

Tesis Doctoral

Caracterización de los mecanismos de defensa a sclerotinia sclerotiorum, agente causal de la podredumbre del estudio de perfiles metabólicos y transcripcionales

Peluffo, Lucila

2010

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:

Peluffo, Lucila. (2010). Caracterización de los mecanismos de defensa a sclerotinia sclerotiorum, agente causal de la podredumbre del estudio de perfiles metabólicos y transcripcionales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Peluffo, Lucila. "Caracterización de los mecanismos de defensa a sclerotinia sclerotiorum, agente causal de la podredumbre del estudio de perfiles metabólicos y transcripcionales". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS DE DEFENSA A
SCLEROTINIA SCLEROTIORUM, AGENTE CAUSAL DE LA
PODREDUMBRE HÚMEDA DEL CAPÍTULO DE GIRASOL A
TRAVÉS DEL ESTUDIO DE PERFILES METABÓLICOS Y
TRANSCRIPCIONALES**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área Ciencias Biológicas

Lucila Peluffo

Director de tesis: Dr. Ruth Heinz
Consejero de Estudios: Dr. Esteban Hopp

Lugar de trabajo: Instituto de biotecnología, CICVyA, INTA-Castelar

Buenos Aires, 2010

Resumen

En Argentina, la podredumbre húmeda del capítulo, causada por el patógeno necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum*, es una enfermedad que provoca serias mermas en la producción y tiene una incidencia anual promedio sobre la producción de la pampa húmeda del 10-20%. Los síntomas de la enfermedad se manifiestan al final de la etapa de floración o durante el llenado de granos por lesiones en el receptáculo que pueden extenderse y afectar todo el capítulo, produciendo la caída del mismo. En estados avanzados de podredumbre, se forman esclerocios, estructuras de resistencia del hongo, que pueden permanecer en los tejidos o en suelo y mantenerse viables por más de 8 años constituyendo el inóculo para futuras infecciones. La resistencia a *Sclerotinia sclerotiorum* en girasol es compleja, habiéndose detectado varios *loci* de carácter cuantitativo (QTL) específicos de línea, órganos y condiciones ambientales de crecimiento. Dicha complejidad ha limitado el desarrollo de germoplasma resistente por medio del mejoramiento clásico, reforzando la necesidad de la utilización de herramientas genómicas que incluyan tanto marcadores neutros para el mapeo de QTL como el desarrollo de marcadores funcionales desarrollados sobre genes candidatos para la resistencia al patógeno. El conocimiento de los factores determinantes de la patogénesis y las respuestas de defensa del hospedante constituyen factores claves para la identificación de dichos genes candidatos. Uno de los aspectos más destacados del mecanismo de invasión de *S. sclerotiorum* es la degradación de la pared celular, siendo el ácido oxálico producido por el patógeno uno de los determinantes de la patogénesis, a través de la acidificación y el secuestro de Ca^{2+} de la pared celular del tejido hospedante. Asimismo, el ácido oxálico ejerce una regulación dual de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Por un lado, en los primeros estadios de la infección el ácido oxálico induce la generación de ROS y la inducción de una muerte celular programada (PCD) en una manera dependiente del pH generando un ambiente favorable para el desarrollo del patógeno, la adquisición de nutrientes y el establecimiento de la relación necrotrófica. Por el otro lado a medida que la infección progresa y al ácido oxálico se acumula en los tejidos del hospedante, el pH disminuye acompañado de la inhibición del estallido oxidativo y la PDC provocando así la muerte celular pero de una manera necrotrófica.

En el presente trabajo se abordó el análisis del perfil metabólico primario, el perfil transcripcional de genes candidatos y los perfiles hormonales de dos líneas de girasol con comportamiento contrastante frente a la infección producida por *S. sclerotiorum* (HA 89 susceptible y RHA801 moderadamente resistente).

Aplicando un método de estudio de perfiles metabólicos basado en la técnica de GC/MS, fue posible detectar diferentes patrones involucrando 63 metabolitos entre ellos azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos grasos y algunos metabolitos secundarios en flores de girasol que constituyen el órgano principal de infección de este patógeno. Los análisis estadísticos paramétricos y multivariados mostraron diferencias metabólicas entre estos dos líneas, así como también efectos de interacción entre línea y los días post inoculación. Los análisis de correlación de redes sugieren que estos cambios metabólicos están sincronizados en una manera dependiente del tiempo en respuesta al patógeno. Se detectaron mayor cantidad de cambios metabólicos diferenciales en la línea susceptible que

en la resistente, esto se evidencia en el mayor número de interconexiones que presenta la línea susceptible entre los módulos de metabolitos formados por compuestos pertenecientes a las mismas vías. Por otro lado, la línea resistente muestra mayor interconexión entre metabolitos pertenecientes a las mismas vías. La evaluación de estos datos también demuestra una regulación línea específica de las distintas vías metabólicas, sugiriendo la importancia de detección de patrones metabólicos, en lugar de cambios específicos de metabolitos individuales, cuando se buscan marcadores metabólicos que responden diferencialmente a la infección de patógenos. Por otra parte el análisis de patrones de actividad de enzimas claves del metabolismo primario del carbono (sacarosa sintasa y las invertasas de pared celular, citológica y vacuolar), foto-respiración (catalasa) y del metabolismo de los fenilpropanoides (fenilalanina-amonio-liasa-PAL), mostró también diferencias entre líneas a tiempos tempranos del proceso de infección. La actividad catalasa presentó un aumento significativo en la línea resistente, que indicaría una regulación diferencial de la fotorespiración frente a la infección del patógeno, disminuyendo el nivel de ROS.

Para la identificación de nuevos genes candidatos involucrados en la resistencia a este patógeno se construyeron colecciones de ADNc basadas en la técnica SSH de flores de girasol inoculadas y no inoculadas a partir de una línea resistente a los 2 y 4 días post inoculación. Esta estrategia dio como resultado la obtención de secuencias diferencialmente expresadas entre las flores inoculadas y no inoculadas. La mayoría de estos genes están involucrados en los procesos de traducción de proteínas, en los procesos de óxido reducción entre los cuales se encuentra un gran número de genes de respuesta a estreses biótico y abiótico, numerosos genes involucrados en el metabolismo primario. Del mismo modo, también se detectó un alto porcentaje de secuencias sin similitud con secuencias disponibles en bases de datos, sugiriendo que podrían codificar para genes no descritos previamente, involucrados en la respuesta del girasol frente a este patógeno. De las clonotecas generadas se seleccionó un conjunto de genes para validar su comportamiento por qRT-PCR. De este conjunto, los genes quitinasa, un elemento de respuesta a etileno y el factor de transcripción WRKY7 mostraron patrones de expresión diferenciales entre las muestras inoculadas y controles a los distintos días post inoculación, sugiriendo que estos genes se encuentran involucrados en la respuesta del girasol frente a *S. sclerotiorum*. Asimismo se identificó un número importante de genes asociados a defensa a patógenos que se expresan en altos niveles en flores de girasol de la línea resistente aún en condiciones control, sin inoculación con el patógeno.

Se estudiaron los perfiles hormonales para el ácido salicílico y para el ácido jasmónico por medio de la técnica LC-ESI-MS/MS. Estos estudios corroboraron que el ácido salicílico no contribuye a la resistencia contra *S. sclerotiorum* y que además se acumula en los tejidos infectados por este hongo, particularmente en la línea susceptible. A su vez, estos estudios demostraron que el jasmónico estaría asociado a la resistencia frente a este patógeno en las flores de girasol de la línea resistente.

