



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE TRANSCRIPTOS ASOCIADOS A LA
ANDROESTERILIDAD INDUCIDA POR IMIDAZOLINONAS EN GIRASOL
RESISTENTE**

NICOLÁS LOSTE
Ingeniero Agrónomo

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER EN GENÉTICA VEGETAL

DIRECTORA: Dra. Ana Claudia Ochogavía
CO-DIRECTORA: Dra. Silvana Andrea Felitti

AÑO 2020

**EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE TRANSCRIPTOS ASOCIADOS A LA
ANDROESTERILIDAD INDUCIDA POR IMIDAZOLINONAS EN GIRASOL
RESISTENTE**

NICOLÁS LOSTE

Ingeniero Agrónomo – Universidad Nacional de Córdoba

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Magister en Genética Vegetal, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Investigaciones y en la sección Horticultura del Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario, durante el período comprendido entre el 1 de enero de 2019 al 30 de junio de 2020, bajo la dirección de la Dra. Ana Claudia Ochogavía y la codirección de la Dra. Silvina Andrea Felitti.

Nombre y firma del Maestrando: **NICOLÁS LOSTE**.....

Nombre y firma de la Directora: **ANA C. OCHOGAVÍA**.....

Nombre y firma de la Co-Directora: **SILVINA A. FELITTI**.....

Defendida:de 2020.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana C. Ochogavía por ser la directora de mi tesis de magister, por darme su apoyo a través de sus conocimientos, dedicación y tiempo.

A mi co-directora, la Dra. Silvina A. Felitti por brindarme su sostén y saberes, principalmente en su área de aplicación.

Al resto del equipo de trabajo de mejoramiento en girasol, Agustín, Liliana, Germán, Marta y Graciela, por su paciencia, tiempo invertido, intelecto y experiencia.

A los compañeros becarios, en especial a Florencia Pozzi, Agustina Fortuni, Florencia Moresco y Mara Depetris. Quienes colaboraron para la ejecución de mi trabajo y me dieron un espacio.

Y en particular, a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario por permitirme utilizar sus equipamientos de última generación y específicamente a la comisión asesora del Magister de Genética Vegetal, por cederme una beca completa que me permitió continuar con mis estudios de posgrado y aplicar para obtener mi título de Magister.

DEDICATORIAS

Mi tesis se la quiero dedicar a mis padres que fueron, son y serán mi mayor pilar. Quienes me sustentaron apostando siempre a mi futuro y resignando muchas cosas con el fin de verme crecer como persona y profesional.

A mis seres queridos que ya no están de forma física conmigo, pero sé que me acompañaron siempre y lo seguirán haciendo.

Al resto de mi familia que siempre está, que con sus palabras de aliento me ayudaron a cumplir mis objetivos y desarrollar mis capacidades.

A todos mis amigos y compañeros del ayer y hoy, que sin dudas nunca me dejaron decaer ante ninguna situación y me apoyaron en mis momentos más difíciles.

Loste Nicolás

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

Los resultados que se describen en el presente trabajo de Tesis han sido publicados en la siguiente revista y reuniones científicas:

Trabajos completos

Loste, N.; Nestares, G.M.; Felitti, S.A.; Ochogavía, A.C. (2021) Gene expression profiling by cDNA-AFLP reveals potential candidate genes for imazapyr-induced male sterility in sunflower. *Crop Science* (en prensa).

Presentaciones a reuniones científicas

Loste, N.; Menendez, A.; Zuzul, G.; Bianchi, M.B.; Picardi, L.; Nestares, G.M.; Ochogavía, A.C. "Androesterilidad inducida por la aplicación de Imidazolinonas en estadios reproductivos tempranos de girasol resistente". VII Congreso de Argentino de Girasol – ASAGIR. Buenos Aires, Argentina 2 de Julio de 2019.

Bianchi, M.B.; Loste, N.; Menéndez, A.; Zuzul, G.; Nestares, G.M.; Ochogavía, A.C. "Embriogénesis somática espontánea en *Helianthus annuus* L.: Caracterización de estructuras celulares mediante microscopía y estudios de expresión génica". XXXVIII Jornada Argentina de Botánica. Tucumán, Argentina 26 de agosto de 2019.

Loste, N.; Felitti, S.A.; Nestares, G.M.; Ochogavía, A.C. "Differential expressed transcripts associated to chemical-induced male sterility by imidazolinone herbicide treatment in Imisun sunflower". XV Congreso Latinoamericano de Genética, XLI Congreso Argentino de Genética–ALAG 2019. Mendoza, Argentina 6 al 9 de octubre del 2019.

Loste, N.; Menéndez, A.; Zuzul, G.; Bianchi, M.B.; Nestares, G.M.; Ochogavía, A.C. "Comparación de la exomorfología del polen entre plantas tratadas con imazapir y control de girasol resistente". IV Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina. Modalidad virtual, 9 al 15 de septiembre del 2020.

Loste, N.; Nestares, G.M.; Felitti, S.A.; Ochogavía, A.C. "Identificación de transcritos asociados a la androesterilidad inducida por imazapir en girasol". XLVIII Congreso Argentino de Genética. Modalidad virtual, 24 al 26 de septiembre de 2020.

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	7
RESUMEN	9
SUMMARY	11
1 INTRODUCCIÓN	12
1.1 El girasol	12
1.2 La enzima clave	13
1.3 La androesterilidad en girasol	14
1.4 Antecedentes de estudios relacionados	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo general.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3 MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1 Material vegetal	19
3.2 Diseño Experimental	19
3.3 Estudio de la fisiología del polen.....	20
3.3.1 Recuento de número de granos de polen por flor.....	20
3.3.2 Análisis de la exomorfología del polen	20
3.3.3 Viabilidad del polen.....	21
3.4 Análisis del tejido esporogénico por Microscopía de Contraste Interdiferencial	21
3.5 Recuento de semillas viables	22
3.6 Análisis transcriptómico por cDNA-AFLP	22
3.6.1 Extracción de ARN	22
3.6.2 Técnica cDNA-AFLP.....	23
3.7 Selección y extracción de bandas de interés	28
3.8 Asignación de identidad de transcritos y análisis bioinformático de secuencias	29
3.9 RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)	30
4 RESULTADOS	32
4.1 Efectos del tratamiento sobre la fisiología del polen.....	33
4.1.1 Recuento de número de granos de polen por flor.....	33
4.1.2 Análisis de la exomorfología del polen	34
4.1.3 Viabilidad del polen.....	35
4.2 Análisis del tejido esporogénico.....	36

4.3	Recuento de semillas viables	37
4.4	Identificación de fragmentos derivados de transcritos (TDF) por cDNA-AFLP	38
4.5	Análisis bioinformático.....	41
4.6	RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)	47
5	DISCUSIÓN	49
6	CONCLUSIÓN.....	58
7	CONSIDERACIONES Y PERSPECTIVAS	59
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXO		65
	Anexo I.....	65

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AFLP: “Amplified Fragment Length Polymorphism”. Polimorfismos en longitud de los fragmentos amplificados.

AHAS: Enzima acetohidroxiácido sintasa.

BLAST: “Basic Local Alignment Search Tool”. Programa de búsqueda de secuencias en bases de datos en función de similitud de secuencias.

cDNA: Ácido desoxirribonucleico copia (ADNc obtenido de ARN mensajero).

cDNA-AFLP: “cDNA Amplified Fragment Length Polymorphism”. Polimorfismos en el largo de los fragmentos amplificados a partir de ADN copia.

CIMS: “Chemically induced male sterility”. Esterilidad masculina inducida químicamente.

CMS: “Cytoplasmic male sterility”. Esterilidad masculina citoplasmática.

csp: Cantidad suficiente para.

DETDFs: “Differential Expressed Transcript Derived Fragments”. Fragmentos derivados de transcritos de expresión diferencial.

DIC: Microscopía de Contraste Interdiferencial.

DNase: Endonucleasa de degradación de ADN.

dNTP: Desoxirribonucleótidos trifosfato.

dpt: Días posteriores al tratamiento.

dsDNA: “Double strand DNA”. Ácido desoxirribonucleico doble hebra.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

es: Espinas.

GPF: Granos de polen por flor.

IMI: Imidazolinonas.

MEB: Microscopía electrónica de barrido.

mRNA: “Messenger RNA”. Ácido ribonucleico mensajero.

NIL: “Near isogenic lines”. Líneas casi isogénicas.

nr: No redundante.

NTSR: Mecanismos de resistencia no asociados al sitio activo de la enzima AHAS.

oe: Objetivo específico.

po: Poros.

preps: Preparados.

PSA: Persulfato de Amonio.

p/v: Peso en volumen.

qRT-PCR: PCR cuantitativa en tiempo real.

ARN: Ácido ribonucleico.

RT: Retrotranscripción.

STEX: Solución estabilizante específica para el aislamiento de ARN mensajero biotinilado.

SUR: Receptor de sulfonilurea.

TDF: “Transcript Derived Fragments”. Fragmentos derivados de transcritos.

TE: Solución estabilizadora TRIS-EDTA pH= 8.

TRIS: Sal de tris (hidroximetil) aminometano.

TRITON X-100: Detergente no iónico.

USDA: “United States Department of Agriculture”. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.

Vf: Volumen final.

v/v: Volumen en volumen.

RESUMEN

El cultivo de girasol (*Helianthus annuus* L.) de origen norteamericano, es el segundo cultivo oleaginoso en importancia de la Argentina. El mejoramiento genético asociado a la implementación de tecnologías de producción constituye un factor crítico para la optimización de la productividad y competitividad de los cultivos. La producción de semillas híbridas a nivel mundial se basa casi exclusivamente en el uso de un único sistema de androesterilidad conocido como CMS PET1, lo que conlleva una alta vulnerabilidad genética. Es por esto que resulta sumamente necesario contar con nuevos sistemas de producción de híbridos en girasol.

Se ha propuesto un nuevo método para inducir androesterilidad a través del tratamiento con imidazolinonas (herbicidas pertenecientes al grupo de inhibidores de la enzima acetohidroxiácido sintasa, AHAS) en estadios reproductivos tempranos en aquellas plantas que portan alelos de resistencia para esta familia de herbicidas. Este método de generación de androesterilidad podría ser aplicado a cualquier tipo de germoplasma para la obtención de híbridos, otorgando así una amplia flexibilidad a los esquemas de mejoramiento genético. No obstante, los mecanismos subyacentes implicados en la inducción de la esterilidad por medio de este tratamiento no han sido estudiados.

Este trabajo tuvo como objetivo la caracterización molecular de un nuevo método de generación de androesterilidad por medio del tratamiento con imidazolinonas de líneas resistentes. Por un lado, se realizó un análisis de la fisiología y anatomía del polen y semillas en plantas tratadas con 160 gr i.a. ha⁻¹ de imazapir y plantas control en dos genotipos de girasol que difieren en el nivel de resistencia a imidazolinonas: completamente resistente (R, *Imr1Imr1Imr2Imr2*) y de resistencia intermedia (I, *Imr1Imr1imr2imr2*). Por otro, se estudiaron los transcritos diferencialmente expresados entre dichas plantas.

Se analizaron los parámetros fisiológicos del polen, de semillas y el desarrollo del tejido esporogénico por microscopía de contraste interdiferencial. El número de granos de polen por flor en ambos genotipos denotó una reducción significativa en plantas tratadas con respecto al control, siendo para el genotipo R: 444 ± 156 y 21.806 ± 607 granos de polen por flor, mientras que para I 1.344 ± 357 y 18.754 ± 969 granos. Mediante el estudio de la exomorfología del polen no se detectaron diferencias significativas en cuanto al número de espinas entre plantas tratadas y control, aunque se evidenciaron diferencias en el diámetro del poro únicamente para el genotipo de resistencia intermedia. Los porcentajes de números de granos viables en plantas control

(89,3%) superaron significativamente el porcentaje detectado en plantas tratadas (69,3%) en el genotipo R como en el genotipo I, 90% y 68,4% respectivamente. La cantidad de semillas viables se correspondió con la producción de polen, reduciéndose a valores mínimos en plantas tratadas tanto para el genotipo R (8,2%) como para el I (12,5%), dando diferencias altamente significativas respecto a los controles (p -valor $<0,01$). A nivel de tejido esporogénico se observaron alteraciones en el desarrollo del polen en ambos genotipos tratados, donde se visualizaron grandes espacios vacíos y en ocasiones completa ausencia de microsporas.

La caracterización transcriptómica se abordó mediante la extracción de ARN e identificación por cDNA-AFLP de transcriptos diferencialmente expresados entre plantas tratadas y control. Se obtuvieron 948 fragmentos derivados de transcriptos, de los cuales 617 fueron categorizados en dos grupos principales: inducidos y suprimidos por el tratamiento; y cada uno subdividido en etapa temprana y tardía respecto al desarrollo del tejido esporogénico. Además, se lograron aislar y secuenciar 73 fragmentos de expresión diferencial, los cuales fueron comparados con secuencias conocidas en bases de datos públicas. Evitando redundancias se realizaron agrupamientos, obteniendo 11 contigs y 31 singletons, constituyendo así 42 secuencias únicas. Los transcriptos pudieron ser agrupados según sus funciones biológicas en 14 grupos, siendo los más representados: traducción, fosforilación de proteínas, procesamiento de xenobióticos, vías de señalización intracelular, proteínas de transporte transmembrana y proteínas de respuesta celular a estímulos. En menor proporción se identificaron proteínas de unión a ADN, actividad endopeptidasa, proteínas de óxido reducción, proteínas de almacenamiento, envoltura y motilidad celular (ELMO), y proteínas involucradas en procesos redox. Los transcriptos simultáneamente inducidos y suprimidos por el tratamiento en ambos genotipos resultaron particularmente interesantes ya que formarían parte del mecanismo de inducción de androesterilidad propiamente dicho. Por otro lado, diez de las 42 secuencias únicas no presentaron homologías con las bases de datos. En base a estos resultados hemos planteado un posible mecanismo del efecto gametocida del imazapir.

Los resultados presentados contribuyen en el corto plazo a ampliar la frontera del conocimiento respecto a esta nueva herramienta para la generación de híbridos y en el mediano plazo a la optimización de los esquemas de mejoramiento del cultivo girasol.

Palabras claves: Androesterilidad inducida, resistencia a imidazolinonas, AHAS, expresión diferencial, *Helianthus annuus*.

SUMMARY

DIFFERENTIAL EXPRESSION OF TRANSCRIPTS ASSOCIATED WITH ANDROESTERILITY INDUCED BY IMIDAZOLINONES IN RESISTANT SUNFLOWER

Chemically induced male sterility (CIMS) is a valuable tool for hybrid breeding in crops. In this context, the acetohydroxyacid synthase (AHAS) inhibiting imazapyr has been proposed to induce male sterility in Imisun sunflower (*Helianthus annuus* L.) when applied during early reproductive development in a two-fold higher than recommended field dose. This study aimed to perform a comparative morphological and transcriptomic analysis to find out the molecular bases of the gametocidal effect of imazapyr on two Imisun genotypes differing in their herbicide resistance level: completely resistant (R, *Imr1Imr1Imr2Imr2*) and intermediate resistant (I, *Imr1Imr1imr2imr2*). The CIMS of treated plants was confirmed at physiological and anatomical levels. Alterations were observed when analyzing the physiological parameters of pollen, seeds and the development of sporogenic tissue by means of interdifferential contrast microscopy. A total of 948 differentially expressed transcript-derived fragments (TDFs) were identified by complementary DNA amplified fragment-length polymorphism (cDNA-AFLP) analysis at the three most informative developmental stages of anther development. Several genes related to xenobiotic metabolism and stress, including cytochrome P450 monooxygenases and ATP-binding cassette transporters, and protein phosphorylation were the main genes identified in resistant genotype. Meanwhile, Ran/Arf small GTPases, protein transmembrane transport and transduction were the most representative groups in the intermediate genotype. Based on the results, we present a probable model of action for the gametocidal effect of imazapyr. Our research provides new insights into the molecular mechanisms of male sterility induction in sunflower.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 El girasol

El cultivo de girasol (*Helianthus annuus* L.) es de origen norteamericano, pertenece a la familia Asteráceas y su género comprende especies herbáceas anuales y perennes. Es el segundo cultivo oleaginoso en importancia de la Argentina, siendo tercer productor mundial la semilla es usada como recurso aceite vegetal comestible, descascarada, tostada o cruda, sola o acompañando otra comida (Miller, 1987).

La inflorescencia es denominada capítulo y está compuesta por 700 a 3000 flores que comparten un receptáculo. Alrededor de su circunferencia se encuentran las flores liguladas que no presentan estambres o pistilos. Las restantes son flores tubuladas dispuestas concéntricamente, completas, con ovario inferior, dos sépalos modificados, una corola con cinco pétalos unidos, cinco anteras con cuatro tecas cada una, unidas formando un tubo con filamentos separados y un estilo que termina en un estigma dividido en dos lóbulos (Scheniter y Miller, 1981; Miller, 1987).

A diferencia de poblaciones silvestres o cultivares de polinización abierta, los híbridos de girasol a menudo poseen altos niveles de autocompatibilidad, lo que contribuye a mejorar rendimientos sobre cultivares de polinización abierta en áreas donde hay bajo nivel de polinizadores (Miller, 1987). De tal manera, la falta de agentes polinizadores no es una limitante en la producción, ya que el superávit de nutrientes se divide entre un menor número de cápsidas logrados, equiparando rendimientos con plantas polinizadas entomófilamente (Deballi y Vitale, 2015).

El mejoramiento genético asociado a la implementación de tecnologías de producción constituye un factor crítico para la optimización de la productividad y competitividad de los cultivos. Los programas de mejoramiento genético modernos que tuvieron sus comienzos en la década del 60 han descubierto que las especies silvestres constituyen recursos de suma importancia para introducir y estabilizar diferentes caracteres agronómicos en cultivares (Vear, 2011). En este sentido, el descubrimiento de la esterilidad masculina citoplasmática (CMS) en Francia por Leclercq (1969) representó un importante avance para el desarrollo de híbridos. La esterilidad encontrada fue resultado de cruzar *Helianthus petiolaris* Nutt. y *Helianthus annuus* L. La progenie resultante fue cruzada con plantas fértiles y también dio progenie estéril, lo cual

determinó la estabilidad de la CMS en girasol (Leclercq, 1969). Del mismo modo, el hallazgo de una fuente de resistencia natural a imidazolinonas en Kansas ha permitido el desarrollo de la tecnología Clearfield (Al-Khatib *et al.*, 1998), actualmente la principal herramienta aplicada al control de malezas en este cultivo.

1.2 La enzima clave

La enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS, EC 2.2.1.6), también denominada acetolactato sintasa (ALS), participa en la vía de síntesis de aminoácidos ramificados: valina, leucina e isoleucina. Esta enzima es el sitio de acción de diferentes clases de herbicidas pertenecientes al grupo B, conocidos colectivamente como inhibidores de AHAS: sulfonilureas, imidazolinonas, triazolpirimidinas, piridimidiniloxybenzoatos y sulfonilaminocarbonil-triazolinonas (Tranel y Wright, 2002; Tan *et al.*, 2005). Las imidazolinonas permiten el control de un amplio espectro de malezas y son efectivas a bajas dosis. El girasol es sensible a todos los herbicidas inhibidores de AHAS, sin embargo, en la actualidad se dispone de fuentes de resistencia natural, así como generada por mutagénesis.

En todos los casos, la resistencia es conferida por mutaciones puntuales en el gen *ahas1*, codificante de la subunidad catalítica uno, que generan cambios conformacionales en el sitio de unión al herbicida, lo que impide que las moléculas del herbicida actúen sobre la enzima (McCourt, 2006; Sala *et al.*, 2008). La primera fuente de resistencia fue descubierta a partir de girasoles silvestres resistentes a herbicidas inhibidores de ALS presentes en cultivos de soja en Kansas (EEUU), que fueron aplicados por siete años consecutivos con estos productos (Al-Khatib *et al.*, 1998). En la actualidad son conocidas las variantes del gen *ahas1* presente en el biotipo silvestre, *ahas1-1* (previamente *Imr1* o *Arpur*) de resistencia intermedia a imidazolinonas y comercialmente tecnología Clearfield®, *ahas1-2* (previamente *Arkan*) con total susceptibilidad a imidazolinonas, pero resistencia a sulfonilureas y *ahas1-3* (gen que confiere la tecnología ClearfieldPlus®) de completa resistencia a imidazolinonas (Kolkman, 2004; Sala *et al.*, 2008). Incluso hay una cuarta variante conocida como *ahas1-4*, propuesta por Sala y Bulos (2012a), de resistencia a metsulfurón e imazapir.

Los genotipos Imisun, o denominados comercialmente Clearfield®, presentan resistencia a imidazolinonas basada en un modelo digénico. Contienen un gen principal *Imr1* (*ahas1-1*), resultado de una mutación puntual de Ala205 en el gen *ahas1* y un gen modificador *Imr2* que incrementa la expresión del carácter y puede o no estar presente. Si bien todavía se desconoce, el gen modificador se ha asociado a mecanismos de resistencia del sitio no objetivo (NTSR) y

relacionado con el metabolismo de xenobióticos y la respuesta al estrés (Manabe *et al.*, 2007; Breccia *et al.*, 2017; Balabanova *et al.*, 2018; Gil *et al.*, 2018). Los procesos NTSR se han relacionado previamente con diferentes familias de genes en otras especies, es decir, transportadores transmembrana de unión a ATP, citocromo P450 monooxigenasas, glutatión S transferasas, entre otros (Manabe *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2007). Algunos de estos genes han sido descubiertos recientemente como miembros de las vías de detoxificación del metabolismo de los herbicidas en *H. annuus* (Breccia *et al.*, 2017; Balabanova *et al.*, 2018; Gil *et al.*, 2018; Vega *et al.*, 2020).

1.3 La androesterilidad en girasol

La utilización de cultivares híbridos para la producción comercial de semillas ha posibilitado un incremento en la productividad de los cultivos debido al fenómeno de la heterosis, es decir la superioridad en el rendimiento de los individuos híbridos comparado con el de sus progenitores. Los mejoradores destinan esfuerzo y recursos en la obtención y evaluación de líneas progenitoras de híbridos. Existen diferentes métodos para evitar la autofecundación como la emasculación manual (Miller, 1987), procedimientos de emasculación con ácido giberélico (Kummar y Srivastava, 2009) o autoincompatibilidad por diferentes fuentes de androesterilidad como CMS (Hu *et al.*, 2014). Como la antesis del girasol ocurre durante varios días y depende del número de filas de flores tubuladas que tiene la inflorescencia, la emasculación manual requiere de la remoción de las anteras durante un largo período. Las anteras de las flores logran la madurez antes que la elongación del estigma y estilo, dicha diferencia se da en las primeras horas del día. Los estigmas emergen después de la remoción de las anteras y permanecen receptivos por cuatro a cinco días (Miller, 1987). Por otro lado, para la emasculación con ácido giberélico se aplican concentraciones de 50 a 100 ppm de dicha hormona sobre un botón floral de 1 a 1,5 cm de diámetro (Estadio R2 según escala fenológica de Schneiter y Miller, 1981) y la efectividad de este tratamiento resulta variable, dependiendo de las diferentes líneas y las condiciones ambientales durante y después del tratamiento (Miller, 1987). Dada la amplia variabilidad en la eficacia del tratamiento con ácido giberélico y la laboriosidad que requiere la emasculación manual, la metodología más utilizada es la implementación de la androesterilidad por medio del sistema génico-citoplasmático. Este sistema implica androesterilidad determinada por la interacción entre el citoplasma y un par de alelos nucleares. El citoplasma es de herencia materna y el portador de plasmagenes que pueden generar androesterilidad (S) o no (F), mientras que los

alelos nucleares en su combinación recesiva (rr) son responsables de androesterilidad y en su forma dominante (RR) codifican androfertilidad. A diferencia de la androesterilidad citoplásmica, la descendencia del cruzamiento de una planta androestéril (como femenina) y una fértil no tiene que ser necesariamente androestéril, depende del genotipo de la planta que actúa como parental masculino. Las diferentes combinaciones pueden dar genotipos conservadores (F) rr o restauradores (S) RR o (F) RR (Cornide *et al.*, 1985).

