

**IDENTIFICACIÓN DE GENES DE REFERENCIA PARA ESTUDIOS DE
EXPRESIÓN GÉNICA EN GIRASOL**

Novello María Angelina^A, Ochogavía Ana Claudia^{A,B}, Nestares, Graciela^A

^A *Cátedra de Genética, Facultad de Ciencias Agrarias-UNR, Zavalla;*

^B *IICAR-UNR-CONICET, Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias de Rosario, Parque Villarino
Zavalla.*

Área: Ingeniería

Sub-Área: Agronomía

Grupo: Y

Palabras clave: *Helianthus*, RT-qPCR, expresión génica.

INTRODUCCIÓN

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es la segunda oleaginosa en importancia a nivel nacional, siendo el aceite de la semilla el principal producto comercializado. En la actualidad, las malezas son una importante causa de la disminución del rendimiento del cultivo, pudiendo generar hasta un 70% de pérdidas, por lo tanto, es necesario un eficiente control de las mismas para mantener la rentabilidad de su producción.

Los herbicidas del grupo de inhibidores de AHAS (enzima acetolactato sintasa) permiten el control de un amplio espectro de malezas y son efectivos a bajas dosis de aplicación. En girasol, la resistencia a inhibidores de AHAS es conferida por mutaciones puntuales localizadas en uno de los tres genes codificantes para AHAS. De modo que el conocimiento preciso de los patrones de expresión de estos genes en los tejidos blanco del herbicida resulta de particular importancia.

Los análisis de expresión génica por medio de técnicas transcriptómicas sensibles, tales como la PCR cuantitativa (RT-qPCR), requieren de mediciones precisas y reproducibles de los niveles transcripcionales de los genes de interés. Normalmente, estos estudios se ven afectados por las condiciones de trabajo (Derveaux et al. 2010), de modo que se requiere necesariamente de la amplificación de un gen de referencia junto con el gen evaluado para calibrar la variabilidad experimental (Chen et al. 2011). Un gen de referencia adecuado debe expresarse en un nivel constante en el tejido blanco y bajo las condiciones de trabajo (Andersen et al. 2004). El uso de inapropiados genes de referencia puede llegar a cambiar radicalmente la interpretación del patrón de expresión de un gen de interés. Es por esto que la falta de validación de los genes de referencia compromete la exactitud de los resultados obtenidos por RT-qPCR (Gutierrez et al. 2008). En plantas, el número de genes de referencia validados para este tipo de estudios todavía es limitado.

En la actualidad, la mayor parte de los genes normalizadores empleados en los ensayos de plantas son genes de funciones celulares fundamentales como actina, tubulina, factor de elongación 1 y ARN ribosomal 18S y 40S (Maroufi et al. 2010; Wan et al. 2010; Cuevas et al. 2008; Cruz et al. 2009), pero se ha demostrado que algunos de ellos pueden variar su expresión de acuerdo a las condiciones experimentales y en función del tejido en estudio (Gutierrez et al. 2008; Nicot et al. 2005; Wan et al. 2010). Numerosos estudios de genes candidatos se han llevado a cabo en diferentes especies, tales como en papa (Nicot et al. 2005), arroz (Jain et al. 2006) y sésamo (Wei L et al. 2013) También, se han realizado estudios apuntados a la búsqueda de nuevos genes de referencia (Libault et al. 2008).

En girasol, el único antecedente de este tipo de ensayos se desarrolló en hojas de plantas expuestas a distintos tratamientos en el cual se ensayaron ocho genes tradicionalmente utilizados (Fernandez et al. 2011). Debido a esto, la identificación de nuevos genes referentes y la evaluación de genes tradicionales en una amplia gama de tejidos y estadios del desarrollo será de utilidad para los futuros estudios transcriptómicos de la especie.

METODOLOGÍA

Obtención del material vegetal

Se trabajó con la línea pública americana HA89. Se obtuvieron dos muestras biológicas de diferentes tejidos y estadios del desarrollo según se describe a continuación. El tejido vegetativo se obtuvo de plántulas cultivadas en cámara de incubación en condiciones de temperatura e iluminación controladas (25 ± 2 °C y 12/12 horas luz/oscuridad respectivamente) hasta alcanzar los 15 días post germinación. Los aquenios se sembraron en germinadores tipo multimacetas con

perlita como soporte inerte. El riego se realizó por capilaridad con una solución nutritiva formulada sobre la base salina de Murashige y Skoog al 25%. Se colectaron hojas y raíces en estadio de 8 días y 15 días post germinación.