La integración del análisis de perfiles metabólicos, transcripcionales y perfiles hormonales contribuyó a una mejor comprensión de los cambios en el metabolismo en los capítulos de girasol durante los primeros estadios de la infección facilitando la identificación de genes y vías metabólicas involucradas en la respuesta al patógeno necrotrófico *S. sclerotiorum*.

Asimismo la identificación de cambios en perfiles metabólicos y transcripcionales de genes candidatos, entre líneas resistentes y susceptibles, posibilita el desarrollo de biomarcadores metabólicos y marcadores funcionales para su aplicación en el mejoramiento asistido del cultivo de girasol.

Abstract

Sclerotinia sclerotiorum, the causal agent of sunflower head rot, represents one of the main constraints in sunflower production in Argentina, with an average annual incidence of 10-20% of total yield of the main growing area, especially when flowering takes place during periods of excessive rainfall. The symptoms appeared at the end of the flowering stage or during grain filling, as water-soaked lesions on the receptacles. The fungus can decay the entire receptacle leaving only a bleached, shredded skeleton with large sclerotia. These sclerotia are resistance structures that can remain viable for more than 8 years in the soil and are main sources of inoculum for future infection.

S. sclerotiorum resistance in sunflower is complex; several underlying QTLs were found to be specific for genotype, organ and environmental conditions. This complexity has limited the development of resistant genotypes by classical breeding, thus strengthening the need of using genomic tools such as neutral markers for QTL mapping and the development of functional markers based on candidate genes for resistance to this pathogen, for association mapping.. Insights into pathogenesis determinant factors and host defense responses are key factors for the identification of candidate genes.

Degradation of plant cell wall is of major importance in the *S. sclerotiorum* invasion. Oxalic acid (OA) secreted by this pathogen induced pathogenesis by lowering the pH and chelating host cell-wall-Ca²⁺. In the early stages of the infection process, low levels of OA elicits reactive oxygen species production (ROS) in host plant tissues, triggering programmed cell death and thus, creating a favorable environment for its development. As OA accumulates, the pH is lowered and the interaction becomes necrotrophic in nature, with the concomitant suppression of ROS and PCD, enabling further pathogen invasion of plant tissue.

In the present work primary metabolic profiling, transcriptional profiling of candidate genes and phytohormone profiling was conducted in two sunflower inbred lines with contrasting behavior to *S.sclerotiorum* infection (HA89 susceptible, RHA801 resistant)

Applying a metabolic profiling approach based on GC/MS, different patterns were identified, involving 63 metabolites including major and minor sugars and sugar alcohols, organic acids, amino acids, fatty acids and few soluble secondary metabolites in the sunflower capitulum, the main target organ of pathogen attack. Both point-by-point and non-parametric statistical analyses showed metabolic differences between genotypes as well as interaction effects between genotype and time after inoculation. Network correlation analyses suggested that these metabolic changes were synchronized in a time-dependent manner in response to the pathogen. Differential metabolic changes were detected to a higher extent in the susceptible line rather than in the moderate resistant line, this is in the susceptible line a higher number of interconnection are observed between modules composed by intermediates of the same pathway. Instead, in the resistant one, larger connections of metabolites within modules were detected.

Evaluation of these data also demonstrated a genotype specific regulation of distinct metabolic pathways, suggesting the importance of detection of metabolic patterns rather than specific metabolite changes when looking for metabolic markers differentially responding to pathogen infection.

The enzymatic activity analysis of key enzymes of the primary carbon (sucrose synthase and cell wall, cytosolic and vacuolar invertases), photorespiratory (catalase) and phenylpropanoid metabolism (phenylalanine ammonia-lyase -PAL-) showed differences between genotypes at early time point of the infection progress. A significant threefold increase in the catalase activity of the resistant genotype was observed, indicating a differential regulation in photorespiration in response to pathogen infection by lowering ROS levels.

Subtractive cDNA libraries of inoculated and mock inoculated flowers at 2 y 4 DPI were constructed for identification of candidate genes involved in *S. sclerotiorum* resistance using a PCR-based suppression subtractive hybridization (*SSH*) method. Differentially expressed sequences between inoculated and mock inoculated flowers were obtained, including sequences coding for genes involved in protein transduction process, oxidoreduction process, genes involved in abiotic and biotic stress responses, genes involved in primary metabolism and a high number of sequences with no homology to sequences deposited in data bases, suggesting that they could be coding for new genes involved in sunflower response to *S. Sclerotiorum*. A group of 16 genes was selected for validating these libraries by qRT-PCR, genes coding for chitinase (AN: ABJ74186), Ethylene responsive element (AN: XP_002275892) and the transcription factor WRKY7 showed differential expression patterns between inoculated and mock inoculated flowers, suggesting that these genes are involved in sunflower response to *S. sclerotiorum*. Besides, a large number of defense-related genes were identified as constitutively expressed in mock inoculated flowers of the resistant genotype.

Hormonal profiling analysis of Salicylic and jasmonic acid levels were determined by LC-ESI-MS/MS at different time points after inoculation in inoculated and mock inoculated sunflower flowers. These studies support the findings that SA does not contribute to resistance against *S. sclerotiorum*, moreover SA accumulation was induced in diseased tissues particularly in the susceptible genotype.

Furthermore this work showed that JA was associated to resistance against this pathogen in sunflower capitula.

The integration of metabolic, transcription and hormone profiling analysis contributed towards a better understanding of sunflower capitulum metabolism changes during the early stages of infection, greatly facilitate the selection of candidate genes for this plant-pathogen interaction, thus allowing the development of metabolic biomarkers and functional markers based on candidate genes, for application in sunflower breeding programs.

Agradecimientos

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las Instituciones y personas que hicieron posible que este trabajo de tesis pudiera realizarse:

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por la beca otorgada.

Al Instituto de Biotecnología (INTA Castelar) y a la Dra. Elisa Carrillo por darme el lugar de trabajo.

Al Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie por el desarrollo de los experimentos de perfiles metabólicos.

Al Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto por el desarrollo de los experimentos de perfiles hormonales.

A Ruth Heinz, Esteban Hopp y Norma Paniego, por abrirme las puertas del laboratorio de Marcadores Moleculares, por las enseñanzas, las charlas de trabajo y por ser guías en los primeros pasos en el laboratorio y en el Instituto.

A Verónica Lia, por las correcciones, la ayuda en los análisis de datos, por la oreja, por la paciencia.

A Fernando Carrari por la ayuda en el análisis y la interpretación de los perfiles metabólicos.

A Sergio Alemán, Guillermina Abdala y Andrea Andrade por la ayuda en el procesamiento de las muestras y el análisis de datos para el estudio de perfiles hormonales

Al Grupo de Fitopatología de Girasol de la EEA INTA Balcarce, por la colaboración en los ensayos a campo.

A la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología (UGB)

Al Lic. MSc. Julio di Rienzo, por su asistencia en el análisis estadístico.

A todos los jefes del Grupo Plantas especialmente a Cecilia Vázquez Róvere, por las charlas y consejos, porque siempre es bueno tener la visión de otros! Y a todos los integrantes del grupo plantas.

A Vane, Nati y Cori, La Polaca y Guille.

A Diego y Seba por la “línea de molienda” de los capítulos.

A Matías y Nacho por cuidar los ensayos de girasol en la jaula.

A Fede Blanco.

A Luis por pasarme la mayor parte de la literatura.

A los de “cocina”.

A todos los que olvidé mencionar, pero que seguramente de una u otra manera me acompañaron en este largo proceso... ¡GRACIAS!

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

Peluffo,L., Lia, V.V., Troglia, C., Maringolo, C., Paniago, N., Escande, A., Hopp, E., Lytovchenko, A., Fernie, A.R., Heinz, R., Carrari, F. Metabolic profiles of sunflower genotypes with contrasting response to *Sclerotinia sclerotiorum* infection. 2010. *Phytochem.* 71(1):70-80.