Sala y Bulos (2012b) han propuesto un nuevo método para producir androesterilidad en líneas que portan alelos de resistencia a imidazolinonas, realizando aplicaciones del herbicida en estadios vegetativos tardíos y reproductivos tempranos. El tratamiento generó esterilidad femenina y masculina en genotipos portadores de los alelos en los que se basa el desarrollo actual de híbridos resistentes *ahas/1-1* (girasoles Imisun o tecnología Clearfield®) y *ahas/1-3* (tecnología ClearfieldPlus®) (Sala y Bulos, 2012b). Si bien los autores reportaron una mayor eficacia en la inducción de androesterilidad en los genotipos homocigotas y heterocigotas portadores de la mutación *ahas/1-3*, también informaron la obtención de plantas androestériles a partir de los genotipos portadores de la mutación *ahas/1-1* tratados con imazapir (Sala y Bulos, 2012b). Ensayos recientes permitieron confirmar la inducción de androesterilidad en genotipos Imisun tratados con dosis altas de imazapir, así como la identificación de los daños iniciales generados por el herbicida en las anteras (Ochogavía *et al.* 2020). Dado que esta metodología se basa en el efecto gametocida del imazapir, su implementación requiere de la optimización de las concentraciones del herbicida y del momento de aplicación sobre los genotipos portadores de la resistencia que difieren en sus fondos genéticos. La androesterilidad inducida se propone como una importante alternativa a la implementación del sistema de androesterilidad genético-citoplásmica en el cultivo. Este nuevo método podría implementarse en las etapas tempranas de obtención de líneas otorgando flexibilidad a los esquemas de mejoramiento genético.

La evaluación de líneas progenitoras de híbridos sólo se realiza a través de la obtención de híbridos experimentales. Si bien para evitar la autofecundación existen diferentes alternativas, la evaluación de la aptitud combinatoria se basa casi exclusivamente en el uso del citoplasma CMS PET1, lo que requiere de la conversión de las líneas, demandando tiempo y recursos. Es por esto que los programas de mejoramiento apuntan a generar nuevas fuentes de androesterilidad eficientes que agilicen la producción de híbridos experimentales, siendo la androesterilidad inducida por imidazolinonas una herramienta promisoría. Sin embargo, no se conoce el mecanismo a nivel citológico o molecular por el cual las imidazolinonas alteran el desarrollo del tejido reproductivo. Ochogavía *et al.* (2018) han logrado expresar androesterilidad parcial en

genotipos de girasol de diversos niveles de resistencia tratados con imazapir en estadio R1 (Schneiter y Miller, 1981) y reportaron cambios a nivel de los tejidos reproductivos femeninos y masculinos asociados a la aplicación tardía de imidazolinonas en genotipos resistentes de girasol. En otras especies de plantas se ha reportado que la exposición prolongada a dosis subletales de sulfonilureas (herbicidas inhibidores de AHAS) provoca la inhibición específica de AHAS, lo cual genera la escasez de aminoácidos ramificados e induce la muerte celular autofágica en las anteras (Zhao *et al.*, 2015). Este tipo de muerte celular provoca el vertido del contenido citoplásmico y la degradación de las microsporas, dando en última instancia androesterilidad. Si bien en girasol el tratamiento probado implica altas dosis de imidazolinonas sobre líneas resistentes, los estudios preliminares de Ochogavía *et al.* (2018) permiten proponer un mecanismo fisiológico análogo al demostrado en las otras especies.

1.4 Antecedentes de estudios relacionados

El grupo de trabajo en el cual se desarrolló el presente proyecto cuenta con una amplia trayectoria en el estudio de la resistencia a herbicidas inhibidores de la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) en diversas especies cultivadas como girasol, trigo y sorgo (Vega *et al.*, 2009; Breccia *et al.*, 2011; Ochogavía *et al.*, 2014; Breccia *et al.*, 2018). Este trabajo de tesis forma parte de una de las líneas de investigación del grupo: el estudio de la androesterilidad inducida por imidazolinonas en genotipos de girasol resistente. En este sentido, a la fecha se ha logrado un importante avance respecto a la identificación de las bases anatómicas de la generación de androesterilidad por la aplicación en estadio reproductivo temprano de imidazolinonas en genotipos resistentes de girasol, así como también en las alteraciones de los patrones de expresión de los genes *ahas* de girasol producidas por el tratamiento (Ochogavía *et al.*, 2018; 2020). Estos resultados permitieron proponer una posible vía por la cual el herbicida alteraría el correcto desarrollo del tejido esporogénico en las anteras de plantas tratadas. En esta línea de investigación, el presente trabajo de tesis se focalizó en la identificación de los genes implicados en la androesterilidad inducida por el tratamiento con imidazolinonas en girasol resistente y la asociación de estos genes con los mecanismos moleculares del modelo propuesto. La técnica implicada en la caracterización molecular de un nuevo método de generación de androesterilidad fue cDNA-AFLP (Vuylsteke *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2009; Gil *et al.*, 2018). Esta técnica es ampliamente utilizada para la evaluación del transcriptoma y la identificación de transcritos diferencialmente expresados entre diversos tratamientos o genotipos. El procedimiento requiere

de la transcripción reversa del mRNA en una doble cadena de cDNA, seguido de una digestión de restricción, ligación de adaptadores específicos y fraccionamiento de la mezcla en pequeños subconjuntos de cDNA por amplificación selectiva. Los fragmentos resultantes son separados en geles de poliacrilamida y el patrón de bandas es visualizado en una plataforma lumínica pertinente. Esto posibilita identificar los patrones de bandas entre muestras, generando una buena medida de los niveles de expresión relativos. Dicha técnica nos permite tener resultados a bajo costo relativo y de alta especificidad en relación a otras como ADN chips o microsatélites, es un sistema abierto por lo que no es necesario información de secuencia previa y el número de nucleótidos de los cebadores para la amplificación selectiva por PCR puede ser variable (Vuylsteke *et al.*, 2007).

El presente trabajo apuntó a conocer los fundamentos moleculares de la androesterilidad inducida por imidazolinonas como posible herramienta biotecnológica para ser implementada en los sistemas de mejoramiento del cultivo de girasol. Además de investigar los transcritos implicados mediante la técnica cDNA-AFLP, se analizaron los parámetros fisiológicos del polen, número de granos por flor, exomorfología y viabilidad, como los anatómicos por microscopía contraste interdiferencial y microscopía electrónica de barrido. Otro parámetro analizado fue el número de semillas viables. Los resultados contribuyen en el corto plazo a ampliar la frontera del conocimiento respecto a esta nueva herramienta para la generación de híbridos y en el mediano a la optimización de los esquemas de mejoramiento del cultivo girasol.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Identificar los genes involucrados en el mecanismo de androesterilidad inducido por el tratamiento con dosis elevadas de imidazolinonas en estadios vegetativos tardíos en plantas de girasol que portan alelos de resistencia a dicho herbicida como estrategia tendiente a reconocer la base molecular del mencionado mecanismo y las potenciales bases fisiológicas.

Hipótesis sustantiva

La identificación de los genes involucrados en el mecanismo de androesterilidad inducido por el tratamiento con doble dosis de imidazolinonas en girasol, permitirá dilucidar las bases moleculares y fisiológicas del mecanismo responsable de la generación de androesterilidad.

2.2 Objetivos específicos

1. OE 1. Cuantificar el efecto de la aplicación del herbicida sobre el número de granos de polen por flor, la exomorfología de la exina, la viabilidad del polen y número de semillas viables como indicadores de fertilidad/esterilidad. Hipótesis asociada: El tratamiento con doble dosis de imazapir sobre plantas de girasol en estadio R1 altera el número de granos de polen por flor, la exomorfología, la viabilidad, así como el número de semillas viables producidas por autofecundación.
2. OE 2. Analizar el desarrollo del tejido esporogénico por medio de microscopía de contraste interdifereencial (DIC). Hipótesis asociada: El tratamiento con imazapir genera daño del tejido esporogénico durante la microgametogénesis.
3. OE 3. Aislar transcriptos implicados en la generación de la androesterilidad inducida por el tratamiento con herbicidas por medio de cDNA-AFLP en diferentes estadios durante el desarrollo del tejido esporogénico. Hipótesis asociada: Los transcriptos involucrados en la androesterilidad inducida por imazapir se encuentran diferencialmente expresados en los tejidos reproductivos de plantas de girasol tratadas y control.
4. OE 4. Asignar identidad a los transcriptos diferencialmente expresados entre plantas tratadas y control. Hipótesis asociada: Los genes involucrados en la androesterilidad inducida por imazapir se encuentran asociados al mecanismo modelo propuesto por nuestro grupo. El cual postula que la inhibición de síntesis de proteínas por la deficiencia de aminoácidos ramificados provocada por el efecto del herbicida, induce la muerte celular programada en el tejido esporogénico y el tapetum, provocando finalmente la ausencia/disminución del número de microsporas.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Se utilizaron tres líneas endocriadas de girasol que difieren en su nivel de resistencia/susceptibilidad a imidazolinonas (IMI): HA425 (*Imr1Imr1Imr2Imr2*) con resistencia completa (R), 1058-1 (*Imr1Imr1imr2imr2*) con resistencia intermedia (I) y HA89 susceptible (*imr1imr1imr2imr2*). Las líneas HA425 y HA89 son líneas americanas públicas, desarrolladas por el Departamento de Agricultura de EEUU con colaboración de la Estación experimental de North Dakota (EEUU). La HA425 es una línea casi isogénica (NIL) mantenedora BC₂F₆ resultante del cruzamiento HA89*3 y PUR *H. annuus* (Miller y Al-Khatib, 2002), la 1058-1 es un material experimental resultante de la retrocruza entre HA425 y HA89 y selección con imazamox (Bruniard y Miller, 2001), mientras que la HA89 es una NIL totalmente susceptible. Estos materiales han sido gentilmente facilitados por los Dres. J.M. Bruniard y J. Miller.

3.2 Diseño Experimental

Las plantas fueron cultivadas a campo en la sección de Horticultura del Campo Experimental de la Facultad de Cs. Agrarias UNR (lat 33°1' S, 60°53' W). La siembra se realizó manualmente en la fecha recomendada (octubre), a una distancia de 1,40 m entre surcos y a 0,3 m entre plantas. El diseño fue completamente aleatorizado con tres repeticiones, cada repetición consistió en diez plantas. El herbicida comercial Clearsol de BASF, cuyo principio activo es imazapir (ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il) nicotínico), fue aplicado por aspersion foliar en el estadio reproductivo estrella (R1) de acuerdo a la escala de Schneiter y Miller (1981). Los tratamientos a evaluar fueron: (i) plantas tratadas con 160 g i.a. ha⁻¹ de imazapir (2X) en R1, equivalente a una doble dosis de campo; (ii) y plantas sin tratar (control). El genotipo susceptible HA89 se incluyó como control de aplicación. El material vegetal para los estudios de la fisiología del polen fue colectado durante el estadio reproductivo R4 y R5 (Schneiter y Miller, 1981). El recuento de semillas viables se realizó con semillas maduras una vez alcanzada la madurez fisiológica. Las colectas de material vegetal para los ensayos de cDNA-AFLP y microscopía de contraste interdiferencial (DIC) se realizaron a partir de plantas independientes, considerando tres réplicas biológicas, en los siguientes estadios: 10, 13 y 16 días posteriores al tratamiento (dpt).

3.3 Estudio de la fisiología del polen

Los estudios de la fisiología del polen incluyeron tres ensayos: recuento de número de granos de polen por flor, estudio de la exomorfología del grano y viabilidad del polen. Los mismos se realizaron a partir de plantas independientes una vez alcanzados los estadios R4 para el recuento y R5 para los restantes ensayos. El recuento de granos de polen no abortivos y el estudio de la viabilidad resultaron necesarios para verificar la eficacia del tratamiento, ya que el mismo puede generar androesterilidad parcial en los genotipos resistentes.

3.3.1 Recuento de número de granos de polen por flor

El número de granos de polen por flor (GPF) se estimó utilizando un hemocitómetro Neubauer-Boeco en cinco flores cerradas (en fenofase E1) de tres diferentes plantas tratadas y control de cada genotipo (Kearns e Inouye, 1993; Ochogavía *et al.*, 2018). Una antera por flor fue cuidadosamente diseccionada y el contenido de polen de dos tecas se colocó en un microtubo de 0,2 ml con 30 μ l de agua destilada. La suspensión se agitó en un mezclador vorticial vertical. Una alícuota de 5 μ l de la suspensión de polen se transfirió a un portaobjetos de hemocitómetro Neubauer, los granos se contaron bajo una lupa binocular SZM-LED2 (OPTIKA Microscopes Italy) y estos valores se extrapolaron al volumen total de la suspensión original (Kearns e Inouye, 1993).

El número de granos de polen por antera se calculó teniendo en cuenta los granos de polen contados en la suspensión, extrapolándolo a las cuatro tecas que componen la misma. Finalmente, el número de GPF se calculó multiplicando el número de anteras por flor (cinco) por el número de granos de polen por antera.

La comparación de medias estadísticas de los valores obtenidos en los estudios de fisiología del polen se realizó mediante la prueba t de Student utilizando el software R v.3.0.0 (R Development Core Team, 2010). Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza de la distribución empírica fueron evaluados previamente por las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene.

3.3.2 Análisis de la exomorfología del polen

Se evaluaron dos muestras de granos de polen maduro para cada combinación de tratamientos. Cada muestra se compuso del polen colectado de cinco plantas. Fueron incubadas en alcohol 96% v/v por 12 hs, montadas en un soporte y cubiertas con oro. Para su fotomicrografía

se utilizó un microscopio electrónico de barrido (MEB) modelo Leitz AMR-1000. El número de espinas de la exina fue cuantificado a partir de cinco micrografías de cada muestra, tomadas en diferentes cuadrantes del campo de observación del MEB. El diámetro de los poros fue cuantificado utilizando el programa *Image J* (Abramoff *et al.*, 2004) y se compararon las medias entre tratamientos utilizando la prueba t de Student, previa validación de los supuestos de normalidad.

3.3.3 Viabilidad del polen

En las plantas no tratadas y en las tratadas que presentaron producción de polen se estudió la viabilidad del mismo por medio de la tinción de los granos no abortivos con una solución de azul de anilina en lactofenol al 0,01% p/v. Se analizaron muestras de polen fresco de cinco capítulos de plantas tratadas y control de cada genotipo contabilizándose 100 granos de polen para obtener porcentajes de viabilidad en función de la proporción de granos teñidos de azul.

Para el análisis estadístico se utilizó la versión 3.0.0 del software R (R Development Core Team, 2010), evaluando la normalidad de los valores por medio de Levene y Shapiro-Wilk, y comparando las medias dentro de cada genotipo a través de la prueba t de Student.

3.4 Análisis del tejido esporogénico por Microscopía de Contraste Interdiferencial

Se fijaron muestras de flores completas de 10, 13 y 16 dpt en la solución de FAA modificado compuesta por: etanol 95% v/v, ácido acético glacial, agua destilada, formaldehído 40% v/v y glutaraldehído GII 25% v/v, en proporciones 50:5:35:8:2. Las anteras de las flores fijadas fueron disectadas bajo una lupa binocular SZM-LED2 (OPTIKA Microscopes Italy) e incubadas en solución clarificante de Herr (ácido láctico, hidrato de cloral, fenol, aceite de clavo de olor y xileno en proporciones 2:2:2:2:1) (Herr, 1971). Se realizaron observaciones en el microscopio de Contraste Interdiferencial Leica DM2500, equipado con 10x, 20x y 40x objetivos acromáticos HI PLAN, disponible en el laboratorio de Microscopía de la Facultad de Ciencias Agrarias. Las imágenes fueron digitalizadas por medio del software "Leica Application Suite 4" (Leica Microsystems).

3.5 Recuento de semillas viables

Fueron evaluadas las semillas de cinco plantas tratadas y control de cada genotipo. Un total de 100 semillas por planta fueron sumergidas en agua destilada hasta que el pericarpio se pudo remover fácilmente ($n= 2000$). Se registró la presencia de partes vitales, clasificándose en semillas vacías y normales (Ochogavía *et al.*, 2018).

Los valores medios de las semillas normales de plantas tratadas y control se compararon estadísticamente con la prueba t de Student, verificando previamente la igualdad de varianza y la normalidad mediante la prueba de Levene y Shapiro-Wilk. Para el análisis estadístico se utilizó la versión 3.0.0 del software R (R Development Core Team, 2010).

3.6 Análisis transcriptómico por cDNA-AFLP

Se estudiaron los perfiles de expresión génica del tejido reproductivo de los dos genotipos expuestos a los tratamientos (C y 2X) por medio de la técnica de cDNA-AFLP (Vuylsteke *et al.*, 2007 y Xiao *et al.*, 2009).

3.6.1 Extracción de ARN

Se colectaron inflorescencias inmaduras en diferentes días posteriores al tratamiento, abarcando los procesos de microsporogénesis (10 y 13 dpt) y microgametogénesis (16 dpt) según Ochogavía *et al.* (2018). Para la extracción se usó el kit comercial "SV Total RNA Isolation System" de PROMEGA, siguiendo las instrucciones del fabricante. A la vez, el uso de DNase PureLink DNase (Invitrogen Life Technologies) permitió eliminar el contenido de ADN. La concentración y calidad del ARN extraído fue cuantificado por espectrofotometría, evaluando las relaciones 260/280 nm (A_{260}/A_{280}) y 260/230 nm (A_{260}/A_{230}), respectivamente. La integridad del ARN también se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, utilizando SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) como revelador intercalante. Se sembraron 4 μ l de ARN más 4 μ l de buffer (5x Green Gotaq) en cada pocillo. La electroforesis se llevó a cabo en una cuba Enduro Gel XL (Labnet) conectada a una fuente EC3000P (Apparatus Corporation) calibrando el voltaje a 100 voltios. Se utilizó el equipo BIORAD Gel Doc™ XR+ para el revelado con iluminación UV y posterior digitalización de las imágenes del gel mediante el software Image Lab™ Software 5.2.1.

3.6.2 Técnica cDNA-AFLP

La técnica empleada fue la propuesta por Vuylsteke *et al.* (2007) y Xiao *et al.* (2009) la cual se ilustra en la Figura 1.

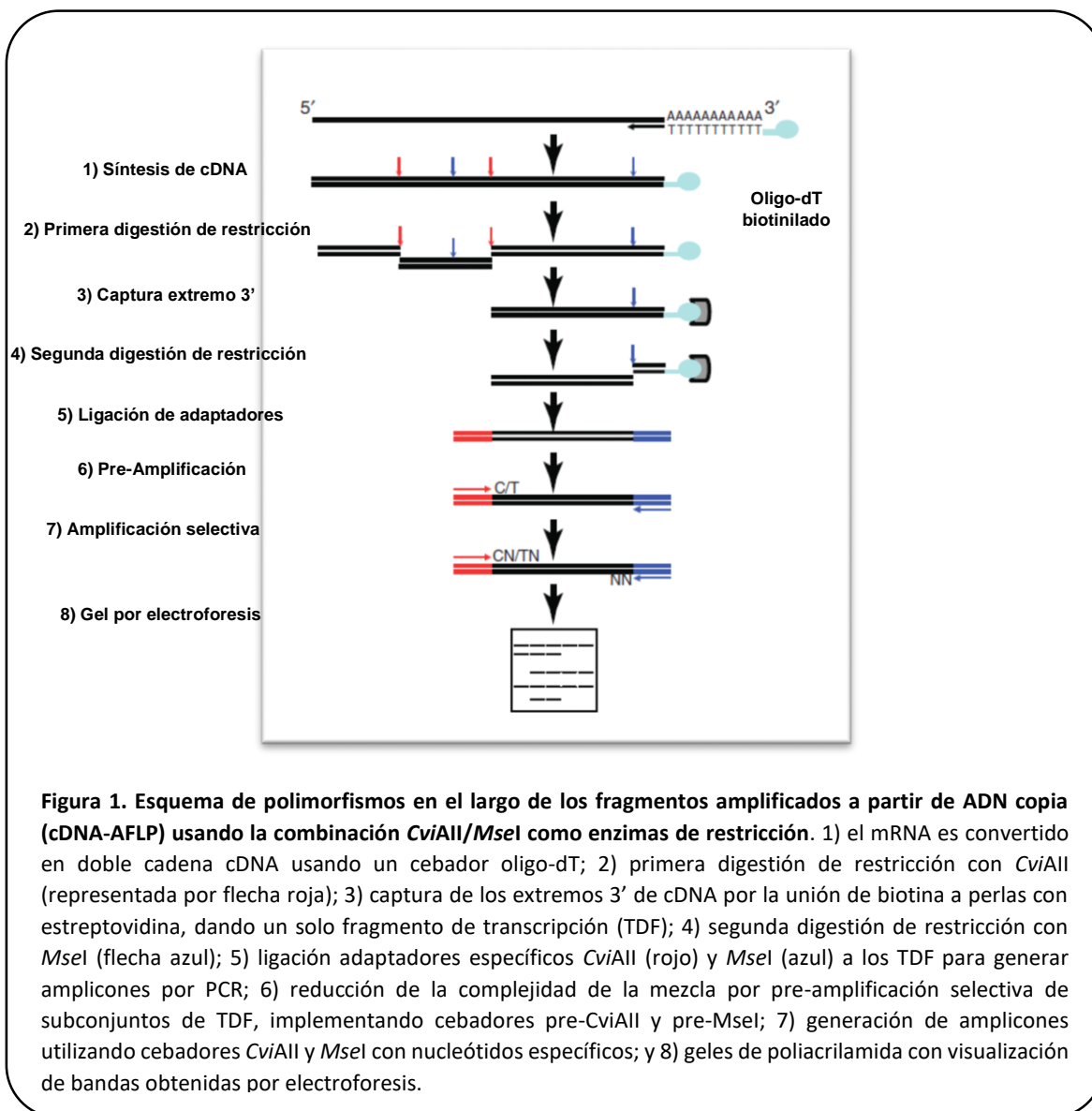


Figura 1. Esquema de polimorfismos en el largo de los fragmentos amplificados a partir de ADN copia (cDNA-AFLP) usando la combinación *Cvi*AI/*Mse*I como enzimas de restricción. 1) el mRNA es convertido en doble cadena cDNA usando un cebador oligo-dT; 2) primera digestión de restricción con *Cvi*AI (representada por flecha roja); 3) captura de los extremos 3' de cDNA por la unión de biotina a perlas con estreptavidina, dando un solo fragmento de transcripción (TDF); 4) segunda digestión de restricción con *Mse*I (flecha azul); 5) ligación adaptadores específicos *Cvi*AI (rojo) y *Mse*I (azul) a los TDF para generar amplicones por PCR; 6) reducción de la complejidad de la mezcla por pre-amplificación selectiva de subconjuntos de TDF, implementando cebadores pre-*Cvi*AI y pre-*Mse*I; 7) generación de amplicones utilizando cebadores *Cvi*AI y *Mse*I con nucleótidos específicos; y 8) gels de poliacrilamida con visualización de bandas obtenidas por electroforesis.

