

Tesis Doctoral

Identificación y caracterización funcional de genes candidatos asociados a la senescencia foliar en girasol basado en perfiles transcripcionales y metabólicos

Moschen, Sebastián

2014

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Moschen, Sebastián. (2014). Identificación y caracterización funcional de genes candidatos asociados a la senescencia foliar en girasol basado en perfiles transcripcionales y metabólicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Moschen, Sebastián. "Identificación y caracterización funcional de genes candidatos asociados a la senescencia foliar en girasol basado en perfiles transcripcionales y metabólicos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Identificación y caracterización funcional de genes
candidatos asociados a la senescencia foliar en girasol
basado en perfiles transcripcionales y metabólicos**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Lic. Sebastián Moschen

Director de tesis: Dra. Ruth A. Heinz
Director Asistente: Dra. Paula Fernández
Consejero de Estudios: Dr. H. Esteban Hopp

Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA Castelar
Buenos Aires, 2014

Identificación y caracterización funcional de genes candidatos asociados a la senescencia foliar en girasol basado en perfiles transcripcionales y metabólicos

RESUMEN

El proceso de senescencia en plantas es un mecanismo complejo controlado por múltiples variables genéticas y ambientales que condicionan el rendimiento de los cultivos. En el caso del girasol, el segundo cultivo oleaginoso en importancia económica para nuestro país, se trata de un proceso con impacto económico que interviene en la brecha existente entre el rendimiento potencial y el rendimiento real observado, por la mayor o menor oportunidad de las plantas para mantener el sistema fotosintético activo durante periodos prolongados. Los parámetros visuales resultan tardíos para evaluar el desencadenamiento y posterior tasa de evolución de la senescencia foliar. La clorosis, la variación en el contenido de clorofila así como también la necrosis de las hojas, son detectables mucho tiempo después que la señal iniciadora de la senescencia ha sido activada.

Este trabajo tuvo como objetivo general el estudio del proceso de senescencia en girasol a través de distintos niveles de organización: ecofisiológico, metabólico, transcriptómico, culminando con la integración de los diversos enfoques *ómicos* mediante una aproximación de biología de sistemas, con el objetivo final de identificar potenciales biomarcadores asociados al proceso de senescencia en girasol.

Se condujeron distintos ensayos que fueron realizados tanto a campo, en la Estación Experimental INTA-Balcarce como en invernáculo, en el Instituto de Biotecnología INTA Castelar, para evaluar el progreso del proceso de senescencia tanto en condiciones naturales como controladas. Asimismo se evaluó la respuesta frente a condiciones de restricción hídrica impuesta en distintas etapas del desarrollo de las plantas.

Se realizaron evaluaciones ecofisiológicas relacionadas con el avance de la senescencia, a través de la medición de variables como contenido de clorofila, azúcares solubles y nitrógeno total de hojas, mediciones a campo de área foliar verde, SPAD, intercepción de la radiación y materia seca por órganos, mediante las cuales fue posible evaluar la evolución del proceso en las diferentes hojas, en condiciones naturales de cultivo.

Adicionalmente, se llevó adelante un análisis de los perfiles metabólicos utilizando técnicas de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS) que permitió la optimización del protocolo de la extracción de metabolitos de hojas de girasol, y la detección de aproximadamente 60 metabolitos primarios incluyendo distintos aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares y azúcares alcohol. Asimismo se optimizó la tecnología de cromatografía iónica, mediante la cual se cuantificaron diferentes nutrientes iónicos relevantes durante el proceso de senescencia tales como nitratos, sulfatos, fosfatos entre otros.

En forma paralela se llevó a cabo un estudio a nivel transcriptómico considerando tanto estrategias de genes candidato, mediante la búsqueda de secuencias putativamente ortólogas a girasol asociadas a senescencia en especies modelo, como el análisis concertado de expresión génica utilizando una micromatriz de oligonucleótidos desarrollada para esta especie. A partir del análisis estadístico de los datos obtenidos con la micromatriz, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional sobre el total de los unigenes que mostraron un comportamiento diferencial y significativo para las distintas condiciones evaluadas, utilizando la metodología de Gene Set Analysis basado en modelos de regresión logística. De este modo se identificaron las diferentes categorías funcionales asociadas a bloques de genes con un patrón de expresión similar. La búsqueda de genes candidato se profundizó con la consulta de bases de datos de genes asociados a senescencia (SAGs del inglés: Senescence Associated Genes), así como también sobre aquellos genes con dominios de factores de transcripción como posibles desencadenantes de las cascadas de señalización de este proceso.

Por último, se realizó la integración de los datos obtenidos a partir de distintas estrategias (fisiológicas, metabolómicas y transcriptómicas) utilizando una aproximación basada en biología de sistemas con el objetivo de identificar biomarcadores asociados a la senescencia en girasol. Para este fin se usaron los programas Paintomics 2.0 (<http://www.paintomics.org>) (García-Alcalde y col 2011) y Mapman (<http://mapman.gabipd.org/>) (Thimm y col 2004) que fueron adaptados para su uso con datos provenientes de esta especie.

Los resultados obtenidos a partir de la integración de datos mostraron una correspondencia entre los cambios detectados a través de los diferentes niveles analizados. A partir de una visión general del metabolismo celular se pudo observar una disminución de la actividad fotosintética y el crecimiento celular, y

un incremento en el metabolismo de sacarosa, ácidos grasos, nucleótidos y aminoácidos así como también en aquellos procesos relacionados al reciclado de nutrientes. En particular, los factores de transcripción con dominios NAC, AP2-EREBP y MYB mostraron altos niveles de expresión y mayores niveles de correlación y co-expresión, puntualizándolos como importantes biomarcadores candidatos para la ejecución del programa de senescencia en girasol.

Los resultados de este trabajo permitieron contribuir al conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en el desencadenamiento y evolución del proceso de senescencia en girasol, así como a la selección robusta de genes involucrados en las distintas etapas del desarrollo del proceso, especialmente factores de transcripción. Estos últimos fundamentalmente, podrán ser validados a futuro sobre materiales de mejora para ser incorporados a los programas de mejoramiento asistido de este cultivo de gran importancia agronómica para nuestro país. Finalmente, las estrategias, metodologías, herramientas y conocimientos desarrollados en esta tesis contribuyen al desarrollo del cultivo y promueven la adopción de la genómica y la post-genómica en las distintas etapas del mejoramiento de girasol.

Palabras claves: Girasol, Senescencia, Genes candidato, Transcriptómica, Metabolómica, Biología de sistemas.

**Identification and functional characterization of candidate genes associated
with leaf senescence in sunflower based on transcriptional and
metabolic profiles**

ABSTRACT

Leaf senescence is a complex mechanism controlled by multiple variables, either from genetical and environmental origin that has strong impact on crop yield. In sunflower, the second economically important oil crop in Argentina, the senescence process has an economic impact involved in the gap between potential and real yield observed due to the incapacity of the plants in keeping their green leaf area for longer periods. Visual parameters are belated to assess the onset and the evolution of leaf senescence. Chlorosis, variation in chlorophyll content as well as leaf necrosis is detected long after the triggering signal has been activated.

The main objective of this work was the study of the senescence process in sunflower through different organization levels: ecophysiological, metabolomic, transcriptomic, and finally an integration of the different *omics* strategies using a systems biology approach, in order to identify potential biomarkers associated to leaf senescence in sunflower.

Different experiments were conducted in both, field and greenhouse condition at INTA-Balcarce Experimental Station and at the Biotechnology Institute, INTA Castelar respectively, assessing the senescence process under natural and controlled conditions. Response to water restrictions imposed at different plant development stages was also evaluated.

Ecophysiological assessments related to the senescence progress were performed through different measurements such as chlorophyll, soluble sugars and total leaf nitrogen content, field measurements of green leaf area, SPAD, interception of radiation and dry material by organ, allowing the evaluation of the senescence process progression in different leaves growing under natural field conditions.

Additionally, metabolic profiles analysis was performed by using Gas Chromatography - Mass Spectrometry technique (GC-MS), allowing the metabolite extraction protocol optimization in sunflower leaves and the detection of approximately 60 primary metabolites, including different amino acids, organic acids, sugars and sugar alcohol.

Likewise, it was possible to optimize the ion chromatography technology, leading to the quantification of relevant ionic nutrients content such as nitrates, sulphates, phosphates and others, along the senescence process.

In parallel, transcriptomic studies were performed considering both, candidate gene strategies by searching of sunflower orthologous gene sequences reported as senescence associated in model species, as well as through a concerted expression analysis using a customized oligonucleotide microarray developed for this species. Statistical functional enrichment analysis was conducted over the complete significant unigenes set derived from the microarray assay, for each evaluated conditions, using *Gene Set Analysis* methodology based on logistic regression models. In this way, different functional categories were identified for gene clusters with similar expression patterns. Moreover, the exploration for candidate genes was deepened by searching into the senescence associated gene databases for model species, as well as by identification of putative triggers of the signalling pathways leading to senescence in sunflower among the transcription factor domains gene database.

Finally, a systems biology approach was achieved in order to integrate the information from the different physiological, metabolomic and transcriptomic strategies with the aim to identify biomarkers associated with leaf senescence in sunflower. These analyses were performed using Paintomics 2.0 (<http://www.paintomics.org>) (Garcia-Mayor et al 2011) and Mapman software (<http://mapman.gabipd.org/>) (Thimm et al 2004) that were adapted for sunflower data.

These results showed a correspondence between the changes detected by the different strategies. Through a metabolism overview, a decrease of photosynthetic activity and cell growth was detected. Moreover, sucrose, fatty acids, nucleotides and amino acids metabolism as well as those pathways related to nutrient recycling processes showed an up-regulation during leaf development. In particular, NAC, AP2-EREBP and MYB transcription factors showed high expression levels and higher levels of correlation and co-expression making them important candidates biomarker in the execution of the senescence program in sunflower.

The results of this work contributed to the knowledge of the molecular mechanisms involved at the onset and evolution of the senescence process in sunflower as well as to the identification of robust candidate genes involved in the different

developmental stages of this process, especially transcription factors. These genes could be further validated on breeding materials to be incorporated into assisted breeding programs for this agronomic important crop for our country. Furthermore, the strategies, methodologies, tools and knowledge developed in this thesis, contribute to the crop development and promote the adoption of genomics and post-genomics in the different stages of sunflower breeding.

Keywords: Sunflower, Senescence, Candidate genes, Transcriptomics, Metabolomics, Systems biology.

Agradecimientos

El presente trabajo ha podido ser realizado gracias al esfuerzo conjunto de muchas personas, que han colaborado ya sea directa o indirectamente con la realización del mismo, por lo cual espero no olvidarme de nadie...

Quisiera agradecer a la ANPCyT, al CONICET y a la DAAD por las becas otorgadas para la realización de este trabajo, así como también al INTA y sus directivos por abrirme las puertas a esta prestigiosa institución donde he aprendido muchísimas cosas desde mi tesina de grado y compartido muy lindos momentos con excelentes personas.

Quiero agradecer principalmente a mis directoras Ruth y Paula por confiar en mí, escucharme y apoyarme en todas mis ideas e incentivar me en todo momento ya sea laboralmente como académicamente. A Ruth, por brindarme su confianza y aceptarme con tanta calidez desde el primer día y abrirme las puertas a su grupo de investigación. Por estar siempre presente y dispuesta en todo momento ayudar y a compartir su valiosa experiencia y conocimiento, aun en los momentos más sobrecargados de trabajo. A Paula, por estar dispuesta a ayudarme y enseñarme desde el primer día y en todo momento, por estar siempre ahí cuando te necesitaba, por tu paciencia, tus charlas y por escucharme siempre y motivarme ante las adversidades y por confiar en mi e involucrarme en los distintos temas y aspectos laborales.

A Norma por recibirme con tanta cordialidad y aceptarme al igual que Ruth dentro de su grupo de trabajo y depositar en mí su confianza, por su activa participación en este trabajo, por las discusiones, ideas y sugerencias brindadas, por tomarte un tiempo para una lectura crítica y constructiva de la tesis y por estar siempre dispuesta a colaborar y solucionar todo tipo de problemas o inquietudes que me surgían.

A las tres, mi mayor reconocimiento y muchísimas gracias de todo corazón!!

A Guillermo por aceptarme en su grupo de fisiología mediante la beca inicial, por su ayuda y aporte durante los ensayos realizados a campo, y por su gran ayuda en el primer capítulo de la tesis. A todo el grupo girasol de Balcarce que me recibieron muy cálidamente y me han ayudado con los ensayos a campo y con el cual compartí muy buenos momentos durante estos años.

A Ally y Tohge por aceptarme en su grupo de trabajo para que pueda realizar los ensayos metabolómicos, por las discusiones y su gran aporte a esta tesis y por estar siempre con buena voluntad para enseñarme y ayudarme en todo momento en estos temas nuevos para mí. A Mutsumi por su ayuda con la cromatografía iónica. También quisiera agradecer a todo el grupo de investigación por su cordialidad, su amistad y por hacerme sentir como en casa, al instituto Max Planck por abrirme las puertas durante 6 meses excelentes donde pude aprender no solo de metabolómica... a Cori y Martin por su buena onda y gran ayuda para conseguir depto. y con todos los temas burocráticos. A Carmen y Javiera, mi familia en Alemania, por la cordialidad que me brindaron desde el primer día y por los hermosos momentos que pase junto a ustedes. Gracias!

A Julio Di Rienzo por su valiosísima ayuda con la parte estadística, por sus discusiones y sugerencias y por estar siempre dispuesto a explicarme ante todas mis dudas.

A todo el grupo de bioinformática, Maxi, Sergio G., Sergio L., Darío, Patricio, Marisa, Paula y Norma, por su gran ayuda en los análisis de datos, por enseñarme y ayudarme en cada uno de los problemas...

A Pilar y Sofía por su gran ayuda con las real time para la validación del chip que hicieron que pueda terminar a tiempo los análisis. Gracias!!!

A Alberto por su ayuda, buena voluntad y buena onda en el armado y diseño del sistema de riego electrónico para el ensayo de invernáculo.

A Ana por su ayuda con los northern y por todas las sugerencias ante las dudas y problemas con los experimentos, siempre dispuesta a escuchar y ayudar.

A Mariana L. por su ayuda con las extracciones de metabolitos y los análisis...

A los chicos del invernáculo, Martín, Nacho, Matías y Agustín por estar siempre presentes y ayudando en todo momento con todos los ensayos...

A Laura por su ayuda con los ensayos de transformación, por su paciencia y por estar dispuesta a enseñarme y ayudarme con todos estos temas y por su ayuda con la edición final...

A los chicos de UGB por su buena onda y buena predisposición que tienen siempre, Apu, Naty, Vero N., Pablito

A los chicos del lavadero, por su valioso trabajo, su gran ayuda y buena voluntad de siempre...

A todo el laboratorio, Carla, Moni, Cori, Lucila, Vero L., Sofía, Caro, Dani, Jere, Fede, Luis, Agustin, por la buena onda y por la cordialidad brindada y por todos los buenos momentos que pasé durante este tiempo, la verdad me da mucho gusto trabajar con gente así.

A todos los chicos del locutorio por los mates, la buena atmosfera de trabajo y los buenos momentos, Laura, Yami, Vero D., Flavia, Moni, Carlita, Noe, Fede, Jere, Lucila, Diego, Gabi, Lusito, Carlitos, Cintia, Pame.

A todo el Instituto de Biotecnología, porque todos de alguna manera me han ayudado con distintas dudas, prestamos de reactivos, sugerencias, comentarios, discusiones de resultados, etc. que me han ayudado muchísimo en todo sentido...

A Jere, por su amistad y por bancarme durante tanto tiempo tanto dentro como fuera del trabajo.

A Mario, por ser un amigo de fierro, con sus locuras siempre dando una mano, "salvándome las papas" y poniéndole buena onda a todos los problemas...

A mis padres por el constante apoyo, cariño y comprensión, por confiar siempre en mí para todas las ideas que pasaban por mi cabeza, por incentivar me en todo momento a pesar de no tener idea sobre mi trabajo y por todo el esfuerzo que realizan a diario para darme todo lo mejor que pueden y a mis hermanos por su compañía, cariño y por todo el apoyo que me brindan día a día.

A todos los que olvidé mencionar, que de una u otra manera me acompañaron en este largo proceso... A todos mi mayor reconocimiento y gratitud ¡GRACIAS!

*A mis padres Ana y Rubén,
mis hermanos Alexia y Gonzalo
y mi sobrino Agustín,
por acompañarme y alentarme durante estos años*

Parte de los resultados presentados en este trabajo de tesis fueron publicados:

- **Moschen S**, Radonic LM, Ehrenbolger GF, Fernández P, Lía V, Paniego NB, López Bilbao M, Heinz RA, Hopp HE. (2014). **Functional Genomics and Transgenesis Applied to Sunflower Breeding**. In: *Sunflowers: Growth and Development, Environmental Influences and Pests/Diseases*. Arribas J.I. (ed) Nova Science Pubs. New York, USA. *Aceptado para publicación*.
- Fernandez P, Soria M, Blesa D, DiRienzo J, **Moschen S**, Rivarola M, Clavijo B, Gonzalez S, Peluffo L, Principi D, Dosio G, Aguirrezabal L, García-García F, Conesa A, Hopp E, Dopazo J, Heinz R, Paniego N. (2012). **Development, characterization and experimental validation of a cultivated sunflower (*Helianthus annuus L.*) gene expression oligonucleotide microarray**. *PLoS ONE* 7 (10).
- Fernandez P, **Moschen S**, Paniego N, Heinz RA. (2012). **Functional approaches to study leaf senescence in sunflower**. In: *Senescence*. InTech Open Access Publisher. (ISBN 978-953-308-28-6).
- Fernandez P, Di Rienzo JA, **Moschen S**, Dosio GA, Aguirrezabal LA, Hopp HE, Paniego N, Heinz RA. (2011). **Comparison of predictive methods and biological validation for qPCR reference genes in sunflower leaf senescence transcript analysis**. *Plant Cell Rep* 30: 63-74.

Índice

Abreviaturas.....	iv
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
El girasol.....	1
<i>Generalidades.....</i>	1
<i>Importancia económica</i>	2
<i>El girasol en Argentina</i>	2
<i>Factores que limitan la producción de girasol</i>	4
El proceso de senescencia en plantas	5
<i>Factores que influyen en el proceso de senescencia</i>	7
<i>Desarrollo del proceso de senescencia.....</i>	11
<i>Eventos moleculares del proceso de senescencia.....</i>	12
<i>Expresión génica durante la senescencia</i>	15
Genómica funcional aplicada al estudio de caracteres complejos.....	16
<i>Genómica Funcional en girasol.....</i>	17
<i>Senescencia en girasol: estrategias de análisis mediante genómica funcional.....</i>	20
HIPÓTESIS DE TRABAJO	22
OBJETIVOS.....	22
<i>Objetivo general</i>	22
<i>Objetivos específicos:</i>	22
CAPITULO 1	
ESTUDIO DE VARIABLES FISIOLÓGICAS RELACIONADAS	
CON LA SENESCENCIA FOLIAR EN GIRASOL.....	24
INTRODUCCIÓN.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS	28
Material biológico y condiciones experimentales.....	28
Mediciones	29
<i>Clorofila</i>	29
<i>Carbohidratos solubles totales.....</i>	29
<i>Porcentaje de nitrógeno foliar.....</i>	30
<i>Biomasa aérea.....</i>	30
<i>Área foliar por planta y SPAD (Índice de verdor).....</i>	30
<i>Índice de intercepción de radiación.....</i>	31

<i>Análisis estadístico de datos</i>	31
RESULTADOS	32
Caracterización del cultivo a través de variables fisiológicas	34
<i>Área foliar e índice de verdor (SPAD)</i>	34
<i>Intercepción de radiación</i>	35
<i>Materia seca</i>	36
Caracterización de la senescencia foliar.....	37
<i>Contenido de clorofila</i>	37
<i>Carbohidratos solubles totales</i>	39
<i>Contenido de nitrógeno (%)</i>	42
DISCUSIÓN	44
CAPÍTULO 2	
ESTUDIO METABOLÓMICO RELACIONADO A LA	
SENESCENCIA FOLIAR EN GIRASOL	49
INTRODUCCION	50
MATERIALES Y MÉTODOS	53
Material biológico y condiciones experimentales.....	53
Análisis concertado de metabolitos	54
Extracción de metabolitos	54
Derivatización y análisis por GC-TOF-MS	54
Cromatografía iónica.....	55
RESULTADOS	56
Diseño experimental	56
Perfiles metabólicos.....	57
Nutrientes iónicos	61
DISCUSIÓN	65
Metabolismo del carbono	65
Metabolismo de aminoácidos	67
Nutrientes iónicos	68
CAPÍTULO 3	
ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO RELACIONADO A LA	
SENESCENCIA FOLIAR EN GIRASOL	71
INTRODUCCIÓN	72
MATERIALES Y MÉTODOS	76

Material biológico	76
Extracción de ARN y control de calidad	76
Análisis de asociación de expresión génica concertada	76
Análisis de enriquecimiento funcional mediante Ontologías Génicas (GO)	77
Selección de genes candidato y diseño de cebadores	78
Análisis de expresión mediante PCR en tiempo real (qPCR).....	79
Northern blot para microARN.....	80
Análisis de genes SAGs	80
Análisis de factores de transcripción	81
RESULTADOS	82
Análisis general de la micromatriz	82
<i>Análisis de agrupamiento</i>	82
<i>Análisis de expresión diferencial</i>	83
Análisis funcional.....	85
<i>Genes asociados a la senescencia (SAGs)</i>	86
<i>Factores de transcripción</i>	90
Validación de la micromatriz	96
DISCUSIÓN	97
CAPÍTULO 4	
ESTUDIO INTEGRADOR DE DATOS TRANSCRIPTÓMICOS, METABOLÓMICOS Y FISIOLÓGICOS RELACIONADOS A LA SENESCENCIA FOLIAR EN GIRASOL	104
INTRODUCCIÓN	105
MATERIALES Y MÉTODOS	109
Análisis de integración utilizando el programa Mapman	109
Análisis de integración utilizando el programa Paintomics	109
RESULTADOS	110
DISCUSIÓN	123
DISCUSIÓN GENERAL	130
CONCLUSIONES FINALES	133
PERSPECTIVAS	134
BIBLIGRAFÍA	136
APÉNDICE	159

Abreviaturas

°C	Grados Centígrados
°CDDE	°C Días desde emergencia
ABA	Ácido abscísico
Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AG	Ácido Giberélico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	ARN ribosomal
ARNsn	ARN nucleares pequeños
ARNt	ARN de transferencia
AS	Ácido salicílico
BLAST	Algoritmo de búsqueda de alineamientos locales, del inglés: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BR	Brasinoesteroides
C	Control
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CC	Componente Celular
cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de carbono
col.	Colaboradores
Cq	Ciclo de cuantificación, del inglés: <i>quantification cycle</i>
DDE	Días desde emergencia
DH	Déficit hídrico
DNA	DeoxyriboNucleic Acid, ver ADN
Dr.	Doctor/a
ECM	Esterilidad citoplasmática masculina
EEA	Estación experimental agropecuaria
ESTs	Secuencias expesadas cortas, del inglés: <i>Expressed Sequence Tags</i>
FAMES	Ésteres metílicos de ácidos grasos, del inglés: <i>Fatty Acid Methyl Ester</i>
FCA-UNMdP	Facultad de Ciencias Agrarias – Universidad Nacional de Mar del Plata
FM	Función Molecular
FT	Factores de transcripción
g	Gramos
GABA	Ácido γ -aminobutírico
γ ATP	γ -adenosin trifosfato
GC-TOF-MS	Cromatografía gaseosa –tiempo de vuelo – espectroscopia de masa, del inglés: <i>Gas Chromatography - Time of Flight - Mass Spectrometry</i> .
GO	Ontologías Génicas, del inglés: <i>Gene Ontology</i>
h	Horas
ha	Hectáreas
HCS	hidratos de carbono solubles

INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IPT	Isopentiltransferasa
KEGG	Enciclopedia de genes y genomas de Kioto, del inglés: <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
Kg	Kilogramos
KH_2PO_4	Fosfato de potasio monobásico
KNO_3	Nitrato de potasio
l	Litro
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa, del inglés: <i>Liquid Chromatography - Mass Spectrometry</i>
log ₂	Logaritmo en base dos
LSD	Mínima diferencia significativa de Fisher del inglés: <i>Least Significant Difference</i>
m	Metros
M	Moles
m ²	Metros cuadrados
mg	Mili gramo
MgCl_2	Cloruro de Magnesio
MgSO_4	Sulfato de magnesio
µg	Micro gramo
µl	Micro litro
µm	micrometro
µM	Micro Molar
miARN	Micro-ARN
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Mili Molar
mm	Milímetros
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico.
Mpb	Mega pares de bases
MSTFA	N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida
Na_2HPO_4	Bifosfato de sodio
NaH_2PO_4	Fosfato monosódico
NGS	Secuenciación de última generación, del inglés: <i>Next-Generation Sequencing</i>
NH_4SO_4	Sulfato de amonio
nm	Nano metro
nM	Nano moles
nmol	Nano moles
PA	Poliaminas
PaO	Feoforbida a-Oxigenasa
PAR	Radiación fotosintéticamente activa, del inglés: <i>Photosynthetically Active Radiation</i>
PB	Proceso Biológico
PCD	Muerte celular programada, del inglés: <i>Programed Cell Death</i>
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa, del inglés: <i>Polymerase Chain Reaction</i>

PF	Peso fresco
qPCR	Reacción en cadena de la Polimerasa cuantitativa, del inglés: <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RCCR	Reductasa catabólica de clorofila roja, del inglés: <i>Red Chlorophyll Catabolite Reductase</i>
RG	Gen de referencia, del inglés: <i>Reference Gene</i>
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNA	RiboNucleic Acid, verARN
RNA-Seq	Secuenciación de ARN, del inglés: <i>Ribonucleic acid sequencing</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SAGs	Genes asociados a senescencia, del inglés: <i>Senescence Associated Genes</i>
SARK	Receptor quinasa asociado a senescencia, del inglés: <i>Senescence-Associated Receptor Kinase</i>
SDGs	Genes sub-expresados durante la senescencia, del inglés: <i>Senescence Down-Regulated Genes</i>
SDI	Genes de girasol inducidos por sequía, del inglés: <i>Sunflower Drought Induced</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico, del inglés: <i>Sodium Dodecyl sulfate</i>
SNP	Polimorfismo de Simple Nucleótido, del inglés: <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SSC	Citrato de sodio salino, del inglés: <i>Saline-sodium citrate</i>
SUR	Base de datos de unigenes de girasol, del inglés: <i>Sunflower Unigene Resource</i>
T	Tiempo
ULC	Agua ultra pura para cromatografía líquida, del inglés: <i>Ultra Liquid Chromatography</i>

INTRODUCCIÓN GENERAL

El girasol

Generalidades

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es una especie perteneciente a la familia Asteraceae, subfamilia Asteriodae, tribu Helianthae, subtribu Helianthinae (Seiler, 1997). La familia Asteraceae es una de las más grandes y diversas dentro de las plantas con flor, conteniendo un 10% de todas las especies de angiospermas. Las plantas dentro de esta familia se caracterizan por la presencia de numerosas inflorescencias agrupadas que presentan el aspecto de una única flor compuesta.

Se estima que la familia Asteraceae surgió en América del Norte entre 100 y 30 millones de años atrás y sufrió una rápida y extensa diversificación (Raven y Axelrod, 1974).

Actualmente, más de 40 taxones de esta familia han sido domesticados, incluyendo cultivos alimenticios (lechuga, achicoria, topinambur), aceiteros (girasol, cártamo), medicinales (manzanilla) y ornamentales (crisantemo, dalia, zinnia y copete) (Kesseli y Michelmore, 1997).

El género *Helianthus* comprende 36 especies perennes y 12 herbáceas anuales (Schilling y Heiser, 1981), dentro del cual se incluyen plantas diploides, tetraploides, y hexaploides, todas con un número cromosómico básico de $x = 17$ (Heiser y col., 1969). *Helianthus annuus* comprende tres subespecies: *H. annuus* ssp. *macrocarpus*, (girasol cultivado), *H. annuus* ssp. *lenticulares* (girasol silvestre) y *H. annuus* ssp. *annuus* (girasol maleza) (Paniego y col., 2007).

Con excepción de la Antártida, se encuentran representantes de esta familia en todos los ambientes y continentes (Funk y col., 2005). El girasol es una especie diploide ($2n = 2x = 34$), con un genoma haploide *ca.* 3500 Mpb (Baack y col., 2005). Su dispersión geográfica es amplia, creciendo en climas templados y subtropicales (Funk y col., 2005). Es una planta típicamente alógama y auto-incompatible, cuya domesticación ha permitido la generación de auto-compatibilidad y el aumento del tamaño, vigor y número de semillas por capítulo. Esto convierte al girasol cultivado en una especie con características que facilitan la obtención de germoplasma autopolinizable, favoreciendo los programas de mejoramiento con la posibilidad del desarrollo de híbridos. Su tiempo generacional

es relativamente corto, de 70 a 120 días, y el rendimiento es de aproximadamente 1.000 semillas por capítulo.

Diversas especies silvestres del género *Helianthus* han sido importantes fuentes de genes a lo largo de la domesticación y mejoramiento del girasol cultivado, aportando genes de resistencia a enfermedades, tolerancia a sequía, esterilidad citoplasmática masculina (ECM) y otras características de interés agronómico (Jan y col., 1998). Como ejemplo de ello, los cruzamientos interespecíficos *H. annuus* x *H. petiolaris* permitieron la combinación de la ECM de *H. petiolaris* y de los genes restauradores de la fertilidad de *H. annuus*, dando lugar al desarrollo de la industria de la semilla híbrida de girasol (Fick y Zimmer, 1976).

Importancia económica

El girasol es uno de los cultivos oleaginosos más importantes del mundo. La mayor parte de la producción se destina a la extracción de aceite (Dorrell y Vick, 1997), que constituye el cuarto aceite vegetal más importante a nivel mundial, después del aceite de soja, palma y canola, con una producción cercana al 13% del total. La semilla de girasol posee un 40% de aceite y un 25% de proteína. A partir de la semilla, se obtiene aceite comestible de alta calidad, considerado además como *Premium* debido al bajo contenido de ácidos grasos saturados (linolénico) y alto contenido de ácidos grasos mono- y di-insaturados (oleico y linoleico). El remanente, luego de la extracción de aceite, es utilizado para alimento de ganado. Además de su uso comestible, el aceite de girasol también es utilizado en la producción de agroquímicos, especialmente en pesticidas hidrofóbicos, surfactantes, adhesivos, plásticos, suavizantes, lubricantes y es, a su vez, un gran potencial para la producción de biodiesel (Paniego y col., 2007).

El girasol en Argentina

La producción mundial de girasol oscila en torno a las 27/30 millones de toneladas anuales. Entre los principales países protagonistas se encuentran: la Federación Rusa, que habitualmente aporta unas 6,5 millones de toneladas, la Unión Europea, con 4,8 a 6,5 millones de toneladas, Ucrania, con 4,2 a 5,3 millones de toneladas, y el único país relevante en el hemisferio sur, la Argentina, con 3,5 a 4,5 millones de toneladas. Hacia finales de los '90, Argentina logró una producción de 6,5 millones de toneladas, convirtiéndose así en el primer productor mundial del grano, con una exportación de 1,7 millones de toneladas de aceite sobre un total de 3 millones

comercializadas mundialmente que la ubicó además como principal exportador a nivel mundial.

Luego de la caída de los precios a fines de los '90, y a raíz de la sobreoferta local, la situación del cultivo mejoró entre las campañas 2000-01 y 2005-06 (Figura I.1). La producción de girasol aumentó de 2,93 a 3,95 millones de toneladas, lo que implicó un 34,7% de crecimiento en seis años (Ingaramo, 2005). El área sembrada creció un 26,6%, aunque este aumento se produjo sobre zonas de mayor riesgo agroecológico o en tierras de menor calidad debido a un rápido cambio de las prácticas agrícolas de cultivos como la soja y el maíz, los cuales han incrementado ampliamente sus áreas cultivables como consecuencia de un mercado favorable y la mayor rentabilidad por parte de productos transgénicos con resistencia a herbicidas e insectos (Figura I.1). Por ello, el rendimiento sólo aumentó un 6,4%. Durante la campaña 2007 se produjeron 4,51 millones de toneladas, casi un millón de toneladas más que en la anterior, con una superficie de 2,64 millones de hectáreas (ha) cosechadas (Ingaramo, 2005).

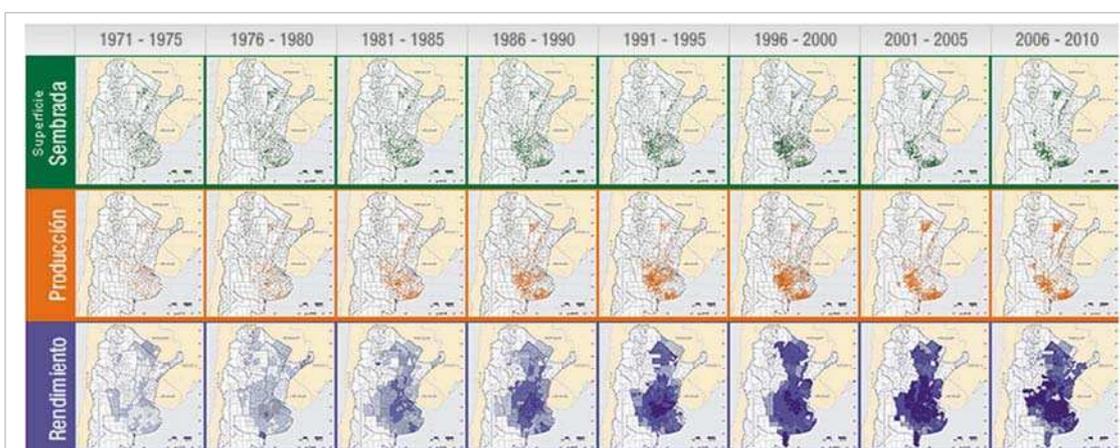


Figura I.1. Mapas de la superficie sembrada, producción y rendimiento del cultivo de girasol en la República Argentina desde el año 1971 hasta 2010.

La superficie sembrada de girasol abarcaba entre 1971 y 1985 la zona comprendida desde el norte del Chaco hasta el sur de la región Pampeana. Se observa un desplazamiento hacia el oeste de la región pampeana y zona chaqueña y una consolidación del sudeste de Buenos Aires y noreste de La Pampa como zona de producción del cultivo desde 1995 hasta 2010. A pesar de la reasignación de tierras a zonas de menor rendimiento relativo (violeta, mayor intensidad = mayor rinde), se ha ido incrementando la producción en los últimos años (naranja, mayor intensidad = mayor producción). Fuente: "La Argentina en Mapas" (CONICET).

Este aumento del rendimiento, a pesar de que las zonas de siembra no hayan sido óptimas, se debió a las mejoras tecnológicas introducidas en la producción del cultivo. Sin embargo, en la campaña siguiente (2008), se produjo una fuerte baja en la superficie sembrada pasando de 2,6 a 1,82 millones de ha, disminuyendo

drásticamente la producción. En la última campaña 2012/13 se sembraron 1,65 millones de ha, un 10,8% menos que en la campaña anterior, con una producción de 3,1 millones de toneladas (Asociación Argentina de Girasol).

La participación de las distintas provincias en el área sembrada indica que la reasignación de tierras ha sido significativa. En la provincia de Buenos Aires, entre 2000/01 y 2006/07, el área ha aumentado un 23%. La segunda provincia en importancia a comienzos de la década del '00 fue Córdoba, que ha visto reducida la superficie en un 68%, mientras que La Pampa, tercera provincia productora, la ha incrementado en un 30,5%. Las Provincias de Chaco y Santa Fe fueron las que mayor aporte han hecho al crecimiento de la superficie de siembra. La primera ha pasado de 140.000 a 352.000 ha (152% de aumento) y la segunda, de 117.000 a 193.000 ha (un 64% más) (Asociación Argentina de Girasol).

Factores que limitan la producción de girasol

El desplazamiento de la producción del cultivo hacia zonas marginales, sumado a las dificultades para obtener plantas de girasol transgénicas (Davey y Jan, 2010) y las consideraciones planteadas respecto al riesgo ambiental potencial derivado de la liberación de dichos eventos transgénicos (Cantamutto y Poverene, 2007), impidió la aparición de girasoles modificados genéticamente en el mercado global. Esta situación, junto con el cambio climático global y el incremento en frecuencia y severidad de distintos estreses abióticos, ha llevado a los investigadores a redirigir los objetivos y ampliar las herramientas utilizadas para el mejoramiento del cultivo (Moschen y col., 2014b; Sala y col., 2012).

Estos factores adversos han sido parcialmente superados mediante la contribución al mantenimiento de la producción a través de la incorporación en materiales elite de resistencia a herbicidas y tolerancia a estrés biótico y abiótico mediante estrategias alternativas de mejoramiento genético y el manejo del cultivo (Paniego y col., 2007; Sala y col., 2012). Estreses abióticos de base genética compleja como por ejemplo la deficiencia de nitrógeno, sequías, frío, salinidad y altas temperaturas son más difíciles de abordar y pueden reducir la producción de los cultivos y consecuentemente el potencial genético para incrementar la producción no es alcanzado. Debido a esto, el desarrollo de cultivares con un incremento en la adaptación a estos cambios climáticos surge como un requerimiento imperioso (Boyer, 1982; Moschen y col., 2014b).

El girasol es descrito normalmente como susceptible a bajas temperaturas y salinidad (Huang y col., 2005; Kratsch y Wise, 2000; Maas y Hoffman, 1977), pero con una tolerancia relativa a sequías debido a su gran sistema radicular exploratorio (Connor y Jones, 1985; Connor y col., 1985; Sadras y col., 1991). La información disponible de genes candidatos en respuesta a estrés abiótico en girasol ha sido descrita en diferentes trabajos (Cellier y col., 1998; Fernandez y col., 2003; Giacomelli y col., 2012; Giordani y col., 1999; Kiani y col., 2007; Liu y Baird, 2003; Manavella y col., 2006; Manavella y col., 2008a; Manavella y col., 2008c; Marchand y col., 2013; Ouvrard y col., 1996; Saadia y col., 2013).

El estrés biótico por su parte, es considerado también dentro de los factores más importantes que afectan la producción de girasol. En este sentido se han desarrollado estudios en los últimos años que incluyen estrategias de mejoramiento convencional y asistido, así como también la búsqueda de QTL para resistencia a hongos y virus fundamentalmente (Paniego y col., 2012).

El proceso de senescencia en plantas

El proceso de senescencia en plantas es un mecanismo complejo que se encuentra controlado por múltiples factores, tanto genéticos como ambientales. Entre estos factores se incluyen la edad, los niveles de hormonas reguladoras de crecimiento y el desarrollo reproductivo. Muchos estreses ambientales y biológicos tales como elevadas temperaturas, sequía, deficiencia de nutrientes, insuficiencias de luz/sombra/oscuridad e infecciones por patógenos pueden inducir la senescencia (Guo y Gan, 2005).

La senescencia de la hoja es el último estadio del desarrollo que precede a la muerte celular. Es un proceso genéticamente programado y está caracterizado por una expresión génica diferencial, lo cual lleva a una sobre expresión de genes asociados a la senescencia (*SAGs: del inglés senescence-associated genes*), logrando así una declinación de la actividad fotosintética, una activa degeneración de las estructuras celulares, el reciclado de nutrientes, y en última instancia, la muerte celular.

La señal visible de la senescencia es el amarilleamiento de las hojas como resultado de la degradación de la clorofila. Durante el proceso, se degradan macromoléculas como proteínas, lípidos, y ácidos nucleicos, y los nutrientes liberados de éste catabolismo son activamente translocados a las regiones de activo crecimiento, tales

como yemas, hojas jóvenes, frutos y semillas en desarrollo (Buchanan-Wollaston y Ainsworth, 1997; Feild y col., 2001; Gan, 2003; Gepstein, 2004; Lim y col., 2003; Quirino y col., 2000; Smart, 1994). La determinación del inicio del proceso de senescencia es compleja porque no existe un “síntoma” que indique este momento. Los estudios existentes se basan generalmente en la acumulación de ARNm que codifican enzimas relacionadas con la degradación de estructuras biológicas, sin embargo, este proceso presenta un alto grado de interacción entre señales autónomas y ambientales, involucrando distintos genes que se inducen o inhiben en distintas etapas del proceso (Gan y Amasino, 1997).

Asimismo, como una estrategia evolutiva, la senescencia foliar contribuye a la supervivencia de la planta ante condiciones ambientales desfavorables (Munne-Bosch y Alegre, 2004), posibilitando la translocación de nutrientes para el desarrollo rápido de semillas y asegurando, de esta forma, la subsistencia de la planta en las generaciones siguientes.

El proceso de senescencia en plantas de cultivos anuales se solapa con la fase reproductiva, influenciando el rendimiento del cultivo cuando es inducida prematuramente en condiciones ambientales adversas (Gregersen y col., 2013). A raíz de ello, este proceso posee un gran impacto económico, que en el caso del girasol actúa sobre la brecha existente entre el rendimiento potencial y real del cultivo, por la mayor o menor oportunidad de las plantas en mantener un sistema fotosintéticamente activo durante mayor tiempo, especialmente durante la etapa del llenado de granos.

El fenotipo reportado como *stay-green* funcional (Kusaba y col., 2013) ha demostrado tener un efecto en el incremento en la producción junto a un concomitante retraso en la senescencia, observado para diferentes líneas de cultivos, mutantes y transgénicas.

Ejemplos de la relación positiva entre *stay-green* y productividad se pueden citar para cultivos de importancia agronómica como arroz (Fu y col., 2011; Zhang y col., 2010), maíz (Ding y col., 2007; Ding y col., 2005; Pommel y col., 2006; Tollenaar y Daynard, 1978), sorgo (Borrell y col., 2000a; Borrell y col., 2000b; Jordan y col., 2012), trigo (Gong y col., 2009; Gong y col., 2005; Hafsi y col., 2000), cebada (Vaezi y col., 2010), soja (Abushakra y col., 1978) y girasol (De la Vega y col., 2011). En el caso de girasol, se evaluaron seis híbridos comerciales con el fin de determinar la relación entre retraso de la senescencia y rendimiento, dos de ellos

potenciales *stay-green*, (Advanta V70597 y V82222) , los cuales mostraron un incremento en el rendimiento, evidenciando una variabilidad en el germoplasma de girasol para este carácter. Sin embargo, para un mejor entendimiento de este carácter en girasol será necesario profundizar los estudios de la contribución de las dinámicas del índice de área foliar y nitrógeno específico de hoja en la acumulación de biomasa post-antesis y la posible contribución del atributo *stay-green* a la estabilidad de la producción en condiciones ambientales adversas (De la Vega y col., 2011).

Factores que influyen en el proceso de senescencia

El proceso de senescencia foliar puede ser influenciado por distintos factores, tanto de origen interno como externo:

- ***Edad:*** en ausencia de estreses externos, la senescencia ocurre de manera dependiente de la edad (Hensel y col., 1993; Jiang y col., 1993; Noodén y Penny, 2001). Los posibles mecanismos propuestos como iniciadores del proceso dependiente de la edad son la disminución de la actividad fotosintética (Hensel y col., 1993) y la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Munne-Bosch y Alegre, 2002).
- ***Desarrollo reproductivo:*** el desarrollo de los órganos reproductivos puede desencadenar la senescencia foliar en muchas especies de plantas, especialmente en aquellas plantas monocárpicas. La extirpación de las flores o frutos extiende la longevidad de la hoja en muchas especies tales como soja (Craftsbrandner y Egli, 1987), guisantes (Pic y col., 2002), arroz (Khan y Choudhuri, 1992) y girasol (Sadras y col., 2000a). Sin embargo, este efecto no ha sido observado en la especie modelo *Arabidopsis thaliana* (Noodén y Penny, 2001).
- ***Estreses:*** diferentes estreses ambientales, como por ejemplo, elevadas temperaturas, deficiencia de nutrientes, estrés hídrico, infecciones por patógenos y estrés oxidativo inducido por ozono o luz ultravioleta pueden inducir y/o acelerar la tasa de senescencia (Buchanan-Wollaston y col., 2003; Smart, 1994).
- ***Etileno:*** el etileno, una hormona gaseosa de la planta, juega un papel importante en el crecimiento y desarrollo vegetal. La correlación entre producción de etileno y senescencia foliar en especies climatéricas supone un rol regulador del etileno en éste proceso. Síntomas de senescencia, pueden ser inducidos (Horton y Bourguoin, 1992; Reyes-Arribas y col., 2001; Zacarias y Reid, 1990) o retrasados (Ella y col.,

2003; Philosophadas y col., 1994; Podwyszynska y Goszczynska, 1998) por aplicaciones de etileno exógeno. Dichas aplicaciones inducen senescencia prematura en plantas de *Arabidopsis*, sin embargo la aplicación constitutiva de esta hormona no cambia la longevidad de las hojas (Grbic y Bleecker, 1995; Kieber y col., 1993), lo cual sugiere una regulación dinámica del proceso de senescencia. Estudios transcriptómicos de genes *SAGs* inducidos por etileno junto con estudios fisiológicos, revelaron una gran interacción entre el etileno y otras hormonas que actuarían ajustando el avance de la senescencia de manera dependiente de la edad de desarrollo (Schippers y col., 2007).

- **Ácido abscísico (ABA):** el ácido abscísico es una hormona vegetal isoprenoide muy estudiada que regula numerosos procesos de crecimiento y desarrollo entre los que se pueden nombrar, dormición de semillas, germinación, embriogénesis, cierre estomático, crecimiento radicular, maduración de frutos, senescencia, respuesta a estrés entre otras (Hirayama y Shinozaki, 2010; Lee y Luan, 2012). En tejidos vegetativos, el ABA juega un rol importante en la respuesta a déficit hídrico al prevenir la deshidratación estimulando el cierre estomático y manteniendo la fase vegetativa, inhibiendo la transición a fase reproductiva. Los niveles de ABA en condiciones normales son mantenidos a bajas concentraciones, sin embargo, estos niveles incrementan considerablemente frente a un estrés hídrico, salino o térmico (Xiong y Zhu, 2003). A pesar de que los niveles de ABA se incrementan cuando la planta está bajo condiciones de estrés ambiental, varias mutantes de *Arabidopsis*, deficientes en la señalización o en la biosíntesis de ABA, no tienen un efecto cuantificable en la progresión de la senescencia foliar (Hensel y col., 1993). A raíz de ello, el ABA es preferentemente considerado como un potenciador, en lugar de un factor promotor de la senescencia de la hoja (He y Gan, 2003).

- **Ácido jasmónico:** los jasmonatos son hormonas oxolipinas derivadas del ácido α -linolenico y regulan un amplio rango de procesos de desarrollo y crecimiento en plantas, tales como germinación, crecimiento radicular, fertilidad, producción de antocianinas, senescencia y defensa frente a estreses bióticos y abióticos (Wasternack, 2007). Los niveles de ácido jasmónico en hojas senescentes son cuatro veces mayores que en las hojas jóvenes y los genes codificantes de enzimas que catalizan reacciones de la vía de biosíntesis de ácido jasmónico, están diferencialmente activados durante la senescencia foliar (He y col., 2002).

Aplicaciones exógenas de ácido jasmónico o metil-jasmonato, resultan en una disminución de la expresión de distintos genes asociados a la fotosíntesis como el gen de la *Rubisco*, además de observarse un cambio en la composición de polipéptidos en hojas senescentes similar a lo observado por inducción de ácido abscísico (Weidhase y col., 1987).

- **Ácido salicílico (AS):** el ácido salicílico, una fitohormona fenólica, regula varios aspectos del crecimiento vegetativo incluyendo, germinación, maduración de frutos, floración, senescencia y defensa frente a varios tipos de estrés (Vlot y col., 2009). Así como el ácido jasmónico, los niveles endógenos de ácido salicílico son cuatro veces más altos en las hojas senescentes que en las no senescentes (Morris y col., 2000). Tratamientos con AS inducen la senescencia prematura en *Arabidopsis*. Sin embargo, la acumulación de AS no es esencial para la inducción de genes SAGs durante la senescencia natural en *Arabidopsis* (Quirino y col., 1999). Estudios de micromatrices en plantas de *Arabidopsis* mostraron que el 19% de genes identificados previamente como sobre-expresados durante la senescencia fueron encontrados sub-expresados en plantas mutantes *nahG* deficientes en las vías de señalización por AS (Buchanan-Wollaston y col., 2005), evidenciando el rol de esta hormona en el progreso de la senescencia foliar.

- **Brasinoesteroides (BR):** los brasinoesteroides son polihidroxi esteroides que tienen influencia en crecimiento de hipocótilos y epicótilos, germinación, rizogénesis, floración, abscisión y senescencia (Rao y col., 2002). Existen evidencias de los BR como promotores de la senescencia foliar acelerando la degradación de clorofilas e inhibiendo la producción de antocianinas (Ali y col., 2008; Bajguz y Hayat, 2009). La aplicación externa de 24-*epi*-brassinolide (*eBR*) induce la senescencia en hojas de poroto (He y col., 1996) y en cotiledones de pepino (Zhao y col., 1990). Varios mutantes de *Arabidopsis* deficientes en la biosíntesis de BR tal como *det2* o en la vía de señalización de BR como los mutantes *bril*, muestran retraso en el fenotipo senescente (Clouse y Sasse, 1998). La acción de BR durante la senescencia o frente a una respuesta a distintos estreses estaría mediada por la interacción con otras hormonas como ABA, SA, etileno y auxinas (Gruszka, 2013).

- **Citoquininas:** estas fitohormonas son ampliamente conocidas por actuar en la regulación de varios procesos de crecimiento y desarrollo vegetal (Argueso y col., 2010; Perilli y col., 2010) y por su función en la adaptación a distintos estreses (Ha

y col., 2012). Estos factores de crecimiento tienen un efecto supresor de la senescencia foliar. La aplicación exógena de citoquininas, o de sus análogos, retrasan la senescencia, e incluso producen un retorno al fenotipo verde de las hojas amarillas en una variedad de especies de plantas como soja, tabaco y *Arabidopsis* (Gan y Amasino, 1996; Noodén y Letham, 1993). Rivero y col. (2010) demostraron que plantas de tabaco que expresan la enzima isopentiltransferasa (*IPT*), crítica en la síntesis de citoquininas, bajo un promotor asociado a senescencia *SARK* (*SARK::IPT* del inglés: *senescence-associated receptor kinase::isopentenyltransferase*) no degradaban las proteínas fotosintéticas a diferencia de las plantas silvestres que evidenciaron una degradación de las mismas.

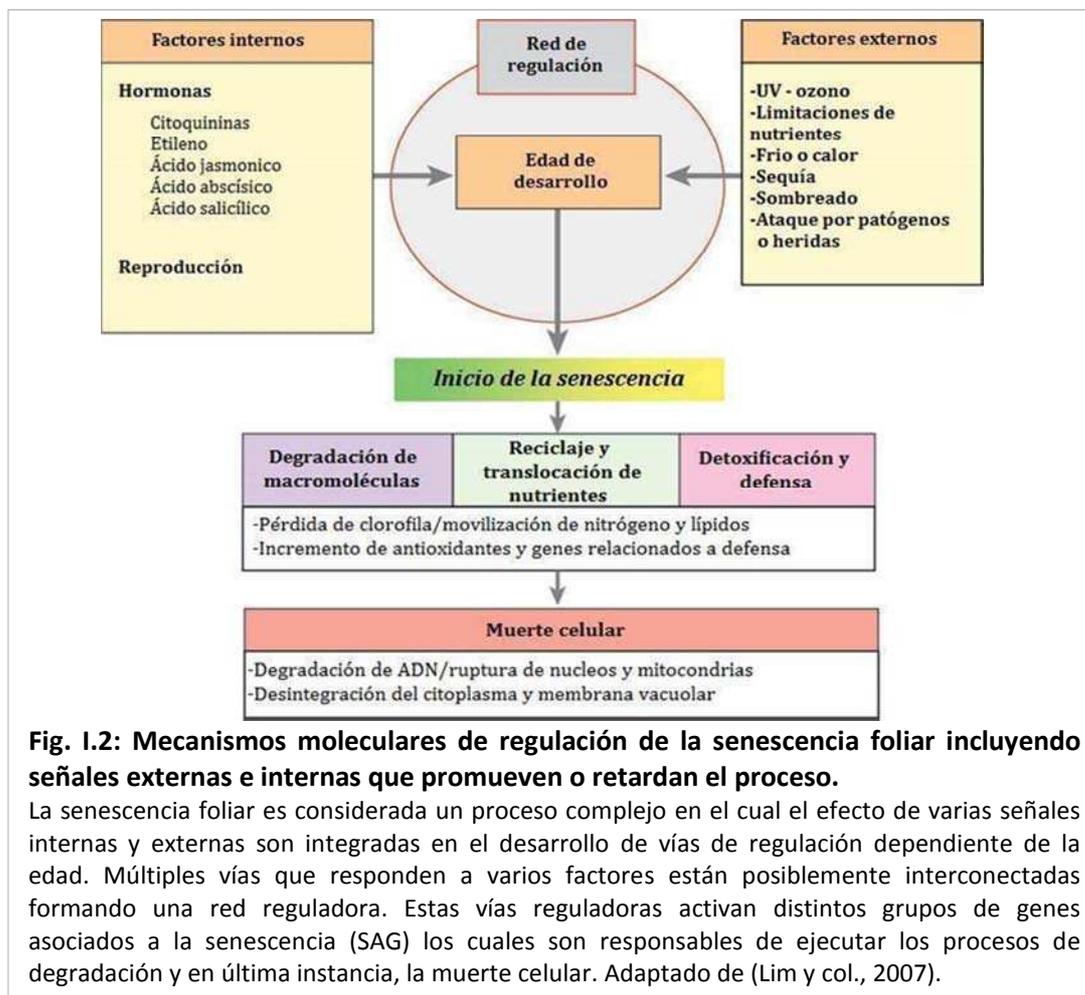
- **Ácido Giberélico (AG):** el ácido giberélico es una fitohormona conocida por su efecto en la elongación celular, dormición y germinación de semillas, crecimiento reproductivo, senescencia y tolerancia a varios estreses ambientales (Rodríguez y col., 2012). Una primera aproximación de la relación entre el AG y la senescencia foliar fue reportada por Fletcher y Osborne (1965), quienes mostraron un retardo en la senescencia en *Taraxacum officinale* a través del mantenimiento de los niveles de clorofila y la síntesis de ARN. La senescencia foliar es inhibida por la disponibilidad de AG libre (AG_4 y AG_7) (Li y col., 2010; Yu y col., 2009). Sin embargo, ha sido propuesto que AG inhibe la senescencia a través de un efecto antagónico a ABA por lo cual no actuaría directamente en la regulación del proceso de senescencia sino mediante un efecto sobre dicha hormona (Jibrán y col., 2013).

- **Auxinas:** este grupo de fitohormonas actúan principalmente controlando el crecimiento y desarrollo celular. La determinación del rol de las auxinas en el proceso de senescencia ha sido compleja debido a su importancia en los distintos aspectos del desarrollo vegetal (Lim y col., 2007). Las auxinas junto con las citoquininas son parte de un complejo regulador del estado nutricional de la planta a través de la vía de señalización del receptor de glucosa HXK1 (Moore y col., 2003). De este modo, el rol de las auxinas en la regulación de la senescencia podría estar interconectado a otras hormonas y al flujo metabólico.

- **Poliaminas (PA):** son fitohormonas con un efecto inhibitor del proceso de senescencia. En muchas especies de plantas, la aplicación exógena de PA puede retardar el efecto senescente, previniendo la pérdida de clorofila y peroxidación de

membrana y mediante la inhibición de la actividad ARNasa y proteasa (Borrell y col., 1997; Evans y Malmberg, 1989; Sood y Nagar, 2003).

La Figura I.2 ilustra de manera esquemática, los distintos mecanismos moleculares reguladores del proceso de senescencia de las hojas.



