid *M. persicae* transcriptome (set of mRNAs expressed in a while determined). After cloning and sequencing the cDNA coming from the transcriptome, 959 sequences were obtained and annotated like *contigs*, which were grouped in categories in agreement with their function. 63% were matched like: proteins involved in metabolism (26%), ribosomal proteins (23%), structural proteins (8%), differentiation (4%) and chaperonin (2%). 37% rest corresponded to “hypothetical” proteins (2%) and “no hit” (35%). Eight contigs were selected like candidates for studies on resistance to insecticides.

2. INTRODUCCIÓN

Resistencia a insecticidas

La resistencia a insecticidas es un interesante ejemplo de selección hecha por el hombre, y los factores que gobiernan el origen y extensión de las mutaciones asociadas a la resistencia son de importancia tanto básica como aplicada (French-Constant y cols., 2004).

Se ha definido la resistencia a insecticidas como un cambio genético poblacional en respuesta a la presión de selección de los pesticidas, cambio que puede limitar el control en situaciones de campo (French-Constant y Roush, 1990).

La evolución de la resistencia a insecticidas en las poblaciones plaga, es uno de los desafíos para su manejo integral (Metcalf, 1989). Para muchos cultivos, la aplicación de insecticidas es la única alternativa asequible para mantener las plagas por debajo de los umbrales de daño económico (Metcalf, 1996). Sin embargo, la aplicación de estos productos, inevitablemente conduce al desarrollo de resistencia en el mediano y largo plazo (Metcalf, 1996; Hoy, 1999; Silva, 2003).

Los áfidos como modelo biológico

Una gran parte de los insectos que pueblan el planeta se alimentan de plantas, es decir son fitófagos, los que han demostrado ser mucho más diversos que los insectos no fitófagos (Jeanike, 1990). Dentro de este grupo de insectos fitófagos existe una amplia gama que desarrolla resistencia a insecticidas, en donde destacan los áfidos (Hemiptera: Aphididae), insectos ubicuos que frecuentemente constituyen plagas debido (i) al daño directo que producen sobre su planta hospedera a través de la ingestión de floema y a la acumulación de fumagina,

(ii) a su alta tasa de reproducción, y (iii) a su capacidad para transmitir virus fitopatógenos (Minks y Harrewijn, 1987).

Los áfidos poseen variados modos de reproducción, desde la partenogénesis cíclica (alternancia de varias generaciones partenogenéticas con una única generación sexual) hasta la partenogénesis obligada (partenogénesis permanente constituida sólo por hembras) (Moran, 1992; Simon y cols, 2002). El rápido incremento poblacional de los áfidos es debido a una combinación de reproducción partenogenética vivípara con generaciones telescópicas, y dado que durante la reproducción partenogenética no ocurre recombinación, los linajes de individuos derivados desde una misma hembra partenogenética son genéticamente idénticos (clones) (Blackman, 1974). El modo de reproducción de los áfidos está fuertemente controlado por el ambiente. La sexualidad puede gatillarse al combinar bajas temperaturas con fotoperíodos cortos, mientras que condiciones contrarias pueden favorecer la reproducción partenogenética. De este modo, la reproducción partenogenética predomina en climas templados como los que se presentan en Chile. Bajo estas condiciones, todas las especies de áfidos que constituyen plagas agrícolas en Chile se reproducen por partenogénesis sostenida todo el año (Figueroa y cols., 1999; 2002; 2004; 2005; Fuentes-Contreras y cols. 1997).

Por su condición de plaga, los áfidos han causado grandes pérdidas económicas a nivel mundial. Son capaces de atacar una gran diversidad de especies vegetales. Uno de los áfidos de mayor impacto agronómico es el pulgón verde del duraznero, *Myzus persicae* (Sulzer). Este áfido es una de las especies más generalistas, capaz de alimentarse sobre más de cuarenta familias vegetales incluyendo tabaco, remolacha, hortalizas, (crucíferas, solanáceas y cucurbitáceas), frutales de carozo y plantas ornamentales, entre otras (Van Emden y cols., 1969; Blackman y Eastop, 2000; Margaritopoulos y cols., 2003).

Mecanismos de resistencia a insecticidas en el áfido *Myzus persicae*

Se ha evidenciado que *M. persicae* es capaz de desarrollar rápidamente resistencia a una amplia gama de insecticidas en varios países (Devonshire y cols., 1998; Field y Blackman, 2003), tanto para cultivos agroindustriales (French-Constant y cols., 1988b; Dewar y cols., 1992; Foster y cols., 1998; Williams y cols., 1998; Foster y cols., 2002; Fuentes-Contreras y cols., 2004), hortícolas (Takada, 1986; Kerns y cols., 1998; Nauen y Elbert, 2003) y frutales (Unruh y cols., 1996; Mazzoni y Cravedi, 2002). Dos son los mecanismos generales de resistencia a insecticidas en *M. persicae*: (i) Mutaciones en el sitio blanco de los insecticidas y, (ii) Sistemas enzimáticos que metabolizan insecticidas.

Los factores no metabólicos que confieren resistencia a insecticidas corresponden a la modificación de los sitios donde actúan los insecticidas, como por ejemplo, la presencia de una acetilcolinesterasa modificada que confiere alta resistencia a carbamatos (Moore y cols., 1994), y mutaciones puntuales en el gen correspondiente a una subunidad del canal de sodio, que confiere resistencia a piretroides y DDT (Martínez Torres y cols., 1999b; Anstead y cols., 2005). La resistencia mediada por factores metabólicos, está basada en una sobreproducción de enzimas que detoxifican xenobióticos, tales como i) Esterasas (E4 y FE4), que secuestran y detoxifican ciertos insecticidas, confiriendo resistencia frente a organofosforados y a la mayoría de los carbamatos, ii) Glutación-S-transferasa (GST), que transforma los insecticidas (normalmente muy apolares) en compuestos más solubles, y iii) Citocromo P-450 monooxigenasas (o MFO: Multi Function Oxidases), que confiere resistencia a diversas clases de insecticidas a través de su oxidación, transformándolos en moléculas más solubles (Devonshire y Moore, 1982; Scott, 1990; Soderlund y Bloomquist, 1990; Berge, 1998; Scott, 2001; Anstead y cols., 2005; Enayati y cols., 2005). En el caso particular de las Esterasas, se ha

encontrado que el grado de resistencia está relacionado directamente con una elevada expresión génica, la que a su vez estaría determinada por efectos epigenéticos mediados por metilación de genes represores de la expresión de Esterasas (Field y Foster, 2002; Field y Blackman, 2003; Field y cols., 2004).

Herramientas de la genómica para estudiar expresión génica en áfidos

La Transcriptómica constituye una poderosa herramienta para identificar nuevos genes y funciones génicas; ésta ha sido aplicada exitosamente en muchos organismos, pero sólo recientemente se han comenzado a aplicar análisis relativos a esta disciplina sobre áfidos (Hunter y cols., 2003; Tagú y cols., 2004). Desde Junio de 2003, el Consorcio Internacional de Genómica de Áfidos (IAGC) ha decidido desarrollar y compartir herramientas y datos para las diferentes disciplinas de genómica (transcriptómica, mapas genéticos, bioinformática) para estimular la investigación de los mecanismos involucrados en el daño de la planta causado por los áfidos.

De esta forma, las propiedades metabólicas que confieren resistencia a insecticidas pueden ser estudiadas evaluando los niveles de expresión de los genes que participarían en la detección y metabolización de insecticidas (por ejemplo, los genes que codifican para enzimas detoxificadoras). Actualmente, los avances en genómica permiten que este tipo de estudio pueda llevarse a cabo utilizando la tecnología de “microarrays” (microarreglos) de DNA (Leung y Cavalieri, 2003). Esta tecnología permite diseñar microchips de DNA, sobre los cuales hay depositados varios miles de genes, y evaluar el nivel de expresión génica de cada uno de ellos bajo una determinada condición experimental. Esta aproximación genómica,

permite un acercamiento experimental hacia el entendimiento de la función del genoma de una forma sintética.

Para la construcción de un “microchip” de DNA específico para el tejido u organismo en estudio, se requiere disponer de una genoteca de cDNAs representante de la diversidad de transcritos que se expresan bajo una condición determinada, y conocer las secuencias de estos cDNAs organizados en bases de datos de ESTs (Expressed Sequence Tags).

Los ESTs son secuencias cortas de cDNA (~ 600 pares de bases) obtenidas a partir del transcriptoma (conjunto de todos los mRNAs) del tejido del cual se construye la genoteca, y que son clonadas y secuenciadas para posteriormente ser comparadas con otros ESTs disponibles en bancos de datos especiales de dominio público llamados dbEST. Es aquí donde las secuencias de los ESTs son depositadas especificando su especie y tejido de origen, entre otros datos. Mediante la comparación por homología de secuencias, las bases de datos ESTs permiten estudiar la posible función de nuevas secuencias ESTs comparándolas con las obtenidas a partir de otros insectos u otros organismos. De esta forma, la construcción de genotecas de cDNA es fundamental para el desarrollo de una dbESTs para artrópodos y su consecuente utilización en la investigación de la expresión de ESTs en insectos.

A partir de una genoteca de cDNAs se obtienen secuencias ESTs de diversos tamaños, y muchas de estas pueden corresponder a fragmentos de un mismo mRNA. Por consiguiente, es posible alinear y solapar estas secuencias con la ayuda de un programa computacional, de modo de generar *clusters* de secuencias. De esta forma, los *clusters* permiten obtener secuencias de consenso del transcrito, lo que se denomina *contig*. Se puede definir entonces a un contig como un conjunto de secuencias ESTs solapadas (clones) que representan una región

continua del genoma, tienen idénticas secuencias de nucleótidos en alguno de sus extremos y, por eso, se pueden superponer. (*Oxford Dictionary of Biochemistry y Molecular Biology*).

Así, los contigs son secuencias que representan genes expresados por el tejido u organismo en estudio, por lo que es posible comparar estas secuencias (contigs) con otras secuencias o genes de función conocida, mediante la ayuda de programas computacionales como BlastX.

Con la ayuda de la tecnología genómica (Transcriptómica), se podrán conocer qué enzimas, proteínas, etc., se pueden estar expresando en el modelo de estudio bajo determinadas condiciones, y así manejar esta información de acuerdo a los intereses del investigador.

Presentación del trabajo de tesis

Dado que *M. persicae* es uno de los insectos que desarrolla uno de los mayores niveles de resistencia a insecticidas, se ha elegido trabajar con este áfido como modelo para evaluar cualitativa y cuantitativamente la expresión diferencial de genes cuando un mismo genotipo (fenotipo) resistente está expuesto a la presión de insecticidas y cuyo no lo está.

Para llevar a cabo este proyecto se requiere de la construcción de una genoteca de cDNA (DNA complementario) que permita el desarrollo de una base de datos de ESTs para el áfido *Myzus persicae*.

Consecuentemente, la presente tesis tiene como objetivo principal construir una genoteca de cDNA a partir del áfido *M. persicae*, actividad que forma parte de un proyecto de investigación que pretende describir la dinámica genómica involucrada en la adquisición de resistencia a insecticidas en áfidos.

A través de esta aproximación, se espera obtener información genético-molecular detallada de los efectos de los insecticidas sobre la expresión de genes relevantes a la resistencia en áfidos, información que podría ser directamente aplicada al diseño de nuevas estrategias de control, e indirectamente aplicada para controlar otras especies de insectos fitófagos de importancia agroeconómica. Asimismo, este trabajo entregará la información necesaria para validar la hipótesis formulada, la cual corresponde al proyecto de investigación antes mencionado.

2.1. HIPÓTESIS

La adquisición de resistencia a insecticidas en el áfido *Myzus persicae* está determinada por una expresión diferencial de genes. Cuando el áfido está expuesto a la presión de los insecticidas, el genotipo del áfido se expresa cualitativa y cuantitativamente de una forma distinta que cuando el áfido no está expuesto.

2.2 OBJETIVO GENERAL

Construir una genoteca de cDNA para el áfido *Myzus persicae* (Sulzer) que permita el desarrollo de una base de datos ESTs, que se usará para construir un microchip de DNA para evaluar si el desarrollo de resistencia a insecticidas en el áfido *M. persicae* está también determinada por una expresión diferencial de genes.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.3.1 Aislar y purificar RNA total a partir de áfidos *M. persicae* crecidos en el laboratorio bajo condiciones controladas.
- 2.3.2 Sintetizar por transcripción reversa el cDNA complementario a partir del RNA previamente purificado.
- 2.3.3 Clonar los diferentes cDNA sintetizados en bacterias electrocompetentes.
- 2.3.4 Purificar y secuenciar los fragmentos clonados a partir del áfido *M. persicae*.
- 2.3.5 Anotar las secuencias en una base de datos ESTs, formar clusters y obtener contigs.
- 2.3.6 Buscar por homología de secuencias en bases de datos públicas, la función putativa de cada secuencia clonada

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 ÁFIDOS

El genotipo de *M. persicae* utilizado correspondió al clón Mp1 recolectado en un cultivo de papa en Roscoff (Bretagne, oeste de Francia), y mantenido en condiciones de reproducción partenogenética continua bajo fotoperíodos largos (16 horas de luz/ 8 horas de oscuridad) y a una temperatura cálida (20°C), condiciones que garantizan su reproducción partenogenética (Terradot y cols., 1999).

3.2 EXTRACCIÓN DE RNA

Se usaron 500 hembras adultas ápteras partenogenéticas pertenecientes al genotipo Mp1, las que fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas en freezer a -80°C hasta su uso. El RNA total fue extraído utilizando el kit “RNeasy Plant Mini Kit” (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cincuenta áfidos previamente congelados con nitrógeno líquido fueron homogeneizados con pistilo plástico en 450 µl de tampón RLT + β-Mercaptoetanol (provisto en el kit). Después de la lisis, la muestra fue incubada a 56°C por 3 min y luego centrifugada a través de una columna QIA shredder™ (provista en el kit) a 10.000 rpm por 2 min para separar el material insoluble (exoesqueleto, patas, antenas, etc.). Luego se agregó 225 µl de etanol para aclarar el lisado, creando así condiciones que promueven la unión selectiva del RNA a la membrana sílica-gel RNeasy. La muestra fue luego aplicada a una minicolumna RNeasy (provista en el kit), donde el RNA se une a la membrana, y se centrifugó a 10.000 rpm por 15 seg. Para eliminar los contaminantes remanentes se lavó la columna con 350 µl de tampón RW1 (provisto en el kit) y se centrifugó a 10.000 rpm por 10 seg y luego se realizaron 2 lavados más con 500 µl de tampón RPE (provisto en el kit) centrifugando por 15

seg y 2 min respectivamente a 10.000 rpm. El RNA total fue eluído de la columna con 40µl de agua ultrapura, centrifugando a 10.000 rpm por 2 min. La concentración del RNA fue determinada por absorbancia a una longitud de onda de 260nm en espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (~ 1 µg/µl). El coeficiente 260/280 fue de ~ 2,1, dando cuenta de un RNA de alta pureza. La calidad del RNA se analizó a través de electroforesis en geles de agarosa-formaldehído al 1% teñidos con bromuro de etidio en condiciones libres de RNasas. (Figura 1). En el gel mostrado en la figura, se cargó 2 µl de RNA (~ 2 µg), 2 µl de agua ultrapura y 1 µl de tampón de carga 5X (azul de bromofenol, EDTA 500mM (pH 8,0) formaldehído 37%, glicerol 100%, formamida, ácido 3-[N-morfolino] propanesulfónico (MOPS) y acetato de sodio) por carril de muestra, donde se pueden apreciar dos bandas correspondientes a las dos mayores moléculas de rRNA de los eucariotas, la 28S correspondiente a la subunidad mayor de los ribosomas de un tamaño aproximado de 4.000 ribonucleótidos (rNTs) y la 18S, correspondiente a la subunidad menor de un tamaño aproximado de 2.400 rNTs.