Por otro lado, el tejido reproductivo fue obtenido de plantas cultivadas a campo. Se efectuaron siembras escalonadas en la fecha normal para el cultivo para disponer de plantas en los estados reproductivos, desde inicio de floración (estado estrella) hasta madurez fisiológica (35 días post floración). Se registró la fecha de polinización en la que el primer tercio de la inflorescencia inició la liberación del polen. Se colectaron diferentes tejidos de flores y embriones inmaduros en los distintos estadios a partir del primer tercio de la inflorescencia. Las flores fueron colectadas en estadio de botón floral (estadio 1) y estadio masculino (estadio 3) según el calendario reproductivo descrito por Miller (1987). Las flores fueron disecadas y se separaron ovario y pistilo por un lado y por otro los estambres. Los embriones fueron colectados 9 y 25 días luego de la polinización.

Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Se colectaron aproximadamente 300mg de cada una de las muestras y las mismas fueron contenidas en microtubos y almacenadas a -80°C hasta el momento de su utilización. Luego, fueron maceradas con micropilón hasta obtener un polvo fino. La purificación de ARN total se realizó mediante el PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen Life technologies) y su cuantificación se realizó por espectrofotometría. La integridad del ARN fue verificada en geles de agarosa al 1%. La electroforesis se llevó a cabo en una cuba horizontal en buffer TBE 1X manteniendo el amperaje constante a 60mA y se observó en transluminador. El ADNc fue sintetizado a partir de 10 μL del ARN total obtenido de cada una de las muestras, utilizando SuperScript® First-Strand Synthesis System for RT-qPCR (Invitrogen Life technologies). Una dilución adecuada de los productos obtenidos por transcripción reversa fue utilizada como molde para la amplificación del ADNc.

Selección de genes putativos y diseño de cebadores específicos

Se seleccionaron 12 genes para evaluar su estabilidad en diferentes tejidos y estadios del desarrollo, cuatro genes tradicionalmente utilizados en estudios de expresión (ACT, TUB, UBG6 y EF1) y ocho genes nuevos (MIR171, MIR156, SKIP16, ARNr 26S, ETIF5, PEP, UNK1 y UNK2). De los nuevos genes, dos codificaban para microARN (MIR156 y MIR171) los cuales habían sido reportados como altamente estable en hojas de lechuga expuestas a diferentes condiciones de estrés abiótico (Borowski et al. 2014). Dos secuencias correspondieron a genes codificantes para proteínas conocidas (la proteína de unión a ADN SKIP16 y la ARN polimerasa de codificación plastídica PEP) las cuales presentaron expresión estable en diferentes tejidos de soja en estudios previos (Hu et al. 2009). También se seleccionaron dos genes codificantes de proteínas de función desconocida (UNK1 y UNK2) que fueron reportadas previamente como genes de alta estabilidad en estudios de expresión en soja y maní (Hu et al. 2009; Wei et al. 2013). Además, se escogieron a ARNr 26S, un gen codificante de la subunidad ribosomal 26S de mitocondria y a ETIF5 cuyo gen codifica para el factor de iniciación transcripcional 5 (Fernandez et al. 2011, Huis et al. 2010). Las secuencias de girasol de los genes codificantes para proteínas fueron extraídas de la base de datos GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Se realizaron estudios de similitud para identificar las secuencias homólogas de UNK1 y UNK2 (At3G13410; At4G33380) de girasol. Para ello, se contrastó la secuencia de los genes de *Arabidopsis* con la base de datos de secuencias expresadas de girasol por medio del programa *Blast* estableciendo parámetros astringentes de comparación utilizando

el algoritmo Megablast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Fueron seleccionadas las secuencias de girasol con alta similitud ($id > 60\%$ y $eV < e-50$). Por otra parte, la secuencia correspondiente al precursor de los microARN (MIR156 y MIR171) de girasol fue extraída de la base de datos de precursores de microARN, miRBASE (<http://www.mirbase.org/>). En la **Tabla 1** se enumeran las accesiones de girasol de cada uno de los genes seleccionados.