Desarrollo del proceso de senescencia

El principal objetivo de las actividades celulares subyacentes al proceso de senescencia es la conversión de los materiales acumulados por los procesos anabólicos en nutrientes fácilmente exportables hacia regiones en activo crecimiento o hacia el desarrollo de frutos y semillas. La baja tasa de degeneración celular durante la senescencia es, en parte, un mecanismo selectivo que asegura una eficiente removilización de nutrientes generados por el catabolismo de macromoléculas (Buchanan-Wollaston y col., 2003; Lim y col., 2003)

A nivel celular, la ejecución del proceso de senescencia ocurre de manera ordenada. Los cloroplastos, que contienen hasta un 70% de las proteínas de las células de la hoja, son las primeras organelas destinadas a la degradación. Otras organelas,

como por ejemplo los peroxisomas, también están sometidas a cambios bioquímicos durante la evolución del proceso. Por otra parte, los núcleos, necesarios para la transcripción génica, y las mitocondrias, fuente esencial de energía, se mantienen intactos hasta los últimos estadios del proceso (Inada y col., 1998; Noodén y col., 1997). Esta serie de pasos, que ocurren ordenadamente, hacen que la senescencia esté incluida dentro de un proceso de muerte celular programada o PCD (del inglés: *programed cell death*), por el cual las células promueven su propia muerte a través de la activación de un sistema de autodestrucción (Gan y Amasino, 1997). Si bien la senescencia resulta en niveles masivos de muerte celular, ésta sólo ocurre cuando el proceso ha sido completado, antes de que tome lugar el colapso vacuolar (Buchanan-Wollaston y col., 2003).

Durante el transcurso de la senescencia, y como resultado de la degradación de macromoléculas en las células de las hojas, los nutrientes como el nitrógeno, fósforo, y azúcares, son relocalizados en los órganos en crecimiento y tejidos de almacenamiento (Quirino y col., 2000; Smart, 1994). Las hojas verdes son órganos que contienen nutrientes; cuando la hoja ya no es requerida por la planta, el proceso de senescencia es inducido y se promueve el reciclaje y movilización de estos nutrientes a los diferentes destinos de la planta. La etapa final del proceso es la muerte de la hoja, pero esta fase es activamente retrasada y ocurre una vez que los nutrientes han sido relocalizados (Buchanan-Wollaston y col., 2003).

La senescencia es un proceso reversible, una hoja completamente amarilla, que ha movilizadado la gran mayoría de su contenido en nutrientes, puede ser inducida a retomar el color verde a través de varios tratamientos (Thomas y Donnison, 2000; Zavaleta-Mancera y col., 1999). De esta manera, los cloroplastos recuperan las características estructurales, se produce la síntesis de proteínas cloroplásticas y se reanuda la fotosíntesis, lo cual demuestra ser un proceso estrictamente regulado y controlado en todas sus etapas.

Eventos moleculares del proceso de senescencia.

- ***Degradación de la clorofila:*** existen tres enzimas claves en esta vía, la clorofilasa (Benedetti y Arruda, 2002; Tsuchiya y col., 1999), feoforbida *a* oxigenasa (Paolacci y col.) (Paolacci y col.) (Pruzinska y col., 2003) y la reductasa catabólica de clorofila roja o RCCR (del inglés: *red chlorophyll catabolite reductase*) (Mach y col., 2001; Wuthrich y col., 2000). PaO es una enzima importante en la degradación de

la clorofila, que sólo ha sido detectada durante la senescencia (Guevara y Jimenez, 2006). Estudios de micromatrices en *Arabidopsis* demostraron una clara sobre-expresión de esta enzima en hojas senescentes (Lin y Wu, 2004). Se cree que la degradación de la clorofila es llevada a cabo como parte del proceso de detoxificación de compuestos fitotóxicos cuando tiene lugar la senescencia, y no así en el reciclaje de nutrientes; así los catabolitos de clorofila no fluorescentes constituyen el producto final de la degradación de la clorofila y son depositados en las vacuolas, mientras que ninguno de los nitrógenos de estos catabolitos es reciclado (Hinder y col., 1996; Tommasini y col., 1998).

- ***Degradación de proteínas:*** las células de las plantas pierden cerca de dos tercios de las proteínas solubles durante la senescencia (Inada y col., 1998). Se ha demostrado que al menos los pasos iniciales de la degradación de proteínas cloroplásticas ocurren en las organelas intactas. Cloroplastos aislados de hojas maduras de guisantes son capaces de degradar proteínas del estroma, incluyendo la enzima Rubisco (Mitsuhashi y Feller, 1992; Roulin y Feller, 1998). Estudios de expresión génica muestran una sobre-expresión de genes codificantes de enzimas de degradación, tales como proteasas de la familia de las Clp (proteasas localizadas en el estroma) (Andersson y col., 2004; Guo y col., 2004; Lin y Wu, 2004), y la familia de las proteasas FtsH (proteasas asociadas a tilacoides) (Andersson y col., 2004; Guo y col., 2004).

Al mismo tiempo se ha documentado la sobre-expresión de cistein-proteasas vacuolares durante la senescencia foliar (Buchanan-Wollaston y col., 2003; He y Gan, 2003). Estas proteasas pueden jugar un importante rol en la degradación de proteínas cloroplásticas, principalmente en las etapas finales, después de la desorganización de la membrana.

En etapas tempranas de la senescencia foliar, cuando las membranas de los cloroplastos aún están intactas, la degradación de proteínas cloroplásticas por las proteasas vacuolares puede llevarse a cabo por la asociación de los cloroplastos a la vacuola central, lo cual es apoyado por estudios de microscopía electrónica en hojas senescentes de poroto francés (Minamikawa y col., 2001).

Existen evidencias de la importancia de la degradación de proteínas no cloroplásticas por la vía de la ubiquitinación en el desarrollo normal, incluyendo senescencia, y en respuesta a señales ambientales (Sullivan y col., 2003; Vierstra,

2003). El incremento de la expresión de *SEN3*, un gen poliubiquitina, fue observado en hojas senescentes de *Arabidopsis* (Park y col., 1998).

✓ **Degradación de lípidos:** durante la senescencia, se debilita la estructura y la integridad funcional de las membranas celulares, como consecuencia de un aumento en el catabolismo de los lípidos de membrana (Thompson y col., 1998). Plantas transgénicas de *Arabidopsis* con expresión alterada de lipasas de membrana, muestran un fenotipo con retraso en la senescencia (Thompson y col., 2000). Diversas enzimas de degradación lipídica, como por ejemplo, fosfolipasa D, ácido fosfatídico fosfatasa, lipoxigenasa, α - y β -galactosidasa y galactolipasa, muestran un aumento en los niveles de transcritos analizados por ensayos de micromatrices (Lin y Wu, 2004) y análisis de hibridación sustractiva (Gepstein y col., 2003), lo cual indica la importancia de estas vías en la degradación y removilización lipídica.

✓ **Reciclaje de nutrientes:** los nutrientes liberados de todos estos procesos catabólicos son translocados a regiones en activo crecimiento, como hojas jóvenes, yemas florales, y desarrollo de frutas y semillas (Guo y Gan, 2005). En un análisis de movilización de nutrientes en hojas de *Arabidopsis*, se encontró una disminución de la concentración de nutrientes como Mo, Cr, S, Fe, Cu, y Zn en hojas senescentes en un 50% comparado con las hojas verdes, mientras que los niveles de N, P, y K se vieron disminuidos en un 80% (Himmelblau y Amasino, 2001).

Los niveles citosólicos de glutamina sintetasa se incrementan durante la senescencia. Dicha enzima, se encuentra involucrada en la conversión de aminoácidos a glutamina, el mayor aminoácido móvil involucrado en el transporte de nitrógeno a larga distancia, incrementando la eficiencia en el reciclaje del nitrógeno (Buchanan-Wollaston y col., 2003). La forma citosólica de la glutamina sintetasa se encuentra localizada predominantemente en los haces vasculares en hojas senescentes de arroz (Sakurai y col., 1996), indicando un rol activo en el transporte de nitrógeno.

Los ácidos grasos liberados pueden ser convertidos a azúcares a través de la gluconeogénesis, o en ácidos orgánicos vía el ciclo de glioxilato (Chen y col., 2000). La expresión de genes codificantes de proteínas vegetales de almacenamiento (Gepstein y col., 2003; Mira y col., 2002) y de varios transportadores de nutrientes

(Guo y col., 2004; Quirino y col., 2001) se encuentran asociados a los procesos de senescencia foliar.

Expresión génica durante la senescencia

La regulación del proceso de senescencia foliar ha sido estudiada particularmente en especies modelo (Gepstein, 2004; Gepstein y col., 2003; Lim y col., 2003; Lin y Wu, 2004) y parcialmente en otras especies como arroz (Lee y col., 2001), tabaco (Pageau y col., 2006), arveja (Pic y col., 2002), trigo (Uauy y col., 2006), nabo (Gomber y col., 2006), y girasol (Cabello y col., 2006; Fernandez y col., 2012a).

Durante este proceso, las hojas experimentan grandes cambios coordinados de estructura celular, metabolismo y expresión génica. En las hojas senescentes, la mayoría de los genes que son expresados en las hojas verdes, incluyendo genes relacionados a la fotosíntesis, se encuentran en bajos niveles de expresión, mientras que un subgrupo de genes denominados SAGs (del inglés: *senescence-associated genes*) se encuentran sobre-expresados (Guo y Gan, 2005).

La primer demostración de la expresión génica diferencial en hojas senescentes proviene de un análisis de traducción in vitro, seguido de electroforesis en gel para detectar los cambios que ocurren en la traducción de poblaciones de ARNm durante la senescencia foliar (Watanabe y Imaseki, 1982). Este tipo de análisis reveló que la mayoría de los genes abundantes disminuyen su expresión durante el proceso de senescencia, mientras que algunos genes la incrementan.

Aunque la senescencia está caracterizada por la activación e inactivación de distintos genes, esta inactivación en sí misma no es suficiente para llevar adelante dicho proceso. La expresión de un subgrupo de genes dentro de las células del tejido foliar es requerida para un progreso ordenado de degradación y reciclaje de nutrientes. Estos genes pueden estar involucrados en múltiples vías interconectadas formando una red que controlan la senescencia foliar. Como consecuencia de ello, el bloqueo de una vía particular puede o no tener efecto significativo en el fenotipo de la hoja; esta particularidad se conoce como plasticidad de la senescencia (Gan y Amasino, 1997).

Diferentes señales inducen a menudo diferentes grupos de genes (He y col., 2001; Park y col., 1998; Weaver y col., 1998) los cuales, a su vez, pueden iniciar diferentes procesos bioquímicos y fisiológicos. Sin embargo, es probable que ciertos genes sean compartidos por diferentes vías, mientras que otros pueden estar

vinculados a una vía específica. Estos genes comunes a las distintas vías pueden tener un rol en la ejecución de la senescencia, y aquellos genes únicos, pertenecientes a una vía particular, podrían estar regulando, río arriba, diferentes componentes del programa senescente.

Los genes asociados a la senescencia (SAGs) se clasifican en dos clases dependiendo de los patrones temporales de expresión. Los genes de la clase I, o específicos de la senescencia, son aquellos cuyos transcritos sólo son detectados durante la senescencia, mientras que los pertenecientes a la clase II se observan en etapas tempranas del desarrollo, con un nivel de expresión basal, pero su abundancia incrementa considerablemente una vez que el proceso se induce (Gan y Amasino, 1997)

Genómica funcional aplicada al estudio de caracteres complejos

La genómica funcional es un campo de la biología molecular que estudia las funciones e interacciones entre genes (y proteínas) a partir de un gran volumen de datos generados por los proyectos genómicos. Tradicionalmente, rasgos o características visibles (fenotipo) se han asociado con el gen o los genes que los producían (genotipo). Los avances en los procesos biotecnológicos han permitido determinar qué genes están implicados, la naturaleza de la interacción y el tiempo en la asociación genotipo-fenotipo.

La primera tecnología innovadora implementada para el análisis transcriptómico a gran escala fue el desarrollo de micromatrices de ADN. Las micromatrices han demostrado ser una poderosa herramienta para el descubrimiento de muchos genes involucrados en respuesta o tolerancia a distintos tipos de estreses.

La aparición en los últimos años de los nuevos métodos de secuenciación de última generación o NGS (del inglés: *Next-Generation Sequencing*), que generan un mayor volumen de datos conjuntamente con una reducción de los costos, ha alentado el desarrollo de estudios más completos y en mayor profundidad para una amplia gama de organismos y transcriptomas. La tecnología de secuenciación de ARN (RNA-Seq del inglés: *Ribonucleic acid sequencing*) ha permitido la generación de información valiosa para especies de alto interés económico pero de recursos genómicos limitados (Moschen y col., 2014b).

Otras tecnologías como la metabolómica y la proteómica aparecen como estrategias post-genómicas y representan un área muy importante dentro de la genómica funcional. El uso del perfil metabólico como herramienta comparativa complementaria de expresión génica ha tenido en los últimos años un gran impulso por parte de los investigadores con el objetivo de proporcionar una visión más profunda e integral de los procesos regulatorios complejos (Fiehn y col., 2000).

Si bien las tecnologías de alto rendimientos como las micromatrices de oligonucleótidos de ADN y la secuenciación de ARN han sido un pilar para el descubrimiento de la funcionalidad de un gran número de genes y/o sus mecanismos de regulación, aún permanecen muchas incertidumbres a la hora de analizar la información obtenida a partir de los datos y su correspondiente significado biológico. La sinergia multidisciplinaria entre la estadística, la biología molecular y la informática emergen como necesarias para dar sustento al uso e interpretación de los resultados obtenidos en el área de genómica funcional para proveer herramientas concretas para el análisis de un número múltiple de genes actuando y/o co-regulando en cascada.

Como resultado de un gran incremento en el volumen de datos tanto de experimentos transcriptómicos, metabolómicos, proteómicos, fisiológicos y fenotípicos, ha surgido en los últimos años una nueva disciplina conocida como biología de sistemas. Esta disciplina integra diferentes tipos de conocimientos moleculares de una manera sinérgica usando modelos y datos experimentales (Bruggeman y col., 2007). El objetivo de la biología de sistemas es proveer enlaces entre las distintas disciplinas moleculares de la biología, como la genética, biología molecular, metabolómica, bioquímica, enzimología, biofísica, biología celular y la fisiología (Alberghina y Westerhoff, 2005; Westerhoff y Palsson, 2004), con el soporte de disciplinas asociadas como la bioinformática y la estadística.

Genómica Funcional en girasol

El primer estudio de genómica funcional aplicado a la evaluación de la respuesta a estrés abiótico en girasol proviene de librerías de ADN complementario (ADNc) y análisis de expresión diferencial mediante despliegue diferencial de ARNm (en inglés: *differential display analysis*) en donde se evaluaron dos líneas contrastantes en respuesta a sequía y se lograron identificar seis genes inducidos denominándolos *SDI* (del inglés: *Sunflower Drought Induced*)(Ouvrard y col., 1996).

Años más tarde, perfiles de expresión génica en respuesta a estrés salino y sequía, fueron evaluados mediante despliegue diferencial de ARNm detectándose cinco ADNc regulados por sequía y doce por salinidad (Liu y Baird, 2003). Durante el mismo año fue reportado por primera vez en girasol el aislamiento y caracterización de secuencias expesadas cortas o ESTs (del inglés: *Expressed Sequence Tags*) órganos-específicas mediante la técnica de hibridación sustractiva por supresión (Fernandez y col., 2003), las cuales fueron anotadas funcionalmente y referenciadas a términos ontológicos según Gene Ontology (Ashburner y col., 2000).

La profundización en el estudio de factores de transcripción es esencial para dilucidar los diferentes mecanismos de respuesta a distintos tipos de estreses. En este caso, HAHB4 es un factor de transcripción de girasol ampliamente estudiado perteneciente a la subfamilia I de las proteínas HD-Zip y se encuentra positivamente regulado por sequía, ABA, herbivoría, oscuridad, daño mecánico o tratamientos con ácido metil-jasmónico o etileno (Dezar y col., 2005a; Gago y col., 2002; Manavella y col., 2006; Manavella y col., 2008b; Manavella y col., 2008c).

Un aspecto importante para comprender las vías de señalización en plantas en respuesta a diferentes tipos de estreses es la regulación post-transcripcional mediada por micro-ARN (miARN). Los miARN son secuencias no codificantes de 20 a 24 nucleótidos de longitud, altamente conservadas en plantas y animales (Bonnet y col., 2004; Huang y col., 2010) que regulan negativamente la expresión de ciertos genes mediante la inhibición de la traducción a proteínas o a través de la degradación del ARNm (Aukerman y Sakai, 2003; Tang y col., 2003). En girasol, se han descrito precursores de miARN (pre-miARN), identificados mediante búsqueda sistemática a partir de secuencias EST conocidas de *Helianthus sp.*, detectándose un total de 61 nuevos miARN para esta especie (Barozai y col., 2012). El gen *HaWRKY6* de girasol es un factor de transcripción perteneciente a la familia WRKY, la cual ha sido identificada mediando una amplia variedad de respuestas a distintos tipos de estreses (Eulgem y Somssich, 2007; Rushton y col., 2010; Ulker y Somssich, 2004). *HaWRKY6* exhibe un sitio de unión putativo al *miARN396* y dicha dependencia ha sido confirmada mediante un estudio en plantas transgénicas de *Arabidopsis* (Giacomelli y col., 2012). Plantas de girasol expuestas a ácido salicílico

o a altas temperaturas mostraron patrones de expresión opuestos evidenciando un rol del miARN en la regulación de este gen (Giacomelli y col., 2012).

El primer gran avance en las tecnologías de análisis transcriptómicos a gran escala fue el desarrollo de micromatrices, que constituyen una poderosa herramienta para el descubrimiento de numerosos genes inducidos por diferentes tipos de estreses. Los primeros estudios transcriptómicos a gran escala en girasol, involucraron el desarrollo de macro y micromatrices de ADNc para evaluaciones de respuesta a estrés biótico (Alignan y col., 2006) y abiótico (Fernandez y col., 2008; Hewezi y col., 2006a; Roche y col., 2007). Recientemente, las tecnologías de Affymetrix y NimbleGen han sido aplicadas para el desarrollo de micromatrices de alta densidad para el género *Helianthus* (Bazin y col., 2011) y para especies de la familia *Asteraceae* (Lai y col., 2012) respectivamente. Más recientemente, una micromatriz de oligonucleótidos para girasol cultivado ha sido desarrollada mediante la tecnología Agilent para estudios transcriptómicos (Fernandez y col., 2012b). Esta última micromatriz consiste de aproximadamente 41.000 unigenes representando el transcriptoma de girasol cultivado. El catálogo completo para dichos unigenes: ensamblados, anotación funcional y los datos de expresión obtenidos a partir del uso de esta micromatriz (Clavijo y col., 2012) se encuentran alojados en una base de datos estructurada bajo el esquema Chado (Mungall y Emmert, 2007) con interfaz Web que permite diferentes niveles de consulta guiados por términos ontológicos. La misma se encuentra disponible en el sitio <http://atgc-sur.inta.gob.ar> (Fernandez y col., 2012b).

Entre otras disciplinas post-genómicas relevantes en la caracterización de los procesos metabólicos de los organismos, es la metabolómica la que proporciona una visión más profunda de los procesos de regulación biológica (Fiehn y col., 2000). En girasol, existen al momento publicaciones fundamentalmente referidas a respuestas ante estreses bióticos (Jobic y col., 2007) que describen el intercambio de metabolitos solubles entre el girasol y *Sclerotinia sclerotiorum*, un hongo que causa distintas formas de enfermedad sobre el cultivo, mediante estudios de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). Otro estudio del perfil metabólico en respuesta a *S. sclerotiorum* fue realizado comparando capítulos infectados y no infectados entre genotipos resistentes y susceptibles al patógeno mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS del

inglés: *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*) identificándose un gran número de metabolitos diferencialmente regulados debido al ataque del hongo (Peluffo y col., 2010).

Senescencia en girasol: estrategias de análisis mediante genómica funcional

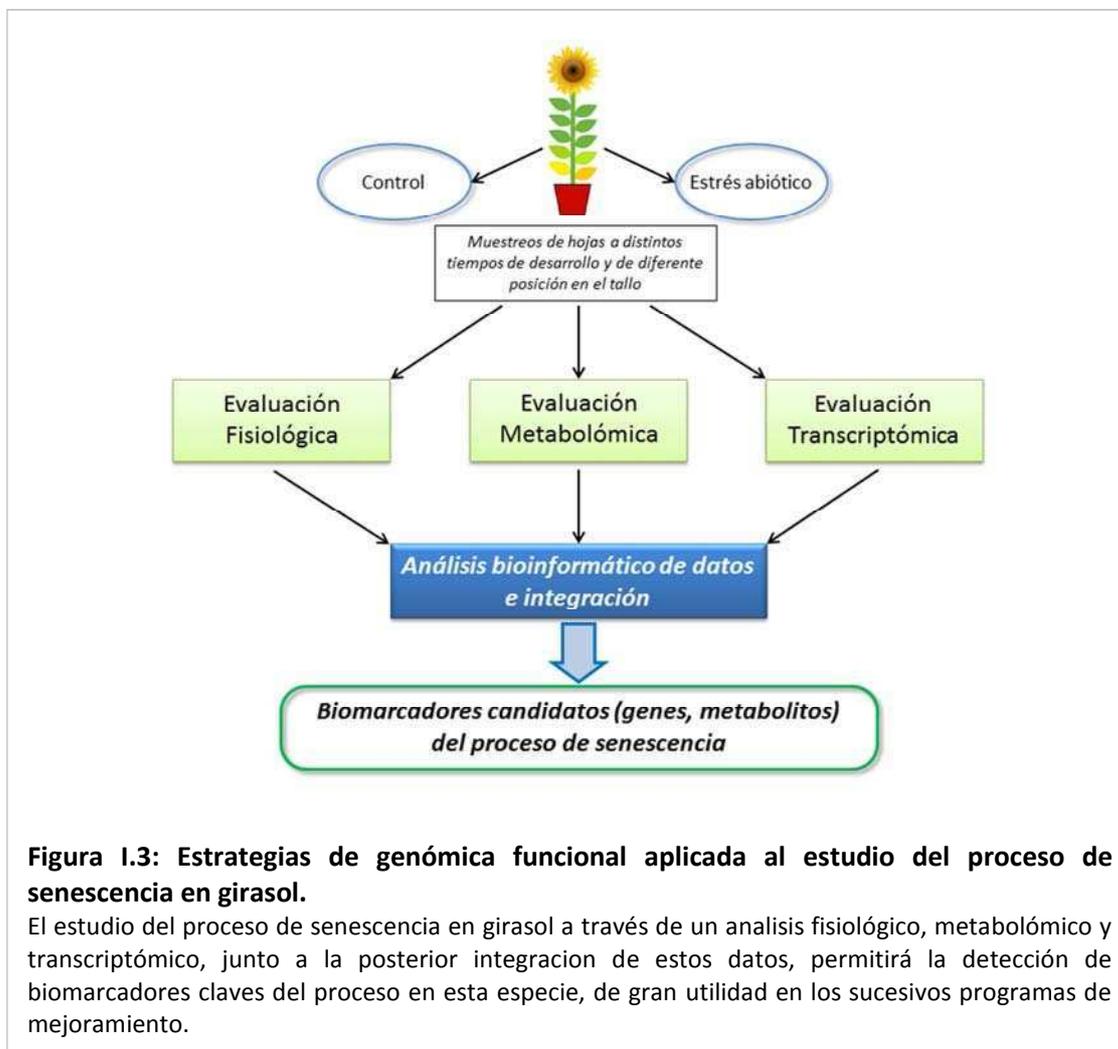
Los rendimientos potenciales del cultivo de girasol distan de los reales en todas las regiones productoras. En Balcarce, por ejemplo, mientras los rendimientos potenciales se estiman en 5.000 kg.ha⁻¹, los obtenidos por los mejores productores sólo alcanzan los 3.000 kg.ha⁻¹, y el promedio de la región oscila en 1.800 kg.ha⁻¹ (Dosio y Aguirrezábal, 2004). Una causa de estas diferencias en el rendimiento es la incapacidad por parte de los híbridos actuales de mantener su área foliar verde en estas condiciones ambientales durante períodos prolongados. Esto es relevante teniendo en cuenta que la radiación interceptada durante el período de llenado de los frutos juega un papel muy importante en la determinación del rendimiento y la concentración de aceite (Aguirrezábal y col., 2003; Dosio y col., 2000).

El proceso de senescencia en girasol se encuentra estrechamente relacionado al estrés nutricional y en particular a la disponibilidad de nitrógeno (Agüera y col., 2010; Cabello y col., 2006; Nasser, 2002) y a los niveles ambientales de CO₂ (de la Mata y col., 2012; Larios y col., 2004). Recientemente, se han realizado diferentes estudios de intensidad de luz en *H. annuus L.* en donde se demostró que las altas densidades de flujo de fotones causan senescencia temprana en las hojas primarias mediante la alteración no sólo de la tasa de fijación de CO₂ y los niveles de azúcar sino también de la actividad de las enzimas clave del metabolismo de nitrógeno (de la Mata y col., 2013).

Aunque los síntomas de la senescencia han sido explorados, los procesos involucrados y los mecanismos moleculares que controlan la senescencia en girasol todavía no han sido comprendidos. Como consecuencia, se han desarrollado distintas estrategias de genómica funcional aplicada al estudio del proceso de senescencia en esta especie (Figura I.3) las cuales permitirán evaluar los procesos moleculares subyacentes al mismo.

La utilización de una micromatriz de oligonucleótidos de alta densidad de girasol para el análisis del transcriptoma durante el proceso de desencadenamiento de la senescencia foliar, conjuntamente con los análisis de los perfiles metabólicos obtenidos por la técnica de cromatografía gaseosa –tiempo de vuelo –

espectrometría de masas (GC-TOF-MS), sumado a información de variables ecofisiológicas, permitirá la reconstrucción de las rutas metabólicas asociadas a las etapas del proceso de senescencia, posibilitando la identificación de genes candidatos robustos.



Conocer el momento de inicio de la cascada de eventos que desencadenan la senescencia permitiría determinar las causas que provocan este proceso y generar herramientas moleculares que faciliten futuras intervenciones sobre el mismo, útiles para su aplicación en el mejoramiento asistido de este cultivo.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La hipótesis que sustenta este trabajo es que la expresión de ciertos genes asociados a la senescencia foliar en girasol se inducen en un estadio temprano, iniciando una cascada de expresión de genes relacionados con procesos asociados a la degradación de macromoléculas que provocan una reducción del área foliar fotosintéticamente activa.

Los estudios de perfiles transcripcionales y metabólicos y su asociación con eventos fisiológicos contribuirán a la identificación de genes candidato y metabolitos clave involucrados en las distintas fases del proceso de senescencia así como también a dilucidar los mecanismos moleculares subyacentes a este proceso.

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es identificar y caracterizar molecularmente secuencias génicas y rutas metabólicas relacionadas con el desencadenamiento y evolución de la senescencia foliar en girasol a través del análisis de perfiles transcripcionales y metabólicos, en hojas de girasol de diferentes edades y en plantas expuestas a distintos tratamientos que modifican la tasa de senescencia, considerando aspectos ecofisiológicos y bioquímicos.

Objetivos específicos:

- ✓ Estudiar fisiológicamente el proceso de senescencia en hojas de girasol a distintos tiempos de desarrollo y frente a tratamientos que modifican la tasa de senescencia.
- ✓ Estudiar los cambios en perfiles metabólicos ocurridos durante la evolución del proceso de senescencia mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa GC-TOF-MS y cromatografía iónica.
- ✓ Identificar genes candidato asociados al proceso de senescencia a través del análisis transcriptómico utilizando una micromatriz de oligonucleótidos de girasol, y mediante la validación de genes potencialmente homólogos asociados al proceso de senescencia descriptos en especies modelo.

- ✓ Integrar los datos de perfiles transcripcionales, metabólicos y de variables fisiológicas asociados al proceso de senescencia en girasol para un análisis concertado que contribuya a identificar biomarcadores genuinos asociados al proceso en esta especie.

CAPÍTULO 1

ESTUDIO DE VARIABLES FISIOLÓGICAS RELACIONADAS CON LA SENESCENCIA FOLIAR EN GIRASOL

INTRODUCCIÓN

La Fisiología Vegetal es la ciencia que intenta explicar a través de las leyes de la física y químicas, cómo las plantas son capaces de utilizar la energía de la luz para sintetizar moléculas orgánicas a partir de sustancias inorgánicas y construir así las complejas estructuras que forman el cuerpo de las plantas, y como las plantas son capaces de reproducirse y adaptarse a un ambiente determinado (Azcon-Bieto, 2008). El aspecto más importante es la manera en que se integran estos procesos en el espacio y tiempo y su modulación en el ambiente para llevar a buen término el desarrollo de una planta.

La senescencia en plantas es un mecanismo complejo y altamente coordinado que se encuentra influenciado tanto por señales de origen endógenas como exógenas (Figura I.2) (Noodén y col., 1997).

En el sudeste de Buenos Aires, por ejemplo, el proceso de senescencia es iniciado abruptamente coincidiendo con el deterioro de las condiciones ambientales y la incidencia de enfermedades foliares, resultando en una disminución de la producción. El mantenimiento de las hojas funcionales durante largos períodos permitiría un incremento en la intercepción de radiación durante la etapa de llenado de grano y de esta forma incrementar el rendimiento (Aguirrezábal y col., 2003; De la Vega y col., 2011; Dosio y col., 2000; Kusaba y col., 2013; Sadras y col., 2000a; Sadras y col., 2000b).

Durante el proceso de senescencia foliar pueden distinguirse dos estadios principales: un proceso inicial durante el cual un número de genes involucrados en el transporte de nutrientes y degradación de estructuras celulares es sobre-expresado o sub-expresado, y una segunda fase que involucra la evolución del proceso una vez que el mismo se ha iniciado. Mientras que la primera etapa puede ser evaluada mediante técnicas moleculares, el progreso de la senescencia puede ser medida a partir de variables fisiológicas (Moschen y col., 2014a).

El contenido de clorofila, asociado a la fijación de CO₂ por parte de la enzima Rubisco, es uno de los parámetros más utilizados para evaluar el progreso de la senescencia foliar (Breeze y col., 2011; Thomas, 2013). Cuando la senescencia foliar se correlaciona con la caída de la enzima Rubisco, y consecuentemente con la disminución de la fotosíntesis, se la denomina “senescencia funcional” (Wittenbach, 1983). La hoja en este caso alcanzaría un equilibrio entre la

asimilación del carbono y la degradación del mismo por parte de la respiración y/o fotorrespiración (punto de compensación de carbono), y dejaría de contribuir en compuestos carbonados a la planta (Hensel y col., 1993).

Otra variable fisiológica relacionada con la senescencia es el contenido de azúcares solubles (van Doorn, 2008; Wingler y col., 2009), que actúan como moléculas señal en varios estadios del desarrollo de la planta (Rolland y col., 2002) y están directamente relacionados con la fotosíntesis como su producto primario, por lo que su disminución podría relacionarse con estadios previos a la senescencia. Sin embargo, la inducción de la senescencia en relación con niveles de azúcares ha sido muy contradictoria ya que en diferentes especies como *Arabidopsis*, tabaco y maíz ocurre una acumulación de azúcares en hojas senescentes (Masclaux y col., 2000; Noodén y col., 1997; Watanabe y col., 2013; Wingler y col., 1998).

El nitrógeno foliar tiene un rol central en el proceso de fotosíntesis (Thomas, 2013) y podría ser un indicador apropiado de la senescencia foliar (Agüera y col., 2010; Sadras y col., 2000a). El nitrógeno, durante el reciclado de nutrientes es convertido en aminoácidos, principalmente glutamina (el mayor aminoácido móvil involucrado en el transporte de nitrógeno a larga distancia), por la actividad de la glutamino-sintetasa, la cual se encuentra sobre-expresada en hojas senescentes de *Arabidopsis* (Buchanan-Wollaston y Ainsworth, 1997; Nam, 1997).

Uno de los principales factores externos o ambientales que modifican la tasa de senescencia y que a su vez está directamente relacionado al rendimiento, es el contenido de agua del suelo. Niveles moderados de estrés hídrico han sido reportados como inductores del proceso de senescencia en numerosos cultivos de importancia agronómica como sorgo (Jones y Rawson, 1979), soja, (Brevedan y Egli, 2003; De Souza y col., 1997), maíz (Aparicio-Tejo y Boyer, 1983), girasol (Whitfield y col., 1989), tomate (John y col., 1997), arveja (Pic y col., 2002), trigo (Yang y col., 2001), arroz (Yang y col., 2002), frijol (Muchero y col., 2013) y algodón (Kuppu y col., 2013).

La luz recibida por las hojas es otro de los factores ambientales que influyen en el proceso de senescencia (Rousseaux y col., 1996). La senescencia de una hoja individual estaría controlada por la cantidad y calidad de luz recibida medida por la relación rojo/rojo lejano, por lo cual, el sombreado de hojas individuales acelera su senescencia. En estas hojas sombreadas se produciría una disminución de la eficiencia fotosintética, con una disminución de los niveles de azúcares que

podrían desencadenar la senescencia. Sin embargo, el sombreado de la planta entera retrasa la senescencia en girasol. Este efecto posiblemente se deba a una desaceleración general del desarrollo de la planta, la cual recibe una menor cantidad de radiación durante el desarrollo. Estudios realizados tanto en maíz (Borrás y col., 2003), como en girasol (Rousseaux y col., 1996) permitieron determinar que una disminución de la calidad de luz (disminución de la relación rojo/rojo lejano) acelera la senescencia foliar en estos cultivos.

En especies monocárpicas, como es el caso del girasol, luego del período de floración se induce el proceso de senescencia a nivel planta entera, ya que es un proceso controlado estrechamente por el desarrollo de las estructuras reproductivas, reflejando una fuerte presión de las relaciones fuente-destino (Davies y Gan, 2012; Gregersen y col., 2013). Sin embargo, una excepción a esta regla es la especie modelo *A. thaliana* en la cual la senescencia foliar es independiente del desarrollo de las estructuras reproductivas (Noodén y Penny, 2001).

Este capítulo tiene como objetivo estudiar variables fisiológicas relacionadas al proceso de senescencia en hojas de girasol de diferentes edades (distinta posición en el tallo), a distintos tiempos de desarrollo y frente a tratamientos que modifican la tasa de senescencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y condiciones experimentales

Un híbrido de girasol ampliamente difundido en el sudeste de Buenos Aires VDH487 (Advanta semillas) fue cultivado a campo en la Unidad Integrada (FCA-UNMdP/EEA-INTA) Balcarce durante la campaña 2010/2011 a una densidad de 7,2 plantas/m², efectuando controles periódicos de enfermedades, malezas e insectos. Se implementaron tres condiciones experimentales: una condición control en la cual las plantas crecieron con buenas condiciones hídricas y nutricionales con una humedad volumétrica cercana al 40% en los primeros 60 cm de profundidad del suelo, una condición de déficit hídrico en la cual se redujo la humedad volumétrica a aproximadamente 20% a partir de los 20 días post-emergencia, y por último, un tratamiento de ablación del órgano reproductivo o decapitado, realizado en el estadio fenológico R3 (Schneider y Miller, 1981). Las mediciones de humedad se realizaron periódicamente utilizando un equipo Trase System, Model 6050X1, Soil moisture Equipment Corp., Santa Barbara, CA, USA.

El experimento fue realizado bajo una cubierta de nylon tipo *shelter* fijo para evitar el ingreso de agua por precipitaciones. En el tratamiento de déficit hídrico se colocaron además bandas de nylon de 200 µm de espesor entre los surcos. El diseño del ensayo fue llevado a cabo en tres bloques completamente aleatorizados con tres réplicas biológicas. Cada una de esas réplicas estaba conformada por una mezcla de tres plantas aleatorizadas dentro de cada bloque.

En distintos momentos durante el desarrollo de la planta se tomaron muestras de las hojas 10, 15 y 20 (numeradas desde la base) para cada uno de los distintos tratamientos. La mitad de cada hoja fue congelada en nitrógeno líquido inmediatamente después de extraída de la planta y almacenada a -80°C para realizar extracción de ARN para análisis moleculares, mientras que la mitad restante se conservó a -20 °C para su posterior utilización en las determinaciones de clorofila, hidratos de carbono y nitrógeno.

La evolución de las distintas variables fue expresada en función del tiempo térmico desde la emergencia de la plántula (°C Días Desde Emergencia: °CDDE), mediante la integración diaria de la temperatura atmosférica con un umbral de temperatura o temperatura base de 6°C (Kiniry y col., 1992).

Mediciones

Clorofila

El contenido de clorofila de las hojas muestreadas fue medido por extracción directa con N,N-dimetilformamida. Se tomaron dos discos de 0,5 cm de diámetro de la base de cada hoja muestreada, resultando un total de 6 discos por réplica biológica (tres plantas muestreadas en cada bloque). Los discos fueron secados en papel secante e incubados en frascos de vidrio color caramelo con 6 ml de N,N-dimetilformamida durante 24 h a temperatura ambiente. Las mediciones de absorbancia de cada muestra se efectuaron utilizando un espectrofotómetro (Spectronic 20, Baush y Lomb, USA). El contenido de clorofila fue calculado como:

$$\text{Clorofila (mg.l}^{-1}\text{)} = 17.9 * \text{abs (647)} + 8.08 * \text{abs (664)}$$

$$\text{Clorofila (mg.cm}^{-2}\text{)} = \text{Cl (mg.l}^{-1}\text{)} / 1.1775 \text{ cm}^2$$

Donde *abs (647)*= absorbancia a 647 nm, correspondiente al pico de absorción de la clorofila B; *abs (664)*= absorbancia a 664 nm, correspondiente al pico de absorción de la clorofila A, y los valores 17,9 y 8,08 los coeficientes de extinción de las clorofilas B y A respectivamente (Inskeep y Bloom, 1985).

Carbohidratos solubles totales

Se tomaron tres discos de 1,2 cm de diámetro de la base de cada hoja muestreada. Un total de 9 discos por réplica biológica (tres plantas muestreadas en cada bloque) fueron pesados y luego secados a 60°C durante 48 h. Se tomaron 50 mg de tejido seco y se agregó 5 ml de agua destilada, luego se incubó en baño térmico a 100°C durante 10 min y se centrifugó a 2.500 rpm durante 5 min. Este paso se repitió tres veces. Se tomaron 100 µl de sobrenadante y se agregaron 900 µl de agua destilada. La cuantificación de carbohidratos se realizó mediante el método colorimétrico utilizando la reacción de fenol y ácido sulfúrico (Dubois y col., 1956). Por cada muestra de 1 ml (100 µl de sobrenadante más 900 µl de agua destilada) se agregó un volumen de fenol 5% y 5 volúmenes de ácido sulfúrico; se incubó durante 30 min a 25°C y luego se midió la densidad óptica en espectrofotómetro a 490 nm (Spectronic 20, Baush y Lomb, USA). El contenido de carbohidratos fue deducido de una curva estándar con concentraciones seriadas de glucosa (0–15 µg.µl⁻¹).

Porcentaje de nitrógeno foliar

El porcentaje de nitrógeno total fue medido de acuerdo al “método de Dumas” a partir de 60 mg de tejido de hoja seca (proveniente de tres plantas muestreadas en cada bloque) (Dumas, 1826). Brevemente, el método de Dumas consiste en la combustión seca a 950°C utilizando oxígeno como acelerador de la combustión. Los productos de la combustión (H₂O, NO, N₂) son filtrados y secados. NO es reducido a N₂ mediante cobre y luego es barrido por gas helio hacia una célula de conductibilidad térmica donde se mide la concentración (TrunSpec CN, Leco, Michigan, USA).

Biomasa aérea

Se tomaron muestras de plantas completas en floración y madurez fisiológica con el objetivo de evaluar el contenido de materia seca por órganos (hojas, tallo y capítulo) entre las distintas condiciones experimentales. Tres plantas por cada bloque fueron cosechadas, separadas en tallo, hojas y capítulo, luego fueron secadas en cámara a 60°C hasta peso constante y pesadas. En madurez fisiológica, además se separaron las semillas del receptáculo, se pesaron y contaron.

Área foliar por planta y SPAD (Índice de verdor)

Tres plantas representativas marcadas por cada bloque y condición experimental fueron utilizadas para la evaluación del área foliar y SPAD mediante mediciones no destructivas.

La evolución del área foliar fue realizada mediante mediciones periódicas del ancho máximo de cada una de las hojas de dichas plantas marcadas. El área foliar de cada hoja individual fue estimado como:

$$AFi = 1,5128 \times (\text{ancho})^{1,7235}$$

Donde AF_i: Área foliar (cm²); 1,5128 y 1,7235: constantes del modelo establecido para este híbrido de girasol en experimentos previos del grupo de Fisiología Vegetal de la Unidad Integrada Balcarce.

Asimismo, en las mismas hojas se estimó la proporción de hoja verde y no verde.

El área foliar verde de cada una de las hojas fue calculado como:

$$AFVi = AFi \times \%Vi / 100$$

Donde AFV_i: es el área foliar verde de cada una de las hojas; AF_i: Área foliar para cada hoja; %V_i: es el porcentaje de hoja verde.

El área foliar verde por planta (AFV_p) fue luego calculado como la sumatoria del área foliar verde de cada hoja:

$$AFV_p = \sum AFV_i$$

Del mismo modo, se realizaron mediciones periódicas de índice de verdor de cada una de las hojas de la planta, realizado en las mismas plantas marcadas para mediciones no destructivas, utilizando un equipo SPAD. Los valores de índice de verdor por planta fueron expresados como el promedio de las mediciones de cada una de las hojas individuales.

Índice de intercepción de radiación

Mediante una barra integradora se tomaron periódicamente mediciones del porcentaje de radiación fotosintéticamente activa PAR (del inglés: *Photosynthetically Active Radiation*) interceptado por el canopeo. Se realizaron 3 mediciones sobre el canopeo (radiación incidente) y 3 mediciones por debajo de la última hoja verde del mismo (radiación transmitida), en cada bloque y condición. Las mediciones se realizaron durante el momento de máxima radiación diaria (cercano al mediodía) y en condiciones de cielo despejado.

El índice de radiación interceptada por el canopeo fue calculado como:

$$fIPAR = (R_i - R_t) / R_i$$

Donde $fIPAR$ es la fracción de radiación PAR interceptada; R_i es la radiación incidente medida sobre el canopeo y R_t es la radiación transmitida medida debajo de la última hoja verde del canopeo.

Análisis estadístico de datos

Se realizó un análisis de la varianza a fin de evaluar diferencias estadísticamente significativas de cada condición experimental frente a la condición control para cada tiempo de muestreo. La significancia de las diferencias entre las medias de los tratamientos se evaluaron con el método de mínima diferencia significativa de Fisher o LSD (del inglés: *Least Significant Difference*) utilizando un p-valor < 0,05.

RESULTADOS

La emergencia del cultivo ocurrió el 10 de noviembre de 2010. En la condición control, la floración (estadio fenológico R5) fue registrado a los 814 °CDDE (65 días desde emergencia) mientras que la madurez fisiológica fue alcanzada a los 1.490 °CDDE (116 días desde emergencia). Las plantas del tratamiento de déficit hídrico, por su parte, alcanzaron el estadio R5 a los 801 °CDDE (64 días desde emergencia) y madurez fisiológica a los 1.330 °CDDE (104 días desde emergencia).

La Figura 1.1 esquematiza el desarrollo del cultivo, los tiempos de inicio y duración de tratamientos y muestreos de las distintas hojas evaluadas.

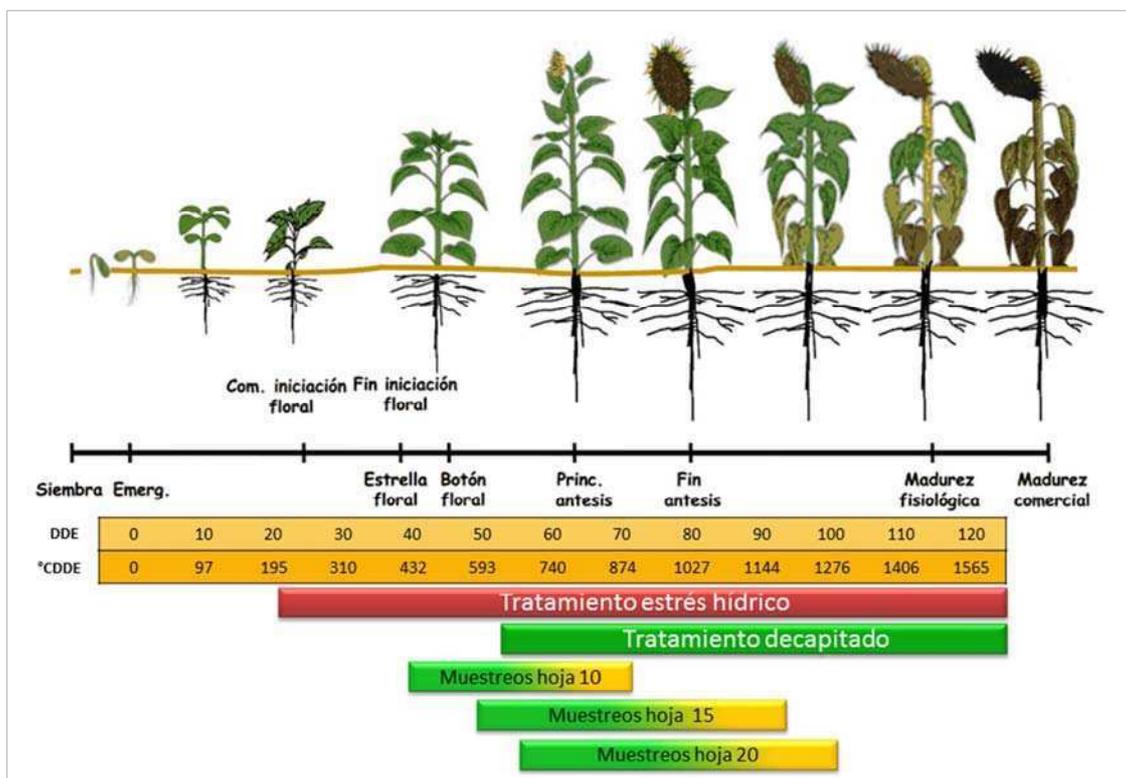


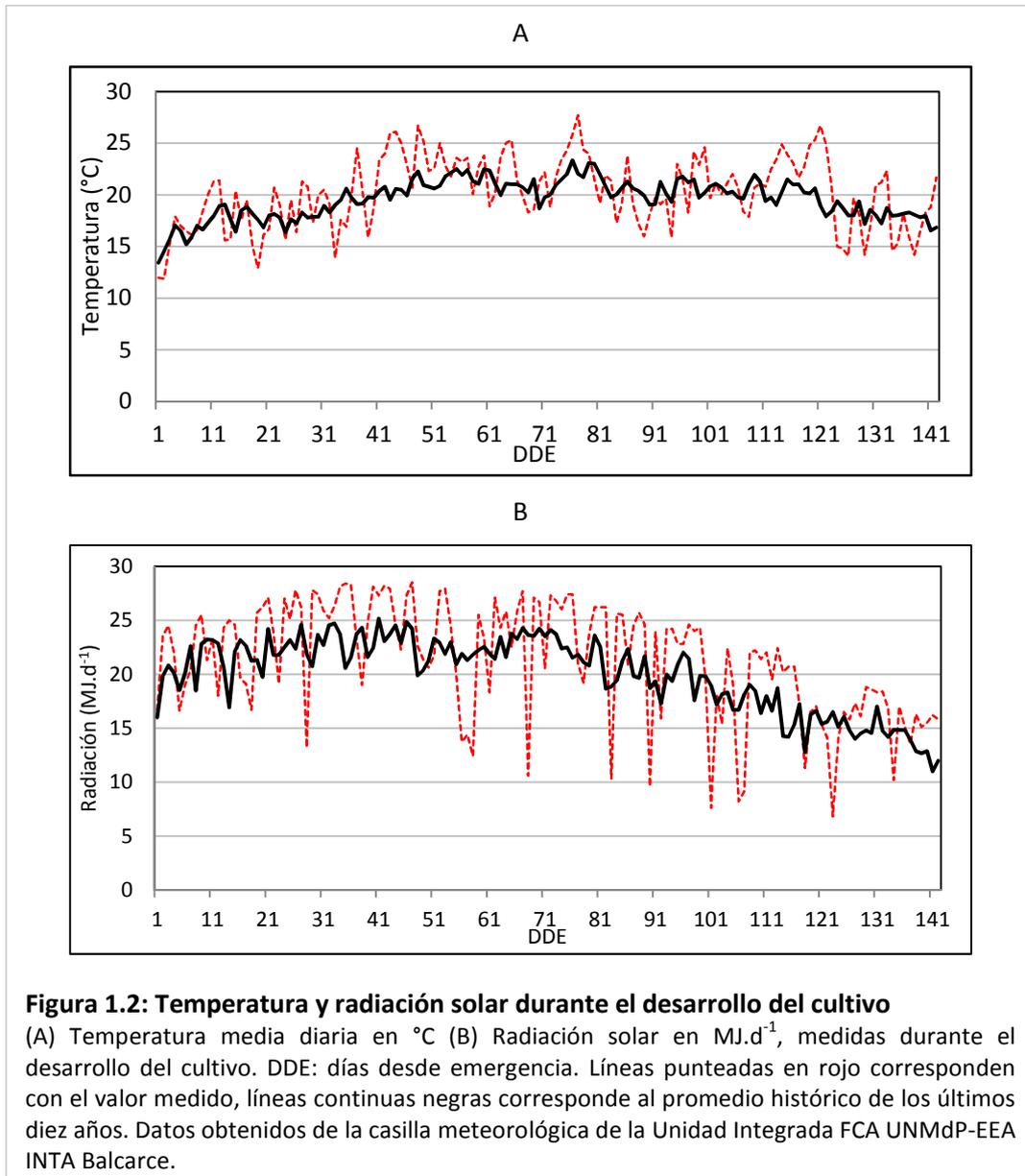
Figura 1.1: Desarrollo del cultivo

DDE: días desde emergencia, °CDDE: grados día desde emergencia (T base=6°C). El tratamiento de déficit hídrico comenzó 20 días desde emergencia manteniéndose la humedad volumétrica del suelo cercana al 20%, mientras que el decapitado fue realizado en el estadio R3. Las barras de muestreos indican la ventana de tiempo en la cual se colectaron muestras de las hojas 10, 15 y 20.

Durante el período en el cual se desarrolló el experimento, las temperaturas medias diarias desde emergencia mostraron valores comprendidos entre 15 y 25 °C durante la mayor parte del desarrollo del cultivo, sin registrarse valores extremos que pudieran ocasionar grandes variaciones en el desarrollo. Estos valores fueron

semejantes al promedio histórico representado por una serie de los últimos 10 años (Figura 1.2 A).

La radiación solar media diaria durante el mismo período de tiempo, presentó un patrón semejante a la radiación histórica para el mismo período (Figura 1.2 B). Dentro del patrón general, se pudo observar una mayor radiación en esta campaña durante la mayor parte del desarrollo.



Caracterización del cultivo a través de variables fisiológicas

Área foliar e índice de verdor (SPAD)

La evolución del área foliar por planta fue diferente entre las condiciones control, déficit hídrico y decapitado. En las plantas de la condición control, el área foliar verde máxima fue de 8.000 cm², mientras que en las plantas en déficit hídrico sólo alcanzaron valores máximos de 5.000 cm². El tratamiento de decapitado mantuvo el área foliar verde durante más tiempo que la condición control, evidenciando además un leve incremento del área verde máxima en relación al control. La tasa de disminución de área foliar verde posterior a antesis fue similar en las condiciones control y déficit hídrico pero con una duración mayor en las plantas control debido a la mayor área foliar desarrollada en antesis. En las plantas decapitadas el área foliar verde se mantuvo e incluso aumentó levemente en el periodo post-antesis hasta aproximadamente los 1.400 °CDDE cuando comenzó a disminuir con una tasa similar a las otras dos condiciones (Figura 1.3 A).

El índice de verdor (SPAD) promedio de la planta en floración fue alrededor de 25 en los tratamientos control y decapitado, mientras que en la condición de déficit hídrico las plantas presentaron valores superiores a 30 (Figura 1.3 B). En este último tratamiento, el índice de verdor comenzó a disminuir antes que el resto, alrededor de los 1.300 °CDDE. En la condición control y el decapitado esta caída comenzó pasados los 1.500 °CDDE, diferenciándose ambos tratamientos en la pendiente de esta variable, que fue mayor en las plantas control (Figura 1.3 B).

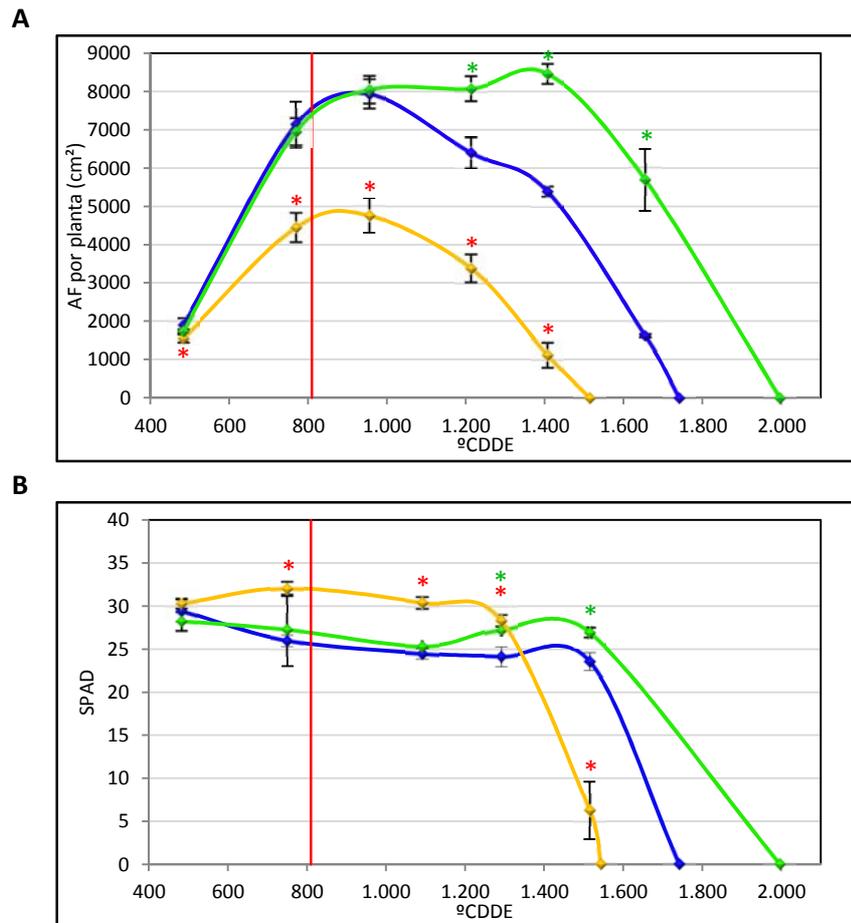


Figura 1.3: Evolución del área foliar e índice de verdor (SPAD)

(A) Área foliar verde por planta, (B) valores de índice de verdor (SPAD) por planta. Las líneas azules, naranja y verde representan la condición experimental control, déficit hídrico y decapitado. La línea vertical roja indica el momento de antesis del cultivo. Asteriscos indican diferencias significativas del tratamiento déficit hídrico (rojos) y decapitado frente a la condición control para cada tiempo de muestreo evaluado (p-valor<0,05).

Intercepción de radiación

El índice de intercepción de radiación en floración fue superior a 0,94 en los 3 tratamientos (Figura 1.4). En el periodo post-antesis el tratamiento de déficit hídrico mostró una rápida caída en la fracción de radiación interceptada, mientras que las plantas control y decapitadas continuaron con altos valores de intercepción hasta los 1.500 °CDDE (80% y 94% del máximo, respectivamente), momento en el cual las plantas sometidas a déficit hídrico disminuyeron la intercepción a aproximadamente la mitad de su valor máximo. A partir de este momento, la intercepción en las plantas de ambos tratamientos comenzó a disminuir rápidamente, con una pendiente mayor en las plantas de la condición control en comparación con las del tratamiento de decapitado.

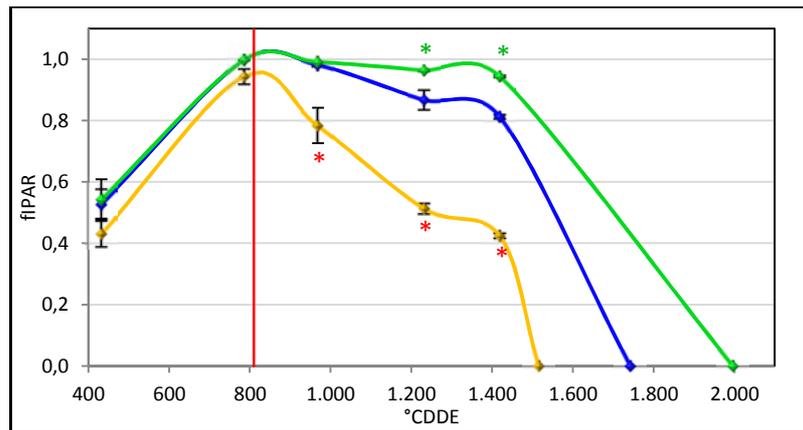


Figura 1.4: Índice de intercepción de radiación

Las líneas azules, naranja y verde representan la condición experimental control, déficit hídrico y decapitado. La línea vertical roja indica la floración. Asteriscos indican diferencias significativas del tratamiento déficit hídrico (rojos) y decapitado frente a la condición control para cada tiempo de muestreo evaluado (p -valor < 0,05).