3.3 PURIFICACIÓN DEL mRNA

Los Poly-A RNAs fueron purificados a partir de 600 µg de RNA total (500µl de RNA 1,2µg/µl) utilizando el kit “PolyAtract mRNA Isolation System III” (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema utiliza un partidor oligo(dT) biotinilado para hibridar en solución la región 3’poly(A) del mRNA aislado de los áfidos. Los híbridos oligo(dT)-mRNA son capturados y lavados en alta astringencia haciendo uso de la afinidad de la Biotina por la Estreptavidina acoplada a partículas paramagnéticas (SA-PMPs), las que son capturadas en un soporte magnético.

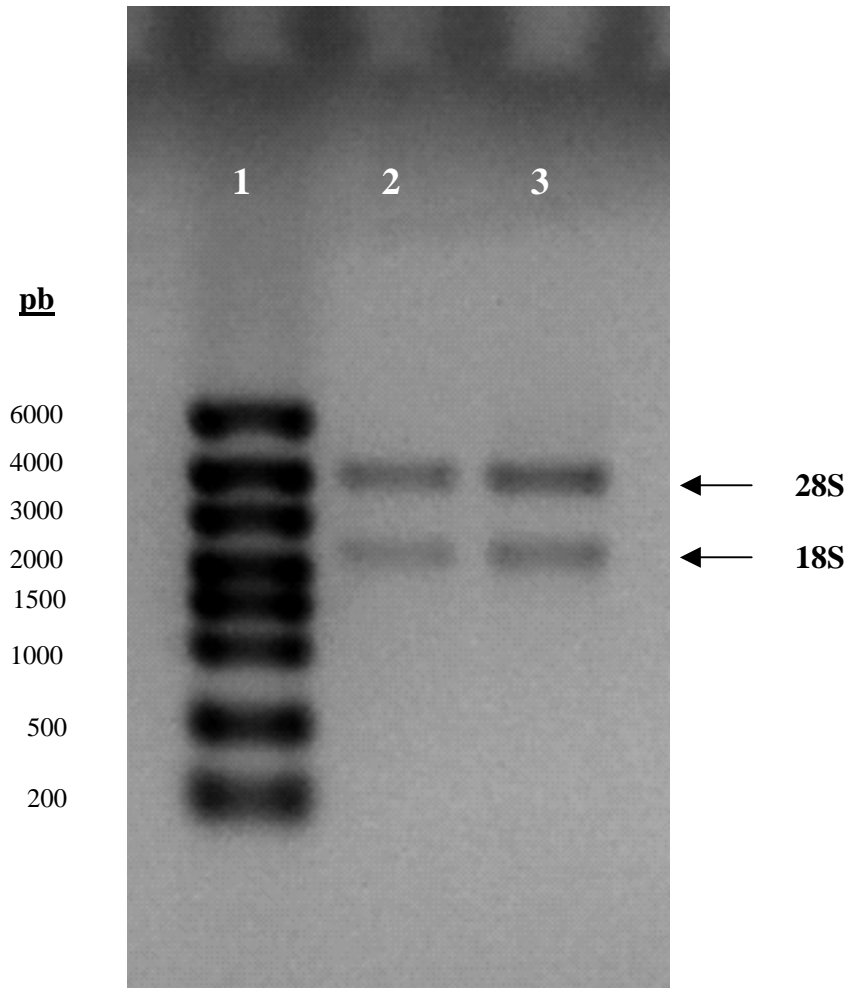


Figura 1: Gel de agarosa-formaldehído al 1% teñido con bromuro de etidio, en condiciones libres de RNAsas. Se señalan con una flecha las moléculas de rRNA 28S y 18S eucarióticas. Se cargó 2 μ g de RNA total por carril de muestra y 0,5 μ g de cada standard.

Carril 1: Standard RNA Ladder (Fermentas); *Carriles 2 y 3:* Muestras de RNA total extraído de 50 áfidos.

Las SA-PMPs, las que son provistas en una solución de tampón salino fosfato (PBS), de albúmina de suero de bovino (BSA) 1 mg/ml y azida de sodio 0,02%.

Para comenzar, se realizó el alineamiento de la sonda incubando el tubo con el RNA total a 65°C por 10min y luego se le agregó 3µl de sonda biotinilada de oligo(dT) y 13µl de solución SSC 20X (NaCl y Citrato de Sodio) (provistos en el kit) para luego enfriar el tubo a temperatura ambiente. Por otra parte, las SA-PMPs fueron lavadas tres veces, cada vez con un volumen igual de 300µl de solución SSC 0,5X (preparada a partir de la solución SSC 20X), capturándolas entre cada lavado con un soporte magnético y removiendo los lavados. Después de lavar las SA-PMPs, se resuspendieron en 100µl de solución SSC 0,5X. A continuación, se agregó todo el contenido de la reacción de alineamiento al tubo que contenía las SA-PMPs lavadas. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente mezclando de vez en cuando. Luego se capturaron las SA-PMPs con el soporte magnético y se guardó el sobrenadante en otro tubo hasta asegurarse de que la unión entre las partículas e híbridos haya ocurrido. Posteriormente, se lavaron las SA-PMPs cuatro veces con 300µl de solución SSC 0,1X (preparada a partir de la solución SSC 20X), de la misma forma que se hicieron los anteriores lavados. Para eluir el mRNA de las partículas SA-PMPs, éstas fueron resuspendidas en 250µl de agua desionizada libre de ribonucleasas y luego se capturaron con el soporte magnético, quedando en el sobrenadante la solución de mRNA purificado. La concentración de mRNA fue determinada por absorbancia a 260 nm en espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (~ 8,0 ng/µl)

3.4 PRECIPITACIÓN Y CONCENTRACIÓN DEL mRNA PURIFICADO

La fracción de mRNA aislado fue concentrada mediante precipitación con etanol. Para ello, se agregó a la muestra de mRNA 0,1 volumen de acetato de sodio 3M (pH 5,2) y 1

volumen de isopropanol al eluido, para a continuación incubarse a -20°C toda la noche. Al otro día, se centrifugó la muestra a $12.000 \times g$ por 10min y se resuspendió el sedimento en 1ml de etanol 75%, centrifugando nuevamente. Para finalizar, se secó el sedimento en un desecador al vacío libre de RNAsas, resuspendiéndose posteriormente en $1\mu\text{l}$ de agua desionizada y libre de RNAsas por cada fracción de mRNA aislado, almacenándose luego a -70°C . La concentración del mRNA fue determinada por absorbancia en espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 ($\sim 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$).

3.5 GENOTECA DE cDNA.

3.5.1 SÍNTESIS DE cDNA

La síntesis y clonamiento del cDNA fueron realizadas con el kit “CreatorTM SmartTM cDNA Library Construction Kit” (BD), según las instrucciones del fabricante.

La primera hebra de cDNA se sintetizó por transcripción reversa (Transcriptasa reversa “Power Script”), utilizando el mRNA aislado previamente como templado. Como control positivo, se utilizó mRNA de placenta humana (provisto en el kit).

Para la reacción, se agregó en un tubo de microcentrífuga $1\mu\text{l}$ del mRNA aislado y concentrado ($0,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$), y en otro tubo $1\mu\text{l}$ de mRNA control ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$). A ambos tubos se les añadió $1\mu\text{l}$ de oligonucleótido SMART IV ($10 \mu\text{M}$), $1\mu\text{l}$ de partidor CDS III/3’ ($10 \mu\text{M}$) y $2\mu\text{l}$ de agua desionizada, para luego incubarse a 72°C y después enfriarse en hielo. Posteriormente, se le agregó a cada tubo $2\mu\text{l}$ de tampón 5X “primera-hebra” (tris 250mM (pH 8.3); MgCl_2 30mM; KCl 375mM), $1\mu\text{l}$ de ditioneitol (DTT) (20 mM), $1\mu\text{l}$ de mix de dNTP (10 mM) y $1\mu\text{l}$ de transcriptasa reversa Power Script ($200\text{u}/\mu\text{l}$), para después incubarse a 42°C . Para finalizar la síntesis de la primera hebra (ss cDNA) inmediatamente finalizada la incubación, se enfrió el

tubo en hielo. La síntesis de la segunda hebra de cDNA se realizó mediante LD-PCR (long-distance PCR) con la “DNA polimerasa Advantage II”. Al tubo con la muestra de ss cDNA se le agregó 80 µl de agua desionizada, 10µl de tampón 10X Advantage 2 PCR, 2µl de mix de dNTP 50X, 2µl de partidor PCR 5’ (10µM), 2µl de partidor CDS III/3’ (10µM) y 2µl de Mix 50X polimerasa Advantage 2. Después se realizó el LD-PCR en un termociclador precalentado a 95°C como se describe a continuación:

- 95°C x 20 seg
- 20 ciclos de:
 - 95°C x 5 seg
 - 68°C x 6 min

Los productos PCR de ds cDNA se analizaron por electroforesis en geles de agarosa/bromuro de etidio (EtBr) al 1,1% (Figura 2) y su concentración fue medida por Nanodrop ND-1000 (~ 0,3 µg/µl). Se cargó 5µl (~ 1,5 µg) de ds cDNA y 1µl de tampón de carga sacarosa-azul de bromofenol 6X por carril de muestra. En los carriles donde se cargó la muestra se aprecia un “degrade” o “huella”, que corresponde a ds cDNAs amplificados, de diversos tamaños, los que van aproximadamente desde los 400-2.000 pb.

La purificación de los cDNAs fue realizada mediante una digestión con proteinasa K para eliminar la presencia de enzimas en la mezcla de cDNAs. Se agregó 2µl de proteinasa K (20 µg/µl) al ds cDNA amplificado y se incubó a 45°C por 20min. Después se agregó 50µl de agua desionizada. Luego se realizó una extracción del ds cDNA mediante fenol: cloroformo: isoamilalcohol, adicionando 100µl de fenol: cloroformo: isoamilalcohol 25:24:1 y centrifugando posteriormente a 14.000rpm por 5min para separar las fases. Después, se removió la capa superior acuosa y se depositó en un nuevo tubo, para luego agregar 100µl de

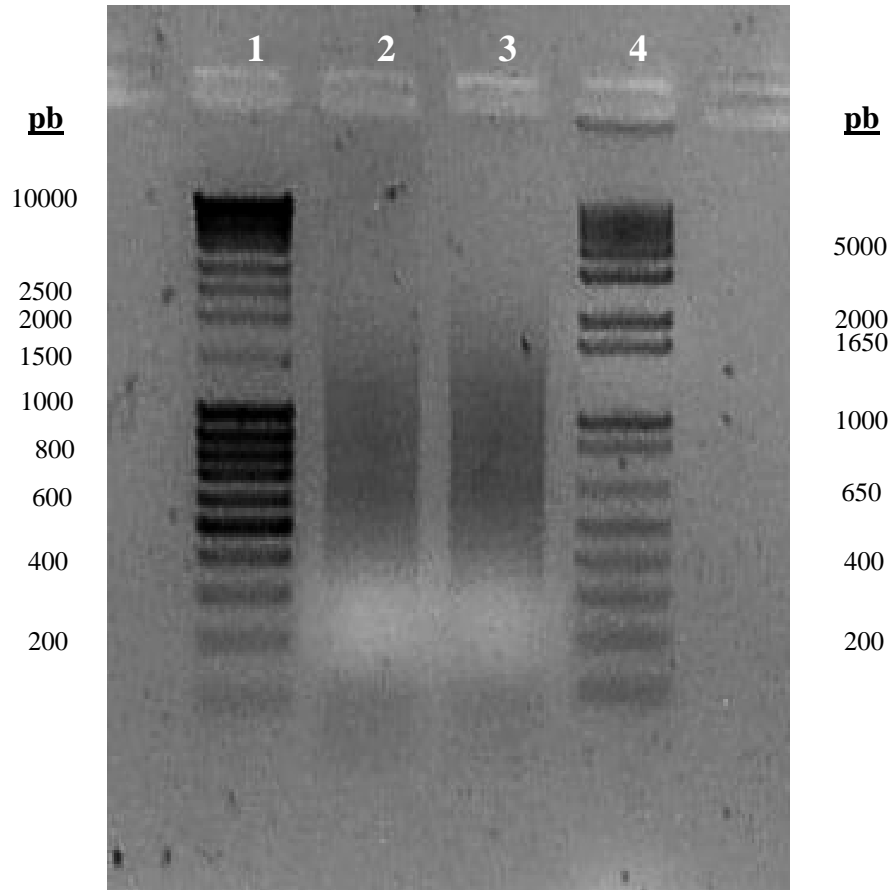


Figura 2: Gel de agarosa al 1,1% teñido con bromuro de etidio. Se cargó 1,5 μ g de ds cDNA de muestra por carril y 0,5 μ g de cada standard.

Carril 1: Standard MassRuler™ DNA Ladder (Fermentas); *Carril 2 y 3:* muestras de ds cDNA amplificadas por LD-PCR, las que forman una “huella” o “degradé” de ds cDNAs de diversos tamaños (entre los 400-2.000 pb aproximadamente); *Carril 5:* TrackIt™ 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

cloroformo: isoamilalcohol 24:1. A continuación para separar las fases, se centrifugó a 14.000rpm por 5min. A continuación se removió nuevamente la capa superior acuosa y se depositó en un nuevo tubo, para agregarle 10µl de acetato de sodio 3M, 1.3µl de glicógeno (20µg/µl) y 260µl de etanol 95%, centrifugando inmediatamente a 14.000rpm por 20min. Luego se retiró cuidadosamente el sobrenadante. El sedimento se lavó con 100µl de etanol 80%, y fue centrifugado 5min a 14.000rpm. El sedimento formado se secó por ~10min en una bomba de vacío, para luego resuspenderlo en 79µl de agua ultrapura estéril.

Para eliminar la secuencia que incluyó a los partidores durante la amplificación por PCR, se digirió el ds cDNA con la enzima de restricción *Sfi* I (provista en el kit). En un tubo se mezcló el ds cDNA con 10µl de tampón *Sfi*10X, 10µl de enzima *Sfi* I y 1µl de BSA 100X, incubando posteriormente a 50°C por 2h. Al tubo finalmente se le agregó 2µl de xileno cianol 1%.

Luego se purificaron los fragmentos de ds cDNA por fraccionamiento a través de una columna de Sephadex CHROMA-SPIN-400 (provista en el kit). Se ajustó el flujo de la columna a 1gota/40seg agregando tampón de columna (provisto por el kit). Se fraccionó toda la muestra de ds cDNA digerido (100µl) a través de la columna. Se colectaron 16 fracciones de eluido en total. A las fracciones de eluido que contenían los ds cDNA (3-4 primeras fracciones) se les agregó 1/10 volúmenes de acetato de sodio (3M, pH 4,8), 1.3 µl de glicógeno (20 mg/ml) y 2,5 volúmenes de etanol 95%, para luego incubarse a -20°C toda la noche. Al otro día se centrifugó el tubo a 14.000rpm por 20 min. Luego, se removió el sobrenadante y después de secar el sedimento de ds cDNA al vacío por 10min, se resuspendió en 7µl de agua desionizada.

3.5.2 CLONAMIENTO DE LOS ds cDNA EN BACTERIAS ELECTROCOMPETENTES

Se realizó la ligación del ds cDNA con un vector de clonación, el plasmidio pDNR-LIB, utilizando la enzima T₄ DNA Ligasa, el cual contiene un gen de resistencia al antibiótico cloranfenicol. Para ello, a 2,5 µl de ds cDNA digerido con *Sfi* se le agregó 1 µl de plasmidio pDNR-LIB (0,1 µg/µl), 0,5 µl de tampón de ligación 10X, 0,5 µl de ATP (10mM) y 0,5 µl de T₄ DNA ligasa. Luego de incubar a 16°C toda la noche, se le añadió al tubo 95 µl de agua ultrapura, 1,5 µl de glicógeno (20 mg/µl) y 280 µl de etanol 95%. Posteriormente, se incubó a -70°C toda la noche. Transcurrida la incubación, la muestra se centrifugó a 14.000rpm por 20 min. Luego el sedimento se lavó con 100 µl de etanol 70% (a -20°C), para en seguida ser secado al vacío por 10 min y posteriormente resuspendido en 5 µl de agua libre de RNAsas.