Síntesis de la primera hebra de cDNA

Para la transcripción reversa del mRNA de girasol se utilizó la enzima transcriptasa reversa IMPROM II de Promega, siguiendo las instrucciones provistas por el proveedor. En principio, se desnaturalizó el ARN al precalentar a 70°C por 5 minutos la mezcla de 5,5 µl compuesta por 56,5

ng de ARN y 0,5 µl de oligo (dT)₁₅ (0,5 µg/rxn) biotilado e inmediatamente fue enfriada en hielo por 5 minutos. Luego la mezcla fue llevada a microcentrifuga por 10 segundos para bajar el condensado.

Posteriormente, para la retrotranscripción (RT) propiamente dicha se agregó 4 µl de Buffer 5x IMPROM II; 1,5 µl de MgCl₂; 1 µl de dNTP MIX (10 mM); 1 µl de la enzima transcriptasa reversa IMPROM II y cantidad suficiente de agua libre de nucleasas para (csp) 20 µl. Los tubos fueron incubados en la PCR a 25°C por 5 minutos permitiendo el anillado. A continuación, se llevó a cabo la extensión por una hora a 42°C. Finalmente se inactivó la transcriptasa reversa calentando las muestras a 70°C durante 15 minutos.

Síntesis de la segunda hebra de cDNA

Se preparó la mix para la síntesis de la segunda hebra con un volumen final de 140 µl compuestos por 16 µl de Buffer ligasa 10x; 3 µl de dNTP (10 mM); 0,16 µl de ribonucleasa H (10 u/µl); 118 µl de H₂O y 2,5 µl DNA Pol I (New England Biolabs). Esta mezcla se agregó al producto de síntesis de la primera hebra incubando por 1 hora a 12°C y luego 1 hora a 22°C.

Para la limpieza de la dsDNA con Nucleospin (Macherey-Nagel) se preparó el buffer de lavado NT3, agregando 320 µl de este N.T.I. (provisto por el kit) a 160 µl de muestra de la segunda hebra. Se colocó 700 µl de la solución en la columna de separación provista por el kit y se centrifugó por 30 segundos a 11.000 xg (RCF), repitiendo el proceso hasta filtrar toda la solución. Luego se agregó 700 µl de NT3 y se centrifugó 30 segundos a 11.000 xg (RCF), descartando el excedente, repitiendo el lavado y secando la membrana por centrifugación a 11.000 xg (RCF) durante 2 minutos. Finalmente se incorporaron 25 µl de buffer NE, incubando a temperatura ambiente por 1 minuto y centrifugando por 1 minuto a 11.000 xg (RCF).

Corte con primer enzima de restricción

El cDNA fue digerido por la enzima *Cvi*AI, previamente validada para el transcriptoma de girasol por Gil (2017). Se agregó 1 µl de la enzima *Cvi*AI (5 U/µl New England Biolabs) más 4 µl de buffer New England Biolabs 10x, incubándose 2 horas a 25°C.

Se recuperaron los fragmentos digeridos con el kit "Streptavidin MagneSphere" de Promega. Para esto se usaron 100 µg de esferas por muestra a 1 µg/µl y efectuaron tres lavados con 200 µl de buffer 2x STEX (NaCl= 40 ml; TRIS 1M= 2 ml; HCl pH= 8; EDTA 0,5 M= 400 µl; TRITON X-100= 2 ml; Vf = 100 ml 2x STEX) cada uno. Luego se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las perlitas en 240 µl de buffer 2x STEX bajo agitación. Se agregaron 40 µl de la suspensión de

perlitas a cada muestra de ADN, incubando 30 minutos con agitación. Claramente el uso de perlitas magnéticas con estreptavidina nos permitió la unión del cebador oligo dT biotinilado usado para la síntesis del cDNA, y así recuperar los fragmentos desde el extremo 3' de la cadena.

Finalmente se lavó en soporte magnético eliminando el sobrenadante, al colocar el separador y agregar 100 µl de buffer 1x STEX, descartando el sobrenadante con micropipeta y repitiendo el lavado cuatro veces. Luego se agregaron 30 µl de buffer TE a cada muestra.

Corte con segunda enzima de restricción

Sobre la solución obtenida en el paso anterior se realizó la restricción con la enzima *MseI*, la cual fue previamente validada para girasol por Gil (2017). Para el corte se agregó 10 µl de la mezcla (4 µl de buffer 10x; 2 µl de H₂O_d y 4 µl de *MseI* (10 U/µl)) de la segunda digestión a cada una de las reacciones/muestras, incubando a 37°C durante 2 horas.

Para la purificación de los fragmentos se colocaron los tubos en el soporte magnético y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, descartando las microesferas precipitadas y el tubo.

Ligación de adaptadores

Para la ligación de los adaptadores *CviAI* y *MseI* (Tabla 1) se preparó la mezcla: 5 µl buffer de ligasa (10x); 1 µl ligasa T4; 3 µl *CviAI* (5 pmol/µl) y 1 µl *MseI* (50 pmol/µl). Esta se agregó a los 40 µl de la mezcla de fragmentos purificados, incubando toda la noche a 4°C.

Pre amplificación

Se llevó a cabo una PCR con 1 µl del producto de ligación, 4 µl de buffer Gotaq 5x, 0,4 µl dNTP (10 mM c/u), 0,4 µl de cebador *CviAI*_preprimer (10 µM), 0,4 µl de cebador *MseI*_preprimer (Tabla 1), 0,2 µl de Gotaq y H₂O_d csp 20 µl. El protocolo de ciclado incluyó las siguientes etapas: 5 minutos a 95°C; 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C (30 ciclos) y 10 minutos a 72°C.

Tabla 1. Adaptadores y primers usados en el análisis de polimorfismos en el largo de los fragmentos amplificados a partir de ADN copia (cDNA-AFLP).

Enzima de restricción	Nombre	Secuencia de oligonucleótidos (5' a 3')
CviAll	CviAll_Forward adaptader	CTCGTAGACTGCGTACC
	CviAll_Reverse adaptader	ATGGTACGCAGTCTAC
	CviAll_preprimer	CTCGTAGACTGCGTACCAT
	CviAll_selprimerC	GACTGCGTACCATGC
	CviAll_selprimerG	GACTGCGTACCATGG
	CviAll_selprimerA	GACTGCGTACCATGA
	CviAll_selprimerT	GACTGCGTACCATGT
Msel	Msel_Forward adaptader	GACGATGAGTCCTGAG
	Msel_Reverse adaptader	TACTCAGGACTCAT
	Msel_preprimer	GACGATGAGTCCTGAGTAA
	Msel_selprimerC	GATGAGTCCTGAGTAAC
	Msel_selprimerG	GATGAGTCCTGAGTAAG
	Msel_selprimerA	GATGAGTCCTGAGTAA
	Msel_selprimerT	GATGAGTCCTGAGTAAT

Amplificación selectiva

Para realizar la amplificación selectiva, se evaluaron 16 combinaciones de cebadores (Tabla 2). El producto de pre-amplificación se diluyó en una proporción 1/3 y a 2 µl de esta dilución se incorporó: 2 µl buffer 5x Gotaq, 0,2 µl dNTP (10 mM c/u), 0,2 µl cebador Msel_selprimer+1 y 0,2 µl cebador CviAll_selprimer+1 con una base selectiva adicional en el extremo 3', 6,2 µl de H₂O_d y 0,2 µl de Gotaq (Polimerasa). El protocolo de ciclado incluyó: 5 minutos a 95°C; 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C (menos 0,7%/ciclo) y 1 minuto a 72°C (12 ciclos); 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C (30 ciclos) y 10 minutos a 72°C.

Tabla 2. Combinaciones de CviAll_selprimer y MseI_selprimer con secuencias.

	CVIAII + A GACTGCGTACCATG A	CVIAII + C GACTGCGTACCATG C	CVIAII + G GACTGCGTACCATG G	CVIAII + T GACTGCGTACCATG T
MSEI + A GATGAGTCCTGAGTAA A	MseI + A CviAll + A	MseI + A CviAll + C	MseI + A CviAll + G	MseI + A CviAll + T
MSEI + C GATGAGTCCTGAGTAA C	MseI + C CviAll + A	MseI + C CviAll + C	MseI + C CviAll + G	MseI + C CviAll + T
MSEI + G GATGAGTCCTGAGTAA G	MseI + G CviAll + A	MseI + G CviAll + C	MseI + G CviAll + G	MseI + G CviAll + T
MSEI + T GATGAGTCCTGAGTAA T	MseI + T CviAll + A	MseI + T CviAll + C	MseI + T CviAll + G	MseI + T CviAll + T

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se analizaron los perfiles de expresión de los genotipos HA425 (resistente) y 1058-1 (resistencia intermedia) tanto en plantas tratadas como control de 10, 13 y 16 dpt, utilizando las 16 combinaciones de cebadores selectivos. Se evaluaron los polimorfismos en el largo de los fragmentos amplificados.

Para esto se preparó el gel poliacrilamida 6% p/v en condiciones desnaturalizantes (7,5 M UREA). El gel de poliacrilamida se preparó a partir de 60 ml de la mezcla de acrilamida/bisacrilamida (9:1), utilizando 41 µl de TEMED y 360 µl de Persulfato de Amonio (PSA) al 10% p/v como catalizadores para la reacción de síntesis del gel. La solución fue vertida entre vidrios previamente tratados con soluciones de BIND y REPEL (Sigma-Aldrich), facilitando la adhesión covalente del gel al vidrio tratado con la primera solución. Para la electroforesis se preparó la cuba con el gel, agregando TBE 0,5x en el contenedor superior y 1x en el inferior. Las muestras fueron desnaturalizadas por 5 minutos a 94°C y conservadas en hielo hasta la siembra. Se inició una pre-corrída del gel durante 1 hora a 60 w (1300 v aproximadamente) y luego se realizó la siembra de 4 µl de las muestras adicionando 2 µl de loading buffer (6 µl finales). Se sembró el marcador en la calle central, compuesto por 4 µl del mismo y 2 µl de loading buffer. La electroforesis se llevó a cabo durante 2 horas a 60 w.

Una vez finalizada la electroforesis, se separaron cuidadosamente los vidrios que contenían el gel y se colocó el que lo tenía en solución fijadora compuesta por ácido acético glacial al 10% v/v durante 20 minutos. Se realizaron tres lavados con agua destilada durante 5 minutos. Posteriormente se introdujo el gel en solución de tinción (AgNO_3 1,5 g, formaldehído 2,25 ml y H_2O csp 1,5 l) durante 30 minutos en agitación constante, resguardándolo de la luz. Luego se lavó con H_2O por 30 segundos. Se sumergió el gel en solución de revelado fría (4°C) constituida por 30 g de Na_2CO_3 , 200 μl de tiosulfato de sodio (10 mg/ml), 1,5 ml de formaldehído y H_2O csp 1 l. Esta solución de revelado se dejó actuar hasta visualizar las bandas, cortándose la reacción al agregar 1 l de ácido acético 10% v/v. Por último, se lavó el gel en H_2O destilada durante 20 minutos.

3.7 Selección y extracción de bandas de interés

En principio, se escaneó el gel rotulado con las combinaciones y calles. Los perfiles de cDNA-AFLP obtenidos de cada combinación de cebadores se compararon entre tratamientos y para cada genotipo independiente, seleccionándose las bandas de interés. Los geles de poliacrilamida digitalizados se convirtieron en una matriz binaria donde la presencia de la banda estaba representada por 1 (uno) y la ausencia por 0 (cero). Se clasificaron los patrones de bandas, los TDF que estaban presentes en las muestras tratadas y ausentes en las muestras de control se consideraron inducidos por el tratamiento (Grupo 1= G.1), y el patrón inverso se consideró suprimidos por el tratamiento con herbicida (Grupo 2= G.2). Se seleccionaron bandas de interés, las cuales fueron humedecidas con una gota de H_2O estéril y cortadas con un bisturí, ayudándonos con un transiluminador de luz visible. La sección de cada banda se colocó sobre un portaobjetos limpio y fue triturada con el mismo implemento. Las bandas procesadas se dispusieron en tubos Eppendorf de 1,5 ml con 50 μl de buffer de elución (400 μl de EDTA 0,1 M en 40 ml de H_2O) incubándolas a 37°C durante toda la noche en agitación orbital.

Para la precipitación del cDNA, las bandas eluidas se centrifugaron por 5 minutos a 12.000 rpm, extrayendo 40 μl del sobrenadante en un tubo limpio. A continuación, se le agregó 2 μl de NaCl 5 M y 2,5 vol (100 μl) de EtOH absoluto, permitiendo la precipitación del ADN durante toda la noche a -20°C . En una segunda etapa se centrifugó a 12.000 rpm por 20 minutos, descartando el sobrenadante y escurriendo el resto del volumen en papel absorbente. Seguidamente se incorporó 250 μl de EtOH 70% v/v centrifugando a 12.000 rpm por 20 minutos. Nuevamente se descartó el sobrenadante escurriendo en papel. Como etapa final se colocó en estufa a 37°C con

la tapa abierta para evaporar todo el EtOH durante 30 min y se resuspendió el precipitado en 15 µl de H₂O estéril. Las bandas eluídas fueron almacenadas a -20°C.

Para verificar la calidad de las bandas eluídas fueron reamplificadas siguiendo el mismo protocolo de amplificación selectiva y analizadas en geles de agarosa al 1,5% con SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen). Se sembraron 4 µl de producto de PCR con 2 µl de loading buffer. La electroforesis se llevó a cabo en buffer TBE 1x a 60 v. Finalmente revelado y analizado en el digitalizador BIORAD Gel Doc™ XR+.

Las bandas seleccionadas fueron secuenciadas en Macrogen Inc. Corea.

3.8 Asignación de identidad de transcritos y análisis bioinformático de secuencias

Se analizaron las secuencias bioinformáticamente tras evaluar la calidad de los cromatogramas con el programa Chromas (<https://chromas.software.informer.com/2.5/>) y se eliminaron las secciones correspondientes a las secuencias de los cebadores de manera manual, utilizando la aplicación Align two sequences del programa BLASTN disponible en el sitio NCBI, implementando los parámetros preestablecidos para esa aplicación. Las secuencias resultantes se agruparon utilizando Egassembler (Masoudi-Nejad *et al.*, 2006) para limitar la redundancia y producir secuencias de consenso más largas, implementándose también los parámetros predeterminados por el programa. Las anotaciones contigs y singletons se realizaron utilizando la herramienta de búsqueda de alineación básica (BLASTN) contra el genoma del girasol (<https://www.heliagene.org/HA412.v1.1.bronze.20141015/>) para identificar genes únicos y su localización cromosómica para cada TDF homólogo a *Helianthus annuus* (E-value <1e⁻³).

Las secuencias también se analizaron haciendo un BLASTN con la herramienta automática Blast2GO contra las secuencias no redundantes (nr) de GenBank de la base de datos de plantas con flores (taxid: 3398) tomando similitudes con un E-value <1e⁻⁶ como coincidencias significativas (Conesa *et al.*, 2005). Fue posible clasificar las homologías según los términos de Gene Ontology para Procesos Biológicos a través del software Blast2GO (E-value <1e⁻³).

3.9 RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Se seleccionaron cuatro TDFs representativos y tres genes de referencia para evaluar su nivel de expresión mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Los cebadores específicos de los TDFs fueron diseñados usando el software Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000) (Tabla 3). Los genes de referencia utilizados fueron actina (ACT), precursor microRNA 156 (MIR156) y una proteína de función desconocida 2 (UNK2), los cuales habían sido previamente validados en *H. annuus*, y categorizados como el óptimo panel normalizador para qRT-PCR de tejido reproductivo (Ochogavía *et al.*, 2017). Las secuencias de cebadores de genes de referencia fueron obtenidas de la publicación Ochogavía *et al.* (2017) (Tabla 3). La qRT-PCR se llevó a cabo en el Rotor-Gene Q con HRM thermal cycler (Qiagen GMBH, Alemania) utilizando 2 μ l de cDNA, sintetizado de acuerdo al protocolo descrito en el punto 3.6.2. La composición del medio de reacción, el protocolo de ciclado de la PCR y la verificación de la especificidad de las secuencias amplificadas se realizó como se describe en Ochogavía *et al.* (2014 y 2017). La expresión normalizada de los genes de interés fue calculada a partir de la fórmula de Simon ($EN = E_r^{C_{qr}} / E_{TDF}^{C_{qTDF}}$), considerando un factor de normalización por muestra obtenida de los tres genes de referencia (Pfaffl *et al.*, 2004). La expresión relativa se calculó independientemente para cada gen de interés, a partir de la relación entre la EN de cada muestra respecto a la menor EN del grupo de muestras. Los datos se analizaron estadísticamente por medio de t de Student (p-valor= 0,05) usando el pack '*agricolae*' en el software R (R development Core Team, 2010). La expresión relativa fue representada gráficamente y referida al mínimo EN nivel por grupo de análisis.

Tabla 3. Secuencias de cebadores usados en qRT-PCR.

GEN	NOMBRE	SECUENCIA DEL CEBADOR (5' A 3')
TDF6	TDF6-Fw	TGACGATGAGTCCTGACCGA
	TDF6-Rv	TGTTGACTGCGTACCATGCG
TDF23	TDF23-Fw	GTCGATAAGTCCTGACCGAG
	TDF23-Rv	GGCCATTTTTGGTAAGCAGA
TDF45	TDF45-Fw	ACGCTGTACTTGTGCTATCA
	TDF45-Rv	ATGATGACTGCGTACCATGT
TDF60	TDF60-Fw	CCCTTCTTTCTCCACACACCT
	TDF60-Rv	TGAATGCGTACCATGGCTCT
ACT*	ACT-Fw	CAGGCCGTGCTTTCCCTCTA
	ACT-Rv	GGTCACGACCAGCGAGATCA
MIR156*	MIR156-Fw	AACGAGATGTTGGTTCGGTTCAA
	MIR156-Rv	GCACGTGATATTGGCACGGCT
UNK2*	UNK2-Fw	AGGAGGTAGCCGTCGTCCAGC
	UNK2-Rv	AGCCTTGGAGTTCAATTGGGCCG

* Ochogavía *et al.* (2017)

4 RESULTADOS

El tratamiento con imazapir generó notables efectos a nivel de planta completa en ambos genotipos, R e I. Se evidenciaron síntomas de deshidratación leve en hojas y en capítulos luego de 4 dpt y se percibió clorosis después de 7 dpt (Figura 2 A-D). Las plantas tratadas florecieron en la misma fecha que las controles, pero en algunos casos el capítulo se deformó (Figura 2 E-H). Las inflorescencias de las plantas susceptibles (HA89) utilizadas como control de aplicación no llegaron a desarrollarse y las plantas murieron 15 dpt.

Durante la dehiscencia de las anteras (etapa fenológica R5, Scheniter y Miller, 1981), los granos de polen fueron liberados en las plantas control y se observaron fácilmente sobre las flores liguladas (Figura 2 E y G). Sin embargo, en las plantas tratadas, la mayoría de las anteras no emergieron y no se pudieron observar granos de polen sobre el capítulo, lo que evidencia una disminución o ausencia de la dehiscencia de las anteras en la mayoría de las flores tubuladas (Figura 2 F y H).

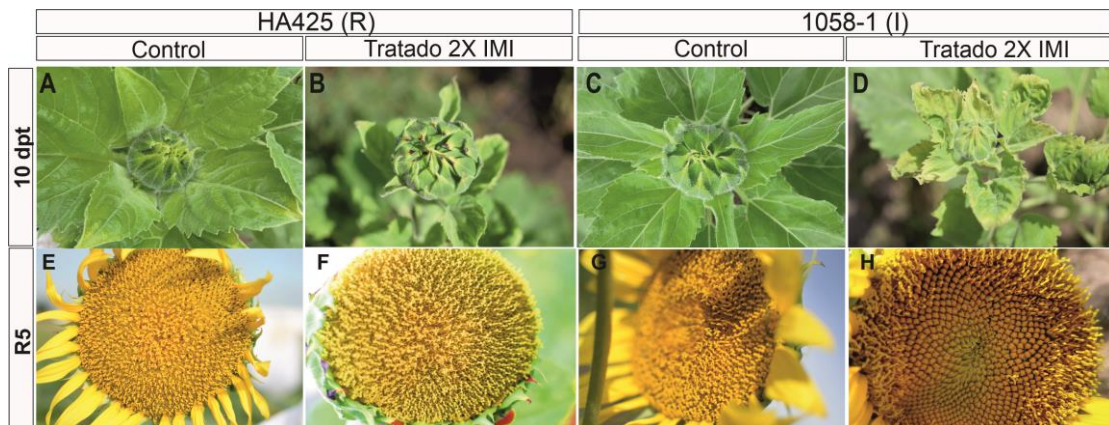


Figura 2. Comparación del efecto herbicida en doble dosis (2X) entre plantas tratadas y control de genotipos HA425 (R) y 1058-1 (I). Paneles A-D capítulos de plantas en el campo 10 dpt. **Paneles E-H** fotografías de capítulos en estado fenológico R5 (Scheniter y Miller, 1981).

4.1 Efectos del tratamiento sobre la fisiología del polen

El estudio de la fisiología del polen en respuesta a los diferentes tratamientos se abordó mediante las siguientes metodologías: a) Recuento del número de granos de polen por flor; b) Análisis de la exomorfología del polen; y c) Estudio de viabilidad.

4.1.1 Recuento de número de granos de polen por flor

El número de GPF se estimó a partir del recuento de los granos en una alícuota de 5 μ l, provenientes de una suspensión del contenido total de granos de polen de dos tecas en un volumen de 30 μ l. El número de granos cuantificados fue extrapolado al contenido total de una flor. Los GPF de plantas tratadas fueron significativamente menores en relación a las plantas control de ambos genotipos. Las plantas resistentes (R) tratadas denotaron 444 ± 156 y las controles 21.806 ± 607 GPF con un p -valor $< 0,0001$. Mientras que las plantas de resistencia intermedia (I) tratadas presentaron 1.344 ± 357 y las controles 18.754 ± 969 GPF (p -valor $< 0,0001$). Las diferencias altamente significativas (p -valor $< 0,01$) en el número de GPF confirmaron una androesterilidad completa inducida por el tratamiento con imidazolinonas (Figura 3).

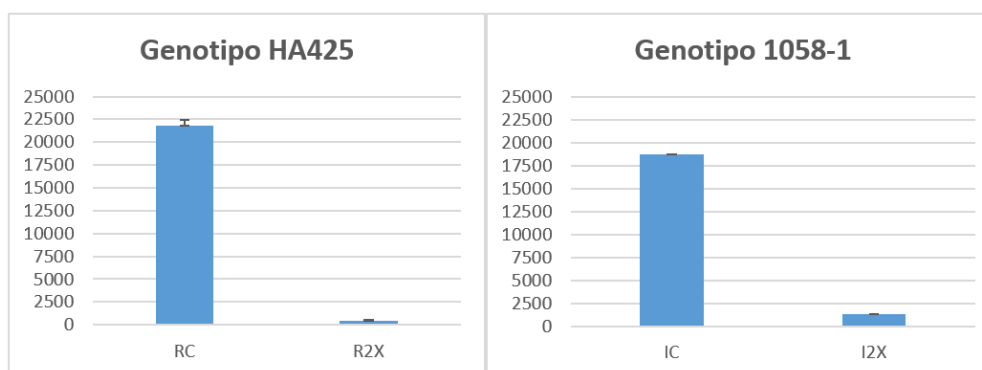


Figura 3. Número de granos de polen por flor en genotipos HA425 y 1058-1 en plantas tratadas y control. Los gráficos de barras indican el promedio del número de granos de polen por flor calculado por genotipo y tratamiento, asociado al error estándar de la determinación.

