

CARACTERIZACIÓN ELECTROFORÉTICA DE LAS PROTEÍNAS DEL ENDOSPERMO DE VARIEDADES DE ARROZ VENEZOLANAS

Carlos José Moreno¹, Rafael Fernández Da Silva¹ y Oscar E. Valbuena Vilchez¹

RESUMEN

La productividad del cultivo de arroz, entre otros factores, está influenciada por la variedad y la calidad de la semilla utilizada. Con el objetivo de contar con un método sencillo y económico que permita evaluar estos aspectos, se determinaron los perfiles electroforéticos de las proteínas del endospermo de variedades de arroz venezolanas (*Oryza sativa* L.). Para ello se realizó la extracción de proteínas según su solubilidad en diferentes solventes, y por métodos colorimétricos se determinó la concentración de proteínas en cada una de las fracciones generadas. Se realizó electroforesis en geles de poli(acrilamida) en condiciones desnaturizantes y en gradiente discontinuo (12 al 16.5 % de poli(acrilamida) de las fracciones en cada una de las variedades comerciales estudiadas (Venezuela 21, Araure, Cimarrón, Centauro y D-Sativa), así como en arroz rojo (*O. sativa*) y arroz silvestre (*O. glumaepatula*). Se observó que las variedades Araure, Centauro y D-Sativa pueden ser diferenciadas por análisis electroforéticos utilizando la fracción de albúminas y globulinas del endospermo. Situación similar se encontró con la fracción de glutelinas en la cual se detectó un perfil polipeptídico único para cada tipo de semilla estudiada. En la fracción de prolaminas no se encontraron diferencias entre variedades comerciales, pero sí entre los representantes de *O. sativa* y *O. glumaepatula*.

Palabras clave adicionales: Albúminas, globulinas, glutelinas, identificación de variedades, prolaminas

ABSTRACT

Electrophoretic characterization of endosperm proteins from Venezuelan rice varieties

Rice productivity is influenced, among other factors, by the variety and quality of the seed. In order to have an affordable method to evaluate these aspects, the electrophoretic profiles of proteins endosperm varieties of Venezuelan rice (*Oryza sativa* L.) were determined. To accomplish this aim, proteins were extracted according to their solubility on different solvents, and also by colorimetric methods in which proteins concentration were determined in each of the generated fractions. Polyacrylamide gel electrophoresis was carried out in denaturing conditions and discontinuous gradient (12 to 16.5 % polyacrylamide) of the different fractions in each of the commercial varieties (Venezuela 21, Araure, Cimarrón, Centauro y D-Sativa) and in red rice (*O. sativa*) and wild rice (*O. glumaepatula*). It was found that Araure, Centauro and D-Sativa varieties can be distinguished by electrophoretic analysis using the albumin and globulin fraction of the endosperm. A similar situation was found with the fraction of glutelins where a unique polypeptide profile was detected for each seed type. Finally no differences were found in the fraction of prolamins among the commercial varieties; however, there were differences between the representatives of *O. sativa* and *O. glumaepatula*.

Additional key words: Albumins, globulins, glutelins, prolamins, varieties identification

INTRODUCCIÓN

En el arroz, como en otros cereales, existen al menos cuatro grupos de proteínas: las estructurales, metabólicas, protectivas y las de reserva. Estas últimas en el grano son sintetizadas en el endospermo (Habino et al., 1989; Rubin et al., 1992; Krishnan y White, 1995) y depositadas en cuerpos proteicos dentro de vacuolas de

almacenamiento de proteínas (Shewry y Halford, 2002; Kim et al., 2009, Reyes et al., 2011). Según el fraccionamiento de Osborne, estas biomoléculas pueden ser clasificadas según su solubilidad en diferentes solventes, obteniéndose mediante extracciones sucesivas con agua, solución de sales diluida, etanol al 70 % y ácidos o álcalis diluidos. Usando esta secuencia de separación, las proteínas se clasifican en albúminas, globulinas, prolaminas

Recibido: Enero 30, 2016

Aceptado: Octubre 13, 2016

¹ Dpto. de Biología, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología (FACYT). Centro de Biotecnología Aplicada (CBA), Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.

e-mail: cjmore@gmail.com; rafaelfer2103@hotmail.com ; ovalbuena@uc.edu.ve

y glutelinas, respectivamente (Ruiz, 2009; Nogueira et al., 2013).