Posteriormente, los plasmidios recombinantes se transformaron en bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) electrocompetentes “ElectrocompTM TOP 10” (Invitrogen). La transformación fue realizada por electroporación a la potencia descrita para *E.coli* (1.800 V). Las bacterias se descongelaron lentamente sobre hielo, y luego se les agregó el plasmidio. La mezcla se colocó en una cubeta de electroporación, previamente enfriada en hielo, e inmediatamente se realizó la descarga en el electroporador a la potencia indicada. En seguida, se le agregó a la cubeta medio de cultivo LB estéril, y se transfirió todo a un tubo de 1,5 ml, para después incubar con agitación orbital a 37°C por 1 h. Al final de la incubación, se realizó una dilución de 1/100 del tubo stock diluyendo 5µl de bacterias en 495µl de medio LB. Al tubo con las bacterias stock se le agregó glicerol 55% y se almacenó a -80°C. El contenido completo de la dilución fue sembrado en placas Petri que contenían medio LB/Agar sólido con cloranfenicol (30µg/ml), sembrando 50 µl por placa Petri; éstas fueron incubadas posteriormente a 37°C toda la noche. Al otro día las placas contenían colonias suficientes y

aisladas (~100-200 colonias por placa petri). En dos placas de 96 pocillos, fondo cónico, marca NUNC (una placa original y una réplica), se sembró cada colonia de *E. coli* utilizando un mondadientes estéril, sembrando una colonia por pocillo, cada cual conteniendo 100 µl de medio LB con antibiótico (cloranfenicol 30 µg/ml) y glicerol 15%. Cada colonia se sembró con mondadientes en la placa original y luego el mismo mondadientes se “lavó” en el pocillo análogo de la placa de réplica. El último pocillo se utilizó como control negativo, utilizando un mondadientes sin bacterias. Las placas de 96 pocillos se dejaron hasta el día siguiente a 37°C.

Para determinar cuáles colonias de *E.coli* contenían el plasmidio recombinante con un único fragmento de cDNA (colonias unigen), se realizó un PCR a cada colonia contenida en los pocillos de la placa de 96 pocillos, de forma tal de amplificar la región que contiene el inserto dentro del plasmidio pDNR-LIB. En una placa de 96 pocillos ABGENE se agregó 5µl de agua ultrapura estéril en cada pocillo. Luego, con un replicador de 96 pines, se trasladaron bacterias desde la placa original a la placa de PCR. El mix de PCR para 1 placa contenía 975µl de agua ultrapura, 225µl de tampón 10X, 180µl de MgCl₂ (2,5mM), 45µl de dNTP's (25mM), 30µl de partidor M13 F (10µM), 30µl de partidor M13 R (10µM) y 15µl de Taq polimerasa (5U/µl)(Invitrogen).

Se agregó el mix PCR a cada pocillo con bacterias y se realizó la amplificación como se describe a continuación:

- 94°C x 2 min
 - 94°C x 30 seg.
 - 57°C x 30 seg.
 - 72°C x 2 min
 - 72°C x 4 min
- } 30 ciclos

Con el objeto de corroborar la amplificación se analizaron 5 productos PCR al azar más el control negativo (por placa PCR), correspondiente al último pocillo de la placa, donde no se sembró bacterias, en un gel de agarosa/bromuro de etidio (EtBr) al 1% (Figura 3). Además se midió su concentración por Nanodrop ND-1000 (~ 0,1 µg/µl). Se cargó 2µl (0,2µg) de producto de amplificación y 0,4µl de tampón de carga sacarosa-bromofenol 6X por carril de muestra, observándose fragmentos desde 300-1000 pb aproximadamente, lo que da cuenta de una amplificación exitosa. Las placas de cultivo de 96 pocillos con las colonias que contenían los distintos cDNAs, fueron almacenadas a -80°C. Estas colonias constituyeron la genoteca de cDNA para *M. persicae*.

3.5.3 PURIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE cDNA

La purificación de los productos PCR clonados a partir de cada colonia, para remover el exceso de primers y nucleótidos adicionados durante la reacción, se realizó mediante columnas Sephadex G-50 comerciales (SigmaSpin, Sigma). Estas columnas, dispuestas como placas de 96 pocillos, fueron hidratadas con 100µl de agua ultrapura. La placa se centrifugó a 2.500rpm por 3min. Por otra parte, a cada pocillo de producto PCR se le agregó 20µl de agua ultrapura. Se transfirieron los productos PCR diluidos en el mismo orden de la placa PCR a la placa con las columnas Sigma Spin. La placa fue centrifugada nuevamente a 2.500rpm por 3min, recibiendo los productos PCR purificados en una placa de cultivo de 96 pocillos, los que fueron analizados en geles de agarosa /EtBr al 1% (Figura 4), para descartar aquellos productos de amplificación que no estén dentro del tamaño deseado (~600-1500pb), tamaño que corresponde al tamaño promedio de un gen; se descartan además los fragmentos que no hayan

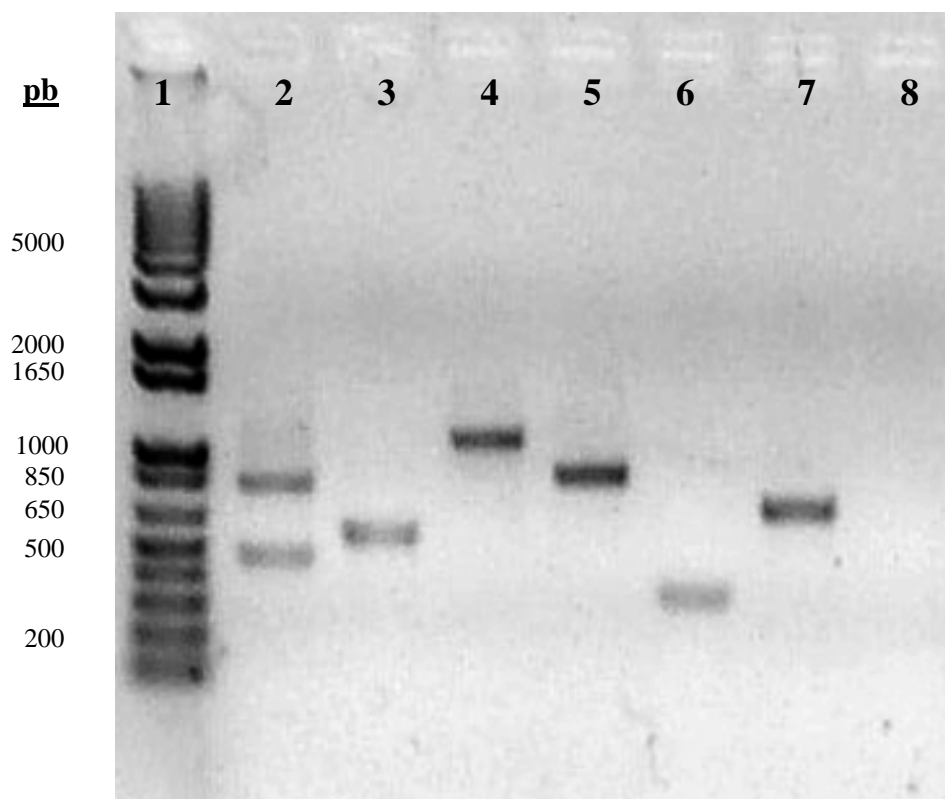


Figura 3: Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se cargó aproximadamente 0,2µg de producto PCR por carril de muestra y 0,5µg de standard.

Carril 1: Standard TrackIt 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); *Carriles 2–7:* Productos PCR de las colonias de *E. coli* transformadas y crecidas, tomados al azar, que contenían los distintos cDNAs. *Carril 8:* Control negativo correspondiente al último pocillo de la placa, amplificado sin bacterias.

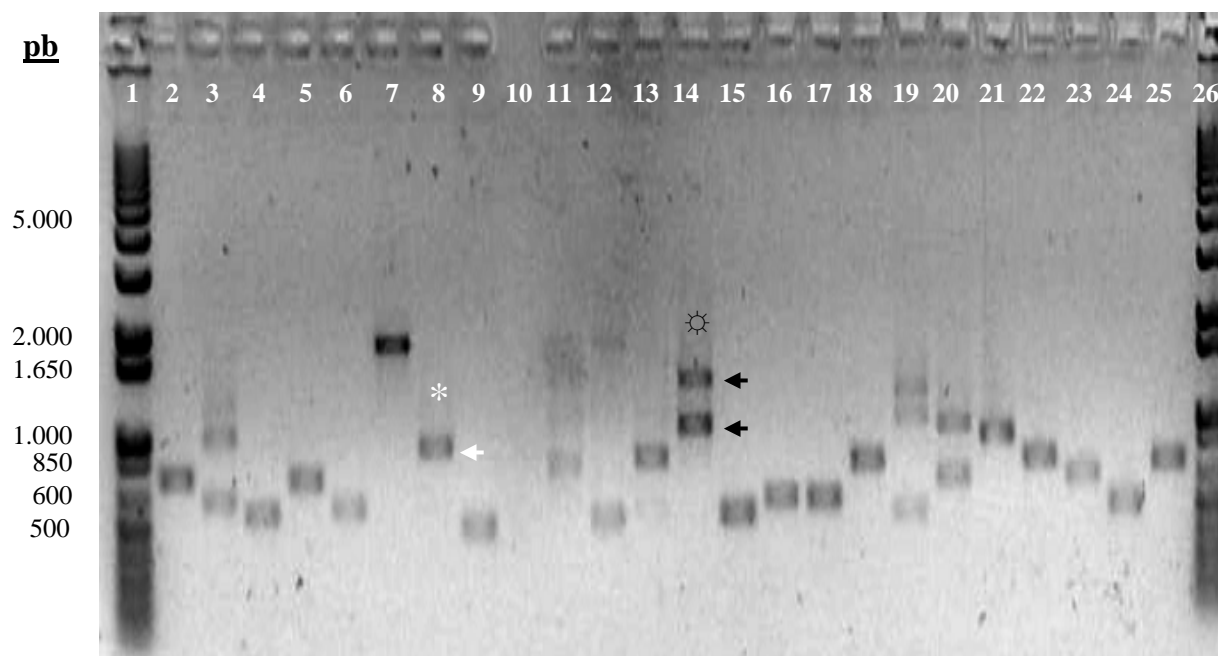


Figura 4: Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se destaca un fragmento correspondiente a una colonia “unigen” de tamaño adecuado (~ 600-1500 pb) (*) y otro correspondiente a una colonia contaminada con más de un inserto (☼). Cada banda es indicada con una flecha. Se cargó aproximadamente 0,1 μ g de producto PCR purificado por carril de muestra y 0,5 μ g de cada standard.

Carriles 1 y 26: Standard TrackIt 1Kb DNA Ladder (Invitrogen); *Carriles 2-25:* Productos PCR purificados mediante columnas Sephadex G-50 comerciales (SigmaSpin Sigma).

sido amplificados o aquellos que presenten más de un producto de amplificación.

La concentración de los productos PCR purificados se midió en Nanodrop ND-1000 tomando algunos pocillos al azar, dando una concentración promedio de $0,05\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se cargó $2\mu\text{l}$ ($0,1\mu\text{g}$) de producto PCR purificado y $0,4\mu\text{l}$ de tampón de carga sacarosa-bromofenol 6X por carril de muestra, observándose fragmentos que van desde los 500-2000 pb aproximadamente, conservándose, como ya se mencionó, sólo aquellos fragmentos provenientes de una colonia o clon “unigen” (colonias de *E. coli* transformadas con el vector pDNR-LIB conteniendo un solo inserto de ds cDNA), cuyo tamaño estuviera en el intervalo de los 600-1500pb aproximadamente, los que posteriormente fueron enviados a secuenciar a OUEST-Genopole® (Roscoff, Francia).

3.5.4 ANOTACIÓN DE ESTs EN BASE DE DATOS

La anotación de las secuencias y su posterior comparación por homología de secuencias fue realizada por investigadores pertenecientes al INRA (Instituto Científico de Investigación Agronómica) en Rennes, Francia (<http://www.rennes.inra.fr/>).

El nombre dado a cada EST correspondió al nombre de la biblioteca de cDNA (MpW para *Myzus persicae*, Whole-body o cuerpo completo), seguido por el número romano de la microplaca, la letra de la fila en la microplaca y el número arábico de la columna en la microplaca (por ejemplo: MpW-II-G10: quiere decir que corresponde a *Myzus persicae*, cuerpo completo, microplaca II, fila G, columna 10).

La base de datos EST se construyó y publicó de acuerdo con Tagú y cols. (2004). Para acceder a la base de datos genómica y para comparar secuencias, se utilizó el programa PRHED (www.phap.org).

Las secuencias clonadas que constituyeron la genoteca de cDNA ($n = 959$) fueron colocadas en la base de datos dbEST (GenBank) bajo los números de acceso DW361650-DW362608 y publicadas (Figuroa y cols., 2007). El procesamiento de las secuencias fue realizado utilizando el paquete computacional Staden (<http://staden.sourceforge.net/>) para quitar las secuencias del vector y del adaptador, y las colas de polyA mediante parámetros de incumplimiento. El criterio para la eliminación se basó en 12 bases con un valor de calidad phred inferior a 10 (1 error cada 10 bases) sobre una ventana de 30 pb de largo, o una longitud mayor a 15 A.

Las secuencias de rRNA y *E. coli* fueron eliminadas después de su identificación (considerando una homología mayor a 100) por comparación con una genoteca de secuencias ribosomales de invertebrados (extraída de Genbank). Dado que los áfidos viven en simbiosis con bacterias del género *Buchnera*, los ESTs de *M. persicae* fueron comparados con los de *Buchnera* sp. (<http://buchnera.gsc.riken.go.jp/>), eliminando las que presentaron una homología superior a 100.

Luego se hizo un “clustering” de las secuencias para formar los “contigs” (con el programa Gap4 del paquete computacional Staden). Se realizaron diferentes análisis Blast a las secuencias “contig”, incluyendo BlastX (compara una secuencia problema de nucleótidos traducida en sus seis posibles marcos de lectura contra una base de secuencias de proteínas), tBlastX (compara las seis traducciones en sus marcos de lectura de la secuencia problema de nucleótidos, contra las seis traducciones en sus marcos de lectura de toda la base de datos de

nucleótidos.) y BlastN (compara una secuencia problema de nucleótidos contra una base de datos de secuencia de nucleótidos), pero solamente BlastX arrojó datos más confiables con altos valores de alineamiento.

De esta forma los “contigs” fueron anotados usando BlastX (Altschul y cols., 1997) contra la base de datos UniProt (Universal Protein Resource) (Bairoch y cols., 2005); sólo las coincidencias significativas con un valor de $E < 1.0 \times 10^{-5}$ fueron consideradas para identificar genes conocidos, o marcos de lectura abiertos, representando E al número de alineamientos con un *score* equivalente o superior al que puede presentarse por azar. Una anotación BlastN también fue realizada para identificar secuencias contaminantes de RNA no codificante (*por ejemplo*: rRNA) o de DNA (*por ejemplo*: bacteria).

Además, se realizó una búsqueda por homología de secuencias en bases de datos públicas (usando BlastX) para asignar un rol celular putativo a cada cDNA al compararlos con secuencias proteicas de función conocida.

Finalmente, se hizo una búsqueda en la literatura sobre algunos genes seleccionados con el fin de discutir su participación en procesos de metabolismo de xenobióticos y resistencia a insecticidas. La búsqueda se basó en la información disponible hasta la fecha, acerca de proteínas que estuviesen involucradas, directa o indirectamente, en los procesos ya mencionados, dentro de los artrópodos (por ejemplo *Drosophila melanogaster*), y que, por lo tanto, pudiesen ser putativamente responsables de mecanismos de detoxificación en *M. persicae*, lo que es posible constatar a través de los microarrays de DNA.

4. RESULTADOS

4.1 PRODUCCIÓN DE ESTs Y CONTIGS

La biblioteca de cDNA de *M. persicae* fue construida usando poly-A RNA obtenido a partir de áfidos completos reproducidos partenogénicamente. Muchas colonias bacterianas (varios cientos) de esta genoteca fueron eliminadas porque resultaron redundantes, es decir, contenían un mismo fragmento y/o porque no eran colonias unigen, esto es, colonias conteniendo plasmidios con diferentes secuencias de cDNA. En total, se obtuvieron 1.920 colonias bacterianas unigen que fueron individualmente mantenidas como stock en glicerol y congeladas a -70°C . De estas, las colonias bacterianas con insertos amplificados de tamaño pequeño (menos de 600 pares de bases), también fueron eliminadas antes de la secuenciación. De esta forma, un total de 1.042 secuencias de los cDNAs seleccionados fueron obtenidas. Todos los áfidos hospedan a la bacteria *Buchnera aphidicola*, su endosimbionte primario, la cual contiene un genoma rico en A/T (Shigenobu y cols., 2000) que puede actuar como un templado para el oligo dT durante la síntesis de la partidora hebra de cDNA (Tagu y cols., 2004). Luego de todos estos pasos de filtración, la colección final de ESTs de *M. persicae* consistió de 959 secuencias.