4.1.2 Análisis de la exomorfología del polen

El estudio de la exomorfología del polen se realizó mediante el recuento del número de espinas y la medición del diámetro de los poros a partir de micrografías de los granos de polen, obtenidas por MEB. No se detectaron diferencias significativas entre plantas tratadas y control en cuanto al número de espinas, siendo respectivamente 102 ± 6 y 99 ± 3 para plantas tratadas y control de HA425 (p -valor $>0,05$); y 92 ± 5 y 94 ± 5 los promedios para plantas tratadas y control de 1058-1 (p -valor $>0,05$). Por otro lado, el diámetro de los poros pudo ser cuantificado utilizando el programa *Image J*, el genotipo HA425 presentó diámetros de $6,7 \pm 0,3$ mm en plantas tratadas y $6,9 \pm 0,2$ mm en los controles (p -valor $>0,05$), mientras que el diámetro de los poros de las plantas tratadas resultó significativamente menor que en las plantas control en el genotipo 1058-1 ($6,4 \pm 0,8$ mm y $7,4 \pm 0,3$ mm respectivamente; p -valor= 0,005) (Figura 4).

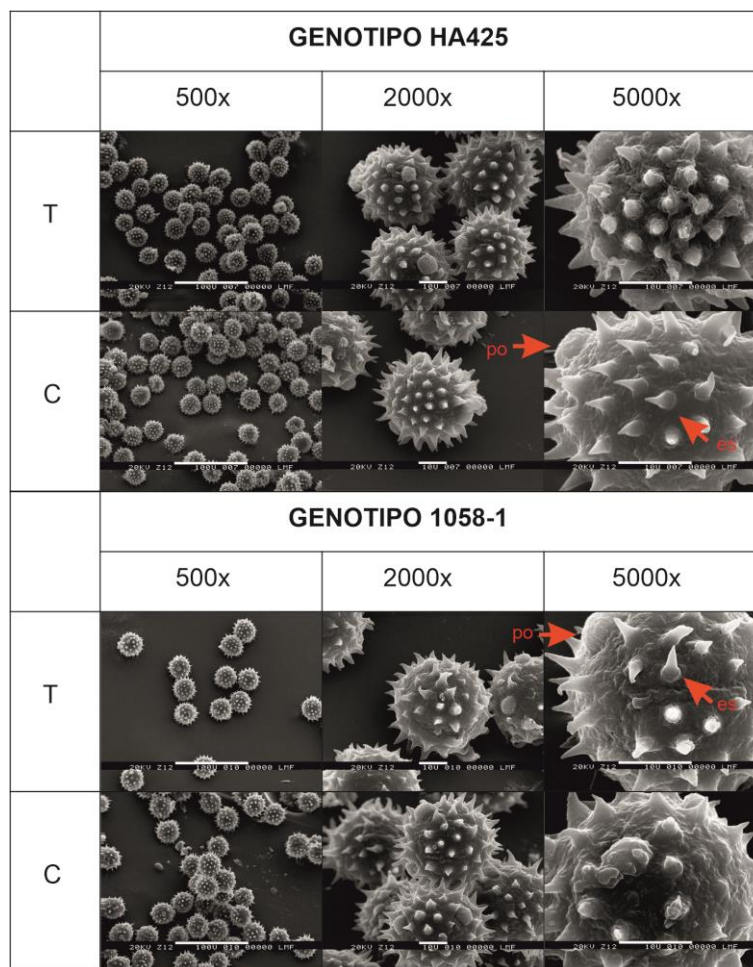
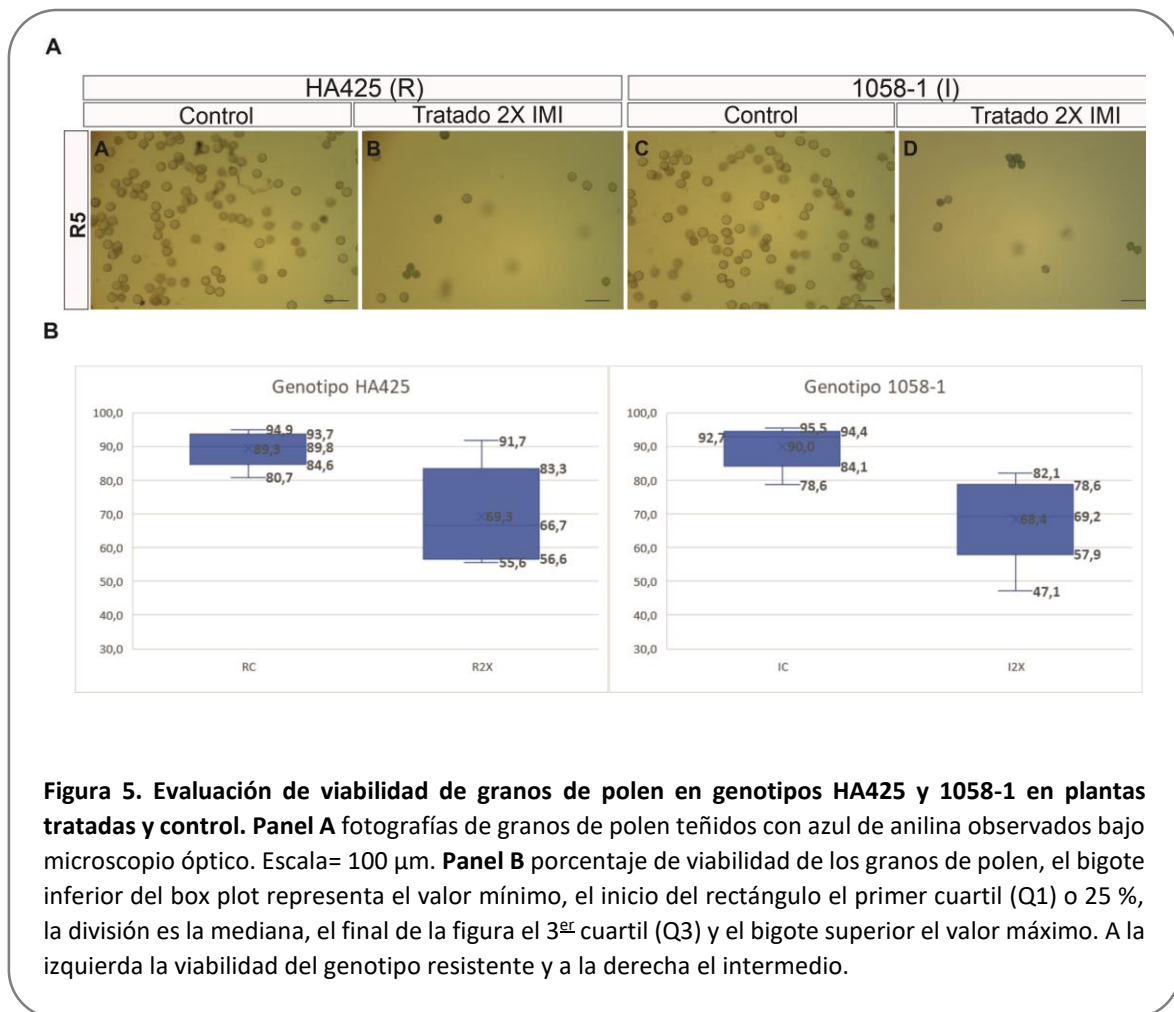


Figura 4: Micrografías de granos de polen obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido a partir de material vegetal tratado (2X) y control (C) de genotipos HA425 (R) y 1058-1 (I). Se analizaron imágenes en tres aumentos: 500X, 2000X y 5000X. En las imágenes se observan los granos con sus espinas (es) y poros (po) (flechas rojas).

4.1.3 Viabilidad del polen

Los granos de polen fresco fueron recolectados a partir de las plantas R e I durante el periodo de dehiscencia de anteras (estado fenológico R5, Schneiter y Miller, 1981), e incubados en una solución de azul de anilina 0,01% p/v. Se contabilizaron 100 granos de polen por planta para obtener los porcentajes de viabilidad, los granos no abortivos fueron teñidos de color azul y los abortivos no presentaban tinción (granos amarillos) (Figura 5-A).

A pesar de que la mayoría de los granos de polen maduros se tiñeron de azul, se detectaron diferencias significativas (considerando $\alpha \leq 0,05$) en el porcentaje de viabilidad entre plantas tratadas y control dentro de cada genotipo (Figura 5-B). En términos generales, en el genotipo R los porcentajes del número de granos viables en las plantas tratadas (69,3%) fue superado por el porcentaje detectado en plantas control (89,3%) (p-valor= 0,0215). Del mismo modo, para el genotipo I, los valores de viabilidad de polen detectados en plantas tratadas (68,4%) también fue superado por el control (90%) (p-valor= 0,0109).



4.2 Análisis del tejido esporogénico

El desarrollo reproductivo masculino se comparó entre plantas tratadas y control de ambos genotipos. El tejido esporogénico se analizó por microscopía DIC en flores de 10, 13 y 16 dpt como 25 días post estrella (E1) (Figura 6 A-P). Las anteras de las plantas tratadas de ambos genotipos sufrieron alteraciones en el desarrollo del polen, fue posible identificar grandes espacios vacíos sin microsporocitos en los sacos polínicos a los 16 dpt (puntas de flecha en las Figura 6 J y L). Incluso se detectó la ausencia total de microsporocitos o granos de polen en anteras de plantas tratadas. En cambio, las anteras de las plantas control a 16 dpt presentaron los sacos polínicos llenos de granos de polen maduros de manera homogénea (Figura 6 I y K). En ambos genotipos, las plantas tratadas generaron muy pocos granos de polen maduros dentro de las tecas en E1 (Figura 6, Paneles N y P). Se detectaron regiones sin granos de polen que afectaron hasta el 60% de la superficie de los sacos polínicos en los dos genotipos tratados con el herbicida (flechas en Figura 6, N y P).

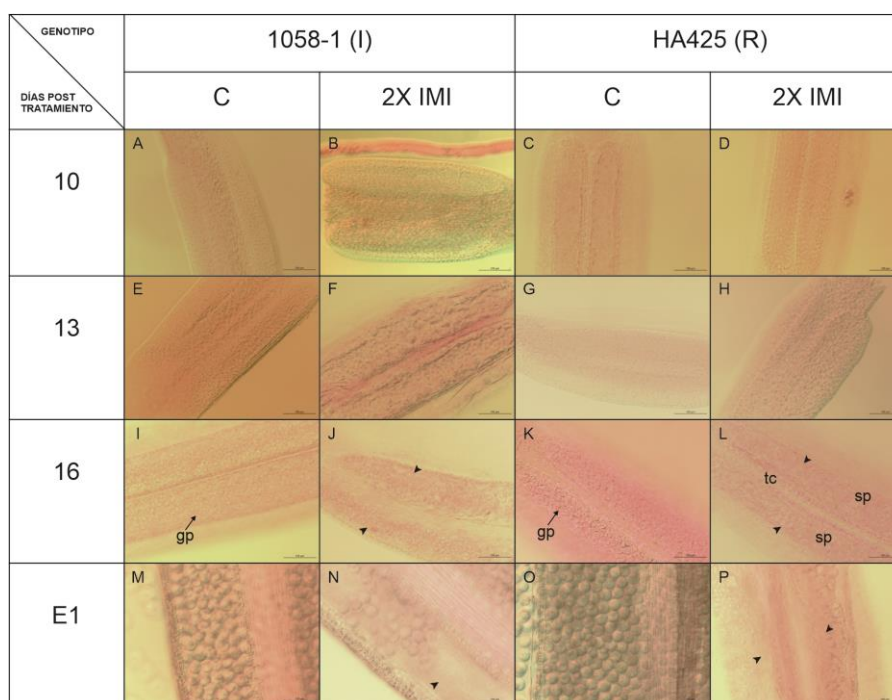


Figura 6. Micrografías de anteras inmaduras obtenidas por microscopía de contraste interdiferencial. Comparación del desarrollo del tejido a los 10, 13 y 16 dpt en condición tratado y control de los genotipos HA425 y 1058-1. **Panel A-D** anteras de flores 10 dpt de genotipos con resistencia completa e intermedia a IMI. **Panel E-H** anteras de flores 13 dpt. **Panel I-L** sacos polínicos de flores 16 dpt con evidencias de daños por el tratamiento, observándose granos de polen (gp), tejido conectivo (tc), sacos de polen (sp) y espacios vacíos (puntas de flechas). **Panel M-P** estadio fenológico avanzado (E1) de sacos polínicos con espacios ocasionados por el tratamiento con herbicida. Escala= 100 µm.

4.3 Recuento de semillas viables

Para determinar la viabilidad de semillas, cinco plantas tratadas y control de cada genotipo fueron evaluadas. Un total de 100 semillas por planta fueron sumergidas en agua destilada hasta que el pericarpio se pudo remover fácilmente para evaluar su contenido.

Los porcentajes de semillas viables obtenidos de plantas tratadas y control fueron comparados estadísticamente. Siguiendo los lineamientos de la reducida producción de polen, se obtuvieron bajos niveles de semillas viables. En este sentido, las plantas tratadas del genotipo R produjeron 8,2% de semillas viables, mientras que sus controles generaron 93,9% (p-valor= 0,003). Además, el genotipo I produjo 12,5% de semillas viables luego del tratamiento, y sus controles un 75,5% (p-valor= 0,026) (Figura 7).

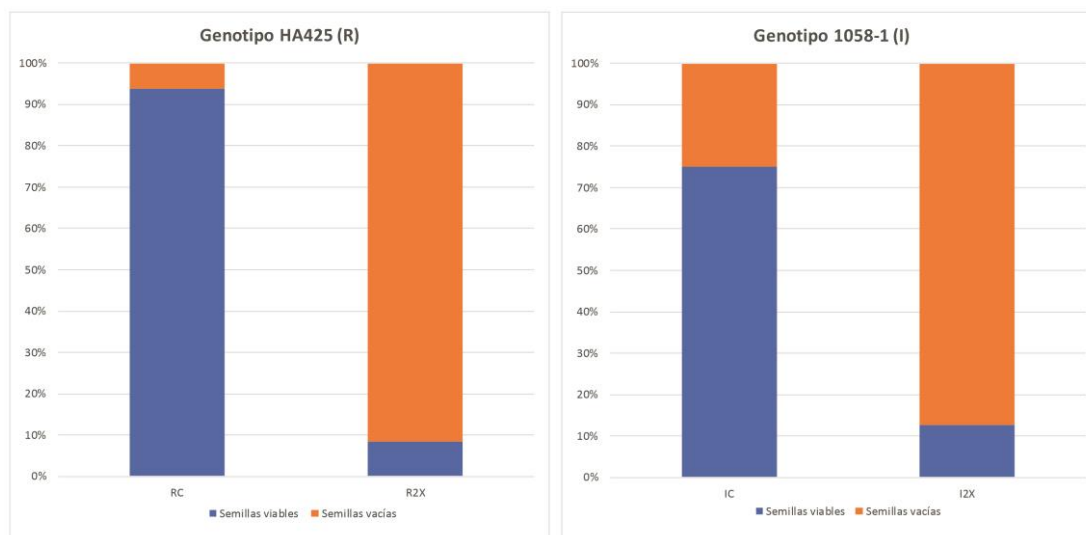


Figura 7. Porcentaje de semillas viables y vacías contabilizadas en plantas tratadas (2X) y control (C) de los genotipos R e I. Gráficos de proporciones donde cada barra representa el 100 % de las semillas contabilizadas para cada genotipo y tratamiento. En el eje de las ordenadas “y” se indica el porcentaje de semillas viables con azul y en el eje de las abscisas “x” los genotipos bajo estudio.

4.4 Identificación de fragmentos derivados de transcritos (TDF) por cDNA-AFLP

En estudios previos pudo demostrarse que el tratamiento con imidazolinonas inducía daños a nivel celular en el tejido esporogénico que podía ser detectado a los 13 dpt con el herbicida, reduciendo el número de granos de polen (Ochogavía *et al.*, 2020). En el presente trabajo de tesis se evaluaron muestras de anteras obtenidas a los 13 dpt, como también los estadios previos y posteriores, a fin de poder analizar y relacionar la variación transcriptómica en estos tejidos con la aplicación del herbicida.

Se estudiaron los perfiles de expresión génica diferencial del tejido reproductivo de los dos genotipos expuestos a los tratamientos (C y 2X) por medio de la técnica de cDNA-AFLP. Para este análisis se evaluaron 16 combinaciones de cebadores con un nucleótido selectivo adicional (Gil *et al.*, 2018). Sumando ambos genotipos obtuvimos entre 7 a 172 TDFs por combinación, aunque tres combinaciones de cebadores no permitieron amplificar fragmentos en nuestro material vegetal. Un total de 948 TDFs fueron identificados, 343 correspondientes al genotipo resistente y 605 al de resistencia intermedia. El tamaño de los fragmentos varió entre 50 y 800 pb. La cantidad de fragmentos obtenidos por muestra fueron cuantificados y se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Cuantificación de fragmentos derivados de transcritos en líneas HA245 (R) y 1058-1 (I) de girasol, en plantas tratadas (2X) y control (C), para todas las combinaciones de cebadores.

GENOTIPO		VALORES
ESPECÍFICO R (TRATADO Y CONTROL)		343
ESPECÍFICO I (TRATADO Y CONTROL)		605
R2X	10 dpt	102
	13 dpt	122
	16 dpt	47
RC	10 dpt	24
	13 dpt	28
	16 dpt	20
I2X	10 dpt	51
	13 dpt	94
	16 dpt	69
IC	10 dpt	145
	13 dpt	149
	16 dpt	97
TOTAL DE BANDAS		948

Los patrones de amplificación fueron analizados en una matriz binaria donde la presencia se indicó con 1 (uno) y la ausencia con 0 (cero). Las diferentes intensidades de las bandas no fueron consideradas. Los patrones de bandas fueron clasificados en dos grupos principales: (G.1) inducido o (G.2) reprimido por el tratamiento, los cuales fueron subdivididos como: (G.1a) TDFs de inducción temprana, siendo bandas presentes en muestras de anteras de 10 y/o 13 dpt y ausentes en plantas control; (G.1b) TDFs de inducción tardía, bandas presentes en muestras tomadas 16 dpt en plantas tratadas y ausentes en plantas control; (G.2a) TDFs de represión temprana, bandas presentes sólo a los 10 y/o 13 dpt en plantas control y ausentes en las tratadas; y (G.2b) TDFs de represión tardía, bandas presentes en muestras de plantas control tomadas a los 16 dpt y ausentes en plantas tratadas. En la figura 8 se presenta un perfil de bandas típico obtenido por medio de la técnica cDNA-AFLP y la clasificación de los patrones descriptos.

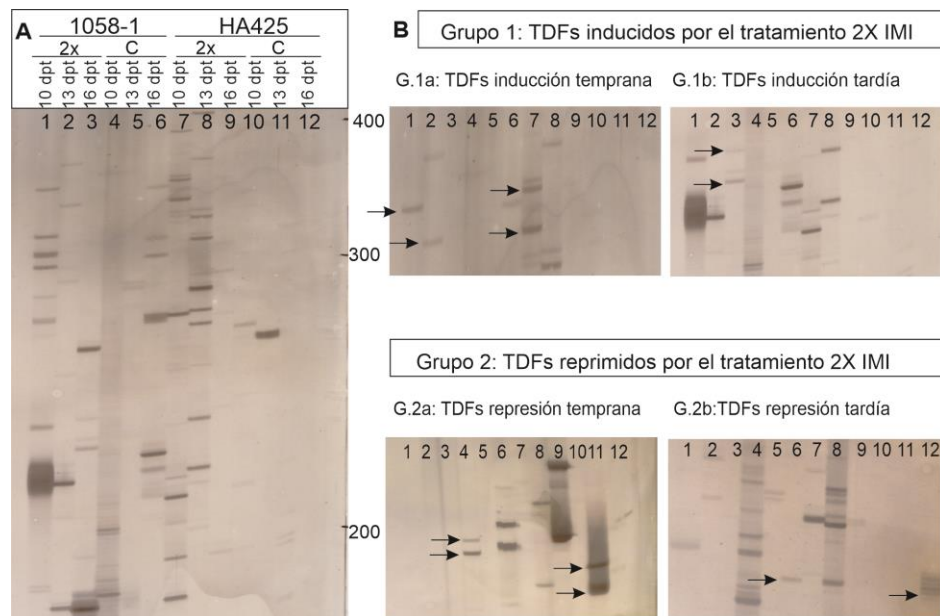


Figura 8. Patrón de bandas de transcritos obtenidos de tejido reproductivo (anteras) de girasol mediante la técnica de cDNA-AFLP. Comparación de bandas diferenciales para las líneas HA425 con resistencia completa y 1058-1 con resistencia intermedia, tratadas (2X) y control (C) a los 10, 13 y 16 días posteriores al tratamiento. Los perfiles de transcritos para 1058-1 y HA425 se corresponden a las columnas 1-6 y 7-12, respectivamente. Las plantas tratadas (1-3 genotipo I y 7-9 para el genotipo R) se compararon con las control (4-6 para el genotipo I y 10-12 para el R) en los distintos dpt. En el margen derecho se indica el tamaño de las bandas en pares de bases. **Panel A** bandas amplificadas por el par de cebadores *Mse*I T + *Cvi*AIII C. **Panel B** clasificación del patrón de bandas en dos grupos, inducidos y reprimidos por el tratamiento, grupo 1 y grupo 2, respectivamente. Subdivididos en (G.1a) de inducción temprana, bandas ausentes en el control y presentes en plantas tratadas a los 10 y/o 13 dpt; (G.1b) de inducción tardía, bandas presentes en muestras de plantas tratadas 16 dpt y ausentes en plantas control, (G.2a) TDFs de represión temprana, bandas presentes sólo a los 10 y/o 13 dpt en plantas control y (G.2b) TDFs de represión tardía, bandas presentes en plantas control a los 16 dpt y ausentes en plantas tratadas.

Un total de 594 marcadores moleculares pudieron ser exitosamente clasificados (210 del R, 361 del I y 23 simultáneamente en ambos genotipos). Los TDFs de inducción temprana (G.1a), representaron la mayor proporción de las bandas del genotipo R, con un 75% (174 TDFs) del total de los patrones de bandas cuantificados, pero en un 25% en el genotipo I (95 TDFs). Contrariamente, los TDFs asociados a la represión temprana de transcritos por tratamiento fueron los de mayor cuantía en el genotipo I (206 TDFs – 54%), encontrándose menos representados en R con 37 TDFs (16%) clasificados en G.2a (Figura 9-A). Los patrones de bandas que se detectaron simultáneamente en ambos genotipos se registraron y se representaron a través del solapamiento en el diagrama de Venn de la Figura 9-B.