ABREVIATURAS

A: absorbancia

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

dsADNc: ADN complementario doble cadena

ssADNc: ADN complementario simple cadena

ANOVA: análisis de la varianza

AUDPC: área bajo la curva del progreso de la enfermedad

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARNr: ARN ribosomal

CTAB: Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio (*Cetrimonium Bromide*)

DEPC: dietilpirocarbonato

dNTP: desoxirribonucleótidos trifosfato

DPI: Días Post Inoculación

DO: densidad óptica

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EUA: Estados Unidos de América

ESTs: Marcador de secuencia expresada (*Expressed sequence tags*)

GC/MS: Cromatografía gaseosa/ Espectrofotometría de masa (Gas chromatography-mass spectrometry)

GAPDH: Gliceraldehido fosfato deshidrogenasa

GLP: Proteína del tipo germina (*Germin Like Protein*)

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

ha: hectárea

HCA: análisis jerárquico de agrupamiento (Hierarchical Cluster Analysis)

hr: hora

I: inoculado

IP: inhibidor de poligalacturonasa

JA: ácido jasmónico

LB: Luria Bertani

LC-ESI-MS/MS: del inglés *Liquid chromatography electrospray ionisation tandem mass spectrometry*

Log: logaritmo

µg: micro gramo

µl: microlitro

LTP: proteína de transferencia de lípidos

m: metro

ml: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

µM: micro molar

min: minuto

MSTFA: *N*-metil-*N*-trimetilsilil trifluoroacetamida

NI: Inoculado con agua (*mock inoculated*)

nm: nanómetro

OPDA: ácido 12-oxofitodienoico

PAL: Fenilalanina amonio liasa (*Phenylalanine amonio liase*)

PCA: análisis de componentes principales (*Principal Component Analysis*)

PCM: número promedio de conexiones por metabolito

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polimerase chain Reaction*)

PCD: Muerte celular programada (*Programmed cell death*)

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (*Quantitative Polymerase chain Reaction*)

PHC: Podredumbre Húmeda del Capítulo

PR: relacionadas/os con la patogénesis (*Pathogenesis related*)

PVP: polivinilpirrolidona

QTL: *Loci* de Caracter Cuantitativo (*Quantitative Trait Loci*)

ROS: especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)

rpm: revoluciones por minuto

RT: Transcripción Reversa

RT-PCR: Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción Reversa

RU: Reino Unido

SA: ácido salicílico

SDS: dodecilsulfato sódico

Seg: segundo

TCA: ciclo de los ácidos tricarboxílicos

UE: Unidad Enzimática

UPGMA: del inglés *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Descripción del taxón	4
Tabla 1. Especies Compuestas con importancia económica	4
1.2. El girasol	5
Figura 1. Mapas de la República Argentina donde se representan, de arriba hacia abajo, la superficie sembrada, la producción y el rendimiento del cultivo de girasol entre los años 1971-2005.	6
1.4.1. Mercado internacional	7
1.4.2. La producción de girasol en la Argentina	7
1.5. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y la Podredumbre Húmeda del Capítulo	9
1.5.1. Síntomas de la enfermedad	10
Figura 2. Síntomas de la Podredumbre Húmeda del capítulo en girasol.	10
1.5.2. Esclerocios	10
Figura 3. Modelo de la activación de MAPK mediado por Rap-1 e inhibido por AMPc en <i>S. sclerotiorum</i>.	12
1.5.3. Ciclo de la enfermedad	12
Figura 4. Ciclo de la enfermedad y síntomas producidos por <i>S. sclerotiorum</i> (Agiros, 1997).	14
1.5.4. Aspectos moleculares de la patogenia	15
1.5.4.1. Enzimas degradadoras de pared celular	15
Tabla 2. Genes de <i>S. sclerotiorum</i> que codifican para enzimas degradadoras de pared celular	16
1.5.4.2. Ácido oxálico	17
1.5.4.3. Factores de necrosis y Muerte Celular Programada (PCD)	19
1.5.5. Control de la enfermedad: resistencia y mecanismos de defensa	20
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	25
2.1. Objetivo general	25
2.2. Objetivos específicos	25
2.3. Hipótesis	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Material Vegetal	27
Tabla 3. Descripción de las líneas endocriadas del germoplasma público	27
3.2. Material patogénico	27
3.3. Ensayos a Campo	28
3.3.1. Ensayo para análisis de perfiles metabólicos por GC/MS y perfiles transcripcionales de genes candidatos	28
3.3.2. Ensayo para construcción de colecciones de ADNc substractivas, análisis de actividades enzimáticas, análisis transcripcional de genes candidatos y perfiles hormonales	29
3.4. Extracción, derivatización y detección de metabolitos de flores de girasol para análisis por la GC/MS	30
3.5. Análisis de actividades enzimáticas	31
3.5.1. Extracción de proteínas a partir de tejidos de flor	31
3.5.2. Medición de la actividad enzimática	31
3.6. Extracción de ARN	32
3.6.1. Extracción de RNA Total	32
3.6.2. Cuantificación, análisis de calidad e integridad del ARN	32
3.6.3. Purificación de ARNm a partir de ARN total	33
3.7. Construcción de colecciones de ADNc	33

3.7.1. Síntesis de ADNc, hibridaciones y amplificaciones substractivas	33
Figura 5. Representación esquemática de la metodología <i>PCR-Select cDNA Subtraction</i> (Diatchenko y col., 1996; Gurskaya y col, 1996).....	34
3.7.2. Clonado de las moléculas de dsADNc	35
3.7.3. Transformación de <i>E. coli</i>	35
3.7.4. Selección de clones	35
3.7.5. Cuantificación de ADN	36
3.7.6. Secuenciación y Análisis de las secuencias.....	36
3.8. Análisis transcripcional de genes candidatos	36
3.8.1. <i>Northern Blot</i>	36
3.8.2. Tratamiento con ADNasa y chequeo por PCR.....	37
3.8.3. Síntesis de ADNc	37
3.8.4. PCR en tiempo final.....	37
3.8.5. PCR cuantitativa (en tiempo real)	37
Tabla 4. Componentes de la mezcla maestra de reacción de qPCR.....	38
Tabla 5. Oligonucleótidos diseñados para PCR cuantitativa. AN: número de acceso	39
3.9. Determinación de Jasmonatos (JAs) y Ácido Salicílico (SA) en capítulos de girasol	40
3.9.1. Extracción y purificación de fitohormonas (JAs, SA)	40
3.9.2. Identificación y cuantificación con LC-ESI-MS/MS	40
3.10. Análisis estadístico	41
3.10.1. Análisis de perfiles metabólicos.....	41
3.10.2. Análisis de perfiles hormonales	42
4. RESULTADOS	43
4.1. Estudio de perfiles metabólicos por CG/MS.....	43
4.1.1. Evaluación de la incidencia de enfermedad en las líneas en evaluación.....	43
Figura 6. Curva del progreso de la enfermedad (arriba) y cálculo de AUDPC acumulativa (abajo).	43
4.1.2. Detección de metabolitos en capítulos de girasol por medio de cromatografía gaseosa/ espectrofotometría de masa (GC/MS).....	44
Figura 7. Cromatogramas iónicos totales obtenidos por la técnica de GC-MS A. Extractos de frutos de tomate. B. Extractos de de flores de girasol. C. Una mezcla estequiométrica de extractos de frutos de tomate y flores de girasol	48
Figura 8. Representación esquemática de las vías metabólicas analizadas en flores de girasol.	49
4.1.3. Cambios en los niveles metabólicos de flores de girasol en la línea moderadamente resistente RHA801 y en la línea susceptible HA89 infectados con <i>S. sclerotiorum</i>	50
Figura 9. Perfiles metabólicos de flores de girasol a lo largo de la infección con <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . Contenido relativo de metabolitos de flores muestreadas a los 0, 2, 4 y 12 días post inoculación.....	51
4.1.4. Análisis de componentes principales (PCA) y Análisis jerárquico de Agrupamiento (conglomerados) (HCA) del complemento metabólico en las líneas moderadamente resistentes y susceptibles de girasol,	53
Figura 10. Análisis de Componentes Principales (PCA) y Análisis de Agrupamiento (HCA).....	54
4.1.5. Análisis de correlación entre los niveles de metabolitos	54
Figura 11. Visualización de las correlaciones significativas metabolito-metabolito ($p < 0,01$) (izquierda) y la representación circular de las redes (derecha) en dos líneas de girasol con comportamiento contrastante frente a <i>S. sclerotiorum</i>	56
Tabla 6. Actividades enzimáticas en flores de girasol de las líneas HA89 y RHA801. .	58
4.2. Identificación de genes candidatos mediante análisis de perfiles transcripcionales y construcción de colecciones de ADNc substractivas	59
4.2.1. Extracción de ARN	59