A partir de estas 959 secuencias se produjeron clusters y contigs. Se identificó un total de 532 contigs. Diez de ellos correspondieron a secuencias de rRNA y fueron eliminadas, mientras que 12 correspondieron a proteínas codificadas en mitocondrias. (Tabla 1)

Nombre Contig	Proteína homóloga	Especies	UniProt An	E-value
Proteínas Ribosomales (n=124)				
12-08_O12_V-F01_016	Proteína S2 ribosomal 40S (Proteína de collar de perlas).	<i>Drosophila melanogaster</i>	P31009	2.0E-68
12-15_G03_XVII-G06_013	Proteína S2 ribosomal 40S	<i>Urechis caupo</i>	P49154	1.0E-49
12-08_F07_III-D02_006	Proteína S20 (S22) ribosomal 40S	<i>Xenopus laevis</i>	P23403	4.0E-40
12-08_A07_I-E01_002	Proteína S21 ribosomal 40S	<i>Sus scrofa</i>	P63221	6.0E-29
12-11_D07_X-F01_004	Proteína S25 ribosomal 40S	<i>Drosophila melanogaster</i>	P48588	3.0E-27
12-11_B11_XI-A05_002	Proteína S28 ribosomal 40S	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q9W334	2.0E-20
12-11_D15_XI-D01_004	Proteína S28 ribosomal 40S	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q9W334	2.0E-20
12-11_L07_X-G04_012	Proteína S28 ribosomal 40S	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q9W334	2.0E-20
12-16_C10_XX-G08_006	Proteína S28 ribosomal 40S	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q9W334	2.0E-19
12-15_G02_XVII-E10_014	Proteína S6 ribosomal 40S	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Q95V32	6.0E-82
12-15_G04_XVII-H10_014	Proteína S8 ribosomal 40S	<i>Apis mellifera</i>	O76756	9.0E-49
12-15_E08_XX-E12_010	Proteína acídica ribosomal 60S P1 (RP21C) (Proteína acídica ribosomal RPA2).	<i>Drosophila melanogaster</i>	P08570	8.0E-22
12-08_O10_V-D12_015	Proteína L10 Ribosomal 60S. (Homóloga a la proteína QM).	<i>Bombyx myarina</i>	O96647	1.0E-114
12-10_D02_XIII-E01_003	Proteína L12 Ribosomal 60S. (Fragmento).	<i>Sus scrofa</i>	Q6QAS5	6.0E-64
12-10_H21_IV-E01_007	Proteína L13A Ribosomal 60S.	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Q962U0	4.0E-52
12-11_M08_XII-D05_014	Proteína L13A Ribosomal 60S.	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Q962U0	6.0E-21
12-09_A21_II-E04_001	Proteína L15 Ribosomal 60S. (YL10).	<i>Chironomus tentans</i>	P30736	1.0E-40
12-14_E10_XVII-A01_010	Proteína L15 Ribosomal 60S.	<i>Drosophila melanogaster</i>	O17445	2.00E-49
12-09_N14_VII-D12_013	Proteína L18a Ribosomal 60S.	<i>Drosophila melanogaster</i>	P41093	1.0E-59
12-15_B03_XVII-F05_003	Proteína L18a Ribosomal 60S.	<i>Drosophila melanogaster</i>	P41093	6.0E-64
12-14_H10_XVII-A04_016	L27A or L22 Proteína L27A o L22 ribosomal 60S(Fragmento).	<i>Platichthys flesus</i>	Q98TL6	2.0E-42
12-09_F10_VII-A12_005	Proteína L31 Ribosomal 60S.	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Q7KF90	4.0E-47

12-09_P15_IV-B01_016	Proteina L31 Ribosomal 60S.	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Q7KF90	3.0E-47
12-10_P22_VIII-A08_015	Proteina L31 Ribosomal 60S.	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Q7KF90	1.0E-46
12-15_A10_XVIII-H08_002	Proteina L31 Ribosomal 60S.	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Q7KF90	4.0E-47
12-15_D11_XIX-B09_007	Proteina L31 Ribosomal 60S.	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Q7KF90	3.0E-46
12-11_O15_IX-D11_016	Proteina L32 Ribosomal 60S.	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Q962T1	1.0E-56
12-08_H03_III-A07_008	Proteina L35 Ribosomal 60S.	<i>Caenorhabditis elegans</i>	P34662	9.0E-19
12-09_B18_VII-F06_001	Proteina L40 Ribosomal 60S.	<i>Aedes albopictus</i>	Q5MIQ5	1.0E-67
12-10_B04_XIII-E12_002	Proteina L44 Ribosomal 60S.	<i>Aedes triseriatus</i>	Q9NB33	4.0E-21
12-16_B09_XX-F07_003	Proteina L44 Ribosomal 60S.	<i>Aedes triseriatus</i>	Q9NB33	3.0E-43
12-14_A11_XVII-A05_001	Proteina L44 Ribosomal 60S.	<i>Aedes triseriatus</i>	Q9NB33	1.0E-42
12-14_A12_XVII-C01_002	Proteina L44 Ribosomal 60S.	<i>Aedes triseriatus</i>	Q9NB33	7.0E-44
12-14_G05_XVI-B09_013	Proteina L44 Ribosomal 60S.	<i>Aedes triseriatus</i>	Q9NB33	7.0E-44
12-15_G09_XVIII-G08_013	Proteina L5 Ribosomal 60S.	<i>Helianthus annuus</i>	O65353	1.0E-57
12-11_K11_IX-A11_012	Proteina L5 Ribosomal 60S.	<i>Helianthus annuus</i>	O65353	3.0E-71
12-15_A04_XVII-G12_002	Proteina L5 Ribosomal 60S.	<i>Helianthus annuus</i>	O65353	3.0E-71
12-10_L04_XIII-G02_012	Proteína ribosomal 60S L7a (Protein 3 del locus de exceso).	<i>Takifugu rubripes</i>	O57592	1.0E-41
12-10_N21_IV-E10_013	Proteína ribosomal acidica p0.	<i>Dascillus cervinus</i>	Q6EV09	4.0E-67
12-15_D09_XVIII-G05_007	Proteína Hoip-prov (RpL7).	<i>Xenopus laevis</i>	Q7ZWY8	1.0E-43
12-11_D09_X-H01_003	Proteína MRPS35 (Fragmento).	<i>Homo sapiens</i>	Q6P4C6	2.00E-23
12-11_N12_XIV-E02_014	Proteína QM.	<i>Plutella xylostella</i>	Q6F451	9.0E-91
12-12_P24_XV-D08_016	Proteína ribosomal L10A.	<i>Bombyx mori</i>	Q5UAS9	2.0E-25
12-08_L08_VI-H11_012	Proteína ribosomal L11.	<i>Bombyx mori</i>	Q5UAS8	2.0E-84
12-14_D07_XVI-D08_007	Proteína ribosomal L11.	<i>Bombyx mori</i>	Q5UAS8	7.0E-63
12-10_L02_XIII-E06_011	Proteína ribosomal L13.	<i>Bombyx mori</i>	Q5UAS6	6.0E-15

12-11_I10_XII-E04_009	Proteína ribosomal L14.	<i>Bombyx mori</i>	Q5UAS4	5.0E-38
12-10_H01_X-B07_007	Proteína ribosomal L17.	<i>Bombyx mori</i>	Q5UAS2	6.0E-58
12-11_C13_IX-B03_003	Proteína ribosomal L17.	<i>Bombyx mori</i>	Q5UAS2	5.0E-68
12-15_F01_XVII-D08_011	Proteína ribosomal L17.	<i>Bombyx mori</i>	Q5UAS2	1.0E-74
12-15_F07_XVIII-E06_011	Proteína ribosomal L17/23.	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Q962Y9	8.0E-73
12-07_E03_I-C02_006	Proteína ribosomal L18 (Fragmento).	<i>Branchiostoma lanceolatum</i>	Q86LX2	1.0E-57
12-08_G05_I-D06_007	Proteína ribosomal L19.	<i>Bombyx mori</i>	Q5UAR9	7.0E-59
12-12_K24_XIII-D06_012	Proteína ribosomal L20.	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Q95UN2	3.0E-30
12-11_M10_XII-E07_013	Proteína ribosomal L21.	<i>Helicoverpa zea</i>	Q5UC14	6.0E-42
12-09_M16_V-H05_014	Proteína ribosomal L24.	<i>Bombyx mori</i>	Q5UAR4	1.0E-38
12-09_P10_VII-B09_015	Proteína ribosomal L26.	<i>Plutella xylostella</i>	Q6F448	2.0E-47
12-10_B02_XIII-D10_001	Proteína ribosomal L26.	<i>Ictalurus punctatus</i>	Q90YU2	4.0E-35
12-14_D04_XVI-A03_008	Proteína ribosomal L27.	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Q962T3	1.0E-54
12-10_P04_XIII-G05_016	Proteína ribosomal L28.	<i>Plutella xylostella</i>	Q6F474	4.0E-38
12-10_M22_VI-C08_013	Proteína ribosomal L29.	<i>Bombyx mori</i>	Q5UAQ9	3.0E-15
12-09_E23_II-F09_006	Proteína ribosomal L30.	<i>Agropecten irradians</i>	Q8ITC5	3.0E-43
12-11_B09_X-G11_001	Proteína ribosomal L34.	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Q8WQ16	1.0E-41
12-10_K02_XII-A07_011	Proteína ribosomal L35A.	<i>Bombyx mori</i>	Q5UAQ3	2.0E-41
12-16_F09_XX-G01_011	Proteína ribosomal L36A.	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Q962S8	4.0E-39
12-09_M14_V-G02_013	Proteína ribosomal L37.	<i>Bombyx mori</i>	Q5UAQ0	5.0E-38
12-12_I23_X-A08_010	Proteína ribosomal L37.	<i>Bombyx mori</i>	Q5UAQ0	1.0E-32
12-08_P07_III-D09_016	Proteína ribosomal L37A.	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Q962S6	1.0E-31
12-11_J11_XI-A10_010	Proteína ribosomal L37A.	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Q962S6	2.0E-27
12-12_D23_XI-H03_004	Proteína ribosomal L37A.	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Q962S6	2.0E-29
12-15_E07_XX-E01_009	Proteína ribosomal L37A.	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Q962S6	5.0E-29

12-11_A08_XII-C10_002	Proteína ribosomal L38.	<i>Plutella xylostella</i>	Q6F450	1.0E-29
12-14_G10_XVII-A03_014	Proteína ribosomal L38.	<i>Plutella xylostella</i>	Q6F450	1.0E-29
12-11_H10_XIV-B03_007	Proteína ribosomal L39.	<i>Bombyx mori</i>	Q5UAP7	1.0E-15
12-15_F07_XX-E02_011	Proteína ribosomal L39.	<i>Bombyx mori</i>	Q5UAP7	2.0E-13
12-15_G08_XX-F03_014	Proteína ribosomal L39.	<i>Bombyx mori</i>	Q5UAP7	3.0E-15
12-12_O18_XIII-A11_015	Proteína ribosomal L44.	<i>Plutella xylostella</i>	Q6F481	6.0E-34
12-11_L06_XIII-H06_011	Proteína ribosomal L7.	<i>Bombyx mori</i>	Q5UAT4	3.0E-51
12-15_C08_XX-E08_006	Proteína ribosomal L8.	<i>Bombyx mori</i>	Q5UAT2	5.0E-83
12-10_N01_X-B11_013	Proteína ribosomal L9.	<i>Bombyx mori</i>	Q5UAT1	1.0E-76
12-11_M07_VIII-G06_014	Proteína ribosomal P2.	<i>Bombyx mori</i>	Q5UAT9	5.0E-12
12-15_C06_XX-C11_006	Proteína ribosomal P2.	<i>Bombyx mori</i>	Q5UAT9	1.0E-13
12-11_E08_XII-C12_006	Equivalente a Proteína ribosomal P2 (Fragmento).	<i>Culicoides sonorensis</i>	Q5QBF5	7.0E-17
12-12_E20_XIII-B02_006	Proteína ribosomal S11 (Proteína ribosomal S11-2).	<i>Bombyx mori</i>	Q66SW3	1.0E-66
12-11_A15_IX-C08_002	Proteína ribosomal S12.	<i>Bombyx mori</i>	Q5UAN1	1.0E-36
12-12_K20_XIII-B05_012	Proteína ribosomal S16.	<i>Bombyx mori</i>	Q5UAM6	1.0E-63
12-09_J16_VII-E09_010	Proteína ribosomal S18.	<i>Plutella xylostella</i>	Q6F458	2.0E-47
12-15_G08_XVIII-F11_014	Proteína ribosomal S18.	<i>Plutella xylostella</i>	Q6F458	3.0E-66
12-08_N05_III-C05_013	Proteína ribosomal S24.	<i>Plutella xylostella</i>	Q6F461	2.0E-39
12-10_L22_VIII-A04_011	Proteína ribosomal S27.	<i>Aedes albopictus</i>	Q5MIR3	2.0E-38
12-11_B06_XIII-G06_001	Proteína ribosomal S27.	<i>Aedes albopictus</i>	Q5MIR3	4.0E-28
12-14_G04_XVI-A06_014	Proteína ribosomal S27.	<i>Aedes albopictus</i>	Q5MIR3	1.0E-39
12-12_M18_XIII-A09_013	Proteína ribosomal S27a.	<i>Aedes albopictus</i>	Q5MIS5	3.0E-32
12-09_I16_V-H01_010	Proteína ribosomal S29.	<i>Plutella xylostella</i>	Q6F473	3.0E-25
12-08_G10_V-D04_007	Proteína ribosomal S30.	<i>Bombyx mori</i>	Q5UAL2	2.0E-32
12-15_C02_XVII-E02_006	Proteína ribosomal S3a (Fragmento).	<i>Crassostrea gigas</i>	Q70MP2	5.0E-18

12-11_F08_XIV-A03_006	Proteína ribosomal S4.	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Q95V34	2.0E-94
12-16_D10_XX-G10_008	Proteína ribosomal S5.	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Q95V33	2.0E-53
12-10_F02_XIII-E03_005	Proteína ribosomal SA.	<i>Bombyx mori</i>	Q5UAP4	5.0E-96
12-11_K10_XII-E05_011	Proteína ribosomal, extensa P2.	<i>Ixodes pacificus</i>	Q6B8B1	2.0E-12
12-15_D12_XIX-D03_008	Proteína de ensamblaje del RNA ribosomal mis3.	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	O74777	4.0E-11
12-08_B05_III-B07_001	Proteína ribosomal S13e.	<i>Timarcha balearica</i>	Q6EUZ0	6.0E-62
12-10_E02_XII-A02_005	Proteína ribosomal S14e.	<i>Dascillus cervinus</i>	Q6EUY9	6.0E-57
12-09_I18_VI-A03_009	Proteína ribosomal S15Ae.	<i>Timarcha balearica</i>	Q6EUY7	2.0E-57
12-09_K19_II-D11_012	Proteína ribosomal S15Ae.	<i>Timarcha balearica</i>	Q6EUY7	6.0E-62
12-12_I24_XIII-D05_010	Proteína ribosomal S17e.	<i>Carabus granulatus</i>	Q6EUY6	2.0E-38
12-14_C09_XVI-G06_005	Proteína ribosomal S17e.	<i>Carabus granulatus</i>	Q6EUY6	6.0E-57
12-14_F01_XV-E04_011	Proteína ribosomal S19e.	<i>Dascillus cervinus</i>	Q6EUY0	2.0E-51
12-15_E05_XVIII-A10_009	Proteína ribosomal S19e.	<i>Dascillus cervinus</i>	Q6EUY0	1.0E-46
12-10_H24_VIII-B01_008	Proteína ribosomal S23e.	<i>Carabus granulatus</i>	Q6EUX7	1.0E-70
12-11_D05_X-D04_003	Proteína ribosomal S23e.	<i>Carabus granulatus</i>	Q6EUX7	1.0E-75
12-11_H09_X-H07_007	Proteína ribosomal S23e.	<i>Carabus granulatus</i>	Q6EUX7	9.0E-44
12-12_C21_IX-H03_003	Proteína ribosomal S23e.	<i>Carabus granulatus</i>	Q6EUX7	9.0E-72
12-15_H01_XVII-D11_015	Proteína ribosomal S25e.	<i>Timarcha balearica</i>	Q6EUX5	1.0E-28
12-11_O10_XII-E12_015	Proteína ribosomal S26e.	<i>Dascillus cervinus</i>	Q6EUX3	5.0E-51
12-14_E03_XV-H01_009	Proteína ribosomal S26e.	<i>Dascillus cervinus</i>	Q6EUX3	5.0E-52
12-15_D05_XVIII-A07_007	Proteína ribosomal S26e.	<i>Dascillus cervinus</i>	Q6EUX3	5.0E-51
12-08_P03_III-B04_016	Proteína ribosomal S3Ae.	<i>Timarcha balearica</i>	Q6EV04	1.0E-102
12-10_P24_VIII-B10_016	Proteína ribosomal S3e.	<i>Carabus granulatus</i>	Q6EV05	6.0E-66
12-08_A04_IV-G12_002	Proteína ribosomal S7e.	<i>Timarcha balearica</i>	Q6EV00	2.0E-64
12-14_G01_XV-E11_013	Proteína ribosomal S7e.	<i>Timarcha balearica</i>	Q6EV00	3.0E-64