Dada la importancia de los cereales desde el punto de vista agroalimentario, estas proteínas han sido ampliamente estudiadas en diferentes aspectos, entre los que se pueden mencionar: biosíntesis (Yamagata et al., 1982; Habino et al., 1989), acumulación en el endospermo (Vitale y Ceriotti, 2004), regulación de la expresión génica y del tráfico vesicular (Fauteux y Strömvik, 2009; Onda et al., 2009; Zhou, et al., 2013), caracterizaciones bioquímicas de las diferentes fracciones (Shyur et al., 1994; Abayomi et al., 2009), reacciones inmunológicas en humanos y aspectos nutricionales (Young y Pellett., 2010; Oszvald et al., 2014; Ren et al., 2014). Así mismo, estas proteínas se han utilizado con el objeto de la identificación varietal en diferentes tipos de cereales (Huebner et al., 1990; Abe et al., 1996; Hoai et al., 2008) y se han desarrollado así biomarcadores, tal como es el caso en arroz (Ju y Jinkyu, 2015).

En Venezuela, existen programas de mejoramiento genético de arroz, lo que ha permitido liberar al mercado un número importante de variedades para ser aprovechadas por los productores, comercializándose a través de semillas (Acevedo et al., 2007; Pérez et al., 2011). Así estas variedades, antes de ser liberadas son evaluadas como lo establece el Servicio Nacional de Semillas (SENASSEM) a fin de obtener conocimiento de su comportamiento, rendimiento, resistencia o susceptibilidad a enfermedades y calidad del grano, verificando las características de distinción, uniformidad y estabilidad, requisitos fundamentales para la protección de las variedades vegetales generadas por los programas de mejoramiento genético (Perdomo et al., 2006; Montoya et al., 2008).

A pesar que en la actualidad las técnicas de ADN para la identificación de variedades son muy usadas por su fiabilidad, se propone utilizar las proteínas del endospermo de las semillas del arroz como característica para la identificación y diferenciación de las variedades estudiadas, ya que a diferencia de las primeras técnicas, estos estudios permitirán disponer de una herramienta sencilla y económica para los productores a la hora de constatar la pureza de los granos que desean adquirir, así como evaluar la presencia del arroz rojo (AR) en los sembradíos y

consecuentemente mejorar la productividad del cereal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico. Las semillas utilizadas correspondieron a cinco variedades de *Oryza sativa* L del subgrupo Indica: Venezuela 21, Araure, Cimarrón, Centauro y D-Sativa, así como semillas de la maleza conocida como arroz rojo (*O. sativa*), y arroz silvestre (*O. glumaepatula*).

Extracción de proteínas. Se descascaró el grano de arroz y se molió el endospermo de las semillas hasta obtener un polvo fino (harina) que fue utilizado para la extracción de proteínas. Para esto, se realizaron modificaciones al protocolo propuesto como método 3 por Abayomi et al. (2009), así como el protocolo de Chen et al. (2010), según las siguientes pautas: Para la extracción de la fracción (albúmina/globulina), se trató 0.25 g de la harina con 250 µl de solución de NaCl 1 % durante 1 h, transcurrido ese tiempo se centrifugó a 10 mil rpm por 15 min, conservando el sobrenadante (albúmina/globulina). Las glutelinas fueron extraídas tratando al precipitado remanente con NaOH 0,02 M (ajustado a pH 11,0) durante 30 min, y se centrifugó como anteriormente se indicó. Para obtener las prolaminas, se utilizó etanol al 70 % v/v durante 4 h, y se realizó nuevamente un proceso de centrifugación. Entre la extracción de cada una de las fracciones se realizaron tres lavados con la misma solución de extracción, adicionalmente a las fracciones obtenidas se le incluyó fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) (1 mM) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (0,1 mM) para inhibir la acción de proteasas.

Una vez realizada la extracción de las diferentes fracciones, las proteínas fueron precipitadas con ácido tricloroacético (ATC). Para ello, a las diferentes fracciones se les añadió 500 µL de ATC para obtener una concentración final del 10 %, y se incubó por 20 min a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min, conservando el precipitado (proteínas) que se lavó con etanol al 70 % salvo la fracción de prolaminas que fue concentrada a 37 °C. Todas las fracciones fueron almacenadas a 4 °C hasta su análisis.