4.2.2. Evaluación de genes candidatos.....	60
Figura 12. Análisis de expresión basado en abundancia de transcritos en líneas de girasol endocriadas moderadamente resistentes (RHA275, RHA801, HA853) y susceptible (HA89).....	61
Tabla 7. Medición de los niveles de HaGLP1 y LTP1 por qRT-PCR en la línea RHA801 proveniente del ensayo de Balcarce.....	62
4.2.3. Construcción de colecciones de ADNc	62
Figura 13. Distribución de secuencias según GO por proceso biológico para las cuatro colecciones de ADNc generadas.....	65
4.2.4 Estudios de perfiles de expresión por técnicas de PCR cuantitativa (qRT-PCR) 69	
4.2.4.1. Evaluación de seis genes de referencia para ser utilizados en el método de cuantificación relativa.....	69
Tabla 8. Comparación de la estabilidad de expresión de distintos genes de referencia entre órganos del capítulo y días post (DPI) utilizando un análisis de varianza de dos factores (ANOVA).....	69
4.2.4.2 Validación de genes candidatos	69
Figura 14. RT-PCR cuantitativa (qPCR).....	70
Tabla 9. Medición de los niveles transcripcionales de los distintos genes seleccionados para la validación de las clonotecas por RT-PCR cuantitativa.	71
Tabla 10. Medición de los niveles de PR5-1 por qRT-PCR.	72
Figura 15. Expresión relativa de los genes Elemento de respuesta a Etileno, Quitinasa, WRKY7.....	73
4.3. Análisis de perfiles hormonales	74
4.3.1. Cambios en los niveles de Ácido Jasmónico	74
Tabla 11. Prueba de hipótesis marginales para el ácido jasmónico (SC tipo III)	74
Tabla 12. Medias ajustadas y errores estándares (E.E.) para el tratamiento.	74
Tabla 13. Medias ajustadas y errores estándares del ácido jasmónico para la interacción Línea*DPI.....	75
Figura 16. Representación gráfica de las medias de la combinación Línea*DPI (días post inoculación) para dos líneas de girasol RHA801 (moderadamente resistente) y HA89 (susceptible) a los 0, 1, 2 y 4 días post inoculación.	75
4.3.2. Cambios en los niveles de Ácido Salicílico.....	76
Tabla 14. Prueba de Hipótesis marginales para el ácido salicílico. SC tipo III ($p < 0,05$)	76
Tabla 15. Medias ajustadas y errores estándares del ácido salicílico para la interacción Línea-DPI-Tratamiento.....	76
Figura 17. Representación gráfica de las medias de la combinación Línea*DPI*tratamiento para dos líneas de girasol RHA801 (moderadamente resistente) y HA89 (susceptible) a los 0, 1, 2 y 4 días post inoculación.	77
5. DISCUSIÓN.....	78
5.1. Estudio de perfiles metabólicos por CG/MS.....	78
5.2. Identificación de genes candidatos mediante análisis de perfiles transcripcionales y construcción de colecciones de ADNc substractivas	83
5.3. Estudio de los perfiles hormonales para Ácido salicílico y ácido jasmónico en dos líneas de girasol con comportamiento contrastante frente a <i>S. sclerotiorum</i> ... 88	
6. CONCLUSIONES	90
7. REFERENCIAS	92
8. APÉNDICE	122

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción del taxón

El girasol cultivado (*Helianthus annuus* L.) es una especie diploide, perteneciente a la familia Asteraceae (Compositae), subfamilia Asteriodae, tribu *Helianthae*, subtribu *Helianthinae*, género *Helianthus* (Seiler & Rieseberg, 1997).

La familia Asteraceae (Compositae) es la más grande y diversificada dentro de las Angiospermas (Funk y col., 2005; Heywood, 1978), incluye al 10% de todas las especies con flor conocidas y se caracteriza por tener una flor compuesta formada por numerosas inflorescencias. Otra característica de esta familia es su gran distribución, abarcando todos los ambientes y no sólo las zonas comprendidas entre los trópicos, como ocurre en el resto de las Angiospermas. La familia probablemente se originó en América del Norte hace 30 a 100 millones de años (Raven & Axelrod, 1974) y sufrió una rápida y extensiva diversificación produciendo un gran espectro de taxones.

Más de 40 especies económicamente importantes han sido domesticadas dentro de esta familia (ejemplos de estas especies se detallan en la Tabla 1) (Kesseli & Micheltore, 1997), entre ellas se incluyen cultivos alimenticios (lechuga, achicoria, topinambur), aceiteros (girasol, cártamo), medicinales (*Echinacea*, manzanilla) y muchos ornamentales (crisantemo, dalia, zinnia y copete).

Tabla 1. Especies Compuestas con importancia económica.

Nombre común	Género y especie	Importancia económica
Lechuga	<i>Lactuca sativa</i> L.	Alimento
Girasol	<i>Helianthus annuus</i> L.	Aceite, alimento y ornamental
Cártamo	<i>Carthamus tinctorius</i> L.	Aceite, alimento y ornamental
Endibia	<i>Cichorium endivia</i> L.	Alimento
Achicoria	<i>Cichorium intybus</i> L.	Alimento
Alcaucil	<i>Cynara scolymus</i> L.	Alimento
Topinambur	<i>Helianthus tuberosus</i> L.	Alimento
Yerba dulce o Stevia	<i>Stevia rebaudiana</i>	Alimento
Caléndula	<i>Calendula officinalis</i> L.	Aceite, hierba y ornamental
Guayule	<i>Parthenium argentatum</i> L.	Látex hipoalergénico
Piretro	<i>Chrysanthemum cinerariifolium</i> L.	Pesticida y ornamental
Echinacea	<i>Echinacea</i> spp.	Medicinal y ornamental
Gerberas	<i>Gerbera</i> spp.	Ornamental
Copetes	<i>Tagetes</i> spp.	Ornamental
Cosmos	<i>Cosmos</i> spp.	Ornamental
Crisantemos	<i>Chrysanthemum</i> spp.	Ornamental
Zinnias	<i>Zinnia</i> spp.	Ornamental
Margarita	<i>Bellis perennis</i> L.	Ornamental y hierba
Artemisias	<i>Artemisia</i> spp.	Ornamental y hierba
Estragón	<i>Artemisia dracunculoides</i> L.	Hierba
Manzanilla	<i>Anthemis nobilis</i> L.	Hierba
Diente de León	<i>Taraxacum officinale</i> L.	Alimento y maleza
Senecio	<i>Senecio</i> spp.	Maleza

La mayoría de las especies de la familia Asteraceae analizadas hasta la fecha tienen genomas más grandes que 1,1 picogramos de ADN /1C (Kesseli & Michelmore, 1997) con excepción de algunas especies como *Leontodon taraxacoi* cuyo genoma es de 0,3 pg (disponible en el proyecto genoma de compuestas <http://compgenomics.ucdavis.edu/cwp/draft.php>).