12-10_C02_XII-A01_003	Proteína ribosomal S8e.	<i>Dascillus cervinus</i>	Q6EUZ9	1.0E-63
12-15_F02_XVII-E09_012	Proteína ribosomal S9e.	<i>Meladema coriacea</i>	Q6EUZ7	2.0E-73
12-08_O06_V-B06_015	Proteína de fusión a la proteína S27 ubiquitin/ribosomal.	<i>Papilio dardanus</i>	Q6EV22	1.0E-48
Estructurales (n=41)				
12-11_I11_IX-A09_010	Proteína equivalente a 2 dominios en espiral enrollado de origen eucariotico (31.3 kD)	<i>Oryza sativa</i>	Q6K5F3	1.00E-06
12-15_C03_XIX-G07_005	Proteína equivalente a 2 dominios en espiral enrollado de origen eucariotico (31.3 kD)	<i>Oryza sativa</i>	Q6K5F4	7.00E-07
12-10_B03_X-C01_002	Actina (Fragmento).	<i>Sitobion avenae</i>	Q6PTC2	1.0E-16
12-15_E11_XIX-B10_009	Actina (Fragmento).	<i>Sitobion avenae</i>	Q6PTC1	2.0E-53
12-08_C10_V-C10_003	Actina (Fragmento).	<i>Reticulitermes flavipes</i>	Q64I75	1.00E-81
12-15_A11_XIX-B01_001	Actina 1 (Fragmento).	<i>Culicoides sonorensis</i>	Q8WRE6	4.0E-87
12-16_A10_XX-G06_002	Actina muscular.	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	P12431	2.0E-64
12-15_D04_XX-A05_008	Actina.	<i>Timarcha balearica</i>	Q5RLJ4	1.00E-138
12-10_L23_IV-F06_012	Tubulina Alfa 2.	<i>Sitobion avenae</i>	Q6QA77	4.0E-25
12-12_E19_IX-F05_006	Tubulina Alfa 2.	<i>Sitobion avenae</i>	Q6QA77	2.0E-19
12-10_B01_X-B03_001	Tubulina Beta-2.	<i>Sitobion avenae</i>	Q6S3D4	1.0E-47
12-10_E03_VIII-D11_006	Tubulina Beta.	<i>Bombyx mori</i>	Q8T8B2	2.0E-76
12-14_H01_XV-E12_015	Proteína cuticular.	<i>Myzus persicae</i>	Q95V16	2.0E-26
12-12_D18_XIV-H07_003	Endocuticle structural glycoprotein (ABD-4A).	<i>Locusta migratoria</i>	P21799	2.0E-19
12-15_F09_XVIII-G07_011	Glicoproteína SgAbd-8 estructural de la endocutícula.	<i>Schistocerca gregaria</i>	Q7M4F2	2.0E-07
12-12_E24_XIII-D03_006	Familia 3B de histonas H3.	<i>Mus musculus</i>	Q8VDJ2	2.00E-17
12-11_L05_X-D11_011	Fistona H3.	<i>Mus musculus</i>	Q9D0H3	3.0E-16
12-12_J23_XI-H08_010	Proteína 1 heterocromatínica (Antígeno de la proteína C1A9 de la proteína cromosomal no histona).	<i>Drosophila melanogaster</i>	P05205	2.0E-17
12-15_E02_XIX-F07_010	Variante de la Histona H2A (Fragmento).	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	P08991	6.0E-49
12-16_C09_XX-F10_005	Histona H3.3B.	<i>Chinchilla lanigera</i>	Q6QN07	3.00E-64

12-11_C08_XII-C11_004	Proteína p62 del aparato mitótico.	<i>Lytechinus pictus</i>	P91753	5.0E-13
12-15_G12_XIX-D08_014	Proteína p62 del aparato mitótico.	<i>Lytechinus pictus</i>	P91753	9.0E-15
12-12_E18_XII-H11_005	Proteína LIM 1 muscular.	<i>Drosophila melanogaster</i>	P53777	5.0E-26
12-08_K12_V-E10_012	Cadena pesada de la Miosina muscular (Fragmento).	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q7JN62	1.0E-61
12-08_A12_V-E01_002	Proteína muscular 20 (Fragmento).	<i>Dascillus cervinus</i>	Q5ZQH9	3.0E-50
12-10_G03_VIII-D12_008	Proteína muscular 20 (Fragmento).	<i>Dascillus cervinus</i>	Q5ZQI6	2.00E-21
12-16_H10_XX-H07_016	Cadena liviana de la Miosina 2 (Cadena liviana de la Miosina 1).	<i>Lonomia obliqua</i>	Q5MG18	4.0E-48
12-12_M14_XII-G06_013	Cadena liviana de la Miosina 2 (Cadena liviana de la Miosina 1).	<i>Lonomia obliqua</i>	Q5MG18	3.0E-33
12-11_B10_XIV-A12_001	Cadena liviana de la Miosina 2 (Cadena liviana de la Miosina 1).	<i>Lonomia obliqua</i>	Q5MG18	7.0E-18
12-11_F07_X-F02_006	Cadena liviana de la Miosina 2 (Cadena liviana de la Miosina 1).	<i>Lonomia obliqua</i>	Q5MG18	1.0E-47
12-12_F21_XI-G05_005	Cadena liviana de la Miosina 2 (Cadena liviana de la Miosina 1).	<i>Lonomia obliqua</i>	Q5MG18	3.0E-39
12-10_F03_X-C04_006	Cadena liviana de la Miosina 2 (Cadena liviana de la Miosina 1).	<i>Lonomia obliqua</i>	Q5MG18	3.0E-46
12-15_H04_XX-A12_016	Cadena regulatoria liviana 2 de la Miosina (MLC-2).	<i>Drosophila melanogaster</i>	P18432	2.0E-33
12-09_O16_V-H06_016	Paramiosina, forma extensa.	<i>Drosophila melanogaster</i>	P35415	2.0E-44
12-15_F10_XIX-A06_012	Proteína de matriz nuclear relacionada con Ser/Arg.	<i>Homo sapiens</i>	O60585	1.00E-38
12-10_E04_XII-B03_006	Tropomiosina.	<i>Myzus persicae</i>	Q64F38	2.0E-62
12-12_A20_XIII-A12_002	Troponina C 47D (Fragmento).	<i>Drosophila virilis</i>	Q6WEW 9	5.0E-29
12-11_E07_VIII-F05_006	Troponina I 1.	<i>Lonomia obliqua</i>	Q5MG13	8.0E-11
12-15_B07_XVIII-D09_003	Isoforma 1 de la Troponina T.	<i>Apis mellifera</i>	Q3B711	2.0E-10
12-10_F21_IV-D09_005	Isoforma 1 de la Troponina T.	<i>Apis mellifera</i>	Q3B711	3.0E-11
Metabolismo (n=125)				
12-15_E03_XVII-F12_009	1-acil-sn-glicerol-3-fosfate aciltransferasa delta (EC 2.3.1.51).	<i>Homo sapiens</i>	Q9NRZ5	3.0E-14
12-15_A08_XX-E05_002	Subunidad beta5 del proteosoma 20S.	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q9NHX7	6.00E-28
12-11_J13_XI-C04_009	3-oxoacil-(Proteína transportadora de acil) reductasa (EC 1.1.1.100).	<i>Leptospira interrogans</i>	Q8F0K8	2.0E-05
12-09_D20_VII-G07_004	Proteína nuclear de unión a 46 kDa FK506 (EC 5.2.1.8) (Peptidil prolil cis-trans isomerasa) (Rotamasa).	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Q26486	2.0E-11

12-09_H16_VII-E07_008	Precursor de la proteína transportadora de Acil (ACP) (NADH ubiquinona oxidorreductasa).	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q94519	3.0E-26
12-09_L20_VII-H01_012	Proterina de unión a Acyl-CoA (ACBP) (EP).	<i>Chaetophactus villosus</i>	P82934	3.0E-15
12-16_A11_XX-H10_001	ADP/ATP Translocasa	<i>Apis mellifera</i>	Q6VQ13	2.0E-57
12-14_E02_XV-F07_010	Aldo-ceto reductasa (EC 1.1.1.2).	<i>Gallus gallus</i>	Q90W83	9.00E-28
12-10_H04_XIII-F08_008	Precursor de la Aminopeptidasa N (EC 3.4.11.2) (Aminopeptidasa microsomal) (APN2).	<i>Myuca sexta</i>	P91885	3.0E-06
12-09_C21_II-E07_003	Proteína APG3L.	<i>Homo sapiens</i>	Q6PKC5	4.00E-10
12-11_O09_IX-A03_015	Cadena de la ATP sintasa alfa, precursor mitocondrial (EC 3.6.3.14)	<i>Drosophila melanogaster</i>	P35381	3.0E-06
12-09_J10_VII-B06_009	Cadena de ATP sintasa B, precursor mitocondrial (EC 3.6.3.14) (subunidad B de la sintasa FO-ATP).	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q94516	2.00E-19
12-12_A16_XII-G08_002	ATP sintasa beta (Fragmento).	<i>Drosophila simulans</i>	Q6W4K6	2.0E-40
12-12_J22_XV-B10_009	Cadena epsilon de ATP sintasa, mitocondrial (EC 3.6.3.14).	<i>Ipomoea batatas</i>	Q06450	1.00E-08
12-08_E07_I-E03_006	Cadena de ATP sintasa f, mitocondrial (EC 3.6.3.14).	<i>Homo sapiens</i>	P56134	3.00E-09
12-08_E05_I-D05_005	Proteína de unión lipídica a ATP-sintasa, precursor mitocondrial (EC 3.6.3.14) (Proteína ATPasa 9).	<i>Myuca sexta</i>	Q9U505	1.0E-33
12-15_F05_XVIII-B02_011	RNA Helicasa p62 ATP-dependiente.	<i>Drosophila melanogaster</i>	P19109	4.0E-46
12-09_F13_III-G10_005	BcDNA.GM05329.	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q9U9Q7	7.0E-47
12-09_D15_IV-A01_004	Calmodulina.	<i>Strongylocentrotus intermedius</i>	Q76LB7	8.0E-66
12-14_H11_XVII-B11_015	Calnexina.	<i>Xenopus tropicalis</i>	Q6DK68	4.0E-39
12-09_D19_IV-C09_004	Precursor de la carboxipeptidasa N catalítica (EC 3.4.17.3).	<i>Homo sapiens</i>	P15169	2.0E-17
12-12_E17_IX-E05_005	Caseína quinasa II, cadena alfa (EC 2.7.1.37) (CK II subunidad alfa).	<i>Spodoptera frugiperda</i>	O76484	3.0E-25
12-08_J03_III-A09_010	Catepsina B-N.	<i>Myzus persicae</i>	Q64G01	3.0E-91
12-11_B08_XIII-H12_002	Catepsina B-N.	<i>Myzus persicae</i>	Q64G01	8.0E-52
12-08_O08_V-C07_016	Catepsina B-N.	<i>Myzus persicae</i>	Q64G01	3.0E-53
12-08_L01_II-H07_011	Proteína de unión a enhancer/CCAAT gama (C/EBP gama) (IG/EBP-1) (GPE1-BP).	<i>Mus musculus</i>	P53568	3.0E-06
12-12_H14_XIV-E10_007	CG15551-PB, isoforma B.	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q86B69	3.00E-05

12-09_K15_II-B10_012	Complexina.	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q9NBA0	2.00E-05
12-12_C17_IX-E03_003	Complexina.	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q9NBA0	2.00E-05
12-14_C12_XVII-C03_006	Precursor de Ciclofilina G.	<i>Tachypleus tridentatus</i>	O44073	1.0E-06
12-12_A14_XII-F10_001	Citocromo c oxidasa polipeptido Vb (Fragmento).	<i>Drosophila simulans</i>	Q7YZE8	2.00E-21
12-12_A17_IX-E01_001	Citocromo c oxidasa polipéptido VIb (Fragmento).	<i>Drosophila mauritiana</i>	Q7YZE2	3.00E-16
12-14_F03_XV-H03_011	Citocromo c oxidasa subunidad Va (EC 1.9.3.1).	<i>Dascillus cervinus</i>	Q95V82	3.0E-38
12-11_M12_XII-F08_014	Citocromo c oxidasa subunidad VIa.	<i>Homo sapiens</i>	Q9UEG9	4.0E-13
12-09_I13_II-A05_009	Citocromo c oxidasa subunidad VIa.	<i>Homo sapiens</i>	Q9UEG9	1.00E-10
12-12_H21_XI-G06_007	Citocromo c oxidasa subunidad VIc.	<i>Thunnus obesus</i>	Q71SZ9	6.0E-16
12-15_C07_XX-D10_005	Citocromo c.	<i>Sarcophaga peregrina</i>	P12831	8.0E-44
12-11_E15_IX-C12_006	Citocromo p450 (Fragmento).	<i>Myzus persicae</i>	Q9BLQ0	4.0E-16
12-12_B14_XIV-E05_001	Citocromo P450 CYP4.	<i>Antheraea yamamai</i>	Q5NT77	2.00E-31
12-12_N21_XI-G09_013	Precursor del miembro 7 de la familia Deshidrogenasa/reductasa SDR.	<i>Homo sapiens</i>	Q9Y394	4.00E-21
12-10_C03_VIII-D06_004	Proteína DmRNase-66B.	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q24485	2.0E-31
12-08_L11_III-G01_012	Polipéptido de las RNA polimerasas DNA dirigidas I, II y III de 7.0 kDa. (EC 2.7.7.6) (ABC10-alfa).	<i>Mus musculus</i>	Q63871	4.00E-16
12-15_G01_XIX-E11_013	DNAJ-1.	<i>Culicoides sonorensis</i>	Q86DT4	4.0E-40
12-10_K04_XII-B06_012	Proteína DNAJC8 (OTTHUMP00000045047) (homóloga a DnaJ (Hsp40), subfamilia C, miembro 8).	<i>Homo sapiens</i>	Q8N4Z5	5.00E-28
12-09_N20_VII-H04_014	Factor 4A de la elongación.	<i>Culicoides sonorensis</i>	Q5QBK8	1.0E-43
12-08_J01_II-H05_009	Factor 5C de la iniciación de la elongación. (CG2922-PA) (Cg2922-pb) (LD21309p).	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q9VNE2	2.0E-12
12-12_B24_XV-C08_002	Enolasa (Fragmento).	<i>Drosophila subobscura</i>	O44101	7.0E-29
12-14_D01_XV-D12_007	Factor 1A de la iniciación de la traducción eucariótica.	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q9NJB4	1.0E-48
12-15_C11_XIX-B06_005	Factor 1A de la iniciación de la traducción eucariótica.	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q9NJB4	5.0E-45
12-16_G09_XX-G03_013	Subunidad del factor 3 p66 de la iniciación de la traducción eucariótica.	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q9NHP3	4.00E-47
12-08_I06_V-B02_009	Factor 3 de la iniciación de la traducción eucariótica, subunidad 5 (Epsilon).	<i>Mus musculus</i>	Q6IRT4	6.0E-10