Materia seca

El peso seco total por planta registrado en la condición control pasó de 192 g en el periodo de floración a 254 g en la etapa de madurez fisiológica (cosecha), mientras que en la condición de déficit hídrico el peso seco por planta fue de 130 g en floración y registró un leve incremento en el periodo de cosecha, alcanzando los 138 g. Las plantas del tratamiento de decapitado, por su parte, presentaron un peso por planta (tallos y hojas, sin capítulo) de 179 g al momento de floración del control y de 261 g al momento de cosecha.

El peso de las hojas en floración fue de 82 g, 61 g y 99 g para las condiciones control, déficit hídrico y decapitado respectivamente. En los tratamientos control y déficit hídrico, las hojas mostraron una disminución de materia seca en madurez fisiológica respecto a floración, mientras que en el tratamiento de decapitado se observó un leve incremento en madurez fisiológica respecto a floración (Figura 1.5).

Al considerar los tallos, al momento de floración se registraron valores de materia seca de 78 g, 45 g y 80 g para las condiciones control, déficit hídrico y decapitado respectivamente. En las plantas control y déficit hídrico no se evidenciaron variaciones entre los dos tiempos evaluados mientras que las plantas decapitadas tuvieron un gran incremento en el peso seco de tallos cercano al 100% del valor inicial.

Por último, el peso seco del capítulo en el momento de floración fue de 32 g para la condición control y 23 g para el tratamiento de déficit hídrico. Las plantas control presentaron un gran incremento en el contenido de materia seca pasando de 32 g a 105 g en madurez fisiológica, mientras que en la condición de déficit hídrico, a pesar de incrementar el peso seco del capítulo entre las dos condiciones, esta variación no fue tan marcada como en el control y tuvo un valor de 58 g en madurez fisiológica. La diferencia en el peso promedio por grano fue estadísticamente significativa y mostró valores de 0,063 g y 0,044 g para las condiciones control y déficit hídrico, respectivamente.

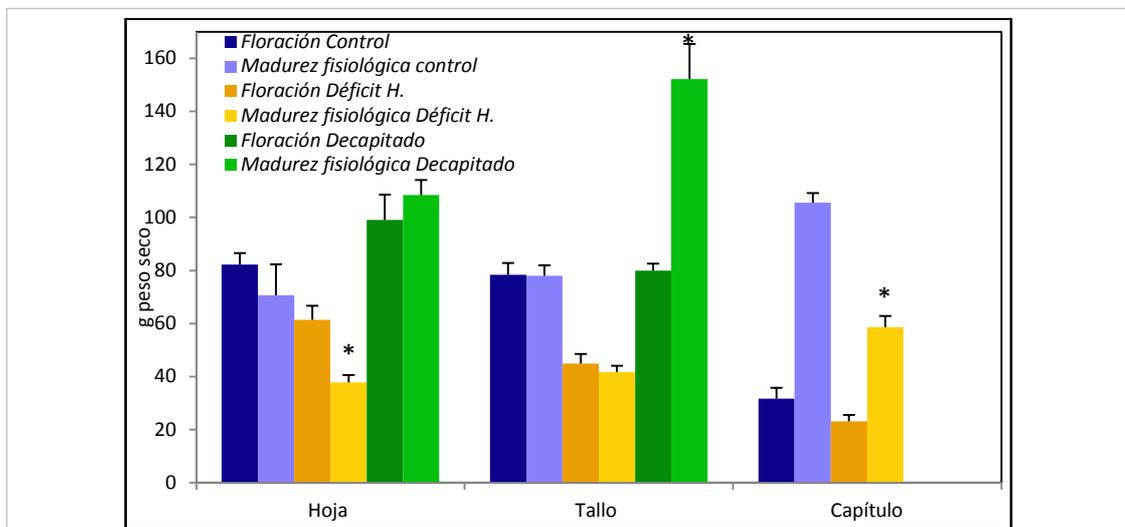


Figura 1.5: Materia seca por órgano: hojas, tallos y capítulos

Las barras en tonos azules, naranjas y verdes indican las plantas control, déficit hídrico y decapitado respectivamente. Los colores oscuros muestran los pesos secos a floración y las tonalidades claras los pesos secos a madurez fisiológica (cosecha). Asteriscos indican diferencias significativas para cada órgano respecto al tiempo de floración (p -valor $<0,05$).

Caracterización de la senescencia foliar

Contenido de clorofila

Uno de los principales indicadores de avance o evolución del proceso de senescencia es el contenido de clorofila.

La hoja 10 (Figura 1.6 A) en la condición control mostró valores máximos de clorofila cercanos a $0,03 \text{ mg.cm}^{-2}$ a los 560°CDDE . A partir de este momento la clorofila comienza a disminuir primero con una suave pendiente hasta cerca de la floración, y luego con una pendiente mayor hasta los 900°CDDE . En el tratamiento decapitado la evolución de esta variable fue similar al control. En la condición de déficit hídrico, por su parte, esta hoja presentó siempre valores de

clorofila superiores al control con un valor máximo de $0,035 \text{ mg.cm}^{-2}$ a los $560 \text{ }^{\circ}\text{CDDE}$ comenzando a disminuir a una tasa menor al control hasta pasados los $900 \text{ }^{\circ}\text{CDDE}$, para luego disminuir abruptamente hasta el amarilleamiento a los $970 \text{ }^{\circ}\text{CDDE}$ desde la emergencia.

En la hoja 15 (Figura 1.6 B), el valor máximo de clorofila para la condición control también fue cercano a $0,03 \text{ mg.cm}^{-2}$ a los $500 \text{ }^{\circ}\text{CDDE}$, aproximadamente. Luego ocurrió una leve caída a $0,025 \text{ mg.cm}^{-2}$ hasta anthesis, y a partir de floración, una nueva caída hasta valores de aproximadamente $0,02 \text{ mg.cm}^{-2}$ que se mantuvieron hasta los $1.100 \text{ }^{\circ}\text{CDDE}$, para luego caer definitivamente hasta cero a los $1.275 \text{ }^{\circ}\text{CDDE}$. La condición de déficit hídrico incrementó la concentración de clorofila en esta hoja hasta un máximo de $0,037 \text{ mg.cm}^{-2}$, valor que se mantuvo relativamente estable hasta los $1.000 \text{ }^{\circ}\text{CDDE}$, para comenzar a caer primero con una pendiente menor hasta antes de los $1.200 \text{ }^{\circ}\text{CDDE}$, y luego con una pendiente abrupta hacia los 1.230°CDDE previo a la condición control. El tratamiento de decapitado mantuvo niveles estables de clorofila entre $0,025$ y $0,03 \text{ mg.cm}^{-2}$ en esta hoja hasta los $1.100 \text{ }^{\circ}\text{CDDE}$, para luego disminuir primero con una tasa menor hasta los $1.300 \text{ }^{\circ}\text{CDDE}$, y luego abruptamente hasta alcanzar el cero a los $1.550 \text{ }^{\circ}\text{CDDE}$.

Por último, en la hoja 20 (Figura 1.6 C), el contenido de clorofila aumentó con valores semejantes en los tres tratamientos hasta alcanzar un valor máximo aproximado de $0,035 \text{ mg.cm}^{-2}$ a los $1.100 \text{ }^{\circ}\text{CDDE}$. A partir de este momento, el tratamiento control comenzó a disminuir la clorofila más suavemente hasta los $1.350 \text{ }^{\circ}\text{CDDE}$, y luego rápidamente hasta llegar a cero a los $1.500 \text{ }^{\circ}\text{CDDE}$, aproximadamente. En el tratamiento de déficit hídrico la disminución de clorofila a partir de los $1.200 \text{ }^{\circ}\text{CDDE}$ fue más rápida que en el control, llegando a cero antes de los $1.400 \text{ }^{\circ}\text{CDDE}$. En el tratamiento decapitado, los valores máximos de clorofila se mantuvieron por más tiempo, hasta los $1.300 \text{ }^{\circ}\text{CDDE}$ aproximadamente, para luego caer con igual pendiente que el control hasta $1.550 \text{ }^{\circ}\text{CDDE}$, y posteriormente más lentamente hasta alcanzar el cero cerca de los $1.800 \text{ }^{\circ}\text{CDDE}$.

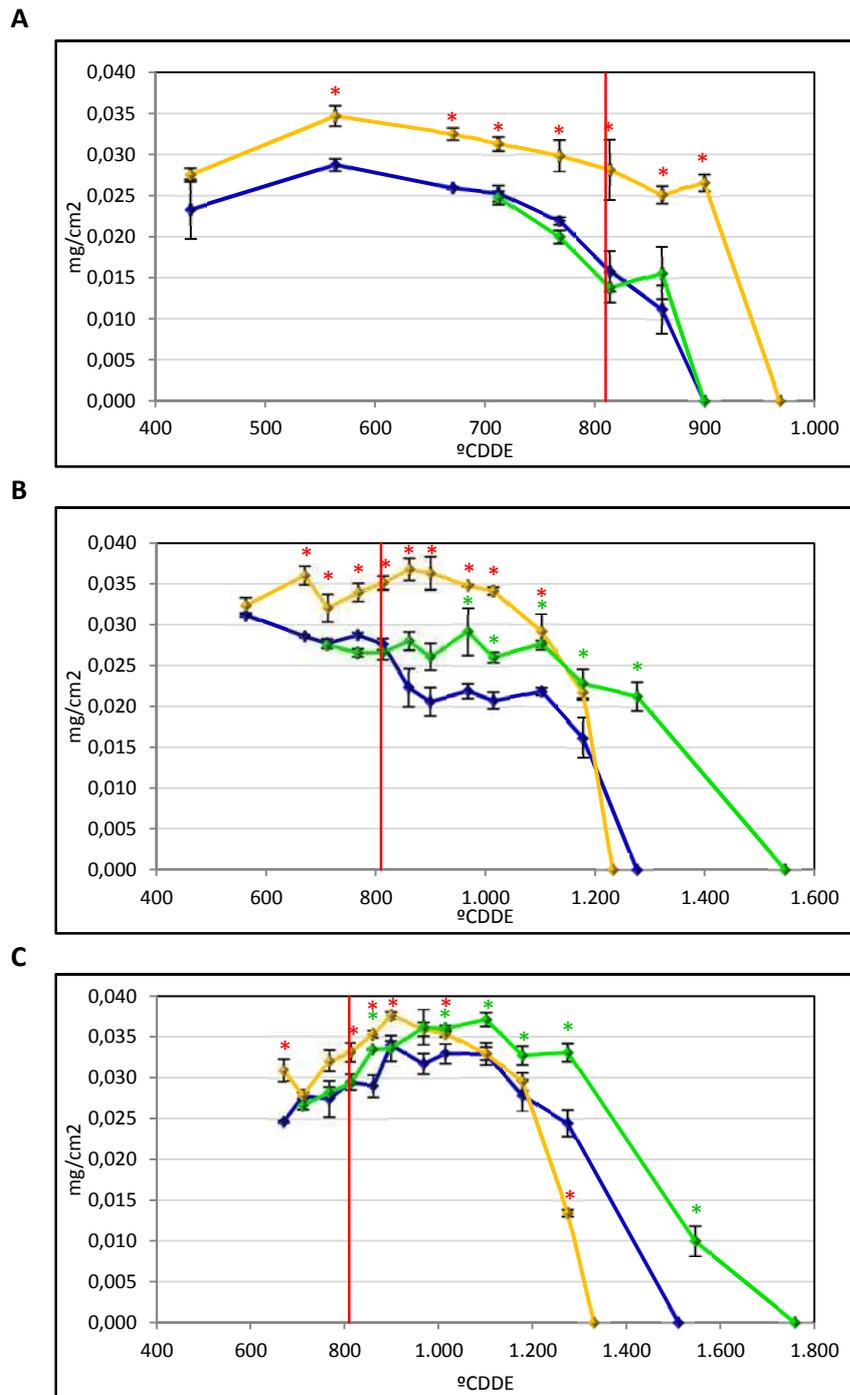


Figura 1.6: Evolución del contenido de clorofila en $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$ de hoja:

(A) Hoja 10, (B) Hoja 15 y (C) Hoja 20. Las líneas azules, naranja y verde representan la condición experimental control, déficit hídrico y decapitado. La línea vertical roja indica el momento de antesis del cultivo. Asteriscos indican diferencias significativas del tratamiento déficit hídrico (rojos) y decapitado frente a la condición control para cada tiempo de muestreo evaluado ($p\text{-valor} < 0,05$).

Carbohidratos solubles totales

Al igual que para el contenido de clorofila, los tratamientos afectaron la evolución en el tiempo de los carbohidratos en las 3 hojas evaluadas.

En el caso de la hoja 10 (Figura 1.7 A), la condición control disminuyó el contenido de hidratos de carbono solubles (HCS) a partir de un valor máximo de $400 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ a los $430 \text{ }^\circ\text{CDDE}$, para estabilizarse en valores cercanos a $100 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ entre los 670 y $870 \text{ }^\circ\text{CDDE}$ aproximadamente, y luego caer definitivamente a los $900 \text{ }^\circ\text{CDDE}$. Ante un déficit hídrico, esta hoja produjo valores máximos de HCS superiores al testigo, que alcanzaron los $630 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ a los $430 \text{ }^\circ\text{CDDE}$. A partir de ese momento comienza a disminuir progresivamente hasta los $200 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ a los $700 \text{ }^\circ\text{CDDE}$, luego aumenta levemente hasta llegar a $300 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ a los $900 \text{ }^\circ\text{CDDE}$, para luego caer hasta cero a los $960 \text{ }^\circ\text{CDDE}$. En el tratamiento decapitado la hoja 10 presentó una evolución de HCS similar al testigo.

La evolución de la concentración de HCS en la hoja 15 (Figura 1.7 B) en la condición control fue similar a la observada en la hoja 10, con una caída inicial a partir de un valor máximo de $300 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ a los $550 \text{ }^\circ\text{CDDE}$, una posterior estabilización entre los 630 y los $1.200 \text{ }^\circ\text{CDDE}$ en valores comprendidos entre 100 y $200 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ llegando a cero a los $1.280 \text{ }^\circ\text{CDDE}$. En el tratamiento de déficit hídrico, se observaron valores entre 200 y $300 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ superiores al testigo hasta los $1.200 \text{ }^\circ\text{CDDE}$ donde se observa una brusca caída final. La hoja 15 en el tratamiento decapitado presentó una evolución similar al control, excepto hacia el final del periodo de evaluación, donde el contenido de HCS se prolongó $270 \text{ }^\circ\text{C}$ días respecto al control.

Por último, la hoja 20 (Figura 1.7 C) mostró una mayor concentración de azúcares comparada a las demás hojas, para los tres tratamientos. En el tratamiento control, los valores de HCS se mantuvieron entre 200 y $300 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ durante la mayor parte del periodo evaluado (entre 600 y $1.100 \text{ }^\circ\text{CDDE}$), produciéndose un aumento hacia los $1.200 \text{ }^\circ\text{CDDE}$ hasta valores cercanos a los $400 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ para luego decaer a los $1.500 \text{ }^\circ\text{CDDE}$. En el déficit hídrico, la hoja 20 alcanzó valores de hasta $800 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ con una caída abrupta a los $1.300 \text{ }^\circ\text{CDDE}$. En el tratamiento de decapitado se observó un gran incremento de HCS a partir de los $1.000 \text{ }^\circ\text{CDDE}$ alcanzando valores máximos de $800 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ hacia el final del desarrollo de la hoja, a los $1.600 \text{ }^\circ\text{CDDE}$, para luego caer abruptamente y llegar a valores cercanos a cero cerca de los $1.800 \text{ }^\circ\text{CDDE}$.

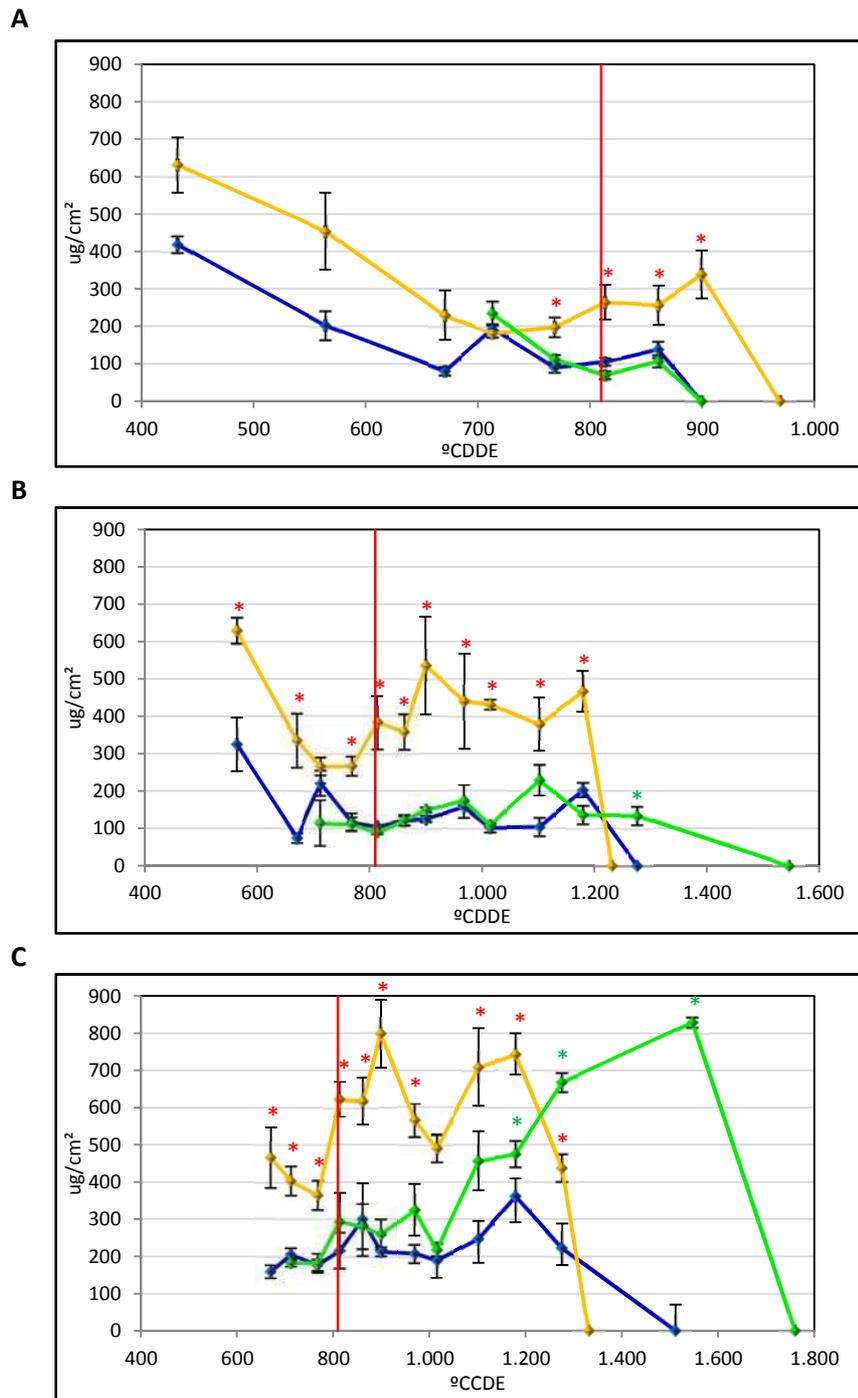


Figura 1.7: Evolución del contenido de carbohidratos solubles totales en $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ de hoja: (A) Hoja 10, (B) Hoja 15 y (C) Hoja 20. Las líneas azules, naranja y verde representan la condición experimental control, déficit hídrico y decapitado. La línea vertical roja indica el momento de anthesis del cultivo. Asteriscos indican diferencias significativas del tratamiento déficit hídrico (rojos) y decapitado frente a la condición control para cada tiempo de muestreo evaluado (p -valor $<0,05$).

Contenido de nitrógeno (%)

El nitrógeno total en la hoja 10 (Figura 1.8 A) presentó una evolución similar en los 3 tratamientos hasta pasado el momento de floración. A partir de un valor máximo algo menor a 5% constante entre 400 °CDDE y 550 °CDDE, comenzó a disminuir hasta los 800 °CDDE donde alcanzó el 3%. En los tratamientos control y decapitado permaneció por un corto lapso en ese valor para luego disminuir con una pendiente similar hasta los 900 °CDDE, mientras que en la condición de déficit hídrico, a partir de ese momento comenzó la caída de esta variable, disminuyendo abruptamente cerca de los 1.000 °CDDE.

El valor máximo en la hoja 15 (Figura 1.8 B) en plantas del tratamiento de déficit hídrico fue algo menor que en control y decapitado. A partir de los 700 °CDDE el nitrógeno comienza a disminuir en los 3 tratamientos; aunque en la condición control y déficit hídrico continúa decreciendo con una pendiente leve hasta los 1.200 °CDDE en donde los valores caen abruptamente hacia los 1.300 °CDDE; en el decapitado se mantiene en valores cercanos a 3,5 % hasta los 1.300 °CDDE, para luego caer con una pendiente menor al control, hacia los 1.600 °CDDE.

Por último, la hoja 20 (Figura 1.8 C), en el tratamiento de déficit hídrico permaneció siempre con valores por debajo del testigo, adelantando su degradación 200°C días antes que en las plantas control. En el tratamiento decapitado esta hoja presenta una evolución similar al control hasta los 1.200 °CDDE aproximadamente, donde retrasa la caída en el contenido de nitrógeno resultando más lenta en comparación con el control, alcanzando valores de cero 250°C días más tarde.

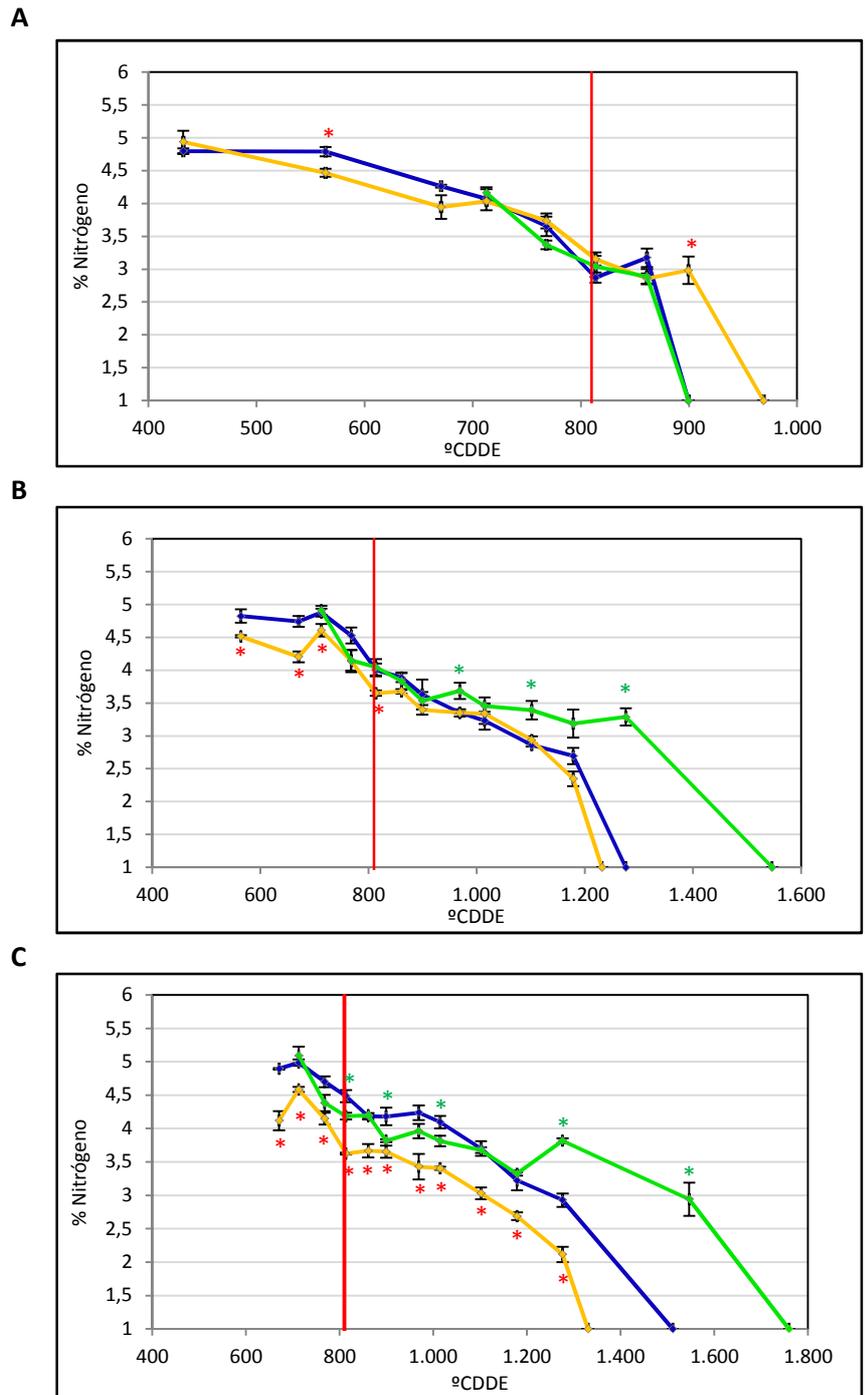


Figura 1.8: Evolución del contenido de Nitrógeno total en %

(A) Hoja 10, (B) Hoja 15 y (C) Hoja 20. Las líneas azules, naranja y verde representan la condición experimental control, déficit hídrico y decapitado. La línea vertical roja indica el momento de anthesis del cultivo. Asteriscos indican diferencias significativas del tratamiento déficit hídrico (rojos) y decapitado frente a la condición control para cada tiempo de muestreo evaluado (p -valor $<0,05$).

DISCUSIÓN

La senescencia foliar es un mecanismo altamente coordinado e influenciado por las condiciones ambientales que presenta un gran impacto en la producción agrícola.

Fisiológicamente se puede evaluar la tasa de avance o progresión del proceso de senescencia a través de múltiples estudios tanto a nivel de planta y su comportamiento en el entorno del cultivo así como también en hojas individuales.

En girasol, es posible separar o dividir la senescencia en dos etapas diferentes dependiendo del estado de desarrollo considerado: *pre- y post- antesis* (Moschen y col., 2014a; Rousseaux y col., 1996). La senescencia *pre-antesis* es aquella que tiene lugar durante los estados vegetativos en los cuales la removilización de nutrientes de las primeras hojas desarrolladas es importante para el desarrollo del botón floral y hojas más jóvenes, mientras que la senescencia *post-antesis* es la que ocurre en el periodo crítico de la planta y los nutrientes removilizados en esta fase son importantes para el llenado del grano.

Al evaluar a nivel de parcela los diferentes tratamientos implementados en este trabajo, podemos observar que la intercepción de radiación PAR fue mayor al 95% en todos los casos, en la fase de antesis (Figura 1.4). Sin embargo, en la condición de déficit hídrico, se observó una rápida caída en relación al control. Esta caída abrupta coincide con una menor área foliar desarrollada en las plantas de este tratamiento (Figura 1.3 A). Ambos efectos, la disminución de área foliar y la intercepción de radiación se vieron reflejados en el peso seco del grano y capítulo al momento de madurez fisiológica (Figura 1.5). Este es un punto importante considerando que la radiación interceptada durante el período de llenado de grano juega un rol relevante en la determinación del rendimiento y la concentración de aceite (Aguirrezábal y col., 2003; Dosio y col., 2000). En el tratamiento decapitado, por su parte, tanto el área foliar como la cobertura del canopeo fueron altas durante un mayor periodo de tiempo (Figura 1.3A). La falta de destinos en este tratamiento derivó en un aumento del área foliar verde de la planta, retrasando la senescencia, efecto que ha sido reportado para esta especie en trabajos previos (Sadras y col., 2000a), así como también en soja (Noodén y Murray, 1982). Por el contrario, en otras especies como por ejemplo maíz, fue reportado que la falta de destinos acelera el proceso de senescencia (Sadras y col., 2000a).

La planta de girasol posee un sistema radicular exploratorio muy desarrollado y una tolerancia relativa al estrés hídrico mayor que otras especies (Connor y Jones, 1985; Connor y col., 1985; Sadras y col., 1991). El déficit hídrico en este trabajo fue provocado en etapas tempranas del cultivo, lo que permitió una adaptación de las plantas a esta situación, resultando en plantas de menor porte y hojas más pequeñas. La tolerancia a sequía es un objetivo importante en la mejora de los cultivos e involucra un retraso en la senescencia de la planta. Sin embargo, la determinación de si este retraso en la senescencia está causando la tolerancia a la sequía o es simplemente una consecuencia de la misma, es difícil de aseverar (Gregersen y col., 2013).

En los resultados de este trabajo, las plantas expuestas a la condición de déficit hídrico además de evidenciar una menor área foliar, mostraron un índice de verdor medido a través de SPAD más intenso que los demás tratamientos (Figura 1.3B). Este efecto puede deberse principalmente a un mayor contenido de clorofila por unidad de superficie (Figura 1.6), pero también podría deberse a un incremento en la producción de antocianinas como producto del estrés (Chalker-Scott, 2002), dando un color de hoja más oscuro.

Al evaluar la materia seca por órganos (Figura 1.5) se observó un comportamiento diferente entre las condiciones evaluadas. La falta de destinos en el tratamiento de decapitado hizo que el tallo actuara como destino alternativo, observándose una gran acumulación de materia seca. Este efecto ha sido previamente reportado en trabajos realizados en maíz (Christensen y col., 1981). Adicionalmente, la falta de destinos provocó una acumulación de hidratos de carbono en las hojas más jóvenes (Figura 1.7 C). El llenado de grano en la condición control fue mayor al de las plantas expuestas a déficit hídrico, sin embargo la caída de materia seca entre hojas en floración y cosecha dentro de las plantas control fue menor que lo observado en déficit hídrico, pudiendo deberse principalmente a la mayor área foliar observada en la condición control y a un retraso de la senescencia en las hojas superiores, lo cual mantiene a las mismas fotosintéticamente activas durante la etapa del llenado de grano, aportando nutrientes en la mayor parte de este periodo, mientras que en la condición de déficit hídrico la mayoría de los nutrientes son reciclados en una etapa temprana del llenado de granos. En el caso de las plantas en déficit hídrico, además del aporte de nutrientes al grano por parte de las hojas, se pudo observar, aunque no significativamente, una disminución leve de materia seca en el tallo, lo

cual podría evidenciar una translocación de nutrientes por parte del tallo. A diferencia de este tratamiento, las plantas control no mostraron variaciones en el contenido de materia seca en los tallos entre los dos tiempos evaluados (Figura 1.5).

Durante el proceso de senescencia foliar, las células vegetales presentan cambios drásticos en el metabolismo y una degradación secuencial de estructuras celulares comenzando por los cloroplastos (Wiedemuth y col., 2005). Estas organelas juegan un doble rol en el proceso de senescencia: son fuente principal de nitrógeno y actúan como reguladores de su propia degradación durante el proceso (Zapata y col., 2005), por lo cual el contenido de nitrógeno, uno de los principales nutrientes reciclados (Himmelblau y Amasino, 2001) y el contenido de clorofila, aparecen como mejores candidatos a la hora de evaluar el progreso de senescencia (Buchanan-Wollaston y col., 2003; Lim y col., 2007).

La acumulación de azúcares, por su parte, es un punto interesante a evaluar debido a que es un mecanismo importante de tolerancia a sequía, evitando la pérdida de agua y protegiendo las membranas, enzimas y otras estructuras celulares (Sperdouli y Moustakas, 2012).

Si consideramos la senescencia en hojas individuales, podemos describir diferentes comportamientos dependiendo de la posición en el tallo y el tipo de tratamiento o condición experimental evaluada.

Diferentes niveles y calidad de radiación PAR recibidas por las hojas afectan la duración del área foliar verde durante las fases de pre- y post-antesis (Rousseaux y col., 1996). En este caso, la senescencia puede ser acelerada en las hojas de estratos inferiores debido a un sombreado proporcionado por las hojas superiores que disminuyen la incidencia de radiación PAR y la relación rojo/rojo lejano. Este efecto pudo observarse en las variables fisiológicas medidas en hojas individuales, las cuales presentaron una mayor duración del desarrollo foliar a medida que nos acercamos a estratos superiores de la planta.

La hoja 10 se desarrolla en un estrato inferior de la planta y esta característica es acompañada por un incremento en el sombreado por parte de las hojas superiores disminuyendo la relación rojo/rojo lejano, llevando a una vida media más corta en relación a las hojas superiores. En el caso del tratamiento de déficit hídrico, una menor área foliar en la planta permitió una mayor incidencia de radiación en las hojas inferiores, pudiendo ser este uno de los motivos por el cual en esta hoja, los

parámetros evaluados para senescencia mostraron un retraso en relación a la condición control, observándose un tiempo de vida media más largo, de aproximadamente 70 °C días. Adicionalmente se observó una mayor concentración de clorofila (Figura 1.6 A) e hidratos de carbono (Figura 1.7 A) durante todo el periodo de vida de la hoja en relación a las plantas control. Este efecto podría deberse a que a pesar de presentar un menor crecimiento celular y menor área foliar, la tasa fotosintética podría no haberse afectado llevando a una mayor concentración de clorofila y azúcares por unidad de superficie.

El tratamiento de decapitado para la hoja 10 no mostró diferencias frente al control, debido principalmente al corto periodo de tratamiento al que estuvo expuesta esta hoja.

La hoja 15, por su parte, representa una hoja desarrollada en un estrato intermedio en la planta. Al comparar las condiciones de déficit hídrico frente al control para esta hoja, los datos de clorofila (Figura 1.6 B) e hidratos de carbono (Figura 1.7 B) mostraron una mayor concentración de los mismos durante toda la fase del desarrollo de la hoja, al igual que lo observado para la hoja 10, pudiendo deberse también aquí a la menor área foliar presentada por esta hoja en esta condición, pero con una caída más abrupta hacia el final del desarrollo, logrando un tiempo de desarrollo foliar similar a la condición control. De manera opuesta, el tratamiento de decapitado en esta hoja tuvo un importante efecto ya que el momento de inicio del tratamiento fue en una etapa temprana para el desarrollo de esta hoja. De esta manera, se logró observar un mayor tiempo de desarrollo con un mayor contenido de clorofila, hidratos de carbono y nitrógeno, retrasando la senescencia.

La hoja 20, una hoja representativa del estrato superior de la planta, no presentó limitaciones lumínicas en ninguna de las condiciones evaluadas, por lo cual el efecto en las variables fisiológicas se debería principalmente a la condición experimental a la cual está sometida. En esta hoja fue posible lograr una aceleración de la senescencia en la condición de déficit hídrico frente al control y un retraso del proceso, en el tratamiento de decapitado. Este efecto pudo observarse en todas las variables fisiológicas evaluadas para hojas individuales.

De este modo la tasa de senescencia de una hoja en particular en girasol varía de acuerdo no sólo al tratamiento al que la planta está expuesta, sino también a la posición en el tallo de la misma, debido principalmente a la competencia y a la

disminución en la calidad y cantidad de radiación recibida por las hojas en los diferentes estratos (Rousseaux y col., 1996).

Estos resultados permitieron comparar el progreso de la senescencia foliar en las diferentes hojas y frente a los distintos tratamientos utilizados, permitiendo seleccionar de manera más eficiente y bajo criterios fisiológicos, un conjunto de muestras para ser analizadas en estudios moleculares, para lo cual se seleccionó la hoja número 10. Esta hoja, a pesar de no mostrar una senescencia acelerada en la condición de déficit hídrico respecto al control, presentó un patrón de degradación de clorofilas anterior a antesis, posiblemente aportando nutrientes para las etapas tempranas del desarrollo del capítulo. Este es un punto importante a considerar teniendo en cuenta el objetivo principal de este trabajo de encontrar indicadores moleculares de senescencia en estadios tempranos del desarrollo de la planta. Por otro lado, esta hoja tiene la ventaja de desarrollarse en etapas tempranas, con lo cual experimenta una menor influencia a cambios inducidos por distintos estreses bióticos y abióticos que pudiesen interferir en los análisis moleculares, en experimentos a campo.

Asimismo, estos resultados permitieron la puesta a punto de nuevas condiciones experimentales practicadas tanto a campo como en invernáculo, de los tiempos de muestreo a lo largo del desarrollo del cultivo y de las distintas variables fisiológicas para la evaluación del proceso de senescencia, haciendo más eficiente el control de fuentes de variación de los nuevos diseños experimentales.

CAPÍTULO 2

**ESTUDIO METABOLÓMICO
RELACIONADO A LA SENESCENCIA
FOLIAR EN GIRASOL**

INTRODUCCION

Las plantas producen un gran número de metabolitos esenciales para la vida durante todo el desarrollo, a través de procesos metabólicos como la respiración y la fotosíntesis, en los que participan los llamados metabolitos primarios, entre los que se incluyen proteínas, lípidos y carbohidratos. Por otro lado, existen también metabolitos que no son esenciales pero son necesarios para la supervivencia ante una determinada condición ambiental, conocidos como metabolitos secundarios, y representan compuestos que no están directamente involucrados en el normal crecimiento, desarrollo o reproducción, pero que juegan un papel muy importante en la señalización y defensa de las plantas (Fraenkel, 1959; Grotewold, 2005; Wink, 2003; Wolfender y col., 2013).

La metabolómica es una disciplina emergente en su aplicación que rápidamente se ha establecido en el campo de las aproximaciones post-genómicas (Shulaev, 2006; Shulaev y col., 2008). Esta disciplina permite a los investigadores discriminar y clasificar muestras en grupos, monitorear cambios en la composición del metaboloma en relación a un estado fisiológico dado, a la influencia de un estrés o un estímulo determinado, a una modificación genética, o a la interacción con otros organismos (Wolfender y col., 2013).

Durante décadas se han efectuado distintas mediciones de metabolitos debido a su importancia como componentes de vías bioquímicas, tanto en la dieta humana como en el uso aplicado a marcadores de diagnóstico para un amplio rango de condiciones biológicas (Ferne y col., 2004).

Las primeras aplicaciones de la metabolómica en el mundo vegetal fueron realizadas como herramienta de diagnóstico (Schauer y Fernie, 2006) como por ejemplo, la respuesta metabólica a herbicidas (Ott y col., 2003; Sauter y col., 1991), comparaciones entre organismos genéticamente modificados y cultivos convencionales (Catchpole y col., 2005; Defernez y col., 2004), y para la clasificación de genotipos de plantas (Fiehn y col., 2000; Roessner y col., 2001a; Roessner y col., 2000; Roessner y col., 2001b; Tikunov y col., 2005).

Actualmente la metabolómica se utiliza fundamentalmente como una herramienta descriptiva en la respuesta de las plantas frente a distintos tipos de estreses tanto bióticos como abióticos, así como también para descifrar funciones génicas y como

parte de análisis integrativos de distintas *ómicas* en biología de sistemas (Balmer y col., 2013; Schauer y Fernie, 2006; Wolfender y col., 2013).

Existe una amplia diversidad de metabolitos celulares. Mientras que en *Escherichia coli* se estima un total de 750 metabolitos aproximadamente (Nobeli y col., 2003), en el reino vegetal el total de metabolitos está estimado en 200.000 (Dixon y Strack, 2003). Con excepción de los metabolitos primarios que están directamente involucrados en el crecimiento, desarrollo y reproducción, la mayoría de ellos son aún desconocidos (Wolfender y col., 2013). La amplia variabilidad de pesos moleculares, polaridad, solubilidad y rango de concentraciones en las células vegetales de los mismos, constituye un problema adicional a las distintas técnicas de detección.

Entre las tecnologías más ampliamente utilizadas para la detección de metabolitos se encuentran la cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS), la cromatografía gaseosa – tiempo de vuelo - espectrometría de masa (GC-TOF-MS), las cuales permiten la identificación y cuantificación robusta de unos pocos cientos de metabolitos en una misma muestra (Fiehn y col., 2000; Halket y col., 1999; Roessner y col., 2001a), y la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (LC-MS) (Fernie y col., 2004). Paralelamente, existen otras tecnologías para este tipo de estudio las cuales pueden combinarse para obtener un perfil metabólico más completo, por ejemplo: Cromatografía Iónica, Espectroscopia Infrarroja, Espectroscopia Infrarroja con Transformación de Fourier, Resonancia Magnética Nuclear, Electroforesis Capilar, Cromatografía en capa delgada, Cromatografía Gaseosa y Cromatografía Líquida de Alta Resolución, la elección de cada técnica o combinación de las mismas es un compromiso entre rapidez, sensibilidad y selectividad.

Si bien para algunos estudios metabólicos es suficiente contar con la detección como presencia o ausencia de un determinado metabolito, a menudo se requieren análisis cuantitativos. Los perfiles metabólicos son frecuentemente expresados como cuantificaciones relativas frente a una muestra control, no obstante, en determinados casos es necesario además obtener una cuantificación absoluta.

Independientemente de si es necesario realizar una cuantificación relativa o absoluta, existen consideraciones químicas, biológicas y técnicas adecuadas que son necesarias para lograr un resultado apropiado (Fernie y col., 2004).

Los estudios actuales sobre el proceso de senescencia derivan principalmente de análisis a nivel transcriptómico y muy poco se conoce acerca de la regulación de este proceso a nivel metabolómico. Sin embargo, y muy recientemente, Watanabe y col. (2013) han desarrollado, a través de diferentes técnicas, un análisis de los perfiles metabólicos detectando cerca de 260 metabolitos, incluyendo pigmentos, lípidos, azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, nutrientes iónicos y metabolitos secundarios, en un estudio espacio-temporal durante el progreso de la senescencia en *A. thaliana*.

En el caso del girasol, actualmente existen pocos estudios de perfiles metabólicos en investigaciones relacionadas a estreses bióticos, particularmente en respuesta al hongo necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum* (Jobic y col., 2007; Peluffo y col., 2010). Los estudios metabolómicos asociados a estreses abióticos son aún más limitados para esta especie. En particular en el tema de senescencia se han estudiado los cambios en la composición bioquímica de algunos metabolitos durante la senescencia natural de la hoja, con el objetivo de encontrar biomarcadores asociados al desarrollo foliar, entre ellos, carbohidratos, amonio, pigmentos fotosintéticos, proteínas solubles y algunos aminoácidos importantes relacionados al reciclaje de nutrientes como la glutamina, glutamato, asparagina y aspartato (Agüera y col., 2012; Cabello y col., 2006). Sin embargo, no se han realizado hasta el momento análisis de perfiles metabólicos en relación a senescencia foliar en girasol. Por lo antedicho, los estudios de perfiles metabólicos durante la senescencia foliar ayudarán a comprender este proceso a un nivel bioquímico y contribuirán a interpretar los datos obtenidos mediante otras aproximaciones como los estudios transcriptómicos.

Este capítulo tiene como objetivo estudiar los cambios en perfiles metabólicos ocurridos durante la evolución del proceso de senescencia mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa GC-TOF-MS y cromatografía iónica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y condiciones experimentales

Para el análisis de los perfiles metabólicos, se utilizaron muestras provenientes del mismo ensayo realizado a campo descrito en el Capítulo 1, así como también un ensayo conducido en invernáculo. Este último fue realizado en macetas de 20 kg conteniendo una mezcla de tierra, arena y turba en proporción 5:3:1 como sustrato. Se utilizó el mismo híbrido de girasol VDH-487 (Advanta Semillas) sembrado a una densidad de 7,2 plantas/m². Enfermedades, malezas e insectos fueron controlados periódicamente. Se analizaron dos condiciones experimentales, por un lado una condición control en la cual las plantas crecieron sin ningún tipo de limitación con una humedad volumétrica cercana al 40% y por otro lado una condición de déficit hídrico en la cual se redujo la humedad volumétrica a aproximadamente el 20% a partir de los 20 días post-emergencia. Los valores de humedad fueron controlados en tiempo real mediante un sistema de riego automático controlado por sensores de humedad (Vegetronix VG400 <http://sp.vegetronix.com/Products/VG400/>). Cada sensor fue regulado para controlar un conjunto de 6 macetas y el ensayo fue regado con agua enriquecida con solución Hoagland semanalmente. Se utilizaron macetas control como bordes del ensayo, de manera que todas las plantas evaluadas tuvieran la misma competencia con plantas vecinas y evitar así variaciones en la senescencia foliar debido a diferencias en la calidad lumínica recibida por las hojas. El diseño del ensayo fue llevado a cabo en cinco bloques completamente aleatorizados. Se tomaron muestras en distintos momentos de la hoja 10, en las dos condiciones experimentales, con cinco réplicas biológicas. Cada una de esas réplicas estaba conformada por una planta aleatoria dentro de cada bloque. Cada hoja fue congelada inmediatamente sumergiéndola en N líquido y almacenada en freezer de -80°C para una óptima conservación hasta su procesamiento para la extracción de ARN total.

El desarrollo de la planta fue expresado en función del tiempo térmico desde la emergencia de la plántula (°C Días Desde Emergencia: °CDDE) (Kiniry y col., 1992).

Análisis concertado de metabolitos

Se realizó una extracción de metabolitos de los tejidos estudiados favoreciendo la extracción de compuestos lipofílicos y polares de acuerdo a protocolos publicados recientemente (Roessner-Tunali y col., 2003) adaptados para girasol (Peluffo y col., 2010). Alícuotas de derivados de estos compuestos se inyectaron en un sistema GC-TOF-MS y se procedió a la identificación y cuantificación por espectrometría de masa y tiempo de retención mediante análisis comparativo con compuestos de referencia y colecciones de metabolitos disponibles. El análisis integrativo de trazas de iones se realizó utilizando un equipo Leco Pegasus III disponible en el Instituto Max Planck, Golm, Alemania. La identificación de metabolitos diferencialmente acumulados a distintos tiempos de desarrollo foliar y/o frente a distintos tratamientos, se realizó calculando la tasa de cambio o *fold-change* utilizando como estadístico de contraste la prueba-t.

Extracción de metabolitos

El tejido foliar fue procesado mediante homogenización por molido en frío con nitrógeno líquido. 100 mg de tejido molido fueron transferidos a un tubo Eppendorf de 2 ml. A cada muestra se adicionó 1.400 µl de metanol 100% y 60 µl de un stock de ribitol (0,2 mg/ml de agua) como control interno de masa. Se agitó durante 15 min en vortex a 70°C, se centrifugó 10 min a 14.000 rpm a 4°C y finalmente se transfirió la fase acuosa a un vial de vidrio. Se adicionaron 750 µl de cloroformo y 1.500 µl de agua bidestilada autoclavada, se agitó en vórtex 15 s y se centrifugó 15 min a 4.000 rpm a 4°C. Un volumen de 150 µl de la fase polar fue transferido a un nuevo tubo Eppendorf. Las muestras fueron concentradas y secadas mediante secadora en vacío en frío y se les agregó gas argón. Finalmente fueron almacenadas a -80 °C para ser luego utilizadas tanto en GC-TOF-MS como en cromatografía iónica.

Derivatización y análisis por GC-TOF-MS

Para la derivatización se agregó a cada tubo de muestra 40 µl de *Methoxyaminhydrochlorid* (20 mg/ml en solución de Piridina), luego se agitó durante 2 h a 37°C, se realizó un centrifugado rápido de 5 s y se agregó 70 µl de MSTFA conteniendo una mezcla de FAMES (del inglés: *Fatty Acid Methyl Ester*) como controles de tiempo de corrida (20 µl FAME/1ml MSTFA), se agitó durante 30 min a 37°C y se transfirió la muestra a viales de vidrio. Un volumen de 1 µl de

muestra fue inyectado al equipo de GC-TOF-MS (LECO Corporation). La cromatografía fue realizada en una columna de 30 m SPB-50 de 0,25mm de diámetro interior y 0,25 μm de espesor de película (Supelco, Belfonte, CA, USA). La temperatura de inyección fue de 230°C, con una interfaz de 250°C y la fuente de iones ajustada a 200°C, se utilizó helio como fase gaseosa en una relación de flujo constante de 1 $\text{ml}\cdot\text{m}^{-1}$.

Los cromatogramas y espectrogramas obtenidos se evaluaron usando el programa ChromaTOF (LECO Corporation) y TagFinder (Luedemann y col., 2008). Los niveles de los metabolitos detectados fueron normalizados frente a su masa inicial de muestra y al control interno ribitol. Los espectros iónicos de los metabolitos primarios y ciertos metabolitos secundarios detectables por GC-TOF-MS fueron comparados con la base de datos de metabolitos *Golm Metabolome Database* para su identificación química (<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/>). Los cambios de metabolitos a lo largo del desarrollo de la hoja en cada condición fueron calculados como tasa de cambio o *fold-change*, tomando el tiempo-0 como control (Figura 2.1).

Cromatografía iónica

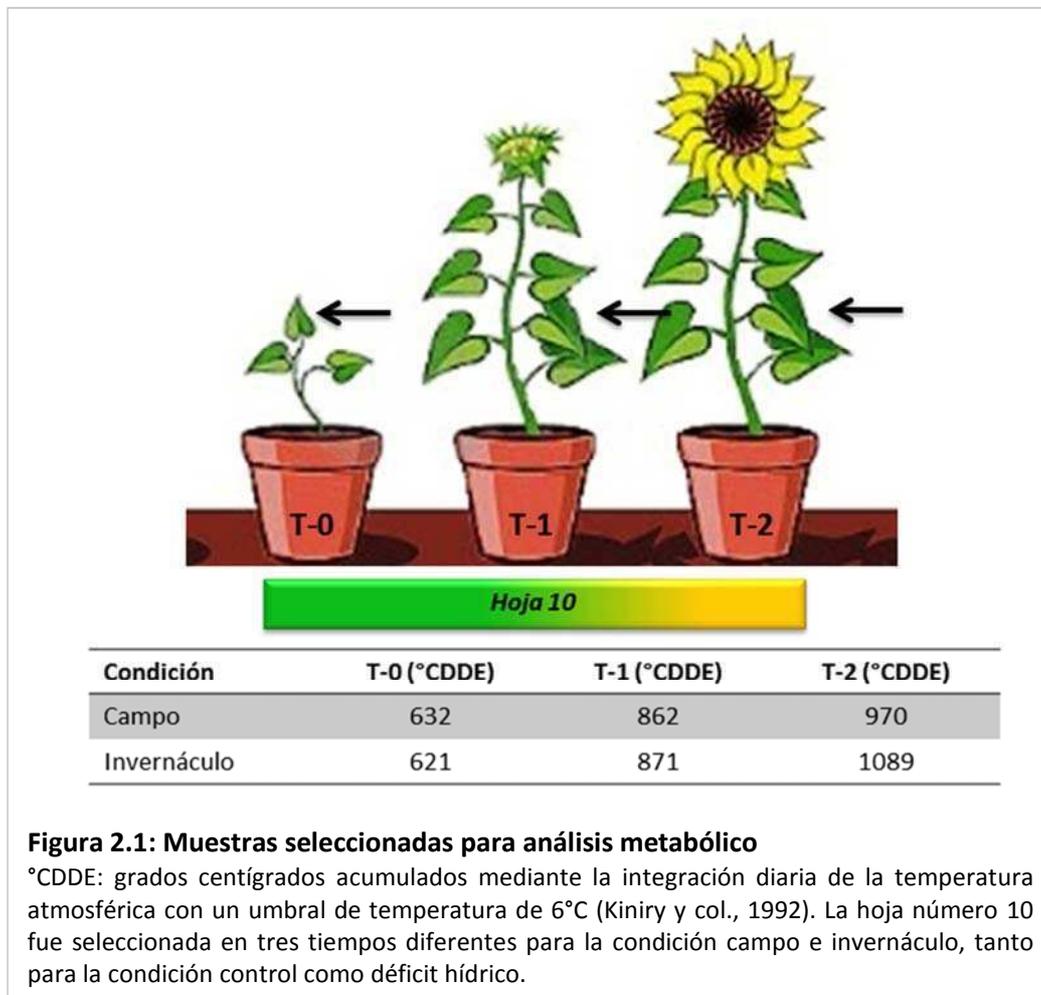
Se realizó un análisis de nutrientes iónicos mediante cromatografía iónica. A cada muestra de metabolitos extraída se le adicionó 500 μl de agua ULC para cromatografía a 4°C (ULC: del inglés *Ultra Liquid Chromatography*). Se agitó en vortex durante 10 s y se centrifugó 30 min a 14.000 rpm a 4°C. Un volumen de 480 μl de sobrenadante fue transferido a de viales de vidrio para cromatografía iónica.

Se realizaron soluciones estándares de los distintos compuestos a detectar. En un tubo Ependorff se mezclaron 200 μl de cada uno de los siguientes compuestos: MgCl_2 , KNO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , NH_4SO_4 y CaCl_2 , cada uno de ellos en concentración 1 mM y se agregó 800 μl de agua ULC para llegar a un volumen final de 2 ml, con una concentración final de 100 μM . A partir de esta solución madre se realizaron diluciones seriadas de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,125 μM , cada una de las cuales fue transferida dentro de viales para su detección utilizando un equipo de cromatografía iónica Dionex Ion Chromatograph (IC3000).

RESULTADOS

Diseño experimental

Para llevar adelante los análisis de perfiles metabólicos se seleccionó la hoja 10 en tres tiempos de muestreo tanto para el experimento de campo como de invernáculo y para las condiciones control y déficit hídrico (Figura 2.1). Los tres tiempos seleccionados fueron: Tiempo cero (T-0) correspondiente a una hoja joven con un contenido de clorofila cercano al máximo, tiempo uno (T-1) o tiempo pre-antesis sin síntomas visibles de senescencia y tiempo dos (T-2) o tiempo post-antesis con síntomas de senescencia visibles. Para cada tiempo de muestreo seleccionado se tuvo en cuenta que el tiempo térmico desde emergencia de cada muestreo fuera similar tanto en la condición de campo como de invernáculo.



El experimento de invernáculo estaba compuesto por cinco réplicas biológicas, cada una de ellas correspondiente a una planta dentro de cada condición, mientras que el

experimento de campo estaba compuesto por tres réplicas biológicas cada una de ellas formada por una mezcla de tres plantas dentro de cada bloque. En ambos experimentos el diseño fue realizado en bloques completamente aleatorizados.

Perfiles metabólicos

Mediante la técnica de GC-TOF-MS fue posible la detección de 58 metabolitos primarios, entre ellos diferentes tipos de aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares y azúcares alcohol en cada uno de los dos ensayos evaluados, campo e invernáculo.

Los gráficos correspondientes a las tasas de cambio o *fold-change* de los metabolitos detectados en el experimento de campo e invernáculo se muestran en las Figuras 2.2 y 2.3 respectivamente.

Al comparar los dos ensayos podemos observar que, en general, los patrones de los perfiles metabólicos son similares en ambos casos. En la condición de invernáculo se pudo observar una menor tasa de cambio a medida que evoluciona la hoja comparado al ensayo de campo. Estos resultados podrían deberse principalmente a las distintas condiciones de crecimiento y a una mayor intensidad lumínica e intercepción de radiación en la condición de campo, lo cual remarca las diferencias en la expresión de los metabolitos.

A través de este análisis se pudo determinar una disminución en la concentración de los distintos azúcares durante el desarrollo de la hoja, así como también aquellos metabolitos pertenecientes al ciclo de los ácidos tricarboxílicos, tanto para la condición control como de déficit hídrico. Paralelamente, se observó un incremento en los niveles de los distintos aminoácidos, especialmente aminoácidos aromáticos como triptófano, tirosina y fenilalanina, y de cadena ramificada como el caso de isoleucina y valina. Estos cambios fueron particularmente más notorios en el experimento de campo, donde se detectaron mayores concentraciones a medida que progresaba el desarrollo de la hoja; observándose además, altos niveles de los aminoácidos asparagina y glutamina, involucrados en los procesos de reciclaje y transporte de nutrientes entre los diferentes tejidos de la planta.

El análisis de componentes principales de los dos experimentos mostró un mejor agrupamiento entre las réplicas biológicas en el ensayo de campo comparado al realizado en invernáculo (Figura 2.4). Este resultado podría deberse a que, en el ensayo de campo, cada réplica biológica estaba compuesta por una mezcla de tres plantas dentro de cada bloque, mientras que en el ensayo de invernáculo cada

réplica biológica correspondía a sólo una planta de cada bloque. Por otro lado, también se observó un mayor efecto del tratamiento de déficit hídrico a campo en relación al ensayo de invernáculo.