1.2. El girasol

El girasol, *Helianthus annuus* L., comprende tres subespecies principales: *Helianthus annuus* ssp. *lenticularis*, girasol silvestre; *Helianthus annuus* ssp. *annuus*, girasol maleza y *Helianthus annuus* ssp. *macrocarpus*, girasol cultivado por sus frutos comestibles.

Su centro de origen es América del Norte, y su antecesor silvestre es una especie diploide ($2n = 2x = 34$) perteneciente a la subtribu *Helianthinae* (Seiler & Riesberg, 1997), siendo el centro de diversidad de dicha especie también América del Norte.

Es una especie alógama y autoincompatible, cuya domesticación ha permitido la autocompatibilidad y un aumento en el tamaño y en el vigor de la semilla. Esto hace que el girasol cultivado tenga varias características que facilitan el desarrollo de germoplasma autopolinizable, favoreciendo los programas de mejoramiento como el desarrollo de híbridos. El girasol cultivado puede ser cruzado sin dificultad, tiene una alta producción de semillas (aproximadamente 1000 semillas/planta) y un tiempo generacional corto de 70 a 100 días.

El girasol es sinónimo de aceite en primer lugar y de proteína en segundo lugar. Su aceite ha sido por años de tipo "linoleico", sin embargo por razones vinculadas al cuidado de la salud y a la demanda de características especiales para usos industriales, se impulsó el desarrollo del girasol medio oleico y alto oleico.

Particularmente, a partir del girasol se obtiene un aceite comestible de alta calidad con bajo contenido de ácidos grasos saturados y alto contenido de ácidos grasos mono y di insaturados. Existen tres calidades de aceite de girasol, dependiendo de su composición, algunas de las cuales no necesitan hidrogenación, característica que los hace ideales para ser usados en frituras (aceite medio oleico y alto oleico) y para elaborar comida para bebé, atendiendo a su estabilidad durante los procesos de elaboración.

El aceite de girasol es considerado de gran valor debido a su composición de ácidos grasos insaturados (oleico y linoleico) y su bajo contenido en ácido linolénico. Es usado además, en jabones y detergentes en Europa del Este, como "transportador" en agroquímicos, particularmente pesticidas hidrofóbicos, surfactantes, adhesivos, plásticos, suavizantes y lubricantes. Además el aceite de girasol es usado en la industria cosmética y tiene un gran potencial como insumo en la producción de biodiesel.

1.3. El girasol en Argentina

Las primeras referencias sobre el girasol en la República Argentina se remontan al siglo XIX, cuando los colonos de origen hebreo afincados en las provincias de Entre Ríos, Santa Fe y Buenos Aires realizaron las primeras introducciones de semilla para su propio consumo. A partir del año 1900 su difusión como cultivo, comenzó en forma casi simultánea, en la Colonia Mauricio, partido de Carlos Casares, en el oeste de la provincia de Buenos Aires y en Basavilbaso, provincia de Entre Ríos, por agricultores inmigrantes. En la República Argentina, el cultivo se extiende entre los 24 y 38 grados de longitud sur, abarcando una amplia gama de ambientes e involucrando una extensa región donde el girasol constituye una alternativa importante para los productores, como puede observarse en los mapas de la Figura 1

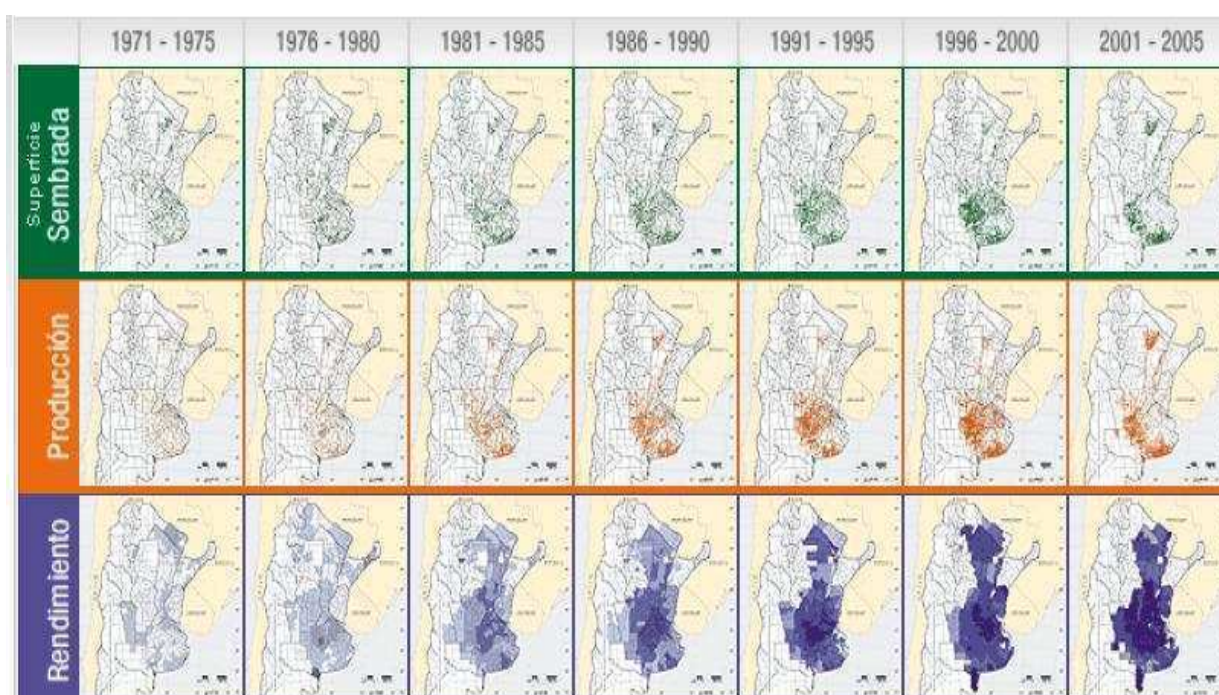


Figura 1. Mapas de la República Argentina donde se representan, de arriba hacia abajo, la superficie sembrada, la producción y el rendimiento del cultivo de girasol entre los años 1971-2005.

(Fuente: La Argentina en mapas, CONICET)

1.4. Importancia económica

1.4.1. Mercado internacional

La producción mundial de girasol (que oscila en torno a las 27/30 millones de toneladas) tiene cuatro principales protagonistas: la Federación Rusa, que habitualmente aporta unas 6,5 millones de toneladas, Ucrania, con 4,2 a 5,3 millones de toneladas y la Unión Europea, con 4,8 a 6,5 millones. Los tres son grandes competidores en el Hemisferio Norte, mientras que el único país relevante en el Hemisferio Sur es la Argentina, con 3,5/4,5 millones de toneladas.

El principal producto de la molienda de girasol, y que contribuye casi excluyentemente a la formación de su precio, es el aceite. El resto, fundamentalmente harina de proteína vegetal, se vende como insumo forrajero para la producción de carnes y leche.