12-11_I09_VIII-H08_009	Exonucleasa RRP41 del complejo exosoma (EC 3.1.13.-) (Proteína 41 del procesamiento del RNA Ribosomal).	<i>Mus musculus</i>	Q921I9	2.00E-05
12-12_P21_XI-G11_015	Proteína salival 1 de la garrapata alimentada.	<i>Ixodes scapularis</i>	Q5S1X9	2.00E-06
12-08_A10_V-C08_001	Precursor de Ferritina.	<i>Myuca sexta</i>	Q9N2P3	3.0E-36
12-14_F12_XVII-C10_012	Proteína FKBP1B	<i>Xenopus laevis</i>	Q5XG46	1.00E-45
12-15_F03_XIX-G11_011	Proteína FKBP1B.	<i>Xenopus laevis</i>	Q5XG46	1.00E-45
12-14_H09_XVI-H01_015	Fructosa 1,6-bifosfato aldolase.	<i>Antheraea yamamai</i>	Q75PQ3	9.00E-42
12-12_C14_XII-F11_003	Galactoquinasa 2.	<i>Xenopus tropicalis</i>	Q6DJ33	1.0E-22
12-08_L09_III-E08_011	Glutation S-transferasa.	<i>Gryllotalpa orientalis</i>	Q6RUR4	6.0E-41
12-15_B02_XIX-F04_004	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.	<i>Sitobion avenae</i>	Q6PPI3	4.0E-70
12-12_H20_XV-A09_008	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.	<i>Plutella xylostella</i>	Q8MPI0	6.0E-75
12-10_P01_X-B12_015	Glicilpeptidil N-tetradecanoiltransferasa (EC 2.3.1.97) (Peptidil N-miristoiltransferasa).	<i>Drosophila melanogaster</i>	O61613	1.0E-69
12-15_H05_XX-C08_015	Lectina 4 C tipo lectina.	<i>Lonomia obliqua</i>	Q5MGD7	7.00E-08
12-14_H02_XV-F11_016	Proteína de unión a ubiquinona de baja masa molecular.	<i>Rattus norvegicus</i>	Q7TQ16	4.00E-13
12-09_N19_IV-D02_014	Lisofosfolipasa II.	<i>Xenopus tropicalis</i>	Q6DJB2	1.00E-44
12-12_H24_XV-C12_008	Lisozima i-1.	<i>Anopheles gambiae</i>	Q6GU90	8.00E-14
12-11_C07_VIII-F04_004	Malato deshidrogenasa 1ª, NAD (Soluble).	<i>Danio rerio</i>	Q7T3D9	8.00E-62
12-09_M15_II-B12_014	Cadena E de la ATP sintasa mitocondrial.	<i>Aedes albopictus</i>	Q5MIP8	3.0E-07
12-11_C05_VIII-E07_003	Cadena E de la ATP sintasa mitocondrial.	<i>Aedes albopictus</i>	Q5MIP8	7.0E-08
12-12_E22_XIII-C05_005	Cadena E de la ATP sintasa mitocondrial.	<i>Aedes albopictus</i>	Q5MIP8	2.0E-07
12-08_C05_I-D01_003	Subunidad TIM10 de la translocasa de importación de la membrana interna de la mitocondria.	<i>Rattus norvegicus</i>	P62074	3.00E-15
12-14_A03_XV-G06_001	Proteína que contiene N-acetiltransferasa.	<i>Mus musculus</i>	Q8CES0	4.0E-14
12-14_A04_XV-H07_002	Subunidad de la NADH-ubiquinona oxidoreductasa 18kDa, precursor mitocondrial (EC 1.6.5.3).	<i>Mus musculus</i>	Q9CXZ1	6.00E-23
12-14_F04_XVI-A05_012	Subunidad de la NADH-ubiquinona oxidoreductasa B12 (EC 1.6.5.3).	<i>Homo sapiens</i>	O43676	8.00E-05
12-15_C07_XVIII-D10_005	Subunidad de la NADH-ubiquinona oxidoreductase PDSW (EC 1.6.5.3).	<i>Homo sapiens</i>	O96000	8.00E-12

12-14_B12_XVII-C02_004	Subunidad de la NADH-ubiquinona oxidoreductasa SGDh, precursor mitocondrial (EC 1.6.5.3).	<i>Homo sapiens</i>	Q43674	1.00E-19
12-09_F12_VII-C02_006	Nueva proteína similar a la isovaleril coenzima A deshidrogenasa dshidrogenasa humana (IVD).	<i>Danio rerio</i>	Q8AW60	9.0E-20
12-09_B15_III-H11_002	Subunidad 2 de la proteína de unión a la envoltura nuclear.	<i>Danio rerio</i>	Q8JGR6	5.00E-51
12-11_N08_XIV-A08_014	Factor 2 del transportador nuclear.	<i>Aedes aegypti</i>	Q6Q9G0	5.0E-51
12-08_M07_I-E10_014	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (EC 5.2.1.8) (PPIasa) (Rotamasa) (Ciclofilina).	<i>Drosophila melanogaster</i>	P25007	2.0E-80
12-09_J14_VII-D07_009	Proteína Peroxirredoxina V.	<i>Branchiostoma belcheri</i>	Q8T5Q7	7.0E-41
12-12_L17_XI-E07_011	Proteína equivalente a la Peroxirredoxina.	<i>Aedes aegypti</i>	Q5UG08	3.00E-18
12-15_C04_XIX-H12_006	Fosfoglicerato deshidrogenasa (Fragmento).	<i>Culicoides sonorensis</i>	Q5QB16	6.0E-31
12-12_J24_XV-D02_010	Fosfolípido hidropéroxido glutatión peroxidasa.	<i>Gallus gallus</i>	Q8QG67	1.0E-34
12-08_M02_IV-G10_013	Polipeptido C de la Polimerasa (RNA) II (DNA dirigida).	<i>Mus musculus</i>	Q99M46	6.00E-55
12-12_K22_XIII-C08_011	Proteína Prdx3.	<i>Rattus norvegicus</i>	Q6P9W3	7.0E-33
12-09_I19_II-D08_010	Subunidad del proteosoma 26S, ATPasa 2.	<i>Rattus norvegicus</i>	Q6P7R9	4.0E-72
12-10_K24_VI-D08_012	Subunidad beta tipo 3 del proteosoma (EC 3.4.25.1) (Subunidad beta-3 del proteosoma 20S).	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q9XYN7	9.0E-44
12-08_G12_V-E05_008	Isoforma de la proteína disulfido isomerasa (D-Erp60).	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q9TWZ1	2.0E-21
12-12_E23_X-A06_006	Isoforma de la proteína disulfido isomerasa (D-Erp60).	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q9TWZ1	9.00E-59
12-12_N17_XI-E09_013	Proteína de transporte de proteína SEC61 subunidad gamma.	<i>Gryllotalpa orientalis</i>	Q7Z1B8	6.0E-15
12-08_G06_V-A12_007	Proteína Ptpn2-prov.	<i>Xenopus laevis</i>	Q6DD82	7.0E-05
12-09_E17_II-C07_005	Putativo antitransportador oxalato:formato.	<i>Bacteroides fragilis</i>	Q64XE1	3.00E-05
12-12_G23_X-A07_008	Proteína Sec61beta-prov.	<i>Xenopus laevis</i>	Q8AVT7	6.00E-21
12-10_D01_X-B04_003	Homologo a la proteína SGT1.	<i>Mus musculus</i>	Q9CS74	6.00E-14
12-07_C01_I-A02_003	Proteína de la partícula de 19 kDa de reconocimiento de señal (SRP19).	<i>Homo sapiens</i>	P09132	1.0E-29
12-10_J24_VIII-B02_010	Similar al factor 3 de iniciación de la traducción eucariótica, subunidad 1 alfa, 35 kDa.	<i>Danio rerio</i>	Q7SXU0	8.0E-06
12-12_M21_IX-H11_013	Familia de proteínas esteroide alfa reductasa 1.	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Q9N5Y2	2.00E-51

12-09_A15_II-B03_002	Succinil-CoA ligasa [ADP-forming] cadena-beta, precursor mitocondrial (EC 6.2.1.5).	<i>Mus musculus</i>	Q9Z2I9	6.0E-19
12-09_M23_II-G01_014	Proteína de supervivencia de la neurona motora.	<i>Canis familiaris</i>	O02771	3.0E-05
12-15_G02_XIX-G02_014	Proteína de unión a Tat 1.	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q9XZC3	3.00E-11
12-15_E03_XIX-G09_009	Proteína Tceb2-prov.	<i>Xenopus laevis</i>	Q6PHL7	2.0E-25
12-14_H03_XV-H06_015	Proteína de tricopeptido repetido 11 (Proteína de repetición 11) (CGI-135).	<i>Homo sapiens</i>	Q9Y3D6	1.0E-17
12-14_F08_XVI-F07_012	Transportador de Tiamina 1 (THTR-1) (ThTr1) (Transportador de Tiamina 1) (TC1).	<i>Homo sapiens</i>	O60779	2.00E-22
12-08_B04_VI-E09_002	Tiorredoxina 2.	<i>Drosophila yakuba</i>	Q6XHI1	1.0E-21
12-15_A01_XVII-D03_001	Factor de iniciación de la Transcripción TFIID, subunidad 11 (TAFII30 beta).	<i>Drosophila melanogaster</i>	P49906	1.0E-40
12-09_O18_VI-A07_015	Proteína equivalente al factor de traducción SUI1.	<i>Aedes aegypti</i>	Q5QC99	5.0E-42
12-12_O14_XII-G07_015	Proteína del tumor traduccionalmente controlado.	<i>Plutella xylostella</i>	Q60FS1	4.0E-33
12-11_F11_XI-A08_006	Proteína Ubfm1.	<i>Danio rerio</i>	Q803Y4	9.00E-08
12-11_I12_XII-F05_010	Complejo protéico 6.4 kDa ubiquinol-citocromo C reductasa (EC 1.10.2.2) (Complejo III).	<i>Mus musculus</i>	Q9CPX8	2.0E-07
12-15_E10_XIX-A05_010	Complejo protéico 6.4 kDa ubiquinol-citocromo C reductasa (EC 1.10.2.2) (Complejo III).	<i>Mus musculus</i>	Q9CPX8	3.0E-07
12-15_B10_XVIII-H11_004	Complejo protéico ubiquinol-citocromo c reductasa.	<i>Spodoptera litura</i>	Q8I918	3.0E-10
12-16_E10_XX-H03_010	Ubiquinol-citocromo c reductasa subunidad hierro-azufre, precursor mitocondrial (EC 1.10.2.2).	<i>Saimiri sciureus</i>	Q69BJ7	1.0E-65
12-09_D14_VII-D03_003	Ubiquitina 1 (Proteína de fusión/Ubiquitina).	<i>Physarum polycephalum</i>	Q966Q8	7.0E-19
12-14_G12_XVII-C12_014	Enzima 9-2 conjugadora de ubiquitina (Enzima E212 conjugadora de ubiquitina) (Proteína Ube2i2).	<i>Danio rerio</i>	Q9DDJ0	8.0E-05
12-14_F11_XVII-B06_011	Enzima E2 M conjuadora de ubiquitina (EC 6.3.2.19) (Ubiquitin-protein ligasa M).	<i>Mus musculus</i>	P61082	7.0E-05
12-15_D06_XX-D01_008	Enzima E2-17 kDa conjugadora de ubiquitina (EC 6.3.2.19) (Ubiquitin-protein ligasa).	<i>Drosophila melanogaster</i>	P25867	2.00E-51
12-09_G17_II-C09_007	Proteína 5 equivalente a Ubiquitina.	<i>Mus musculus</i>	Q9EPV8	9.0E-34
12-09_O17_II-D02_015	Precursor de la proteína SMT3B equivalente a la Ubiquitina (Sentrina 2) (Proteína SUMO-3 relacionada a la Ubiquitina)	<i>Mus musculus</i>	P61957	1.00E-27

12-12_B21_XI-G01_001	ATP Sintasa catalitica vacuolar subunidad A, isoforma osteoclastica (EC 3.6.3.14).	<i>Homo sapiens</i>	P38607	1.0E-33
12-09_L16_VII-F01_012	ATP Sintasa vacuolar subunidad F (EC 3.6.3.14).	<i>Myuca sexta</i>	P31478	4.0E-46
12-08_C09_I-F02_003	Precursor de la subunidad 1 de la ATP Sintasa Vacuolar S1 precursor (EC 3.6.3.14).	<i>Bos taurus</i>	P40682	6.00E-10
12-12_K18_XIII-A07_011	ATPasa vacuolar M9.	<i>Aedes albopictus</i>	Q5MIS8	8.0E-26
12-11_G05_VIII-E09_007	Proteína específica de las células endoteliales vasculares (Septina 2).	<i>Rattus norvegicus</i>	Q91Y81	1.00E-61
12-08_G07_I-E05_008	Proteína Ywhab-prov.	<i>Xenopus laevis</i>	Q8AVQ3	9.00E-34
Chaperoninas (n=9)				
12-14_A06_XVI-B11_002	Proteína BAG2.	<i>Homo sapiens</i>	Q6FID0	2.0E-14
12-15_F04_XX-A07_012	Chaperonina que contiene TCP1, subunidad 2 (Beta).	<i>Rattus norvegicus</i>	Q5XIM9	1.0E-06
12-10_M04_XII-B07_014	Chaperonina que contiene TCP1, subunidad 3 (Gamma).	<i>Danio rerio</i>	Q7T2P2	3.0E-73
12-16_H09_XX-G05_015	Proteína de estrés, heat shock cognate 4 (Hsc 70-4).	<i>Myuca sexta</i>	Q9U639	2.0E-59
12-08_D04_VI-E10_004	Proteína de estrés, heat shock cognate 4 (Hsc 70-4).	<i>Lonomia obliqua</i>	Q5MGD5	3.0E-69
12-15_F08_XX-F02_012	Proteína de shock térmico HSP 90-beta (HSP 84).	<i>Rattus norvegicus</i>	P34058	5.0E-61
12-08_L02_VI-E06_011	Hsp90.	<i>Opisththalmus carinatus</i>	Q5WQZ6	3.0E-61
12-14_C04_XVI-A02_006	Proteína TRAP1 relacionada a Hsp90	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q7KNF3	1.00E-28
12-10_J22_VIII-A02_009	Proteína PPIL4. (Fragmento).	<i>Homo sapiens</i>	Q6P392	8.00E-21
Diferenciación (n=21)				
12-09_H15_IV-A07_008	Equivalente a proteína del disco alar anormal	<i>Choristoneura parallela</i>	Q8MUR5	2.0E-59
12-12_G20_XIII-B03_008	Equivalente a Angiomotina 1	<i>Homo sapiens</i>	Q8IY63	2.0E-14
12-09_E14_V-F07_005	Proteína EB2 ligante de APC.	<i>Mus musculus</i>	Q6PER3	3.00E-10
12-12_K23_X-A09_012	Proteína Cdc51-prov.	<i>Xenopus tropicalis</i>	Q66JL3	8.00E-40
12-08_L07_III-D06_012	Proteína CGI-25 (Proteína que interactúa con ENOS).	<i>Homo sapiens</i>	Q9Y314	9.00E-27
12-08_D03_II-H12_004	Proteína quimiosensorial.	<i>Leucophaea maderae</i>	Q8MTC3	9.00E-24
12-10_K03_VIII-E02_012	Ciclina L2.	<i>Homo sapiens</i>	Q5T2N6	6.00E-30