Determinación de la concentración de proteínas. Para la cuantificación de proteínas en

cada una de las fracciones, se utilizó el método colorimétrico de Bradford (1976). Se construyó una curva de calibración con una solución de albúmina de suero bovino (ASB) $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente discontinuo. Para observar el perfil electroforético polipeptídico de las fracciones (Albúminas/globulinas, prolaminas y glutelinas), se realizó una modificación del método de Laemmli (1970). Se preparó un gel de poliacrilamida en gradiente discontinuo (12, 14 y 16,5 %) en condiciones desnaturalizantes. Para generar un gradiente estable fue necesario incorporar glicerol a cada una de las concentraciones del polímero, empleando $600 \mu\text{L}$ para la zona de 16,5 % y $200 \mu\text{L}$ para la de 14 %. Se analizaron $60 \mu\text{g}$ de proteínas para establecer comparaciones entre variedades. La corrida electroforética fue realizada a 100 V por 1 h a 4°C . La tinción se realizó con una solución de metanol al 40 %, ácido acético al 10 % y azul de coomassie R-250 (0.0123 %) por 30 minutos, luego se trató con una solución de desteñido (metanol 40 % y ácido acético 10 %) hasta observar bandas azules, que se registraron fotográficamente mediante un transiluminador Chemidoc XRS system 170-8170 de Bio-Rad, empleando el programa Piximetre versión 5.7 para la medición de la migración de las bandas de

proteínas y la correspondiente asignación de los pesos moleculares aproximados, tomando como referencia el patrón de peso molecular de Bio-rad (intervalo 10-250 kDa) utilizado.

Los datos generados fueron comparados mediante un análisis de árbol jerarquizado utilizando la distancia binaria según el programa estadístico Past versión 1.91.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los perfiles electroforéticos de la fracción albúminas/globulinas, de las variedades de arroz se muestran en la Figura 1. Para esta fracción, las variedades analizadas mostraron dos patrones electroforéticos característicos: el primero, representado por Venezuela 21, Cimarrón y D-Sativa, es un perfil constituido por 14 bandas con un intervalo de peso molecular aproximado entre 97,6 y 14,5 kDa, tal como se ha señalado al evaluar diversos bancos de germoplasma de arroz (Nogueira et al., 2013; Tripathy et al., 2015; Vithyashini y Wickramasinghe, 2015). En este grupo, la variedad D-Sativa presenta una banda de peso molecular próximo a 37,7 kDa, la cual no se observa en las otras variedades. Así mismo, se observó que Venezuela 21 y Cimarrón mostraron patrones electroforéticos similares en esta fracción.

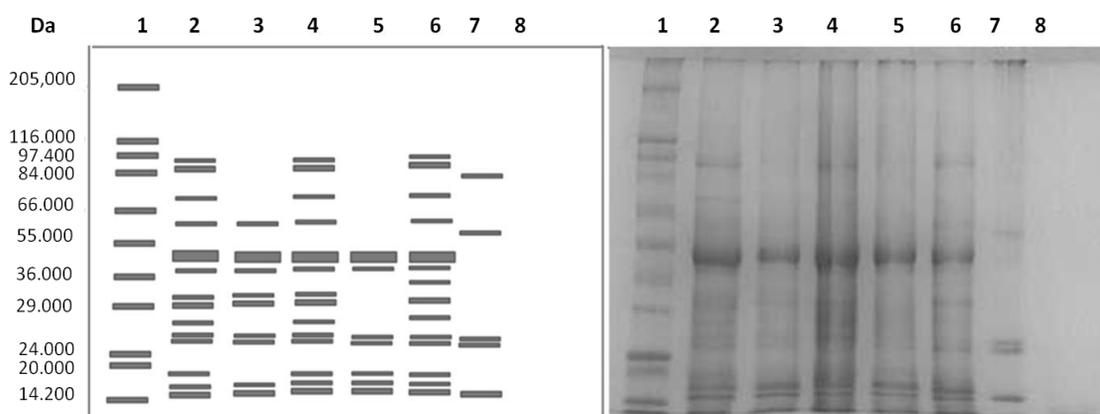


Figura 1. Perfil electroforético de la fracción de albúminas y globulinas del endospermo de variedades venezolanas de arroz (SDS-PAGE en gradiente discontinuo del 12 al 16.5 %). 1.- Marcador de peso molecular (Sigma Marker M4038). 2.- Venezuela 21. 3.- Araure. 4.- Cimarrón. 5.- Centauro 6.- D-Sativa. 7.- Arroz rojo. 8.- Arroz silvestre.

El segundo patrón electroforético, encontrado en esta fracción, lo presentaron las variedades Araure y Centauro. Este estuvo constituido por un

menor número de bandas, con un intervalo de peso molecular aproximado entre 60,6 y 14,5 kDa. Se puede observar que ambas variedades carecen de

las subunidades de mayor peso molecular (97,6; 91,2 y 74,4 kDa). A su vez se aprecia que la variedad Araure se distingue de Centauro por presentar un doblete de peso molecular 35,2 y 30,7 kDa, que en esa última variedad no se observó.