En el mercado mundial de aceites, el de girasol es el cuarto en orden de importancia. En las campañas que van desde los años 2003/2004 a 2007/2008 (consideradas para el Hemisferio Norte), el aceite de girasol participó con 8/9 % de la oferta mundial. Así, este producto compite en el segmento de aceites de mejor calidad junto con el de canola.

La Argentina fue el primer exportador mundial de aceites y pellets de girasol hasta el 2007, lugar que perdió en las últimas campañas debido a las malas condiciones climáticas y a una reducción del 39% del área sembrada por la discriminación tributaria que sufrió del 32% (CREA, 2010). Actualmente, el desarrollo del cultivo en Rusia (7 millones de toneladas), Ucrania (6 millones de toneladas) y la Unión Europea (6,5 millones de toneladas), han determinado que estos países superen en producción a nuestro país (2 millones de toneladas) dejando a la Argentina en el cuarto lugar como productor mundial y en el quinto como exportador (Ingaramo, 2010).

1.4.2. La producción de girasol en la Argentina

Si se estudian las campañas que van desde la de 1998/1999 hasta la de 2007/2008, pueden distinguirse dos etapas muy claras (sin considerar las últimas dos campañas como se aclaró en el ítem anterior): 1. Hasta la campaña 1999/2000; y 2. las ocho campañas restantes.

En la primera etapa, hubo un fuerte entusiasmo por el cultivo, que se reflejó en un récord de 4,24 millones de hectáreas y una producción de 7,1 millones de toneladas en la campaña 1998/1999. El rinde fue muy bueno en la comparación histórica (1762 kg/ha). En la campaña siguiente, se produjeron más de 6 millones de toneladas. Ambas ofertas fueron volcadas a un mercado mundial fuertemente debilitado en materia de precios, a raíz de la irrupción de la oferta del aceite de palma (cultivo perenne, muy significativo en Asia, cuya producción entró al mercado masivamente hacia fines de la década de los '90). Por esta razón, se produjo una baja inusitada de precios para los aceites, lo que condujo a la etapa siguiente.

La segunda etapa se inicia con una abrupta caída del área de siembra en nuestro país como consecuencia del quebranto económico inducido por los magros precios internacionales. La superficie cayó un 45% en 2000-01 y la producción apenas llegó a 3,18 millones de toneladas. Desde entonces, ha habido una recuperación gradual en el área sembrada, que alcanzó las 2,7 millones de hectáreas en 2007/2008 (36,6 % más que el

valor piso). La producción había crecido 41,9%, hasta las 4,51 millones de toneladas y los rindes apenas aumentaron 2,5%.

La traslación del cultivo hacia zonas con mayor riesgo agroecológico y tierras de menor calidad y aptitud se observa claramente en los mapas de superficie sembrada y de producción (en color verde y naranja, respectivamente) de la Figura 1. Como contraparte, se incorporaron importantes cambios tecnológicos que produjeron rendimientos cada vez mejores (indicados en la Figura 1 en color violeta), evitando así que los rendimientos a nivel país hayan experimentado bajas significativas. En la campaña 2007/2008 se obtuvieron 1710 kg/ha a nivel país, mientras que en los últimos ocho años, el rango osciló entre 1502 kg/ha y 1904 kg/ha.

La participación de las distintas provincias en el área sembrada indica que la reasignación de tierras ha sido por demás significativa, tal como se mencionó en párrafos anteriores y se desprende del mapa de superficie sembrada (Figura 1, color verde), comparando los períodos 1986/90 y 2001/05. En la provincia de Buenos Aires, entre 2000/01 y 2006/07, el área aumentó un 23 %. La segunda provincia en importancia a comienzos de la década del '00 fue Córdoba, que ha visto reducida en un 68% la superficie de cultivo. La Pampa, tercera provincia productora, la ha incrementado en un 30,5%. El 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 (un 64% más) (Asociación Argentina de girasol, 2008)

Si bien el girasol junto con la soja ocupa la fracción más importante de la producción e industrialización de semillas oleaginosas en Argentina, existe entre ambos cultivos una brecha tecnológica importante en favor de la soja, que deja al girasol en condiciones competitivas inferiores. Con el objeto de mitigar esta situación, se desarrollaron diversos programas de investigación a nivel nacional, orientados a satisfacer las demandas locales del cultivo (Bruniard, 2002). Dentro de los problemas tecnológicos del cultivo se destaca la necesidad de intensificar la búsqueda de nuevas fuentes de resistencias a enfermedades, y el desarrollo de líneas que aseguren estabilidad de producción en regiones de cultivo afectadas. Entre los patógenos más importantes que afectan el girasol en Argentina se encuentran los de origen fúngico, siendo los más relevantes: *Sclerotinia sclerotiorum* (podredumbre húmeda del capítulo; PHC), *Verticillium dahliae* (secado anticipado y quebrado del tallo; SayQT), *Plasmophara hasltedii* (mildiu o enanismo) y *Puccinia helianthii* (roya negra). De ellos, *S. sclerotiorum* es uno de los hongos fitopatógenos que causa más problemas a nivel mundial dado que es capaz de colonizar un amplio espectro de hospedantes, que incluyen las especies agronómicas de mayor impacto económico dentro de las familias de las compuestas, las crucíferas, las solanáceas y las leguminosas. En Argentina, la PHC es una de las enfermedades más devastadoras del girasol que en casos extremos puede causar pérdidas totales por la caída de los capítulos, con una incidencia anual promedio sobre la producción de la pampa húmeda del 10-20% (Pérez Fernández, 2002).

1.5. *Sclerotinia sclerotiorum* y la Podredumbre Húmeda del Capítulo

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary es un ascomicete necrotrófico, de la clase Ascomycetes, orden Helotiales, familia Sclerotiniaceae, género *Sclerotinia*. Este hongo necrotrófico es uno de los más devastadores y cosmopolitas en plantas. Más de 60 nombres han sido usados para referirse a las enfermedades causadas por este patógeno fúngico (Purdy, 1979) incluyendo podredumbre algodonosa, podredumbre húmeda blanda, podredumbre del tallo, tizón de la flor y la más conocida, podredumbre blanca. Este hongo es capaz de infectar más de 400 especies de plantas en el mundo incluyendo importante cultivos y numerosas malezas (Boland & Hall, 1994). *S. sclerotiorum* es una amenaza tanto para las dicotiledóneas de importancia económica como girasol, soja, colza, frijol comestible, garbanzo, maní, arveja seca, lentejas, y varios vegetales como la lechuga, la zanahoria, la papa y el tomate, como para monocotiledóneas como la cebolla y los tulipanes (Boland & Hall, 1994). La importancia de *S. sclerotiorum* como patógeno de plantas data de hace muchos años (Libert, 1837). Las pérdidas anuales debido a epifitias causadas por *S. sclerotiorum* han excedido los 200 millones de dólares (Anon., 2005). *S. sclerotiorum* fue identificado como patógeno del girasol por Fuckel en 1861 (Purdy, 1979). Este hongo necrotrófico está ampliamente distribuido y su aparición ha sido reportada en todas las regiones girasoleras del mundo (Bolton y col., 2006). En la Argentina, este patógeno afecta al cultivo en muchas regiones, pero la zona más expuesta es el sudeste y sur de la provincia de Buenos Aires (Pereyra & Bazzalo, 1988). *S. sclerotiorum* puede causar diversas enfermedades en el girasol:

Podredumbre húmeda de la base del tallo: la germinación miceliogénica de los esclerocios en el suelo puede infectar raíces y la base del tallo causando marchitez

Podredumbre húmeda del Tallo: las ascosporas infectan hojas y la infección progresa hacia el pecíolo, produciendo degradación de la médula y quebrado del tallo

Podredumbre húmeda del capítulo (PHC): las ascosporas infectan las flores tubulosas y la infección progresa produciendo la podredumbre del receptáculo

Sin embargo, en el sudeste de la provincia de Buenos Aires, la enfermedad que predomina es ésta última. Los daños económicos más importantes por PHC son la pérdida de producción por pudrición de capítulos, la disminución de la calidad por la presencia de cuerpos extraños en los lotes de semilla producida y la acidificación del aceite que se extrae de la semilla de capítulos enfermos. Esta enfermedad puede causar la pérdida total de la producción en lotes individuales (Pereyra & Escande, 1994). La epifitia de PHC en Argentina durante 1987/88, es considerada la más importante que sufriera el cultivo en nuestro país, tanto por su incidencia en cada lote como por la magnitud del área afectada (Pereyra & Bazzalo, 1990). En esa oportunidad se registraron pérdidas totales en más de 50.000 ha y disminuciones en el rendimiento cercanos al 50% en otras 100.000 ha (Pereyra & Valetti, 1993).