Se diseñaron cebadores específicos para cada uno de los genes escogidos utilizando el programa *Primer3 Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) contemplando un contenido de GC mayor al 60%, Tm de 63-67°C, tamaño del amplicón de 90 a 260 nucleótidos y asegurando baja probabilidad de autoempalme. Se evaluó la especificidad de los cebadores contrastando la secuencia de los mismos contra la base de datos de secuencias expresadas de girasol por medio del programa *PrimerBlast* de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/primer-blast.cgi>).

Tabla 1. Características de los genes seleccionados para los estudios de estabilidad.

Genes	N° de Accesión	Locus ortólogo de A.thaliana	%Id	Descripción del locus	Función
ACT	DY915068	AT5G09810	90%	Actina 7	Proteína del citoesqueleto de función estructural
TUB	DY921120	AT1G75780	96%	Tubulina beta	Proteína del citoesqueleto de función estructural
EF1	DY907212	AT1G56070	94%	Factor de elongación1	Factor de elongación de la traducción
PEP	DY912398	AT4G35800	87%	RNA Pol	ARN Polimerasa de codificación plastídica
SKIP	GE522343	AT1G06110	60%	F-box SKIP	Proteína de caja-F SKIP 16
MIR171	MI0022246	MI0000214	70%	miR171	Precursor de microARN 170/171
UBQ6	CX947085	AT2G47110	67%	Ubiquitina 6	Unión y modificación proteica
ETIF5	DY929865	AT1G69410	89%	Factor de iniciación de la transcripción 5	Factor de iniciación transcripcional 5
26S ARNr	BQ969069	AT3G41950	96%	ARNr 26S	Subunidad ribosomal mitocondrial 26S
MIR156	MI002228	MI0000178	86%	miR156	MicroARN 156
UNK1	DY924449	AT3G13410	60%	Proteína hipotética	Desconocida
UNK2	GE512112	AT4G33380	68%	Proteína hipotética	Desconocida

Amplificación de fragmentos por PCR cuantitativa (RT-qPCR)

Para identificar el nivel de expresión de cada uno de los ocho genes en los tejidos y estadios evaluados se determinó el nivel de transcritos por medio de RT-qPCR. Se utilizó el equipo Rotor-Gene Q (QIAGEN®) con HRM (Desnaturalización de alta resolución). Cada reacción se llevó a cabo por duplicado en un volumen final de 15µl a partir de 3µl de ADNc 8.5ng/µL, 1x de SYBR Green mezcla de PCR (Mezcla Real®, Biodynamics, Argentina), 0,4mM de cada uno de los cebadores. Se incorporaron además controles sin templado en donde no se evidenció amplificación.

Se programaron 42 ciclos y cada ciclo de PCR consistió en 15s a 95°C, 30s a 60-65°C (61°C para los genes ACT, EF1, PEP, MIR171, ETIF5 y MIR156 y 64°C para UNK1,

UNK2, TUB, SKIP y ARNr 26S) y 40s a 72°C. Los estudios de desnaturalización de los productos se realizaron en rampa de 0,5°C/s. El valor de Cq y el factor de eficiencia (E), así como las curvas de desnaturalización, fueron obtenidos a partir del programa *Comparative Quantitation* del Rotor-Gene Q software (versión 1.7, Corbett Research).

Análisis estadístico de la estabilidad de expresión

La estabilidad de la expresión de los genes se analizó aplicando los programas *NormFinder*, *BestKeeper* y complemento del programa qbase+ de Biogazelle, *GeNorm* (Andersen et al. 2004, Pfaffl et al. 2004, Vandesompele et al. 2002). El primero utiliza un modelo basado en el análisis de la variancia (ANOVA) para estimar variaciones inter e intra grupales y provee una medición directa de la variación de expresión para cada gen. En el caso del programa *BestKeeper*, los ciclos de cuantificación (Cq) de los genes que presentan menor variación son combinados en el índice BKI. Cada Cq es enfrentado al índice BKI a través de una correlación de *Pearson* a fin de evaluar la variabilidad de los datos y concluir que genes son competentes para ser utilizados como referencia. Por último *GeNorm* genera un ranking de los referentes evaluados de acuerdo al valor del índice de estabilidad M, de acuerdo al programa éste no debe ser mayor a 1.5.