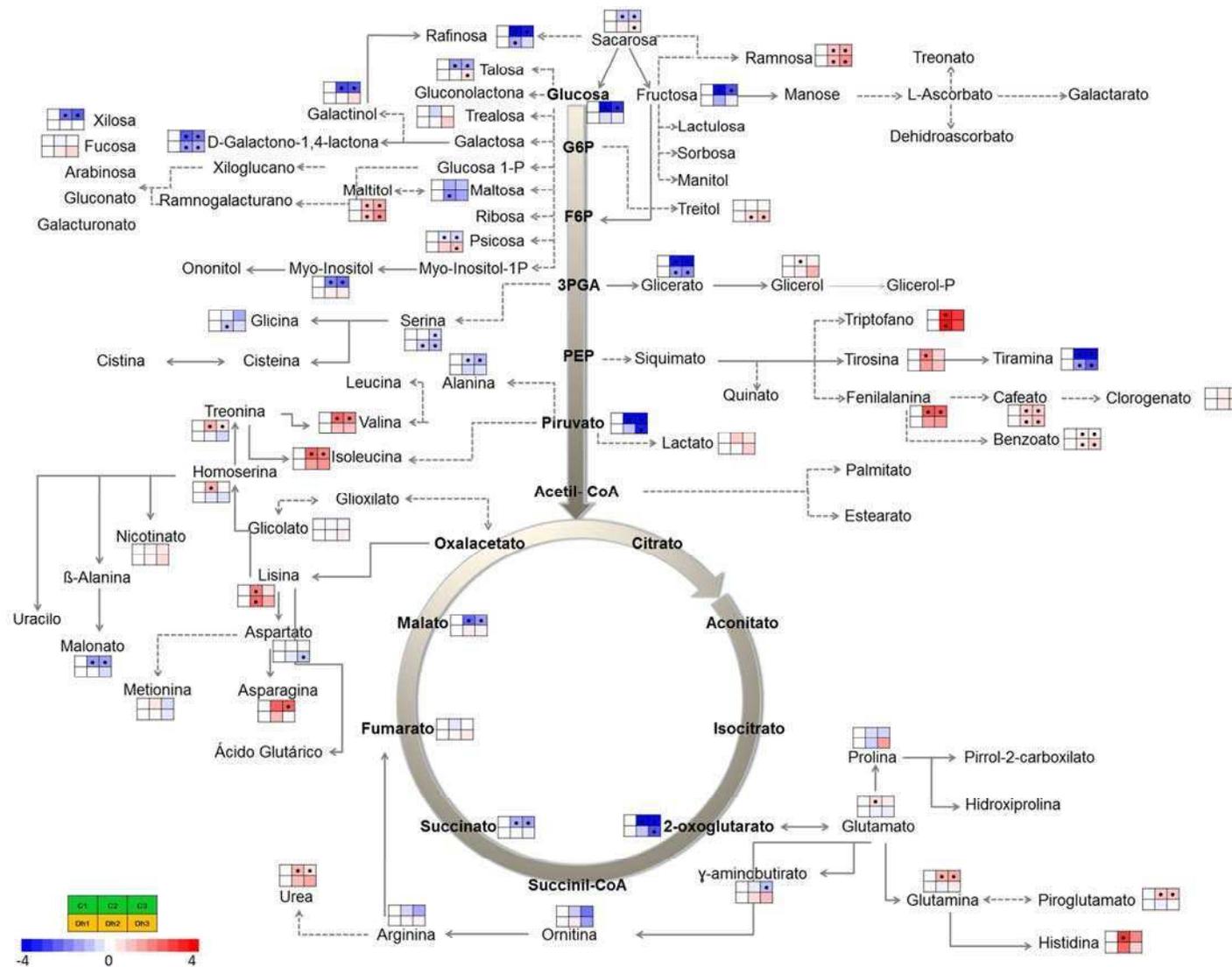


Figura 2.2: Perfil de metabolitos detectados a través de GC-TOF-MS

Ensayo realizado a campo. Cada gráfico representa la tasa de cambio o *fold-change* considerando el tiempo 0 como control; las columnas representan los tiempos evaluados para cada metabolito. La primera fila corresponde a la condición control mientras que la segunda fila corresponde a la condición de déficit hídrico. Los puntos dentro de cada gráfico indican diferencias estadísticamente significativas (p -valor $<0,05$).

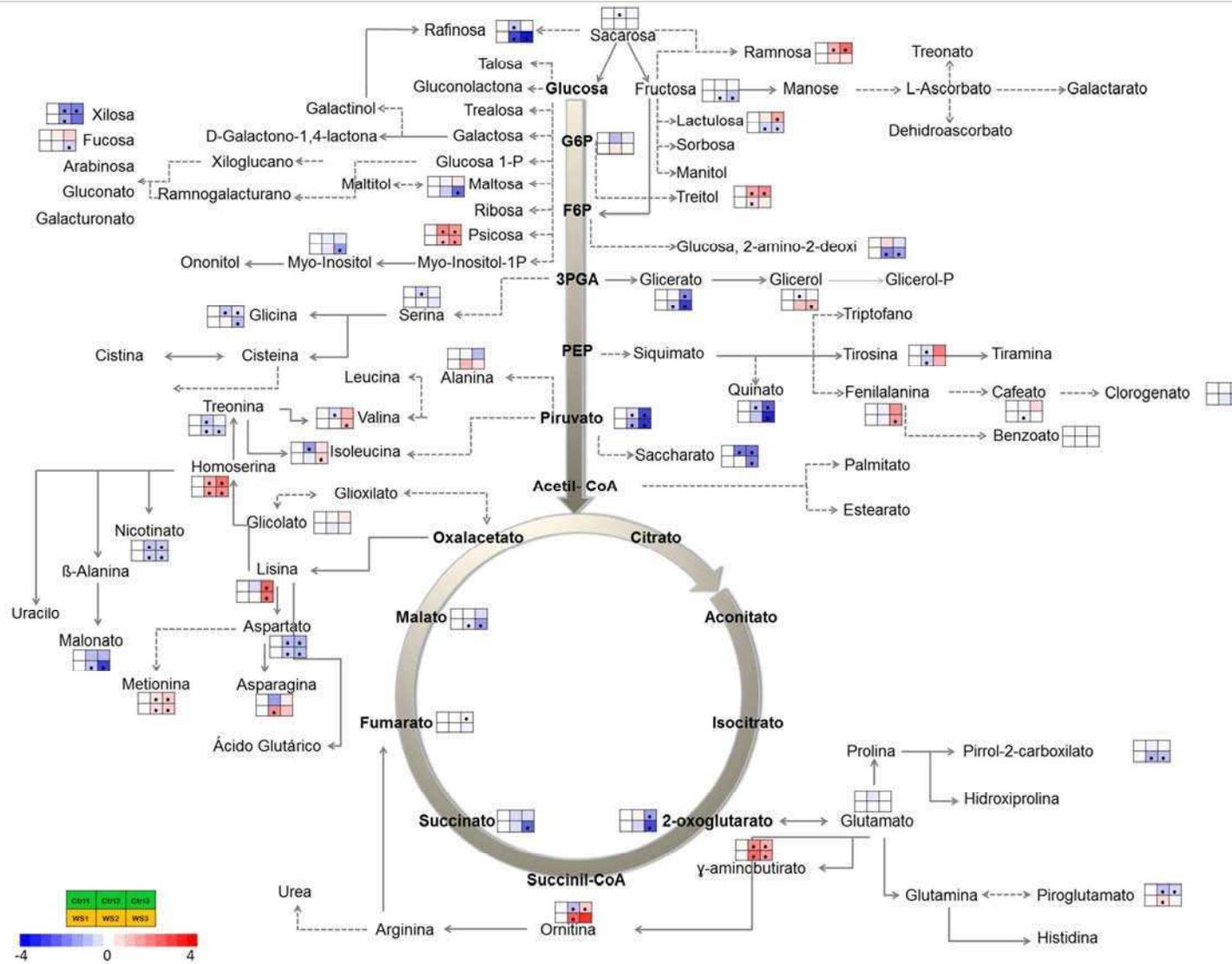
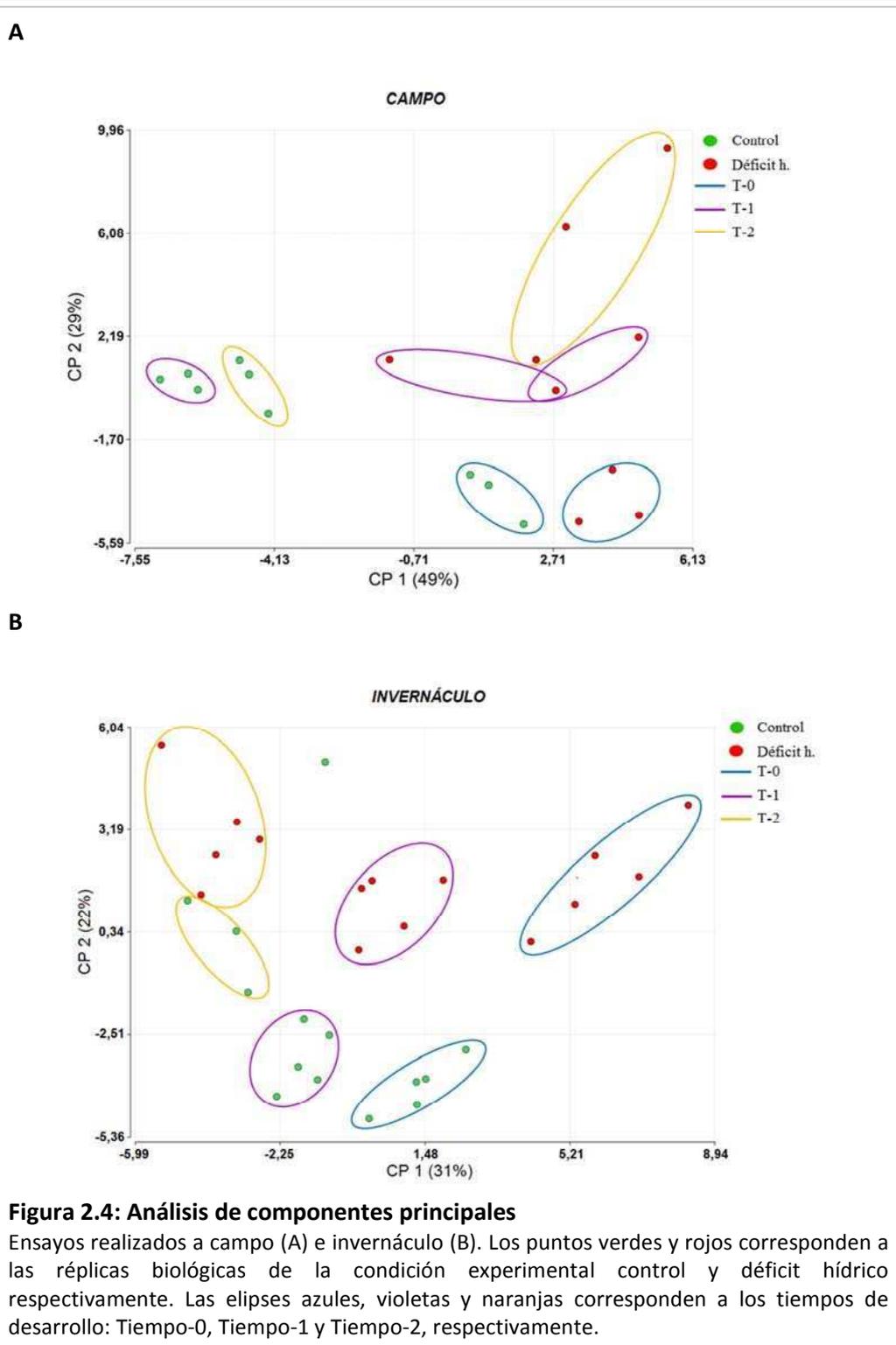


Figura 2.3: Perfil de metabolitos detectados a través de GC-TOF-MS

Ensayo realizado en invernáculo. Cada gráfico representa la tasa de cambio o *fold-change* considerando el tiempo 0 como control; las columnas representan los tiempos evaluados para cada metabolito. La primera fila corresponde a la condición control mientras que la segunda fila pertenece a la condición de déficit hídrico. Los puntos dentro de cada gráfico indican diferencias estadísticamente significativas (p -valor < 0,05).



Nutrientes iónicos

Mediante cromatografía iónica fue posible la detección de cuatro nutrientes aniónicos (cloruro, nitrato, sulfato, y fosfato) y 5 nutrientes catiónicos (sodio, amonio, potasio, magnesio y calcio).

Entre los nutrientes aniónicos que mayores diferencias mostraron, se encuentran los nitratos, para los cuales se observó un incremento durante el desarrollo de la hoja tanto a campo como invernáculo, en ambas condiciones evaluadas (control y déficit hídrico), mientras que los sulfatos mostraron una disminución de la concentración a medida que avanzaba el proceso de senescencia (Figura 2.5). En el caso de cloruros, se observó un incremento significativo en la condición de déficit hídrico a campo mientras que en invernáculo los niveles disminuyeron para la misma condición. Los fosfatos, por su parte, mostraron una disminución de la concentración, aunque no significativa, en la condición de campo, mientras que en invernáculo se observó un incremento considerable en la condición de déficit hídrico, durante el desarrollo de la hoja.

De manera opuesta, los nutrientes catiónicos no mostraron patrones definidos durante la evolución del desarrollo foliar. En el caso de potasio, se detectó un aumento significativo hacia el final del desarrollo en la condición de déficit hídrico para el ensayo de campo, pero este efecto no fue observado en invernáculo. Otro de los nutrientes que mostró diferencias significativas fue el magnesio para el cual se evidenció una disminución significativa bajo déficit hídrico en invernáculo, mientras que a campo se observó una tendencia a incrementar el nivel para la misma condición, pero dicha diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 2.6).

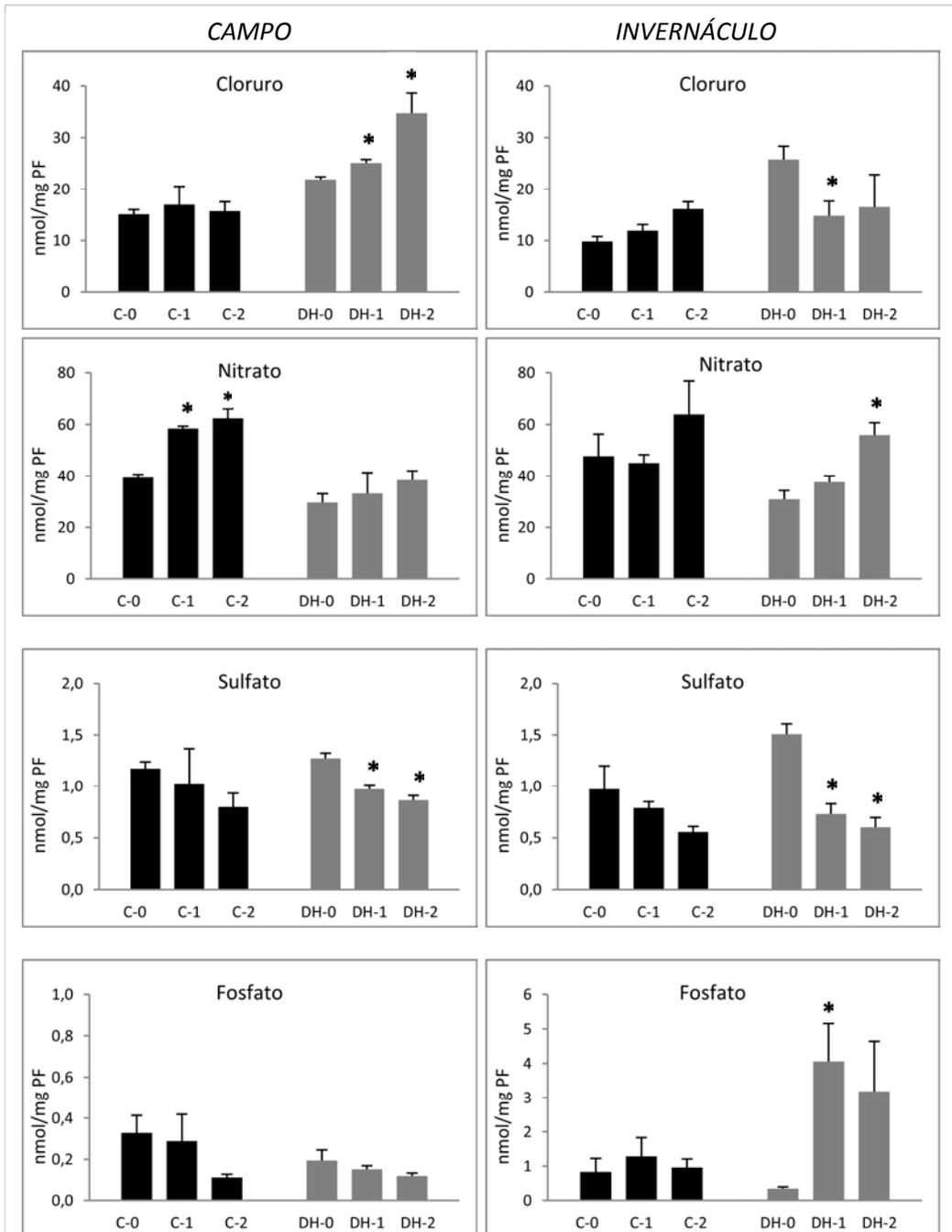


Figura 2.5: cromatografía iónica: análisis aniónico

Nutrientes aniónicos en valores absolutos en nanomoles por miligramo de peso fresco. C-0, C-1 y C-2 corresponden a los tres tiempos en la condición control, DH-0, DH-1 y DH-2 corresponden a los tres tiempos en la condición déficit hídrico. Asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto al tiempo 0.

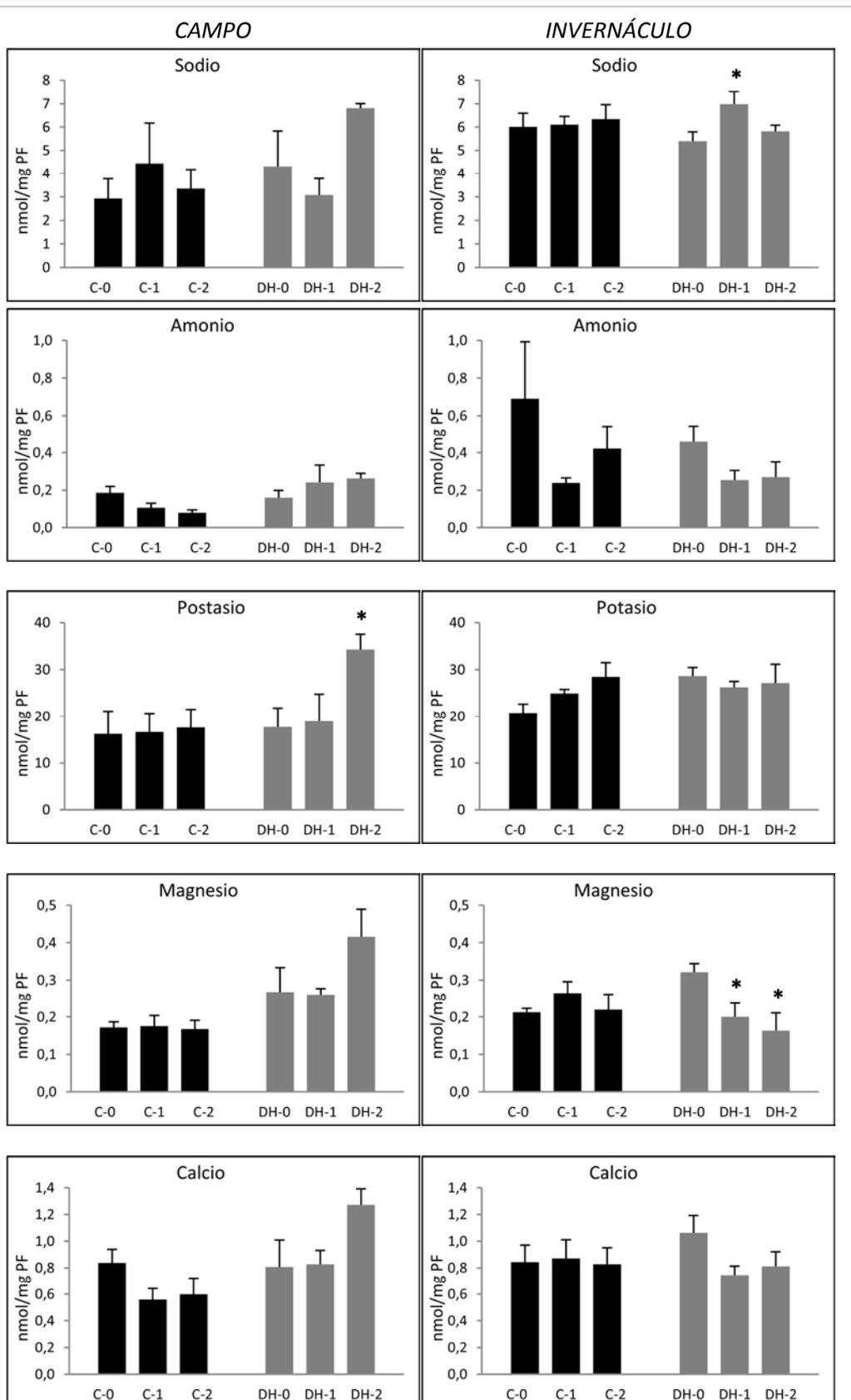


Figura 2.6: Cromatografía iónica: análisis catiónico

Nutrientes catiónicos en valores absolutos en nanomoles por miligramo de peso fresco. C-0, C-1 y C-2 corresponden a los tres tiempos en la condición control, DH-0, DH-1 y DH-2 corresponden a los tres tiempos en la condición déficit hídrico. Asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto al tiempo 0.

DISCUSIÓN

El desarrollo del proceso de senescencia en plantas se encuentra fisiológicamente coordinado y es una etapa crítica para la redistribución de los nutrientes desde las hojas senescentes hacia nuevos órganos en crecimiento como las hojas jóvenes o el desarrollo de fruto y semilla. Durante el desarrollo de la senescencia se incrementan los procesos catabólicos como la degradación de clorofilas, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, mientras que se observa una disminución de los procesos anabólicos (Lim y col., 2007). El transporte de metabolitos desde las hojas maduras y senescentes hacia los distintos destinos, en particular el desarrollo de semillas, repercute en la calidad y cantidad de las mismas y es uno de los aspectos más importantes para el mejoramiento de los cultivos de importancia agronómica (Gregersen y col., 2013).

En este trabajo se llevó adelante un estudio de los perfiles metabólicos durante el desarrollo del proceso de senescencia considerando una serie temporal de tres tiempos a lo largo del desarrollo de la hoja 10 de la planta de girasol, tanto en condiciones control evaluando la senescencia natural de la hoja como en condiciones de déficit hídrico. Los niveles de los metabolitos detectados mostraron, a nivel global, una progresión más marcada durante el desarrollo de la hoja en el experimento a campo, posiblemente debido a una mayor influencia ambiental que derivó en plantas más grandes y con mayor tasa de desarrollo.

Metabolismo del carbono

El rol de los azúcares en el proceso de senescencia ha sido debatido extensamente en los últimos años. Los azúcares son elementos centrales en las relaciones fuente - destino (Balibrea Lara y col., 2004; Roitsch y Gonzalez, 2004) y han sido reportados como reguladores de crecimiento (Smeekens y col., 2010) y de la tasa fotosintética (Wingler y col., 1998). Sin embargo, el efecto de los azúcares sobre el proceso de senescencia es controversial y difiere según las especies estudiadas (Nooden, 1988; van Doorn, 2004; Wingler y col., 2009; Yoshida, 2003). En *Arabidopsis*, por ejemplo, ha sido reportada una acumulación de azúcares a medida que se desarrolla la hoja, mientras que tratamientos con aplicación exógena de azúcares inducen senescencia de manera temprana (Diaz y col., 2005; Masclaux-Daubresse y col., 2005; Masclaux y col., 2000; Quirino y col., 2001; van Doorn, 2008; Watanabe y col., 2013; Wingler y col., 2012; Wingler y col., 2006; Wingler y Roitsch, 2008).

En girasol, se observó una disminución del contenido de azúcares a medida que evoluciona el desarrollo de la hoja, opuesto a lo observado en *Arabidopsis* (Figura 2.2 y 2.3). Los azúcares pertenecientes a la vía metabólica de la glucólisis y los metabolitos derivados del ciclo de los ácidos tricarbóxicos se detectaron en baja concentración durante la senescencia. Esta observación apoya la hipótesis de que a medida que avanza el proceso de senescencia, disminuye la tasa fotosintética junto con los niveles de azúcares en la hoja (Quirino y col., 2000). A su vez, el girasol es una planta que ejerce una fuerte presión por la demanda de nutrientes, especialmente los azúcares como sustrato en la síntesis de aceite durante la etapa del llenado de granos, lo cual intensificaría la demanda, disminuyendo las concentraciones de los mismos en las hojas. Por otro lado, los bajos niveles de azúcares podrían incrementar la producción y/o sensibilidad al etileno, el cual actúa como acelerador del proceso de senescencia (Grbic y Bleecker, 1995; Hoeberichts y col., 2007).

En el experimento realizado a campo se llevó a cabo un tratamiento intensivo de déficit hídrico en un periodo temprano del desarrollo de la planta, por lo cual las plantas en este tratamiento sufrieron una adaptación relativa a esta condición, logrando plantas más chicas y con un retraso en la senescencia, en relación a la planta control para la hoja 10 (ver Capítulo 1). Al comparar el contenido de azúcares durante la senescencia entre plantas control y plantas con déficit hídrico, se pudo observar una menor cantidad de los mismos en las hojas de las plantas control, correspondiéndose con el adelanto de la senescencia observado en dichas plantas (Figura 2.2). En el experimento de invernáculo, en el cual el tratamiento de estrés no fue tan severo, se pudo observar, de manera opuesta, una menor cantidad de azúcares (rafinosa y fructosa) en las plantas en el tratamiento de déficit hídrico en relación al control (Figura 2.3).

Existen números estudios acerca del rol de los azúcares en la ejecución del programa de senescencia, dependiendo de la especie, de los tratamientos evaluados, de la hoja y de la sección de la hoja estudiada, por lo que la conclusión sobre su efecto durante el proceso puede ser diferente o ambiguo (van Doorn, 2008). Un estudio más detallado de los azúcares a nivel de célula o de un tejido específico durante la senescencia natural de la planta podría dar una señal más clara sobre su efecto durante este proceso.

Metabolismo de aminoácidos

Algunos aminoácidos aromáticos productos de la vía del shikimato, como triptófano, tirosina y fenilalanina mostraron un incremento en sus concentraciones a medida que avanza la senescencia, posiblemente relacionados con su papel relevante como fuente de precursores para la síntesis de metabolitos secundarios, como por ejemplo los flavonoides, que actúan como protectores celulares durante la senescencia (Figura 2.2 y 2.3) (Pichersky y col., 2006; Radwanski y Last, 1995; Watanabe y col., 2013; Wittstock y Halkier, 2002). El aminoácido tirosina es un precursor de la biosíntesis de vitamina E o α -tocoferol, que actúa como poderoso antioxidante en los tejidos (Almeida y col., 2011; Collakova y DellaPenna, 2003; Falk y Munne-Bosch, 2010; Quadrona y col., 2013), y una acumulación de vitamina E ha sido reportada en tejidos foliares senescentes (Abbasi y col., 2009; Molina-Torres y Martinez, 1991; Rise y col., 1989).

Por otro lado se observó un gran incremento en aminoácidos ramificados como isoleucina y valina, pudiendo reflejar un papel en la respiración como sustratos alternativos bajo condiciones de estrés, habiendo también sido reportada su acumulación bajo condiciones de senescencia inducida por oscuridad (Araujo y col., 2010; Araujo y col., 2011).

Durante la renovación y degradación de proteínas se produce una liberación de amonio, la cual es acelerada durante la senescencia (Gregersen, 2011). Dicho grupo amonio puede ser canalizado nuevamente en estructuras de aminoácidos mediante la acción de la glutamina sintetasa, enzima que juega un papel central en la removilización de nitrógeno durante el proceso (Bernard y Habash, 2009; Martín y col., 2006; Tabuchi y col., 2007). Por lo general, se ha pensado que el aumento en el contenido de aminoácidos es una consecuencia de la degradación de proteínas. Sin embargo, los niveles en estado de equilibrio de los aminoácidos podrían no sólo depender de la velocidad de su liberación durante la degradación de proteínas, sino también de la tasa relativa de su anabolismo y catabolismo y también probablemente en función de su tasa de transporte (Watanabe y col., 2013).

Los niveles de glutamina incrementaron durante la senescencia a campo (no fue detectado en el ensayo de invernáculo) así como también los niveles de asparagina, ambos involucrados en el transporte a larga distancia de nitrógeno y carbono, siendo los aminoácidos más abundantes en el xilema y floema (Lea y Mifflin, 1980; Urquhart y Joy, 1981) e indicando su participación activa en la removilización de nutrientes.

El Ácido γ -aminobutírico o GABA se mostró en altos niveles en la condición de déficit hídrico a campo e invernáculo y en la condición control invernáculo durante el desarrollo de la hoja. GABA es un producto de la reacción de decarboxilación de ácido glutámico y su acumulación ha sido reportada como asociada a varios tipos de estreses (Kinnersley y Turano, 2000; Obata y Fernie, 2012; Roberts, 2007) en hojas senescentes de leguminosas y tabaco (Lahdesmaki, 1968; Masclaux y col., 2000). Distintos roles han sido propuestos para la acumulación de GABA, como amplificador de la señal de estrés a través del incremento en la síntesis de etileno, como compuesto de almacenamiento temporal de nitrógeno y como compuesto anaplerótico proporcionando intermediarios en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos en respuesta a estrés (Kinnersley y Turano, 2000). Esta última función sería importante considerando que durante la senescencia disminuyen los niveles de azúcares y la concentración de metabolitos en la vía de los ácidos tricarbóxicos, pudiendo proporcionar intermediarios para estas reacciones enzimáticas claves para la producción de energía vía respiración mitocondrial. Adicionalmente, el metabolismo de GABA y prolina se encuentran directamente relacionados al metabolismo de ácido glutámico y jugarían un rol en el balance de glutamato, durante el desarrollo de la planta (Masclaux y col., 2000).

Nutrientes iónicos

Entre los nutrientes iónicos más relevantes durante la senescencia se encuentran los nitratos inorgánicos, los cuales mostraron un incremento de su concentración en la hoja a medida que progresa la senescencia. Este aumento fue observado en todas las condiciones evaluadas (Figura 2.5). En *Arabidopsis* se observó una disminución de nitratos a medida que avanza el proceso de senescencia en la planta entera, y a su vez un gradiente desde la punta de la hoja hacia la base donde se acumula en mayor proporción (Watanabe y col., 2013). Sin embargo, un incremento en el contenido de nitratos ha sido detectado en hojas viejas de planta de tabaco (Masclaux y col., 2000), mientras que en hojas jóvenes se observó una disminución de las concentraciones. Este incremento podría estar relacionado a la función de estos nutrientes como osmoprotectores en vacuolas senescentes (McIntyre, 1997), lo cual explicaría el incremento en la turgencia celular observado en células senescentes (Brugiere y col., 2000). De manera análoga una disminución del contenido de nitratos podría ser observada hacia el final del desarrollo previo a la muerte celular.

Una tendencia a la disminución en el contenido de amonio fue observada en plantas control tanto a campo e invernáculo y en la condición de déficit hídrico en invernáculo. La diferencia no fue estadísticamente significativa. (Figura 2.6). El amonio puede ser obtenido en hojas a partir de la reducción de nitratos, la fotorrespiración y la hidrólisis de proteínas y aminoácidos. Esta disminución podría estar relacionada a su utilidad para la conversión de ácido glutámico y ácido aspártico hacia glutamina y asparagina, los cuales se mostraron en altos niveles.

Los nutrientes fosfato mostraron una tendencia a disminuir durante la progresión del proceso de senescencia (Figura 2.5), evidenciado una posible translocación de los mismos hacia nuevos destinos. Sin embargo, en las plantas con déficit hídrico en invernáculo, se observó un incremento de los mismos durante el desarrollo.

El contenido de sulfatos disminuyó progresivamente durante el desarrollo de la hoja (Figura 2.5). Una correlación negativa entre sulfatos y nitratos ha sido previamente reportada (Blomzandstra y Lampe, 1983; Diaz y col., 2005), y la disminución de sulfatos en hojas senescentes es altamente dependiente de la disponibilidad de nitratos (Dubousset y col., 2009). Sin embargo, los mecanismos por los cuales los sulfatos son movilizados y exportados durante la senescencia foliar no están claramente definidos (Diaz y col., 2005). Especies oleaginosas como canola (*Brassica napus L.*) son particularmente demandantes de azufre (McGrath y Zhao, 1996) y muy sensibles a la falta de este compuesto, con grandes consecuencias para la calidad de la semilla y el rendimiento, afectando la composición lipídica y proteica de la semilla, impactando en la calidad nutricional (Dubousset y col., 2009; Janzen y Bettany, 1984; Scherer, 2001).

Los cationes magnesio mostraron una disminución significativa en plantas con déficit hídrico en invernáculo (Figura 2.6). El magnesio es un macronutriente esencial para varios procesos celulares, incluida la fotosíntesis. Una deficiencia en magnesio ha sido asociada a senescencia foliar en plantas de arroz debido a un defecto en el flujo transpiratorio (Kobayashi y col., 2013).

El potasio, por su parte, mostró un incremento significativo en plantas bajo déficit hídrico a campo, mientras que en plantas control en invernáculo se evidenció una tendencia a incrementar durante el desarrollo. El potasio juega un rol crítico en los mecanismos de translocación de nutrientes hacia el floema (Bhandal y Malik, 1988) y una deficiencia en potasio podría llevar a una acumulación de azúcares en las hojas (Lavon y col., 1995), por lo cual la disminución de azúcares en las hojas

senescentes podría estar relacionada también al incremento en la concentración de potasio.

Estos resultados sugieren una gran movilidad de nutrientes a medida que avanza el desarrollo de las hojas en girasol. Alternativamente, un análisis más detallado espacio temporal, considerando hojas de distintas posiciones en el tallo, sería necesario para determinar de manera más específica la dinámica de los movimientos de los distintos nutrientes durante el progreso de la senescencia.

La removilización de nutrientes desde las hojas hacia las semillas durante el proceso de senescencia es importante para el incremento en peso y en la calidad de las semillas de los cultivos agronómicos (Gregersen y col., 2013).

Las plantas necesitan encontrar un compromiso entre los procesos catabólicos, el mantenimiento de la funcionalidad celular durante el mayor tiempo posible y el transporte de metabolitos hacia órganos destino antes de llegar a la muerte celular. Por este motivo, la transición entre destino y fuente en hojas es importante para un buen desarrollo de la planta, a fin de asegurar el desarrollo óptimo de las semillas y de esta forma incrementar el rendimiento (Watanabe y col., 2013). Sin embargo, a pesar de que los análisis metabólicos en estado estacionario no representan completamente los flujos de translocación de nutrientes en las hojas, provee una poderosa herramienta de estudio para ser utilizada en asociación con otras estrategias como por ejemplo la proteómica o transcriptómica. Un mejor entendimiento de los procesos metabólicos que ocurren durante la senescencia foliar en girasol, puede lograrse sumando información a nivel transcriptómico e integrando datos de las diferentes aproximaciones *ómicas*, fisiológicas y moleculares (Fukushima y col., 2009). Esta aproximación contribuirá a interpretar los mecanismos moleculares subyacentes de este proceso de gran importancia para la producción de este y otros cultivos relevantes.

CAPÍTULO 3

**ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO
RELACIONADO A LA SENESCENCIA
FOLIAR EN GIRASOL**

INTRODUCCIÓN

En los organismos multicelulares, todas las células contienen el mismo genoma y de este modo los mismos genes. Sin embargo no todos los genes se encuentran transcripcionalmente activos en cada célula en un momento determinado, es decir que cada célula muestra un patrón de expresión génica diferente en cada etapa del desarrollo (Adams, 2008). El transcriptoma es el complemento total de ARN que es transcrito a partir del genoma de una célula en un determinado momento. El transcriptoma de un tejido particular es dinámico y cambia bajo determinadas circunstancias dando a lugar a distintos patrones de expresión génica.

La expresión génica es el proceso por el cual la información de un gen es sintetizada para dar lugar a un producto funcional que incluye tanto a los genes que son transcritos a ARN mensajero (ARNm) y que luego son traducidos a proteínas, así como también todos aquellos genes que son transcritos a ARN pero que no son traducidos a proteínas como por ejemplo, ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosomal (ARNr) y ARN nuclear pequeño (ARNsn).

El proceso de senescencia en plantas está caracterizado por la activación e inactivación de distintos grupos de genes. Sin embargo, la expresión de un subgrupo de genes en las células del tejido foliar es requerida para un progreso ordenado de degradación y reciclaje de nutrientes.

La determinación del inicio del proceso de senescencia es compleja porque no existe un “síntoma” que indique este momento. Los parámetros visuales resultan tardíos para evaluar estos procesos. Tanto la variación en el contenido de clorofila, como el amarilleamiento o la necrosis de las hojas, son detectables mucho tiempo después que la cascada de señalización del proceso de senescencia ha sido activada. Los estudios más frecuentes de la senescencia se basan en la acumulación de ARN mensajeros que codifican enzimas relacionadas con la degradación de estructuras, sin embargo, este proceso presenta un alto grado de interacción entre señales endógenas y ambientales, involucrando distintos genes cuya expresión es inducida o inhibida en distintas etapas del proceso (Gan y Amasino, 1997), modificando los patrones de expresión génica ante una situación determinada y complejizando el análisis debido a la interacción entre distintas vías de señalización.

Diferentes estudios han sido realizados con el objetivo de identificar genes asociados a la senescencia sobre- y sub-expresados (genes SAGs: del inglés *Senescence-Associated Genes*, o genes SDGs: del inglés *senescence Down-regulated Genes*)

a lo largo de distintos estadios del proceso (Balazadeh y col., 2008; Breeze y col., 2011; Buchanan-Wollaston y col., 2003; Gepstein y col., 2003; Gregersen y Holm, 2007; Li y col., 2012; Lim y col., 2007; Liu L y col., 2008).

Recientemente, se han identificado factores de transcripción NAC relacionados a la senescencia en especies modelo (*Arabidopsis thaliana*, *Medicago sativa*, *Orzya sativa* L.) y no modelo (*Chrysanthemum lavandulifolium*, *Gossypium hirsutum* L., *Malus domestica*, *Solanum tuberosum* L.) y han sido descritos como relevantes en la regulación del proceso de senescencia relacionado al programa de muerte celular programada (Balazadeh y col., 2011; Balazadeh y col., 2010; de Zelicourt y col., 2012; Guo y Gan, 2006; He y col., 2005; Hu y col., 2010; Huang y col., 2012; Jensen y col., 2010; Kim y col., 2009; Matallana-Ramirez y col., 2013; Nuruzzaman y col., 2010; Shah y col., 2013; Singh y col., 2013; Su y col., 2013; Wang, 2013; Wu y col., 2012; Zhou y col., 2013). Los factores de transcripción tienen una función determinante en la regulación de la expresión génica y consecuentemente en la transducción de señales, actuando como nodos en las redes de regulación de numerosos procesos biológicos. En *A. thaliana*, la expresión de un miembro de la familia de factores de transcripción NAC conocido como *ORE1*, uno de los mayoritariamente estudiados, se encuentra bajo el control de la vía de señalización del etileno regulado por el gen *EIN2* (*ETHYLENE INSENSITIVE2*) (He y col., 2005) el cual codifica una proteína central en dicha vía de señalización localizada en la membrana del retículo endoplasmático (Alonso et al., 1999; Bisson et al., 2009). A su vez, se ha reportado una regulación negativa de *ORE1* mediante el micro ARN *miARN164* (Kim y col., 2009). Entre las familias de factores de transcripción relevantes que han sido relacionadas al proceso de senescencia en numerosas especies, se encuentran, además de los mencionados factores NAC, los factores de transcripción MYB (Jaradat y col., 2013; Zhang y col., 2011), AP2 (Chen y col., 2012a; Chen y col., 2012b; Koyama y col., 2013) y WRKY (Besseau y col., 2012; Miao y col., 2008; Rushton y col., 2012; Ulker y col., 2007; Zhou y col., 2011).

Actualmente existen diversas tecnologías para el estudio de la expresión génica. Una de las técnicas pioneras de alto desempeño que permite el estudio simultáneo de miles de genes y que ha revolucionado la biología molecular fue el desarrollo de micromatrices de ADN. Una de las principales características de esta tecnología es el gran volumen de datos cuantitativos que puede generar, motivo por el cual es necesaria la complementación con técnicas de bioinformática y estadística, adecuadas para una correcta interpretación y análisis de los datos.

En los últimos años, el uso de la tecnología de micromatrices se ha visto sustancialmente incrementado, principalmente para tres tipos de exploraciones genéticas: análisis de expresión génicas, genotipado de mutaciones puntuales o SNP (del inglés: *Single Nucleotide Polymorphism*) y re-secuenciación (Dalma y col., 2006).

La utilización de micromatrices para estudios de expresión génica permite a los investigadores un mejor entendimiento de las relaciones dinámicas entre el contenido de ARNm y una función biológica determinada.

Las micromatrices pueden ser clasificadas en dos grupos basados en la naturaleza del ADN fijado al soporte sólido: micromatrices de ADNc y micromatrices de oligonucleótidos (Aharoni y Vorst, 2002). Estas últimas tienen la ventaja de permitir una gran densidad génica en el mismo soporte y una mayor uniformidad y especificidad en la hibridación. Durante la última década, macro y micromatrices de ADNc han sido desarrolladas en girasol para estudios transcripcionales de desarrollo de semillas (Hewezi y col., 2006b) y de respuesta a estreses bióticos (Alignan y col., 2006) y abióticos (Fernandez y col., 2008; Fernandez y col., 2012b; Hewezi y col., 2006a; Roche y col., 2007).

El desarrollo de proyectos genómicos durante los últimos años ha generado un incremento exponencial del número de secuencias disponibles en bases de datos públicas, involucrando tanto secuenciaciones de genomas completos para algunas especies modelo, así como también, secuencias expresadas cortas o ESTs, en especies con genomas muy grandes como el caso del girasol (Moschen y col., 2014b).

La disponibilidad de un gran número de secuencias ESTs en bases de datos públicas para girasol cultivado y otras especies de girasol relacionadas, entre ellas especies silvestres, junto con el desarrollo en los últimos años de técnicas de análisis transcriptómicos a gran escala, permitieron la implementación y adopción de distintas plataformas para estudios de genómica funcional de girasol.

Las tecnologías de Affymetrix y NimbleGen se aplicaron al desarrollo de micromatrices para el género *Helianthus* en particular y especies de la familia Asteraceae respectivamente (Bazin y col., 2011; Lai y col., 2012).

Utilizando bases de datos públicas de ESTs para *Helianthus sp.* y secuencias de transcriptoma de la línea endocriada HA89, obtenidas mediante secuenciación en secuenciadores de alta posesividad Roche 454 (Roche Diagnostics Corporation), se

ha diseñado recientemente un chip de genotipificación según la tecnología Illumina Infinium BeadChip (Bachlava y col., 2012).

Más recientemente, nuestro grupo de trabajo ha desarrollado una micromatriz de oligonucleótidos basado en la tecnología de Agilent para estudios de expresión génica en girasol (Fernandez y col., 2012b). Este trabajo contempló la limpieza, el ensamblado y la anotación funcional de aproximadamente 130.000 secuencias públicas de ESTs generando un total aproximado de 41.000 unigenes de girasol, los cuales están representados en la micromatriz con un formato de cuatro campos conteniendo 44K sondas (4x44, www.agilent.com). La ventaja de esta tecnología frente a estrategias alternativas reside en el uso de sondas más largas, de 60 pares de bases, lo que le confiere una alta estabilidad de hibridación, siendo más adecuado para el análisis en regiones altamente polimórficas (Hardiman, 2004).

Si bien la tecnología de las micromatrices de ADN y/u oligonucleótidos ha sido un pilar para el descubrimiento de la funcionalidad de un gran número de genes y/o sus mecanismos de regulación, aún permanecen muchas incertidumbres a la hora de analizar la información obtenida a partir de un valor de fluorescencia, y su correspondiente significado biológico. La sinergia multidisciplinaria entre estadística, biología molecular e informática emergen como necesarias para dar sustento al uso e interpretación de los resultados obtenidos utilizando micromatrices en el área de genómica funcional y proveer así, herramientas concretas asociadas a estas problemáticas de análisis de un número múltiple de genes actuando y/o corregulando la respuesta de otros genes en cascada.

En este sentido, el objetivo de este capítulo fue identificar genes candidato del proceso de senescencia a través del análisis concertado de expresión génica, utilizando una micromatriz de oligonucleótidos diseñada para girasol, así como también mediante la búsqueda, selección y validación por qPCR de genes candidatos previamente caracterizados en especies modelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Para realizar los estudios transcriptómicos se utilizaron muestras provenientes del mismo ensayo realizado a campo en la Unidad Integrada (FCA-UNMdP/EEA-INTA) Balcarce, detallado en los Capítulos 1 y 2, así como también, el ensayo realizado en invernáculo detallado en este último capítulo. Para el ensayo a campo se analizaron tres réplicas biológicas mientras que para el ensayo en invernáculo se seleccionaron cuatro réplicas biológicas de las cinco réplicas colectadas.

Extracción de ARN y control de calidad

A partir de 100 mg de tejido foliar obtenido a distintos tiempos de desarrollo y frente a las distintas condiciones experimentales se realizó la extracción de ARN utilizando el reactivo Tripure (Roche, Argentina) siguiendo las instrucciones del fabricante para cada una de las réplicas biológicas. El ADN genómico fue eliminado mediante tratamiento con ADNasa (Invitrogen, Argentina). El ARN obtenido fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware USA). La pureza e integridad del ARN fue determinada mediante mediciones de absorbancia a través de la relación 260/280 y 260/230 y mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% conteniendo MOPS al 10%.

La integridad del ARN obtenido para ser utilizado en la micromatriz fue evaluada además utilizando un bioanalizador RNA-6000 NanoBioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, California USA).

Análisis de asociación de expresión génica concertada

Se utilizó una micromatriz de ADN de alta densidad basadas en oligonucleótidos gen-específicos (60-mer) diseñados en base a ESTs de bases de datos públicas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/dbest>) y sintetizadas *in situ* sobre soporte poroso (Tecnología Agilent 4x44 One-Color Chip). Esta plataforma diseñada para girasol se encuentra disponible desde el repositorio GEO de NCBI, AN GPL13610 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GPL13610>).

Esta metodología permitió la evaluación simultánea de hasta 44.000 secuencias únicas en plantas desafiadas y plantas control. Se realizaron dos ensayos de

hibridación independientes: *campo* (campaña 2010/11) e *invernáculo* (campaña 2010/11). Para la hibridación de la micromatriz se utilizó la hoja 10 tanto de la condición control como de déficit hídrico, en tres tiempos de desarrollo, tiempo 0 (T0= hoja joven), tiempo 1 (T1= hoja pre-antesis) y tiempo 2 (T2= hoja post antesis) (Fig. 2.1)

La captura de datos se realizó con un lector de chips Agilent; las imágenes obtenidas se analizaron mediante Agilent Feature Extraction Software (v9.5.1) según el protocolo Agilent GE1_107_Sep 09 y QC Metric Set GE1_QCMT_Sep09 (Fernandez y col 2012). El pre-procesamiento de los datos fue realizado usando la librería “limma” (Smyth, 2005) del paquete estadístico R (R Core Team, 2012) disponibles en la plataforma de código abierto Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>). Los datos fueron corregidos utilizando la función *backgroundCorrect*, utilizando el algoritmo “rma”. La normalización entre micromatrices fue realizada usando la función *normalizeBetweenArray* utilizando el método de *quantiles*. Finalmente la expresión génica fue transformada a escala logarítmica en base 2 (\log_2) y calculando la media de las réplicas técnicas.

El análisis de agrupamiento de perfiles de expresión en conglomerados se llevó a cabo utilizando herramientas específicas del programa Infostat (<http://www.infostat.com.ar>), Universidad Nacional de Córdoba; programa para análisis de micromatrices (paquete R) (R Core Team, 2012).

Con el objetivo de evaluar la evolución del proceso de senescencia en condiciones naturales del desarrollo y evitar el solapamiento con genes de respuesta específica a estrés, el análisis estadístico se efectuó comparando los distintos tiempos de desarrollo (T1 vs T0 y T2 vs T0) dentro de cada condición, por un lado plantas control y por otro lado plantas desafiadas.

Se filtraron todos aquellos genes que tenían un p-valor menor a 0,05 y una tasa de cambio (*fold change*) mayor o menor a 2 ($\log_2 > 0 < a 1$) en uno o los dos contrastes evaluados, para cada condición experimental.

Análisis de enriquecimiento funcional mediante Ontologías Génicas (GO)

Las comparaciones descritas en la expresión diferencial fueron evaluadas mediante un análisis funcional utilizando los términos GO de *Gene Ontology* (Ashburner y col., 2000) a través del programa Babelomics (Al-Shahrour y col., 2008).

Con el objetivo de encontrar bloques funcionales enriquecidos en alguna de las condiciones, se utilizó la metodología de *Gene Set Analysis* basado en modelos de regresión logística (Montaner y Dopazo, 2010; Sartor y col., 2009) utilizando como datos de entrada la lista de todos los genes de la micromatriz, ordenados por el valor del contraste estandarizado. La corrección de los p-valores en un escenario de múltiples pruebas se realizó mediante el procedimiento de Benjamini Hochberg, obteniendo los respectivos p-valores ajustados (Benjamini y Hochberg, 1995).

Selección de genes candidato y diseño de cebadores

La base de datos que aloja el catálogo de unigenes curados y anotados para girasol, *Sunflower Unigene Resource* (SUR v1.0), desarrollada por la Unidad de Bioinformática del Instituto de Biotecnología, disponible en la dirección de internet: <http://atgc-sur.inta.gob.ar/> (Fernandez y col., 2012b) fue utilizada para la búsqueda de genes candidato seleccionados a partir de secuencias descritas en bibliografía en especies modelo, así como también a partir de la selección de aquellas identificadas a través del ensayo de micromatrices y utilizados para la validación del mismo ensayo.

Diferentes genes de referencia fueron evaluados en un trabajo previo para estudios de expresión durante la senescencia foliar en girasol (Fernandez y col., 2011). En este trabajo se seleccionó el *Factor de Elongación-1- α* (*Ha-EF-1 α*) como gen de referencia (RG) debido a que mostró un comportamiento estable durante el desarrollo de la hoja.

Se desarrollaron cebadores específicos para cada gen seleccionado utilizando el programa *Primer3* (Rozen and Skaletsky, 2000) bajo parámetros preestablecidos. Los iniciadores empleados para amplificar las regiones candidatas se describen en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Lista de cebadores diseñados para qPCR

Nombre	Identificador SUR	Cebador izquierdo	Cebador derecho
Ha-NAC01	HeAn_S_19140	5'AAGAAGTACCCGACCGGATT 3'	5'TCACCCAATTCGTCTTTTCC 3'
Ha-EIN2	HeAn_C_6687	5'AGCTGGCGTTCTCTAAACCA 3'	5'TGCAATCTCCACATCCTTCA 3'
Ha-EF-1 α	HeAn_C_8757	5'ACCAAATCAATGAGCCCAAG 3'	5'GAGACTCGTGGTGCATCTCA 3'
163	HeAn_C_163	5'GCAAGAGGCACTTGAAGGAC 3'	5'GAACAAGCTTCCCATGTGGT 3'
1282	HeAn_C_1282	5'TTTGGGCACTTTTCGTAAGC 3'	5'TTTAGGGAACACGGCAAGTC 3'
2535	HeAn_C_2535	5'GATGAAAATGGGCGAAGGTA 3'	5'TTTGGTTCACAATGGCTTGA 3'
3510	HeAn_C_3510	5'ATTTCTGGCGGTCAAACAAC 3'	5'CCGGTCTTGATCTCGGGTA 3'
4383	HeAn_C_4383	5'GAGGGTGATAACCGACTGGA 3'	5'TTGGGAGCCATAGAAAAGCAC 3'
5124	HeAn_C_5124	5'ACGTCAGGGTGGTGAAAAAG 3'	5'ATAACCCGAACCGATTTTCC 3'
10816	HeAn_C_10816	5'ATGTTTGGCGAGAAGGAATG 3'	5'TCCTTTGGGAGCTTTACCAA 3'
11489	HeAn_C_11489	5'TACTTGCCGAAAATCCAGT 3'	5'ATTGCTCGTCCAATCAATCC 3'
11812	HeAn_C_11812	5'AAGGAAGGGATTCCGACAGT 3'	5'CCAGGGCATCTCCTGTAAAA 3'
37540	HeAn_S_37540	5'CGAACCTTCTCCATGCTCTC 3'	5'TGGTGGTACCCTGAGGAGTC 3'

Análisis de expresión mediante PCR en tiempo real (qPCR)

A partir del ARN extraído y tratado con la enzima ADNasa se realizó la síntesis de ADN copia (ADNc) utilizando la enzima para transcripción reversa Superscript III (Invitrogen, EUA) y cebadores de hexámeros al azar. A partir del ADNc obtenido para cada muestra, se cuantificó el nivel de expresión para los distintos genes a través de la técnica de PCR cuantitativa (qPCR) utilizando el kit Fast Start SYBR Green (Roche, Argentina) en termociclador Step-One Real-Time PCR System (Applied Biosystems). La reacción de qPCR fue llevada a cabo en 25 μ l de reacción conteniendo 200 nM de cada cebador, 1 μ l de ADNc y 12,5 μ l de FastStart Universal SYBR Green Master (Roche Applied Science). Se evaluaron simultáneamente controles negativos. Se utilizó el siguiente programa de ciclado: 95°C durante 10 min, y 40 ciclos de 95°C por 15 s y 1 min a temperatura de hibridación. La especificidad de la reacción fue verificada mediante el análisis de la curva de disociación o curva de *melting* luego de los 40 ciclos de la PCR. El ensayo de qPCR fue llevado a cabo con tres réplicas biológicas para cada condición y tres réplicas técnicas para cada una de ellas.

Los datos crudos obtenidos se analizaron mediante el programa LinRegPCR, el cual permite calcular la eficiencia de la reacción de PCR y el Cq o ciclo de cuantificación, para cada una de las muestras evaluadas (Ruijter y col., 2009). Los niveles de expresión se evaluaron en relación a la expresión de RGs caracterizados

previamente para girasol (Fernandez y col., 2011) utilizando el programa *fgStatistics* (fgStatistics, 2009).

Northern blot para microARN

Con el objetivo de evaluar la transcripción de un micro ARN (*miARN164*) se realizó una extracción de ARN de hoja 10, colectadas a distintos tiempos de desarrollo en el ensayo de campo utilizando Tripure (Roche, Argentina), siguiendo las instrucciones del fabricante pero repitiendo el paso de agregado de cloroformo dos veces para la obtención de ARN de mayor calidad. Una masa de 15 mg de ARN total fue resuelto en un gel de poliacrilamida al 17% conteniendo 7 M de urea. Luego de la electroforesis, el ARN fue transferido a una membrana GeneScreen Plus membrane (PerkinElmer Life Science, Waltham, MA). Se utilizó la sonda del *micro ARN164* de girasol (5'TTCATGTGCCCTGCTTCTCCA3') (Barozai et al., 2012) la cual fue marcada radioactivamente utilizando α -ATP y T4 Polinucleótido quinasa. La sonda marcada fue luego purificada mediante columnas de purificación QIAquick Nucleotide Removal kit (QIAGEN, Argentina). Luego, el oligonucleótido marcado fue incubado con la membrana en solución 2× Denhardt 5× SSC, 7% SDS, 20 nM Na₂HPO₄ (pH7.2), y 1 mg de esperma de salmón a 50°C durante una noche.

La membrana fue lavada dos veces utilizando una solución de lavado conteniendo 10× Denhardt, 3× SSC, 5% SDS, 25 nM NaH₂PO₄ (pH7.5), durante 15 min cada lavado y expuesta durante una noche en *cassettes* con pantallas de detección de radioactividad. La intensidad de cada banda fue cuantificada usando el equipo Typhoon Trio (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). La intensidad de radiación de cada banda fue normalizada frente a la intensidad de la banda del ARN ribosomal marcada con bromuro de etidio durante la electroforesis.