El daño extensivo de los cultivos, junto con la falta de resistencia de los hospedantes y la dificultad de controlar las enfermedades causadas por este patógeno, han sido el impulso sostenido para la investigación en este tema en distintos países (Bolton y col., 2006).

1.5.1. Síntomas de la enfermedad

Dado que *S. Sclerotiorum* tiene un amplio rango de hospedantes los síntomas no son los mismos en todas las plantas infectadas por el patógeno. Los síntomas de la podredumbre del capítulo (PHC) se caracterizan por una necrosis floral seguida de manchas color marrón claro en el envés del capítulo y podredumbre húmeda del receptáculo; a medida que la infección progresa el patógeno va consumiendo los tejidos del capítulo hasta dejar sólo las fibras de los tejidos vasculares que dan al mismo el aspecto de escoba. A su vez, el micelio se va concentrando en diferentes puntos dando origen a los esclerocios en el receptáculo (Figura 2)

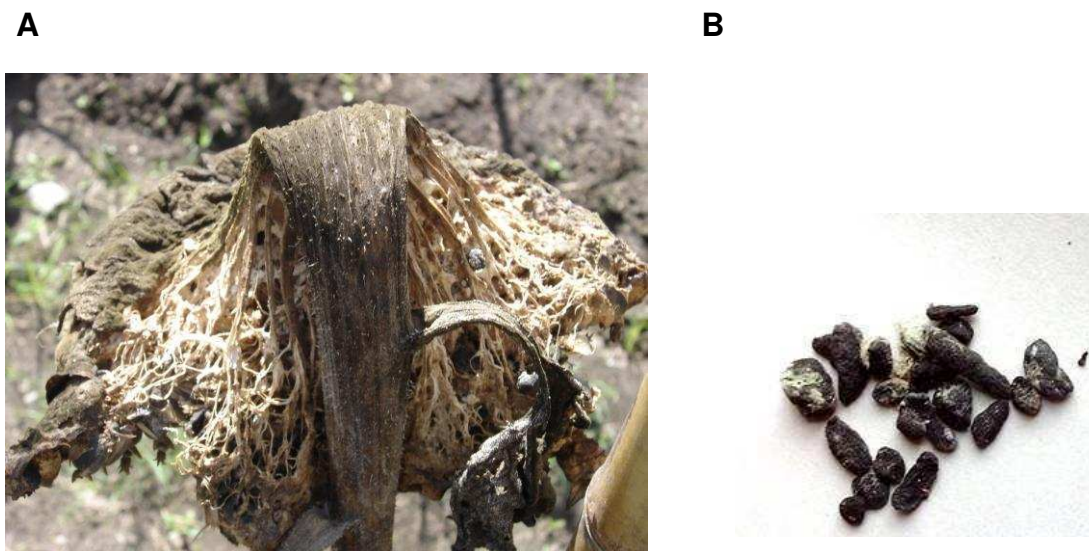


Figura 2. Síntomas de la Podredumbre Húmeda del capítulo en girasol.
A. Capítulo de girasol mostrando síntomas avanzados de la enfermedad. **B.** Esclerocios.

1.5.2. Esclerocios

Los esclerocios juegan un papel importante en los ciclos de infección de esta enfermedad debido a que producen el inóculo y además son estructuras de supervivencia de larga duración que pueden permanecer viables hasta 8 años (Adams & Ayers, 1979; Willetts & Wong, 1980;). Los esclerocios son agregados de hifas de color negro con alto contenido de melanina, un compuesto que se cree que en algunos casos está asociado a la virulencia y que juega un papel importante en la protección frente a condiciones adversas y a los efectos de degradación de otros microorganismos en varios hongos (Bell & Wheeler, 1986; Henson y col., 1999). El tamaño de los esclerocios varía drásticamente dependiendo del hospedante. En girasol, un esclerocio puede tener hasta 1 cm de ancho y puede exceder los 3,5 cm de diámetro. Se han caracterizado 3 estadios en el desarrollo de los esclerocios: 1. Iniciación: etapa en que la hifas se agregan formando una masa blanca llamado esclerocio inicial; 2. Desarrollo: en donde las hifas crecen y adquieren mayor agregación para aumentar el tamaño, 3. Maduración: estadio en donde se produce la delimitación superficial, deposición de melanina en las células de la corteza y consolidación interna. Por

lo general los esclerocios son producidos cuando el crecimiento del micelio se encuentra limitado por la escasez de nutrientes (Christias & Lockwood, 1973). Se ha demostrado que el pH tiene una influencia significativa en el desarrollo de los esclerocios. En medios de cultivo a pH neutro o básico, la formación de esclerocios se ve inhibida, mientras que la acumulación de ácido oxálico producida por el hongo lleva a una disminución del pH en el medio ambiente, favoreciendo el desarrollo de esclerocios (Maxwell & Lumsden, 1970; Rollins & Dickman, 2001). En concordancia, las mutantes de *S. sclerotiorum* incapaces de producir ácido oxálico también son incapaces de producir esclerocios *in vitro* y son no patogénicas para la planta (Dickman & Mitra, 1992; Godoy y col., 1990). Sin embargo, la disminución del pH del medio no restaura la habilidad de desarrollar esclerocios en estas mutantes sugiriendo un modo de regulación más complejo (Rollins & Dickman, 2001). No obstante, el gen de *S. sclerotiorum* *pac1*, que es un componente de la vía de regulación mediada por pH, es requerido para el crecimiento a pH neutro, la virulencia, la producción de ácido oxálico y el desarrollo de esclerocios, lo que claramente demuestra que la expresión génica en respuesta al pH es un importante aspecto en el desarrollo de este hongo y de su patogenicidad (Rollins, 2003). Rollins & Dickman (1998) encontraron que el AMP cíclico (AMPC) juega un rol importante en la transición entre la etapa de crecimiento micelial y la etapa de desarrollo de esclerocios. Un aumento en los niveles endógenos o exógenos de AMPC inhibe el desarrollo esclerotial pero aumenta los niveles de ácido oxálico producidos por *S. sclerotiorum*. Los aumentos en los niveles de AMPC inhiben a Smk1, una MAPK quinasa del patógeno, que también es necesaria para la esclerogénesis (Figura 3). A pH ácido se detectó una alta expresión de los transcritos de Smk1, afectando a la cascada de MAPK quinastas, vía una señalización dependiente de pH y de AMPC, como elemento regulador en el desarrollo de esclerocios (Chen y col., 2004). Para examinar la influencia del AMPC en la esclerogénesis, Harel y col. (2005) demostraron que los niveles de la proteína proteinasa K (PKA) dependiente de AMPC aumentaban durante el desarrollo de los esclerocios en cepas salvajes, pero se mantenían bajos en las mutantes incapaces de producir esclerocios. Además, se encontró que la aplicación de estímulos ambientales que aumentaban los niveles de PKA se correlacionaba con la producción de estructuras del tipo esclerocio en mutantes que no producían esclerocios (Figura 3). Sin embargo, mutantes *Knock-out* para la subunidad catalítica de PKA del gen *pka1* eran capaces de producir esclerocios, respondían a AMPC y presentaban niveles de patogenicidad similares a las cepa salvaje, sugiriendo una vía independiente de PKA o genes adicionales que codifican para PKA involucrados en el desarrollo de esclerocios (Jurik y col., 2004). Chen & Dickman (2005) sugirieron que la inhibición de la producción de esclerocios por cAMP es independiente de PKA debido a que la inhibición de la actividad de PKA por inhibidores específicos no tenía efecto en la inhibición por MAPK dependiente de AMPC o en el desarrollo de esclerocios. Más aun, se demostró que la proteína pequeña GTPase Ras, un activador río arriba de la cascada de MAPK quinastas, era necesaria para el desarrollo normal de esclerocios debido a que la pérdida de su actividad impedía la activación de MAPK, sugiriendo que la vía de señalización Ras/MAPK era necesaria para la esclerogénesis (Figura 3). Es interesante destacar que la inhibición de Rap-1, un miembro de la familia proteica Ras, restauró la activación de MAPK y el desarrollo normal de los esclerocios bloqueado bajo la presencia de AMPC. Estos resultados sugieren que el