Validación de los genes de referencia

A fin de confirmar la estabilidad de los potenciales genes de referencia, se midieron los perfiles de expresión del gen *ahas1*, el cual codifica para la enzima acetohidroxiácido sintasa, y se normalizaron con los tres mejores genes candidatos y el peor de ellos, clasificados según los programas empleados. En trabajos previos se ha evidenciado una expresión mayoritaria de este gen en hojas jóvenes (Ochogavía et al. 2014) de modo que se evaluó su expresión en muestras de hojas de 8 y 15 días post germinación a fin de evidenciar dicha diferencia de abundancia.

RESULTADOS

Selección de los genes putativos y amplificación de los mismos

De los ocho genes seleccionados, cuatro correspondieron a genes constitutivos tradicionalmente utilizados como referentes en estudios de expresión génica (UBQ, ACT, TUB y EF1) y ocho fueron genes no convencionales identificados en otras especies como altamente estables (SKIP16, MIR171, MIR156, ARNr 26S, PEP, UNK1, UNK2 y ETIF5). Se diseñaron cebadores específicos a partir de secuencias de girasol. Las secuencias de los genes tradicionales fueron extraídas directamente de la base de datos GeneBank y las de los genes no tradicionales se identificaron por medio de estudios de homología en las bases de datos de secuencias expresadas de girasol de NCBI y miRBASE. En todos los casos, las secuencias identificadas compartían más del 60% de identidad y su valor-e fue inferior a e-50. En la **Tabla 2** se detalla la secuencia de los cebadores, el tamaño del amplicón y la temperatura de desnaturalización de los mismos.

Tabla 2. Características de los genes y cebadores seleccionados para los estudios de estabilidad.

Genes	Nº de Accesión	Cebadores 5'-3'; senido(+)/antisentido(-)	Tamaño producto	Tm °C (+/-)
ACT	DY915068	CAGGCCGTGCTTCCCTCTA/ GGTCACGACCAGCGAGATCA	145 pb	64,8/64,8
TUB	DY921120	TCTGCCACCATGTCTGGGAGTT/ GTAACGCCCGTGTCTGGGTC	252pb	64,1/65,3
EF1	DY907212	TGCCAAGAAGTTGCTGGTG/ ACGTGCCCAGGTGAGTCGAT	189 pb	64,6/65,3
PEP	DY912398	ACCGGGCCAATGATGAGGTGT/ AGGAGCAAGCTGGCCCAACA	126 pb	64,2/64,5
SKIP	GE522343	ACGCTCGAACCTGAACACCGC/ AAGAACATGCCCGCCGCCTC	135 pb	65,7/65,8
MIR171	MI002246	ACGAGATGTTGGTTCGGTTCAA/ CACGTGATATTGGCACGGCTCA	93 pb	60,9/63,1
UBQ6	CX947085	CCTCTTCTTCGCGCCACCGC/ CACCGACCAACAGCGTCCC	131pb	66,6/66,6
ETIF5	DY929865	GGCCGATGCAGGTGCTTCCA/ AGCATGACCGTGTGTTGCCAGT	136pb	64,6/63,3
26S ARNr	BQ969069	GCCTCCCGTTCCGGTTTCA/ TACCAAGAGGCACGGCAGGC	125pb	64,6/64,6
MIR156	MI002228	AACGAGATGTTGGTTCGGTTCAA/ GCACGTGATATTGGCACGGCT	91pb	61,1/63,3
UNK1	DY924449	TCATGTGCTGCAGAGGCTGGA/ CAACCAGTGGCGTCTGCCCC	112 pb	64,7/66,8
UNK2	GE512112	AGGAGGTAGCCGTCTCCAGC/ AGCCTTGGAGTTCAATTGGGCCG	142 pb	65,9/65,7

La cuantificación de los niveles transcripcionales de las secuencias se llevó a cabo por medio RT-qPCR basado en la detección de SYBR Green. Cada reacción se realizó por duplicado y no se observó amplificación en ausencia de cDNA. La especificidad de los cebadores se evaluó por medio de un gel de agarosa al 2,5% en donde se observaron bandas únicas del tamaño esperado como se muestra en la **Figura 1**.