Análisis de genes SAGs

La base de datos *Leaf Senescence Database* (<http://psd.cbi.pku.edu.cn/>) (Li y col., 2014) reúne una colección de secuencias de genes SAGs de distintas especies, en particular Arabidopsis. Aproximadamente 1.200 secuencias en formato FASTA de genes SAGs de Arabidopsis fueron descargados de dicha base de datos. Mediante el programa Bioedit (Hall, 1999) se realizó la búsqueda por similitud de secuencia comparando mediante BLASTN las 1.200 secuencias de genes SAGs frente a la base de datos de girasol conteniendo la colección de aproximadamente 41.000 unigenes, seleccionando en cada caso la secuencia con mayor similitud o “hit-

BLAST” para cada secuencia incógnita y tomando luego todas aquellas con un valor de puntuación significativo.

Análisis de factores de transcripción

De forma similar a la búsqueda de genes SAGs, se descargó de la base de datos *Plant Transcription Factor Database* (<http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/>) (Perez-Rodriguez y col., 2010) aproximadamente 23.000 secuencias de factores de transcripción pertenecientes a las especies *A. lyrata*, *A. thaliana*, *Oryza sativa*, *Populus trichocarpa*, *Vitis vinifera* y *Zea mays*. Utilizando el programa Bioedit (Hall, 1999) se realizó la búsqueda por similitud de secuencia comparando mediante BLASTN las 23.000 secuencias de FTs frente a la base de datos de girasol conteniendo la colección de aproximadamente 41.000 unigenes, seleccionando en cada caso el “hit-BLAST” para cada secuencia y tomando luego todas aquellas con un valor de puntuación significativo.

Se realizó un análisis de correlación de Spearman (Spearman, 1904) entre los distintos factores de transcripción diferencialmente expresados durante la senescencia natural utilizando el programa estadístico Infostat (<http://www.infostat.com.ar>). Las correlaciones positivas significativas (p -valor $<0,01$) fueron luego graficadas en forma de red mediante el programa Cytoscape (Shannon y col., 2003).

RESULTADOS

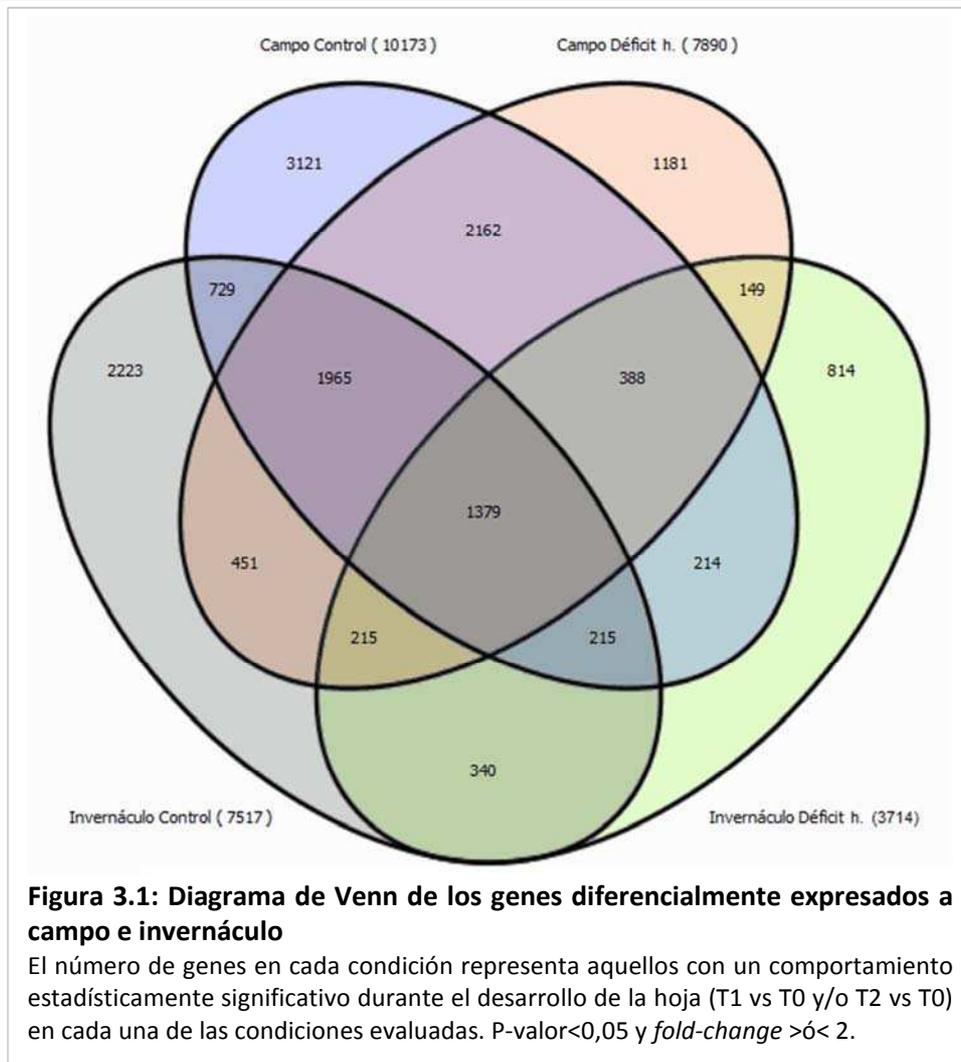
Análisis general de la micromatriz

Análisis de agrupamiento

A partir de un análisis estadístico de la micromatriz se lograron detectar 10.173 y 7.517 sondas estadísticamente significativas entre los distintos tiempos evaluados (T-1 vs T-0 y/o T-2 vs T-0) para las condiciones control en los experimentos de campo e invernáculo respectivamente, mientras que las comparaciones dentro del tratamiento de déficit hídrico mostraron un total de 7.890 y 3.714 sondas estadísticamente significativas en los experimentos campo e invernáculo respectivamente. Los parámetros estadísticos fueron p-valor menor a 0,05 y tasa de cambio o *fold-change* mayor o menor a 2.

Mediante un análisis de diagrama de Venn se pudo observar un total de 1.379 sondas detectadas diferencialmente expresadas en todas las condiciones evaluadas tanto a campo como invernáculo. En el ensayo de campo, la mayoría de los genes diferencialmente expresados fueron compartidos en las dos condiciones experimentales y con un menor número de genes estadísticamente significativos sólo en la condición de déficit hídrico, mientras que en el ensayo de invernáculo, la mayoría de los genes se mostraron diferencialmente expresados sólo en la condición control con un menor número de genes compartidos entre ambas condiciones experimentales y con un número de genes presentes sólo en la condición de déficit hídrico similar al experimento de campo (Figura 3.1).

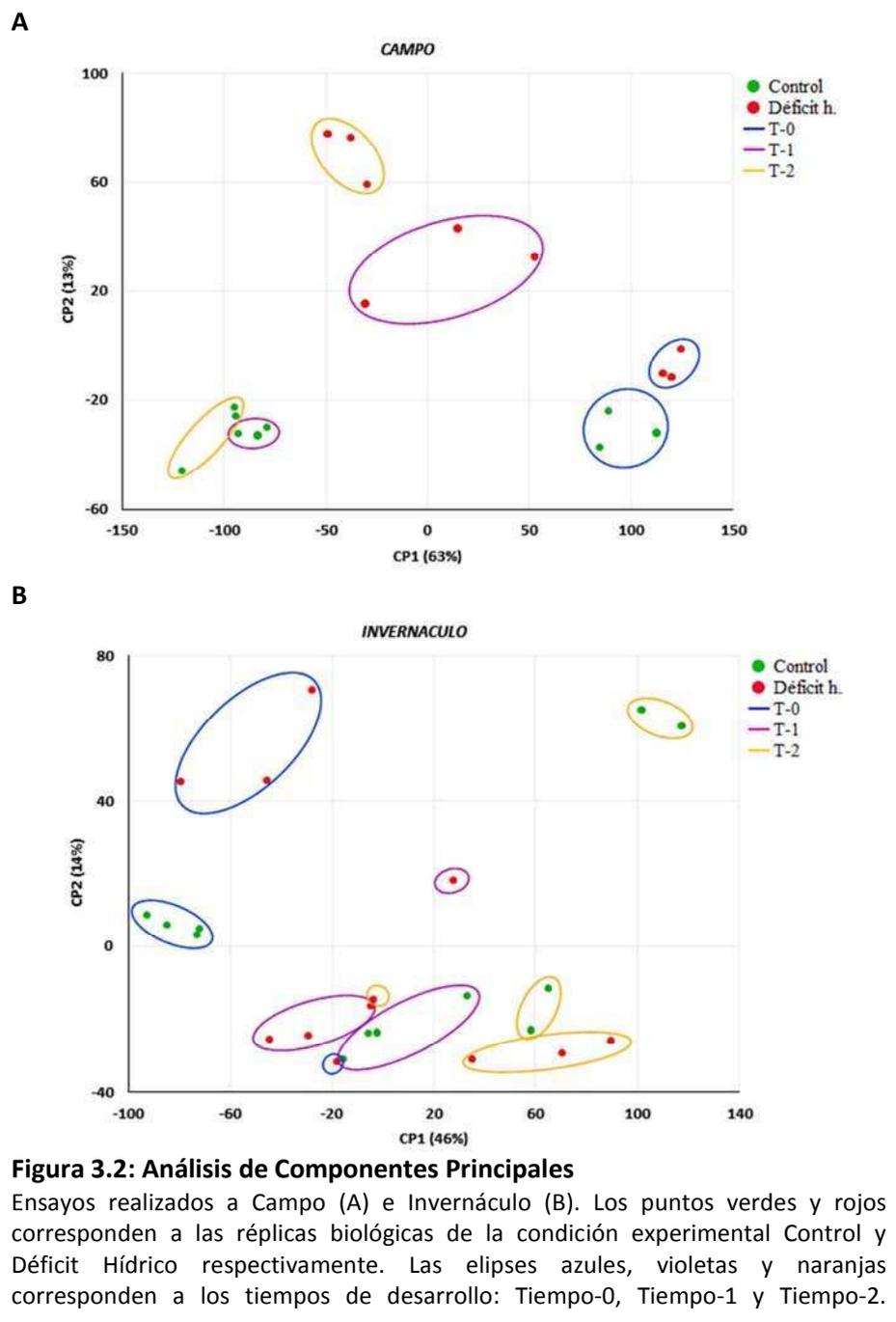
La mayor disponibilidad de espacio físico en un ensayo a campo ha permitido agrupar en cada tiempo de muestreo y por cada condición experimental tres plantas dentro de cada bloque para formar una réplica biológica. Esta característica disminuyó ampliamente la variabilidad entre las réplicas biológicas a diferencia de los ensayos en invernáculo, en la que cada réplica biológica estaba constituida por una única planta. Dicho efecto puede notarse al analizar los gráficos de componentes principales (Figura 3.2) los cuales muestran un agrupamiento de réplicas biológicas más claro para el ensayo de campo con mayores diferencias entre los distintos tiempos de muestreo y condiciones experimentales, similar a lo observado en los análisis metabolómicos detallados en el Capítulo 2.



Análisis de expresión diferencial

Al igual que lo observado en los análisis metabolómicos, se observó también un mayor número de genes diferencialmente expresados y con una mayor tasa de cambio en el ensayo a campo comparado con el de invernáculo, pudiendo deberse también aquí, a las distintas condiciones de crecimiento, lo cual remarca las diferencias en los patrones de expresión.

A raíz de estos efectos observados, se realizó un análisis general de las micromatrices para cada una de las condiciones experimentales estudiadas y luego se focalizó el análisis de datos en la condición de campo control, con el objetivo de evaluar la evolución de la senescencia natural de la hoja a lo largo del desarrollo.



A partir de las 10.173 sondas estadísticamente significativas en la condición campo control se realizó una purificación y filtrado de datos para utilizarlos en los siguientes análisis funcionales. En primer lugar se eliminaron aquellas sondas cuyos unigenes representados (en general unigenes de secuencia corta) no poseían anotación funcional o no presentaban un “hit BLAST” asociado y en segundo lugar se descartaron aquellos unigenes cuyo “hit BLAST” asociado fuera el mismo, seleccionando en cada caso el unigen con mayor identidad de secuencia a un gen determinado basado en el valor de *score* y *e-value* del algoritmo (Altschul y col., 1990). Esto sucede debido a que la base de datos de girasol cuenta con

aproximadamente 41.000 unigenes que han sido ensamblados *in-silico* de manera estricta, con lo cual es probable que dos o más unigenes correspondan a un mismo gen y no hayan podido ensamblarse debido por ejemplo, a un solapamiento corto o una región de secuencia contaminada. De este modo el análisis se redujo a 4.909 genes únicos, anotados funcionalmente y con diferencias de expresión estadísticamente significativas.

Análisis funcional

Mediante un análisis de enriquecimiento *Gene Set Analysis* utilizando como datos de entrada la lista de todas las sondas ordenadas por el estadístico de contraste estandarizado, fue posible detectar diferentes categorías funcionales enriquecidas representadas en las micromatrices, tanto sobre- como sub-expresadas (Figura 3.3).

El enriquecimiento de términos GO de los genes sobre-expresados resultó ser menos informativo que aquellos genes sub-expresados. En el ensayo a campo (Figura 3.3 A) se pudo observar un mayor número GOs pertenecientes a procesos biológicos y función molecular sub-expresados durante el proceso de senescencia, para todas las condiciones evaluadas. Mientras que en el ensayo en invernáculo (Figura 3.3 B), la condición control mostró un patrón similar a lo observado a campo, donde el número de GOs sub-expresados para procesos biológicos y función molecular fue mayor. Sin embargo, este efecto no fue observado en la condición de déficit hídrico donde se detectó menor cantidad de categorías funcionales sub-expresadas.

Al analizar las diferencias entre las condiciones control y déficit hídrico, en un tiempo temprano previo a anthesis (T1-T0), no se observaron diferencias en las categorías sobre- y sub-expresadas. Estudiando luego más en detalle dentro de cada condición experimental para este tiempo pre-antesis, anterior a la aparición de los primeros síntomas de senescencia, entre los genes sub-expresados, se observó alto enriquecimiento de genes relacionados a actividad catalítica como oxido-reductasa, isomerasa y transferasa, especialmente genes relacionados a actividad glucosiltransferasa en relación a síntesis de pared celular y a metabolismo de grupos carbono y sulfuros.

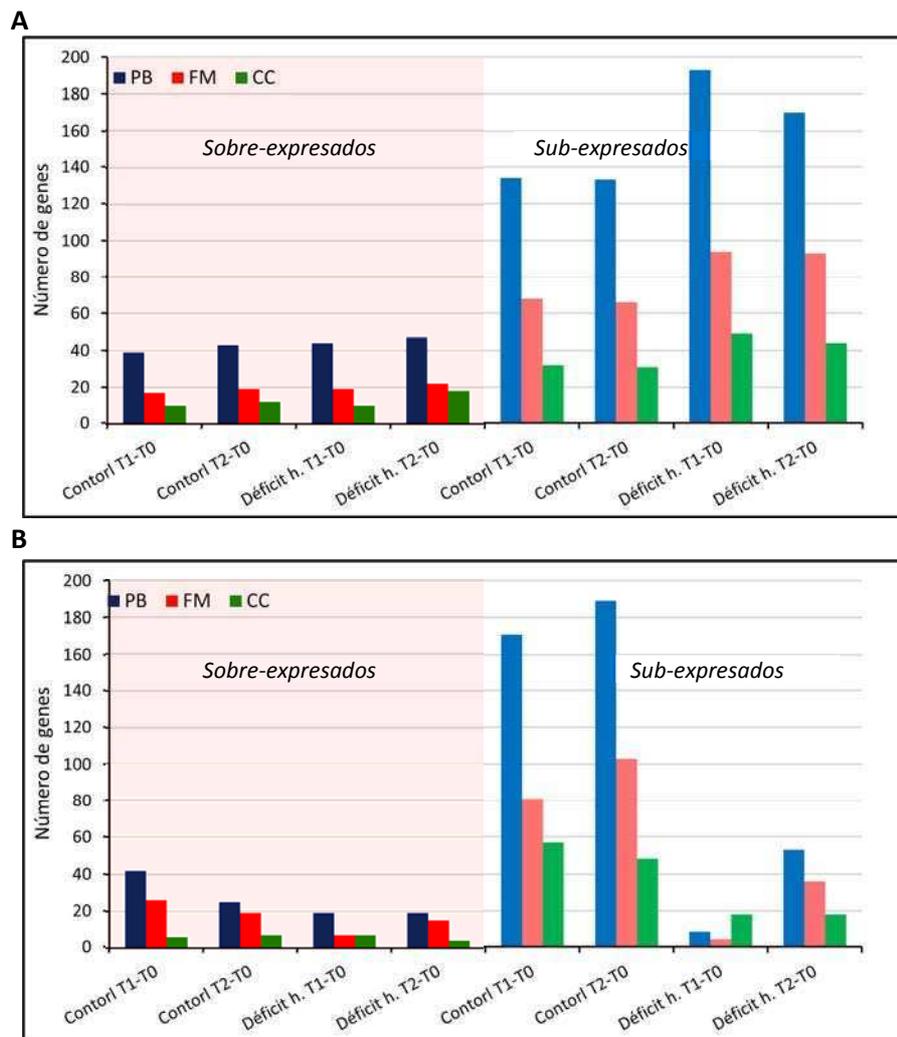


Figura 3.3: Distribución de términos GO significativos

Ensayos realizados a Campo (A) e Invernáculo (B). PB: Proceso Biológico, FM: Función Molecular, CC: Componente Celular. Barras oscuras a la izquierda indican el número de GO sobre-expresados, mientras que las barras de color claro a la derecha indican el número de GOs sub-expresados.

Por otro lado, entre los genes sobre-expresados, estas categorías presentaron pocos genes, y se observó además un enriquecimiento de categorías como regulación transcripcional, factores de transcripción y actividad de ligasas, especialmente en la formación de uniones carbono-nitrógeno y carbono-oxígeno y algunos genes con actividad transferasa, y en este caso más específicamente de grupos nitratos y fosfatos. La Figura A3.1, Apéndice, representa la distribución de los términos GOs significativos para función molecular (FM) en el contraste T1-T0 durante la senescencia natural de la hoja (Campo-Control).

Genes asociados a la senescencia (SAGs)

A partir de aproximadamente 1.200 secuencias de genes SAGs reportados en Arabidopsis se identificaron en la base de datos de girasol, un total de 369 unigenes

candidatos con alta identidad de secuencia. Luego se analizó cuántos de ellos se encontraban expresados con valores significativos en el análisis de micromatrices.

En el ensayo de campo se encontraron un total de 167 y 152 genes SAGs para la condición control y déficit hídrico diferencialmente expresados durante el desarrollo de la hoja respectivamente, mientras que para el experimento en invernáculo se detectó un total de 103 y 60 genes SAGs diferencialmente expresados en las condiciones control y déficit hídrico respectivamente.

Al analizar las funciones moleculares más importantes representadas en este grupo de genes se encontró que la mayoría de ellas correspondían a genes asociados al reciclado de nutrientes, al metabolismo de lípidos y/o carbohidratos y a la regulación de la transcripción en mayor número, seguidas por las categorías degradación de proteínas y regulación redox (Figura 3.4).

Dentro de cada subgrupo de genes, aquellos relacionados a reciclaje de nutrientes, metabolismo de lípidos y carbohidratos (excepto en déficit hídrico en invernáculo, Figura 3.4D) y regulación de la transcripción mostraron a su vez un mayor número sobre-expresados, mientras que entre los genes mayormente sub-expresados encontramos genes relacionados a la regulación óxido-reducción.

Al comparar los genes diferencialmente expresados durante el desarrollo de la hoja entre ambas condiciones experimentales (control vs. déficit hídrico) pudimos observar que la gran mayoría de ellos eran compartidos, mostrando un mismo comportamiento durante el desarrollo de la hoja en cada condición, ya sea sobre o sub-expresados durante el desarrollo. Unos pocos genes fueron estadísticamente significativos sólo en la condición de déficit hídrico, pero al analizar los valores de expresión presentaban un patrón similar al observado en la condición control, sólo que en esta última fueron excluidos de los valores estadísticos de corte, es decir que no se observaron comportamientos diferentes u opuestos en ambas condiciones.

Para un análisis más detallado y considerando la evolución de la senescencia natural a lo largo del desarrollo de la hoja en condiciones controladas, se seleccionaron aquellos genes que presentaron una mayor tasa de cambio en el ensayo de campo, ya que fue el ensayo que permitió una manifestación más clara del fenotipo de senescencia y mostró una menor variabilidad entre réplicas biológicas. Se seleccionaron los genes sobre- y sub-expresados, tomando como punto de corte todos aquellos genes que mostraron una tasa de cambio mayor o menor a 4, o lo que es lo mismo, un logaritmo en base 2 mayor o menor a 2 ($\log_2 > 2$ ó < -2) (Tabla A3.1, Apéndice).

Entre los genes que mostraron un mayor nivel de expresión encontramos enzimas relacionadas al reciclaje de nutrientes como las enzimas glioxilasa I y lisina-ketoglutarato reductasa. Adicionalmente, se observaron altos niveles de expresión de factores de transcripción reportados como SAGs, entre ellos encontramos representantes de las familias NAC, MYB, MBF1, HSF y AP2-EREBP. Asimismo, también se detectaron altos niveles de expresión de genes relacionados al metabolismo de lípidos, carbohidratos y degradación de proteínas.

Entre los genes mayormente sub-expresados, se identificaron aquellos que codifican para enzimas relacionadas a reacciones de óxido-reducción, un factor de transcripción de respuesta a auxinas, una enzima relacionada a respuesta a citoquininas y genes relacionados al metabolismo de lípidos de pared celular.

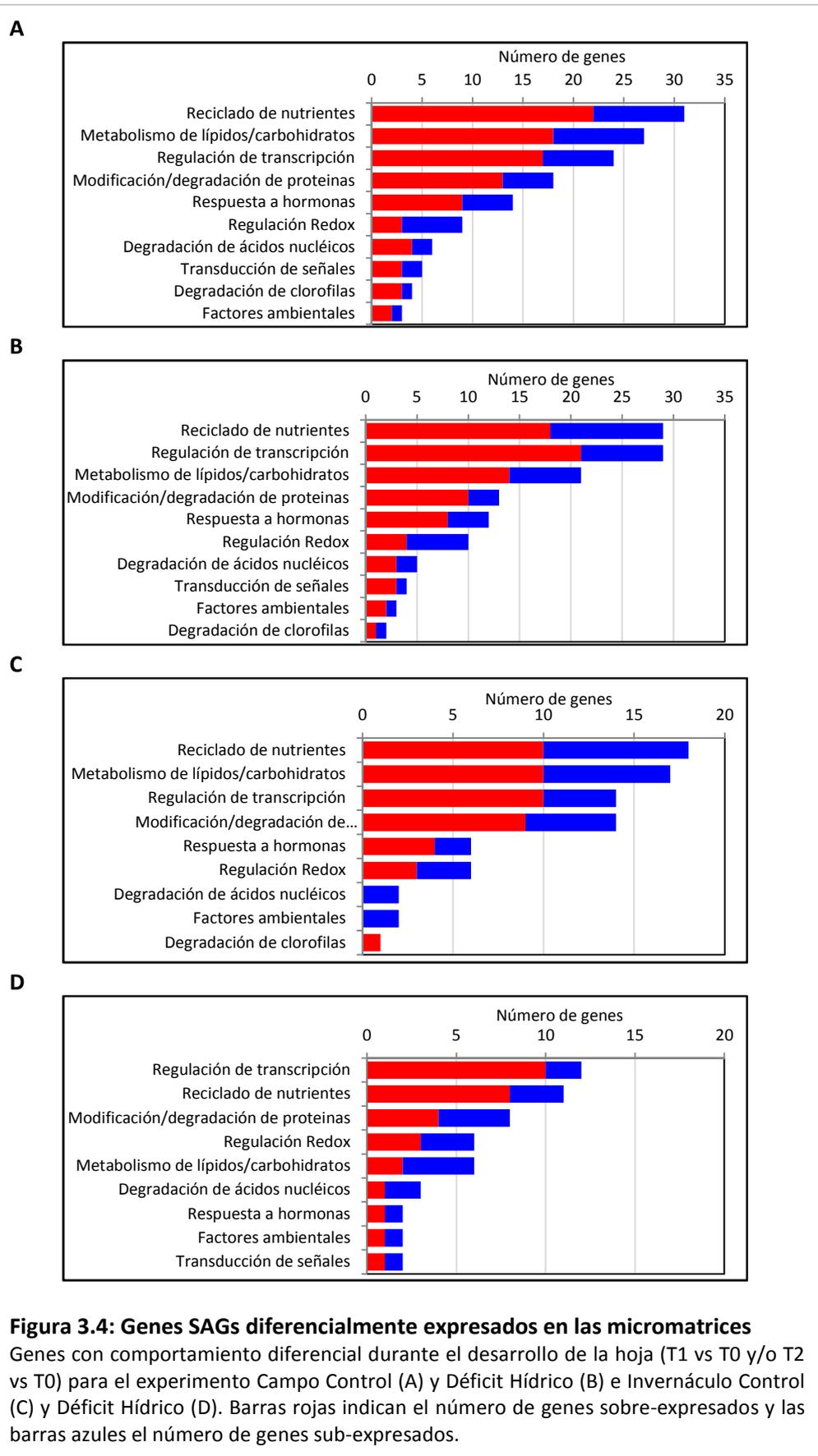


Figura 3.4: Genes SAGs diferencialmente expresados en las micromatrices

Genes con comportamiento diferencial durante el desarrollo de la hoja (T1 vs T0 y/o T2 vs T0) para el experimento Campo Control (A) y Déficit Hídrico (B) e Invernáculo Control (C) y Déficit Hídrico (D). Barras rojas indican el número de genes sobre-expresados y las barras azules el número de genes sub-expresados.

Factores de transcripción

Los factores de transcripción (FT) son proteínas relevantes en la regulación de la expresión génica, su función es determinante en la transcripción y transducción de señales, actuando como nodos en las redes de regulación de numerosos procesos biológicos. Mediante los análisis de alineamiento fue posible detectar 687 unigenes como putativos factores de transcripción en la base de datos de girasol SUR v.1.0.

A través de un proceso de purificación, eliminación de unigenes redundantes y detección de secuencias diferencialmente expresadas en las micromatrices se detectaron 140 y 136 FT estadísticamente significativos durante la evolución de la hoja en condiciones de campo control y déficit hídrico respectivamente, mientras que en el ensayo de invernáculo se detectaron 123 y 86 FT en las condiciones control y de déficit hídrico respectivamente.

Un análisis de las diferentes familias de FT que mostraron diferencias en el estudio, reveló que las familias más representadas corresponden a FT del tipo AP2-EREBP, MYB, NAC, bZIP y HB. Dentro de cada familia, la mayoría de ellas mostraron una mayor relación de genes sobre-/sub-expresados (Figura 3.5). Al analizar la tasa de cambio o *fold-change* se observó además que estas familias no sólo incluían un gran número de representantes diferencialmente expresados, sino que además éstos mostraban una mayor tasa de cambio en relación a las demás familias.

Mediante un análisis de diagrama de Venn se pudo observar un gran número de genes diferencialmente expresados compartidos en los diferentes tratamientos. Un total de 25 FT fueron representados en cada una de las condiciones evaluadas, mientras que separando cada ensayo experimental, pudimos observar 90 y 47 FT compartidos entre control y déficit hídrico para los ensayos de campo e invernáculo, respectivamente (Figura 3.6).

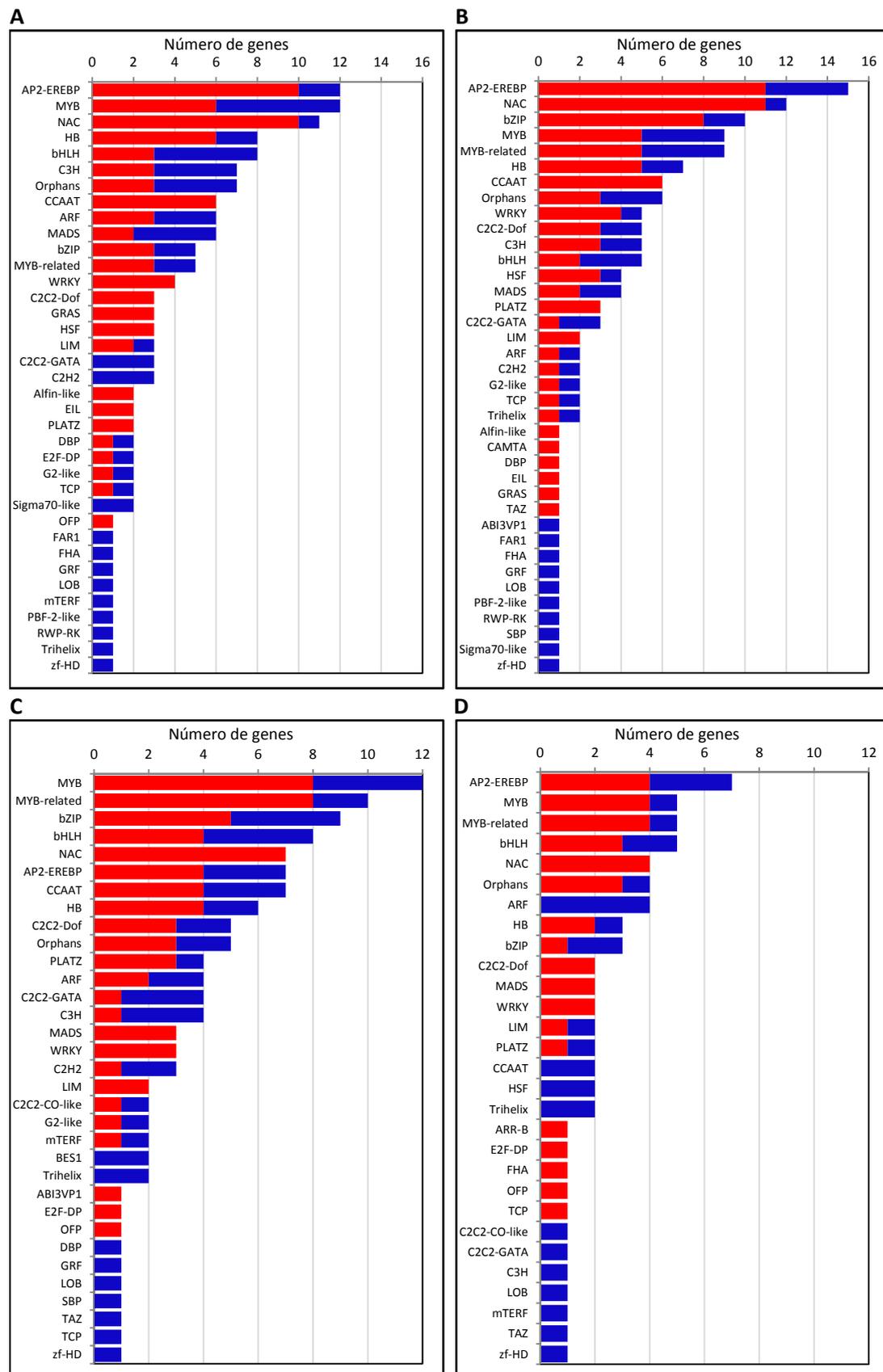
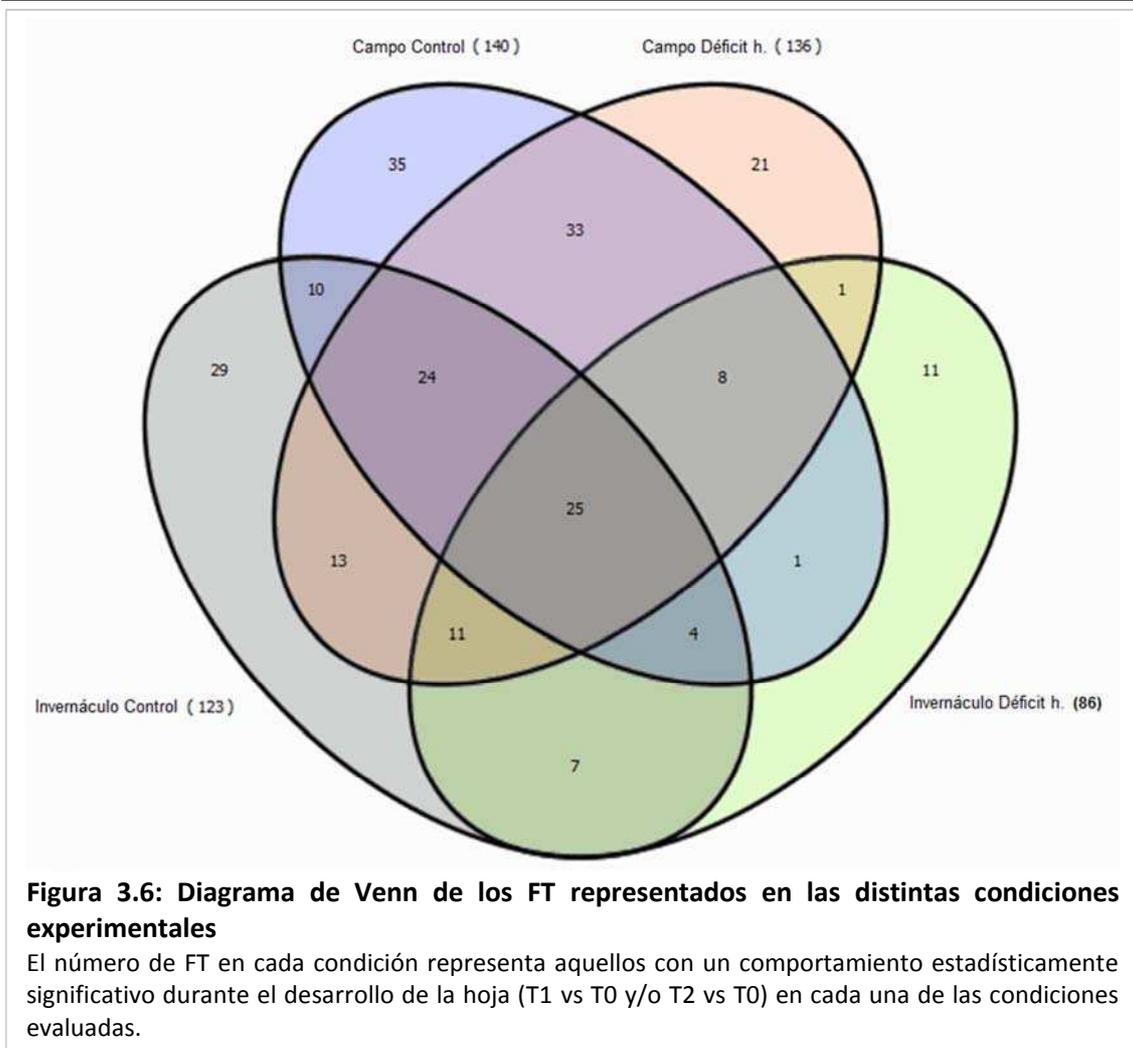


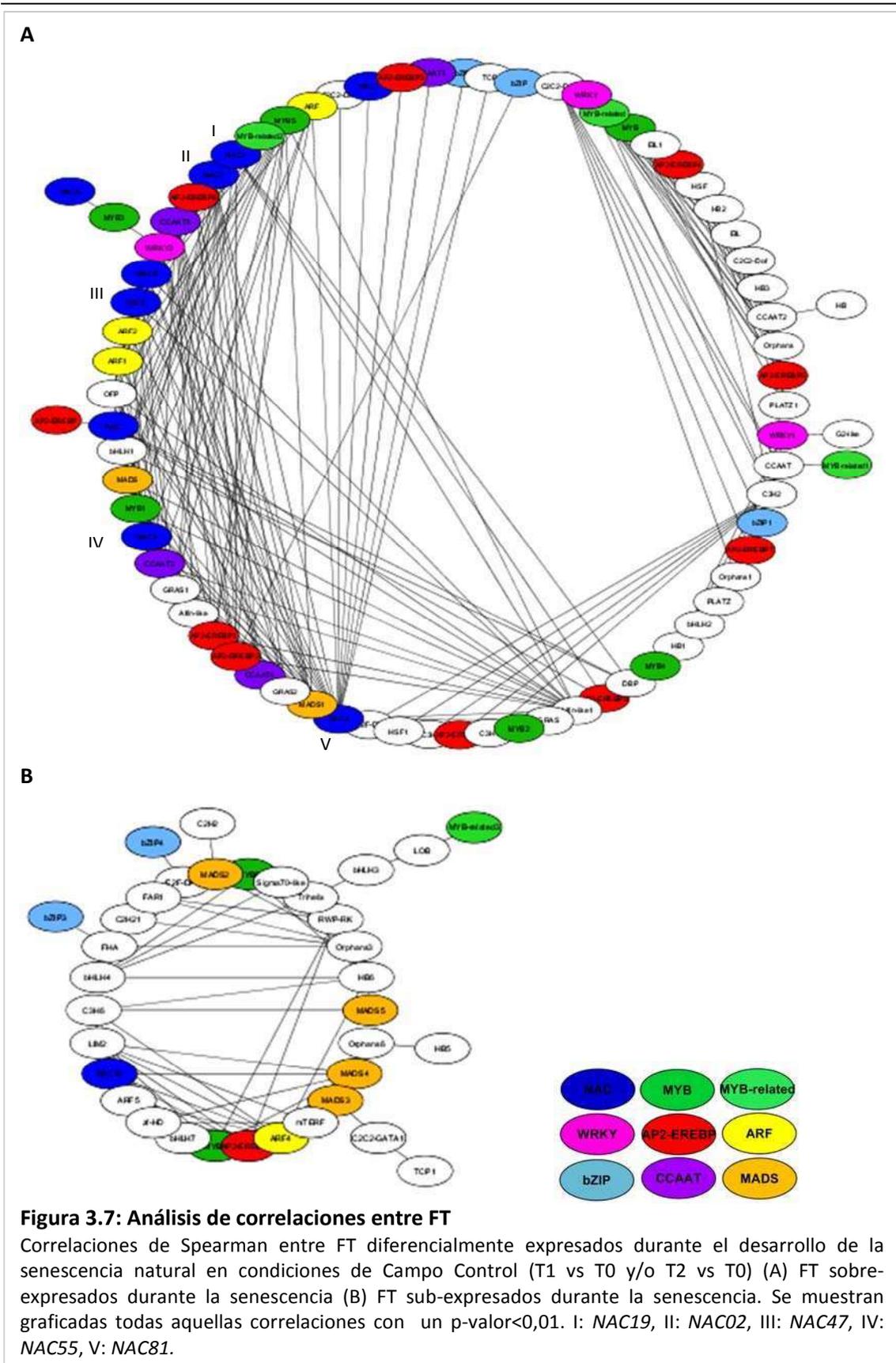
Figura 3.5: TFs diferencialmente expresados en las micromatrices

Genes con comportamiento diferencial durante el desarrollo de la hoja (T1 vs T0 y/o T2 vs T0) para el experimento Campo Control (A) y Déficit Hídrico (B) e Invernáculo Control (C) y Déficit Hídrico (D). Barras rojas indican el número de genes sobre-expresados y las barras azules el número de genes sub-expresados.



Al considerar la senescencia natural en el ensayo de campo (Campo-Control) se seleccionaron aquellos genes que presentaron una mayor tasa de cambio, tanto sobre- como sub-expresados, tomando como punto de corte todos aquellos genes que mostraron una tasa de cambio mayor o menor a 4, o lo que es lo mismo un logaritmo en base 2 mayor o menor a 2 ($\log_2 > 2$ o < -2) (Tabla A3.2, Apéndice). Estos resultados mostraron altos niveles de sobre-expresión entre las familias de FT previamente reportadas como asociadas o inductoras de senescencia, en respuesta a distintos tipos de estreses tanto bióticos como abióticos en especies modelo, como por ejemplo, la familia de FT de tipo NAC, AP2-EREBP, HB y MYB.

Un análisis de correlaciones entre los distintos FT diferencialmente expresados durante la senescencia natural en el experimento de campo fue llevado a cabo a fin de encontrar co-expresiones y posibles co-regulaciones entre ellos durante el desarrollo (Figura 3.7). En primer lugar se pudo observar un mayor número de genes sobre-expresados durante el avance de la senescencia (Figura 3.7A) con representantes de todas las familias detectadas, y un número menor de genes



sub-expresados (Figura 3.7B). En segundo lugar, al analizar las correlaciones dentro de los FT sobre-expresados, encontramos un gran número de correlaciones entre un subgrupo de ellos; dentro de este subgrupo, se encuentran comprendidos

casi todos los FT de la familia NAC detectados con correlaciones estadísticamente significativas en este análisis, los cuales mostraron un gran número de interrelaciones, junto a otros FT candidatos en particular de las familias AP2-EREBP, MYB, MYB-related y ARF.

Entre los FT de la familia NAC se pudieron detectar genes con alta identidad de secuencia a algunos previamente reportados en *Arabidopsis*: *NAC02*, *NAC19*, *NAC55*, *NAC47* y *NAC81*.

Los factores de transcripción de la familia NAC han sido ampliamente reportados como iniciadores de las cascadas de señalización del proceso de senescencia en relación al programa de muerte celular programada en varias especies modelo (*A. thaliana*, *Medicago sativa*, *O. sativa* L.) y no modelo (*Chrysanthemum lavandulifolium*, *Gossypium hirsutum* L., *Malus domestica*, *Solanum tuberosum* L.) (Balazadeh y col., 2011; Balazadeh y col., 2010; de Zelicourt y col., 2012; Guo y Gan, 2006; He y col., 2005; Hu y col., 2010; Huang y col., 2012; Jensen y col., 2010; Kim y col., 2009; Matallana-Ramirez y col., 2013; Nuruzzaman y col., 2010; Shah y col., 2013; Singh y col., 2013; Su y col., 2013; Wang, 2013; Wu y col., 2012; Zhou y col., 2013).

Uno de ellos, *ORE1* o *ANAC092* (AT5G39610) ha sido ampliamente estudiado como activador del proceso de senescencia en especies modelo y se encuentra bajo la regulación positiva de la vía de señalización del etileno a través del gen *EIN2* (He y col., 2005). A su vez, ambos genes forman una red de regulación que involucra un micro ARN (*miARN164*), el cual regula negativamente a *ORE1* en hoja joven y es negativamente regulado por *EIN2* a medida que progresa la senescencia (Kim y col., 2009).

Estos genes, a pesar de mostrarse sobre-expresados en el análisis de micromatrices, no mostraron un p-valor estadísticamente significativo, por tal motivo, al realizar los filtros correspondientes, no fueron seleccionados para los análisis posteriores. Sin embargo, los perfiles de expresión de los unigenes candidatos de girasol *Ha-NAC01* y *Ha-EIN2*, con alta similitud de secuencia con *ORE1* y *EIN2* de *Arabidopsis*, fueron evaluados mediante qPCR, mientras que el micro ARN *Ha-miARN164* fue estudiado a través de un análisis de northern blot (Figura 3.8). Estos análisis fueron realizados durante el desarrollo de la hoja 10 en siete tiempos diferentes de muestreos.

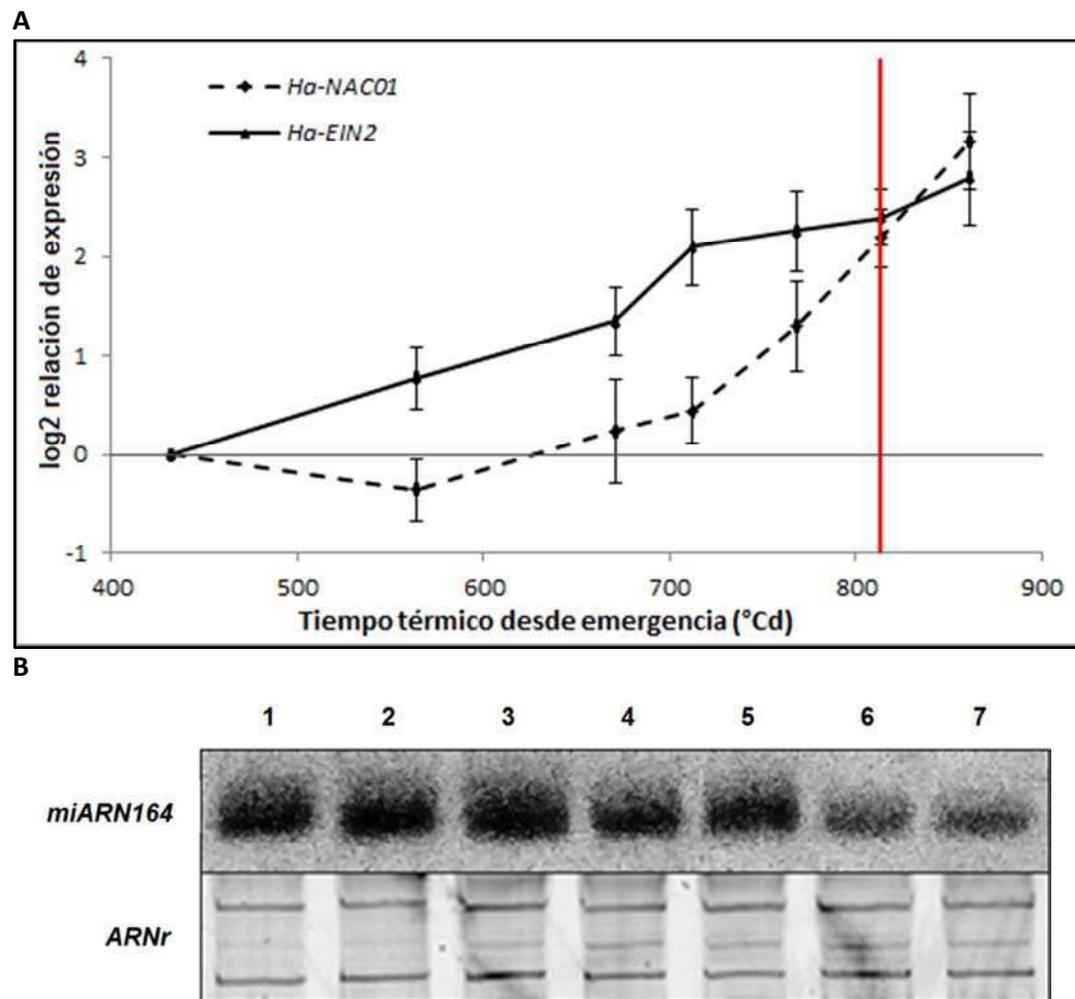


Figura 3.8: Perfiles de expresión de *Ha-EIN2*, *Ha-NAC01* y *miARN164*

(A) Niveles de expresión de los genes candidatos *Ha-EIN2* y *Ha-NAC01* en relación al primer tiempo de muestreo, utilizando el factor de elongación (*Ha.EF1α*) como gen de referencia. La línea roja indica el momento de antesis en el cultivo. (B) Análisis de northern blot de *miARN164*, las bandas correspondientes al ARN ribosomal (ARNr) se muestran como controles de concentración teñidos con bromuro de etidio.

Ha-NAC01, mostró un incremento progresivo de sus niveles de expresión a medida que avanzaba el desarrollo de la hoja con una mayor tasa de incremento de transcritos hacia el momento de antesis y anterior a los primeros síntomas visibles de senescencia (ver Capítulo 1). Los niveles de transcritos de *Ha-EIN2* aumentaron rápidamente en una etapa temprana del desarrollo de la hoja, de manera anticipada a *Ha-NAC01*, evidenciando una posible regulación del mismo, de manera similar a lo reportado en *Arabidopsis* (Kim y col., 2009). La abundancia del *miARN164* fue inversamente correlacionada con los niveles de transcripción de *Ha-NAC01* y *Ha-EIN2*. Cuando la hoja es joven, *Ha-NAC01* es regulado de forma negativa mientras que los niveles del *miARN164* permanecen altos; pero durante el desarrollo de la

hoja, los niveles de *miARN164* disminuyen gradualmente, mientras que se incrementan los niveles de transcripción de *Ha-NAC01*.

Validación de la micromatriz

Diez genes fueron seleccionados en base a su tasa de cambio durante la senescencia natural en el experimento de campo para ser validados mediante qPCR. La Figura 3.9 muestra los valores de expresión obtenidos mediante el análisis de micromatrices y qPCR de los genes seleccionados tanto para la condición control como déficit hídrico.

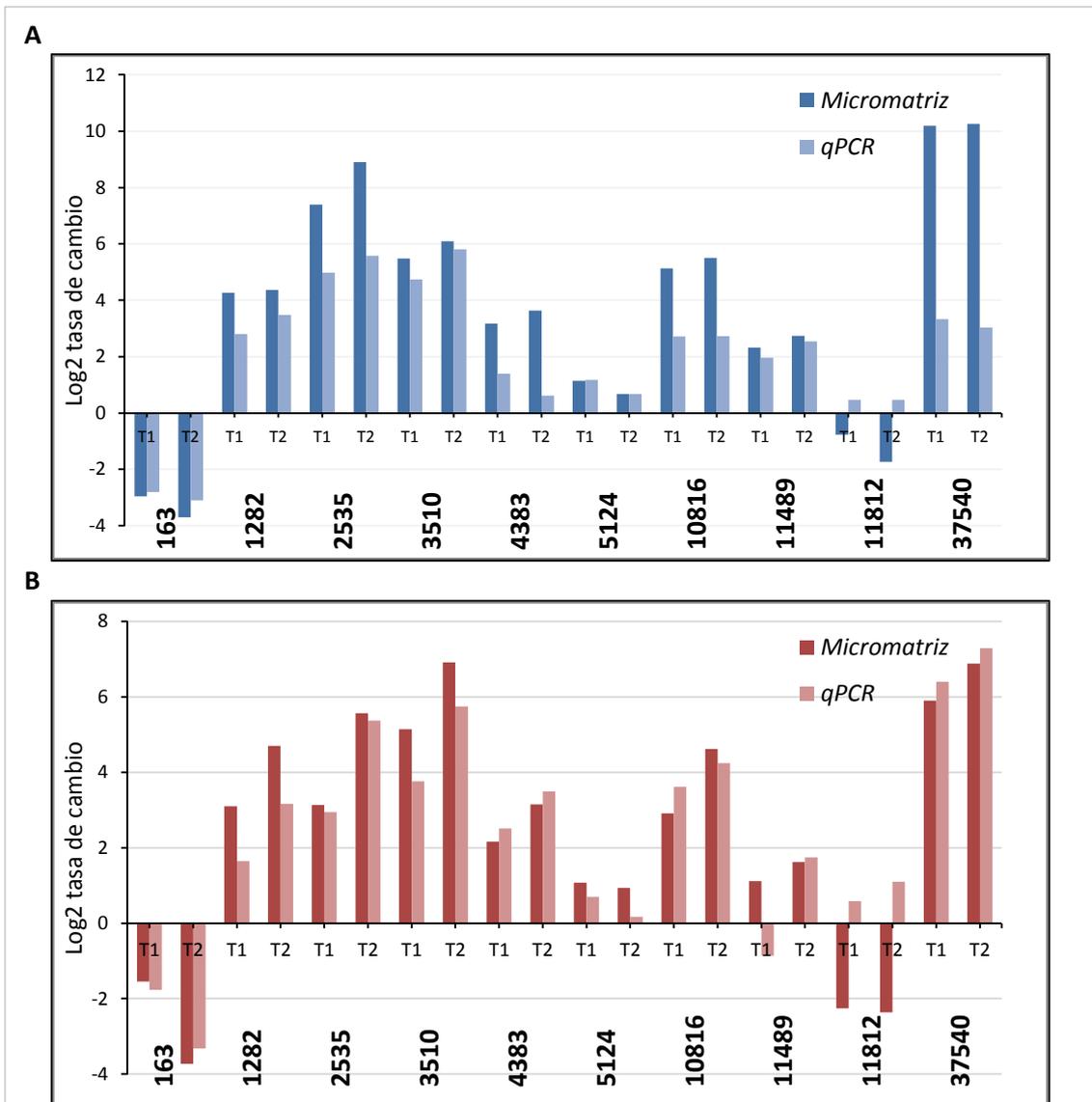


Figura 3.9: Validación de la micromatriz en las condiciones de Campo Control y Déficit Hídrico

(A) Campo Control (B) Campo Déficit Hídrico. Niveles de expresión en escala logarítmica (Log2) de los diez unigenes (nombrados según el número de identificación en la base de datos de girasol) en relación al tiempo 0 (T0) utilizando el factor de elongación (*Ha.EF1α*) como gen de referencia. T1: tiempo1 y T2: tiempo2.

DISCUSIÓN

Durante el proceso de senescencia, las hojas experimentan grandes cambios coordinados de estructura celular, metabolismo y expresión génica. Distintos genes pueden ser sobre- o sub-expresados durante el avance de este proceso y a su vez estos genes pueden estar involucrados en múltiples vías de señalización interconectadas formando una red que controla la senescencia foliar. Por otro lado, diferentes señales endógenas o exógenas inducen a menudo diferentes grupos de genes (He y col., 2001; Park y col., 1998; Weaver y col., 1998), lo cual complejiza aún más el estudio de este proceso. La comprensión de las influencias relativas de cada vía de señalización y las relaciones entre ellas, es un punto crucial para la identificación de genes reguladores claves que controlan el proceso de senescencia (Breeze y col., 2011).

En este trabajo se llevó a cabo un estudio transcripcional del proceso de senescencia en hojas de girasol tanto en condiciones naturales como en plantas sometidas a déficit hídrico, mediante el uso de la tecnología de micromatrices, que permite la detección simultánea de miles de genes logrando una visión general del transcriptoma de la planta en distintos momentos.

Los resultados del ensayo realizado a campo mostraron mayor reproducibilidad entre muestras y mayor tasa de cambio en la expresión de genes, similar a lo ocurrido con el estudio metabolómico detallado en el Capítulo 2.

El análisis funcional mediante enriquecimiento de categorías funcionales en términos de ontología génica (GO) a través de la metodología de *Gene Set Analysis* reveló un enriquecimiento en categorías funcionales sub-expresadas en relación a las sobre-expresadas (Figura 3.3). Un análisis más detallado (Figura A3.1, Apéndice) mostró principalmente sub-expresión de la actividad catalítica oxidoreductasa con un gran número de genes relacionados a respiración celular, evidenciando una disminución en la actividad mitocondrial durante el progreso de la senescencia; también se observó disminuida la actividad glucosiltransferasa en relación a síntesis de pared celular lo que podría asociarse con la disminución en el crecimiento celular. Entre los genes sobre-expresados se observó enriquecimiento de categorías como regulación de la transcripción y factores de transcripción, resultado que concuerda con un proceso altamente regulado en el cual las distintas etapas se producen de manera ordenada y organizada. Asimismo, se observó sobre-expresión de genes con actividad transferasa de grupos nitrato y fosfato lo cual

denota la activación de las vías de reciclaje de nutrientes. Resultados similares fueron obtenidos en *Arabidopsis* donde se evaluaron los perfiles transcripcionales durante la senescencia en series temporales a fin de evaluar la cronología de los distintos eventos (Breeze y col., 2011).

Con el objetivo de evaluar la funcionalidad de genes de girasol putativamente ortólogos a los genes diferencialmente expresados durante el desarrollo de la hoja reportados como asociados a senescencia en la especie modelo *A. thaliana*, se realizó un análisis mediante búsqueda por similitud de secuencias utilizando la base de datos de genes SAGs (Li y col., 2014). Estos resultados mostraron un gran número de genes sobre-expresados durante el progreso de la senescencia para todas las condiciones evaluadas tanto a campo como en invernáculo. A su vez la mayoría de ellos se encontraban asociados a reciclado de nutrientes, metabolismo de lípidos y proteínas y a la regulación de la transcripción (Figura 3.4). Una característica distintiva durante el proceso de senescencia es la degradación masiva de macromoléculas, tales como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos, para luego ser recicladas y translocadas a regiones de activo crecimiento (Buchanan-Wollaston y Ainsworth, 1997; Feild y col., 2001; Gan, 2003; Gepstein, 2004; Lim y col., 2003; Quirino y col., 2000; Smart, 1994). Genes relacionados a estos procesos, no sólo mostraron un gran número de secuencias estadísticamente significativas, sino que además, la mayoría evidenciaron altos niveles de expresión en relación al resto (Tabla A3.1, Apéndice).

Enzimas relacionadas a la degradación de proteínas, del tipo quinasas, fosfatasa e hidrolasas mostraron altos niveles de expresión. Uno de estos genes candidatos mostró alta similitud de secuencias con una cisteína proteasa, conocido como *SAG12* el cual ha sido ampliamente reportado como asociado a senescencia y es ampliamente utilizado como marcador de avance de dicho proceso. Asimismo los promotores de los genes *SAG12* y *SARK* (del inglés: *Senescence-Associated Receptor Kinase*) han sido utilizados también para regular la expresión del gen *ipt* al inicio de la senescencia, el cual regula la producción de citoquininas (Gan y Amasino, 1995; Medford y col., 1989; Rivero y col., 2010; Rivero y col., 2007; Rivero y col., 2009), induciendo el desarrollo de plantas con un retraso en el fenotipo senescente, así como también, presentando tolerancia a sequía y un incremento en la tasa fotosintética y actividad antioxidante.