12-12_I16_XII-H01_010	Proteína de las células epidermales de Langerhans (LCP1).	<i>Homo sapiens</i>	Q94842	2.00E-07
12-08_H02_VI-E04_007	Precursor de proteína 1 de la translocación de la variante folicular (FVT-1).	<i>Homo sapiens</i>	Q06136	2.0E-08
12-11_H07_X-F10_008	Factor de crecimiento del disco imaginal.	<i>Pieris rapae</i>	Q6IWP3	3.0E-10
12-08_O02_IV-G11_015	Proteína inhibidora del crecimiento 4.	<i>Mus musculus</i>	Q8C0D7	4.00E-13
12-15_A12_XIX-C09_002	Proteína de unión a la Hormona Juvenil	<i>Heliothis virescens</i>	Q25175	7.00E-05
12-09_L19_IV-D01_012	Factor inhibitorio de la migración de macrófagos.	<i>Ixodes pacificus</i>	Q9GUA9	6.0E-26
12-08_P04_VI-F06_016	Miple.	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q9Y0V9	5.00E-16
12-10_N03_X-C11_014	Proteína nucleolar 1 ligante de GTP (Proteína de falla génica renal crónica) (Proteína ligante de GTP).	<i>Mus musculus</i>	Q99ME9	1.0E-35
12-12_H16_XIV-G04_008	Proteína de muerte celular programada 6 (Probable proteína ligante de calcio ALG-2) (PMP41).	<i>Mus musculus</i>	P12815	3.0E-05
12-09_L14_VII-D08_011	2G4-like asociado a proliferación.	<i>Danio rerio</i>	Q6PHD8	6.00E-31
12-10_G22_VI-C02_007	Receptor para un homólogo de la proteína quinasa C activada.	<i>Plutella xylostella</i>	Q60FS2	7.0E-57
12-15_A09_XVIII-G01_001	Proteína UBA/UBX 33.3 kDa.	<i>Homo sapiens</i>	Q04323	1.00E-19
12-08_N09_III-E09_013	Proteína Zcchc8-pro.	<i>Xenopus laevis</i>	Q6DD45	6.0E-06
12-14_A05_XVI-B01_001	Proteína con dedos de zinc 622 (Zinc finger-like protein 9).	<i>Homo sapiens</i>	Q969S3	2.00E-41
Proteínas Hipotéticas (n=12)				
12-12_G16_XII-G12_008	CG1397-PA (LD10746p).	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q9VZ21	3.0E-31
12-08_P08_VII-A07_016	CG18624-PA, isoforma A.	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q9W3N7	4.0E-05
12-09_B13_III-G05_001	CG30101-PA (LD27203p).	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q9V808	7.0E-07
12-11_O05_VIII-F02_015	CG30415-PA, isoforma A.	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q8MLR9	2.0E-10
12-09_A17_II-C05_001	CG7099-PA.	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q9VJY7	1.0E-05
12-11_N11_XI-A12_014	ENSANGP00000013411.	<i>Anopheles gambiae</i>	Q7PM90	3.0E-20
12-15_C09_XVIII-G03_005	ENSANGP00000015228 (Fragmento).	<i>Anopheles gambiae</i>	Q7PPG0	5.0E-06
12-10_E01_VIII-C02_005	Proteína inducida por etanol.	<i>Mus musculus</i>	Q8CEW7	2.0E-13

12-12_J20_XV-A11_010	Proteína hipotética MGC5987.	<i>Homo sapiens</i>	Q86V88	1.0E-08
12-15_E08_XVIII-F05_010	Proteína hipotética zgc:73376.	<i>Danio rerio</i>	Q6PBJ5	6.0E-08
12-09_F20_VII-G09_006	Proteína de membrana conservada no caracterizada.	<i>Idiomarina loihiensis</i>	Q5QW14	4.00E-13
12-14_F02_XV-F09_012	RE11282p (Fragmento).	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q8IGW9	2.0E-09
Codificadas en Mitocondria (n=12)				
12-14_B08_XVI-F01_004	ATP sintasa cadena A subunidad 6.	<i>Myzus persicae</i>	Q9B6J3	8.0E-25
12-09_M21_II-F02_013	Citocromo b (Fragmento).	<i>Schizaphis graminum</i>	Q8LWP5	8.0E-35
12-09_N18_VII-G02_013	Citocromo b (Fragmento).	<i>Schizaphis graminum</i>	Q6JCP3	2.0E-19
12-09_I23_II-F11_010	Citocromo b.	<i>Schizaphis graminum</i>	Q699M8	1.0E-64
12-14_H07_XVI-E09_015	Citocromo b.	<i>Schizaphis graminum</i>	Q699M8	8.0E-36
12-15_D08_XX-E09_008	Citocromo c oxidasa polipeptido I (EC 1.9.3.1).	<i>Schizaphis graminum</i>	Q699N8	1.0E-35
12-15_F11_XIX-B11_011	Citocromo c oxidasa polipeptido III (EC 1.9.3.1).	<i>Schizaphis graminum</i>	Q699N4	2.0E-09
12-09_L18_VII-F11_011	Citocromo c oxidasa subunidad I (Fragmento).	<i>Schizaphis graminum</i>	Q94XN1	2.0E-51
12-14_D06_XVI-C04_008	Citocromo oxidasa subunidad I (Fragmento).	<i>Sitobion avenae</i>	Q9MLD5	3.0E-61
12-09_B20_VII-G05_002	Citocromo oxidasa subunidad I.	<i>Diuraphis noxia</i>	Q85QQ1	6.0E-48
12-15_H02_XIX-G04_016	NADH deshidrogenasa subunidad 4.	<i>Schizaphis graminum</i>	Q699N1	5.0E-08
12-08_J07_III-D05_010	NADH-ubiquinona oxidoreductasa cadena 3 (EC 1.6.5.3).	<i>Schizaphis graminum</i>	Q699N3	5.0E-09

Tabla 1: Similitud de las secuencias contig de *Myzus persicae* usando BlastX con aquellas encontradas en bases de datos públicas.

4.2 ANOTACIÓN FUNCIONAL

Sobre la base de similitud de secuencias con proteínas de función conocida en bases de datos públicas (usando BlastX), el rol celular putativo fue asignado al 63% de los 532 contigs de *M. persicae*, de los cuales un 2% correspondió a chaperoninas, un 4% a proteínas de diferenciación, un 8% a proteínas estructurales, un 26% de metabolismo y un 23% ribosomales. El 37% restante cayó dentro de la categoría de “hipotéticas” (2%) o “no hit: Sin función conocida” (35%) (Figura 5).

Además, después de una exhaustiva búsqueda en la literatura, se elaboró una tabla con algunas proteínas seleccionadas e identificadas en la biblioteca de cDNA de *M. persicae*, que en insectos juegan un rol importante en la detoxificación de aleloquímicos vegetales y en la generación de resistencia a insecticidas, y que en *Myzus persicae* pudieran cumplir una función putativamente similar (Tabla 2). Por ejemplo, una de las proteínas identificadas es la proteína de unión a la hormona juvenil, cuya función es transportar esta hormona crucial para el desarrollo, reproducción y otras actividades vitales en insectos. La resistencia a insecticidas análogos a la hormona juvenil que Shemshedini y Wilson (1990) describen para *Drosophila melanogaster*, da cuenta de la importancia que pudiera tener esta proteína de unión a la hormona, en los mecanismos de resistencia a insecticidas por parte de *M. persicae*, puesto que es crucial para su transporte, como para el transporte de insecticidas análogos.

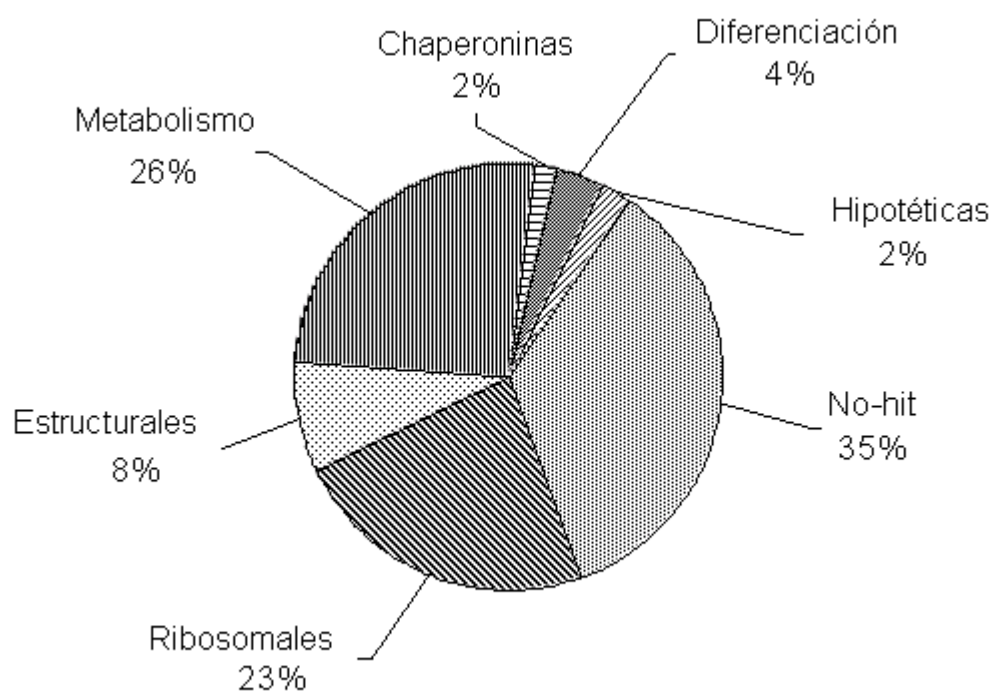


Figura 5. Distribución de las 532 secuencias contigs por categoría funcional.

Contig	Proteína	Función	Especies	Referencia
12-08_D03_II-H12_004	Proteína quimiosensorial	Rápida detoxificación de los compuestos tóxicos de la planta.	<i>Manduca sexta</i>	Glendinning (1996)
12-15_A12_XIX-C09_002	Proteína de unión a la Hormona Juvenil.	Transporta a la Hormona Juvenil al sitio blanco para mecanismos de insensibilidad.	<i>Drosophila melanogaster</i>	Shemshedini y Wilson (1990)
12-08_J03_III-A09_010	Catepsina B-N	Procesamiento de polipéptidos exógenos ingeridos.	<i>Aphis gossypii</i>	Deraison y cols. (2004); Moon y cols. (2004)
12-16_H09_VI-E10_004	Hsc70	Plegamiento protéico, translocación a través de membranas, degradación lisosomal y dependiente de ubiquitinación de proteínas celulares. Ayuda a la formación estructural de proteínas <i>in vivo</i> .	<i>Chironomus tentans</i> <i>Callosobruchus maculatus</i>	Yoshimi y cols. (2002)
12-15_F08_XX-F02_012	Proteína de Shock térmico			
12-08_L09_III-E08_011	Glutación S-Transferasa (GST)	Conjugación de moléculas electrofílicas (xenobióticos) con glutación reducido (GSH).	<i>Aulacorthum solani</i> <i>Acyrtosiphon pisum</i>	Francis y cols. (2001)
12-14_H07_XVI-E09_015	Citocromo b (b5)	Transporta electrones a la Citocromo P450.	<i>Anopheles gambiae</i>	Nikou y cols. (2003)
12-09_L18_VII-F11_011	Subunidad I de la Citocromo c oxidasa	Pertenece al complejo de la cadena respiratoria mitocondrial. Transfiere electrones al oxígeno molecular.	<i>Blattella germanica (L.)</i>	Pridgeon y Liu (2003)
12-11_E15_IX-C12_006	Citocromo P450	Une oxígeno molecular y recibe electrones del NADPH.	<i>Anopheles minimus</i>	Bergé y cols. (1998); Rongneparut y cols. (2003)
12-08_B04_VI-E09_002	Tioredoxina 2	Función antioxidativa y sustrato para la Tioredoxina Peroxidasa.	<i>Drosophila melanogaster</i>	Bauer y cols. (2002)
12-14_H07_XVI-E09_015	Ubiquinol-Citocromo c reductasa (Complejo III)	Cataliza la oxidación del ubiquinol y la reducción del Citocromo c mediante un mecanismo conocido como el ciclo Q.	<i>Calliphora erythrocephala</i> <i>Bemisia tabaci</i> .	Jewess y cols. (2002); García-Vallve (2004)

Tabla 2: Secuencias de *Myzus persicae* putativamente involucradas en la detoxificación de las defensas de la planta y en la resistencia a insecticidas.

5. DISCUSIÓN.

De acuerdo con el rol celular putativo asignado a los “contigs” clonados a partir del áfido *Myzus persicae*, la proporción más grande de secuencias se encuentra en tres categorías funcionales: metabolismo (26%), proteínas ribosomales (23%), y proteínas estructurales. Esta distribución fue muy similar a los ESTs clonados del áfido *Rhopalosiphum padi* (Tagu y cols., 2004) y obtenidos a partir del mismo tipo de material (individuos completos ápteros partenogenéticos). Esto indica que una pequeña colección de ESTs como ésta, principalmente revela los genes más expresados (*por ej.* proteínas ribosomales) así como los que tienen una función constitutiva que se expresan en todo el individuo (*por ej.* estructura celular).

Algunos de los genes identificados pueden ser útiles para estudios posteriores sobre detoxificación de aleloquímicos vegetales e insecticidas. Se identificó una GST perteneciente a la clase sigma (Tabla 2) de esta familia de enzimas, las cuales están ampliamente distribuidas en insectos y otros animales (Enayati y cols., 2005). Este grupo de GST juega un importante rol en la protección contra el estrés oxidativo (Singh y cols., 2001; Enayati y cols., 2005). Recientemente, se ha aislado y caracterizado una GST homodimérica de *M. persicae* aparentemente involucrada en la detoxificación de glucosinolatos provenientes de plantas crucíferas. La actividad aumentada de GST ha sido asociada con detoxificación xenobiótica en *Sitobion avenae* y otros áfidos de cereales crecidos sobre cultivos de trigo que muestran altos niveles de ácidos hidroxámicos (Leszczynski y Dixon, 1992; Leszczynski y cols., 1994; Loayza-Muro y cols., 2000).

Al menos cinco contigs diferentes involucrados en la transferencia de electrones o actividad antioxidante han sido identificados para *M. persicae* (Tabla 2). Entre ellos un contig

de citocromo P450 monooxigenasa perteneciente a la familia CYP4 fue detectado. La familia CYP4 ha sido asociada con resistencia a insecticidas en otras especies de insectos tales como la Oruga del tomate (*Helicoverpa armigera*), el gusano de la raíz del maíz (*Diabrotica virgifera*) y el mosquito vector de la malaria (*Anopheles gambiae*) (Pittendrigh y cols., 1997; Scharf y cols., 2001; Ranson y cols., 2002). De cualquier forma, se sabe muy bien que las monooxigenasas son fundamentales para los mecanismos de detoxificación de insecticidas y aleloquímicos de la planta hospedera en varios grupos de insectos fitófagos (Feyereisen, 1999; Scott, 1999; Scott y Wen, 2001).

Una etapa limitante para el progreso de nuevas estrategias de mitigación del desarrollo de resistencia a insecticidas, es el conocimiento íntimo de los mecanismos de detoxificación, y de las características de las proteínas blanco de los insecticidas. Esta genoteca de ESTs permitirá el estudio de los niveles de expresión de estos genes relacionados con la resistencia a insecticidas, esterasas, GST, citocromo P450, etc., entre otros genes de importancia para la supervivencia del áfido en condiciones adversas. Al momento de escribir esta tesis, este tipo de investigaciones se estaban llevando a cabo en el INRA-Rennes, Francia por la Srta. Andrea Silva y el Sr. Marco Cabrera, ambos estudiantes del programa de Doctorado en Ciencias mención Sistemática y Ecología de la Universidad Austral de Chile, quienes ya han encontrado varios genes regulados por la acción de insecticidas, y que involucrarían a enzimas tales como las GSTs (Silva y Cabrera, comunicación personal).

Para ello, se está utilizando la tecnología de “microarrays”, una poderosa herramienta para examinar la relación entre perfiles de expresión génica global y varios estados fisiológicos. Los microarrays han llegado a ser, con el paso del tiempo, una herramienta estándar en muchos laboratorios de investigación en genómica alrededor del mundo, que estudian el genoma de

diversos organismos incluyendo insectos (Heckel 2003; Leung y Cavalieri, 2003). El uso de microarrays de genoma completo provee una manera eficiente de identificar nuevos genes candidatos asociados a un rasgo particular (David y cols., 2005).