Figura 1. Verificación de la especificidad de los cebadores en gel de agarosa al 2,5%. En la última calle se sembró el marcador de peso molecular λ .

Análisis estadístico de la estabilidad de expresión

El desempeño de los genes de referencia putativos se analizó por medio de los programas *NormFinder*, *BestKeeper* y *GeNorm*.

De los doce genes iniciales, 26S ARNr y UNK1 fueron descartados por presentar baja eficiencia y valores de amplificación en el límite de sensibilidad de la técnica.

Los genes candidatos restantes se estudiaron dentro de tres subgrupos de muestras: tejidos reproductivos (embriones y flores); tejidos vegetativos (raíces y hojas) y ambos tejidos en conjunto. Los resultados obtenidos se exponen en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Parámetros de estabilidad de los genes candidatos.

Todos los Tejidos						
Ranking	NormFinder		geNorm		BestKeeper	
	Gen	Sv	Gen	M	Gen	R ²
1	UNK2	0,043	EF1	1,261*	ACT	0,933
2	SKIP	0,056	ETIF5	1,317*	UNK2	0,913
3	ACT	0,058	ACT	1,402*	EF1	0,908
4	EF1	0,066	UBQ6	1,621	SKIP	0,890
5	TUB	0,091	UNK2	1,820	UBQ6	0,858
6	PEP	0,101	SKIP	2,191	MIR171	0,786
7	MIR156	0,109	TUB	2,259	MIR156	0,771
8	UBQ6	0,112	PEP	2,411	ETIF5	0,714
9	ETIF5	0,116	MIR171	2,691	PEP	0,696
10	MIR171	0,126	MIR156	2,831	TUB	0,682

Tejido Vegetativo						
Ranking	NormFinder		geNorm		BestKeeper	
	Gen	Sv	Gen	M	Gen	R ²
1	SKIP	0,040	ETIF5	1,131*	ETIF5	0,943
2	UNK2	0,045	EF1	1,249*	UBQ6	0,895
3	ETIF5	0,050	UNK2	1,332*	UNK2	0,870
4	PEP	0,054	UBQ6	1,505	EF1	0,866
5	ACT	0,054	ACT	1,703	ACT	0,860
6	EF1	0,058	TUB	1,841	SKIP	0,739
7	TUB	0,067	PEP	1,977	TUB	0,492
8	UBQ6	0,091	SKIP	2,12	PEP	0,255
9	MIR156	0,091	MIR156	2,351	MIR171	0,224
10	MIR171	0,103	MIR171	2,476	MIR156	0,180

Tejido Reproductivo						
Ranking	NormFinder		geNorm		BestKeeper	
	Gen	Sv	Gen	M	Gen	R ²
1	UNK2	0,046	EF1	1,25*	MIR156	0,958
2	MIR156	0,055	UBQ6	1,282*	UNK2	0,944
3	ACT	0,066	ACT	1,295*	ACT	0,946
4	SKIP16	0,069	MIR156	1,762	EF1	0,925
5	EF1	0,074	SKIP	2,018	SKIP	0,904
6	PEP	0,083	UNK2	2,113	UBQ6	0,896
7	TUB	0,103	MIR171	2,246	MIR171	0,866
8	UBQ6	0,118	PEP	2,410	PEP	0,837
9	MIR171	0,121	TUB	2,674	TUB	0,767
10	ETIF5	0,148	ETIF5	2,934	ETIF5	0,691

Cuando todos los tejidos fueron evaluados en conjunto empleando el programa *geNorm*, los genes EF1, ETIF5 y ACT tuvieron los valores M más bajos, indicando que fueron los más estables de los 10 candidatos. Cuando el tejido vegetativo y el reproductivo fueron analizados independientemente, el programa clasificó como los tres genes más estables a ETIF5, EF1 y UNK2 y a EF1, UBQ6 y ACT respectivamente. De acuerdo a la aplicación *NormFinder*, los genes UNK2 y ACT presentaron los valores de estabilidad (Sv) más bajos tanto para el tejido reproductivo como cuando se evaluaron todos los tejidos en conjunto, indicando una alta estabilidad de estos genes. Para el tejido vegetativo se seleccionó a SKIP y a UNK2 como los referentes putativos más eficientes. Por otro lado, la evaluación realizada en todos los tejidos con *BestKeeper* sugirió que todos los genes serían aptos para ser utilizados como referentes siendo ACT el que presentó la mejor correlación con el índice BKI (0,933; $p < 0,001$). Mientras que al analizar los tejidos por separado, para raíces y hojas, ETIF5 presentó la mayor correlación (0,943; $p < 0,0019$); y para flores y embriones, el gen más estable fue MIR156 (0,958; $p < 0,001$).