Entre las enzimas relacionadas al reciclaje de nutrientes mayormente sobre-expresadas durante el avance de la senescencia, encontramos la enzima glioxilasa I,

la cual se encuentra relacionada a la vía de la glucólisis y gluconeogénesis y ha sido reportada por conferir tolerancia a estrés abiótico en *Brassica juncea* (Veena y col., 1999). La enzima lisina-ketoglutarato reductasa, que también mostró altos niveles de expresión, participa en la degradación de lisina llevando a la producción de ácido glutámico (Tang y col., 1997), el cual puede luego convertirse en glutamina y ser transportado por floema (Lea y Mifflin, 1980; Urquhart y Joy, 1981). Proteínas transportadoras de nitratos, fosfatos y aminoácidos también fueron expresadas en altos niveles, así como genes relacionados al metabolismo de lípidos, carbohidratos y degradación de proteínas, evidenciando un incremento en la tasa de metabolismo celular y reciclado de nutrientes.

Por otro lado, considerando que los factores de transcripción son proteínas clave en la activación y/o represión de las diferentes vías metabólicas que participan durante el proceso de senescencia, se desarrolló una búsqueda de aquellos que se identificaron como diferencialmente expresados durante el desarrollo de la hoja en girasol. Entre las familias de FT que evidenciaron mayores niveles de expresión encontramos, con mayor abundancia, representantes de las familias NAC, MYB y AP2-EREBP (Tabla A3.2, Apéndice), los cuales se encuentran ampliamente estudiados y reportados como posibles candidatos activando el programa de senescencia foliar.

Entre los factores de transcripción de tipo NAC que se detectaron con mayores niveles de transcripción, encontramos genes con alta similitud de secuencia con *ANAC055*, *ANAC019* y *ANAC029* de *Arabidopsis* (AT3G15500, AT1G52890 y AT1G69490 respectivamente). A su vez, los dos primeros, también mostraron altos niveles de correlación con otros FT en el análisis de correlaciones de Spearman (Figura 3.7). *ANAC055* y *ANAC019* pertenecen a un mismo subtipo de genes NAC y tienen patrones de expresión superpuestos (Hickman y col., 2013). Ambos están implicados en las vías de señalización del ácido jasmónico y/o del etileno, en particular en respuesta a patógenos (Bu y col., 2008). *ANAC019* fue postulado como activador de la senescencia con un rol en la biosíntesis de flavonoides y antocianinas, mientras que *ANAC055* podría acelerar la senescencia y parecería estar involucrado en la respuesta a quitina (Hickman y col., 2013).

ANAC029, también llamado *NAC-LIKE ACTIVATED BY AP3/PI (AtNAP)*, también ha sido reportado como activador del proceso de senescencia mediante estudios de sobreexpresión y mutantes (Guo y Gan, 2006).

Dos de los factores de transcripción MYB que mostraron altos niveles de expresión, poseen alta similitud de secuencia con *MYB44* y *MYB73* de *Arabidopsis* (AT5G67300 y AT4G37260 respectivamente). *MYB44* es expresado durante el desarrollo de la planta y especialmente en hojas senescentes, siendo un regulador negativo de ABA, estrés, heridas y senescencia, mediante una función homeostática, manteniendo el crecimiento (Jaradat y col., 2013) y posiblemente inducido por etileno (Liu y col., 2010). *MYB73*, por otra parte, ha sido reportado como inducido por estrés salino y es un regulador negativo de genes sensibles a sal o genes SOS (del inglés: *Salt Overly Sensitive*) (Kim y col., 2013).

Otra familia que mostró varios representantes altamente expresados durante la senescencia en girasol y que a su vez ha sido reportada como asociada a senescencia en especies modelo fue la familia AP2-EREBP (AP2: APETALA2 y EREBP: del inglés *Ethylene-Responsive Element Binding Proteins*). Estos FTs se encuentran presentes sólo en plantas y juegan un papel importante en varios procesos esenciales del desarrollo (Riechmann y Meyerowitz, 1998). Los tres FTs representantes de esta familia que mostraron altos niveles de expresión, poseen alta similitud de secuencia con *ERF104*, *ERF3* y *ERF72* (AT5G61600, AT1G50640 y AT3G16770); hasta el presente estos FT no han sido asociados directamente al proceso de senescencia pero se sabe que esta familia es parte de una red reguladora implicada en la regulación hormonal, por azúcares y señalización redox, frente a distintos estreses abióticos (Dietz y col., 2010).

La familia HB, por su parte, también mostró un gran número de genes diferencialmente expresados. *HAHB4* (AF339748) es un factor de transcripción de girasol de la familia HD-Zip ampliamente estudiado en los últimos años en respuesta a estrés biótico y abiótico (Dezar y col., 2005a; Dezar y col., 2005b; Manavella y col., 2008a; Manavella y col., 2008b; Manavella y col., 2008c); este TF no ha sido detectado mediante el análisis comparativo de secuencias frente a la base de datos de FT pero sin embargo, ha sido detectado mediante la búsqueda en la base de datos de girasol *SUR v.1.0* (Fernandez y col., 2012b) y ha mostrado altos niveles de expresión durante el avance de la senescencia perteneciendo al grupo de los FT mayormente expresados (Tabla A3.2, Apéndice).

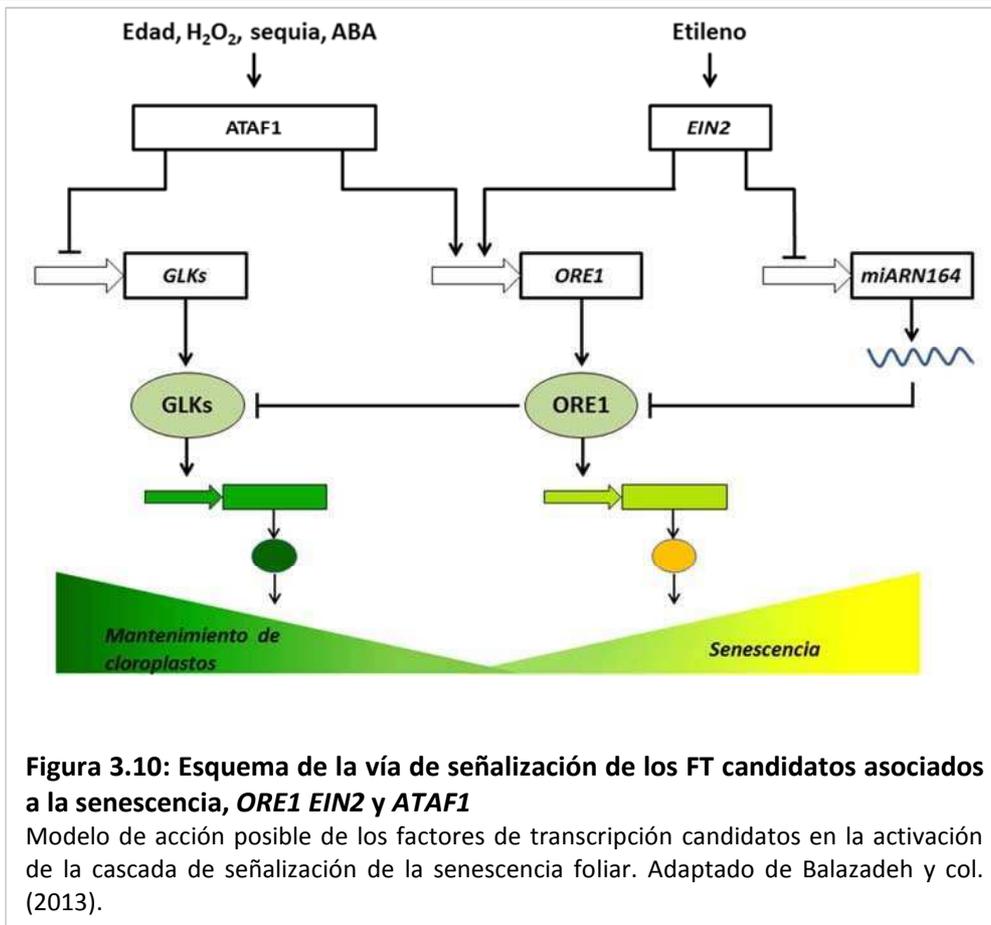
HAHB4 es positivamente regulado por etileno y una vez inducido, regula negativamente la biosíntesis de etileno y a los genes de señalización relacionados (Manavella y col., 2006). Expresiones ectópicas de este gen en *A. thaliana* mostraron una fuerte tolerancia a estrés hídrico y una reducción en la tasa de

crecimiento y desarrollo (Dezar y col., 2005b). Por otro lado HAHB4 participa también en la respuesta a heridas y estrés biótico coordinando la producción de fitohormonas durante la respuesta a estrés y regulando positivamente la producción de ácido jasmónico y etileno y negativamente la sensibilidad al etileno y la acumulación de ácido abscísico (Manavella y col., 2008c).

Entre éstas distintas familias de FTs, una de las más ampliamente reportadas y estudiadas por su efecto en el proceso de senescencia es la familia NAC. A través del análisis de correlación de FTs fue posible detectar altos niveles de correlación entre varios representantes de esta familia, entre ellos, uno con alta similitud de secuencia a *ANAC02* de *Arabidopsis* o también llamado *ATAF1*. Este FT juega un rol importante en los procesos de adaptación a distintos estreses ambientales y en el desarrollo de la planta regulando la síntesis de ABA (Jensen y col., 2013) y la respuesta de defensa frente a distintos tipos de patógenos (Wang y col., 2009), así como también se ha demostrado su participación en las vías de señalización del etileno (Shan y col., 2012).

Por otro lado existe la hipótesis que *ATAF1* estaría actuando río arriba de la vía de señalización de *EIN2* y *ORE1* (Balazadeh y col., 2013) activando la expresión de *ORE1* junto con *EIN2* e inhibiendo la expresión de FTs *GLKs*, los cuales son importantes para el desarrollo y mantenimiento de los cloroplastos. A su vez, se ha demostrado que *ORE1* también participa como antagonista de *GLKs* (Rauf y col., 2013) lo cual complejiza aún más esta red de regulación candidata para la activación del programa de senescencia foliar. La Figura 3.10 muestra en forma esquemática las posibles relaciones entre estos FTs, sin embargo, existen además números genes que podrían estar interactuando en esta vía como intermediarios y/o activando o bloqueando algún paso en particular, lo cual evidencia una compleja red de regulación.

En girasol, mediante qPCR, fue posible estudiar los perfiles de expresión de los genes candidatos *Ha-EIN2* y *Ha-NAC01* y el patrón de expresión del *miARN164* mediante northern blot (Figura 3.8). *Ha-EIN2* mostró un incremento en los niveles de expresión en forma más temprana al incremento transcripcional de *Ha-NAC01*, justo antes del inicio de antesis y de la aparición de los primeros síntomas de senescencia para esta hoja, coincidiendo con el incremento en la tasa de removilización de nutrientes (ver Capítulo 1). Por otro lado, *miARN164* mostró altos niveles de transcritos en los primeros momentos del desarrollo de la hoja y su transcripción comenzó a disminuir hacia la etapa de antesis, cuando la



transcripción de *Ha-NAC01* incrementaba significativamente. Los patrones de expresión de *miARN164* fueron opuestos a *Ha-EIN2* evidenciando la posible función de éste micro ARN en la regulación negativa de este gen (Moschen y col., 2014a). Estos resultados son consistentes con los observados en *Arabidopsis* donde *miARN164* regula negativamente *ORE1* y *EIN2* es sobre-expresado de manera anticipada activando *ORE1* e inhibiendo *miARN164* (Kim y col., 2009) (Figura 3.10).

Los estudios a nivel transcriptómico son sólo una parte de los complejos procesos regulatorios que ocurren a nivel celular, factores como la estabilidad de ARN, la tasa de traducción a proteínas, el procesamiento y estabilidad de las proteínas, las concentraciones de metabolitos y muchos otros factores tienen un rol esencial en la moderación de la actividad celular en una escala más fina (Breeze y col., 2011). Sin embargo, la transcripción juega un papel importante en la regulación de la senescencia, por lo tanto la identificación de redes regulatorias basadas en perfiles de expresión es un punto de partida importante para la detección de factores de control claves en el proceso de senescencia.

En este trabajo fue posible, mediante la utilización de tecnologías de alto procesamiento como el caso de las micromatrices, y a través del estudio de genes candidatos por qPCR, la detección de un gran número de genes sobre y sub-expresados durante el desarrollo de la hoja y evolución del proceso de senescencia.

En particular se observó un gran enriquecimiento de categorías funcionales sub-expresadas con actividad catalítica oxido-reductasa y sobre-expresión de genes con ontologías relacionados a la regulación de transcripción y factores de transcripción así como también de genes con actividad transferasa de grupos nitratos y fosfatos. Sumado a eso, fue posible la detección de numerosos factores de transcripción con altos niveles de expresión en una etapa temprana, antes de los primeros síntomas visibles de senescencia, lo cual podría indicar un rol durante el inicio y/o evolución de este proceso. En particular resultan de interés aquellos pertenecientes a las familias NAC, AP2-EREBP y MYB que son ampliamente citados como asociados a la senescencia en especies modelo. Un estudio más profundo y a un nivel funcional de los distintos factores de transcripción candidatos seleccionados en esta tesis, permitirán la obtención de un análisis más detallado de las posibles vías y redes de regulación de este proceso con un gran impacto en el rendimiento de los cultivos de relevancia agronómica.

A modo de perspectiva, nuevos predictores de genes candidato deberían ser evaluados de manera de obtener una proyección posible del nivel de error de los filtros estadísticos más extendidos en este tipo de análisis (Dalman y col., 2012), de manera de resignificar la posible expresión diferencial de los genes con papel más preponderante en el proceso.

CAPÍTULO 4

**ESTUDIO INTEGRADOR DE DATOS
TRANSCRIPTÓMICOS,
METABOLÓMICOS Y FISIOLÓGICOS
RELACIONADOS A LA SENESCENCIA
FOLIAR EN GIRASOL**

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, el desarrollo de nuevas tecnologías de alto desempeño entre las distintas disciplinas *ómicas* ha dado lugar a un gran volumen de datos transcriptómicos, metabolómicos, proteómicos, fisiológicos y fenotípicos. Sin embargo, los datos emergentes de cada una de las distintas aproximaciones en forma individual deben ser tomados con precaución debido principalmente a la ocurrencia de falsos negativos y positivos en un gran volumen de datos y por otro lado, debido a que una anotación funcional no es suficiente para entender la complejidad de una función génica (Ge y col., 2003). Para cualquier proceso biológico se podría considerar un enfoque modular, en el cual el comportamiento y la función de la red reguladora correspondiente a dicho proceso biológico se estudia en su conjunto, además de estudiar algunos de sus componentes individualmente (Hartwell y col., 1999). Por este motivo, y para incrementar la confiabilidad de los datos y de determinadas funciones génicas, múltiples aproximaciones *ómicas* deben ser integradas en una visión global, llevando al surgimiento de una nueva disciplina denominada biología de sistemas.

El objetivo principal de la biología de sistemas es proveer un nexo entre las distintas disciplinas moleculares en biología, como la genética, biología molecular, metabolómica, bioquímica, enzimología y biofísica, y de otras disciplinas dentro de la biología que estudian a los organismos como la biología celular y la fisiología (Alberghina y Westerhoff, 2005; Bruggeman y col., 2007; Westerhoff y Palsson, 2004). A raíz de ello, es necesario el trabajo conjunto entre la biología molecular, la estadística y la bioinformática para lograr un correcto análisis y comprensión de este gran volumen de datos.

El proceso de senescencia en plantas, es un proceso complejo y se encuentra regulado por múltiples factores tanto endógenos como exógenos incluyendo la edad, estrés biótico y abiótico y distintas fitohormonas. Diferentes señales pueden inducir diferentes grupos de genes (He y col., 2001; Lim y col., 2007; Park y col., 1998; Weaver y col., 1998), los cuales a su vez, pueden iniciar diferentes procesos bioquímicos y fisiológicos. A su vez estos genes pueden estar expresados en respuesta a una señal determinada o ser inducidos frente a varias señales, lo cual hace más complejo el estudio de este proceso.

Una vez que el programa de senescencia es iniciado, se producen importantes cambios altamente regulados en la expresión génica que llevan a un incremento en

la tasa de metabolismo y degradación de macromoléculas como clorofilas, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, una relocalización de nutrientes, la degradación de organelas y en última instancia, la muerte celular (Buchanan-Wollaston y col., 2003; Gan, 2003; Gepstein y col., 2003; Guo y Gan, 2005; Lim y col., 2007; Quirino y col., 2000). En consecuencia, se trata de un proceso de naturaleza compleja y dinámica, por lo que abordar estudios a un nivel de biología de sistemas es clave para un mejor entendimiento de este proceso (Guo, 2013).

Actualmente existen pocos trabajos integradores de diferentes disciplinas para el estudio del proceso de senescencia. Guo y Gan (2012), a través de una aproximación de biología de sistemas, determinaron que los perfiles de expresión durante el desarrollo de la hoja en condiciones naturales y frente a 27 diferentes tratamientos inductores de senescencia difieren significativamente en etapas tempranas, pero son considerablemente similares durante los últimos estadios del desarrollo, cuando ya existe un fenotipo visible de senescencia, lo cual indica que aunque existan diferentes señales que llevan al inicio del programa de senescencia, pueden hacerlo a través de diferentes vías, pero comparten eventos de regulación y ejecución comunes, una vez iniciado.

A partir de la información disponible en la base de datos de genes asociados a senescencia, *Leaf Senescence Database* (Li y col., 2014), Li y col. (2012), a través de una aproximación de biología de sistemas, han desarrollado un estudio donde se construyeron modelos de redes de genes con el objetivo de encontrar reguladores comunes al proceso de senescencia en *A. thaliana*, utilizando tanto genes promotores como inductores de este proceso. Estos resultados mostraron que hormonas como citoquininas, auxinas, óxido nítrico, y otras pequeñas moléculas como Ca^{2+} retrasan la senescencia, mientras que el etileno, ABA, SA y pequeñas moléculas como el oxígeno, promueven el proceso de senescencia.

Por otro lado, la anotación funcional automática sigue siendo relevante y no resuelta, aún para especies profundamente analizadas como los organismos modelo (Klie y Nikoloski, 2012). En el caso de *Arabidopsis*, con aproximadamente 27.000 genes, sólo la mitad pudo ser anotado funcionalmente basado en la similitud con genes conocidos, mientras que sólo un 13% de los mismos pudo ser experimentalmente confirmado (Lamesch y col., 2012). En la biología de plantas existen dos ontologías de uso prioritario: Gene Ontology (GO) y MapMan. Mientras GO se originó de manera independiente al interés de un organismo en particular, Mapman fue desarrollado específicamente para la anotación funcional

de *Arabidopsis*, aunque luego fue extendido a maíz (Doehlemann y col., 2008), *Medicago* (Tellstrom y col., 2007), tomate (Urbanczyk-Wochniak y col., 2006) y papa (Rotter y col., 2007).

Estudios integradores de perfiles transcripcionales y metabólicos durante la senescencia han sido desarrollados en maíz (Sekhon y col., 2012) donde fue posible revelar redes de regulación involucrando genes SAGs ya conocidos, así como también nuevos genes candidato detectados para esta especie.

Actualmente existen varias metodologías bioinformáticas de agrupamientos de genes según sus perfiles de expresión o *clustering* pero muy pocos permiten organizar los datos de una manera simple para el usuario y fácil de interpretar en un contexto de procesos biológicos.

El programa Mapman (Thimm y col., 2004) es una herramienta muy útil para el análisis de un gran número de datos provenientes de análisis transcriptómicos y metabolómicos. Este programa consiste en módulos que colectan y clasifican los parámetros medidos (transcriptómicos y/o metabolómicos) dentro de un set de categorías funcionales jerárquicas o *Bin code* preestablecidas en una colección que contiene 34 códigos binarios en estructura de árbol que utiliza el programa para luego ser graficadas en distintos diagramas, tanto de metabolismo general como diagramas más específicos de vías metabólicas particulares. Mapman tiene la ventaja de ser muy simple y versátil de utilizar y permite al usuario editar sus propias vías metabólicas a partir del conocimiento previo de las categorías funcionales en la colección.

Otro programa utilizado para análisis de integración de datos provenientes de análisis transcriptómicos y metabolómicos es el programa Paintomics (García-Alcalde y col., 2011). Paintomics es un programa de interface web que permite la integración de datos en las vías metabólicas de la librería *KEGG* (del inglés: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, <http://www.genome.jp/kegg/>). Este programa tiene la desventaja de no presentar los resultados de una forma general en los distintos procesos biológicos, sino que ilustra vías de señalización muy específicas para cada una de las distintas rutas metabólicas. Sin embargo, es muy útil cuando se quiere estudiar vías de señalización o procesos biológicos específicos, en determinados análisis.

En los últimos años se ha incrementado significativamente el número de publicaciones en biología de sistemas, integrando datos de diferentes *ómicas*, donde las regulaciones génicas y las interacciones entre genes identifican nuevas preguntas

para formular con datos de expresión existentes (Bleda y col., 2012; Lin y col., 2013). La recopilación de datos procedentes de múltiples recursos permite el desarrollo de modelos más complejos e integrales. Diferentes aproximaciones de biología de sistemas como la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica podrán complementarse entre sí para abordar cuestiones más complejas como la regulación de la movilización de nutrientes durante la senescencia foliar. Las limitaciones actuales en estudios proteómicos y metabolómicos hacen difícil un análisis de la senescencia a nivel de biología de sistemas (Guo, 2013). Las mejoras en las tecnologías de análisis de las distintas *ómicas*, sumado a la información disponible de los distintos genomas ya secuenciados y al incremento en la cantidad de programas bioinformáticos para el análisis de datos a gran escala, permitirán en los próximos años obtener una mejor visión de las diferentes vías de señalización durante la activación y el progreso de la senescencia foliar frente a condiciones naturales, así como también en respuesta a distintos tipos de estreses.

El objetivo principal de este Capítulo fue el desarrollo de un análisis integrador de los cambios transcripcionales y metabólicos y su relación con las variables fisiológicas asociados al proceso de senescencia en girasol para identificar los procesos biológicos y vías de señalización significativas durante el avance del proceso y determinar así posibles indicadores moleculares o biomarcadores asociados al mismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de los análisis estadísticos realizados para los estudios transcriptómicos y metabolómicos se generaron tablas con los datos de expresión de genes y metabolitos diferencialmente expresados en condiciones naturales, tanto en ensayos de campo como invernáculo para ser incluidas en los programas Mapman y Paintomics, con el objetivo de integrar ambos análisis. Se utilizaron las tasas de cambio T1-T0 y T2-T0 como datos de entrada para cada uno de los programas bioinformáticos.

Análisis de integración utilizando el programa Mapman

Con el objetivo de utilizar este programa con datos provenientes de girasol fue necesario adaptar la colección de datos para esta especie.

A partir de la base de datos de girasol que contiene aproximadamente 41.000 unigenes se realizó la anotación funcional y asignación de *Bin code* para cada uno de ellos y se creó la colección con todos los genes anotados.

El resultado de esta anotación funcional fue la creación de una tabla que contiene información del *Bin code* asociado para cada unigen y metabolito, el nombre del gen y una columna con descripción donde se informa el grado de similitud frente a un determinado gen de *Arabidopsis* con su identificador y una descripción del mismo. Esta tabla fue luego añadida al programa y utilizada como librería para luego identificar y mapear los unigenes significativos en las distintas vías metabólicas.

Análisis de integración utilizando el programa Paintomics

Para utilizar este programa es necesario contar con los identificadores de los genes en los mapas de KEGG o en el caso de *Arabidopsis* es posible utilizar los identificadores de los genes.

A raíz de ello, y considerando que girasol no posee anotación funcional de genes en mapas de KEGG, se utilizaron los identificadores de los genes de *Arabidopsis* que contenían alta similitud con los unigenes de girasol. A partir de la anotación funcional realizada para Mapman, se utilizó esa información para asignar un identificador de *Arabidopsis* a cada unigen de girasol y de este modo poder utilizar el programa.

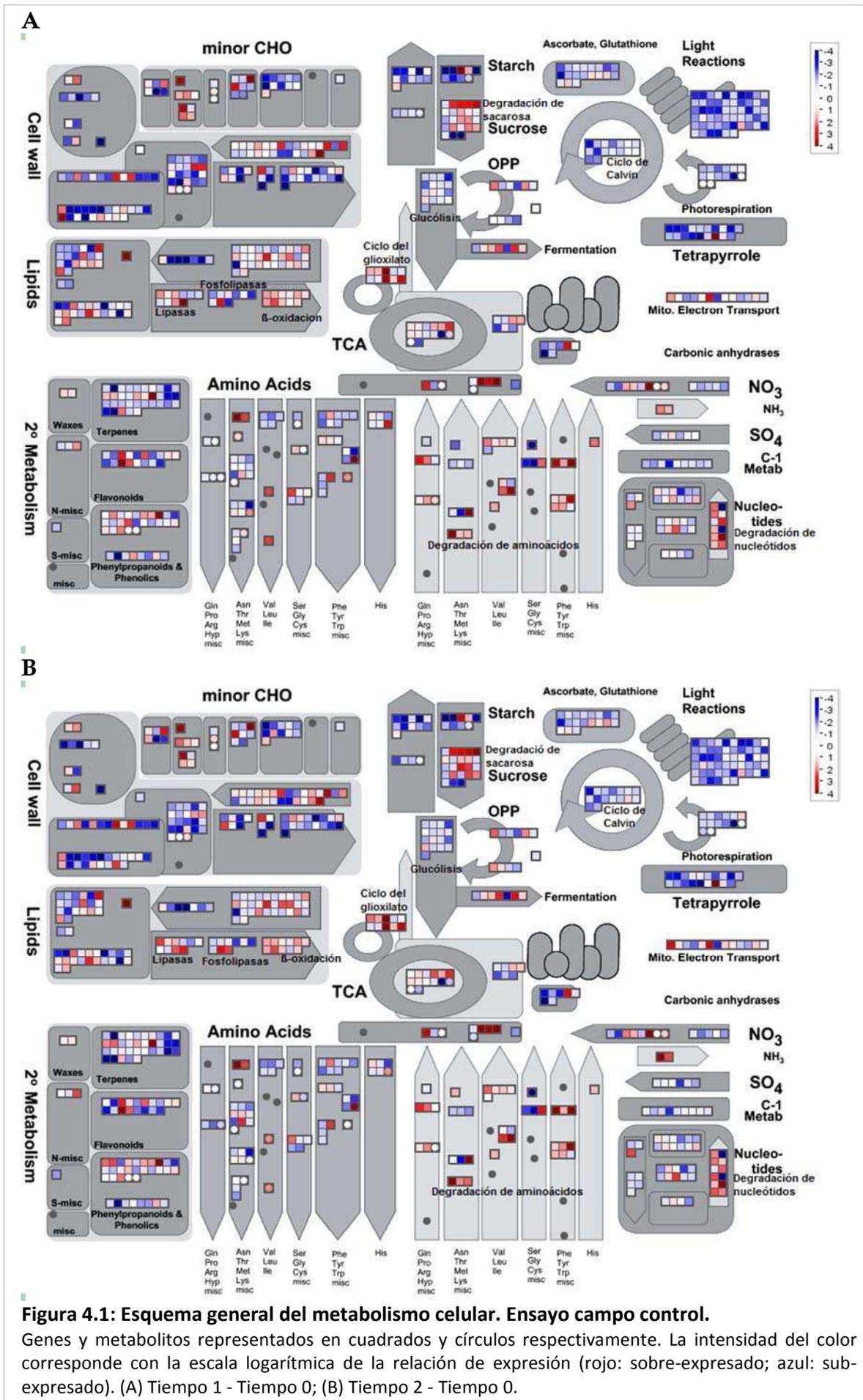
Al igual que en el programa Mapman, los datos de entrada fueron los unigenes y metabolitos con cambios estadísticamente significativos.

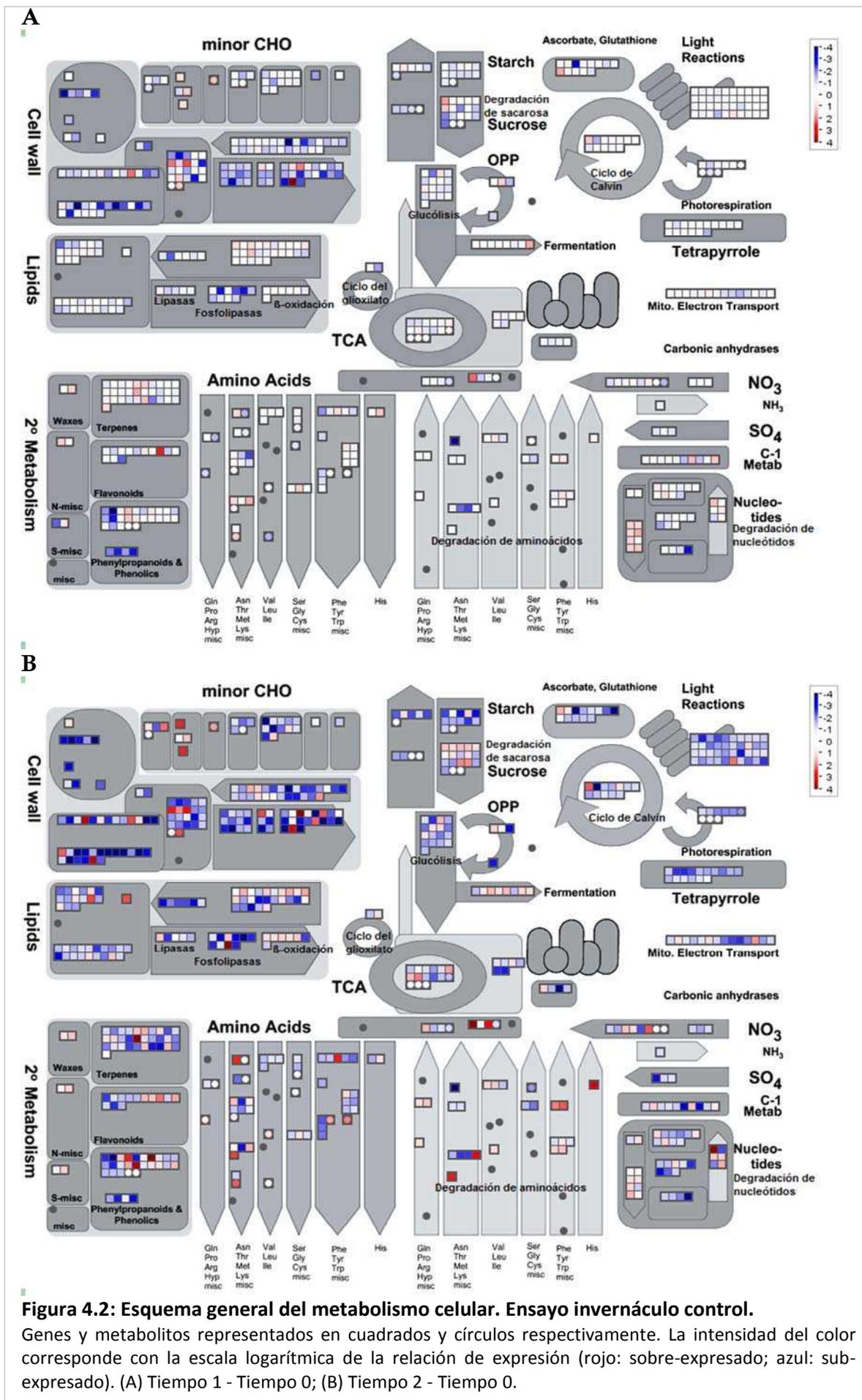
RESULTADOS

Utilizando el programa Mapman, fue posible obtener una imagen general del metabolismo celular de la planta durante la senescencia, a partir de los datos transcriptómicos y metabolómicos. Las Figuras 4.1 y 4.2 muestran la integración de los datos para los tiempos 1 y 2 (T1-T0 y T2-T0) en las condiciones control (senescencia natural) tanto de campo como de invernáculo, respectivamente. En estas imágenes se grafica la tasa de cambio en escala logarítmica (\log_2), donde cada símbolo cuadrado corresponde a un gen y cada símbolo circular a un metabolito.

Ambos ensayos mostraron un patrón de procesos de sobre- y sub-expresión similares, la diferencia radicó principalmente en una mayor o menor tasa de cambio en los datos a campo, lo cual hizo más evidente y fácil la interpretación de los resultados derivados de ese ensayo. En invernáculo, en el tiempo 1 (T1-T0), los niveles de expresión fueron bajos en relación al tiempo 2 (T2-T0); en el ensayo a campo, por otro lado, esta diferencia fue menor y ya en el tiempo 1 se encontraron valores elevados de expresión para la mayoría de los genes detectados.

Esta visión global del metabolismo permitió detectar los procesos biológicos más importantes que estarían sucediendo durante la senescencia. En todas las condiciones evaluadas se pudo observar una disminución en los niveles de expresión de genes y metabolitos relacionados a los procesos de fotosíntesis, fotorrespiración, ciclo de ascorbato-glutación relacionado a mecanismos antioxidantes de defensa y genes asociados a glucólisis. Genes relacionados a la degradación de sacarosa, por su parte se mostraron sobre-expresados mientras que en concordancia con ello, los metabolitos de estas rutas metabólicas se mostraron sub-expresados. Por otro lado, aquellos genes relacionados a la síntesis de sacarosa y almidón presentaron bajos niveles de expresión. También se observaron altos niveles de expresión de genes relacionados a las vías de degradación de lípidos y del ciclo del glioxilato, genes relacionados a la degradación de nucleótidos y aminoácidos, así como también genes relacionados al reciclado de nutrientes.

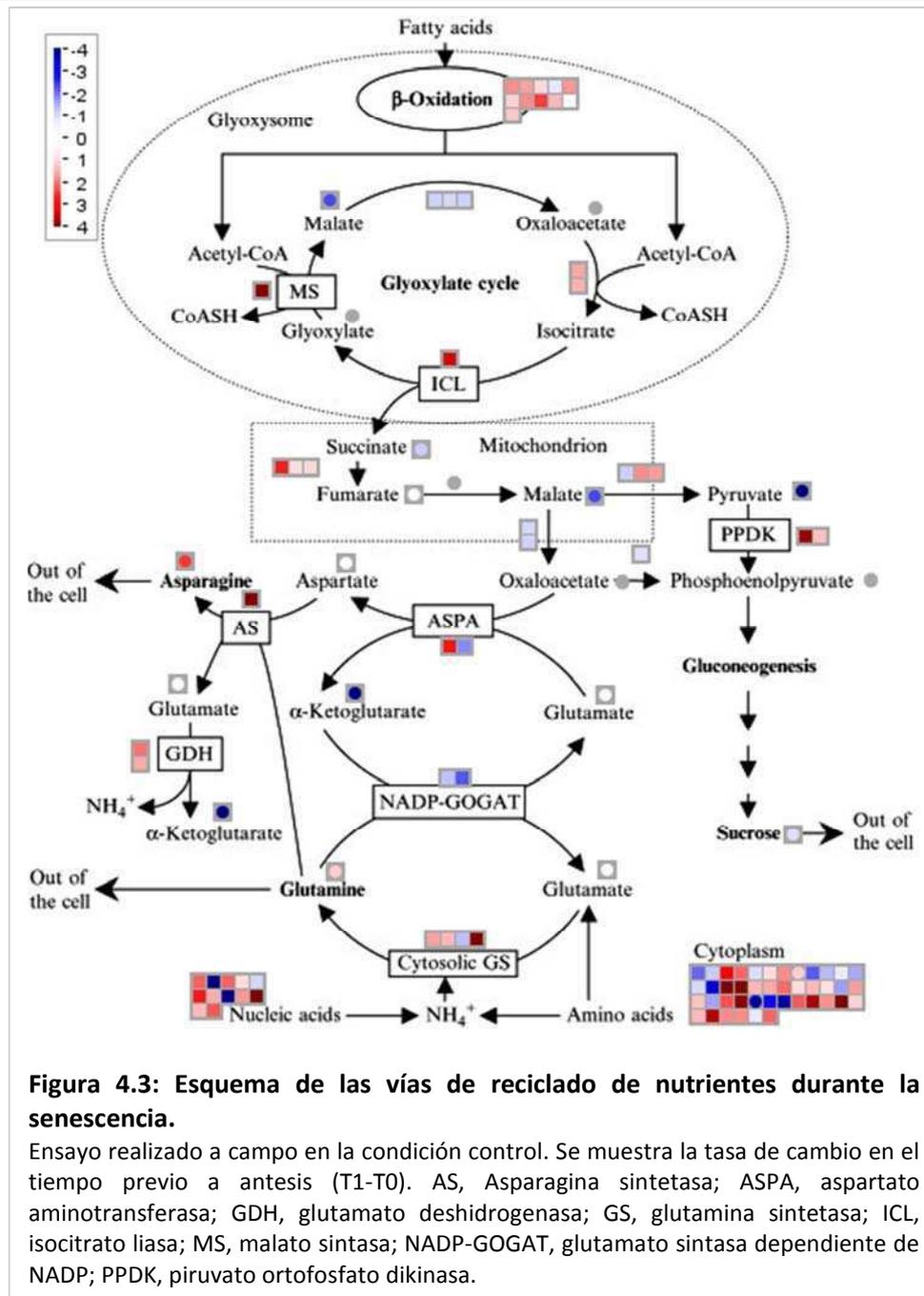




Estos resultados evidenciaron un gran incremento en la tasa y regulación del metabolismo de macromoléculas y del reciclado de nutrientes durante el desarrollo de la hoja, que podrían ser relevantes para un progreso ordenado del proceso de senescencia foliar.

Con el objetivo de evaluar las principales vías metabólicas relacionadas al reciclado de nutrientes durante el proceso de senescencia, se adaptó una imagen tomada de Guo y Gan (2005) para volcar los resultados derivados a este programa. La Figura 4.3 grafica de manera esquemática las principales vías de señalización del proceso de reciclado de nutrientes que ocurrió durante la etapa temprana de la senescencia natural, en el experimento de campo (campo-control T1-T0).

En un tiempo previo a anthesis, antes de la aparición de los primeros síntomas de senescencia para esta hoja (Figura 1.6 A), se pudo observar un incremento en la expresión en los genes relacionados al reciclaje de nutrientes. Algunos genes relacionados a la beta-oxidación de ácidos grasos y al ciclo del glioxilato mostraron altos niveles de expresión; entre ellos las enzimas malato sintasa e isocitrato liasa fueron las que mayor tasa de cambio evidenciaron. Por otro lado, también se observó sobre-expresión de genes relacionados a la degradación de aminoácidos y ácidos nucleicos que conducen a la formación de amonio como sustrato de la enzima glutamina sintasa, la cual además mostró altos niveles de expresión, llevando luego a la formación de glutamina como aminoácido de transporte. La enzima asparagina sintetasa, por su parte, también presentó elevados niveles de expresión en una etapa temprana en el progreso de la senescencia, involucrada en la producción de asparagina como aminoácido móvil en el transporte de nutrientes; el glutamato liberado de esta reacción es luego utilizado por la glutamato deshidrogenasa que también presentó una sobre-expresión, llevando a la producción de amonio, retroalimentando el ciclo de reciclado.



A fin de evaluar en detalle las distintas vías metabólicas más importantes y mayoritariamente representadas por el número de genes y/o metabolitos presentes en cada una de ellas, se utilizó el programa Paintomics. Las Figuras 4.4 a 4.10 muestran la integración de los datos para los tiempos 0, 1 y 2 (T0-T0; T1-T0 y T2-T0) en las condiciones de campo control (senescencia natural). Del mismo modo, en estas imágenes se representa la tasa de cambio en escala logarítmica (log₂), donde cada símbolo se encuentra dividido en tres, representando los tres tiempos de estudio. La intensidad del color corresponde a la escala logarítmica de la relación de expresión (rojo: sobre-expresado; azul: sub-expresado).

Las Figuras 4.4 y 4.5 ilustran las vías de señalización pertenecientes al proceso de fotosíntesis y fijación de carbono respectivamente, en ambos casos se puede observar una sub-expresión de estos procesos a medida que avanza el desarrollo de la hoja, evidenciando una desaceleración de la actividad fotosintética durante la senescencia. Seguido a ello, los procesos de glucólisis también se mostraron sub-expresados (Figura 4.6), donde tanto genes como metabolitos mostraron bajos niveles durante el desarrollo de la hoja. Sin embargo, se observaron altos niveles de expresión en enzimas relacionadas a la degradación de sacarosa (Figura 4.7) (no así para genes relacionados a la degradación de almidón), indicando que la producción de glucosa durante esta etapa estaría gobernada principalmente por el metabolismo de sacarosa debido a la fuerte disminución de la actividad fotosintética. Por otro lado, la disminución en la producción y el metabolismo de glucosa para la producción de energía estaría compensada además, por la degradación de ácidos grasos, proceso que evidenció estar incrementado durante la senescencia (Figura 4.8). El producto final de la degradación de ácidos grasos es la producción de Acetil-CoA que actúa como sustrato de entrada al ciclo de los ácidos tricarboxílicos, así como también en el ciclo del glioxilato, cuyas enzimas también mostraron altos niveles de expresión (Figura 4.3).

Con respecto a la degradación de proteínas (Figura 4.9) se observó un incremento en la expresión de genes asociados a los procesos de ubiquitinación tanto en el complejo asociado al retículo endoplasmático como en el citoplasma, evidenciando un incremento en la actividad de los proteasomas.

Adicionalmente, y considerando además que este proceso se encuentra regulado por los distintos niveles hormonales, se analizaron las distintas vías de señalización hormonal durante la senescencia (Figura 4.10). Se pudo observar una caída en la expresión de genes relacionados a respuesta a auxinas posiblemente relacionado a la disminución en la tasa de crecimiento y desarrollo foliar, mientras que genes de respuesta a giberelinas y brasinoesteroides se mostraron sobre expresados durante el desarrollo de la hoja. Genes de respuesta a la hormona etileno por su parte, mostraron altos niveles de expresión a medida que avanza el proceso de senescencia, ejerciendo posiblemente una fuerte influencia en la activación y progresión del proceso.

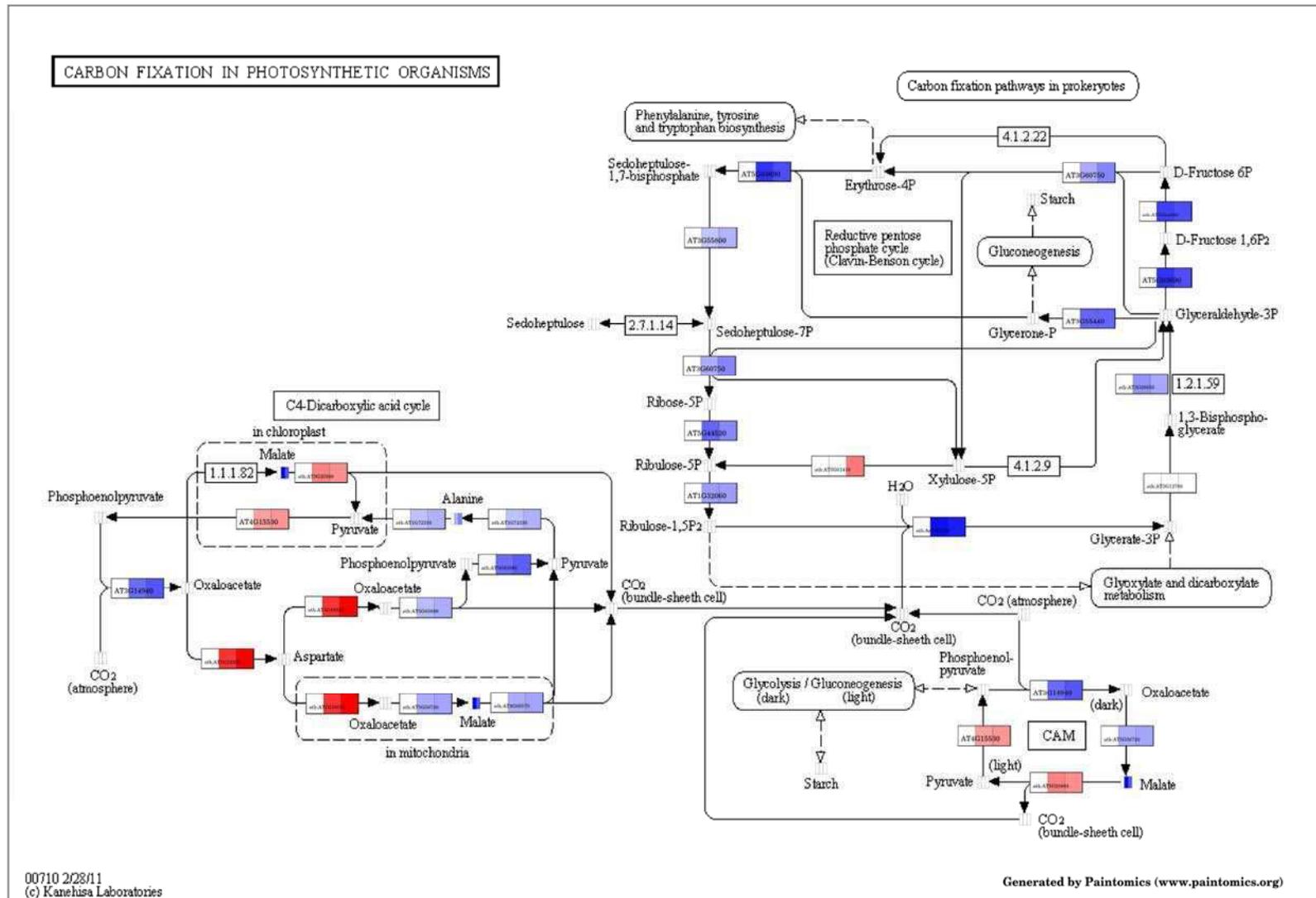


Figura 4.5: Vías metabólicas relacionadas a la fijación del carbono en organismos fotosintéticos.

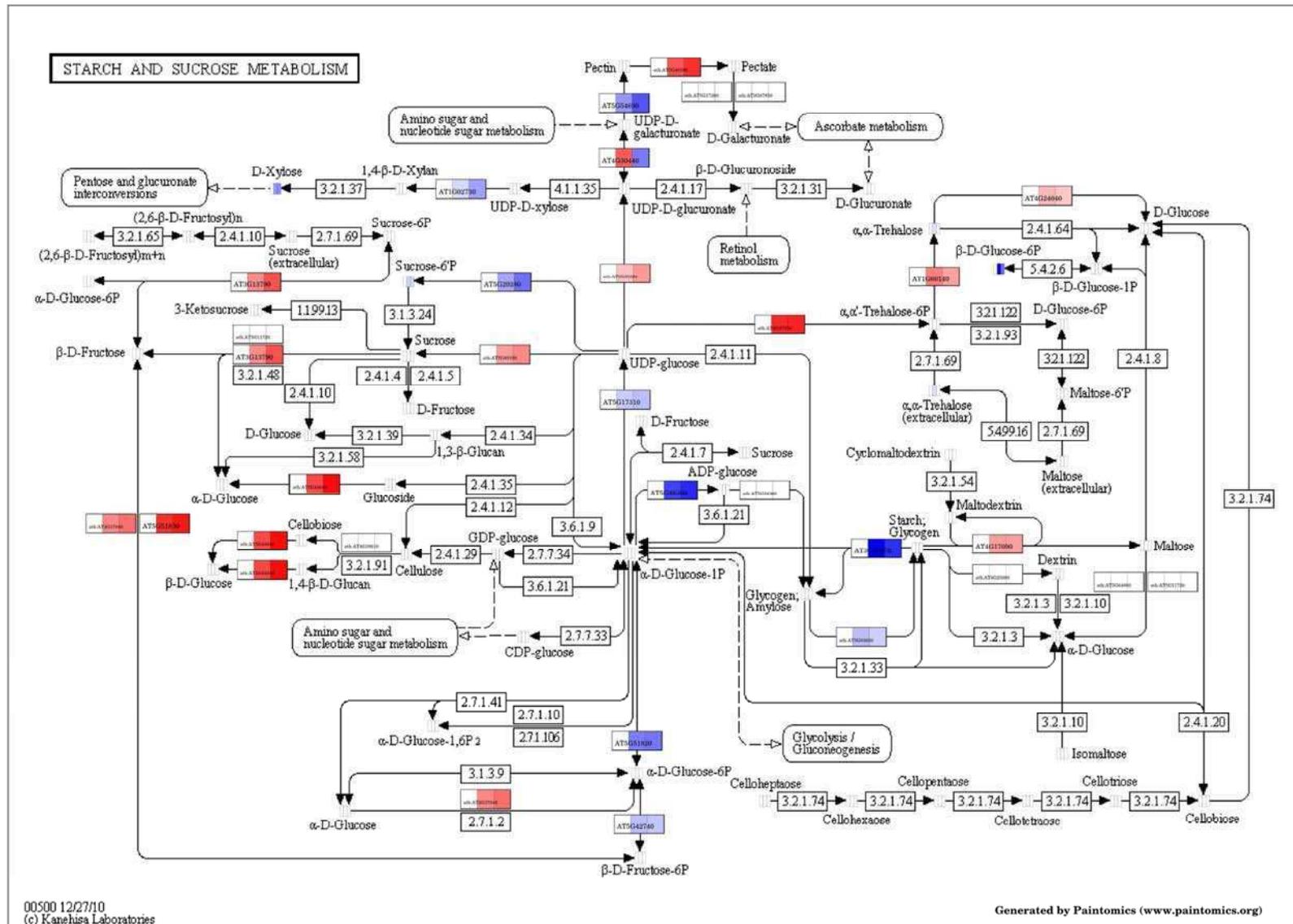


Figura 4.7: Vías metabólicas relacionadas a metabolismos de almidón y sacarosa.

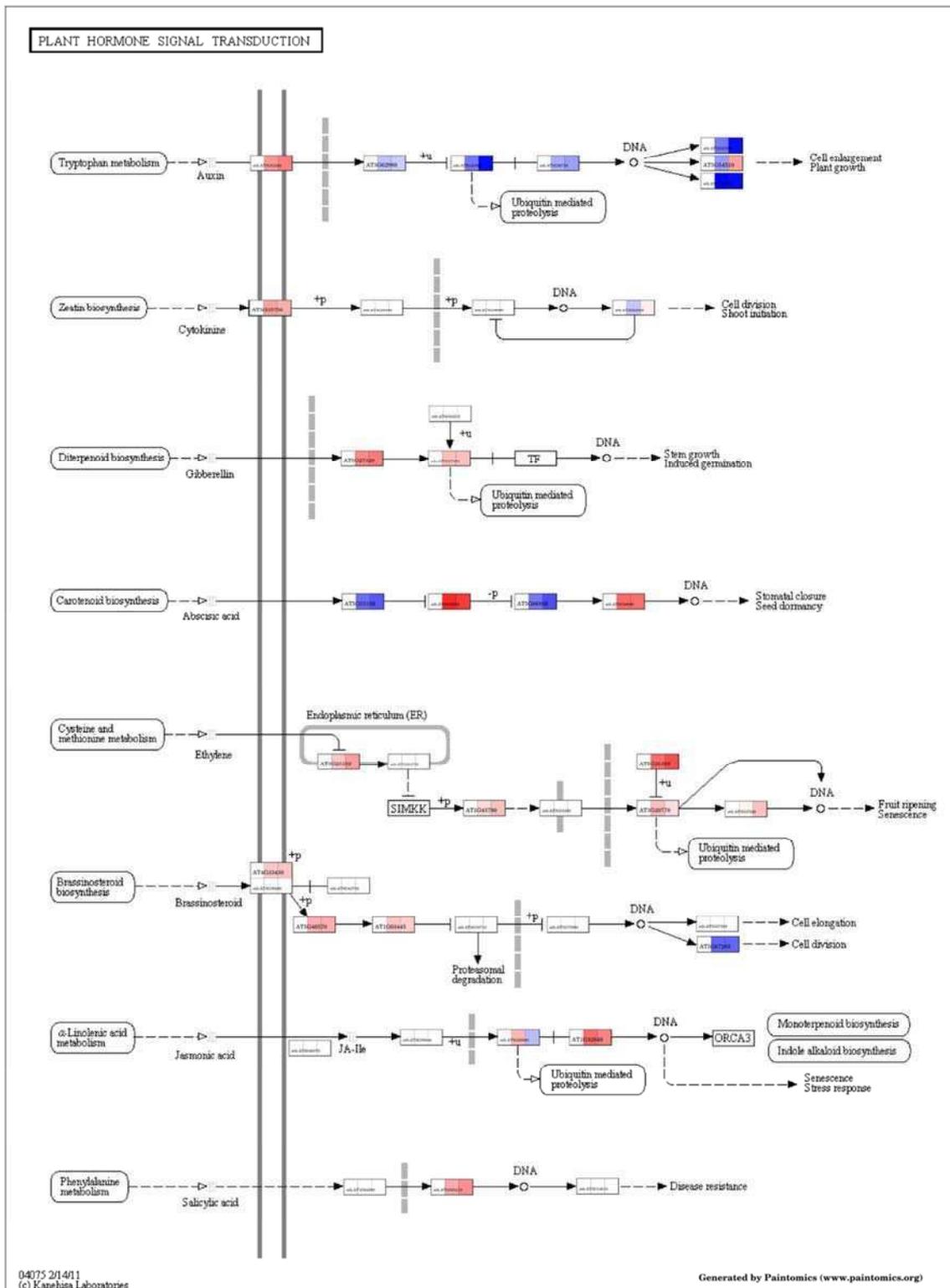


Figura 4.10: Vías metabólicas relacionadas a transducción de señales en respuesta a fitohormonas.

DISCUSIÓN

Al estudiar procesos celulares como la senescencia foliar, la biología molecular tradicional se centra en moléculas individuales como ácidos nucleicos, proteínas, y metabolitos, mientras que la biología de sistemas intenta ver la dinámica y la integración de muchos de los componentes moleculares asociados a su vez a respuestas fisiológicas. En los últimos años, con los avances tecnológicos sumados a la disminución en los costos en las tecnologías moleculares de alto rendimiento, ha escalado la obtención de grandes volúmenes de datos, lo cual hizo necesario el desarrollo de nuevos programas, herramientas bioinformáticas y metodologías de análisis para interpretar dichos datos en un nivel de procesos biológicos.

La senescencia en plantas es un mecanismo de naturaleza compleja y dinámica, por lo cual es necesario un estudio a nivel de biología de sistemas para un mejor entendimiento de este proceso (Guo, 2013).

En los cultivos anuales, luego de la floración, se induce el proceso de senescencia en la planta entera. Los nutrientes foliares, productos del metabolismo de macromoléculas, son removilizados y translocados hacia el fruto, produciendo en última instancia la muerte celular, por lo cual se trata de un proceso controlado estrechamente por el desarrollo de las estructuras reproductivas (Davies y Gan, 2012; Gregersen y col., 2013).

Al evaluar ecofisiológicamente el cultivo de girasol en condiciones naturales de crecimiento a campo (Capítulo 1), se pudo observar una fuerte disminución de área foliar verde (Figura 1.3A), contenido de clorofila (Figura 1.6) y nitrógeno (Figura 1.8) luego de floración, mientras que un retraso en la tasa de degradación de estos nutrientes fue observado en la condición de decapitado, lo cual reflejó la fuerte presión de las relaciones fuente-destino que gobiernan el inicio de la senescencia en especies monocárpicas (Davies y Gan, 2012). Distintos tipos de estreses, como por ejemplo el déficit hídrico, llevan a una disminución del área foliar y/o a una aceleración de la senescencia (dependiendo del momento en el cual se produce el estrés) implicando un menor rendimiento (Figura 1.5), por lo cual la asociación entre senescencia, área foliar fotosintéticamente activa y rendimientos de los cultivos es un punto importante y objetivo de estudio en muchas especies de importancia agronómica.

La relación entre senescencia y productividad es compleja. Un beneficio para la productividad mediante un retraso en la senescencia tiene que ser coordinado con las fases tempranas del desarrollo, en particular, el momento de la floración, que marca el inicio de la fase de crecimiento reproductivo. Por lo tanto, la asociación entre la duración de la senescencia (o la longitud de la fase de crecimiento reproductivo) y el rendimiento puede ser confundida por los efectos de la época de la floración (Gregersen y col., 2013).