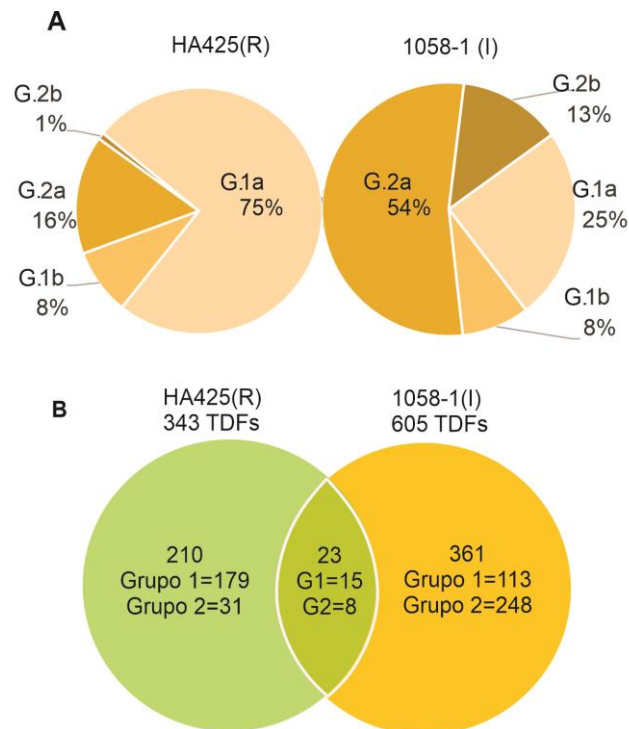
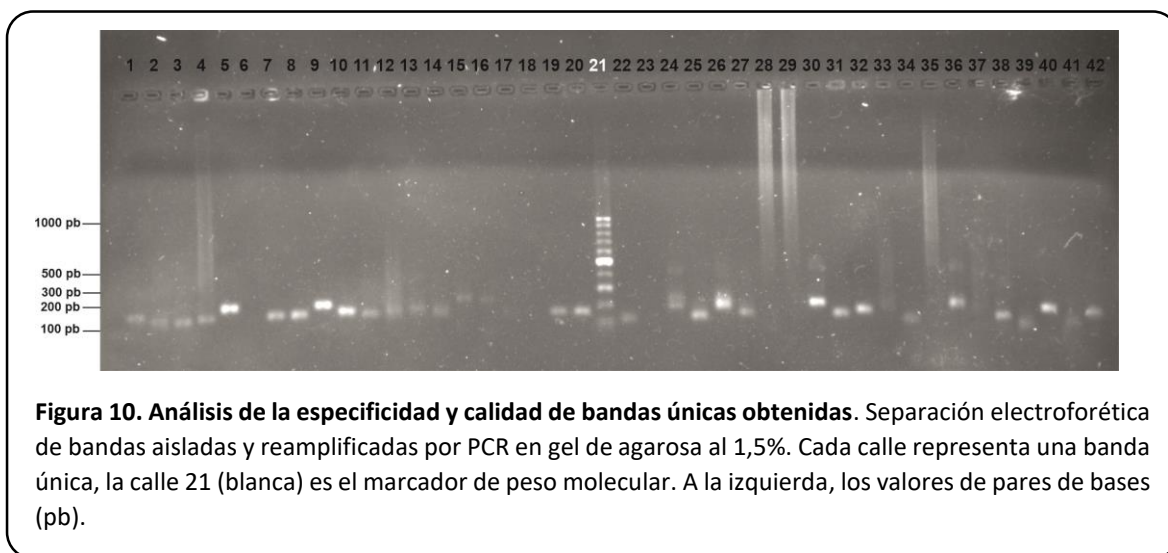


Figura 9. Clasificación de los patrones de bandas en función a su respuesta al tratamiento con imazapir. Panel A proporción de TDFs en los genotipos HA425 (R) y 1058-1 (I). G.1a, TDFs de inducción temprana; G.1b, TDFs de inducción tardía; G.2a, TDFs de represión temprana y G.2b, de represión tardía. **Panel B** diagrama de Venn de TDFs de genotipos R e I. Sobre cada círculo se encuentra el valor total de TDFs de cada genotipo, dentro de cada figura se encuentran los valores únicos para cada genotipo y en el área de solapamiento las bandas que comparten cada uno.

Un total de 135 bandas que se encontraban diferencialmente expresadas entre plantas tratadas y control, denominadas fragmentos de expresión diferencial derivados de transcritos

(DETDFs), fueron seleccionadas para su secuenciación. Del total de bandas seleccionadas, 28 fueron aisladas a partir del genotipo R y 45 a partir del genotipo I. Las bandas fueron eluidas, reamplificadas por PCR y seleccionadas de acuerdo a su intensidad y calidad para su secuenciación en Macrogen Inc. (Corea) (Figura 10). Se obtuvo un total de 73 secuencias, las cuales fueron contrastadas con las bases de datos públicas de plantas.



4.5 Análisis bioinformático

La calidad de los cromatogramas fue analizada con el programa Chromas (<https://chromas.software.informer.com/2.5/>) y la presencia de los cebadores fue identificada utilizando el programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se usó la herramienta Egassembler (Masoudi-Nejad *et al.*, 2006) para formar clusters conformando los contigs, evitando redundancias en el estudio. A través del software se descartaron automáticamente diez secuencias al tener una longitud menor a 70 pb y no cumplir con las exigencias mínimas establecidas por el software. Se conformaron a través de la herramienta un total de 31 singletons y 11 contigs, compuestos por dos a seis TDFs cada uno. Se realizó una comparación de las secuencias contra el transcriptoma de girasol en la plataforma Heliagene-INRA Sunflower Bioinformatical Resources (<https://www.heliagene.org/HA412.v1.1.bronze.20141015>) con la finalidad de identificar secuencias específicas en los transcriptomas de girasol disponibles y la localización de los genes codificantes en los cromosomas. Complementando este estudio, las secuencias fueron analizadas usando la herramienta bioinformática automática Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005) a través de un software de alineamientos BLASTN, donde la base consultada fue la colección de nucleótidos no redundante (nr/nt) y el organismo plantas con flores

(taxid:3398). Las categorías funcionales fueron establecidas según la nomenclatura determinada para Procesos Biológicos por GeneOntology (<http://geneontology.org/>) (Figura 11). Las secuencias únicas fueron publicadas en la base de datos DNA Data Bank of Japan (DDBJ; <https://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>), obteniéndose diferentes códigos de acceso (Anexo I).

Asignación de funciones a DETDFs

A partir de las 73 secuencias obtenidas en el estudio, se obtuvieron 42 secuencias únicas, de las cuales 31 fueron similares a mRNA de *H. annuus* (E-value $<1e^{-3}$) y 26 similares a secuencias transcritas de plantas con flores (taxid: 3398) (E-value $<1e^{-4}$), donde en la mayoría de los casos ambos resultados fueron coincidentes (Tabla 5). Del total, diez secuencias únicas no presentaron homología contra ninguna de las bases de datos analizadas por ambos métodos (Tabla 5). De las secuencias que presentaron homologías con las bases de datos, se asignaron funciones putativas a 30 secuencias únicas de acuerdo a la terminología GO para procesos biológicos, y dos secuencias presentaron homologías con proteínas de función desconocida (Tabla 5).

En cuanto a la identidad de los TDFs analizados, aproximadamente el 24% fueron relacionados a traducción celular, asociada a la síntesis proteica mitocondrial y citoplasmática (Figura 11). El segundo grupo más representado fue fosforilación de proteínas (9%) y se correspondió a receptores tipo serina/treonina-proteínas quinasas LRR, seguido por proteínas de procesamiento de xenobióticos (8%). En este último grupo se identificaron citocromo P450 monooxigenasas y miembros de la superfamilia de transportadores con casetes de unión a ATP, como los receptores de sulfonilurea (SUR). Las vías de señalización intracelular también se encontraron representadas en el 8% de los TDFs identificados, los que fueron agrupados en procesos de unión a GTP y pequeñas proteínas de la familia GTPasas (Tabla 5). Un cuarto grupo de proteínas de transporte transmembrana también alcanzó un 8%. Además, fueron representadas proteínas relacionadas a la respuesta celular de estímulos (5% del total de TDFs): asociadas a familia de beta G-proteínas con respuesta celular a estímulos de daños del ADN y receptores relacionados con la resistencia a enfermedades. Interesantemente, fue identificada una proteína de envoltura y motilidad celular (ELMO) (1%), involucrada en los reordenamientos del citoesqueleto necesarios para la fagocitosis de las células apoptóticas y la movilidad celular. Se identificaron las siguientes proteínas involucradas en procesos redox: transcetolasa, C-terminal/piruvato-ferredoxina oxidorreductasa (1%) y proteína de hierro-azufre Rieske (1%). También se encontraron representados diferentes procesos biológicos tales como: proteínas de unión a ADN (3%), actividad endopeptidasa (2%) y proteínas de almacenamiento (2%) (Figura 11).

Tabla 5. Resultados de búsqueda de secuencia para TDFs obtenidos por cDNA-AFLP de plantas tratadas y control de líneas de girasol R (HA425) e I (1058-1). Se indica para cada secuencia única la longitud total, el nombre de la línea, el grupo de clasificación, la información del mejor resultado, los términos GO asociados y el E-value.

TDF/contig*	Longitud (pb)	Línea	Grupo†	Mejor información encontrada de acuerdo con las búsquedas de Blast2GO y Heliagene; especie, ID; descripción; número de cromosomas; términos GO asociados	E-value
<i>Traducción celular</i>					
Contig 2 (4 TDFs)	146	R/I	G.1a/G.2a /G.2b	<i>Helianthus annuus</i> (Ha412v1r1 12g016810); IPR021138: Proteína ribosomal L18a; Chr12; GO:0006412 Traducción, GO:0003735 Constituyente estructural del ribosoma, GO:0005840 Ribosoma	7e ⁻⁵⁹
Contig 4 (3 TDFs)	140	R/I	G.1a/G.2a	<i>Helianthus annuus</i> (mt_gi_571031384.22) RNA mitocondrial	6e ⁻²⁵
Contig 6 (2 TDFs)	342	I	G.1a/G.2b	<i>Berberis bealei</i> (FJ626461.1); secuencia del gen del ARN ribosómico mt; GO:0006412 Traducción; GO:0006412 Traducción, GO:0003735 Constituyente estructural del ribosoma, GO:0005840 Ribosoma	3e ⁻⁴⁷
2_C/G_5.1	135	I	G.2a	<i>Helianthus annuus</i> (rDNA_gi_563582565.2) RNA Ribosomal Traducción	1e ⁻¹⁵
52_A/T_6.1	149	I	G.2b	<i>Helianthus annuus</i> (rDNA_gi_563582565.2) RNA Ribosomal; GO:0006412 Traducción, GO:0003735 Constituyente estructural del ribosoma, GO:0005840 Ribosoma	2e ⁻⁴⁵
55_G/C_5.1	310	I	G.2a	<i>Helianthus annuus</i> (Ha412v1r1 12g016810); IPR021138: Proteína ribosomal L18a; Chr12; GO:0006412 Traducción, GO:0003735 Constituyente estructural del ribosoma, GO:0005840 Ribosoma	1e ⁻⁰³
55'_G/C_5.2	163	I	G.2a	<i>Helianthus annuus</i> (Ha412v1r1 12g016810); IPR021138: Proteína ribosomal L18a; Chr12; GO:0006412 Traducción, GO:0003735 Constituyente estructural del ribosoma, GO:0005840 Ribosoma	1e ⁻⁰³
66_T/C_1.3	314	I	G.1a	<i>Stipa narynica</i> voucher (KY826235.1) (KRA) S/74/1; Secuencia espaciadora intergénica de ARN ribosómico 26S-18S, GO:0006412 Traducción; GO:0006412 Traducción, GO:0003735 Constituyente estructural del ribosoma, GO:0005840 Ribosoma	2e ⁻³⁶
69_T/C_1.7	310	R/I	G.1a	<i>Cratylia environmental</i> (JX158792.1) muestra clon CEgs305 18S producto de secuencia del gen de RNA ribosómico	2e ⁻¹⁹
<i>Respuesta celular a estímulos</i>					
Contig 3	146	R/I	G.1a/G.2b	<i>Musa acuminata</i> (AY463016.1) cds de RNAm de proteína G de la supuesta familia beta;	2e ⁻⁰⁶

(2 TDFs)				nota= similar a Arabidopsis thaliana transducina/WD-40 repite la proteína familiar; GO:0006261 Replicación de ADN dependiente de ADN, GO:0006974 respuesta celular al estímulo de daño del ADN, GO:0005634 Núcleo	
57_C/A_10.2	239	R	G.2a	<i>Helianthus annuus</i> (Ha412v1r1 10g035760); IPR000767: Proteína de resistencia a enfermedades; IPR017241: Receptor tipo Toll; IPR027417: Bucle P que contiene nucleósido trifosfato hidrolasa; Chr10	1e ⁻⁰³
<i>Proteínas de transporte transmembrana</i>					
Contig 5 (3 TDFs)	159	R/I	G.1a/G.2a	<i>Helianthus annuus</i> (Ha412v1r1 12g038890); IPR026749: Proteína transmembrana 135 (TMEM135); nota= proteína de membrana de múltiples pasos, Chr12	4e ⁻⁴²
13_G/C_5.3	170	R/I	G.2a	<i>Helianthus annuus</i> (XM_022137156.1) RNAm LOC110889593 no caracterizado; pfam15982 TMEM135 C rich; Región rica en cisteína N-terminal de la proteína transmembrana 135; Chr12	3e ⁻⁰⁴
41_G/C_5.1	168	I	G.2a	<i>Helianthus annuus</i> (Ha412v1r1 12g038890); IPR026749: Proteína transmembrana 135 (TMEM135); nota= proteína de membrana de múltiples pasos; Chr12	5e ⁻⁵⁴
<i>Fosforilación de proteínas (quinasas)</i>					
Contig 8 (6 TDFs)	301	R/I	G.1a/G.1b	<i>Panicum hallii</i> (XM_022137156.1) probable serina/treonina-proteína quinasa similar al receptor LRR At2g16250 (LOC112875483); GO:0006468 fosforilación de proteínas; GO:0005515 enlace proteico, GO:0016021 componente integral de membrana	2e ⁻⁴⁹
<i>Vías de señalización intracelular (unión a GTP)</i>					
Contig 9 (3 TDFs)	334	I	G.1a/G.2a	<i>Helianthus annuus</i> (Ha412v1r1 01g020040); IPR001806: Pequeña superfamilia de GTPasa; IPR002041: Ran GTPase Ran pequeño GTPases; IPR005225: Pequeño dominio de proteína de unión a GTP; IPR027417: Bucle P que contiene nucleósido trifosfato hidrolasa; Arf pequeñas GTPasas; Chr1; GO:006913 transporte nucleocitoplasmático; GO:0005525 Enlace GTP, GO:0003924 Actividad de GTPasa	7e ⁻³³
12_G/A_4.1	134	I	G.2a	<i>Helianthus annuus</i> (Ha412v1r1_13g044020); IPR002867: Dedo de zinc, Tipo C6HC; IPR016398: E3 ubiquitina-proteína ligasa p28; Pequeña GTPasas tipo Ras. Proteínas de unión a GTP involucradas en vías de señalización; Chr13; GO:0016881 actividad ligasa ácido-aminoácido	1e ⁻⁰³
54_G/A_4.3	168	I	G.2a	<i>Helianthus annuus</i> (Ha412v1r1 01g020040); IPR001806: Pequeña superfamilia de GTPasa; IPR002041: Ran GTPase Ran pequeño GTPases; IPR005225: Pequeño dominio de proteína de unión a GTP; IPR024156: Pequeña superfamilia de GTPasa, Tipo ARF; Chr1; GO:006913 transporte nucleocitoplasmático, GO:0005525 Enlace GTP, GO:0003924 Actividad GTPasa	7e ⁻²⁰

Procesamiento de xenobióticos

27_T/A_8.5	131	R	G.1a	<i>Helianthus annuus</i> (Ha412v1r1 04g010280); IPR001128: Citocromo P450; IPR012677: Arreglo alfa-beta de unión a nucleótidos; Chr4; GO:0055114 proceso de oxidación-reducción, GO:0020037 enlace hemo, GO:0005506 enlace de iones de hierro	1e ⁻⁰³
44_C/G_8.1	229	R/I	G.1a	<i>Helianthus annuus</i> (Ha412v1r1 01g001750); IPR000844: Receptor de sulfonilurea, tipo 1; IPR027417: Bucle P que contiene nucleósido trifosfato hidrolasa; Casete de unión a ATP subfamilia C; Chr1; GO:0006813 transporte de iones de potasio, GO:0008281 actividad del receptor de sulfonilurea, GO:0005524 ATP vinculante, GO:0016020 membrana	2e ⁻¹²
45_C/T_8.2	194	R	G.1a	<i>Helianthus annuus</i> (Ha412v1r1 04g013760); IPR001128: Citocromo P450; Chr4; GO:0055114 proceso de oxidación-reducción, GO:0020037 enlace hemo, GO:0005506 enlace de iones de hierro, GO: 0016705 actividad oxidorreductasa	1e ⁻⁰⁴
47_T/A_7.1	247	R/I	G.1a	<i>Helianthus annuus</i> (Ha412v1r1 13g015200); IPR001128: Citocromo P450; Chr13; GO:0055114 proceso de oxidación-reducción, GO:0020037 enlace hemo, GO:0005506 enlace de iones de hierro, GO: 0016705 actividad oxidorreductasa	8e ⁻⁰⁴
61_T/G_7.4	185	R	G.1a	<i>Helianthus annuus</i> (Ha412v1r1 01g001750); IPR000844: Receptor de sulfonilurea, tipo 1; IPR027417: Bucle P que contiene nucleósido trifosfato hidrolasa; Casete de unión a ATP subfamilia C; Chr1; GO:0006813 transporte de iones de potasio, GO:0008281 actividad del receptor de sulfonilurea, GO:0005524 ATP vinculante, GO:0016020 membrana	3e ⁻⁴⁹

Proteínas de unión a ADN

36_T/C_8.1	176	R	G.1a	<i>Helianthus annuus</i> (Ha412v1r1 00g059140); IPR000558: Histona H2B; IPR009072: Pliegue de histona; GO:0003677 Unión de DNA, GO:0046982 actividad de heterodimerización de proteínas, GO:0000786 Nucleosoma	1e ⁻⁰³
53_A/T_6.3	178	I	G.2b	<i>Helianthus annuus</i> (Ha412v1r1 07g001070); IPR025927: Dominio potencial de unión al DNA; Chr7	1e ⁻⁰³

Fagocitosis, envoltura

37_T/C_8.6	250	R	G.1a	<i>Helianthus annuus</i> (Ha412v1r1_16g003620); IPR006816: Engullimiento/motilidad celular, dominio ELMO (Engulfment and Cell Motility); Chr16; GO:0005525 Enlace GTP	1e ⁻⁰³
------------	-----	---	------	---	-------------------

Procesos redox: Transcetolasa

59_T/G_3.1	204	R/I	G.1a	<i>Helianthus annuus</i> (Ha412v1r1 04g041750); IPR005478: Transcetolasa, similar a una bacteria; IPR009014: Transcetolasa, terminal C/piruvato-ferredoxina oxidorreductasa, dominio II; Chr4; GO:0004802 actividad transcetolasa; GO:0003824 actividad catalítica	2e ⁻⁰⁴
------------	-----	-----	------	--	-------------------

Procesos óxido reducción

60_T/G_7.3	316	R	G.1a	<i>Helianthus annuus</i> (Ha412v1r1 06g017020); IPR014349: Proteína de hierro-azufre de Rieske, Chr6; GO:0055114 proceso de oxidación-reducción, GO:0016679 actividad oxidorreductasa, que actúa sobre los difenoles	1e ⁻⁰⁴
------------	-----	---	------	--	-------------------

Actividad endopeptidasa

63_T/G_7.2	310	R/I	G.1a	<i>Helianthus annuus</i> (Ha412v1r1 02g034070); IPR006639: Presenilina/péptido señal peptidasa; nota= péptido señal peptidasa (SPP) familia de proteasas aspárticas; Chr2; GO:0004190 actividad endopeptidasa de tipo aspártico; GO:0016021 componente integral de la membrana	1e ⁻³
------------	-----	-----	------	--	------------------

Proteínas de almacenamiento

64_G/G_2.1	156	I	G.1a	<i>Helianthus annuus</i> (Ha412v1r1_10g005990); IPR006044: Proteína de almacenamiento de semillas 11-S; Chr10; GO:0045735 actividad del reservorio de nutrientes	1e ⁻¹⁰
------------	-----	---	------	--	-------------------

Proteínas de función desconocida

42_C/A_10.1	217	R	G.2a	<i>Helianthus annuus</i> (Ha412v1r1 10g050670) proteína no caracterizada; Chr10	1e ⁻⁰³
51_C/C_7.6	239	R	G.1a	<i>Helianthus annuus</i> (Ha412v1r1 03g020890) proteína no caracterizada; Chr3	1e ⁻⁰³

No asignado

Contig 1	142	R	G.2a	N/A	
Contig 7	202	I	G.1a/G.2a	N/A	
Contig 10	204	R	G.1a/G.2a	N/A	
Contig 11	159	R/I	G.1a	N/A	
32_G/C_6.3	249	R/I	G.1b/G.2b	N/A	
60'_T/G_7.3	244	R	G.1a	N/A	
62_T/G_10.1	141	R	G.2a	N/A	
65_T/C_1.2	276	R	G.1a	N/A	
67_T/C_1.4	296	I	G.1a	N/A	
70_T/C_1.7	253	R/I	G.1a	N/A	

* La nomenclatura TDF incluye el número de banda (1 a 73), las bases selectivas de la combinación de cebadores *MseI/CviAI* y el número final corresponde a la columna de la combinación de cebadores que le dio origen y luego del punto el valor de banda según su posición en dicha columna. Contig 1: 6_C/G_10.1, 30_C/C_10.2, 46_T/A_10.1; Contig 2: 14_C/G_5.4, 11_A/T_6.4, 7_A/C_4.2, 8_A/C_4.3; Contig 3: 15_G/C_6.1, 16_G/C_6.2; Contig 4: 18_C/A_4.2, 17_C/A_4.1, 58_T/G_1.3; Contig 5: 22_A/A_4.1, 31_A/C_4.1, 10_A/G_5.1; Contig 6: 23_T/G_1.4, 43_C/G_10.1; Contig 7: 1_C/G_4.1, 25_T/G_3.3; Contig 8: 5_C/C_8.3, 29_C/C_8.4, 34_G/C_8.1, 35_G/C_8.2, 39_C/C_8.2, 9_A/C_7.1; Contig 9: 40_G/A_4.2, 21_C/A_5.3, 56_C/A_8.1; Contig 10: 48_T/A_7.1, 49_T/A_8.7; Contig 11: 65'_T/C_1.2, 68_T/C_1.5.

‡ G.1 indica TDFs detectados en plantas tratadas, y G.2 en plantas control; a, TDFs detectados a partir de 10 o 13 dpt, y b, TDFs detectados a los 16 dpt.

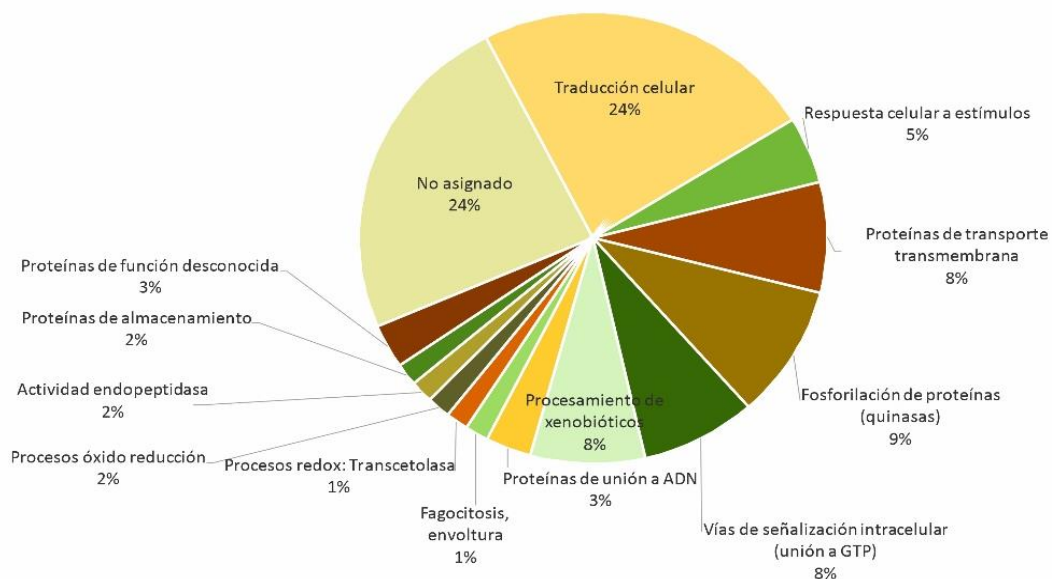


Figura 11. Categorías asignadas por procesos biológicos GO a través de las herramientas HeliGene y Blast2GO a las 42 secuencias únicas de 73 DETDFs e identificados por análisis de cDNA-AFLP. Las transcripciones se aislaron de anteras en desarrollo tratadas con dosis 2X de imazapir y plantas control de genotipos HA425 (R) y 1058-1 (I). Después del análisis de conglomerados, se clasificaron las secuencias únicas utilizando el algoritmo de la herramienta de búsqueda de alineación local básica contra el transcriptoma de girasol (HeliGene) y se complementó el análisis usando el software automático de bioinformática Blast2GO contra la colección de nucleótidos no redundante (nr) de la base de datos de plantas con flores (taxid: 3398). Se indican los porcentajes de secuencias únicas representadas en cada categoría GO.