Es de resaltar que en esta fracción las variedades estudiadas mostraron una serie de similitudes, como por ejemplo, la presencia de una banda con un peso molecular aproximado a 46,2 kDa, que presentó la mayor intensidad a diferencia de lo reportado por Nogueira et al. (2013), quienes indican que la banda de mayor intensidad se ubicó en 25 kDa. Estas diferencias pueden ser atribuidas a que en este trabajo las albúminas y las globulinas se encontraron en una misma fracción. De igual forma, en todas las variedades comerciales se evidenció la presencia de un doblete de bajo peso molecular (15,5 y 14,5 kDa). Sin embargo, tanto ese doblete como la subunidad de 46,2 kDa, no se observaron en el AR. Lo que indica diferencias entre las variedades comerciales y el arroz rojo.

Es importante mencionar que la caracterización bioquímica de esta fracción puede identificar variedades con propiedades nutricionales importantes. Un ejemplo de esto es el Índice de Aminoácidos Esenciales (IAE), que es directamente proporcional al contenido de

globulinas (Martínez et al., 2005). Este aspecto es relevante ya que los granos de este cereal están constituidos en un gran porcentaje por almidón y valores cercanos al 10 % de proteínas, tal como lo plantean Kim et al. (2013) y Cao et al. (2009). Sin embargo, algunos autores plantean que su importancia radica en la calidad de la proteína y no en la cantidad de la misma (Martínez et al., 2005).

Las prolaminas se caracterizan por solubilizarse en soluciones de alcohol, siendo el componente proteico más abundante en la mayoría de los cereales, a excepción del arroz donde son las glutelinas las de mayor cuantía, lo cual coincide con los hallazgos encontrados en este estudio. La Figura 2 muestra el fraccionamiento de las prolaminas del endospermo de las cinco variedades comerciales, del arroz rojo y del arroz silvestre. Se puede ver que existe un patrón característico de este tipo de proteína, independiente a la variedad estudiada, aspecto que coincide con lo señalado por Nogueira et al. (2013), sin embargo, difiere a lo señalado por Hoai et al. (2008), quienes indican que por análisis de SDS PAGE de esta fracción es posible identificar cultivares de arroz del norte de Vietnam debido a diferencias en términos de puntos isoeléctrico, número e intensidad de las bandas.

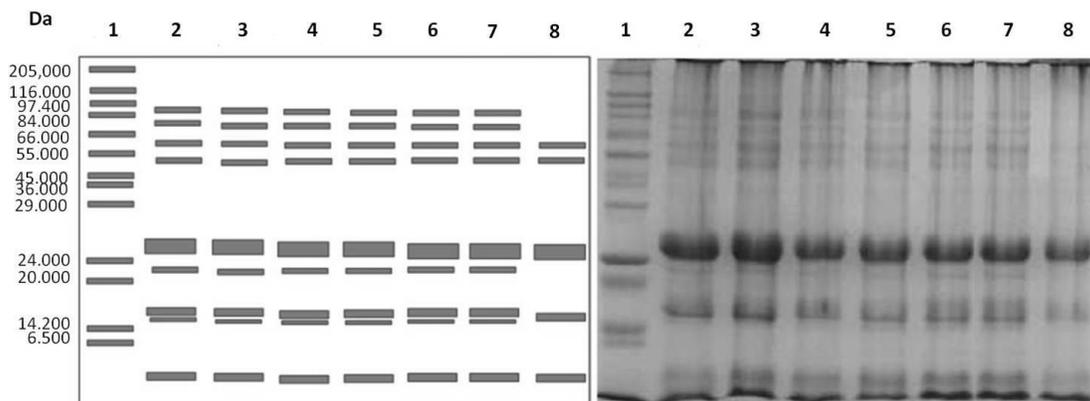


Figura 2. Perfil electroforético de la fracción de prolaminas del endospermo de variedades venezolanas de arroz (SDS-PAGE en gradiente discontinuo del 12 al 16.5 %). 1.- Marcador de Peso Molecular (SigmaMarker M4038). 2.- Venezuela 21. 3.- Araure. 4.-Cimarrón. 5.-Centauro 6.- D-Sativa. 7.- Arroz rojo. 8.- Arroz silvestre

El patrón electroforético de prolaminas encontrado en este trabajo consiste de 9 subunidades o bandas con un intervalo de peso molecular 93,7 kDa a 5,4 kDa. El componente mayoritario de esta fracción proteica corresponde

a una ó varias cadenas polipeptídicas con peso molecular aproximado de 33,2 kDa que puede ser evidenciado por la intensidad de la banda en el análisis electroforético presentado. Así mismo, se observan proteínas de bajo peso molecular entre

18 y 14 kDa, resultados similares a los indicados por otros investigadores en otras variedades de arroz (Kim et al., 2013; Nogueira et al., 2013). Otro aspecto importante a señalar son las proteínas menores a 6 kDa detectadas en este estudio (Figura 2), que corresponde a uno de los pesos moleculares más bajos reportados por este tipo de proteínas en estos cereales (Van Der Borgh et al., 2006; Chandi y Sogi 2007; Oszvald et al., 2014).