Mientras un número de estudios ha fallado en demostrar la conexión entre senescencia y productividad, se ha encontrado en los últimos años un incremento en el número de reportes en diferentes especies, utilizando mutantes y líneas transgénicas en las cuales un retraso en la senescencia, impacta positivamente en la productividad (Gregersen y col., 2013). Esta característica es conocida como fenotipo *stay-green* funcional (Kusaba y col., 2013). En el caso de girasol, se ha demostrado una asociación positiva entre retraso en la senescencia e incremento en la productividad en distintos materiales híbridos comerciales. Para lograr éste efecto, el fenotipo *stay-green* debe ser combinado con otros atributos como tiempo de anthesis y duración del llenado del grano con el fin de contribuir de manera eficiente a la producción (De la Vega y col., 2011).

El desarrollo de la hoja tiene tres etapas principales, una fase de expansión, una fase de madurez y una fase de senescencia (Guiboileau y col., 2010). Durante la fase de madurez, la hoja está sujeta a diferentes señales ambientales y fisiológicas que pueden modificar el momento de inicio de la fase de senescencia. Sin embargo, a pesar de que múltiples mecanismos pueden inducir el proceso de senescencia de manera temprana a través de diferentes vías de señalización, el desarrollo del proceso una vez iniciado parecería ser similar a pesar de ser inducido por caminos diferentes (Guo y Gan, 2012).

Los estudios realizados a nivel transcripcional y metabólico en hojas de girasol, permitieron detectar importantes cambios en el metabolismo en una etapa temprana del desarrollo, previa a anthesis y antes de la manifestación de los primeros síntomas de senescencia evaluados fisiológicamente. En un tiempo post-anthesis, el patrón de los cambios detectados y procesos biológicos observados fueron similares a los de la etapa temprana, la principal diferencia radicó en la mayor expresión tanto de genes como metabolitos asociados a los distintos procesos del metabolismo celular (Figura 4.1 y 4.2).

El primer efecto observado durante el proceso de senescencia fue una disminución de la actividad fotosintética; genes y metabolitos claves de este proceso fueron encontrados sub-expresados en etapas tempranas del desarrollo de la hoja (Figura 4.4 y 4.5). La disminución en la tasa de fotosíntesis impacta directamente en el metabolismo de azúcares, los cuales han sido reportados como reguladores de tasa fotosintética mediante procesos de retroalimentación (Wingler y col., 1998). Sin embargo, el efecto de los azúcares sobre el proceso de senescencia es controversial y difiere según las especies estudiadas (Nooden, 1988; van Doorn, 2004; Wingler y col., 2009; Yoshida, 2003). En este estudio se pudo observar una disminución de los niveles de azúcares durante la senescencia. Sumado a ello y como dato adicional, al evaluar fisiológicamente la hoja 20, una hoja joven de la planta de girasol, en un tratamiento de decapitado en el cual, para esta hoja, el tratamiento fue en etapas tempranas de su desarrollo, se pudo observar una acumulación importante de azúcares hacia los últimos estadios del desarrollo, produciendo un retraso en el fenotipo senescente. En este caso a diferencia de *Arabidopsis* donde la acumulación de azúcares induce senescencia (Watanabe y col., 2013; Wingler y col., 2009), en girasol parecería observarse un efecto opuesto.

Genes relacionados a procesos de degradación de sacarosa, como por ejemplo distintas fructoquinazas e invertasas de pared celular, vacuolares y neutras fueron encontrados en altos niveles de expresión, lo cual indicaría que la falta de glucosa como producto de la fotosíntesis para la producción de energía, estaría suplementada por la hidrólisis de sacarosa.

Genes asociados al metabolismo de lípidos, por su parte, también fueron encontrados en altos niveles de expresión (Figura 4.8), especialmente relacionados a la beta-oxidación, proceso que culmina con la producción de acetil-CoA, que además de actuar como sustrato en el ciclo de los ácidos tricarbónicos actúa como sustrato de la enzima malato sintasa, una de las enzimas que mayor niveles de expresión presentó en estos análisis. Enzimas clave del ciclo del glioxilato, como las enzimas isocitrato liasa y malato sintasa, fueron encontradas con una mayor actividad en etapas tempranas del proceso de senescencia en hojas de cebada (Gut y Matile, 1988) y pepino (Graham y col., 1992) indicando un rol en el reciclado de carbono durante la senescencia. Sin embargo, en *Arabidopsis* el ciclo del glioxilato no juega un papel importante en el reciclado de nutrientes (Charlton y col., 2005) y la expresión de la malato sintasa mostró estar restringida específicamente a

plántulas jóvenes y las puntas de las raíces de las plantas más viejas, en hojas senescentes no se detectó expresión tanto de malato sintasa como de isocitrato liasa.

Un componente crítico asociado al proceso de senescencia es la degradación de proteínas (Roberts y col., 2012). Genes asociados a los procesos de procesamiento de proteínas, ubiquitinación y degradación, también presentaron altos niveles de expresión durante la senescencia, mientras que se observó una sub-expresión en genes asociados a glicosilación de proteínas (Figura 4.9). Enzimas proteasas han sido identificadas con abundantes niveles de expresión en hojas senescentes en distintas especies (Desclos y col., 2009; Schiltz y col., 2004), y muchas de ellas se encuentran reportadas como genes SAGs. En girasol, los genes que codifican para varias de estas enzimas mostraron altos niveles de expresión durante el desarrollo de la hoja (Tabla A3.1, Apéndice), entre ellas proteínas kinasas y fosfatasa, *SAG12*, una cisteín-proteasa ampliamente reportada en estudios de senescencia y utilizada como marcador de avance de este proceso y proteínas F-box, las cuales median la ubiquitinación de proteínas, marcándolas para su degradación en el proteasoma. Adicionalmente, chaperonas como Hsp70 y Hsp90 (del inglés *Heat shock protein*) mostraron elevados niveles de expresión en girasol (Figura 4.9) y han sido reportadas como asociadas a senescencia jugando un rol en la protección de proteínas frente a la desnaturalización (Desclos y col., 2009; Schiltz y col., 2004).

Enzimas clave del reciclado de nutrientes como la asparagina sintetasa y la glutamina sintasa y los metabolitos asociados asparagina y glutamina, principales aminoácidos móviles involucrados en el transporte de nitrógeno (Buchanan-Wollaston y col., 2003) mostraron valores elevados durante el desarrollo de la hoja (Figura 4.3) evidenciando una fuerte actividad de reciclaje ya en las etapas tempranas del desarrollo previo a los primeros síntomas.

El rol de las distintas fitohormonas ha sido investigado durante la senescencia natural e inducida frente a distintos tratamientos (Breeze y col., 2011; Lim y col., 2007; Quirino y col., 2000). Sin embargo, es difícil dilucidar cómo las diferentes hormonas regulan el inicio y la progresión de la senescencia foliar, ya sea afectando directa o indirectamente el programa de desarrollo (Jibrán y col., 2013).

Entre las hormonas más importantes y de mayor impacto directo en el proceso de senescencia encontramos la hormona etileno, la cual juega un rol relevante en el crecimiento y desarrollo vegetal y su asociación con el proceso de senescencia ha

sido ampliamente reportada (Lim y col., 2007) actuando además, en conjunto con otras hormonas, regulando el avance de la senescencia de manera dependiente de la edad de desarrollo (Schippers y col., 2007). En girasol se pudo observar un incremento en la expresión de aquellos genes asociados a las vías de señalización de esta hormona (Figura 4.10). Sumado a ello, los genes candidatos *Ha-EIN2* y *Ha-NAC01*, evaluados en el Capítulo 3, y que se encuentran asociados a las vías de señalización de esta hormona, también mostraron altos niveles de expresión a medida que avanza el progreso de la senescencia, lo cual remarcaría la acción de estas vías de señalización iniciando y/o regulando el progreso de la senescencia en girasol, puntualizándolos como importantes genes candidato.

Genes de respuesta a brasinoesteroides, ácido jasmónico y ácido salicílico también mostraron altos niveles de expresión a medida que progresa el desarrollo de la hoja, mientras que aquellos genes de respuesta a auxinas se vieron sub-expresados mostrando una posible acción de estas vías de señalización en la regulación del progreso de la senescencia. Sin embargo, las vías de señalización en respuesta a giberelinas y ácido abscísico no mostraron un patrón de expresión muy claro, con patrones contradictorios dentro de cada vía en relación al proceso.

Una característica importante del desarrollo del proceso de senescencia es la activación de un gran número de factores de transcripción (Balazadeh y col., 2008) los cuales juegan un rol importante en la activación y/o inhibición de los distintos procesos que gobiernan el inicio y avance de la senescencia, especialmente aquellos pertenecientes a las familias NAC, AP2/EREBP, WRKY, MYB, C2H2 zinc-finger, y bZIP los cuales han sido mayormente reportados en asociación con este proceso (Balazadeh y col., 2008; Breeze y col., 2011; Buchanan-Wollaston y col., 2005). En girasol, mediante un análisis transcriptómico de micromatrices fue posible la detección de un gran número de factores de transcripción, con altos niveles de expresión en etapas tempranas del desarrollo de la hoja previa a antesis (T1-T0), (discutido en el Capítulo 3), que a su vez han sido validados mediante estudios de los perfiles de expresión a través de qPCR (Bengo Luoni, 2014), lo cual tendría una significancia importante para la activación y desarrollo del proceso de senescencia y el reciclado de nutrientes hacia el desarrollo del grano. Entre ellos, las familias NAC, AP2-EREBP, MYB y HB mostraron un mayor número de representantes y con elevados niveles de expresión (Figura 3.3); en particular la familia de factores de transcripción NAC que a su vez mostró altos niveles de

correlación con otros miembros de esa familia y con representantes de otras familias como AP2-EREBP, MYB y MYB-related (Figura 3.5) lo cual hace que estos factores de transcripción se constituyan como importantes candidatos para un estudio más detallado y puntual de su efecto en la ejecución del programa de senescencia en esta especie.

Los resultados de esta tesis han permitido generar un gran volumen de datos, los cuales demuestran un número relevante de procesos biológicos que son sobre-expresados y sub-expresados durante la evolución de la senescencia foliar en girasol. Los estudios de perfiles transcripcionales y metabólicos y su asociación con eventos ecofisiológicos permitieron la identificación de genes candidato asociados a este proceso, especialmente factores de transcripción que podrían estar actuando en la activación del programa de senescencia y distintos biomarcadores del avance del proceso que fueron detectados en etapas tempranas. En la actualidad, no existen estudios previos a niveles *ómicos* relacionados al proceso de senescencia en girasol, por lo cual estos resultados, además de ser pioneros para esta especie, son un punto de partida importante para futuros análisis, abriendo nuevas posibilidades y estrategias de estudio que serán necesarias para poder comprender de manera más detallada e integral las posibles vías de activación de la senescencia natural en girasol.

La comprensión del proceso en conjunto con los procesos subyacentes al mismo, contribuirá a desarrollar estrategias de mejoramiento, controlando el proceso de llenado y maduración de grano, mejorando los rendimientos del cultivo, lo cual representa un desafío importante para el futuro de la agricultura dado el gran crecimiento de la población mundial sumado al incremento en los riesgos climáticos que afectan a la productividad. Por tal motivo, la sinergia multidisciplinaria de los distintos campos de la biología, la estadística y la bioinformática será necesaria para comprender los eventos moleculares que desencadenan y regulan el proceso de senescencia permitiendo determinar las causas que lo provocan y generar herramientas moleculares que faciliten futuras intervenciones sobre el mismo.

**DISCUSIÓN GENERAL Y
CONCLUSIONES FINALES**

DISCUSIÓN GENERAL

La senescencia foliar en plantas es un mecanismo complejo y altamente coordinado que se encuentra influenciado tanto por factores internos como externos (Noodén y col., 1997) y que además presenta un gran impacto económico para la producción agrícola (Gregersen y col., 2013). En el caso del girasol, el segundo cultivo oleaginoso en importancia agronómica para nuestro país después de la soja, este proceso interviene en la brecha existente entre el rendimiento potencial y el rendimiento real observado a campo, por la mayor o menor oportunidad de las plantas para mantener el sistema fotosintético activo durante periodos prolongados, especialmente durante el periodo crítico del llenado de grano.

En este trabajo de tesis se propuso estudiar el proceso de senescencia en hojas de girasol mediante enfoques fisiológicos, metabolómicos, transcriptómicos y una aproximación de biología de sistemas con el objetivo final de integrar dicha información en una visión global de los procesos subyacentes a la senescencia foliar. El mismo ha sido consecuencia de un esfuerzo multidisciplinario, que incluyó biólogos moleculares, genetistas, ecofisiólogos, bioinformáticos y estadísticos.

Mediante un estudio de las variables fisiológicas en condiciones naturales de cultivo a campo, fue posible la evaluación crítica del progreso de la senescencia a nivel de cultivo, considerando la planta entera y su comportamiento en el canopeo, así como también, a nivel de hoja, examinando tres hojas a diferente posición en el tallo sometidas a tratamientos que modifican la tasa de senescencia, permitiendo así, la selección de muestras para estudios moleculares y la puesta a punto de condiciones experimentales y tiempos de evaluación para futuros estudios.

Los estudios a nivel metabolómico han emergido en los últimos años y se han establecido en el campo de las aproximaciones post-genómicas (Shulaev, 2006; Shulaev y col., 2008). Actualmente se conoce muy poco acerca de la regulación metabólica del proceso de senescencia en plantas (Watanabe y col., 2013). En el caso del girasol, los estudios metabolómicos en relación a estreses abióticos son limitados. En particular en el tema de senescencia se han estudiado los cambios en la composición bioquímica de algunos metabolitos durante la senescencia natural de la hoja (Agüera y col., 2012; Cabello y col., 2006). Sin embargo, no se ha

realizado hasta el momento un análisis de perfiles metabólicos a nivel de disciplinas *ómicas* en relación a senescencia foliar.

En este trabajo se llevó adelante un estudio de los perfiles metabólicos durante el desarrollo del proceso de senescencia en la hoja 10 de la planta de girasol, tanto en condiciones control evaluando la senescencia natural, así como también en condiciones de déficit hídrico, detectándose 58 metabolitos primarios que mostraron un comportamiento diferencial durante el desarrollo de la hoja, entre ellos diferentes tipos de aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares y azúcares alcohol, en cada uno de los dos ensayos evaluados mediante la técnica de GC-TOF-MS. Asimismo, mediante cromatografía iónica fue posible determinar la variación de las concentraciones de los distintos nutrientes iónicos importantes durante la removilización de nutrientes.

El desarrollo del proceso de senescencia en plantas está caracterizado por la activación e inactivación de distintos grupos de genes, los cuales pueden estar sobre- o sub-expresados durante el avance de este proceso y a su vez estos genes pueden estar involucrados en múltiples vías de señalización interconectadas formando una compleja red que controla la senescencia foliar. En los últimos diez años se han realizado diferentes estudios con el objetivo de identificar genes asociados a la senescencia sobre- y sub-expresados a lo largo de los distintos estadios del proceso (Balazadeh y col., 2008; Breeze y col., 2011; Buchanan-Wollaston y col., 2003; Gepstein y col., 2003; Gregersen y Holm, 2007; Li y col., 2012; Lim y col., 2007; Liu L y col., 2008).

En este trabajo, mediante un estudio transcripcional del proceso de senescencia en girasol a través de la tecnología de micromatrices, fue posible la detección simultánea de miles de genes que mostraron un comportamiento diferencial durante el desarrollo de la hoja tanto en condiciones naturales como en plantas sometidas a déficit hídrico, logrando una visión general del transcriptoma de la planta en distintos momentos del proceso. Varios genes SAGs previamente reportados en especies modelo, fueron confirmados con un patrón de expresión asociado a senescencia, así como también se detectaron numerosos factores de transcripción con elevados niveles de expresión en etapas tempranas, previas a los primeros síntomas de senescencia evaluados fisiológicamente, remarcándolos como importantes genes candidatos en la activación e inicio del proceso de senescencia en esta especie.

Durante el proceso de senescencia, diferentes señales pueden inducir diferentes grupos de genes (He y col., 2001; Lim y col., 2007; Park y col., 1998; Weaver y col., 1998), los cuales a su vez, pueden iniciar diferentes procesos bioquímicos y fisiológicos. De este modo, se trata de un proceso de naturaleza compleja y dinámica, por lo que estudios a un nivel de biología de sistemas son críticos para un mejor entendimiento de este proceso (Guo, 2013). De este modo, mediante una aproximación de biología de sistemas, fue posible integrar la información proveniente del análisis fisiológico, metabolómico y transcriptómico.

Los resultados de este trabajo de tesis permitieron detectar importantes cambios en el metabolismo celular en una etapa temprana del desarrollo, previa a antesis y antes de la manifestación de los primeros síntomas de senescencia evaluados fisiológicamente, lo cual demuestra la importancia de estas vías en la ejecución y desarrollo del programa de senescencia en girasol.

Este estudio constituye el primer trabajo de senescencia foliar en girasol abordado mediante estrategias *ómicas*, permitiendo el desarrollo de nuevas estrategias de estudio para este carácter de gran influencia en el rendimiento del cultivo y en la calidad de los granos, contribuyendo además a desarrollar nuevas estrategias de mejoramiento, con el objetivo de controlar el proceso de llenado y maduración de grano.

CONCLUSIONES FINALES

- I Los estudios de las variables fisiológicas permitieron detectar cambios en la evolución de la senescencia en hojas de diferentes edades y frente a distintos tratamientos, facilitando la selección de muestras y tiempos de muestreos para estudios a nivel molecular. Asimismo, las variables contenido de clorofila y nitrógeno mostraron ser más robustas para la diferenciación de muestras en distintos estadios senescentes.
- II El tratamiento de déficit hídrico implementado en estadios tempranos no mostró ser un inductor de senescencia en girasol, debido principalmente a una adaptación de esta especie relativamente tolerante a sequía, mientras que el tratamiento de ablación del órgano reproductivo evidenció un retraso del proceso en hojas jóvenes.
- III Cerca de 60 metabolitos primarios fueron detectados con importantes cambios en etapas tempranas del inicio del proceso de senescencia en hojas de girasol. Azúcares y metabolitos relacionados al ciclo de los ácidos tricarboxílicos fueron detectados en bajos niveles, mientras que distintos aminoácidos mostraron altos niveles de concentración, especialmente aminoácidos aromáticos y de cadena ramificada.
- IV Nueve nutrientes iónicos, aniónicos y catiónicos fueron encontrados con diferencias de concentración, evidenciando una gran movilidad de nutrientes a medida que avanzaba el proceso de desarrollo de las hojas en girasol. Un análisis más detallado espacio temporal, considerando tiempos de muestreos más acotados en el tiempo y hojas de distintas posiciones en el tallo, sería necesario para determinar de manera más específica los movimientos de los distintos nutrientes durante el progreso de la senescencia.
- V Aproximadamente 4.900 genes únicos anotados funcionalmente y con diferencias de expresión estadísticamente significativas fueron detectados durante la evolución de la senescencia en condiciones naturales de crecimiento a campo, de los cuales cerca de 2.000 evidenciaron un incremento en los niveles de expresión en etapas tempranas, previo a antesis.

La mayoría de ellos representan genes relacionados a regulación de la transcripción, reciclado de nutrientes y degradación de proteínas, lípidos ácidos nucleicos y azúcares.

- VI** Aproximadamente 30 factores de transcripción fueron encontrados con altos niveles de expresión en etapas tempranas, previo a la aparición de los primeros síntomas de senescencia, entre ellos, las familias más representadas corresponden a los FT con dominios AP2-EREBP, MYB, NAC, bZIP y HB. En particular, las familias NAC, AP2-EREBP y MYB mostraron altos niveles de expresión y mayores niveles de correlación y co-expresión, señalándolos como importantes biomarcadores candidatos para la ejecución del programa de senescencia en girasol.
- VII** Mediante una aproximación de biología de sistemas fue posible integrar la información proveniente de las distintas disciplinas, encontrándose correspondencia entre los cambios detectados a través de las diferentes estrategias. Una visión general del metabolismo celular permitió observar una disminución de la actividad fotosintética y crecimiento celular y un incremento en el metabolismo de sacarosa, ácidos grasos, nucleótidos y aminoácidos así como también en aquellos procesos relacionados al reciclado de nutrientes.

PERSPECTIVAS

Este trabajo de tesis constituye el primer antecedente de estudio del proceso de senescencia en girasol a través de una aproximación de biología de sistemas integrando la información proveniente de distintas disciplinas de investigación. Si bien los resultados aquí presentados deberán ser validados mediante técnicas de genética molecular y genómica funcional, evaluando la participación de los distintos genes candidatos en las diferentes vías de señalización del programa de senescencia foliar en girasol, el trabajo constituye un punto de partida promisorio que permitirá el desarrollo de nuevos diseños experimentales para el estudio de la senescencia en esta especie. El estudio de nuevas variables utilizando líneas públicas de girasol contrastantes para el carácter senescencia, analizadas bajo series temporales acotadas a los primeros estadios de desarrollo de cada hoja, así como

también la generación de nuevas herramientas moleculares, proveerá no sólo novedosas aplicaciones para profundizar en el estudio de este carácter, sino también para al mejoramiento asistido de girasol. Asimismo este trabajo contribuye a la dilucidar las bases moleculares de la senescencia en una especie no modelo, permitiendo no sólo la confirmación del importante rol de algunos genes candidatos previamente descritos en dichas especies sino también a través de la identificación de nuevos metabolitos y transcritos claves para el proceso, con perfiles particulares de evolución en distintas condiciones de cultivo y/o en distintas hojas y etapas de desarrollo de la planta de girasol.

Dra. Ruth Heinz
Director

Dra. Paula Fernandez
Director Asistente

Lic. Sebastián Moschen
Doctorando

BIBLIOGRAFÍA

- Infostat [<http://www.infostat.com.ar>].
- ASAGIR: Asociación Argentina de Girasol (www.asagir.org.ar). (Asociación Argentina de Girasol).
- **Abbasi AR, Saur A, Hennig P, Tschiersch H, Hajirezaei M, Hofius D, Sonnewald U, Voll LM.** Tocopherol deficiency in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants leads to accelerated senescence. (2009). *Plant Cell Environ* 32: 144-157.
- **Abushakra SS, Philipps DA, Huffaker RC.** Nitrogen fixation and delayed leaf senescence in soybeans. (1978). *Science* 199: 973-975.
- **Adams J.** Transcriptome: connecting the genome to gene function. (2008). *Nature Education* 1.
- **Agüera E, Cabello P, de la Haba P.** Induction of leaf senescence by low nitrogen nutrition in sunflower (*Helianthus annuus*) plants. (2010). *Physiol Plant* 138: 256-267.
- **Agüera E, Cabello P, de la Mata L, Molina E, de la Haba P.** Metabolic Regulation of Leaf Senescence in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Plants. (2012). *Senescence*: InTech Open Access Publisher.
- **Aguirrezábal LAN, Lavaud Y, Dosio GAA, Izquierdo NG, Andrade FH, González LM.** Weight per seed and oil concentration in a sunflower hybrid are accounted for by intercepted solar radiation during a definite period of seed filling. (2003). *Crop Science* 43: 152-161.
- **Aharoni A, Vorst O.** DNA microarrays for functional plant genomics. (2002). *Plant Mol Biol* 48: 99-118.
- **Al-Shahrour F, Carbonell J, Minguéz P, Goetz S, Conesa A, Tarraga J, Medina I, Alloza E, Montaner D, Dopazo J.** Babelomics: advanced functional profiling of transcriptomics, proteomics and genomics experiments. (2008). *Nucleic Acids Res* 36: W341-346.
- **Alberghina L, Westerhoff HV.** Systems Biology: Did we know it all along? (2005). In: Alberghina L, Westerhoff HV, eds. *Systems Biology: Definitions and Perspectives*: Springer Berlin Heidelberg.
- **Ali Q, Athar HUR, Ashraf M.** Modulation of growth, photosynthetic capacity and water relations in salt stressed wheat plants by exogenously applied 24-epibrassinolide. (2008). *Plant Growth Regul* 56: 107-116.
- **Alignan M, Hewezi T, Petitprez M, Dechamp-Guillaume G, Gentzbittel L.** A cDNA microarray approach to decipher sunflower (*Helianthus annuus*) responses to the necrotrophic fungus *Phoma macdonaldii*. (2006). *New Phytol* 170: 523-536.
- **Almeida J, Quadrana L, Asis R, Setta N, de Godoy F, Bermudez L, Otaiza SN, Correa da Silva JV, Fernie AR, Carrari F, Rossi M.** Genetic dissection of vitamin E biosynthesis in tomato. (2011). *J Exp Bot* 62: 3781-3798.
- **Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D.** Basic local alignment search tool. (1990). *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- **Andersson A, Keskitalo J, Sjodin A, Bhalerao R, Sterky F, Wissel K, Tandré K, Aspeborg H, Moyle R, Ohmiya Y, Brunner A, Gustafsson P, Karlsson J, Lundeberg J, Nilsson O, Sandberg G, Strauss S, Sundberg B, Uhlen M, Jansson S, Nilsson P.** A transcriptional timetable of autumn senescence. (2004). *Genome Biol* 5: R24.
- **Aparicio-Tejo PM, Boyer JS.** Significance of accelerated leaf senescence at low water potentials for water loss and grain yield in maize. (1983). *Crop Sci.* 23: 1198-1202.
- **Araujo WL, Ishizaki K, Nunes-Nesi A, Larson TR, Tohge T, Krahnert I, Witt S, Obata T, Schauer N, Graham IA, Leaver CJ, Fernie AR.** Identification of the 2-hydroxyglutarate and isovaleryl-CoA dehydrogenases as alternative electron donors linking lysine catabolism to the electron transport chain of Arabidopsis mitochondria. (2010). *Plant Cell* 22: 1549-1563.

- **Araujo WL, Tohge T, Ishizaki K, Leaver CJ, Fernie AR.** Protein degradation - an alternative respiratory substrate for stressed plants. (2011). *Trends Plant Sci* 16: 489-498.
- **Argueso CT, Raines T, Kieber JJ.** Cytokinin signaling and transcriptional networks. (2010). *Curr Opin Plant Biol* 13: 533-539.
- **Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G.** Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. (2000). *Nature Genetics* 25: 25-29.
- **Aukerman MJ, Sakai H.** Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. (2003). *Plant Cell* 15: 2730-2741.
- **Azcon-Bieto J.** *Fundamentos de Fisiología Vegetal.* (2008). MCGRAW-HILL / INTERAMERICANA DE ESPAÑA, S.A.
- **Baack EJ, Whitney KD, Rieseberg LH.** Hybridization and genome size evolution: timing and magnitude of nuclear DNA content increases in *Helianthus* homoploid hybrid species. (2005). *New Phytol* 167: 623-630.
- **Bachlava E, Taylor Ca, Tang S, Bowers JE, Mandel JR, Burke JM, Knapp SJ.** SNP discovery and development of a high-density genotyping array for sunflower. (2012). *PLoS ONE* 7: e29814.
- **Bajguz A, Hayat S.** Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. (2009). *Plant Physiol Biochem* 47: 1-8.
- **Balazadeh S, Garapati P, Xue GP, Mueller-Roeber B.** A transcription factor upstream of ORE1 and GLK1 integrates ABA signalling with drought-induced senescence. (2013). *6th European Workshop on Leaf Senescence.* 14-18 October. INRA, Versailles, France
- **Balazadeh S, Kwasniewski M, Caldana C, Mehrnia M, Zanor MI, Xue GP, Mueller-Roeber B.** ORS1, an HO-responsive NAC transcription factor, controls senescence in *Arabidopsis thaliana*. (2011). *Mol Plant* 4: 346-360.
- **Balazadeh S, Riaño-Pachón DM, Mueller-Roeber B.** Transcription factors regulating leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. (2008). *Plant Biology* 10: 63-75.
- **Balazadeh S, Siddiqui H, Allu AD, Matallana-Ramirez LP, Caldana C, Mehrnia M, Zanor MI, Kohler B, Mueller-Roeber B.** A gene regulatory network controlled by the NAC transcription factor ANAC092/AtNAC2/ORE1 during salt-promoted senescence. (2010). *Plant J* 62: 250-264.
- **Balibrea Lara ME, Gonzalez Garcia MC, Fatima T, Ehness R, Lee TK, Proels R, Tanner W, Roitsch T.** Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. (2004). *Plant Cell* 16: 1276-1287.
- **Balmer D, Flors V, Glauser G, Mauch-Mani B.** Metabolomics of cereals under biotic stress: current knowledge and techniques. (2013). *Front Plant Sci* 4: 82.
- **Barozai MY, Baloch IA, Din M.** Identification of MicroRNAs and their targets in *Helianthus*. (2012). *Mol Biol Rep* 39: 2523-2532.
- **Bazin J, Langlade N, Vincourt P, Arribat S, Balzergue S, El-Maarouf-Bouteau H, Bailly C.** Targeted mRNA oxidation regulates sunflower seed dormancy alleviation during dry after-ripening. (2011). *Plant Cell* 23: 2196-2208.
- **Benedetti CE, Arruda P.** Altering the expression of the chlorophyllase gene *ATHCOR1* in transgenic *Arabidopsis* caused changes in the chlorophyll-to-chlorophyllide ratio. (2002). *Plant Physiol* 128: 1255-1263.
- **Bengoia Luoni S.** Identificación y validación de factores de transcripción asociados a senescencia foliar temprana en girasol. (2014). Universidad Nacional de San Martín, Licenciatura en Biotecnología. *En preparación.*

- **Benjamini Y, Hochberg Y.** Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. (1995). *Journal of the Royal Statistical Society Series B Methodological* 57: 289-300.
- **Bernard SM, Habash DZ.** The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. (2009). *New Phytol* 182: 608-620.
- **Besseau S, Li J, Palva ET.** WRKY54 and WRKY70 co-operate as negative regulators of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. (2012). *J Exp Bot* 63: 2667-2679.
- **Bhandal IS, Malik CP.** Potassium estimation uptake and its role in the physiology and metabolism of flowering plants. (1988). *Intl. Rev. Cytol.* 110: 205-254.
- **Bleda M, Medina I, Alonso R, De Maria A, Salavert F, Dopazo J.** Inferring the regulatory network behind a gene expression experiment. (2012). *Nucleic Acids Res* 40: W168-172.
- **Blomzandstra G, Lampe JEM.** The Effect of Chloride and Sulfate Salts on the Nitrate Content in Lettuce Plants (*Lactuca-Sativa L.*). (1983). *Journal of Plant Nutrition* 6: 611-628
- **Bonnet E, Wuyts J, Rouze P, Van de Peer Y.** Detection of 91 potential conserved plant microRNAs in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* identifies important target genes. (2004). *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 11511-11516.
- **Borrás L, Maddoni GA, Otegui ME.** Leaf senescence in maize hybrids: plant population, row spacing and kernel set effects. (2003). *Field Crops Res.* 82: 13-26.
- **Borrell A, Carbonell L, Farras R, Puig Parellada P, Tiburcio AF.** Polyamines inhibit lipid peroxidation in senescing oat leaves. (1997). *Physiol. Plant.* 99: 385-390.
- **Borrell AK, Hammer GL, Douglas ACL.** Does maintaining green leaf area in sorghum improve yield under drought? I. Leaf growth and senescence. . (2000a). *Crop Sci.* 40: 1026-1037.
- **Borrell AK, Hammer GL, Henzell RG.** Does maintaining green leaf area in sorghum improve yield under drought? II. Dry matter production and yield. . (2000b). *Crop Sci.* 40: 1037-1048.
- **Boyer JS.** Plant productivity and environment. (1982). *Science* 218: 443-448.
- **Breeze E, Harrisona E, McHattiea S, Hughesa L, Hickmana R, Hilla C, Kiddlea S, Kima Y, Penfoldb CA, Jenkinsb D, Zhanga C, Morriska K, Jennera C, Jacksona S, Thomasa B, Tabretta A, Legaieb R, D. Mooreb JD, Wildb DL, Ottb S, Randb D, Beynona J, Denby K, Meada A, Buchanan-Wollaston V.** High-Resolution Temporal Profiling of Transcripts during *Arabidopsis* Leaf Senescence Reveals a Distinct Chronology of Processes and Regulation. (2011). *The Plant Cell* 23: 873-894.
- **Brevedan RE, Egli DB.** Short Periods of water stress during seed filling, leaf senescence, and yield of soybean. (2003). *Crop Sci.* 43: 2083-2088.
- **Bruggeman FJ, Hornberg JJ, Boogerd FC, Westerhoff HV.** Introduction to systems biology. (2007). In: Baginsky S, Fernie A, eds. *Plant systems biology*, 1-20.
- **Brugiere N, Dubois F, Masclaux C, Sangwan RS, Hirel B.** Immunolocalization of glutamine synthetase in senescing tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) leaves suggests that ammonia assimilation is progressively shifted to the mesophyll cytosol. (2000). *Planta* 211: 519-527.
- **Bu Q, Jiang H, Li CB, Zhai Q, Zhang J, Wu X, Sun J, Xie Q, Li C.** Role of the *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factors ANAC019 and ANAC055 in regulating jasmonic acid-signaled defense responses. (2008). *Cell Res* 18: 756-767.
- **Buchanan-Wollaston V, Ainsworth C.** Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence-related genes by subtractive hybridization. (1997). *J Exp Bot* 52: 1117-1121.
- **Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T, Pink D.** The molecular analysis of leaf senescence -a genomic approach. (2003). *Plant Biotechnol J* 1: 3-22.

-
- **Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, Nam HG, Lin JF, Wu SH, Swidzinski J, Ishizaki K, Leaver CJ.** Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis. (2005). *Plant J* 42: 567-585.
 - **Cabello P, Agüera E, de la Haba P.** Metabolic changes during natural ageing in sunflower (*Helianthus annuus*) leaves: expression and activity of glutamine synthetase isoforms are regulated differently during senescence. (2006). *Physiol Plant* 128: 175-185.
 - **Cantamutto M, Poverene M.** Genetically modified sunflower release: Opportunities and risks. (2007). *Field Crops Research* 101: 133-144.
 - **Catchpole GS, Beckmann M, Enot DP, Mondhe M, Zywicki B, Taylor J, Hardy N, Smith A, King RD, Kell DB, Fiehn O, Draper J.** Hierarchical metabolomics demonstrates substantial compositional similarity between genetically modified and conventional potato crops. (2005). *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 14458-14462.
 - **Cellier F, Conejero G, Breitler JC, Casse F.** Molecular and physiological responses to water deficit in drought-tolerant and drought-sensitive lines of sunflower. Accumulation of dehydrin transcripts correlates with tolerance. (1998). *Plant Physiol* 116: 319-328.
 - **Clavijo B, Fernandez P, Gonzalez S, Rivarola M, Heinz R, M. F, Paniago N.** ATCG: an ontology driven database and web interface applied to Sunflower Microarray Project. (2012). *XXI Plant and Animal Genome Conference*. San Diego, CA.
 - **Clouse SD, Sasse JM.** BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development. (1998). *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 427-451.
 - **Collakova E, DellaPenna D.** The role of homogentisate phytyltransferase and other tocopherol pathway enzymes in the regulation of tocopherol synthesis during abiotic stress. (2003). *Plant Physiol* 133: 930-940.
 - **Connor DJ, Jones TR.** Response of sunflower to strategies of irrigation II. Morphological and physiological responses to water stress. (1985). *Field Crops Research* 12: 91-103.
 - **Connor DJ, Palta JA, Jones TR.** Response of sunflower to strategies of irrigation. III. Crop photosynthesis and transpiration. (1985). *Field Crops Research* 12: 281-283.
 - **Craftsbrandner SJ, Egli DB.** Modification of seed growth in soybean by physical restraint - effect on leaf senescence. (1987). *J. Exp. Bot.* 38: 2043-2049.
 - **Chalker-Scott LK.** Do Anthocyanins Function as Osmoregulators in Leaf Tissues? (2002). *Adv. Bot. Res.* 37: 104-129.
 - **Charlton WL, Johnson B, Graham IA, Baker A.** Non-coordinate expression of peroxisome biogenesis, beta-oxidation and glyoxylate cycle genes in mature Arabidopsis plants. (2005). *Plant Cell Rep* 23: 647-653.
 - **Chen GH, Chan YL, Liu CP, Wang LC.** Ethylene response pathway is essential for ARABIDOPSIS A-FIFTEEN function in floral induction and leaf senescence. (2012a). *Plant Signal Behav* 7: 457-460.
 - **Chen GH, Liu CP, Chen SC, Wang LC.** Role of ARABIDOPSIS A-FIFTEEN in regulating leaf senescence involves response to reactive oxygen species and is dependent on ETHYLENE INSENSITIVE2. (2012b). *J Exp Bot* 63: 275-292.
 - **Chen ZH, Walker RP, Acheson RM, Tecsi LI, Wingler A, Lea PJ, Leegood RC.** Are isocitrate lyase and phosphoenolpyruvate carboxykinase involved in gluconeogenesis during senescence of barley leaves and cucumber cotyledons? (2000). *Plant Cell Physiol* 41: 960-967.
 - **Christensen LE, Below FE, Hageman RH.** The effects of ear removal on senescence and metabolism of maize. (1981). *Plant Physiol* 68: 1180-1185.

- **Dalma D, Weiszhausz D, Warrington J, Tanimoto E, Miyada CG.** The Affymetrix GenChip Platform: An Overview. (2006). In: Kimmel A, Oliver B, eds. *Methods Enzymology*, Vol. 410, 3-28.
- **Dalman MR, Deeter A, Nimishakavi G, Duan ZH.** Fold change and p-value cutoffs significantly alter microarray interpretations. (2012). *BMC Bioinformatics* 13 Suppl 2: S11.
- **Davey MR, Jan M.** Sunflower (*Helianthus annuus* L.): Genetic Improvement Using Conventional and In Vitro Technologies. (2010). *Journal of Crop Improvement* 24: 349-391.
- **Davies J, Gan S.** Towards an Integrated View of Monocarpic Plant Senescence. (2012). *Russian Journal of Plant Physiology* 59: 467-478.
- **de la Mata L, Cabello P, de la Haba P, Agüera E.** Growth under elevated atmospheric CO₂ concentration accelerates leaf senescence in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. (2012). *J Plant Physiol* 169: 1392-1400.
- **de la Mata L, Cabello P, de la Haba P, Agüera E.** Study of senescence process in primary leaves of sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants under two different lights intensities. (2013). *Photosynthetica* 51: 85-94.
- **De la Vega A, Cantore MA, Sposaro NN, Trapani N, Lopez Pereira M, Hall AJ.** Canopy stay green and yield in non stressed sunflower. (2011). *Fields Crop Research* 121: 175-185.
- **De Souza PI, Egli DB, Bruening WP.** Water stress during seed filling and leaf senescence in soybean. (1997). *Agron. J.*: 807-812.
- **de Zelicourt A, Diet A, Marion J, Laffont C, Ariel F, Moison M, Zahaf O, Crespi M, Gruber V, Frugier F.** Dual involvement of a *Medicago truncatula* NAC transcription factor in root abiotic stress response and symbiotic nodule senescence. (2012). *Plant J* 70: 220-230.
- **Defernez M, Gunning YM, Parr AJ, Shepherd LV, Davies HV, Colquhoun IJ.** NMR and HPLC-UV profiling of potatoes with genetic modifications to metabolic pathways. (2004). *J Agric Food Chem* 52: 6075-6085.
- **Desclos M, Etienne P, Coquet L, Jouenne T, Bonnefoy J, Segura R, Reze S, Ourry A, Avice JC.** A combined 15N tracing/proteomics study in *Brassica napus* reveals the chronology of proteomics events associated with N remobilisation during leaf senescence induced by nitrate limitation or starvation. (2009). *Proteomics* 9: 3580-3608.
- **Dezar CA, Fedrigo GV, Chan RL.** The promoter of the sunflower HD-Zip protein gene *Hahb4* directs tissue-specific expression and is inducible by water stress, high salt concentrations and ABA. (2005a). *Plant Science* 169: 447-456.
- **Dezar CA, Gago GM, Gonzalez DH, Chan RL.** *Hahb-4*, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, is a developmental regulator and confers drought tolerance to *Arabidopsis thaliana* plants. (2005b). *Transgenic Res* 14: 429-440.
- **Diaz C, Purdy S, Christ A, Morot-Gaudry JF, Wingler A, Masclaux-Daubresse C.** Characterization of markers to determine the extent and variability of leaf senescence in *Arabidopsis*. A metabolic profiling approach. (2005). *Plant Physiol* 138: 898-908.
- **Dietz KJ, Vogel MO, Viehhauser A.** AP2/EREBP transcription factors are part of gene regulatory networks and integrate metabolic, hormonal and environmental signals in stress acclimation and retrograde signalling. (2010). *Protoplasma* 245: 3-14.
- **Ding L, Wang KJ, Jiang GM, Liu MZ, Gao LM.** Photosynthetic rate and yield formation in different maize hybrids. (2007). *Biol Plant* 51: 165-168.
- **Ding L, Wang KJ, Jiang GM, Liu MZ, Niu SL, Gao LM.** Post-anthesis changes in photosynthetic traits of maize hybrids released in different years. (2005). *Field Crop Res.* 93: 108-115.
- **Dixon RA, Strack D.** Phytochemistry meets genome analysis, and beyond. (2003). *Phytochemistry* 62: 815-816.

-
- **Doehlemann G, Wahl R, Horst RJ, Voll LM, Usadel B, Poree F, Stitt M, Pons-Kuhnemann J, Sonnewald U, Kahmann R, Kamper J.** Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. (2008). *Plant J* 56: 181-195.
 - **Dorrell D, Vick B.** Properties and Processing of oilseed sunflower. (1997). In: (ed) SA, ed. *Sunflower Technology and Production.*, Vol. 35. Madison, WI: Agronomy series. ASA, CSSA, and ASSA.
 - **Dosio GAA, Aguirrezábal LAN.** Variaciones del rendimiento en girasol. Identificando las causas. (2004). *Revista Agromercado, Cuadernillo de girasol*, Vol. 90, 7-10.
 - **Dosio GAA, Aguirrezábal LAN, Andrade FH, Pereyra VR.** Solar radiation intercepted during seed filling and oil production in two sunflower hybrids. . (2000). *Crop Science* 40: 1637-1644.
 - **Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebus PA, Smith F.** Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. . (1956). *Analytical Chemistry* 28: 350-356.
 - **Dubousset L, Abdallah M, Desfeux AS, Etienne P, Meuriot F, Hawkesford MJ, Gombert J, Segura R, Bataille MP, Reze S, Bonnefoy J, Ameline AF, Ourry A, Le Dily F, Avice JC.** Remobilization of leaf S compounds and senescence in response to restricted sulphate supply during the vegetative stage of oilseed rape are affected by mineral N availability. (2009). *J Exp Bot* 60: 3239-3253.
 - **Dumas A.** *Annales de chimie.* (1826). 33,342.
 - **Ella L, Zion A, Nehemia A, Amnon L.** Effect of the ethylene action inhibitor 1-methylcyclopropene on parsley leaf senescence and ethylene biosynthesis. (2003). *Postharvest Biol. Technol.* 30: 67-74.
 - **Eulgem T, Somssich IE.** Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. (2007). *Curr Opin Plant Biol* 10: 366-371.
 - **Evans PT, Malmberg RL.** Do polyamines have roles in plant development? (1989). *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 235-269.
 - **Falk J, Munne-Bosch S.** Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. (2010). *J Exp Bot* 61: 1549-1566.
 - **Feild TS, Lee DW, Holbrook NM.** Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood. (2001). *Plant Physiol* 127: 566-574.
 - **Fernandez P, Di Rienzo J, Fernandez L, Hopp H, Paniego N, R.A. H.** Transcriptomic identification of candidate genes involved in sunflower responses to chilling and salt stresses based on cDNA microarray analysis. (2008). *BMC Plant Biol* 8.
 - **Fernandez P, Di Rienzo JA, Moschen S, Dosio GA, Aguirrezabal LA, Hopp HE, Paniego N, Heinz RA.** Comparison of predictive methods and biological validation for qPCR reference genes in sunflower leaf senescence transcript analysis. (2011). *Plant Cell Rep* 30: 63-74.
 - **Fernandez P, Moschen S, Paniego N, Heinz RA.** Functional approaches to study leaf senescence in sunflower. (2012a). *Senescence*: InTech Open Access Publisher.
 - **Fernandez P, Paniego N, Lew S, Hopp HE, Heinz RA.** Differential representation of sunflower ESTs in enriched organ-specific cDNA libraries in a small scale sequencing project. (2003). *BMC Genomics* 4: 40.
 - **Fernandez P, Soria M, Blesa D, DiRienzo J, Moschen S, Rivarola M, Clavijo B, Gonzalez S, Peluffo L, Príncipi D, Dosio G, Aguirrezabal L, García-García F, Conesa A, Hopp E, Dopazo J, Heinz R, Paniego N.** Development, characterization and experimental validation of a cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) gene expression oligonucleotide microarray. (2012b). *PLoS ONE* 7.
 - **Fernie AR, Trethewey RN, Krotzky AJ, Willmitzer L.** Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. (2004). *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 763-769.

-
- **fgStatistics**. (2009). In: Di Rienzo JA, ed. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. .
 - **Fick G, Zimmer D**. Yield stability of sunflower hybrids and open pollinated varieties. (1976). *7TH Int. Sunflower Conference*. Paris, France. .
 - **Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, Altmann T, Trethewey RN, Willmitzer L**. Metabolite profiling for plant functional genomics. (2000). *Nat Biotechnol* 18: 1157-1161.
 - **Fletcher RA, Osborne DJ**. Regulation of protein and nucleic acid synthesis by gibberellin during leaf senescence. (1965). *Nature* 207: 1176-1177.
 - **Fraenkel GS**. The raison d'etre of secondary plant substances; these odd chemicals arose as a means of protecting plants from insects and now guide insects to food. (1959). *Science* 129: 1466-1470.
 - **Fu JD, Yan YF, Kim MY, Lee SH, Lee BW**. Population-specific quantitative trait loci mapping for functional stay-green trait in rice (*Oryza sativa* L.). (2011). *Genome* 54: 235-243.
 - **Fukushima A, Kusano M, Redestig H, Arita M, Saito K**. Integrated omics approaches in plant systems biology. (2009). *Curr Opin Chem Biol* 13: 532-538.
 - **Funk VA, Bayer RJ, Keeley S, Chan R, Watson L, Gemeinholzer B, Schilling E, Panero JL, Baldwin BG, Garcia-Jacas N, Susanna A, Jansen R**. Everywhere but Antarctica: using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. (2005). *Biologiske Skrifter* 55: 343-374.
 - **Gago GM, Almoguera C, Jordano J, Gonzalez DH, Chan RL**. Hahb-4, a homeobox-leucine zipper gene potentially involved in abscisic acid-dependent responses to water stress in sunflower. . (2002). *Plant Cell Environ.* 25: 633-640.
 - **Gan S**. Mitotic and postmitotic senescence in plants. (2003). *Science's SAGE KE*.
 - **Gan S, Amasino RM**. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. (1995). *Science* 270: 1986-1988.
 - **Gan S, Amasino RM**. Making sense of senescence. (1997). *Plant Physiol* 113: 313-319.
 - **Gan SS, Amasino RM**. Cytokinins in plant senescence: From spray and pray to clone and play. (1996). *BioEssays* 18: 557-565.
 - **Garcia-Alcalde F, Garcia-Lopez F, Dopazo J, Conesa A**. Paintomics: a web based tool for the joint visualization of transcriptomics and metabolomics data. (2011). *Bioinformatics* 27: 137-139.
 - **Ge H, Walhout AJ, Vidal M**. Integrating 'omic' information: a bridge between genomics and systems biology. (2003). *Trends Genet* 19: 551-560.
 - **Gepstein S**. Leaf senescence--not just a 'wear and tear' phenomenon. (2004). *Genome Biol* 5: 212.
 - **Gepstein S, Sabehi G, Carp M-J, Hajouj T, Neshor MFO, Yariv I, Dor C, Bassani M**. Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. (2003). *The Plant Journal* 36: 629-642.
 - **Giacomelli JI, Weigel D, Chan RL, Manavella PA**. Role of recently evolved miRNA regulation of sunflower HaWRKY6 in response to temperature damage. (2012). *New Phytol* 195: 766-773.
 - **Giordani T, Natali L, D'Ercole A, Pugliesi C, Fambrini M, Vernieri P, Vitagliano C, Cavallini A**. Expression of a dehydrin gene during embryo development and drought stress in ABA-deficient mutants of sunflower (*Helianthus annuus* L.). (1999). *Plant Mol Biol* 39: 739-748.
 - **Gomber J, Etienne P, Ourry A, Le Dily F**. The expression patterns of SAG12/Cab genes reveal the spatial and temporal progression of leaf senescence in *Brassica napus* L. whit sensitivity to the environment. (2006). *J. Exp. Bot.* 57: 1949-1956.

-
- **Gong Y, Ji X, Gao J.** Grain sink strength related to carbon staying in the leaves of hybrid wheat XN901. (2009). *Agr Sci China* 8: 546-555.
 - **Gong Y, Zhang J, Gao J, Lu L, Wang J.** Slow export of photoassimilate from stay-green leaves during late grain-filling stage in hybrid winter wheat (*Triticum aestivum* L.). (2005). *J Agron Crop Sci* 191: 292-299.
 - **Graham IA, Leaver CJ, Smith SM.** Induction of Malate Synthase Gene Expression in Senescent and Detached Organs of Cucumber. (1992). *The Plant Cell* 4: 349-357.
 - **Grbic V, Bleeker AB.** Ethylene regulates the timing of leaf senescence in Arabidopsis. (1995). *The Plant Journal* 8: 596-602.
 - **Gregersen PL.** Senescence and Nutrient Remobilization in Crop Plants. (2011). In: Hawkesford MJ, Barraclough P, eds. *The Molecular and Physiological Basis of Nutrient Use Efficiency in Crops*.: John Wiley & Sons, Inc.
 - **Gregersen PL, Culetic A, Boschian L, Krupinska K.** Plant senescence and crop productivity. (2013). *Plant Mol Biol* 82: 603-622.
 - **Gregersen PL, Holm PB.** Transcriptome analysis of senescence in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). (2007). *Plant Biotechnol J* 5: 192-206.
 - **Grotewold E.** Plant metabolic diversity: a regulatory perspective. (2005). *Trends Plant Sci* 10: 57-62.
 - **Gruszka D.** The brassinosteroid signaling pathway-new key players and interconnections with other signaling networks crucial for plant development and stress tolerance. (2013). *Int J Mol Sci* 14: 8740-8774.
 - **Guevara E, Jimenez V.** *La Reproducción de las Plantas*. (2006). Costa Rica: Editorial UCR.
 - **Guiboileau A, Sormani R, Meyer C, Masclaux-Daubresse C.** Senescence and death of plant organs: nutrient recycling and developmental regulation. (2010). *C R Biol* 333: 382-391.
 - **Guo Y.** Towards systems biological understanding of leaf senescence. (2013). *Plant Mol Biol* 82: 519-528.
 - **Guo Y, Cai Z, Gan S.** Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence. (2004). *Plant, Cell and Environment* 27: 521-549.
 - **Guo Y, Gan S.** Leaf senescence: signals, execution, and regulation. (2005). *Curr Top Dev Biol* 71: 83-112.
 - **Guo Y, Gan S.** AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. (2006). *The Plant Journal* 46: 601-612.
 - **Guo Y, Gan SS.** Convergence and divergence in gene expression profiles induced by leaf senescence and 27 senescence-promoting hormonal, pathological and environmental stress treatments. (2012). *Plant Cell Environ* 35: 644-655.
 - **Gut H, Matile P.** Apparent induction of key enzymes of the glyoxylic acid cycle in senescent barley leaves. (1988). *Planta* 176: 548-550.
 - **Ha S, Vankova R, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LS.** Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. (2012). *Trends Plant Sci* 17: 172-179.
 - **Hafsi M, Mechmeche W, Bouamama L, Djekoune A, Zaharieva M, Monneveux P.** Flag leaf senescence, as evaluated by numerical image analysis, and its relationship with yield under drought in durum wheat. (2000). *J Agr Crop Sci* 185: 275-280.
 - **Halket JM, Przyborowska A, Stein SE, Mallard WG, Down S, Chalmers RA.** Deconvolution gas chromatography/mass spectrometry of urinary organic acids--potential for pattern recognition and automated identification of metabolic disorders. (1999). *Rapid Commun Mass Spectrom* 13: 279-284.

- **Hall TA**. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. (1999). *Nucleic Acids Symp.* 41: 95-98.
- **Hardiman G**. Microarray platforms--comparisons and contrasts. (2004). *Pharmacogenomics* 5: 487-502.
- **Hartwell LH, Hopfield JJ, Leibler S, Murray AW**. From molecular to modular cell biology. (1999). *Nature* 402: C47-52.
- **He XJ, Mu RL, Cao WH, Zhang ZG, Zhang JS, Chen SY**. AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. (2005). *Plant J* 44: 903-916.
- **He Y, Tang W, Swain JD, Green AL, Jack TP, Gan S**. Networking senescence-regulating pathways by using Arabidopsis enhancer trap lines. (2001). *Plant Physiol* 126: 707-716.
- **He YH, Fukushige H, Hildebrand DF, Gan S**. Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. (2002). *Plant Physiol.* 128: 876-884.
- **He YH, Gan S**. Molecular characteristics of leaf senescence. . (2003). In: Signpost R, ed. *Recent Research Developments in Plant Molecular Biology*. Kerala, India.
- **He YH, Xu R, Zhao Y**. Enhancement of senescence by epibrassinolide in leaves of mung bean seedling. (1996). *Acta Phytophysiol. Sinica* 22: 58-62.
- **Heiser CB, Clevenger S, Martin WC**. The North American sunflower (*Helianthus*). (1969). *Mem. Torrey Bot. Club* 22: 1-218.
- **Hensell LL, Grbic V, Baumgarten DA, Bleecker AB**. Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in arabidopsis. (1993). *Plant Cell* 5: 553-564.
- **Hewezi T, Leger M, El Kayal W, Gentzbittel L**. Transcriptional profiling of sunflower plants growing under low temperatures reveals an extensive down-regulation of gene expression associated with chilling sensitivity. (2006a). *J Exp Bot* 57: 3109-3122.
- **Hewezi T, Petitprez M, Gentzbittel L**. Primary metabolic pathways and signal transduction in sunflower (*Helianthus annuus L.*): comparison of transcriptional profiling in leaves and immature embryos using cDNA microarrays. (2006b). *Planta* 223: 948-964.
- **Hickman R, Hill C, Penfold CA, Breeze E, Bowden L, Moore JD, Zhang P, Jackson A, Cooke E, Bewicke-Copley F, Mead A, Beynon J, Wild DL, Denby KJ, Ott S, Buchanan-Wollaston V**. A local regulatory network around three NAC transcription factors in stress responses and senescence in Arabidopsis leaves. (2013). *Plant J* 75: 26-39.
- **Himmelblau E, Amasino RM**. Nutrients mobilized from leaves of Arabidopsis thaliana during senescence. (2001). *J Plant Physiol* 158: 1317-1323.
- **Hinder B, Schellenberg M, Rodoni S, Ginsburg S, Vogt E, Martinoia E, Matile P, Hortensteiner S**. How plants dispose of chlorophyll catabolites. Directly energized uptake of tetrapyrrolic breakdown products into isolated vacuoles. (1996). *J Biol Chem* 271: 27233-27236.
- **Hirayama T, Shinozaki K**. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. (2010). *Plant J* 61: 1041-1052.
- **Hoeberichts FA, van Doorn WG, Vorst O, Hall RD, van Wordragen MF**. Sucrose prevents up-regulation of senescence-associated genes in carnation petals. (2007). *J Exp Bot* 58: 2873-2885.
- **Horton RF, Bourguoin N**. Leaf senescence in juvenile ivy. (1992). *Plant Physiol. Biochem.* 30: 119-122.
- **Hu R, Qi G, Kong Y, Kong D, Gao Q, Zhou G**. Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in *Populus trichocarpa*. (2010). *BMC Plant Biol* 10: 145.