4.6 RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

La expresión relativa de cuatro TDFs se analizó por qRT-PCR. Tres de las secuencias analizadas se categorizaron dentro del grupo G.1 (23_T/G_1.4, 60_T/G_7.3, y 45_C/T_8.2) y correspondían a transcritos inducidos por el tratamiento en el genotipo R (60_T/G_7.3, y 45_C/T_8.2) y el I (23_T/G_1.4). Una secuencia formó parte del grupo G.2, y correspondió a un TDF cuya expresión se vio reprimida por el tratamiento en el genotipo R (6_C/C_10.1) (Tabla 5). Se diseñaron cebadores específicos para cada uno de los transcritos y se evaluó su expresión junto a tres genes de referencia (ACT, UNK2 y MIR156) los cuales fueron previamente validados como panel normalizador óptimo para tejido reproductivo de girasol (Ochogavía *et al.*, 2017). Se evaluaron dos réplicas biológicas y tres réplicas técnicas por muestra y determinación. Los tres genes de referencia presentaron valores de eficiencia máxima, siendo 0,99, 1 y 0,98 para ACT, UNK2 y MIR156, respectivamente. Además, los genes normalizadores presentaron un porcentaje

óptimo de coeficiente de variación (<5%) en los valores de Cq entre todas las muestras y réplicas analizadas (4,03%, 4,34% y 4,36% para ACT, UNK2 y MIR156, respectivamente). La expresión de los genes de interés se calculó considerando el factor de normalización comprendido por la mediana de la expresión normalizada de cada uno de los genes de referencia, según se describe en materiales y métodos.

La expresión relativa de los tres TDFs seleccionados y aislados en plantas tratadas fue confirmada por RT-qPCR, ya que se detectó una expresión seis veces mayor del citocromo P450 (45_C/T_8.2) en relación al R Control 13 dpt (p-valor= 0,0157), dos veces de la proteína de hierro azufre de Rieske (60_T/G_7.3) con respecto al R Control 10 dpt (p-valor= 0,469) y siete veces de la mt proteína ribosómica (23_T/G_1.4) comparado con el I Control 10 dpt (p-valor<0,0001) (Figura 12). De manera similar, la expresión relativa del TDF no clasificado (6_C/C_10.1) aislado de las plantas control en el genotipo R presentó una expresión cuatro veces superior en plantas control respecto a las plantas tratadas (p-valor= 0,0417) (Figura 12).

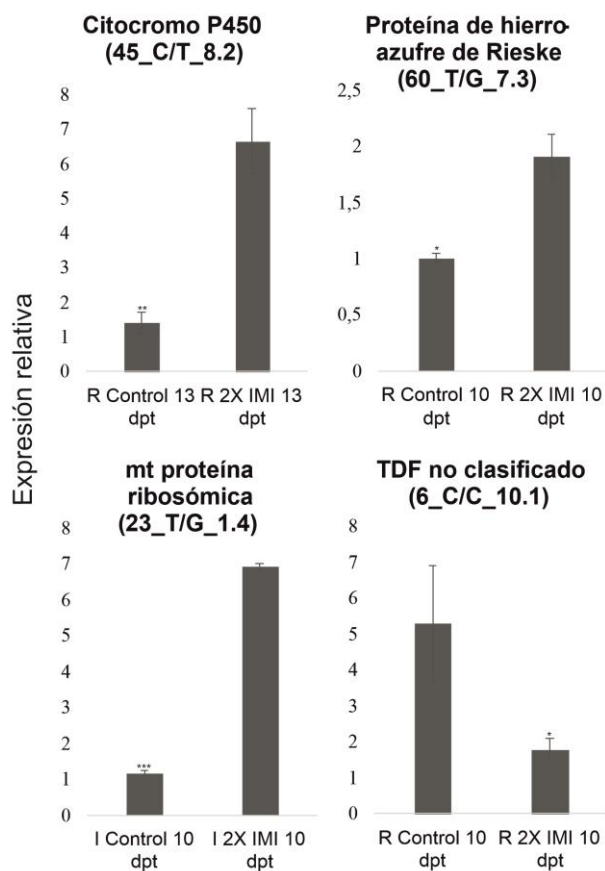


Figura 12. Expresión relativa de los TDF seleccionados, inducidos y reprimidos por el tratamiento, en genotipos completamente resistentes (R) y de resistencia intermedia (I). Las barras representan la expresión relativa y el error estándar de las muestras comparadas. El asterisco representa diferencias significativas obtenidas por la prueba t de Student: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001. dpt, días posteriores al tratamiento.

5 DISCUSIÓN

La disponibilidad de herbicidas selectivos para girasol es realmente limitada debido al alto costo de registro, siendo baja la probabilidad de desarrollo exclusivo para dicho cultivo (Sala y Bulos, 2012a). Por lo que el descubrimiento y el desarrollo de la tolerancia a herbicidas como sulfonilureas o imidazolinonas en este caso, lograron una adecuada herramienta para favorecer el control de malezas, evitando cultivares transgénicos. Las mutaciones favorecen dos tipos de tolerancia a herbicidas, las sitio específicas (baja sensibilidad al herbicida) y las sitio no específicas (que involucran diferentes mecanismos como reducción de translocación de herbicidas, secuestro de moléculas de químicos en vacuolas o apoplastos, incremento de detoxificación).

La androesterilidad inducida por químicos es una herramienta valiosa para la optimización del tiempo en los programas de mejoramiento. En girasol, se demostró que las imidazolinonas podrían comportarse como un agente de hibridación, ya que la aplicación de imazetapir o imazapir durante las primeras etapas del desarrollo reproductivo inducen androesterilidad en líneas de girasol resistentes a IMI (Sala y Bulos, 2012b; Ochogavía *et al.*, 2018; Ochogavía *et al.*, 2020). En su estudio, Sala y Bulos (2012b) proponen por primera vez la implementación de estos herbicidas como agente de hibridación, y de esta forma plantean un método alternativo que favorece el testeo de líneas mantenedoras, brindando versatilidad, gran capacidad de adopción, como un posible y rápido cambio del background del tester a implementar en un programa de mejora. Estos autores plantearon que la esterilidad inducida podría ser manipulada con la dosis de herbicida y el estado de desarrollo de la planta. Para ello evaluaron el efecto de la aplicación de imidazolinonas en 15 líneas mantenedoras (cinco genotipos con el locus *ahas1* – susceptibles, CLPlus e Imisun homocigota como heterocigota – con tres backgrounds diferentes). A su vez, los genotipos CLPlus heterocigotas no mostraron síntomas a nivel de planta completa y presentaron androesterilidad. Por lo que dos líneas heterocigotas *ahas1-3* fueron cruzadas con líneas susceptibles evaluando la obtención de híbridos y corroborando que la progenie heterocigota presentaba androesterilidad luego del tratamiento con imidazolinonas.

Sin embargo, los mecanismos biológicos y moleculares implicados en la androesterilidad inducida por imidazolinonas aún están en estudio. Informes anteriores de nuestro grupo de trabajo han proporcionado la primera evidencia del efecto citocida de imazapir en tejidos de anteras de girasol resistente. Se han informado daños en el tejido esporogénico en los genotipos R e I tratados (genotipos HA425 y 1058-1, respectivamente), pero el desarrollo acelerado de polen solo

se ha asociado a plantas I tratadas (Ochogavía *et al.*, 2020). Se propuso un mecanismo hipotético en el que la inhibición de AHAS induce la carencia de aminoácidos, lo que lleva a la destrucción de los plastidios y la muerte celular autofágica en el tejido microsporogénico (Ochogavía *et al.*, 2018; 2020). Este mecanismo también se ha relacionado con los efectos citocidas de las dosis subletales de los herbicidas inhibidores de AHAS en plantas susceptibles de colza y *Arabidopsis*. Un claro ejemplo citocida es el que menciona Li *et al.* (2015), mediante el cual lograron generar y caracterizar la obtención de híbridos de colza al inducir androesterilidad a través del uso de dosis subletales de tribenuron metil, herbicida del grupo B. Cuantificaron la actividad AHAS *in vitro*, determinando y caracterizando el origen de la resistencia. La misma se debió a una mutación en un único gen dominante, *BnaA.ahas3.a*. Pudieron inferir que las líneas resistentes mantienen la androesterilidad, demostrando que el mutante podría usarse de manera segura como un progenitor masculino con androesterilidad inducida por químicos para la producción de semillas híbridas. Por otro lado, Zhao *et al.* (2015) aplicaron tribenuron metil sobre hojas de colza y *Arabidopsis*, lo que inhibió la síntesis de aminoácidos ramificados al tener como objetivo la subunidad catalítica CSR1 de la enzima AHAS, liderando la muerte celular autofágica. Los autores postularon un modelo por el cual se generaría la inducción de androesterilidad: el herbicida es absorbido y translocado por floema hacia las anteras (sitio de mayor concentración de herbicida), llevando a muerte celular autofágica, donde el contenido citoplasmático en microsporas es abortado dando granos de polen aberrantes y finalmente androesterilidad. En el año 2017, Liu *et al.* reportaron un estudio citológico, transcriptómico y fisiológico sobre la aplicación de amidosulfuron como inhibidor de AHAS en colza. Estos autores notaron clorosis, reducción de la elongación y disminución de la fotosíntesis los primeros días luego de la aplicación, como afección de plastidios de las células del tapetum y microsporas uninucleadas que mostraron vacuolas autofágicas, y también una rápida deformación. A su vez, la regulación transcriptómica estuvo correlacionada con las alteraciones citológicas y fisiológicas, lo cual les permitió proponer mecanismos moleculares de androesterilidad inducida mediante la exposición de las plantas a sulfonilureas.

En girasol, Ochogavía *et al.* (2018) demostraron que la expresión de *ahas1*, gen responsable de la resistencia a imidazolinonas, se reduce enormemente en anteras tratadas de girasoles Imisun. Esto indica que el tejido reproductivo masculino es susceptible al herbicida, incluso en plantas resistentes. Además, se hallaron efectos sobre plantas tratadas a nivel fisiológico como reducción del número de granos de polen por flor, de semillas viables, cambios morfológicos y citoembriológicos como aceleración del desarrollo del gametofito, anteras afectadas revelado a través de microscopía confocal y diferentes patrones de expresión en la familia de genes *ahas*.

El presente trabajo de tesis comprendió la identificación y caracterización de transcritos diferencialmente expresados e involucrados en la androesterilidad inducida por imazapir en dos líneas de girasol Imisun (R e I) para indagar la base molecular de dicha androesterilidad. Además, se evaluó el efecto del gen *Imr2* sobre esta inducción, ya que el mecanismo de resistencia a imidazolinonas por modificación del sitio de unión al herbicida está presente en el genotipo I (*Imr1Imr1imr2imr2*), sin embargo, una combinación de mecanismos de resistencia por modificación del sitio de unión y mecanismos de resistencia no asociados a la modificación del sitio de unión de la enzima AHAS confieren resistencia al genotipo R (*Imr1Imr1Imr2Imr2*) (Kolkman *et al.*, 2004).

La inducción de androesterilidad se confirmó en ambos genotipos mediante enfoques fisiológicos y anatómicos sobre el desarrollo de los granos de polen. Los efectos herbicidas del tratamiento con imazapir 2X se evidenciaron a nivel de toda la planta en ambos genotipos, donde la clorosis y la deshidratación fueron los síntomas comúnmente observados. El número de granos de polen por flor y el porcentaje de semillas viables se vieron notablemente disminuidos por el tratamiento, lo que se relaciona con lo reportado por Ochogavía *et al.* (2018). Durante la antesis (fenofase R5, Scheniter y Miller, 1981), no fue posible visualizar los granos de polen sobre los capítulos de las plantas tratadas debido a que el número de granos de polen por flor se redujo significativamente ($p\text{-valor} < 0,001$) con respecto a las plantas control. Estos resultados son consistentes con las publicaciones previas, donde se obtuvieron niveles crecientes de androesterilidad mediante la aplicación de diferentes concentraciones de imazapir (Ochogavía *et al.*, 2020). En el presente trabajo, tanto la exomorfología como la viabilidad del polen no se vieron mayormente afectadas. Si bien se detectaron diferencias significativas ($p\text{-valor} < 0,05$) en la viabilidad de los granos de polen de plantas tratadas y control, esta se mantuvo en niveles elevados. Sin embargo, dada la marcada reducción del número de granos de polen por flor inducida por el tratamiento ($p\text{-valor} < 0,01$) se obtuvo un porcentaje mínimo de semillas viables en las plantas tratadas de ambos genotipos (alrededor del 10%, Figura 7). El desarrollo del polen fue significativamente alterado por el tratamiento, ya que el análisis de microscopía DIC reveló la ausencia completa de microsporocitos en algunas regiones de las tecas de las plantas tratadas en ambos genotipos, caso similar al reportado por Ochogavía *et al.* (2018).

La evaluación a nivel transcriptómico se llevó a cabo mediante cDNA-AFLP en los genotipos R e I, en las tres etapas de desarrollo más informativas durante la maduración de las anteras (10, 13 y 16 dpt) (Ochogavía *et al.*, 2018). Se identificaron un total de 948 TDFs, de los cuales un tercio provino de R y dos tercios del genotipo I. Los patrones de bandas se clasificaron en dos

grupos principales: inducidos por el tratamiento (G.1) y reprimidos por el tratamiento (G.2). Cada grupo también se subdividió de acuerdo con la etapa de desarrollo: transcritos expresados tempranamente, 10 y/o 13 dpt (a) y tardíamente, 16 dpt (b).

Las variaciones transcriptómicas inducidas por el tratamiento con imazapir fueron intrínsecamente diferentes para cada genotipo. El 75% de los TDFs aislados en el genotipo R fueron inducidos por el tratamiento (G.1), mientras que el 54% de los TDFs I fueron reprimidos por el tratamiento (G.2). Además, la mayoría de los TDFs representados se expresaron en las primeras etapas de desarrollo (10 y/o 13 dpt), lo que sugiere una inducción inmediata de los transcritos específicos en el genotipo R después del tratamiento, y una inhibición rápida en el genotipo I.

Se secuenciaron un total de 73 TDFs y se agruparon en 42 secuencias únicas. Los transcritos inducidos por el tratamiento (G.1) detectados en el genotipo R incluían TDFs relacionados a fosforilación de proteínas, procesamiento de xenobióticos, procesos redox transcetolasa, actividad endopeptidasa de tipo aspártico, procesos óxido reducción y fagocitosis/envoltura. Sin embargo, los TDFs detectados exclusivamente en el genotipo R fueron asociados a proteínas de hierro-azufre de Rieske vinculadas a procesos de óxido reducción que generan un potencial electroquímico ligado a la síntesis de ATP (60_T/G_7.3). También se identificaron transcritos homólogos a la proteína de envoltura/motilidad celular (ELMO) (37_T/C_8.6) exclusivamente inducidos en R luego del tratamiento (Tabla 5, Figura 13). Curiosamente, las proteínas de dominio ELMO fueron asociadas a los procesos de reordenamiento del citoesqueleto durante la fagocitosis de las células apoptóticas y la motilidad celular en diferentes organismos (Gumienny *et al.*, 2001; Bowzard *et al.*, 2007). Históricamente, la autofagia y la fagocitosis se consideran vías separadas, pero estudios recientes han revelado la participación directa de las proteínas en la autofagia y la fagocitosis (Florey y Overholtzer, 2012). Como se mencionó anteriormente, la muerte celular autofágica se ha asociado a los efectos gametocitocidas de los herbicidas inhibidores de AHAS en Brassica y Helianthus (Zhao *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017; Ochogavía *et al.*, 2018; Ochogavía *et al.*, 2020). Recientemente, se ha informado que una proteína relacionada con el autofagosoma (ATG8A) se induce en flores de colza androestériles rociadas con amidosulfuron, un herbicida inhibidor de AHAS (Liu *et al.*, 2017).

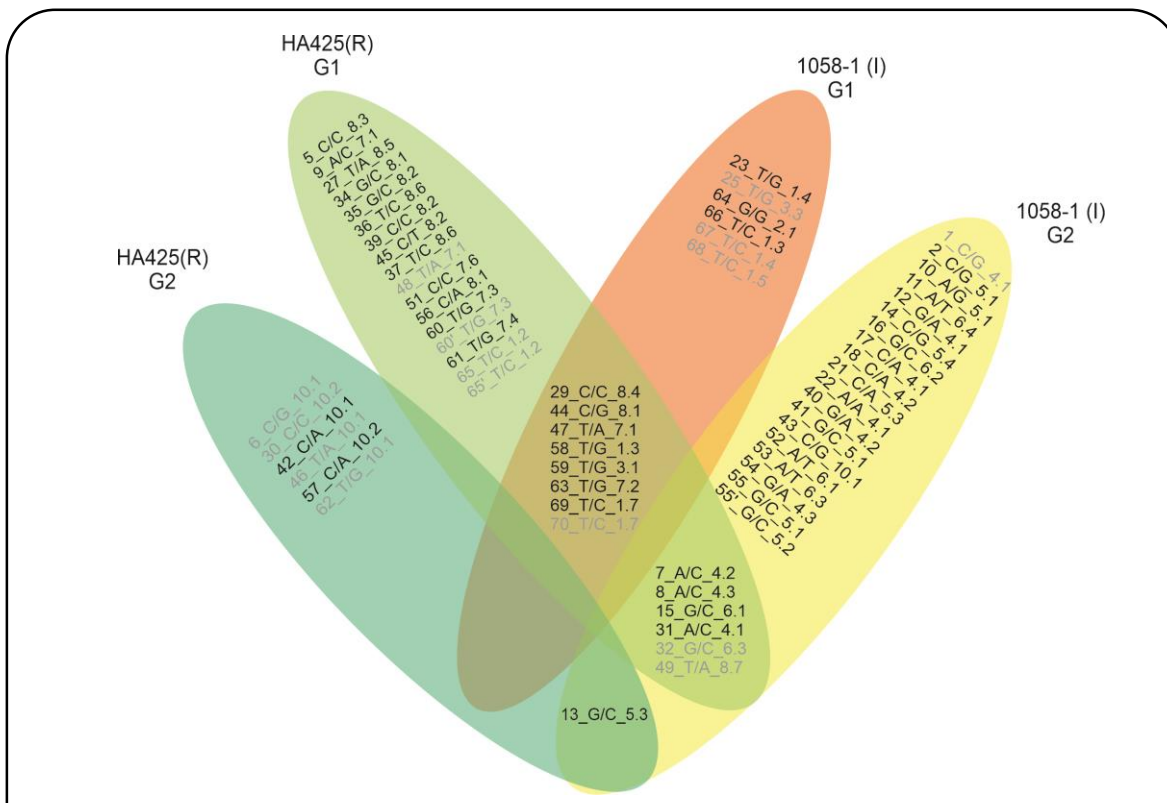


Figura 13. Representación esquemática de los TDFs aislados de anteras de genotipos R (HA425) e I (1058-1). Los TDFs se incluyen en círculos: G.1, inducidos por el tratamiento; G.2, reprimidos por el tratamiento. Las intersecciones correspondieron a TDFs que se identificaron simultáneamente en ambos grupos. Los nombres de TDFs que eran homólogos a secuencias conocidas están en negro, los TDFs sin identidad asignada están en gris.

Los transcritos que no sólo estaban presentes en G.1 para el genotipo R sino también en el I fueron proteínas quinasas serina/treonina tipo receptor LRR involucradas en la fosforilación de proteínas (29_C/C_8.4); familias de proteínas del metabolismo de xenobióticos, tales como las citocromo P450 monooxigenasas (47_T/A_7.1) y las proteínas transportadoras del tipo ABC Receptores de Sulfonilureas SUR 1 (44_C/G_8.1); proteínas de actividad transcetolasa (59_T/G_3.1) y endopeptidasa de tipo aspártico (63_T/G_7.2) (Tabla 5, Figura 13). Los receptores SUR son proteínas de membrana, miembros de la superfamilia portadoras de casetes de unión a ATP (ABC), que regulan la actividad del canal de potasio/ATP y la homeostasis celular (Burke *et al.*, 2008). Estas proteínas se han relacionado con la respuesta al estrés por NaCl en *Arabidopsis* (Lee *et al.*, 2004). Las proteínas de metabolismo de xenobióticos se han informado previamente como parte del mecanismo de resistencia no asociado al sitio activo de la enzima (NTSR) en girasol Imisun (Kaspar *et al.*, 2011; Breccia *et al.*, 2017; Gil *et al.*, 2018; Vega *et al.*, 2020). El NTSR previene el efecto nocivo xenobiótico al reducir las moléculas de herbicida que

alcanzan el sitio activo (Petit *et al.*, 2010). Entre los trabajos más relevantes desarrollados en base al estudio del NTSR en girasol podemos mencionar los siguientes: Kaspar *et al.* (2011); Breccia *et al.* (2017); Gil *et al.* (2018); Vega *et al.* (2020), entre otros. Kaspar *et al.* (2011) intentaron seleccionar una línea de girasol con tolerancia a múltiples herbicidas y determinar si esa condición era revertida por el malatión, inhibidor de la enzima P450 monooxigenasa. Estos autores evaluaron 90 líneas endocriadas para descubrir alguna resistente, hallaron una con estas características: ToIP450-1, la caracterizaron en invernadero y a campo, sometiendo a tratamientos de imazamox, prosulfurón y atrazina en diferentes estadios (Kaspar *et al.*, 2011). En todos los casos comprobaron que la resistencia se revertía con el inhibidor de la enzima P450. Otro de los estudios que contribuyó a dilucidar la función de la enzima P450 sobre los herbicidas inhibidores de AHAS fue el publicado por Breccia *et al.* (2017), basado en la evaluación de la contribución del NTSR a la resistencia a imidazolinonas en girasol Imisun. Evaluaron el rol del P450 al combinar la aplicación de herbicida con un inhibidor de dicha proteína como el malatión. Encontraron que el proceso metabólico que desencadena dicha proteína, reduce la eficiencia del herbicida y aporta a la resistencia de los girasoles Imisun. Por otro lado, Gil *et al.* (2018) llevaron a cabo un estudio para evaluar el perfil de transcripción por cDNA-AFLP de la resistencia a imidazolinonas generada por el NTSR de girasol Imisun. Pudieron determinar la concentración óptima de herbicida, duración del tratamiento y nivel de inhibición de AHAS para detectar los cambios transcriptómicos. Hallaron importantes proteínas como la P450 y transportadores ABC asociadas a metabolismos de xenobióticos y estrés. Vega *et al.* (2020) también llevaron a cabo un estudio de respuesta a estrés y mecanismos de detoxificación involucrados en NTSR, evaluando el perfil proteico usando imazetapir y aminobenzotriazol o butóxido de piperonilo como inhibidores de la P450, sobre líneas de resistencia completa e intermedia. Obtuvieron un aumento de la fitotoxicidad en líneas resistentes sometidas a inhibidores, lo que concordó con lo propuesto por los otros autores. También vieron cambios con el tratamiento con imazetapir en la expresión de proteínas relacionadas con el estrés, glutatión S - transferasas y citocromo P450, entre otras.