La similitud encontrada en el perfil electroforético de las prolaminas pudiera ser utilizada para diferenciar variedades comerciales de arroz venezolanas de otros cereales, ya que el patrón difiere entre cereales. En este sentido, Kim y Okita (1988) sugieren que no existe homología significativa de estas proteínas en otros cereales, por lo que deben haber diferencias, en términos de perfiles electroforéticos, entre los diversos cereales (Shewry y Halford, 2002).

Otro aspecto importante en estos análisis es que la especie silvestre mostró un patrón de bandas diferente, en términos de ausencia de bandas en comparación con las variedades comerciales, lo que concuerda con lo reportado por Nogueira et al. (2013). Las diferencias radican principalmente en la ausencia de las subunidades de mayor peso molecular en esta fracción (93,7 y 80,4 kDa), así como las de 17,2 y 5,4 kDa. Esta información pudiera ser utilizada para detectar mezclas entre variedades comerciales y arroz silvestre, ya que el patrón electroforético no correspondería a las establecidas individualmente para cada una de ellas. En este estudio no se encontraron diferencias entre el patrón electroforético de las variedades comerciales y el arroz rojo, tal como ha sido señalado en otras investigaciones (Nogueira et al., 2013), ya que todos ellos pertenecen a la especie *O. sativa*.

Las glutelinas constituyeron la fracción de mayor cuantía determinadas en este estudio, y se encontraron dos patrones electroforéticos para esta fracción: el primero, lo presentaron las variedades Venezuela 21, Araure y D-Sativa, el mismo estuvo constituido por un total de 13 bandas con un intervalo de peso molecular de 109,1 a 13,7 kDa. Al respecto, Chandi y Sogi (2007), reportan glutelinas en variedades de arroz con pesos moleculares entre 22 y 88 kDa aproximadamente, siendo las subunidades mayoritarias de 70,04 y 22,28 kDa; mientras que en este trabajo, la

subunidad mayoritaria correspondió a la banda en la zona de 48,3 kDa, según lo evidenciado en la Figura 3, donde se observa que la variedad Venezuela 21 presentó 9 de las 13 bandas detectadas en el análisis. En esta variedad no se observan las subunidades de menor peso molecular (14,8 y 13,7 kDa) así como las subunidades de 19,9 y 18,5 kDa, que únicamente estuvieron presentes en las variedades D-Sativa y Araure respectivamente. El segundo patrón característico en la fracción de glutelinas lo presentaron las variedades Cimarrón y Centauro, esta última puede ser diferenciada por presentar la subunidad con el menor peso molecular (13,7 kDa) y la ausencia de bandas en la zona correspondiente a los 109,1 kDa hasta los 60,4 kDa.

En lo que respecta a las similitudes encontradas en esta fracción entre las diferentes variedades analizadas, se puede decir que existen subunidades que se encuentran presentes en todas ellas, un ejemplo de esto, es el doblete con peso molecular asociado de 24,8 y 23,1 kDa y una subunidad de 48,389 kDa, que constituye el componente mayoritario en todas las variedades (Figura 3). A pesar de las similitudes encontradas en esta fracción, las variedades analizadas en este estudio mostraron patrones de bandas diferentes lo que sugiere que esta fracción puede ser utilizada para la identificación de variedades comerciales de arroz. Estas diferencias pueden ser atribuidas a que esta fracción proteica es la mayoritaria en los granos de arroz (cerca del 80 %), y es en ella donde existe mayor cantidad de proteínas que muestran alta heterogeneidad en pesos moleculares y puntos isoeléctricos (Kagawa et al., 1988; Kim et al., 2013; Nogueira et al., 2013).

El dendograma que se muestra en la Figura 4, indica que con el perfil proteico de las proteínas del endospermo de las variedades estudiadas se pueden distinguir entre ellas, el arroz silvestre y AR. Esta respuesta concuerda con lo descrito por Aiswariya y Thomas (2016), al caracterizar cinco variedades de arroz de la India, utilizando caracteres morfológicos referenciales y perfiles proteicos del grano. Las diferencias encontradas en este estudio pudieran estar relacionadas al hecho de que la principal función de las proteínas de reserva es servir de fuente de amino ácidos, de carbono o nitrógeno, al embrión en desarrollo, por lo que desde el punto de vista funcional no

parecen tener tantas restricciones, lo que permite que exista polimorfismo a pesar de la existencia

de una estrecha base genética entre las variedades comerciales.