A pesar de que los programas se basan en algoritmos estadísticos diferentes, todos incluyeron a ACT dentro de los tres genes más estables para tejido reproductivo y todos los tejidos en conjunto y los tres seleccionaron a ETIF5 como el gen más apto dentro del tejido vegetativo. Además *NormFinder* y *BestKeeper* coincidieron en seleccionar dentro de los mejores referentes a UNK2 para todos los tejidos y a MIR156 y UNK2 para tejido reproductivo. Por otro lado, tanto *geNorm* como *BestKeeper* clasificaron a EF1 como un buen gen de referencia en todos los tejidos.

Validación de los genes de referencia

La validación de los genes seleccionados por los algoritmos estadísticos se llevó a cabo midiendo el perfil de expresión del gen *ahas1* en hojas jóvenes y maduras. La normalización de la expresión de este gen se hizo utilizando los tres genes más estables (ETIF5, EF1, y UNK2) y el más inestable (MIR171) clasificados por *geNorm*. De acuerdo a Ochogavía (2014), el gen *ahas1* presenta mayor expresión en tejidos jóvenes. Al normalizar la expresión de *ahas1* con uno de los tres mejores candidatos se observó diferencia significativa de abundancia entre los dos estadios. El mismo patrón se observó al utilizar dos o los tres genes en la normalización. Por otro lado, al analizar la expresión del gen de interés frente a MIR171 se evidenció diferencia de abundancia pero las barras de error se incrementaron notablemente como se muestra en la **Figura 2**.