En conclusión, los presentes datos representan un primer paso hacia la identificación y anotación de transcritos en *M. persicae*. El siguiente paso será el uso de estos ESTs para tecnologías basadas en “arrays” de cDNA (microarrays) e hibridaciones comparativas para así poder identificar genes de áfidos involucrados en la aceptación de planta hospedera, alimentación y metabolización de defensas químicas de la planta e insecticidas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W y Lipman DJ (1997) Gapped BLAST y PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402.
- Anstead JA, Williamson MS, Denholm I. (2005) Evidence for multiple origins of identical insecticide resistance mutations in the aphid *Myzus persicae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35:249-56.
- Bairoch A, Apweiler R, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, Gasteiger E, Huang HZ, Lopez R, Magrane M, Martin MJ, Natale DA, O'Donovan C, Redaschi N y Yeh LSL (2005) The universal protein resource (UniProt). *Nucleic Acids Research* 33:D154-D159.
- Bauer H, Kanzok SM y Schirmer RH (2002) Thioredoxin-2 but not thioredoxin-1 is a substrate of thioredoxin peroxidase-1 from *Drosophila melanogaster*. *Journal Biological Chemistry* 17:17457-17463.
- Bergé JB, Feyereisen R y Amichot M (1998) Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B* 29:1701-1705.
- Blackman, R. L. y Eastop V. F. (2000). Aphids on de world's crops. An identification and information guide. En: John Wiley y Sonds Ltd., (Second Edition) British Museum. 466 pp. Chichester, UK.

- Blackman, R.L. (1974). Life-cycle variation of *Myzus persicae* (Sulz.) (Hom., Aphididae) in different parts of the world, in relation to genotype y environment. Bulletin of Entomological Research 63: 595-607.
- David DC, Hoerndli F, Gotz J. (2005) Functional Genomics meets neurodegenerative disorders Part I: transcriptomic and proteomic technology. Progress in Neurobiology 76:153-68.
- Deraison C, Darboux I, Duportets L, Gorojankina T, Rahbé Y y Jouanin L (2004) Cloning and characterization of a gut-specific cathepsin L from the aphid *Aphis gossypii*. Insect Molecular Biology 13:165-177.
- Devonshire AL, Field LM, Foster SP, Moores GD, Williamson MS y Blackman RL (1998) The evolution of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B 353:1677-1684.
- Devonshire, A. L., y G. D. Moores. (1982). A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). Pesticide Biochemistry and Physiology 18: 235-246.
- Dewar, A. M., Read, L. A., Thornhill, W. A., Smith, S. D. J. y Devonshire, A. L. (1992) The effect of established and novel aphicides on resistant *Myzus persicae* (Sulz.) on sugar beet under field cages. Crop Protection 11: 21-26
- Enayati AA, Ranson H y Hemingway J (2005) Insect glutathione transferases and insecticide resistance. Insect Molecular Biology 14:3-8.
- Feyereisen, R (1999) Insect P450 enzymes. Annual Review of Entomology 44:507-533.

- French-Constant, R.H., S.J. Clark y A.L. Devos. (1988b). Effect of decline of insecticide residues on selection for insecticides resistance in *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* 78:19-29.
- French-Constant, R.H., Roush, R.T. (1990). Resistance detection and documentation: the relative roles of pesticidal and biochemical assays. En: Roush, R.T, Tabashnik B.E, editors. *Pesticide Resistance in Arthropods*, pp. 4–38. New York: Chapman y Hall.
- French-Constant, R. H., Daborn, P. J. y Le Goff, G. (2004). The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends in Genetics* 20:163-170.
- Figueroa C.C., Koenig C, Araya C, Santos MJ y Niemeyer H.M. (1999) Effect of DIMBOA, a hydroxamic acid from cereals, on peroxisomal and mitochondrial enzymes from aphids: evidence for the presence of peroxisomes in aphids. *Journal of Chemical Ecology* 25: 2465-2475.
- Figueroa C.C., Loayza-Muro, R., y Niemeyer, H.M. (2002) Temporal variation of RAPD-PCR phenotype composition of the grain aphid *Sitobion avenae* (Hemiptera:Aphididae). *Pesticide Management Science* 59:166-173.
- Figueroa, C.C., Simon, J-C., Le Gallic, J-F., Prunier-Leterme, N., Briones, L.M., Dedryver, C-A., y Niemeyer, H.M. (2004). Effect of host defense chemicals on clonal distribution and performance of different genotypes of the cereal aphid *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Chemical Ecology* 30:2515-2525.

- Figuroa, C.C., Simon, J.C., Le Gallic, J.F., Prunier-Leterme, N., Briones, L.M., Dedryver, C.A., y Niemeyer, H.M. (2005). Genetic structure and clonal diversity of an introduced pest in Chile, the cereal aphid *Sitobion avenae*. *Heredity* 95:24-33.
- Figuroa C. C., Prunier-Leterme N., Risper C., Sepulveda F., Fuentes-Contreras E., Sabater-Munoz B., Simon J.C., Tagu D.(2007). Annotated expressed sequence tags and xenobiotic detoxification in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Insect Science* 14:29-45
- Foster, S.P., Denholm, I., Harling, Z.K., Moores, G.D. y Devonshire, A.L. (1998) Intensification of insecticide resistance in UK field populations of the peach–potato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) in 1996. *Bulletin of Entomological Research* 88:127–130.
- Foster, S.P., Harrington, R., Dewar, A.M., Denholm, I. y Devonshire, A.L. (2002) Temporal and spatial dynamics of insecticide resistance in *Myzus persicae* (Hemiptera:Aphididae). *Pest Management Science* 58:895–907.
- Francis F, Haubruge E, Gaspar C y Dierickx PJ (2001) Glutathione S-transferases of *Aulacorthum solani* and *Acyrtosiphon pisum*: partial purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 129:165-171.
- Fuentes-Contreras, E., Muñoz, R. y Niemeyer, H.M. (1997) Diversidad de áfidos (Hemiptera: Aphidoidea) en Chile. En: *Revista Chilena de Historia Natural* 70:531-542.
- Fuentes-Contreras, E., Figuroa, C.C., Reyes, M., Briones, L.M., y Niemeyer, H.N. (2004). Clonal diversity and insecticide resistance of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) populations from tobacco in Chile: evidence for the existence of a single predominant clone. *Bulletin of Entomological Research* 94:11-18.

- García-Vallve S (2004) Contribution of each complex of the mitochondrial respiratory chain in the generation of the proton-motive force. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 32:17-19.
- Glendinning JI (1996) Is chemosensory input essential for the rapid rejection of toxic foods? *The Journal of Experimental Biology* 199:1523-1534.
- Haack, L., Simon, J.C., Gauthier, J.P., Plantegenest, M. y Dedryver, C.A. (2000). Predominance of generalist clones in a cyclically parthenogenetic organism evidenced by combined demographic and genetic analyses. *Molecular Ecology* 9:2055-2066.
- Heckel DG (2003) Genomics in pure and applied entomology. *Annual Review of Entomology* 48:235–260.
- Hoy, M.A. (1999). Myths, models and mitigation of resistance to pesticides. En: *Insecticide Resistance: From Mechanisms to Management*. pp. 111-119. I. Denholm, J. A. Pickett and A. L. Devonshire, Eds., CABI Publ, Wallingford, UK.
- Hunter WB, Dang PM, Bausher MG, Chaparro JX, McKendree W, Shatters RG, McKenzie CL y Sinisterra XH (2003) Aphid biology: expressed genes from the alate *Toxoptera citricida*, the brown citrus aphid. *Journal of Insect Science* 3:23-29.
- Jaenike, J. (1990) Host specialization in phytophagous insects. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21:243-273.

- Jewess PJ, Chamberlain K, Boogaard AB, Devonshire AL y Khambay BP (2002) Insecticidal 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones: correlation of inhibition of ubiquinol cytochrome c oxidoreductase (complex III) with insecticidal activity. *Pest Management Science* 58: 243-247.
- Kerns, D.L., Palumbo J.C., y. Byrne D.N. (1998). Relative susceptibility of Red and Green Forms of Green Peach Aphid to insecticides. *Southwestern Entomologist* 23:17-24.
- Leszczynski B y Dixon AFG (1992) Resistance of cereals to aphids: the interaction between hydroxamic acids and glutathione s-transferases in the grain aphid *Sitobion avenae* (F.) (Hom., Aphididae). *Journal of Applied Entomology* 113:61-67.
- Leszczynski B, Matok H y Dixon AFG (1994) Detoxification of cereal plant allelochemicals by aphids: activity and molecular-weights of glutathione-S-transferase in thee species of cereal aphids. *Journal of Chemical Ecology* 20:387-394.
- Leung YF, Cavalieri D. (2003). Fundamentals of cDNA microarray analysis. *Trends in Genetics* 19:649-659.
- Loayza-Muro R, Figueroa CC y Niemeyer HM (2000) Effect of two wheat cultivars differing in hydroxamic acid concentration on detoxifying and oxidative metabolism in the aphid *Sitobion avenae*. *Journal of Chemical Ecology* 26:2725-2731.
- Margaritopoulos, J.T., Blackman, R.L., Tsitsipis, J.A. y Sannino, L., (2003). Co-existence of different host-adapted forms of the *Myzus persicae* group (Hemiptera: Aphididae) in southern Italy. *Bulletin of Entomological Research* 93:131-135.

- Martínez-Torres D, Foster SP, Field LM, Devonshire AL y Williamson MS (1999) A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera:Aphididae). *Insect Molecular Biology* 8:1-8.
- Mazzoni, E., y P. Cravedi. (2002). Analysis of insecticide-resistant *Myzus persicae* (Sulzer) populations collected in Italian peach orchards. *Pest Management Science* 58:975-980.
- Metcalf R L. (1989). Insect resistance to insecticides. *Journal of Pesticide Science*. 26:333-358.
- Metcalf. R. L. (1996). Applied entomology in the twenty-first century: needs and prospects. *American Entomology* 42:216–227.
- Minks, A.K. y Harrewijn, P. (1987) Aphids, their biology, natural enemies and control. Vol. A. Amsterdam, Elsevier. Vol. 1, 450 pp.
- Moon J, Salzman RA, Ahn JE, Koiwa H y Zhu-Salzman K (2004) Transcriptional regulation in cowpea bruchid guts during adaptation to a plant defence protease inhibitor. *Insect Molecular Biology* 13:283-291.
- Moore, G., G. Devine, y A. Devonshire. (1994). Insecticide-insensitive acetylcholinesterase can enhance esterase-based resistance in *Myzus persicae* y *Myzus nicotianae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 49:114-120.
- Moran NA. (1992) The evolution of aphid life cycles. *Annual Review of Entomology* 37: 321–348.

- Nauen y Elbert (2003). European monitoring of resistance to insecticides in *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) with special reference to imidacloprid. *Bulletin of Entomological Research* 93:47-54.
- Nikou D, Ranson H y Hemingway J (2003). An adult-specific CYP6 P450 gene is overexpressed in a pyrethoid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae* Gene 30:91-102.
- Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, (2000) revised edition. Oxford: Oxford University Press.
- Pittendrigh B, Aronstein K, Zinkovski E, Yreev O, Campbell B, Daly J, Trowell S y ffrench-Constant RH (1997) Cytochrome P450 genes from *Helicoverpa armigera*: expression in a pyrethoid-susceptible and resistant strain. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27: 507-512.
- Pridgeon JW y Liu N (2003) Overexpression of the cytochrome c oxidase subunit I gene associated with a pyrethoid resistant strain of German cockroaches, *Blattella germanica* (L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33:1043-1048.
- Ranson H, Nikou D, Hutchinson M, Wang X, Roth CW, Hemingway J y Collins FH (2002) Molecular analysis of multiple cytochrome P450 genes from the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology* 11:409-418.
- Rongnoparut P, Boonsuepsakul S, Chareonviriyaphap T y Thanomsing N (2003) Cloning of cytochrome P450, CYP6P5, and CYP6AA2 from *Anopheles minimus* resistant to deltamethin. *Journal of Vector Ecology* 28:150-158.

- Scott, J.G. (1990). Investigating mechanisms of insecticide resistance: methods, strategies and pitfalls. En: R.T. Roush y B.E. Tabashnik [eds.], Pesticide resistance in arthropods, pp. 39-57. Chapman and Hall, New York.
- Scott JG (1999) Cytochromes P450 y insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29:757-777.
- Scott JG y Wen Z (2001) Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. *Pest Management Science* 57:958-967.
- Scharf, M.E., Parimi, S., Meinke, L.J., Chyler, L.D., Siegfried, B.D. (2001) Expression and induction of the family 4 cytochrome P450 (CYP4) genes identified from insecticide resistant and susceptible western corn rootworms, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Insect Molecular Biology* 2:139-46.
- Shemshedini L y Wilson TG (1990) Resistance to juvenile hormone and an insect growth regulator in *Drosophila* is associated with an altered cytosolic juvenile hormone-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87:2072-2076.
- Shigenobu S, Watanabe H, Hattori M, Sakaki Y y Ishikawa H (2000) Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera sp* APS. *Nature* 407:81-86.
- Silva JG, Meixner MD, McPheron BA, Steck GJ, Sheppard WS. (2003) Recent Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) infestations in Florida - a genetic perspective. *Journal of Economic Entomology* 96:711-8.
- Simon JC, Rispe C, Sunnucks P (2002). Ecology and evolution of sex in aphids. *Trends in Ecology and Evolution* 17:34-39.

- Singh SP, Coronella JA, Benes H, Cochane BJ y Zimniak P (2001) Catalytic function of *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase DmGSTS1-1 (GST2) in conjugation of lipid peroxidation end products. *European Journal of Biochemistry* 268: 2912-2923.
- Soderlund, D. y Bloomquist J.R. (1990). Molecular mechanisms of insecticide resistance. En: Roush, R.T. and Tabashnik B.E. (eds.). *Pesticide resistance in arthropods*. Págs:58-96. Chapman and Hall. New York.;
- Tagu D, Prunier-Leterme N, Legeai F, Gauthier JP, Duclerc A, Sabater-Muñoz B, Bonhomme J y Simon JC (2004) Annotated expressed sequence tags for studies of the regulation of reproductive modes in aphids. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 8:809-822.
- Terradot L, Simon J-C, Leterme N, Bourdin D, Wilson ACC, Gauthier JP y Robert Y (1999) Molecular characterization of clones of the *Myzus persicae* complex (Hemiptera: Aphididae) differing in their ability to transmit the potato leafroll luteovirus (PLRV). *Bulletin of Entomological Research* 89:355-363.
- Unruh, J.B., R.E. Gaussoin, y S.C. Wiest. (1996). Basal growth temperatures and growth rate constants of warm-season turfgrass species. *Crop Science* 36:997-999.
- Van Emden HF, Eastop VF, Hughes RD, Way MJ.(1969).The ecology of *Myzus persicae*. *Annual Review of Entomology* 14:197-270.
- Williams RS, Lincoln DE, Norby RJ (1998) Leaf age effects of elevated CO₂-grown white oak leaves on spring-feeding lepidopterans. *Global Change Biology* 4:235–246
- Yoshimi T, Minowa K, Karouna-Renier NK, Watanabe C, Sugaya Y y Miura T (2002) Activation of a stress-induced gene by insecticides in the midge, *Chironomus yoshimatsui*. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 16: 10-17.

7. ANEXO

Lista de reactivos utilizados y sus respectivas marcas comerciales

REACTIVO	MARCA
β -Mercaptoetanol	MERCK
Etanol	TCL
Agarosa	GIBCO
Formaldehído	TCL
Bromuro de Etidio	TCL
Agua desionizada libre de ribonucleasas	GIBCO
Acetato de sodio	RIEDEL-DE HAEN
Isopropanol	VETEC
proteínasa K	INVITROGEN
Fenol: Cloroformo: Isoamilalcohol	SIGMA
Glicerol	SIGMA
Cloranfenicol	SIGMA
Medio LB (NaCl, Extracto de Levadura, Triptona, Agar-Agar)	BD