- **Huang H, Wang Y, Wang S, Wu X, Yang K, Niu Y, Dai S.** Transcriptome-wide survey and expression analysis of stress-responsive NAC genes in *Chrysanthemum lavandulifolium*. (2012). *Plant Sci* 193-194: 18-27.
- **Huang L, Ye Z, Bell RW, Dell B.** Boron nutrition and chilling tolerance of warm climate crop species. (2005). *Ann Bot (Lond)* 96: 755-767.
- **Huang Y, Zou Q, Tang SM, Wang LG, Shen XJ.** Computational identification and characteristics of novel microRNAs from the silkworm (*Bombyx mori* L.). (2010). *Mol Biol Rep* 37: 3171-3176.
- **Inada N, Sakai A, Kuroiwa H, Kuroiwa T.** Three-dimensional analysis of the senescence program in rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles. Investigations of tissues and cells by fluorescence microscopy. (1998). *Planta* 205: 153-164.
- **Ingaramo J.** Plan Estratégico ASAGIR 2006-2015. (2005). *Cuadernillo Informativo*, Vol. Nº 11. Buenos Aires, Argentina, 24pp.
- **Inskip WP, Bloom PR.** Extinction coefficients of chlorophyll a and B in n,n-dimethylformamide and 80% acetone. (1985). *Plant Physiol* 77: 483-485.
- **Jan CC, Vick BA, Miller JF, Kahler AL, Butler III. ET.** Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower. (1998). *TAG Theoretical and Applied Genetics* 96: 15-22.
- **Janzen HH, Bettany JR.** Sulphur nutrition of rapeseed. Influence of fertilizer nitrogen and sulphur rates. (1984). *Soil Science Society of America Journal* 48: 100-107.
- **Jaradat MR, Feurtado JA, Huang D, Lu Y, Cutler AJ.** Multiple roles of the transcription factor AtMYBR1/AtMYB44 in ABA signaling, stress responses, and leaf senescence. (2013). *BMC Plant Biol* 13: 192.
- **Jensen MK, Kjaersgaard T, Nielsen MM, Galberg P, Petersen K, O'Shea C, Skriver K.** The Arabidopsis thaliana NAC transcription factor family: structure-function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling. (2010). *Biochem J* 426: 183-196.
- **Jensen MK, Lindemose S, de Masi F, Reimer JJ, Nielsen M, Perera V, Workman CT, Turck F, Grant MR, Mundy J, Petersen M, Skriver K.** ATAF1 transcription factor directly regulates abscisic acid biosynthetic gene NCED3 in Arabidopsis thaliana. (2013). *FEBS Open Bio* 3: 321-327.
- **Jiang CZ, Rodermeil SR, Shibles RM.** Photosynthesis, Rubisco activity and amount, and their regulation by transcription in senescing soybean leaves. (1993). *Plant Physiol.* 101: 105-112.
- **Jibrán R, D AH, P PD.** Hormonal regulation of leaf senescence through integration of developmental and stress signals. (2013). *Plant Mol Biol* 82: 547-561.
- **Jobic C, Boisson AM, Gout E, Rasclé C, Fevre M, Cotton P, Bligny R.** Metabolic processes and carbon nutrient exchanges between host and pathogen sustain the disease development during sunflower infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. (2007). *Planta* 226: 251-265.
- **John I, Hackett R, Cooper W, Drake R, Farrell A, Grierson D.** Cloning and characterization of tomato leaf senescence-related cDNAs. (1997). *Plant Mol Biol* 33: 641-651.
- **Jones M, Rawson H.** Influence of the rate of development of leaf water deficits upon photosynthesis, leaf conductance, water use efficiency, and osmotic potential in sorghum. (1979). *Physiologia Plantarum* 45: 103-111.
- **Jordan DR, Hunt CH, Cruickshank AW, Borrell AK, Henzell RG.** The relationship between the stay-green trait and grain yield in elite Sorghum hybrids grown in a range of environments. (2012). *Crop Sci* 52: 1153-1161.
- **Kesseli RV, Michelmore RW.** The Compositae: systematically fascinating but specifically neglected. (1997). In: Paterson AH, ed. *Genome Mapping in Plants*. Georgetown, TX: R. G. Landes Co., 179-191.

- **Khan RI, Choudhuri MA.** Influence of reproductive organs on plant senescence in rice and wheat. (1992). *Biol. Plant.* 34: 241-251.
- **Kiani P, Grieu P, Maury P, Hewezi T, Gentzbittel L, Sarrafi A.** Genetic variability for physiological traits under drought conditions and differential expression of water stress-associated genes in sunflower (*Helianthus annuus L.*). (2007). *Theor Appl Genet* 114: 193-207.
- **Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR.** CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein kinases. (1993). *Cell* 72: 427-441.
- **Kim JH, Nguyen NH, Jeong CY, Nguyen NT, Hong SW, Lee H.** Loss of the R2R3 MYB, AtMyb73, causes hyper-induction of the SOS1 and SOS3 genes in response to high salinity in Arabidopsis. (2013). *J Plant Physiol.* 170: 1461-1465.
- **Kim JH, Woo HR, Kim J, Lim PO, Lee IC, Choi SH, Hwang D, Nam HG.** Trifurcate feed-forward regulation of age-dependent cell death involving miR164 in Arabidopsis. (2009). *Science* 323: 1053-1057.
- **Kiniry JR, Blanchet R, Williams JR, Texier V, Jones K, Cabelguenne M.** Sunflower simulation using the EPIC and ALMANAC models. (1992). *Field Crops Research* 30: 403-423.
- **Kinnersley AM, Turano FJ.** Gamma-aminobutyric acid (GABA) and plant response to stress. (2000). *Crit Rev Plant Sci* 19: 479-509.
- **Klie S, Nikoloski Z.** The choice between MapMan and Gene Ontology for automated gene function prediction in plant science. (2012). *Front Genet* 3: 1-14.
- **Kobayashi NI, Saito T, Iwata N, Ohmae Y, Iwata R, Tanoi K, Nakanishi TM.** Leaf senescence in rice due to magnesium deficiency mediated defect in transpiration rate before sugar accumulation and chlorosis. (2013). *Physiol Plant* 148: 490-501.
- **Koyama T, Nii H, Mitsuda N, Ohta M, Kitajima S, Ohme-Takagi M, Sato F.** A regulatory cascade involving class II ETHYLENE RESPONSE FACTOR transcriptional repressors operates in the progression of leaf senescence. (2013). *Plant Physiol* 162: 991-1005.
- **Kratsch H, Wise R.** The ultrastructure of chilling stress. (2000). *Plant, Cell and Environment* 23: 337-350.
- **Kuppu S, Mishra N, Hu R, Sun L, Zhu X, Shen G, Blumwald E, Payton P, Zhang H.** Water-deficit inducible expression of a cytokinin biosynthetic gene IPT improves drought tolerance in cotton. (2013). *PLoS ONE* 8: e64190.
- **Kusaba M, Tanaka A, Tanaka R.** Stay-green plants: what do they tell us about the molecular mechanism of leaf senescence. (2013). *Photosynth Res.*
- **Lahdesmaki P.** The amount of gamma-aminobutyric acid and the activity of glutamic carboxylase in ageing leaves. (1968). *Physiol Plant* 21: 1322-1327.
- **Lai Z, Kane N, Kozik A, Hodgins K, Dlugosch K, Barker M, Matvienko M, Yu Q, Turner K, Pearl S, Bell G, Zou Y, Grassa C, Guggisberg A, Adams K, Anderson J, Horvath D, Kesseli R, Burke J, Michelmore R, Rieseberg L.** Genomics of Compositae weeds: EST libraries, microarrays, and evidence of introgression. (2012). *Am J Bot* 99: 209-218.
- **Lamesch P, Berardini TZ, Li D, Swarbreck D, Wilks C, Sasidharan R, Muller R, Dreher K, Alexander DL, Garcia-Hernandez M, Karthikeyan AS, Lee CH, Nelson WD, Ploetz L, Singh S, Wensel A, Huala E.** The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. (2012). *Nucleic Acids Res* 40: D1202-1210.
- **Larios B, Aguera E, Cabello P, Maldonado JM, de la Haba P.** The rate of CO₂ assimilation controls the expression and activity of glutamine synthetase through sugar formation in sunflower (*Helianthus annuus L.*) leaves. (2004). *J Exp Bot* 55: 69-75.

- **Lavon R, Goldschmidt EE, Salomon R, Frank F.** Effect of Potassium, Magnesium, and Calcium Deficiencies on Carbohydrate Pools and Metabolism in Citrus Leaves. (1995). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120: 54-58.
- **Lea PJ, Mifflin BJ.** Transport and Metabolism of Asparagine and Other Nitrogen Compounds within the Plant. (1980). In: Mifflin BJ, ed. *The Biochemistry of Plants: a Comprehensive Treatise.*, Vol. 5. New York, N.Y., USA; London, England., 569-608
- **Lee RH, Wang CH, Huang LT, Chen SC.** Leaf senescence in rice plants: cloning and characterization of senescence up-regulated genes. (2001). *J. Exp. Bot.* 52: 1117-1121.
- **Lee SC, Luan S.** ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. (2012). *Plant Cell Environ* 35: 53-60.
- **Li JR, Yu K, Wei JR, Ma Q, Wang BQ, Yu D.** Gibberellin retards chlorophyll degradation during senescence of *Paris polyphylla*. (2010). *Biol Plant* 54: 395-399.
- **Li Z, Peng J, Wen X, Guo H.** Gene network analysis and functional studies of senescence-associated genes reveal novel regulators of Arabidopsis leaf senescence. (2012). *Journal of Integrative Plant Biology* 54: 526-539.
- **Li Z, Zhao Y, Liu X, Peng J, Guo H, Luo J.** LSD 2.0: an update of the leaf senescence database. (2014). *Nucleic Acids Res* 42: D1200-1205.
- **Lim PO, Kim HJ, Nam HG.** Leaf Senescence. (2007). *Annual Rev. Plant Biol.* 58: 115-136.
- **Lim PO, Woo HR, Nam HG.** Molecular genetics of leaf senescence in *Arabidopsis*. (2003). *Trends Plant Sci* 8: 272-278.
- **Lin J, Kreisberg R, Kallio A, Dudley AM, Nykter M, Shmulevich I, May P, Autio R.** POMO - Plotting Omics analysis results for Multiple Organisms. (2013). *BMC Genomics* 14: 918.
- **Lin JF, Wu SH.** Molecular events in senescing Arabidopsis leaves. (2004). *Plant J* 39: 612-628.
- **Liu L, Zhou Y, Zhou G, Ye R, Zhao L, Li X, Y L.** Identification of early senescence-associated genes in rice flag leaves. (2008). *Plant Mol Biol* 67: 37-55.
- **Liu R, Lü B, Wang X, Zhang C, Zhang S, Qian J, Chen L, Shi H, Dong H.** Thirty-seven transcription factor genes differentially respond to a harpin protein and affect resistance to the green peach aphid in Arabidopsis. . (2010). *J. Biosci. Bioeng.* 35: 435-450.
- **Liu X, Baird W.** Differential expression of genes regulated in response to drought or salinity stress in sunflower. (2003). *Crop Science* 43: 678-687.
- **Luedemann A, Strassburg K, Erban A, Kopka J.** TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography--mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. (2008). *Bioinformatics* 24: 732-737.
- **Maas EV, Hoffman GJ.** Crop salt tolerance, current assessment. (1977). *J. Irrig. Drain. Div. ASCE* 103: 115-134.
- **Mach JM, Castillo AR, Hoogstraten R, Greenberg JT.** The Arabidopsis-accelerated cell death gene ACD2 encodes red chlorophyll catabolite reductase and suppresses the spread of disease symptoms. (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 771-776.
- **Manavella PA, Arce AL, Dezar CA, Bitton F, Renou J-P, Crespi M, Chan RL.** Cross-talk between ethylene and drought signalling pathways is mediated by the sunflower Hahb-4 transcription factor. (2006). *The Plant Journal* 48: 125-137.
- **Manavella PA, Dezar CA, Ariel FD, Chan RL.** Two ABREs, two redundant root-specific and one W-box cis-acting elements are functional in the sunflower *HAHB4* promoter. (2008a). *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 860-867.

- **Manavella PA, Dezar CA, Ariel FD, Drincovich MF, Chan RL.** The sunflower HD-Zip transcription factor HAHB4 is up-regulated in darkness, reducing the transcription of photosynthesis-related genes. (2008b). *Journal of Experimental Botany* 59: 3143-3155.
- **Manavella PA, Dezar CA, Bonaventure G, Baldwin IT, Chan RL.** HAHB4, a sunflower HD-Zip protein, integrates signals from the jasmonic acid and ethylene pathways during wounding and biotic stress responses. (2008c). *The Plant Journal* 56: 376-388.
- **Marchand G, Mayjonade B, Varès D, Blanchet N, Boniface MC, Maury P, Nambinina FA, Burger P, Debaeke P, Casadebaig P, Vincourt P, Langlade NB.** A biomarker based on gene expression indicates plant water status in controlled and natural environments. (2013). *Plant Cell Environ* 36: 2175-2189.
- **Martin A, Lee J, Kichey T, Gerentes D, Zivy M, Tatout C, Dubois F, Balliau T, Valot B, Davanture M, Terce-Laforgue T, Quillere I, Coque M, Gallais A, Gonzalez-Moro MB, Bethencourt L, Habash DZ, Lea PJ, Charcosset A, Perez P, Murigneux A, Sakakibara H, Edwards KJ, Hirel B.** Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. (2006). *Plant Cell* 18: 3252-3274.
- **Masclaux-Daubresse C, Carrayol E, Valadier MH.** The two nitrogen mobilisation- and senescence-associated GS1 and GDH genes are controlled by C and N metabolites. (2005). *Planta* 221: 580-588.
- **Masclaux C, Valadier MH, Brugiere N, Morot-Gaudry JF, Hirel B.** Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. (2000). *Planta* 211: 510-518.
- **Matallana-Ramirez LP, Rauf M, Farage-Barhom S, Dortay H, Xue GP, Droge-Laser W, Lers A, Balazadeh S, Mueller-Roeber B.** NAC Transcription Factor ORE1 and Senescence-Induced BIFUNCTIONAL NUCLEASE1 (BFN1) Constitute a Regulatory Cascade in Arabidopsis. (2013). *Mol Plant*.
- **McGrath SP, Zhao FJ.** Sulphur uptake, yield responses and the interactions between nitrogen and sulphur in winter oilseed rape (*Brassica napus*). (1996). *Journal of Agricultural Science* 126: 53-62.
- **McIntyre GI.** The role of nitrate in the osmotic and nutritional control of plant development. (1997). *Aust J Plant Physiol* 24: 103-118.
- **Medford JI, Horgan R, El-Sawi Z, Klee HJ.** Alterations of Endogenous Cytokinins in Transgenic Plants Using a Chimeric Isopentenyl Transferase Gene. (1989). *Plant Cell* 1: 403-413.
- **Miao Y, Smykowski A, Zentgraf U.** A novel upstream regulator of WRKY53 transcription during leaf senescence in Arabidopsis thaliana. (2008). *Plant Biol (Stuttg)* 10 Suppl 1: 110-120.
- **Minamikawa T, Toyooka K, Okamoto T, Hara-Nishimura I, Nishimura M.** Degradation of ribulose-bisphosphate carboxylase by vacuolar enzymes of senescing French bean leaves: immunocytochemical and ultrastructural observations. (2001). *Protoplasma* 218: 144-153.
- **Mira H, Martinez N, Penarrubia L.** Expression of a vegetative-storage-protein gene from Arabidopsis is regulated by copper, senescence and ozone. (2002). *Planta* 214: 939-946.
- **Mitsuhashi W, Feller U.** Effects of Light and External Solutes on the Catabolism of Nuclear-Encoded Stromal Proteins in Intact Chloroplasts Isolated from Pea Leaves. (1992). *Plant Physiol* 100: 2100-2105.
- **Molina-Torres J, Martinez ML.** Tocopherols and leaf age in *Xanthium strumarium* L. (1991). *New Phytol* 118: 95-99.
- **Montaner D, Dopazo J.** Multidimensional gene set analysis of genomic data. (2010). *PLoS ONE* 5: e10348.

-
- **Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng WH, Liu YX, Hwang I, Jones T, Sheen J.** Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. (2003). *Science* 300: 332-336.
 - **Morris K, MacKerness SA, Page T, John CF, Murphy AM, Carr JP, Buchanan-Wollaston V.** Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. (2000). *Plant J* 23: 677-685.
 - **Moschen S, Bengoa-Luoni S, Paniego N, Hopp HE, Dosio G, Fernandez P, Heinz RA.** Identification of potential biomarker genes associated with leaf senescence in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). (2014a). *Enviado para ser publicado en PlosOne*.
 - **Moschen S, Radonic LM, Ehrenbolger GF, Fernández P, Lía V, Paniego NB, López Bilbao M, Heinz RA, Hopp HE.** Functional Genomics and Transgenesis Applied to Sunflower Breeding. (2014b). In: Arribas JI, ed. *Sunflowers: Growth and Development, Environmental Influences and Pests/Diseases*. Nova Science Pubs. New York, USA. *Aceptado para publicación*.
 - **Muchero W, Roberts PA, Diop NN, Drabo I, Cisse N, Close TJ, Muranaka S, Boukar O, Ehlers JD.** Genetic Architecture of Delayed Senescence, Biomass, and Grain Yield under Drought Stress in Cowpea. (2013). *PLoS ONE* 8: e70041.
 - **Mungall CJ, Emmert DB.** A Chado case study: an ontology-based modular schema for representing genome-associated biological information. (2007). *Bioinformatics* 23: i337-346.
 - **Munne-Bosch S, Alegre L.** Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts. (2002). *Planta* 214: 608-615.
 - **Munne-Bosch S, Alegre L.** Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. (2004). *Functional Plant Biology* 31: 203-216.
 - **Nam HG.** The molecular genetic analysis of leaf senescence. (1997). *Curr Opin Biotechnol* 8: 200-207.
 - **Nasser LEA.** Interactive Effects of Nitrogen Starvation and Different Temperatures on Senescence of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Leaves Associated with the Changes in RNA, Protein and Activity of Some Enzymes of Nitrogen Assimilation. (2002). *Journal of Biological Sciences* 2: 463-469.
 - **Nobeli I, Ponstingl H, Krissinel EB, Thornton JM.** A structure-based anatomy of the E.coli metabolome. (2003). *J Mol Biol* 334: 697-719.
 - **Noodén L, Letham DS.** Cytokinin metabolism and signaling in the soybean plant. (1993). *Aust. J. Plant Physiol.* 20: 639-653.
 - **Noodén L, Murray B.** Transmission of the monocarpic senescence signal via the xylem in soybean. (1982). *Plant Physiol* 69: 754-756.
 - **Noodén L, Penny J.** Correlative controls of senescence and plant death in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). (2001). *J. Exp. Bot.* 52: 2151-2159.
 - **Nooden LD.** Whole plant senescence. (1988). In: AC L, ed. *Senescence and aging in plants.*: Academic Press, San Diego, 392-439.
 - **Noodén LD, Guamet JJ, Isaac J.** Senescence mechanisms. (1997). *Physiologia plantarum* 101: 746-753.
 - **Nuruzzaman M, Manimekalai R, Sharoni AM, Satoh K, Kondoh H, Ooka H, Kikuchi S.** Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. (2010). *Gene* 465: 30-44.
 - **Obata T, Fernie A.** The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. (2012). *Cell. Mol. Life Sci.*

- **Ott KH, Aranibar N, Singh B, Stockton GW.** Metabonomics classifies pathways affected by bioactive compounds. Artificial neural network classification of NMR spectra of plant extracts. (2003). *Phytochemistry* 62: 971-985.
- **Ouvrard O, Cellier F, Ferrare K, Tousch D, Lamaze T, Dupuis JM, Casse-Delbart F.** Identification and expression of water stress- and abscisic acid-regulated genes in a drought-tolerant sunflower genotype. (1996). *Plant Mol Biol* 31: 819-829.
- **Pageau K, Reisdorf-Cren M, Morot-Gaudrory JF, Masclaux-Daubresse C.** The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. (2006). *J. Exp. Bot.* 57: 547-557.
- **Paniego N, Bazzalo ME, Bulos M, Lia V, Fusari C, Altieri E, Ramos ML, Galella MT, Kaspar M, Escande A, Zambelli A, Sala C.** Genomics, mapping and marker assisted selection strategies for disease resistance. (2012). *Proceedings 18th International Sunflower Conference*. Mar del Plata, Argentina, 44-50.
- **Paniego N, Heinz R, Fernandez P, Talia P, Nishinakamasu V, Hopp H. Sunflower.** (2007). In: Kole C, ed. *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*, Vol. 2. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 153-177.
- **Paolacci A, Tanzarella O, Porceddu E, Ciaffi M.** Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. (2009). *BMC Molecular Biology* 10:11.
- **Park JH, Oh SA, Kim YH, Woo HR, Nam HG.** Differential expression of senescence-associated mRNAs during leaf senescence induced by different senescence-inducing factors in Arabidopsis. (1998). *Plant Mol Biol* 37: 445-454.
- **Peluffo L, Lia V, Troglia C, Maringolo C, Norma P, Escande A, Esteban Hopp H, Lytovchenko A, Fernie AR, Heinz R, Carrari F.** Metabolic profiles of sunflower genotypes with contrasting response to *Sclerotinia sclerotiorum* infection. (2010). *Phytochemistry* 71: 70-80.
- **Perez-Rodriguez P, Riano-Pachon DM, Correa LG, Rensing SA, Kersten B, Mueller-Roeber B.** PInTFDB: updated content and new features of the plant transcription factor database. (2010). *Nucleic Acids Res* 38: D822-827.
- **Perilli S, Moubayidin L, Sabatini S.** The molecular basis of cytokinin function. (2010). *Curr Opin Plant Biol* 13: 21-26.
- **Philosophhadas S, Meir S, Aharoni N.** Role of ethylene in senescence of watercress leaves. (1994). *Physiol. Plant.* 90: 553-559.
- **Pic E, Teyssandier de la Serve B, Tardieu F, Turc O.** Leaf senescence induced by mild water deficit follows the same sequence of macroscopic, biochemical, and molecular events as monocarpic senescence in pea. (2002). *Plant Physiol* 128: 236-246.
- **Pichersky E, Noel JP, Dudareva N.** Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. (2006). *Science* 311: 808-811.
- **Podwyszynska M, Goszczynska DM.** Effect of inhibitors of ethylene biosynthesis and action, as well as calcium and magnesium on rose shoot rooting, shoot-tip necrosis and leaf senescence *in vitro*. (1998). *Acta Physiol. Plant.* 20: 91-98.
- **Pommel B, Gallais A, Coque M, Quillere I, Hirel B, Prioul JL, Andrieu B, Floriot M.** Carbon and nitrogen allocation and grain filling in three maize hybrids differing in leaf senescence. (2006). *Eur J Agron* 24: 203-211.
- **Pruzinska A, Tanner G, Anders I, Roca M, Hortensteiner S.** Chlorophyll breakdown: pheophorbide a oxygenase is a Rieske-type iron-sulfur protein, encoded by the accelerated cell death 1 gene. (2003). *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15259-15264.

- **Quadrana L, Almeida J, Otaiza SN, Duffy T, Correa da Silva JV, de Godoy F, Asis R, Bermudez L, Fernie AR, Carrari F, Rossi M.** Transcriptional regulation of tocopherol biosynthesis in tomato. (2013). *Plant Mol Biol* 81: 309-325.
- **Quirino BF, Noh YS, Himelblau E, Amasino RM.** Molecular aspects of leaf senescence. (2000). *Trends Plant Sci* 5: 278-282.
- **Quirino BF, Normanly J, Amasino RM.** Diverse range of gene activity during Arabidopsis thaliana leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. (1999). *Plant Mol Biol* 40: 267-278.
- **Quirino BF, Reiter WD, Amasino RD.** One of two tandem Arabidopsis genes homologous to monosaccharide transporters is senescence-associated. (2001). *Plant Mol Biol* 46: 447-457.
- **R Core Team.** R: A language and environment for statistical computing. (2012). Vienna, Austria.: R Foundation for Statistical Computing.
- **Radwanski ER, Last RL.** Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. (1995). *Plant Cell* 7: 921-934.
- **Rao SSR, Vidya Vardhini B, Sujatha E, Anuradha S.** Brassinosteroids: a new class of phytohormones. (2002). *Curr Sci* 82: 1239-1245.
- **Rauf M, Arif M, Dortay H, Matallana-Ramirez LP, Waters MT, Gil Nam H, Lim PO, Mueller-Roeber B, Balazadeh S.** ORE1 balances leaf senescence against maintenance by antagonizing G2-like-mediated transcription. (2013). *EMBO Rep* 14: 382-388.
- **Raven PH, Axelrod DI.** Angiosperm biogeography and past continental movements. (1974). *Ann. Missouri Bot. Garden* 61: 539-673.
- **Reyes-Arribas T, Barrett JE, Huber DJ, Nell TA, Clark DG.** Leaf senescence in a non-yellowing cultivar of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*). (2001). *Physiol Plant* 111: 540-544.
- **Riechmann JL, Meyerowitz EM.** The AP2/EREBP family of plant transcription factors. (1998). *Biol Chem* 379: 633-646.
- **Rise M, Cojocar M, Gottlieb HE, Goldschmidt EE.** Accumulation of alpha-Tocopherol in Senescing Organs as Related to Chlorophyll Degradation. (1989). *Plant Physiol* 89: 1028-1030.
- **Rivero RM, Gimeno J, Van Deynze A, Walia H, Blumwald E.** Enhanced cytokinin synthesis in tobacco plants expressing PSARK::IPT prevents the degradation of photosynthetic protein complexes during drought. (2010). *Plant Cell Physiol* 51: 1929-1941.
- **Rivero RM, Kojima M, Gepstein A, Sakakibara H, Mittler R, Gepstein S, Blumwald E.** Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. (2007). *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 19631-19636.
- **Rivero RM, Shulaev V, Blumwald E.** Cytokinin-dependent photorespiration and the protection of photosynthesis during water deficit. (2009). *Plant Physiol* 150: 1530-1540.
- **Roberts IN, Caputo C, Criado MV, Funk C.** Senescence-associated proteases in plants. (2012). *Physiol Plant* 145: 130-139.
- **Roberts MR.** Does GABA Act as a Signal in Plants?: Hints from Molecular Studies. (2007). *Plant Signal Behav.* 2: 408-409.
- **Roche J, Hewezi T, Bouniols A, Gentzmittel L.** Transcriptional profiles of primary metabolism and signal transduction-related genes in response to water stress in field-grown sunflower genotypes using a thematic cDNA microarray. (2007). *Planta* 226: 601-617.
- **Rodrigues C, Vandenberghe LP, de Oliveira J, Soccol CR.** New perspectives of gibberellic acid production: a review. (2012). *Crit Rev Biotechnol* 32: 263-273.
- **Roessner-Tunali U, Hegemann B, Lytovchenko A, Carrari F, Bruedigam C, Granot D, Fernie A.** Metabolic profiling of transgenic tomato plants overexpressing hexokinase reveals that the

influence of hexose phosphorylation diminishes during fruit development. (2003). *Plant Physiol* 133: 84-99.

- **Roessner U, Luedemann A, Brust D, Fiehn O, Linke T, Willmitzer L, Fernie A.** Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. (2001a). *Plant Cell* 13: 11-29.

- **Roessner U, Wagner C, Kopka J, Trethewey RN, Willmitzer L.** Technical advance: simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. (2000). *Plant J* 23: 131-142.

- **Roessner U, Willmitzer L, Fernie AR.** High-resolution metabolic phenotyping of genetically and environmentally diverse potato tuber systems. Identification of phenocopies. (2001b). *Plant Physiol* 127: 749-764.

- **Roitsch T, Gonzalez MC.** Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. (2004). *Trends Plant Sci* 9: 606-613.

- **Rolland F, Moore B, Sheen J.** Sugar sensing and signaling in plants. (2002). *Plant Cell* 14 Suppl: S185-205.

- **Rotter A, Usadel B, Baebler S, Stitt M, Gruden K.** Adaptation of the MapMan ontology to biotic stress responses: application in solanaceous species. (2007). *Plant Methods* 3: 10.

- **Roulin S, Feller U.** Light-independent degradation of stromal protein in intact chloroplast isolated from *Pisum sativum* L. leaves: Requirement for divalent cations. (1998). *Planta* 205: 297-304.

- **Rousseaux MC, Hall AJ, Sanchez RA.** Far-red enrichment and photosynthetically active radiation level influence leaf senescence in field-grown sunflower. (1996). *Physiol Plant* 96: 217-224.

- **Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, Moorman AF.** Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. (2009). *Nucleic Acids Res* 37: e45.

- **Rushton DL, Tripathi P, Rabara RC, Lin J, Ringler P, Boken AK, Langum TJ, Smidt L, Boomsma DD, Emme NJ, Chen X, Finer JJ, Shen QJ, Rushton PJ.** WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signalling. (2012). *Plant Biotechnol J* 10: 2-11.

- **Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ.** WRKY transcription factors. (2010). *Trends Plant Sci* 15: 247-258.

- **Saadia M, Jamil A, Ashraf M, Akram NA.** Comparative Study of SOS2 and a Novel PMP3-1 Gene Expression in Two Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Lines Differing in Salt Tolerance. (2013). *Appl Biochem Biotechnol* 170: 980-987.

- **Sadras VO, Echarte L, Andrade FH.** Profiles of Leaf Senescence During Reproductive Growth of Sunflower and Maize. (2000a). *Annals of Botany* 85: 187-195.

- **Sadras VO, Quiroz F, Echarte L, Escande A, Pereyra VR.** Effect of *Verticillium dahliae* on Photosynthesis, Leaf Expansion and Senescence of Field-grown Sunflower. (2000b). *Annals of Botany* 86: 1007-1015.

- **Sadras VO, Whitfield DM, Connor DJ.** Regulation of evapotranspiration and its partitioning between transpiration and soil evaporation by sunflower crops. A comparison between hybrids of different stature. (1991). *Field Crops Research* 28: 17-37.

- **Sakurai N, Hayakawa T, Nakamura T, Yamaya T.** Changes in the cellular localization of cytosolic glutamine synthetase protein in vascular bundles of rice leaves at various stages of development. (1996). *Planta* 200: 306-311.

-
- **Sala C, Bulos M, Altieri E, ML. R.** Sunflower: Improving Crop Productivity and Abiotic Stress Tolerance. (2012). In: Nar endra Tuteja SSG, Antoni o F. Tiburcio, and Renu Tuteja, ed. *Improving Crop Resistance to Abiotic Stress: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.*
 - **Sartor MA, Leikauf GD, Medvedovic M.** LRpath: a logistic regression approach for identifying enriched biological groups in gene expression data. (2009). *Bioinformatics* 25: 211-217.
 - **Sauter H, Lauer M, Fritsch H.** Metabolic profiling of plants--a new diagnostic technique. (1991). *ACS symposium series. American Chemical Society:* 288-299.
 - **Schauer N, Fernie AR.** Plant metabolomics: towards biological function and mechanism. (2006). *Trends Plant Sci* 11: 508-516.
 - **Scherer HW.** Sulphur in crop production: invited paper. (2001). *European Journal of Agronomy* 14: 81-100.
 - **Schiltz S, Gallardo K, Huart M, Negroni L, Sommerer N, Burstin J.** Proteome reference maps of vegetative tissues in pea. An investigation of nitrogen mobilization from leaves during seed filling. (2004). *Plant Physiol* 135: 2241-2260.
 - **Schilling EE, Heiser CB.** An infrageneric classification of *Helianthus* (Compositae) (1981). *Taxon* 30: 393-403.
 - **Schippers JHM, Jing HC, Hille J, Dijkwel PP.** Developmental and hormonal control of leaf senescence. (2007). In: Gan S, ed. *Senescence processes in plants:* Blackwell Publishing Ltd., 145-170.
 - **Schneiter AA, Miller JF.** Description of sunflower growth stages. (1981). *Crop Science* 21: 901-903.
 - **Seiler GJ.** Anatomy and morphology of sunflower. (1997). In: Schneiter AA, ed. *Sunflower technology and production.* Madison, Wis. USA: American Society of Agronomy, 67-111.
 - **Sekhon RS, Childs KL, Santoro N, Foster CE, Buell CR, de Leon N, Kaepler SM.** Transcriptional and metabolic analysis of senescence induced by preventing pollination in maize. (2012). *Plant Physiol* 159: 1730-1744.
 - **Shah ST, Pang C, Fan S, Song M, Arain S, Yu S.** Isolation and expression profiling of GhNAC transcription factor genes in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) during leaf senescence and in response to stresses. (2013). *Gene* 531: 220-234.
 - **Shan W, Kuang JF, Chen L, Xie H, Peng HH, Xiao YY, Li XP, Chen WX, He QG, Chen JY, Lu WJ.** Molecular characterization of banana NAC transcription factors and their interactions with ethylene signalling component EIL during fruit ripening. (2012). *J Exp Bot* 63: 5171-5187.
 - **Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T.** Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. (2003). *Genome Res* 13: 2498-2504.
 - **Shulaev V.** Metabolomics technology and bioinformatics. (2006). *Brief Bioinform* 7: 128-139.
 - **Shulaev V, Cortes D, Miller G, Mittler R.** Metabolomics for plant stress response. (2008). *Physiol Plant* 132: 199-208.
 - **Singh AK, Sharma V, Pal AK, Acharya V, Ahuja PS.** Genome-wide organization and expression profiling of the NAC transcription factor family in potato (*Solanum tuberosum* L.). (2013). *DNA Res* 20: 403-423.
 - **Smart CM.** Gene expression during leaf senescence. (1994). *New Phytol.* 126: 419-448
 - **Smeekens S, Ma J, Hanson J, Rolland F.** Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. (2010). *Curr Opin Plant Biol* 13: 274-279.

-
- **Smyth G**. Limma: linear models for microarray data. (2005). In: Gentleman R, Carey V, Dudoit S, Irizarry R, Huber W, eds. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. New York: Springer, 397-420.
 - **Sood S, Nagar PK**. The effect of polyamines on leaf senescence in two diverse rose species. (2003). *Plant Growth Regul.* 39: 155-160.
 - **Spearman C**. The proof and measurement of association between two things. (1904). *Am J Psychol* 15: 72-101.
 - **Sperdouli I, Moustakas M**. Interaction of proline, sugars, and anthocyanins during photosynthetic acclimation of *Arabidopsis thaliana* to drought stress. (2012). *J Plant Physiol* 169: 577-585.
 - **Su H, Zhang S, Yuan X, Chen C, Wang XF, Hao YJ**. Genome-wide analysis and identification of stress-responsive genes of the NAM-ATAF1,2-CUC2 transcription factor family in apple. (2013). *Plant Physiol Biochem* 71: 11-21.
 - **Sullivan JA, Shirasu K, Deng XW**. The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants. (2003). *Nat Rev Genet* 4: 948-958.
 - **Tabuchi M, Abiko T, Yamaya T**. Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). (2007). *J Exp Bot* 58: 2319-2327.
 - **Tang G, Miron D, Zhu-Shimoni JX, Galili G**. Regulation of lysine catabolism through lysine-ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase in *Arabidopsis*. (1997). *Plant Cell* 9: 1305-1316.
 - **Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD**. A biochemical framework for RNA silencing in plants. (2003). *Genes Dev* 17: 49-63.
 - **Tellstrom V, Usadel B, Thimm O, Stitt M, Kuster H, Niehaus K**. The lipopolysaccharide of *Sinorhizobium meliloti* suppresses defense-associated gene expression in cell cultures of the host plant *Medicago truncatula*. (2007). *Plant Physiol* 143: 825-837.
 - **Thimm O, Blasing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Kruger P, Selbig J, Muller LA, Rhee SY, Stitt M**. MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. (2004). *Plant J* 37: 914-939.
 - **Thomas H**. Senescence, ageing and death of the whole plant. (2013). *New Phytol* 197: 696-711.
 - **Thomas H, Donnison I**. Back from the brink: plant senescence and its reversibility. (2000). *Symp Soc Exp Biol* 52: 149-162.
 - **Thompson J, Taylor C, Wang TW**. Altered membrane lipase expression delays leaf senescence. (2000). *Biochem Soc Trans* 28: 775-777.
 - **Thompson JE, Froese CD, Madey E, Smith MD, Hong Y**. Lipid metabolism during plant senescence. (1998). *Prog Lipid Res* 37: 119-141.
 - **Tikunov Y, Lommen A, de Vos CH, Verhoeven HA, Bino RJ, Hall RD, Bovy AG**. A novel approach for nontargeted data analysis for metabolomics. Large-scale profiling of tomato fruit volatiles. (2005). *Plant Physiol* 139: 1125-1137.
 - **Tollenaar M, Daynard TB**. Leaf senescence in short-season maize hybrids. . (1978). *Can J Plant Sci* 58: 869-874.
 - **Tommasini R, Vogt E, Fromenteau M, Hortensteiner S, Matile P, Amrhein N, Martinoia E**. An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. (1998). *Plant J* 13: 773-780.

- **Tsuchiya T, Ohta H, Okawa K, Iwamatsu A, Shimada H, Masuda T, Takamiya K.** Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate. (1999). *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 15362-15367.
- **Uauy C, Brevis JC, Dubcovsky J.** The high grain protein content gene Gpc-B1 accelerates senescence and has pleiotropic effects on protein content in wheat. (2006). *J. Exp. Bot.*: [Online Early-julio 2006].
- **Ulker B, Shahid Mukhtar M, Somssich IE.** The WRKY70 transcription factor of Arabidopsis influences both the plant senescence and defense signaling pathways. (2007). *Planta* 226: 125-137.
- **Ulker B, Somssich IE.** WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. (2004). *Curr Opin Plant Biol* 7: 491-498.
- **Urbanczyk-Wochniak E, Usadel B, Thimm O, Nunes-Nesi A, Carrari F, Davy M, Blasing O, Kowalczyk M, Weicht D, Polinceusz A, Meyer S, Stitt M, Fernie AR.** Conversion of MapMan to allow the analysis of transcript data from Solanaceous species: effects of genetic and environmental alterations in energy metabolism in the leaf. (2006). *Plant Mol Biol* 60: 773-792.
- **Urquhart AA, Joy KW.** Use of Phloem Exudate Technique in the Study of Amino-Acid-Transport in Pea-Plants. (1981). *Plant Physiology* 68: 750-754
- **Vaezi B, Bavei V, Shiran B.** Screening of barley genotypes for drought tolerance by agro-physiological traits in field condition. (2010). *Afr J Agric Res* 5: 881-292.
- **van Doorn WG.** Is petal senescence due to sugar starvation? (2004). *Plant Physiology* 134: 35-42.
- **van Doorn WG.** Is the onset of senescence in leaf cells of intact plants due to low or high sugar levels? (2008). *Journal of Experimental Botany* 59: 963-1972.
- **Veena, Reddy VS, Sopory SK.** Glyoxalase I from Brassica juncea: molecular cloning, regulation and its over-expression confer tolerance in transgenic tobacco under stress. (1999). *Plant J* 17: 385-395.
- **Vierstra RD.** The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. (2003). *Trends Plant Sci* 8: 135-142.
- **Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF.** Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. (2009). *Annu Rev Phytopathol* 47: 177-206.
- **Wang X, Basnayake BM, Zhang H, Li G, Li W, Virk N, Mengiste T, Song F.** The Arabidopsis ATAF1, a NAC transcription factor, is a negative regulator of defense responses against necrotrophic fungal and bacterial pathogens. (2009). *Mol Plant Microbe Interact* 22: 1227-1238.
- **Wang YX.** Characterization of a novel Medicago sativa NAC transcription factor gene involved in response to drought stress. (2013). *Mol Biol Rep* 40: 6451-6458.
- **Wasternack C.** Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. (2007). *Ann Bot* 100: 681-697.
- **Watanabe A, Imaseki H.** Changes in translatable mRNA in senescing wheat leaves. (1982). *Plant Cell Physiol* 23: 489-497.
- **Watanabe M, Balazadeh S, Tohge T, Erban A, Giavalisco P, Kopka J, Mueller-Roeber B, Fernie AR, Hoefgen R.** Comprehensive Dissection of Spatiotemporal Metabolic Shifts in Primary, Secondary, and Lipid Metabolism during Developmental Senescence in Arabidopsis. (2013). *Plant Physiol* 162: 1290-1310.
- **Weaver LM, Gan S, Quirino B, Amasino RM.** A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. (1998). *Plant Mol Biol* 37: 455-469.

-
- **Weidhase R, Kramell HM, Lehmann J, Liebisch HW, Lerbs W, Partier B.** Methyl jasmonate-induced changes in the polypeptide pattern of senescing barley leaf segments. (1987). *Plant Sci* 51: 177–186.
 - **Westerhoff HV, Palsson BO.** The evolution of molecular biology into systems biology. (2004). *Nat Biotechnol* 22: 1249-1252.
 - **Whitfield DM, Connor DJ, Hall AJ.** Carbon dioxide balance of sunflower (*Helianthus annuus*) subjected to water stress during grain-filling. (1989). *Field Crop Res.*: 65-80.
 - **Wiedemuth K, Muller J, Kahlau A, Amme S, Mock HP, Grzam A, Hell R, Egle K, Beschow H, Humbeck K.** Successive maturation and senescence of individual leaves during barley whole plant ontogeny reveals temporal and spatial regulation of photosynthetic function in conjunction with C and N metabolism. (2005). *J Plant Physiol* 162: 1226-1236.
 - **Wingler A, Delatte TL, O'Hara LE, Primavesi LF, Jhurreea D, Paul MJ, Schluempmann H.** Trehalose 6-phosphate is required for the onset of leaf senescence associated with high carbon availability. (2012). *Plant Physiol* 158: 1241-1251.
 - **Wingler A, Masclaux-Daubresse C, Fischer AM.** Sugars, senescence, and ageing in plants and heterotrophic organisms. (2009). *J Exp Bot* 60: 1063-1066.
 - **Wingler A, Purdy S, MacLean JA, Pourtau N.** The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. (2006). *J Exp Bot* 57: 391-399.
 - **Wingler A, Roitsch T.** Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses. (2008). *Plant Biol (Stuttg)* 10 Suppl 1: 50-62.
 - **Wingler A, Von Schaewen A, Leegood RC, Lea PL, Quick PW.** Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light. (1998). *Plant Physiol* 116: 329–335.
 - **Wink M.** Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. (2003). *Phytochemistry* 64: 3-19.
 - **Wittenbach VA.** Effect of pod removal on leaf photosynthesis and soluble protein composition of field-grown soybeans. (1983). *Plant Physiol* 73: 121-124.
 - **Wittstock U, Halkier BA.** Glucosinolate research in the Arabidopsis era. (2002). *Trends Plant Sci* 7: 263-270.
 - **Wolfender JL, Rudaz S, Choi YH, Kim HK.** Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers. (2013). *Curr Med Chem* 20: 1056-1090.
 - **Wu A, Allu AD, Garapati P, Siddiqui H, Dortay H, Zanol MI, Asensi-Fabado MA, Munne-Bosch S, Antonio C, Tohge T, Fernie AR, Kaufmann K, Xue GP, Mueller-Roeber B, Balazadeh S.** JUNGBRUNNEN1, a reactive oxygen species-responsive NAC transcription factor, regulates longevity in Arabidopsis. (2012). *Plant Cell* 24: 482-506.
 - **Wuthrich KL, Bovet L, Hunziker PE, Donnison IS, Hortensteiner S.** Molecular cloning, functional expression and characterisation of RCC reductase involved in chlorophyll catabolism. (2000). *Plant J* 21: 189-198.
 - **Xiong L, Zhu JK.** Regulation of abscisic acid biosynthesis. (2003). *Plant Physiol* 133: 29-36.
 - **Yang J, Zhang J, Wang Z, Zhu Q, Liu L.** Water deficit-induced senescence and its relationship to the remobilization of pre-stored carbon in wheat during grain filling. (2001). *Agron. J.*: 196-206.
 - **Yang J, Zhang J, Wang Z, Zhu Q, Liu L.** Abscisic acid and cytokinins in the root exudates and leaves and their relationship to senescence and remobilization of carbon reserves in rice subjected to water stress during grain filling. (2002). *Planta* 215: 645-652.
 - **Yoshida S.** Molecular regulation of leaf senescence. (2003). *Curr Opin Plant Biol* 6: 79-84.

-
- **Yu K, Wang Y, Wei J, Ma Q, Yu D, Li J.** Improving rhizome yield and quality of *Paris polyphylla* through gibberellic acid-induced retardation of senescence of aerial parts. (2009). *Plant Signal Behav* 4: 413-415.
 - **Zacarias L, Reid MS.** Role of growth-regulators in the senescence of *Arabidopsis thaliana* leaves. (1990). *Physiol Plant.* 80: 549-554.
 - **Zapata JM, Guera A, Esteban-Carrasco A, Martin M, Sabater B.** Chloroplasts regulate leaf senescence: delayed senescence in transgenic *ndhF*-defective tobacco. (2005). *Cell Death Differ* 12: 1277-1284.
 - **Zavaleta-Mancera HA, Thomas BJ, Thomas H, Scott IM.** Regreening of senescence *Nicotiana* leaves. II. Redifferentiation of plastids. (1999). *J. Exp. Bot.* 50: 1683-1689.
 - **Zhang MP, Zhang CJ, Yu GH, Jiang YZ, Strasser RJ, Yuan ZY, Yang XS, Chen GX.** Changes in chloroplast ultrastructure, fatty acid components of thylakoid membrane and chlorophyll a fluorescence transient in flag leaves of a super-high-yield hybrid rice and its parents during the reproductive stage. (2010). *J Plant Physiol* 167: 277-285.
 - **Zhang X, Ju HW, Chung MS, Huang P, Ahn SJ, Kim CS.** The R-R-type MYB-like transcription factor, *AtMYBL*, is involved in promoting leaf senescence and modulates an abiotic stress response in *Arabidopsis*. (2011). *Plant Cell Physiol* 52: 138-148.
 - **Zhao YM, Xu R, Luo W.** Antagonist effect of ABA on detached cucumber cotyledon senescence induced by *eBR*. (1990). *Chinese Sci. Bullet.* 35: 928-931.
 - **Zhou X, Jiang Y, Yu D.** *WRKY22* transcription factor mediates dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. (2011). *Mol Cells* 31: 303-313.
 - **Zhou Y, Huang W, Liu L, Chen T, Zhou F, Lin Y.** Identification and functional characterization of a rice NAC gene involved in the regulation of leaf senescence. (2013). *BMC Plant Biol* 13: 132.

APÉNDICE

Tabla A3.1: Genes SAGs con mayor tasa de cambio durante la senescencia natural en el experimento de campo.

Los valores de expresión se encuentran en escala logarítmica en base 2 para cada uno de los contrastes: T1-T0 (Tiempo 1 – Tiempo 0) y T2-T0 (Tiempo 2 – Tiempo 0)

Unigen girasol	Alta similitud con Arabidopsis	Función	log2 T1-T0	log2 T2-T0	Descripción
HeAn_C_1184	AT5G42270	Chlorophyll degradation	-2,58	-2,45	FtsH extracellular protease family
HeAn_S_37374	AT4G11910	Chlorophyll degradation	3,27	4,07	
HeAn_S_37058	AT5G13200	Hormone response pathway:ABA	1,99	2,25	GRAM domain family protein
HeAn_C_509	AT1G75450	Hormone response pathway:CK	-2,49	-3,16	cytokinin oxidase 5
HeAn_C_6755	AT2G33150	Hormone response pathway:JA	1,83	2,20	peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase 3
HeAn_S_25592	AT1G79680	Lipid/Carbohydrate metabolism	-2,11	-2,33	WALL ASSOCIATED KINASE (WAK)-LIKE 10
HeAn_S_21409	AT1G53310	Lipid/Carbohydrate metabolism	-2,10	-2,13	phosphoenolpyruvate carboxylase 1
HeAn_C_12878	AT1G21240	Lipid/Carbohydrate metabolism	-1,44	-2,02	wall associated kinase 3
HeAn_S_13324	AT2G42790	Lipid/Carbohydrate metabolism	1,63	2,19	citrate synthase 3
HeAn_C_12396	AT2G31390	Lipid/Carbohydrate metabolism	3,59	4,00	pfkB-like carbohydrate kinase family protein
HeAn_S_34239	AT2G45220	Lipid/Carbohydrate metabolism	3,76	4,17	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily
HeAn_C_5147	AT5G65110	Lipid/Carbohydrate metabolism:fatty acid catabolism	2,16	2,27	acyl-CoA oxidase 2
HeAn_C_3979	AT1G54100	Lipid/Carbohydrate metabolism:fatty acid catabolism	2,73	3,17	aldehyde dehydrogenase 7B4
HeAn_C_163	AT4G37990	Lipid/Carbohydrate metabolism:Mannitol	-2,96	-3,70	elicitor-activated gene 3-2
HeAn_C_11408	AT3G17810	Nucleic acid degradation	2,72	3,98	pyrimidine 1
HeAn_C_3955	AT1G11190	Nucleic acid degradation:RNA and DNA degradation	0,34	3,64	bifunctional nuclease i
HeAn_C_3517	AT4G10380	Nutrient recycling	-3,91	-3,85	NOD26-like intrinsic protein 5;1
HeAn_S_21426	AT5G46180	Nutrient recycling	1,84	2,01	ornithine-delta-aminotransferase
HeAn_S_22977	AT5G13750	Nutrient recycling	2,14	2,55	zinc induced facilitator-like 1
HeAn_C_12388	AT1G58030	Nutrient recycling	2,71	2,72	cationic amino acid transporter 2
HeAn_C_1716	AT2G26230	Nutrient recycling	2,79	2,27	uricase / urate oxidase / nodulin 35, putative
HeAn_S_21335	AT1G32450	Nutrient recycling	2,91	2,77	nitrate transporter 1.5
HeAn_S_39024	AT4G33150	Nutrient recycling	4,78	4,90	lysine-ketoglutarate reductase
HeAn_S_37701	AT1G80160	Nutrient recycling	5,51	6,59	Lactoylglutathione lyase / glyoxalase I family protein
HeAn_S_27145	AT2G38940	Nutrient recycling	6,31	4,97	phosphate transporter 1;4
HeAn_C_11320	AT1G15380	Nutrient recycling	7,19	8,61	Lactoylglutathione lyase / glyoxalase I family protein
HeAn_C_6293	AT1G58360	Nutrient recycling:Amino acid transport	-2,01	-1,30	amino acid permease 1
HeAn_S_13856	AT3G60640	Nutrient recycling:Autophagy	2,32	3,16	Ubiquitin-like superfamily protein
HeAn_S_37067	AT5G39670	Nutrient recycling:Calcium	4,18	3,73	Calcium-binding EF-hand family protein
HeAn_S_25880	AT2G41220	Nutrient recycling:N mobilization and transport	-2,28	-2,65	glutamate synthase 2

HeAn_S_28865	AT5G51070	Others:Defense and cell rescue mechanisms	2,53	2,29	Clp ATPase
HeAn_C_3900	AT4G12290	Others:Detoxification	-3,92	-3,42	Copper amine oxidase family protein
HeAn_C_719	AT1G78380	Others:Detoxification	2,40	2,85	glutathione S-transferase TAU 19
HeAn_C_11165	AT5G01600	Others:Detoxification	3,77	3,36	ferretin 1
HeAn_C_2113	AT1G21000	Others:Metal binding	3,36	3,39	PLATZ transcription factor family protein
HeAn_C_11547	AT1G76590	Others:Metal binding	3,41	3,25	PLATZ transcription factor family protein
HeAn_C_11239	AT5G62480	Others:stress and detoxification	-1,88	-2,11	glutathione S-transferase tau 9
HeAn_C_1598	AT5G52640	Others:stress and detoxification	2,41	0,30	heat shock protein 90.1
HeAn_C_3531	AT5G50260	Protein degradation/modification	0,73	2,59	Cysteine proteinases superfamily protein
HeAn_C_1620	AT5G45890	Protein degradation/modification	1,30	2,77	senescence-associated gene 12
HeAn_C_1984	AT1G67340	Protein degradation/modification:F-box	-2,00	-1,48	HCP-like superfamily protein with MYND-type zinc finger
HeAn_C_4383	AT1G21410	Protein degradation/modification:F-box	3,17	3,63	F-box/RNI-like superfamily protein
HeAn_C_8229	AT1G66200	Protein degradation/modification:glutamate synthetase	1,48	2,12	glutamine synthase clone F11
HeAn_S_37631	AT5G24550	Protein degradation/modification:hydrolase	3,16	4,21	beta glucosidase 32
HeAn_S_15612	AT5G10930	Protein degradation/modification:protein kinase and phospho.	4,00	3,99	CBL-interacting protein kinase 5
HeAn_C_1639	AT3G22370	Redox regulation:Antioxidants	-2,52	-2,65	alternative oxidase 1A
HeAn_C_1282	AT2G18950	Redox regulation:Antioxidants	4,26	4,36	homogentisate phytyltransferase 1
HeAn_S_37145	AT3G28540	Redox regulation:ATPase	2,93	0,48	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases protein
HeAn_C_1365	AT1G75280	Redox regulation:reductase	-2,72	-2,56	NmrA-like negative transcriptional regulator family protein
HeAn_S_13197	AT4G09010	Redox regulation:ROS	-3,67	-3,19	ascorbate peroxidase 4
HeAn_S_37764	AT2G33380	Signal transduction:Calcium	4,61	4,80	Caleosin-related family protein
HeAn_C_11791	AT1G46768	Transcription regulation:AP2-EREBP	1,71	2,07	related to AP2 1
HeAn_S_13087	AT5G43700	Transcription regulation:AUX-IAA	-2,45	-4,50	AUX/IAA transcriptional regulator family protein
HeAn_S_39847	AT5G39660	Transcription regulation:C2C2-Dof	2,40	1,71	cycling DOF factor 2
HeAn_S_16691	AT5G60200	Transcription regulation:DOF	2,82	1,78	TARGET OF MONOPTEROS 6
HeAn_S_16631	AT5G45710	Transcription regulation:HSF	3,67	2,85	winged-helix DNA-binding transcription factor family protein
HeAn_C_518	AT3G24500	Transcription regulation:MBF1	2,56	2,95	multiprotein bridging factor 1C
HeAn_S_37677	AT3G50060	Transcription regulation:MYB	3,18	2,78	myb domain protein 77
HeAn_S_32569	AT1G48000	Transcription regulation:MYB	4,14	5,28	myb domain protein 112
HeAn_C_7516	AT3G04070	Transcription regulation:NAC	2,73	3,86	NAC domain containing protein 47
HeAn_C_3510	AT3G15500	Transcription regulation:NAC	5,48	6,09	NAC domain containing protein 3

Tabla A3.2: FT con mayor tasa de cambio durante la senescencia natural en el experimento de campo.

Los valores de expresión se encuentran en escala logarítmica en base 2 para cada uno de los contrastes: T1-T0 (Tiempo 1 – Tiempo 0) y T2-T0 (Tiempo 2 – Tiempo 0)

Unigen girasol	Familia FT	log2 T1-T0	log2 T2-T0	Alta similitud con
HeAn_S_30904	C2H2	-3,16	-3,22	AT4G17810
HeAn_C_11953	MADS	-3,00	-3,49	AT2G45650
HeAn_S_19690	C2C2-GATA	-2,88	-2,46	AT5G25830
HeAn_C_419	zf-HD	-2,75	-2,59	AT4G24660
HeAn_S_28995	MYB-related	-2,47	-1,39	AT5G52660
HeAn_C_1262	Sigma70-like	-2,27	-2,14	AT1G64860
HeAn_C_3894	HB	-2,14	-3,00	AT1G69780
HeAn_C_1889	Sigma70-like	-2,02	-2,91	AT5G24120
HeAn_C_5012	Trihelix	-1,58	-2,45	AT5G28300
HeAn_C_10633	LIM	-0,15	2,87	AT3G61230
HeAn_S_38260	AP2-EREBP	0,88	2,11	AT2G44840
HeAn_C_1736	MADS	1,23	2,00	AT5G15800
HeAn_S_17088	NAC	1,23	3,30	AT3G15510
HeAn_C_11649	LIM	2,00	2,68	AT1G10200
HeAn_C_11894	HB	2,05	1,45	AF339748
HeAn_S_38523	AP2-EREBP	2,12	2,90	AT3G16770
HeAn_S_20175	bHLH	2,23	2,02	AT2G42280
HeAn_S_23351	MYB-related	2,25	0,71	AT1G01060
HeAn_C_8526	NAC	2,28	2,62	AT1G01720
HeAn_C_12542	C3H	2,29	1,59	AT2G40140
HeAn_C_11489	MYB	2,32	2,74	AT1G68320
HeAn_C_12149	MYB-related	2,34	1,96	AT5G17300
HeAn_C_562	bZIP	2,36	2,76	AT1G42990
HeAn_C_10939	AP2-EREBP	2,39	2,92	AT1G50640
HeAn_S_39847	C2C2-Dof	2,40	1,71	AT5G39660
HeAn_B_41077	WRKY	2,41	1,26	AT1G80840
HeAn_C_12919	C3H	2,43	1,94	AT3G55980
HeAn_S_16691	C2C2-Dof	2,82	1,78	AT5G62940
HeAn_S_36863	AP2-EREBP	2,93	2,76	AT5G61600
HeAn_C_6630	CCAAT	3,17	2,31	AT5G63470
HeAn_S_37677	MYB	3,18	2,78	AT4G37260
HeAn_S_16631	HSF	3,67	2,85	AT4G18880
HeAn_C_11118	NAC	3,91	5,23	AT1G69490
HeAn_S_32569	MYB	4,14	5,28	AT5G49620
HeAn_S_36498	OFP	4,37	4,99	AT2G30400
HeAn_C_11287	MYB	4,59	3,50	AT5G67300
HeAn_C_10816	NAC	5,13	5,50	AT1G52890
HeAn_C_3510	NAC	5,48	6,09	AT3G15500