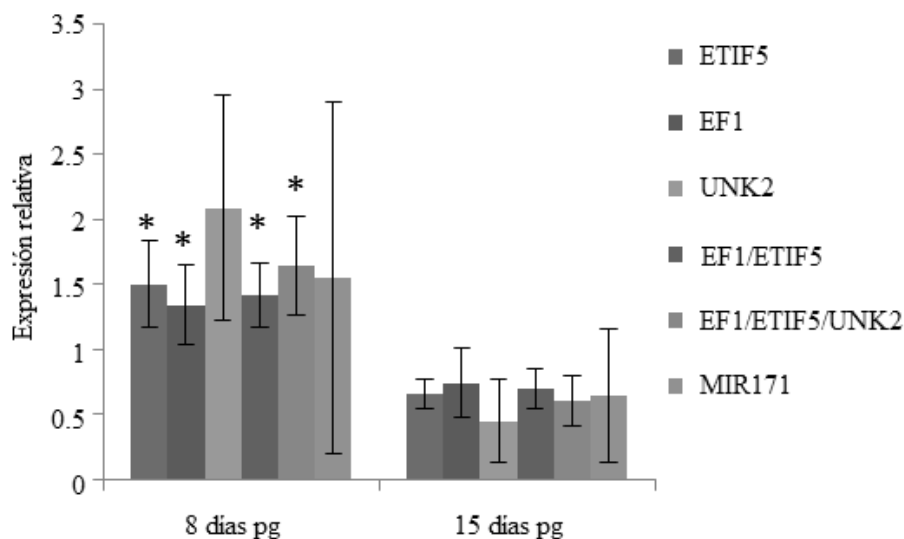


Figura 2. Expresión relativa del gen *ahas-1* en hojas de 8 y 15 días post germinación (Pg). La expresión relativa se calculó respecto del valor promedio para cada estadio. Los genes utilizados son EF1, UNK2, ETIF5, EF1/ETIF5, ETIF5/UNK2/EF1 y MIR171. Los asteriscos (*) indican diferencia significativa de acuerdo a la prueba de t ($P \leq 0.05$) entre los dos estadios.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los estudios de expresión utilizando la técnica de qPCR requieren de la normalización de los datos para ser precisos e informativos dado que la expresión de un gen puede ser influenciada por las condiciones experimentales. Es por esto que es necesario encontrar genes cuya expresión sea estable a lo largo del estudio para ser utilizados como referencia (Bustin 2002). En este trabajo se evaluaron 12 genes putativos en cuatro tejidos y distintos estadios del desarrollo para la especie girasol. Entre los genes candidatos se encontraban cuatro genes comúnmente utilizados (ACT, β -TUB, UBG6 y EF-1 α) y ocho nuevos postulantes (MIR171, MIR156, SKIP16, ARNr 26S, ETIF5, PEPKR1, UNK1 y UNK2). Los programas *BestKeeper*, *geNorm* y *NormFinder* fueron empleados para los análisis de la estabilidad de la expresión.

Dos de los genes estudiados (ARNr 26S y UNK1) debieron ser eliminados de forma preliminar por presentar valores Cq cercanos al límite de detección de la técnica. De esta forma los estudios estadísticos empleando los programas recién mencionados se llevaron a cabo con los 10 candidatos restantes.

En función de seleccionar los genes candidatos más aptos para ser utilizados como referencia, se tomaron los genes que fueron clasificados dentro de los tres primeros puestos por al menos dos de los tres programas de análisis empleados. Así, UNK2, MIR156 y ACT fueron seleccionados como los mejores referentes para trabajar en tejido reproductivo, mientras que los genes UNK2 y ETIF5 resultaron ser los más apropiados para realizar ensayos en tejido vegetativo. Finalmente, para llevar a cabo ensayos de expresión en muestras pertenecientes a ambos tipos de tejido, los genes UNK2, ACT y EF fueron seleccionados como los mejores normalizadores.

La validación de los genes se llevó a cabo midiendo la expresión del gen *ahas1* en hojas jóvenes y maduras. En trabajos recientes se evidenció una mayor expresión del mismo en estadios tempranos de hoja (Ochogavía et al. 2014). Se analizaron los tres mejores referentes y el peor seleccionados por *geNorm* y la combinación de dos o tres de ellos. Al utilizar los mejores genes de manera independiente (ETIF5, UNK2 y EF1) la diferencia entre los dos estadios fue significativa y las barras de error mínimas. Del

mismo modo, al normalizar utilizando dos o tres genes, las diferencias estadísticas entre estadios se mantuvieron.

Tradicionalmente, genes como ACT, TUB, EF1 y UBG6 han sido utilizados como normalizadores en ensayos de expresión en distintas especies de plantas (Maroufi et al. 2010; Cuevas et al. 2008), pero se ha evidenciado que no siempre demuestran ser suficientemente estables en distintos tejidos o bajo ciertas condiciones experimentales (Gutierrez et al. 2008; Fernandez et al. 2011).

Por otra parte, investigaciones recientes han apuntado a la búsqueda de nuevos genes putativos que presentaran un comportamiento menos variable. En las especies lechuga, soja, y maní se encontró que genes que codificaban para proteínas de función desconocida, precursores de microARNs y factores de transcripción resultaron ser buenos normalizadores de la expresión (Hu et al. 2009; Borowski et al. 2014; Chi et al. 2012; Wei et al. 2013). En nuestros ensayos, tanto ETIF5 (factor de iniciación transcripcional) como UNK2 (proteína de función desconocida) demostraron ser apropiados para ensayos de expresión en tejido vegetativo pero no para tejido reproductivo. Resultados similares para UNK2 fueron reportados en tomate (Exposito-Rodriguez et al. 2008). Por otra parte, se observó un comportamiento contrario para el gen MIR156 (microARN) que resultó ser altamente estable en flores y embriones pero no en raíces y hojas de la misma especie (Exposito-Rodriguez et al. 2008). Coincidentemente, este gen había sido reportado como variable en hojas bajo distintos tipos de estrés en lechuga (Borowski et al. 2014).