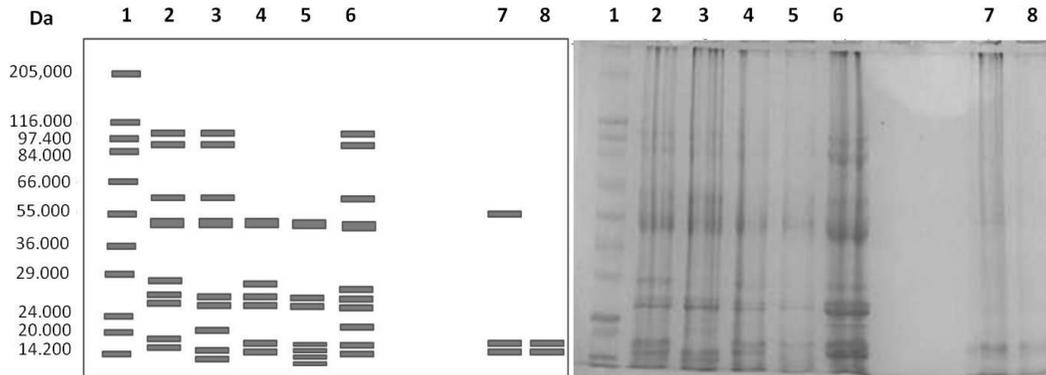


Figura 3. Perfil electroforético de la fracción de glutelinas del endospermo de variedades venezolanas de arroz (SDS-PAGE en gradiente discontinuo del 12 al 16.5 %). 1.- Marcador de Peso Molecular (SigmaMarker M4038). 2.- Venezuela 21. 3.- Araure. 4.- Cimarrón. 5.-Centauro 6.- D-Sativa. 7.- Arroz rojo. 8.- Arroz silvestre

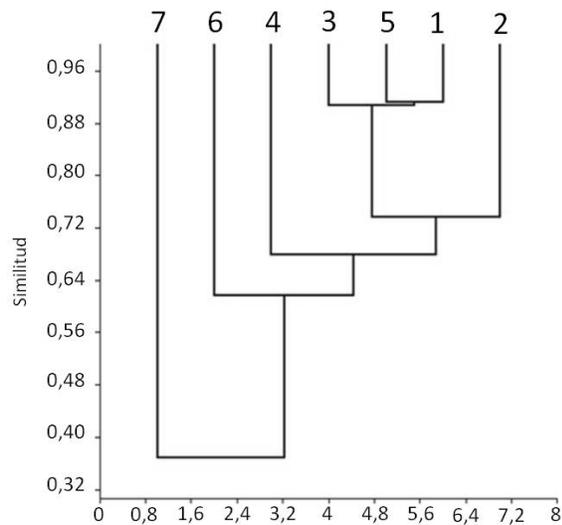


Figura 4. Dendrograma con información de todas las fracciones proteicas. 1.- Venezuela 21. 2.- Araure. 3.- Cimarrón. 4.- Centauro 5.- D-Sativa. 6.- Arroz rojo. 7.- Arroz silvestre

Finalmente, la información suministrada en este estudio concuerda con lo reportado por otros autores (Kumamaru et al., 1988; Chen y Chen, 1989; Nogueira et al., 2013) quienes plantean que los perfiles electroforéticos de las proteínas de la semilla o del endospermo pueden utilizarse para establecer diferencias entre cultivares, así como del arroz rojo y del silvestre. Es por esto que se recomienda realizar este tipo de trabajo a todas las

variedades comerciales presentes en el país, así como, al complejo de Arroz rojo y arroz silvestre presente en los estados productivos de Venezuela.

CONCLUSIONES

Las variedades Araure, Centauro y D-Sativa pueden ser diferenciadas por análisis electroforético utilizando la fracción de albúminas/globulinas de las proteínas del endospermo. Sin embargo, esta fracción no permitió discriminar por esta técnica entre las variedades Venezuela 21 y Cimarrón.

En la fracción de prolaminas no se encontraron diferencias en el patrón de bandas en las variedades de *O. sativa* estudiadas, pero si es posible identificar la especie silvestre de este cereal

Con el patrón de bandas de la fracción de glutelinas fue posible detectar un perfil polipeptídico único para cada tipo de semilla estudiada, es decir, cada patrón fue diferente (en términos de presencia y ausencia de bandas) en todas las variedades analizadas.