Asimismo, los transcritos de expresión temprana e inducidos por el tratamiento (G.1) que fueron detectados en el genotipo I incluyeron proteínas ribosomales y proteínas de almacenamiento, aunque sólo la proteína asociada a funciones de almacenamiento fue detectada de manera exclusiva en el genotipo de resistencia intermedia (Tabla 5, Figura 13).

Por otro lado, un grupo de transcritos ausentes en las anteras tratadas se aislaron de estos tejidos de las plantas control (G.2). Este grupo estaba principalmente representado en el genotipo I e incluía los transcritos inhibidos o regulados negativamente por el tratamiento con imazapir.

Dicho grupo estuvo conformado por proteínas ribosómicas; varias proteínas de transporte transmembrana; pequeñas proteínas involucradas en la señalización intracelular por la unión a GTP; familia beta de las proteínas G y proteínas de unión al ADN (Tabla 5, Figura 13). El grupo de proteínas de señalización intracelular incluyó varias GTPasas pequeñas de tipo Ras y Arf, miembros de la superfamilia de pequeñas GTPasas. Aparentemente, las pequeñas GTPasas se conservan en todos los organismos como interruptores moleculares críticos para la modulación de muchas rutas y funciones de señalización específicas (Yang, 2002). Se ha demostrado que algunas GTPasas pequeñas se localizan en vacuolas en desarrollo y se acumulan preferentemente en el tapetum, las células microsporogénicas y los tejidos vasculares en las plantas (Li *et al.*, 2001). Aunque las pequeñas proteínas GTPasa Ran no se han estudiado en plantas, se sabe que regulan el tráfico de ARN y proteínas a través de los poros nucleares en otros organismos y se requieren proteínas Arf para la formación de vesículas en el sistema secretor de las plantas (Yang, 2002). Si bien todas estas proteínas estaban principalmente representadas en este grupo, también se pudo identificar un único transcripto homólogo en el grupo G.1 del genotipo R.

Curiosamente, una única proteína (TDF 13) presente en plantas control y ausente en tratadas se expresó en ambos genotipos. Siendo la proteína homóloga a un transportador transmembrana (13_G/C_5.3).

De este modo, los mecanismos más representados en el genotipo R (HA425) fueron fosforilación de proteínas (receptores quinasas de normalmente alta expresión en tejidos reproductivos, que suelen activar, desactivar o alterar las funciones proteicas al generar un cambio en su conformación) y procesamiento de xenobióticos (representado por enzimas citocromo P450, una superfamilia de monooxigenasas con funciones de biosíntesis de compuestos como hormonas, compuestos defensivos, ácidos grasos; y receptores de sulfonilureas SUR1: miembros de la familia de transportadores ABC, reguladores del canal ATP de potasio). Mientras que para el I (1058-1) los principales fueron las vías de señalización intracelular mediadas por GTPasas (regulan el transporte mediado por receptores entre el núcleo y el citoplasma, involucrándose en síntesis, procesamiento, exportación de ARN, siendo un punto de control del ciclo celular); el transporte transmembrana (con funciones estructurales en canales transportadores de iones, recepción de señales celulares); y la traducción (proteínas ribosomales).

Un grupo de TDFs tuvieron un comportamiento singular, siendo identificadas en G.1 R y G.2 I. Entre estas se clasificaron proteínas asociadas a la traducción, de transporte de membrana (31_A/C_4.1) y de respuesta a estímulos (15_G/C_6.1).

Dado que ambos genotipos cuentan con el mismo mecanismo de resistencia asociado al sitio de acción de la enzima y que la diferencia entre ambos es que el genotipo R presenta además un mecanismo NTSR, los transcritos inducidos o reprimidos por el tratamiento en ambos genotipos simultáneamente serían los que están involucrados en la propia vía de androesterilidad inducida dado que su expresión diferencial es independiente de la presencia del mecanismo NTSR. Como se detalló anteriormente, dentro de los mecanismos inducidos por el tratamiento en ambos genotipos encontramos procesamiento metabólico de xenobióticos, traducción celular y fosforilación de proteínas, a su vez, otros procesos como los de oxidorreducción a través de la enzima transcetolasa (cataliza la transferencia reversible de una unidad cetol a un receptor de aldosa, siendo un vínculo entre las vías glucolíticas y pentosafofato) y actividad endopeptidasa de tipo aspártico (permiten liberar péptidos biológicamente importantes). Finalmente, el único proceso biológico que fue compartido a nivel del grupo G.2, regulados negativamente por el tratamiento en ambos genotipos, fue el de proteínas de transporte transmembrana.

Nuestros resultados coinciden con la bibliografía publicada anteriormente. Se ha informado que el tratamiento con imazetapir induce la expresión inmediata de genes de desintoxicación en *Arabidopsis*, pero los genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos, metabolitos secundarios y ARNt se regulan positivamente en etapas posteriores (Manabe *et al.*, 2007). Según nuestros hallazgos, es posible sugerir un modelo preliminar de acción para el efecto gametocida del imazapir en los genotipos analizados. En primer lugar, postulamos que la toxicidad del herbicida induce la expresión de proteínas implicadas en los mecanismos NTSR en el genotipo R, pero también induce proteínas asociadas a detoxificación en el genotipo I, reduciendo el número de moléculas que llegan a la enzima AHAS. Posteriormente, dado que el pool de enzimas AHAS es principalmente susceptible al herbicida en anteras de girasol resistente (Ochogavía *et al.*, 2014), la inhibición efectiva de la enzima AHAS da como resultado la inanición de los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) en el desarrollo de tejido esporogénico y células del tapetum. Se demostró previamente en genotipos de colza tratados con inhibidores de AHAS, que el desequilibrio de la reserva de aminoácidos en estos tejidos que presentan altas tasas metabólicas disminuye la síntesis de proteínas, la transcripción del ARN y la replicación del ADN, pero también induce la muerte celular autofágica excesiva (Liu *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2015). La identificación de transcritos homólogos a proteínas asociadas a la muerte celular autofágica en

nuestro estudio permite deducir que un mecanismo análogo al reportado en colza estaría teniendo lugar en las anteras tratadas. Además, las microsporas en desarrollo absorben nutrientes del tapetum, una capa interna de células en el lóculo de la antera. Durante la maduración de las microsporas los plástidos se someten a una reorganización estructural intensiva (Carrizo Garcia *et al.*, 2017). La inducción de transcriptos asociados a procesos oxidorreducción en nuestro estudio estarían asociados a los cambios en el metabolismo de plástidos en las microsporas de plantas tratadas.

6 CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en el marco de cada objetivo específico planteado de este trabajo de tesis permitieron detectar las primeras evidencias sobre las posibles bases moleculares y fisiológicas del mecanismo de androesterilidad inducido por el tratamiento con dosis elevadas de imidazolinonas en estadios vegetativos tardíos en plantas de girasol resistentes.

La aplicación de herbicida redujo el número de granos de polen por flor, alteró su exomorfología y su viabilidad, y disminuyó el número de semillas viables producidas por autofecundación. Se comprobó un importante daño del tejido esporogénico, lo cual afectó la microgametogénesis.

Los resultados presentados en cuanto al estudio transcriptómico indican que la androesterilidad en plantas de girasol Imisun tratadas con imazapir puede estar asociada a genes que desencadenan tres mecanismos principales tras la aplicación de doble dosis de campo en estadio vegetativo tardío: inducción de mecanismos de detoxificación; inhibición de la biosíntesis de proteínas y la transcripción del ARN durante la microsporogénesis y la microgametogénesis seguida de muerte celular autofágica en microsporas; y alteraciones del metabolismo de los plastidios en microsporas y células del tapetum.

Sin embargo, resulta necesario realizar estudios adicionales para identificar las interconexiones moleculares entre las rutas propuestas. Nuestra investigación proporciona las bases para identificar el modo de acción de la androesterilidad inducida por químicos gametocidas en girasol, contribuyendo a ampliar la frontera del conocimiento sobre una nueva herramienta para la producción de semillas híbridas que en el mediano plazo podría ser aplicado para la optimización de los programas de mejoramiento de cultivos de girasol.

7 CONSIDERACIONES Y PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos permitieron construir las primeras evidencias en cuanto al mecanismo molecular de inducción de androesterilidad por el tratamiento con imidazolinonas. Se indagaron las bases tanto a nivel fisiológico como transcriptómico, continuando la investigación del grupo de trabajo de la facultad.

La perspectiva en el corto plazo contempla poder detectar las principales vías de inducción de androesterilidad y sus interconexiones por medio de un análisis transcriptómico completo, evaluando el transcriptoma de los dos genotipos bajo estudio (HA425 y 1058-1) en las dos condiciones de tratamiento planteadas a través de una herramienta como RNA-seq. Por otro lado, sería de gran interés indagar los alcances de esta nueva metodología induciendo androesterilidad en genotipos de diferentes fondos genéticos, evaluando la eficiencia del tratamiento y su correlación con la expresión de transcritos de interés.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramoff, M. D.; Magalhaes, P. J.; Ram, S. J. (2004). Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11: 36-42.
- Al-Khatib, K.; Baumgartner, J.R.; Peterson, D.E. and Currie, R.S. (1998). Imazethapyr resistance in common sunflower (*Helianthus annuus*). *Weed Science* 46: 403-407.
- Balabanova, D.; Remans, T.; Vasilev, A.; Cuypers, A. and Vangronsveld, J. (2018). Possible involvement of glutathione S-transferases in imazamox detoxification in an imidazolinone-resistant sunflower hybrid. *Journal of Plant Physiology* 221: 62–65.
- Bowzard, J.B.; Cheng, D.; Peng, J.; Kahn, R.A. (2007). ELMOD2 is an Arl2 GTPase-activating protein that also acts on Arfs. *Journal of Biological Chemistry* 282: 17568–17580.
- Breccia, G.; Vega, T.; Nestares, G.; Mayor, M.L.; Zorzoli, R.; Picardi, L. (2011). Rapid test for detection of imidazolinone resistance in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Breeding* 130: 109-113.
- Breccia, G.; Gil, M.; Vega, T.; Altieri, E.; Bulos, M.; Picardi L. and Nestares, G. (2017). Contribution of non-target-site resistance in imidazolinone-resistant Imisun sunflower. *Bragantia* 76 (4): 536-542.
- Breccia, G.; Bisio, M.B.; Picardi, L. and Nestares, G. (2018). Rapid Phenotyping Method for Imazamox Resistance in Wheat. *Planta Daninha* 36: e018179638.
- Bruniard, J.M. and Miller, J.F. (2001). Inheritance of imidazolinone-herbicide resistance in sunflower. *Helia* 24 (35): 11-16.
- Burke, M.A.; Mutharasan, R.K.; Ardehali, H. (2008). The sulfonylurea receptor, an atypical ATP-binding cassette protein, and its regulation of the KATP channel. *Circulation Research* 102 (2): 164-176.
- Carrizo García, C.; Nepi, M.; Pacini, E. (2017). It is a matter of timing: asynchrony during pollen development and its consequences on pollen performance in angiosperms-a review. *Protoplasma* 254: 57–73.

- Conesa, A.; Götz, S.; García-Gómez, J.M.; Terol, J.; Talón, M.; Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21 (18): 3674-3676.
- Cornide, M. T; Lima, H; Galvez, G; Sigarrosa, A. (1985). *Genética Vegetal y Fitomejoramiento*. Editorial Científico-Técnica 22 (3): 73-82.
- Dalgaard, P. (Producer). (2010). R Development Core Team (2010): R: A language and environment for statistical computing. Computer Programme <http://www.R-project.org/>
- Deballi, G. y Vitale, S.H. (2015). Autocompatibilidad y rendimiento en híbridos comerciales de girasol. *SEMIÁRIDA Revista de la Facultad de Agronomía UNLPam* Vol 25(1): 69-74.
- Florey, O. and Overholtzer, M. (2012). Autophagy proteins in macroendocytic engulfment. *Trends in Cell Biology* 22 (7): 374-380.
- Gil, M. (2017). Identificación y caracterización de mecanismos de resistencia a herbicidas inhibidores de la enzima acetohidroxiácido sintasa en girasol (Tesis de Doctorado en Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario).
- Gil, M.; Ochogavía, A. C.; Veja, T.; Felitti, S.; Nestares, G. (2018). Transcript Profiling of Non-Target-Site Imidazolinone Resistance in Imisun Sunflower. *Crop Science* 58 (5): 1991-2001.
- Gumienny, T. L. et al. (2001). CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell* 107: 27-41.
- Herr, J.M., Jr. 1971. A new clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperms. *American Journal of Botany* 58: 785-790.
- Hu, J.; Huang, W.; Huang, Q.; Qin, X.; Yu, C.; Wang, L.; Li, S.; Zhu, R.; Zhu, Y. (2014). Mitochondria and cytoplasmic male sterility in plants. *Mitochondrion* (19) Pt B: 282-288.
- Kaspar, M.; Grondona, M.; Leon, A. and Zambelli, A. (2011). Selection of a sunflower line with multiple herbicide tolerance that is reversed by the P450 inhibitor malathion. *Weed Science* 59: 232-237.
- Kearns, C.A., and D.W. Inouye. (1993). *Techniques for pollination biologists*. Univ. Press of Colorado, Niwot.

- Kolkman, J.M.; Slabaugh, M.B.; Bruniard, J.M.; Berry, S.; Bushman, B.S.; Olungu, C.; et al. (2004). Acetohydroxyacid synthase mutations conferring resistance to imidazolinone or sulfonyleurea herbicides in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1147–1159.
- Kummar, G., and Srivastava, P. (2009). Gibberellic Acid-Induced Pollen Mortality and Abnormal Microsporogenesis in Safflower. *Cytologia* 74 (2): 171–176.
- Lee, S.; Lee, E.J.; Yang, E.J.; Lee J.E.; Park A.R.; Song W.H.; Park O.K. (2004). Proteomic identification of annexins, calcium-dependent membrane binding proteins that mediate osmotic stress and abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16: 1378-1391.
- Leclercq P. (1969). A case of cytoplasmic male-sterility in sunflower. *Annales De L'Amelioration Des Plantes* 19: 99-106.
- Li, H.; Shen J.J.; Zheng, Z.L.; Lin, Y. and Yang, Z. (2001). The Rop GTPase Switch Controls Multiple Developmental Processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 126: 670-84.
- Li, H.; Li, J.; Zhao, B.; Wang, J.; Yi, L.; Liu, C.; Wu, J.; King, G.J. and Liu, K. (2015). Generation and characterization of tribenuron-methyl herbicide resistant rapeseed (*Brassica napus*) for hybrid seed production using chemically induced male sterility. *Theoretical and Applied Genetics* 128: 107-118.
- Liu, X.-Q.; Yu, C.-Y.; Dong, J.-G.; Hu, S.-W. and Xu, A.-X. (2017). Acetolactate synthase-inhibiting gametocide amidosulfuron causes chloroplast destruction, tissue autophagy and elevation of ethylene release in rapeseed. *Frontiers in Plant Science* 8: 1-20.
- Manabe, Y.; Tinker, N.; Colville, A. and Miki, B. (2007). CSR1, the sole target of imidazolinone herbicide in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 48: 1340–1358.
- Masoudi-Nejad, A.; Tonomura, K.; Kawashima, S.; Moriya, Y.; Suzuki, M.; Itoh, M.; Kanehisa, M.; Endo, T.; Goto, S. (2006) EGAssembler: online bioinformatics service for large-scale processing, clustering and assembling ESTs and genomic DNA fragments. *Nucleic Acids Research* 34 (2): 459–462.
- McCourt, J.A.; Pang, S.S.; King-Scott, J.; Guddat, L.W.; Duggleby, R.G. (2006). Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. *PNAS* 103: 569–573.
- Miller A. (1987) Sunflower. In: *Principles of cultivar development*. Ed.: Fehr, W. Macmillan Publishing Company 2: 626-668.

- Miller, J.F. & Al-Khatib, K. (2002). Registration of Imidazolinone Herbicide-Resistant Sunflower Maintainer (HA 425) and Fertility Restorer (RHA 426 and RHA 427) Germplasms. *Crop Science* 42 (3): 988-989.
- Ochogavía, A.C.; Breccia, G.; Vega, T.; Felitti, S.A.; Picardi, L.A. and Nestares, G. (2014). Acetohydroxyacid synthase activity and transcripts profiling reveal tissue-specific regulation of *ahas* genes in sunflower. *Plant Science* 224: 144–150.
- Ochogavía, A.C.; Novello, M.A.; Picardi, L. and Nestares, G. (2017). Identification of suitable reference genes by quantitative real-time PCR for gene expression normalization in sunflower. *Plant Omics Journal* 10: 210–218.
- Ochogavía, A.C.; Novello, M. A.; Bianchi, M. B.; Picardi, L.; Nestares, G. (2018). Partial Male Sterility in Imisun Sunflower: Imazapyr Treatment in Advanced Vegetative Stages Decreases Pollen Yield and Alters *ahas* Gene Expression. *Crop Science* 58: 1-14.
- Ochogavía, A.C.; Bianchi, M. B.; Picardi, L.; Nestares, G. (2020). Evidence of accelerated and altered pollen development after Imazapyr treatment in resistant sunflower. *Bragantia* 79 (1): 94-106.
- Petit, C.; Duhieu, B.; Boucansaud, K. and Délye, C. (2010). Complex genetic control of non-target-site-based resistance to herbicides inhibiting acetyl-coenzyme A carboxylase and acetolactate-synthase in *Alopecurus myosuroides* Huds. *Plant Science* 178: 501–509.
- Pfaffl M.W.; Tichopad A.; Prgomet C. and Neuvians T.P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26 (6): 509-15.
- Rozen S.; Skaletsky H. (2000). Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. In: Misener S., Krawetz S.A. (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology™*, vol 132. Humana Press, Totowa, NJ.
- Sala, C.A.; Bulos, M.; Echarte, M.; Whitt, S.R.; and Ascenzi, R. (2008). Molecular and biochemical characterization of an induced mutation conferring imidazolinone resistance in sunflower. *Theoretical Applied Genetics Journal* 118: 105–112.
- Sala, C.A.; Bulos, M. (2012a). Inheritance and molecular characterization of broad range tolerance to herbicides targeting acetohydroxyacid synthase in sunflower. *Theoretical Applied Genetics Journal* 124: 355-364.

- Sala, C.A.; Bulos, M. (2012b). Use of imidazolinone tolerance to produce male-sterile testers in sunflower breeding programs. in: 18th International Sunflower Conference, Mar del Plata & Balcarce, Argentina.
- Schneiter, A.A. and Miller, J.F. (1981). Description of sunflower growth stages. *Crop Science* 21: 901–903.
- Tan, S.; Evans, R.R.; Dahmer, L.M.; Singh, K.B.; Shaner, L.D. (2005). Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Management Science* 61 (3): 246-257.
- Tranel, P. & Wright T. (2002). Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: What have we learned? *Weed Science* 50 (6): 700-712.
- Vear F. (2011). *Helianthus*. In: Kole C (ed) Wild crop relatives: genomic and breeding resources, oilseeds. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg: pp 161–170.
- Vega, T.; Breccia, G.; Nestares, G.; Mayor, M.L.; Zorzoli, R.; Picardi, L. (2009). Soil-less bioassays for early screening for resistance to imazapyr in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Pest Management Science* 65 (9): 991-995.
- Vega, T.; Gil, M.; Martin, G.; Moschen, S.; Picardi, L.; Nestares, G. (2020). Stress response and detoxification mechanisms involved in non-target-site herbicide resistance in sunflower. *Crop Science* 60 (4): 1809-1822.
- Vuylsteke, M.; Peleman, J.D.; Van Eijk, M.J. (2007). AFLP-based transcript profiling (cDNA-AFLP) for genome-wide expression analysis. *Nature Protocols* 2: 1399–1413.
- Xiao, X.; Li, H.; Tang, C. (2009). A silver-staining cDNA-AFLP protocol suitable for transcript profiling in the latex of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Molecular Biotechnology* 42: 91–99.
- Yang Z. (2002). Small GTPases: Versatile Signaling Switches in Plants. *The Plant Cell* 14 Suppl (Suppl): S375-88.
- Yuan, J.S.; Tranel, P.J. and Stewart, C.N. (2007). Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends in Plant Science* 12: 6-13.
- Zhao, L.; Jing, X.; Chen, L.; Liu, Y.; Su, Y.; Liu, T.; Gao, C.; Yi, B.; Wen, J.; Ma, C.; Tu, T.; Zou, J.; Fu, G.; Shen, J. (2015). Tribenuron-methyl induces male sterility through anther-specific inhibition of acetolactate synthase leading to autophagic cell death. *Molecular Plant* 8: 1710

ANEXO

Anexo I

Anotación de secuencias identificadas en este trabajo de tesis en la base de datos de ADN de Japón: DNA Data Bank of Japan DDBJ (<https://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>).