De esta forma, a lo largo de este trabajo se ha expuesto que aún dentro de una misma especie no se han podido detectar genes de referencia universales y que los normalizadores putativos, ya sea genes tradicionalmente utilizados o nuevos genes candidatos deben ser cuidadosamente evaluados en el tejido y/o estadio bajo las condiciones de trabajo. No obstante, hemos logrado identificar referentes confiables como la ACT y normalizadores promisorios tales como ETIF5 o UNK2 que podrán ser empleados en múltiples estudios de expresión en la especie girasol.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF** (2004) Normalization of realtime quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64:5245–5250.
- Borowski J, Galli V, Messias R, Perin E, Hugh Buss J, Delmar dos Anjos e Silva S, Rombaldi C** (2014) Selection of candidate reference genes for real-time PCR studies in lettuce under abiotic stresses. *Planta* 39:1187–1200.
- Bustin SA** (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29:23-39.
- Cruz F, Kalaoun S, Nobile P, al. e** (2009) Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative realtime RT-PCR. *Mol Breed* 23:607–616.
- Cuevas J, López-Cobollo R, Alcázar R, Zarza X, Koncz R, Altabella T, Salinas J, Tiburcio A, Ferrando A** (2008) Putrescine is involved in Arabidopsis freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature. *Plant Physiol* 148 (2):1094-1105.
- Chen L, Zhong H, Kuang J, al. e** (2011) Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. *Planta* 234:377–390.
- Chi Y, Hu R, Yang Q, Zhang X, Pan L, Chen N, Chen M, Yang Z, Wang T, He W, Yu S** (2012) Validation of reference genes for gene expression studies in peanut by quantitative real-time RT-PCR. *Mol Genet Genomics* 287:167-176.

- Derveaux S, Vandersompele J, Hellemans J** (2010) How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods* 50:227-230.
- Exposito-Rodriguez M, Borges AA, Borges-Perez A, Perez JA** (2008) Selection of internal control genes for quantitative real-time RTPCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biol*:8-131.
- Fernandez P, Di Rienzo JA, Moschen S, Dosio GA, Aguirrezabal LA, Hopp HE, Paniago 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 (1):63-74.
- Gutierrez L, Mauriat M, Pelloux J, Bellini C, Van Wuytswinkel O** (2008) Towards a systematic validation of references in real-time rt-PCR. *Plant Cell* 20 (7):1734-1735.
- Hu R, Fan C, Li H, Zhang Y, Fu Y** (2009) Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. *BMC Molec Biol* 10 (93):1471-2199.
- Huis R, Hawkins S, Neutelings G** (2010) RSeeselaerchc attriocien of reference genes for quantitative gene expression normalization in flax (*Linum usitatissimum* L.). *BMC Plant Biology* 2010, 10:71 10:71.
- Iskandar HM, Simpson RS, Casu RE, Bonnett GD, MacLean DJ, Manners JM** (2004) Comparison of reference genes for quantitative realtime polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. *Plant Mol Biol Rep* 22:325-337.
- Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK, Khurana JP** (2006) Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 345 (2):646-651.
- Libault M, Thibivilliers S, Bilgin D, al. e** (2008) Identification of four soybean reference genes for gene expression normalization. *Plant Genome* 1:44–54.
- Maroufi A, Van Bockstaele E, De Loose M** (2010) Validation of reference genes for gene expression analysis in chicory (*Cichorium intybus*) using quantitative real-time PCR. *BMC Mol Biol* 11-15.
- Miller A** (1987) *Sunflower En: Principles of cultivar development*. Ed.:Fehr, W. Macmillan Publishing Company (2):626-668.
- Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D** (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J Exp Bot* 56 (421):2907-2914.
- Ochogavia AC, Breccia G, Vega T, Felitti SA, Picardi LA, Nestares G** (2014) Acetohydroxyacid synthase activity and transcripts profiling reveal tissue-specific regulation of ahas genes in sunflower. *Plant Sci* 224:144-150.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP** (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: *BestKeeper*--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26 (6):509-515.
- Simon P** (2003) Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics* 19 (11):1439-1440.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F** (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:research0034.
- Wan H, Zhao Z, Qian C, al. e** (2010) Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. *Anal Biochem* 399:257–261.
- Wei L, Miao H, Zhao R, al. e** (2013) Identification and testing of reference genes for Sesame gene expression analysis by quantitative real-time PCR. *Planta* 237:873-889.