AGRADECIMIENTO

A la Dra. Iris Pérez (INIA-Maracay) por la donación de las semillas de las cinco variedades de *Oryza sativa* y a la Dra. Aida Ortiz (Facultad

de Agronomía, UCV) por la donación de las semillas de arroz rojo y arroz silvestre.

Este trabajo fue subvencionado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH-UC), según oficio N° CDCH 023-2012.

LITERATURA CITADA

1. Abayomi, P., O. Ayobamitale, H. Yusuke, O. Tomohisa y K. Muramoto. 2009. Isolation and characterization of protein fractions from deoiled rice bran. *Eur. Food Res. Technol.* 228: 391-401.
2. Abe, T., R. Sadimantara, G. Ono. y T. Sasahara. 1996. Variation in glutelin and high molecular weight endosperm proteins among subspecies of rice (*Oryza sativa* L.) detected by two dimensional gel electrophoresis. *Genes Genet Syst.* 71: 63-68.
3. Acevedo, M., E. Torres, O. Moreno, R. Alvarez, O. Torres, W. Castrillo et al. 2007. Base genética de los cultivares de riego liberados en Venezuela. *Agronomía Trop.* 57(3): 197-204.
4. Aiswariya, K. y G. Thomas. 2016. Characterization of five rice varieties using morphological traits and seed storage protein profiling. *South Indian J Biol Sci* 2(1): 152-161.
5. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochemistry* 72: 248-254.
6. Cao, X., H. Wen, C. Li. y Z. Gu. 2009. Differences in functional properties and biochemical characteristics of congenetic rice proteins. *Journal of Cereal Science* 50: 184-189.
7. Chandi, G. y D. Sogi. 2007. Biochemical characterization of rice protein fractions. *International Journal of Food Science and Technology* 42: 1357-1362.
8. Chen, L. y C. Chen. 1989. Inheritance of two endosperm proteins loci in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 78: 788-792.
9. Chen, Y., Y. Chen, Ch. Wu, Ch. Yu. y H. Liao. 2010. Prolamin, a rice protein, augments anti-leukaemia immune response. *Journal of Cereal Science* 51: 189-197.
10. Fauteux, F. y M. Strömviik. 2009. Seed storage protein gene promoters contain conserved DNA motifs in Brassicaceae, Fabaceae, Poaceae. *BMC Plant Biology* 9:126-136.
11. Habino, T., K. Kidzu, T. Masumura, K. Ohtsuki, K. Tanaka, M. Kawabata. y S. Fujii. 1989. Amino acid composition of rice prolamin polipeptides. *Agric. Biol. Chem.* 53(2): 513-518.
12. Hoai, T., T. Kumamaru y H. Satoh. 2008. Variation of seed storage prolamin from North Vietnam local rice cultivars. *Rice Genetics Newsletter* 24: 65-67.
13. Huebner, F., J. Bietz, B. Webb. y B. Juliano. 1990. Rice Cultivar Identification by High-Performance Liquid Chromatography of Endosperm Proteins. *Cereal Chem.* 67(2): 129-135.
14. Ju-Young, L. y L. Jinkyu. 2015. Development of protein biomarkers for the authentication of organic rice. *Appl. Biol. Chem.* 58(4): 355-361.
15. Kagawa, H., H. Hirano y F. Kikuchi. 1988. Variation of glutelina seed storage protein in rice (*Oryza, sativa* L.). *Japan. J. Breed.* 38: 327-332.
16. Kim, J., B. Kim, J. Lee, D. Lee, S. Rehman y S. Yun. 2013. Protein content and composition of waxy rice grains. *Pak. J. Bot.* 45(1): 151-156.
17. Kim, S., Y. Wang, S. Kang, S. Kim, R. Rakwal, Y. Kim y K. Kang. 2009. Developing rice embryo proteomics reveals essential role for embryonic proteins in regulation of seed germination. *Journal of Proteome Research* 8: 3598-3605.
18. Kim, W. y T. Okita. 1988. Nucleotide and primary sequence of major rice prolamine. *FEBS Lett* 231: 308-310.
19. Krishnan, H. y J. White. 1995. Morphometric analysis of rice seed proteins bodies. *Plant Physiol* 109: 1491-1495.
20. Kumamaru, T., H. Satoh, N. Iwata, T. Omura, M. Ogawa. y K. Tanaka. 1988. Mutants for rice storage proteins. Screening of mutants semidwarfism-related proteins and glutelina seed proteins in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet* 83: 153-158.
21. Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

- bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
22. Martínez, A., E. Ventura, U. Maldonado, M. Sanchez, C. Bazaldua. y A. Villar. 2005. Caracterización de las proteínas de reserva y cultivo de anteras para el desarrollo de genotipos de arroz de alta calidad nutricional. *Biotecnología Aplicada* 22: 37-40.
23. Montoya, M., N. Rodríguez, I. Pérez-Almeida. y C. Marín. 2008. Identificación de descriptores morfológicos relevantes para la distinción de variedades y líneas élites de arroz venezolano con fines de protección intelectual. *Agronomía Trop.* 58(3): 223-232.
24. Nogueira, K., R. Días, C. Garcia y C. Brondani. 2013. Storage protein profile and amino acid content in wild rice *Oryza glumaepatula*. *Pesq. Agropec. Bra.* 48(1): 66-72.
25. Onda, Y., T. Kumamaru y Y. Kawagoe. 2009. ER membrane-localized oxidoreductase Ero1 is required for disulfide bond formation in the rice endosperm. *PNAS* 106(33): 161-167.
26. Oszvald, M., L. Tamas, P. Shewry y P. Tosi. 2014. The trafficking pathway of a wheat storage protein in transgenic rice endosperm. *Annals of Botany* 113: 807– 815.
27. Perdomo, M., E. Arnao, C. Ramis, I. Faria y I. Pérez. 2006. Avances en la obtención de huellas moleculares en genotipos de arroz mediante isoenzimas con fines de propiedad intelectual. *Agronomía Trop.* 56(4): 549-554.
28. Pérez-Almeida, I., E. Torres, L. Angulo. y M. Acevedo. 2011. Diversidad genética entre cultivares de arroz de Venezuela con base a la estimación del coeficiente de parentesco y análisis con marcadores moleculares microsatélites (SSR). *Interciencia* 36(7): 545-551.
29. Ren, Y., Y. Wang, F. Liu, K. Zhou, Y. Ding, F. Zhou, et al. 2014. Glutelin precursor accumulation encodes a regulator of post-golgi vesicular traffic essential for vacuolar protein sorting in rice endosperm. *The Plant Cell* 26: 410-425.
30. Reyes, F., T. Chung, D. Holding, R. Jung, R. Vierstra y M. Oteguia. 2011. Delivery of prolamins to the protein storage vacuole in maize aleurone cells. *The Plant Cell* 23: 769-784.
31. Rubin, R., H. Levanony. y G. Galili. 1992. Evidence for the presence of two different types of protein bodies in wheat endosperm. *Plant Physiol* 99: 718-724.
32. Ruiz, G. 2009. Proteínas de la harina de trigo: clasificación y propiedades funcionales. *Temas de Ciencia y Tecnología* 13(38): 27-32.
33. Shewry, P. y N. Halford. 2002. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany* 53: 947-958.
34. Shyur, L., T. Wen y C. Chen. 1994. Purification y characterization of rice prolamins. *Bot. Bull Acad. Sin* 35: 65-71.
35. Tripathy, S., B. Mohapatra, P. Nayak, S. Pal, N. Senapati, G. Dash, D. Lenka, D. Swain. y R. Ranjan. 2015. Revealing genetic variation in upland rice using seed storage protein profiling. *Research Crops* 6 (2):320- 331
36. Van der Borght, A., G. Vandeputte., V. Derycke, K. Brijs, G. Daenen. y J. Delcour. 2006. Extractability and chromatographic separation of rice endosperm proteins. *Journal of Cereal Science* 44: 68-74.
37. Vitale, A. y A. Ceriotti. 2004. Protein quality control mechanisms and protein storage in the endoplasmic reticulum. A conflict of interests? *Plant Physiol.* 136: 3420-3426.
38. Vithyashini, L. y H. Wickramasinghe. 2015. Genetic diversity of seed storage proteins of rice (*Oryza sativa* L.) varieties in Sri Lanka. *Tropical Agricultural Research* 27(1): 49- 58.
39. Yamagata, H., T. Sugimoto, K. Tanaka. y Z. Kasai. 1982. Biosynthesis of storage proteins in developing rice seeds. *Plant Physiol.* 70: 1094-1100.
40. Young, V. y P. Pellett. 2010. Wheat proteins in relation to protein requirements and availability of amino acids. *The American Journal of Clinical Nutrition* 41: 1077-1090.
41. Zhou, S., L. Yin y H. Xue. 2013. Functional genomics based understanding of rice endosperm development. *Current Opinion in Plant Biology* 16: 236-246.