SECUENCIA	CÓDIGO	LONGITUD	NOTA
CONTIG1 ACCAAAACGTAAAAAATCTGACGATGAGTCC TGACCGATTATTCCTATCACAACCTGGATTTTT GGAGATTTTACAGGAATTGTACATAAAAACT TAAGACAGTTAAAAAATAATAAAAAAACGC ATGGTACGCAGTCAACA	LC553466	142	fragmento derivado de transcripto (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP
CONTIG2 AGAACTCTTGAGCTTGAGGTGGTCTTGAGC TTTCTGGTTGGTGGTCTAACCTTCTTGAAGAC CAACGGAACTTGATCTTCGAATTATGGAAC TGCTTGGTGGACTCCCTCTTGACAGACTTGGC GGGCATGGTACGCAGTCAGA	LC553467	146	similar a la proteína ribosomal L18, IPR021138; fragmento derivado de transcripto (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP
CONTIG3 GAGTCTGACCGATGAGTCTGACGATGAGT CCTGACCGAGGACATCGCCACGCATCTGGAC ATGGTACGCAGTCAGGGTCTGATGATGAGT CCTGACCGACGATGAGAATGCTGTGCTGTG CTGCATGGTAGTCACTCAGCTG	LC553468	146	similar al ARNm de proteína G putativo de la familia beta, AY463016; fragmento derivado de transcripto (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP
CONTIG4 GAGAACTTTGGATCTTAGCACCCAATCAGTCT GTCTGTAAGGATGACGGCCTGTATTCGG AGTCTTACCGTCTAGCCGTTGGTACTCCGCAT CTTACGGAGAATTCAATTTACCGGGTCATT GGAAGCAATCCAA	LC553469	140	similar al ARN mitocondrial de <i>H. annuus</i> , mt_gi_571031384.22; fragmento derivado de transcripto (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP
CONTIG5 ACGGTAAGCATAACATATGTCGACGCTGCTT GTGAAGAAGCTCTTCAATGCACTCGTGAAG GCAGTAGAGTGATATTTGATTCTCCTGCTCT TTTTCTCTATTGCTAAACTCAGACCGGTTGGG AACGTGCCAAGTGCTACCATGGTACGCAGTC AA	LC553470	159	similar a la proteína transmembrana 135 (TMEM135), IPR026749; fragmento derivado de transcripto (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP

CONTIG6

CTTTACTCAGTCGATAAGTCCTGACCGAGAAC
 ACCCTTTGTGGGCTCTAGGTTAGCGGTAGTT
 GGGCACCGTAACCCGGCTTCCGGTTCATCCCG
 CGTCGCATGTTCTGCTTACCAAAAATGGCCCA
 CTTGGAGCTCCCGATTCCATGGTCGCAGTCAT
 GTGATGGCCCGAGAAACGACAAACTATAGGT
 GACGAATTGATGAGAAAATCTGAGGAATGA
 ATCCGGTTTTACGAGATGAGGGCTTTATCTTG
 ACGGGGTTGTGGCTCCGTGACGCAGAACAA
 GACGACATTTCCGGTGGGGTTGTGGGGTGGTG
 TCTGAGTGGGGGAAAGAAAGAACTGGAG

LC553471 342

similar a la secuencia del gen de ARN ribosómico mt, FJ626461.1; fragmento derivado de transcritto (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP

CONTIG7

CCTTAATCTGACGATGATTCTGACCGGCTGG
 CCAGGGGATGCGACTTCCACCGGCCAGGCAT
 CGCGCGCCTCGGAAAAGCGCCAGCAAATC
 GGGCAGCGGCACCATCAACCCGGCTTGCTGC
 TTTTACCGAACC CGCCATGGAACGCAGTCC
 CCGGCCATGGTACGCAGTCAAACAATCACGG
 CCATGGTACACAGT

LC553472 202

fragmento derivado de transcritto (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP

CONTIG8

GACGATGAGTCCTGAGTAAGGAGATGCACA
 CCGAGTATTGTGCTATCTCTAATCTGTGGTAC
 TCCTACACAACAACACTGTCTTCAAGCTCTAC
 GGGATCAGGGAAATTTTCTGCGAAGCCCTC
 TTGAACGAGAACGAATTCTCCTCCTCATCGCT
 TCCTTGAGACTCTGCTGTATTTCTCTGAGCAA
 CTGGTTTTCCCGATGTTGGCATGGTACGCAGT
 CAGAGTCCTGATGATAAGTCCTGAGTAAGAA
 GATGAGTCCTGAGTAAGAAGATGAATCCCGA
 GTATTGCTATTCTACAA

LC553473 301

similar a receptor LRR de tipo serina/treonina-quinasa At2g16250; fragmento derivado de transcritto (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP

CONTIG9

GGGCATCGGATGACACACGCACCTGGAGAT
 GATGGTGCGCTAAGATGCGCCACTTTTGATG
 TTCCTTATTAGGTGATTTGATTGTGTTTTGCA
 TGGTACGCAGCAACGGAAGATGAGGTTGAT
 GGGCTGTGTCTTGGTACGCTGTCAGAACTCT
 GCTTGAGTGACCTGTAGTGCTGCACGGTGGG
 GACGAGAGAGAACGGTACGCAGAATTCGTG
 CCCATGCTGGGTATATCATACCGCGAGGGAC
 GAGGGTTTCTGCATCCAGATACTCGGGACTT
 GTAAGTTGATGATCAGAGTGGTGTCTGGAAT
 ACTGTAGACTGTTGTTTTGTGAAA

LC553474 334

similar a IPR001806: superfamilia de pequeñas GTPasas; IPR002041: pequeñas GTPasas Ran; IPR005225: dominio de proteína de unión a GTP pequeño; fragmento derivado de transcritto (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP

<p>CONTIG10 TGAGTCCTGACCGAGCAGCCAGTGAAACTTC TAATGTAAAGAGAGCCGTGGTCATGGTACGC AGTCAGGACTCATCGTCAGGACTCATCTCGC ATACTGCGTACTCTTCATCAGGACTCATCACT CATACTCCGTACTCATGACTCAGACTCATGAC TCATGACTCTTCATCATGACTCATCCATA ATCATGACTCATAAC</p>	LC553475	204	fragmento derivado de transcripto (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP
<p>CONTIG11 GAGTCCTGACCGAAGAGTCTGACGATGAGT CCTGACCGATGGATGCAGTATTTAGAAACAT AAAGTGGCGTTTCTCTAGGCTTGAGATGAAA CAAAAGCTATTCAGAAACATAGAAATGGTGT TTCTCTAGGCATGGTACGCAGTCAAGAAG ACTC</p>	LC553476	159	fragmento derivado de transcripto (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP
<p>2_C-G_5-1 GGTCTGAGTCTTGGGTACTGCTATAACGCGCT ACTTTTGCACCTTCCTTAGTACTTCCATGTTCA TCGCGCTTCGCCATGTCTCCTTACCAAAAATG GCCCACTGGAGCTCCCGATTCCATGGTACGC ACACAA</p>	LC553477	135	similar al ARN ribosómico, rDNA_gi_563582565.2; fragmento derivado de transcripto (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP
<p>12_G-A_4-1 CTTGTGCGTTCATATGGAGATCTGAGTAAGA TGAGTCCTGATTAGAGGAGCCCTGTTTATGA TGCTTAGTAGGTGCGATGATCGTGTGTTGTTG TGATGATCGTTCATTGTCGTGTTGCTCGTTCA TTGTCGTG</p>	LC553478	134	similar al dedo de zinc, tipo C6HC IPR002867; E3 ubiquitina-proteína ligasa p28, IPR016398; pequeñas GTPasas Ras; fragmento derivado de transcripto (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP
<p>13_G-C_5-3 GGGGGATGTTACCAGGTCCGGTGGTTCTAA TAACCTTCCTTGGGTTCAGAACGTTACAAAG GGGCTATTTGATCCTCCGGTCTTTTTCCCTT TTCTAACCTCAAACCGTTTGGAAACTTGCCA ACGGTTAGGAAGCTACCCAACAACACTACCATG GTACCCATCCA</p>	LC553479	169	fragmento derivado de transcripto (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP
<p>27_T-A_8-5 CTCTACCATAGCAAAGATCTGATATTAACCTG AATATGATCCTGATCCAGCATCCTGATTCCGG TCTATTGTTCTGATTCATGATTCATGAATCA AGATCAAGGATCCTTATTAAGAGTCTGAAT TTGA</p>	LC553480	131	similar al citocromo P450, IPR001128; fragmento derivado de transcripto (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP

<p>32_G-C_6-3 ACGATGAGTCCTGAGTACGACGATGAGTCCT GAGTATGGTACTCAGTCCTGGATACGAGTTC TGCCCATGAGTCCTGACCGAAATCCGTTATCA GGATCACCCCTGGGCATGGTACGCAGTCACA TGAGTGCTGATCAGTCCTGAGTATCAGGATC ACTCCTGGGTATGGTGATCAGTCATGAGTAT GATGATGAGTCCTGAGTAAGACGATGAGTCC TGAGTATGACGATGAGTCCTGAGTATGATGA</p>	LC553481	249	fragmento derivado de transcripto (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP
<p>36_T-C_8-1 TGAGTCCTGATGATGAGTCCTGACCCACGGT CCCTTTCCTCCAGATGGGCTCCTTTTACTGGA TCTACCAGATGGGTCCTGATGATCAGTCCTGA CCGATGATGTCGTTAATGAAGGAGTTCATGA TGGGCATGGTACGCAGTCAGAGTCCTGATGA TGAATCCTGACCTATGAG</p>	LC553482	176	similar a la histona H2B, IPR000558; fragmento derivado de transcripto (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP
<p>37_T-C_8-6 ATAAAAAGAAGGGCGAATTGGATTGGCCTTTT CTATACCACTCCACCATCACTTGGAGAGAGA GGATTTACTGTGGCTGTTGAAGGGTAGCATG AGGTGCCCCAGAGAGAAAAGGCCATTTCCTG TAATTGCAGGAAAAGAAAACCTGTTCTTCTCC TGGTCTTGGAACACACAACCAACCTAATACT TGGCCATAAATGGTGATGGGTGGCCAGATGC CTTCAGAACAGCCACGAAGCCCGGAGTAAT</p>	LC553483	250	similar a proteína con dominio ELMO (Engulfment and Cell Motility), IPR006816; fragmento derivado de transcripto (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP
<p>41_G-C_5-1 GTGGATGTATCAGTTGTGGTAGGTATCCTAT GTCCGACATTGTTGTGAAGAACTTCAATGG CTCGTGCAAGGCACTAAAGTGATATTCGATT CTCCTGCTCTTTTCTCTATTGCTAAACTCAA CCGTTGGGAACGTGCCAAGTGCTAGCATGA TACGCAGTCA</p>	LC553484	168	similar a la proteína transmembrana 135 (TMEM135), IPR026749; fragmento derivado de transcripto (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP
<p>42_C-A_10-1 ATCCCTGTTCTTACCCTACCGGATGTGCTGTT AACCACATCATGTACAGTTTCTGGGACAAA ATTACGGGTTGGGGGAACCGGGATGGTTCGT TTGTCAAGTACCGTGGCGATCTTTCCTTCAAT CTGAAAGCACACCGTTGGGCGGAGGTGATG GTATTGACCTGCCCTCGTCTTGATGTGCCCC ACAGGAAGTAATTGCCCCGCGATCGA</p>	LC553485	217	fragmento derivado de transcripto (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP

<p>44_C-G_8-1 AACCCTTGTTCTCCTCTCCAATCCATCATTTC CATGGCTCTCTCCGTCAACAGCTTCTTATTACT TCCGGTAAGCGGTCTGTCCATTGTAACCAA ACTAATGGTCTCCGCCTTACGGGGGGTAA ACCATGGTGAAGGAGCATGGAGCTGCTTAA GTGCGAGTGATGGGGATTTCTAGTTAAAA AGGGCCGGGAGGAGGGGGCCCGACGGGGC TGGCGTGGGGG</p>	<p>LC553486</p>	<p>229</p>	<p>similar al receptor de sulfonilurea tipo 1; IPR027417: P-loop que contiene nucleósido trifosfato hidrolasa; Subfamilia C de casetes de unión a ATP; fragmento derivado de transcritpo (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP</p>
<p>45_C-T_8-2 AGTGAAAACCTACGCTGTAATTGTGCTATCAT ACAACATTTGGATGAAATGGCTACACGCCCA GCCTCGGCATCAAACTTGAAGCCAGTAATG TCAAAAGGCATCAACTACCAGATTTCTTTTCC ATCTGCAAAAAATTACCCGAGGGGAAGCACA TGGTACGCAGTCATCATCACGACTCATGATGC CTATC</p>	<p>LC553487</p>	<p>194</p>	<p>similar al citocromo P450, IPR001128; fragmento derivado de transcritpo (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP</p>
<p>47_T-A_7-1 CCACATCATTGACCAGCTTAACCCTGGCGATG CCTTGGTCATGGTACGCAGTCAGAATGACGC TGGTCCCATCACTTCGACCCCTCACTTTAATC ATTCATCTCTATCCGGGAGAGACAGCCAACT ACCTTTTATTTCTTTGGGGGGTGTAGAACG CCCGTCTTAAATGATTCATGATCCGTGGGCTT GTGGTTGAATTGATGGCGTGGTTTGGCTGTA GTGTGAAGTAGGGGAGAGAGTAAAA</p>	<p>LC553488</p>	<p>247</p>	<p>similar al citocromo P450, IPR001128; fragmento derivado de transcritpo (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP</p>
<p>51_C-C_7-6 GGGTAAAAGTTTTTCTAAATTTCTGTGCCAA ACTACATAAACGTCTCTTCAAGCTCTAAGGG ATCAGGGACATTTTAAGCGAAACCAATAGAA CGAGAACTTATTCTCCCCCTATTGCTTCATGA GAACTGCTTTTTTCTGAAAATGGATTCTCA TATGGAAAAAAGAAATTAGATTTCTGATTAT TGTCATGAATAAGATGACAAAATAAATCAG TGACGAACAGGGGGTATT</p>	<p>LC553489</p>	<p>239</p>	<p>similar a la proteína no caracterizada Ha412v1r1 03g020890; fragmento derivado de transcritpo (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP</p>
<p>52_A-T_6-1 TAGCGGGGATGGATCCACCCCAGATGCCTT CTAATCGTTGCTGTACCCATAGAACTCGGA CCCGGGCTCCGGCTATCCAGAGGAAAACGTC GGAGGTAACCAGCTACTAGACGGTTTCGATTA GTCTTTCGCCCTATACCCAAGTC</p>	<p>LC553490</p>	<p>149</p>	<p>similar al ARN ribosómico rDNA_gi_563582565.2; fragmento derivado de transcritpo (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP</p>
<p>53_A-T_6-3 AATCTAGAAGATAAATATAAAAAACAATATGA AATAACTATCGACTTTCCTAGTGCGTTATTAG ACTGAAAAATTACCCTCAGTGTCCTTTCCAA GCCACCGCTATCAAGTTAAAAAAAAGAATA</p>	<p>LC553491</p>	<p>178</p>	<p>similar al dominio potencial de unión al ADN IPR025927; fragmento derivado de transcritpo (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP</p>

ACCCACAAATAGTATGATCATCGAGACCTGA
ACTGGAGACCTGACCAATAAG

54_G-A_4-3

AGGATGAGACCTGGCGCTCAGATGCGCCACC
TTTTGATGATCCTTATTAGGTGATTTGATTGT
GTTTTGTCATGGTACGCAGGCATTGACTGGG
ATTCAGCACCGTACTCAGGACTCATCATCTTA
CTCAGGACTCATCATCTTACTCAGGACTCATC
ATCTTACTCA

LC553492 168

similar a la superfamilia de
pequeñas GTPasas,
IPR001806; fragmento
derivado de transcritto
(TDF) obtenido por análisis
cDNA-AFLP

55_G-C_5-1

GGAGGATGAACCTTGTAGGTGGTCGTGAGCT
TTCTGGTGGGCGGTCTATTTTCTTGAGGAGG
ACGGGCTTTTGGTCTTCCATTATGGAACGGG
TTGGTGGACTCCCTCTTGCAGAGTGTGGTGG
GTATGGTACACATTGACGGGCATGGCACGCA
CTCATTCTGAGGGGAGCGCAGAGACTCCCC
CCCTTACTTCTTTATGGGCGTAGAGAAAACG
ACCATAAAAAGATTTTTCATCATCTGTGGTCG
TGGCCGATGTAGATGGTGGGGGTGTTGTGCG
GAGTAATTAAGAAGGGGA
GAAGATAATT

LC553493 310

similar a la proteína
ribosómica L18a, IPR021138;
fragmento derivado de
transcritto (TDF) obtenido
por análisis cDNA-AFLP

55-_G-C_5-2

AGGTCAAAAACTTGTAGGTGCTCTTGACCTT
GCTGGTGGGCTTGCTAATCTCTTGTGGAGC
TCTAACCTTCTTGTCTACCAACGATAACTGG
CCTGCGAATTACCAACTGCTTGGCGTACTCC
CTCTTGACACCTTACGGCCATGGTACGCAG
TCA

LC553494 163

similar a la proteína
ribosómica L18a, IPR021138;
fragmento derivado de
transcritto (TDF) obtenido
por análisis cDNA-AFLP

57_C-A_10-2

TTAAAGTATTGGGCTCTTCAGATAGTTGATGC
AGAAGGTGTCAATGATGTAATGACATTTAGG
TTCTTTTCATATGTGATTTTTTATTAATCATA
TAATGTAATCTGAGAATTTGAGATTGATTTAG
GCCTGATATTGTGTAATCATAATGCTCATTTA
TCATTTGTTTGCAACCTGAACTCATGCGTGAT
TACCCGCTGAACTTAAGCATATCACTTAGCGG
AGAAAATAAACTAAA

LC553495 239

similar a la proteína de
resistencia a enfermedades
IPR000767; fragmento
derivado de transcritto
(TDF) obtenido por análisis
cDNA-AFLP

59_T-G_3-1

ATTTTTATTTAGTACATTATTCTTGATGGATG
ATATTGGCCTAGTACTTCCACCGTGTGGAT
ACCTCTGCTCGCGTAATACTCCTGCATATC
GTGACTGACACCATCATCCGGCTTGATGCTT
TTCATCGAACCCGTTTATGGTACACAAAAAA
AGACTTGATTTTTATTTCTTTTATTTTTTACT
TAATGTAATAA

LC553496 204

similar a IPR005478:
transcetolasa, de tipo
bacteriano; IPR009014:
Transcetolasa, C-terminal /
Piruvato-ferredoxina
oxidoreductasa, dominio II;
fragmento derivado de
transcritto (TDF) obtenido
por análisis cDNA-AFLP

<p>60_T-G_7-3 ACAAAAGGGTTAATATCAAATTCCTCATTTCC CCTTCTTTCTCCACACACCTTGTTTTTACTT TTGTGATTTTCACTGTCCCCTTATTACAT GGAACGGATCCTTTGAAACGACCTCTGACTG ATGAATGCTGACTGATGAACCTGATGATGAG TCCTGACCGACGATGAGTCCTGACCGAGGAT GAACGTGCAGGGCCCTTACGGATCCTCCCAG AGATGTCCTAGTGAGAGCCATGGTACGCATT CACAGCCGGAACCTTCTCGTAGACTGCATAC CATGAATACTGCCCTTCATCAATGATTAA</p>	<p>LC553497</p>	<p>316</p>	<p>similar a la proteína de hierro-azufre de Rieske, IPR014349; fragmento derivado de transcritpo (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP</p>
<p>60-T-G_7-3 AGAAAAACAGAAAATAAAAAACCTATTA TCTGAAAATTATCCCCGATGTTGAGAGAGG ATGGGTAACACCTATCATCTAGGTCGCTCGC TTATGCGCATCAAGGACGTCATGTTGGCAAT AATGTGATTTCCATGTCTTTTTTTTCAGGGCC CAATATTTTCAATTTGTATGCTTTTTATTCTT ATCTTTTGAAACTACACCGTTAAGGTTTGG TATGAAATCTCAGTCCTGGTAG</p>	<p>LC553498</p>	<p>244</p>	<p>fragmento derivado de transcritpo (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP</p>
<p>61_T-G_7-4 GTAACGGTGGGGTTTGATCTCAAATTCATC ATTTCCAAGTCTTTCTCAAGCAACAGTTTTTT ATTACTTCTTGTATTTCTGTCTGTCATTGGC AAACCAAACAAAATGTTCTTTGGGCGTCCC AATTTGAATCCATGGTAGGCAGGCCGCCAGA ACTCATCTCGAAGACTTCTTACCAT</p>	<p>LC553499</p>	<p>185</p>	<p>similar al receptor de sulfonilurea tipo 1, IPR000844; fragmento derivado de transcritpo (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP</p>
<p>N62_T-G_10-1 CCGGACGAGGCCTATGGATTCACACCTGAGC TATGGTACCTAGTTAAGTGGCAGGATTTCAA ATACTATTGAATGAATATGTTTTATTAATACA TCATTCTTAATGTTAATATTCTTTCTTTAATT TTGTTTTTTTTG</p>	<p>LC553500</p>	<p>141</p>	<p>fragmento derivado de transcritpo (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP</p>
<p>63_T-G_7-2 ACAATAATAAACACTTTATCTTGGTGGAATAT GCTACAAACATGTTATGATCCTAACGAAAGG AGGTTCTGCCTTCCCCTGCCAGGGGAAGGC TTCTCTGTCCCTTCTTCTTGGTGGATGAGAA AATGAGGCTGGGGCTACATTCATTTATTCTC TCTGGAAAGAAAACTACCAATCCCCCCTT ACTTTGGGGGGGTGGGGTAAAAAAGACCCA GAAGATGAGGATTTCTTGATCTGTGGCCTTG TGCGCTGAAGGGGATGGGTTTGCTCTGGAAT GAGGAAGAAGAGAGGGGAGAAAAA</p>	<p>LC553501</p>	<p>310</p>	<p>similar a la presenilina/péptido señal peptidasa, IPR006639; fragmento derivado de transcritpo (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP</p>

<p>64_G-G_2-1 GTTTAATACCTACTTATTTTCTGTTTCCATAGG TTTACGACTTACAACCTTACGTTACACATAAC CTAACCATCTTATTCCTTACATCCATGGTACGC AGTCACAACCCTGGTGATGAGTCCAGAGGGA TGATGACTCATCCTGATGATTAGGATG</p>	LC553502	156	similar a la proteína de almacenamiento de semillas 11-S de plantas IPR006044; fragmento derivado de transcripción (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP
<p>65_T-C_1-2 GAGTCCTGATGTTGATGCTTGAATAAATTTT GTTTCTGCCCCATAAGGGGACGCCTTTTCT GTTTCTTTCCAGGGTTGCCATGGATCAGGACT CAAGGTCGGGATTCATCTGCTTTCACCCCTA GGAGGGGGAAGCAGCCAGGACCCATTACTT ACACTGGGACGGGTACTCAAGACTCATCAGC AAGAGTTTTCTTCACTGACTGGCTTGCCGA CTCAGTAGATAGCATTGCTATGGACTGGAAT TAAGAAACAGGGAAAAAAGAAAAG</p>	LC553503	276	fragmento derivado de transcripción (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP
<p>66_T-C_1-3 CAGCGGGATGAGTCTGACTGATGAGCCTGAG ATGAGCCTGACCGACCCTTCTGCCGACGAAG CGCTCCTAGCCTTAATTGGCCGGGGCGGGCC TCCGCCGCTGCACTTTGAAGAAATTAGAGTG CTCAAAGCAAGCCATCGCTCTGGATACATTA GCATGGTACGCAGACAGGACACTCCTCGAAG ACTGCGTTCATAATGCGGGGGTCATAAACG ACCAGATTAAGAGGGTTCAAGATCTGGGGC CTTGGCCGCTGAAGTTGATGGCAGGGCTTTG GACCGGAATTAAGAAAAAGGGGGAAAAGA GAAAAA</p>	LC553504	314	similar a la secuencia espaciadora intergénica de ARN ribosómico 26S y 18S KY826235.1; fragmento derivado de transcripción (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP
<p>67_T-C_1-4 GATAAGGAATAAATCTAGATTGAGAGGCAT ATTTTTATAACTGTTTTGAAACCAAGAAAAG AAACATAATGTCTAATACTCGGAAGAAGGG GGGTTTTCCGTCCAGCTCCAACCTGGGTGGA AGAGAAAGAAAGGGAGCTTTATTTTTCATCT TCTGAGGAGGGAGGAAATCACAAACCCTTAC TTTTTTGGGGGGTAGAGAAAACAAAAA AAAAGATTTAAGATCTTTGGCCTTGGCGTTG AATTGATGGAGGGCTTGGTGTGGAATTAAG AAAAAGGGAAGAAAGTTAAT</p>	LC553505	296	fragmento derivado de transcripción (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP
<p>69_T-C_1-7 ACAAGTAGGCTGACCGACTCTTCTGCCGGCG AACGCTCCTAGGCTTAATTGGCCGGGACGGG CCTCCGTCCCTGTTACTTTGAAGAGGGAGAG GCTCAAAGCTGGCCTTCGCGCTGGATACATT AGCAAGGTACGGGGGATGGTCTATTTTTTT CCCCCTCTAAAGAGCGCAGAAACTCACAGCC CCTTCATTCTTGTGGGTGGGTAGAGAACCC ATGAAAGGAGGTCTTCATCATCGTGCTTGGT</p>	LC553506	310	similar a la secuencia del gen de ARN ribosómico JX158792.1; fragmento derivado de transcripción (TDF) obtenido por análisis cDNA-AFLP

GGTTGAAGTTGATGGTGGTGCTGTTGTGGAG
AGTTATGAAGAAGAGGGGAAAAAGAAATATT

70_T-C_1-7

CATACTGAGAGGTCTTTCTTGCTTTCCCGGG
GGGAGGGGGCTTCTCGTGAGCTCCCATCATT
GAGCAAGCATCTCATTGAGGCTGCCATAA
TTTTTTCACTCTGTGGGAGAGAGACTCAC
CCCCCTTACTTCATTATGGGGGTGTTAGAGA
ACCCAGATGAAGATTTTCAACATCTGTGGT
CTTCGCCGTTGAAGTTGATGGCGCTGCTGTG
GGGAGTTATTAAGAAGGGGGTAAATAAAT
AT

LC553507 253

fragmento derivado de
transcripto (TDF) obtenido
por análisis cDNA-AFLP