desarrollo de los esclerocios se basa en un mecanismo que requiere la participación de la vía Ras/MAPK que es regulado negativamente por RAP-1, en una vía de señalización por AMPc independiente de PKA (Figura 3). Estos estudios ilustran un juego finamente orquestado entre la señalización por AMPc y la detección del pH ambiental en la esclerogénesis donde el rol de PKA todavía es incierto.

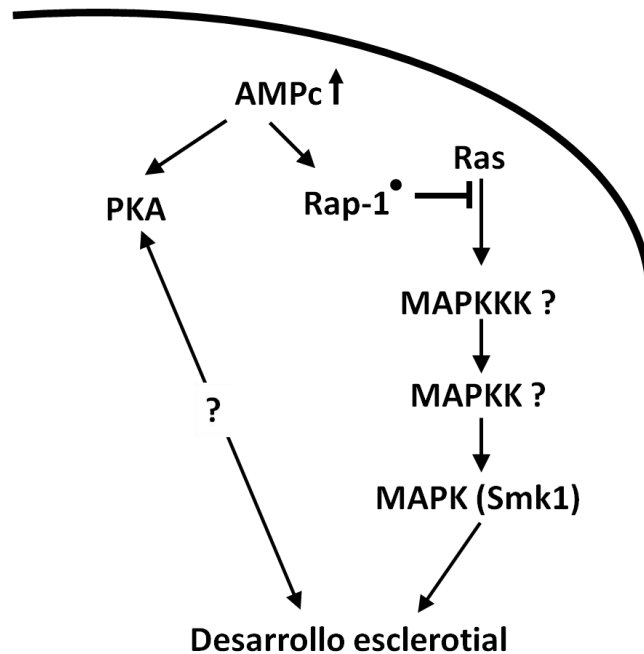


Figura 3. Modelo de la activación de MAPK mediado por Rap-1 e inhibido por AMPc en *S. sclerotiorum*.

Este esquema muestra la inhibición por AMPc/Rap-1 en una vía de señalización Ras/MAPK y la influencia de la proteína A (PKA) en el desarrollo de esclerocios. Los niveles de PKA aumentan durante el desarrollo de los esclerocios. Por otro lado, los niveles altos de PKA correlacionan con la producción de precursores de esclerocios en mutantes que no producen esclerocios (Harel y col 2005). Chen & Dickman (2005) demostraron que Rap-1 es activado por AMPc y posiblemente se una río arriba en la cascada de señalización con MAPKKK no identificadas y a MAPKK en la vía Ras/MAPK. Estas uniones llevan a la inactivación de MAPK (Smk1) río abajo, que en consecuencia inhiben el desarrollo de los esclerocios. Adaptado de Chen & Dickman (2005).

1.5.3. Ciclo de la enfermedad

El potencial máximo de reproducción y su capacidad de supervivencia hacen del esclerocio el componente central en la epidemiología de *S. sclerotiorum*. Los esclerocios en condiciones ambientales favorables germinan generando apotecios que subsecuentemente producen ascosporas que son las que infectan los capítulos del girasol (Figura 4). Las condiciones ambientales que favorecen la germinación de los esclerocios son temperaturas entre los 15 y 20°C y alta humedad. Los apotecios no germinan hasta que el canopeo de los cultivos se cierra, debido a que la sombra favorece el mantenimiento de la humedad en el suelo. Este es un factor crítico en la producción de apotecios y es una de las principales

razones por las cuales el inicio de las enfermedades causadas por este patógeno está asociado con periodos de lluvias. Se pueden generar uno a varios apotecios a partir de un esclerocio. El apotecio consiste en un estípite que se origina a partir del esclerocio y un receptáculo con una capa himenial cóncava plana. Las capas del himenio tienen filas de ascos que son sacos cilíndricos que contienen 8 ascosporas binucleadas. Las ascosporas son descargadas por la fuerza de cada asco en condiciones ambientales favorables por más de 10 días en el campo a una tasa de 1600 ascosporas/h (Clarkson y col., 2003). Las ascosporas están recubiertas por una capa mucilaginosa que les permite adherirse al sustrato sobre el cual se depositan. Pueden sobrevivir sobre los tejidos vegetales hasta dos semanas dependiendo de las condiciones ambientales, siendo la humedad relativa alta y la luz ultravioleta determinantes para su supervivencia (Clarkson y col., 2003). Las ascosporas pueden germinar en la superficie de tejidos sanos pero no pueden infectar a la planta sin una fuente exógena de nutrientes y una película de agua. Por lo tanto, los tejidos senescentes o necróticos generalmente sirven como fuente de nutrientes para iniciar la germinación, dando origen a una infección micelial de la planta hospedante (Abawi & Grogan, 1979; Lumsden, 1979; McLean, 1958). La floración es considerada un factor crítico del hospedante asociado a esta enfermedad debido a que las partes de las flores senescentes sirven como fuente primaria de nutrientes (Inglis & Boland, 1990; Turkington & Morrall, 1993). Como la floración de los cultivos ocurre en el momento que el canopeo ha cerrado ya el surco, las fuentes de nutrientes están disponibles en el momento en que las condiciones son más favorables para el crecimiento de este patógeno. En la podredumbre húmeda del capítulo, la infección se produce directamente sobre las flores senescentes. Debido a que los esclerocios son el inóculo primario para el desarrollo de esta enfermedad en girasol, la densidad del inóculo presente en el suelo está directamente relacionada con la cantidad de enfermedad (Holley & Nelson, 1986). El micelio puede penetrar la cutícula de la planta hospedante mediante enzimas, por fuerza mecánica ejercida por los apresorios o por los estomas (Lumsden, 1979; Lumsden & Dow, 1973). Guimarães & Stotz (2004) demostraron que el ácido oxálico producido por *S. sclerotiorum* durante la infección está implicado en la desregulación de la células oclusivas produciendo la apertura de los estomas y en consecuencia la penetración de las hifas de los tejidos vegetales. Además de causar estrés hídrico, los estomas abiertos son utilizados por este patógeno para la emergencia de las hifas, para una colonización secundaria de la planta hospedante, así como también para la formación de esclerocios en la superficie de hospedante (Guimarães & Stotz, 2004; Lumsden & Dow, 1973).

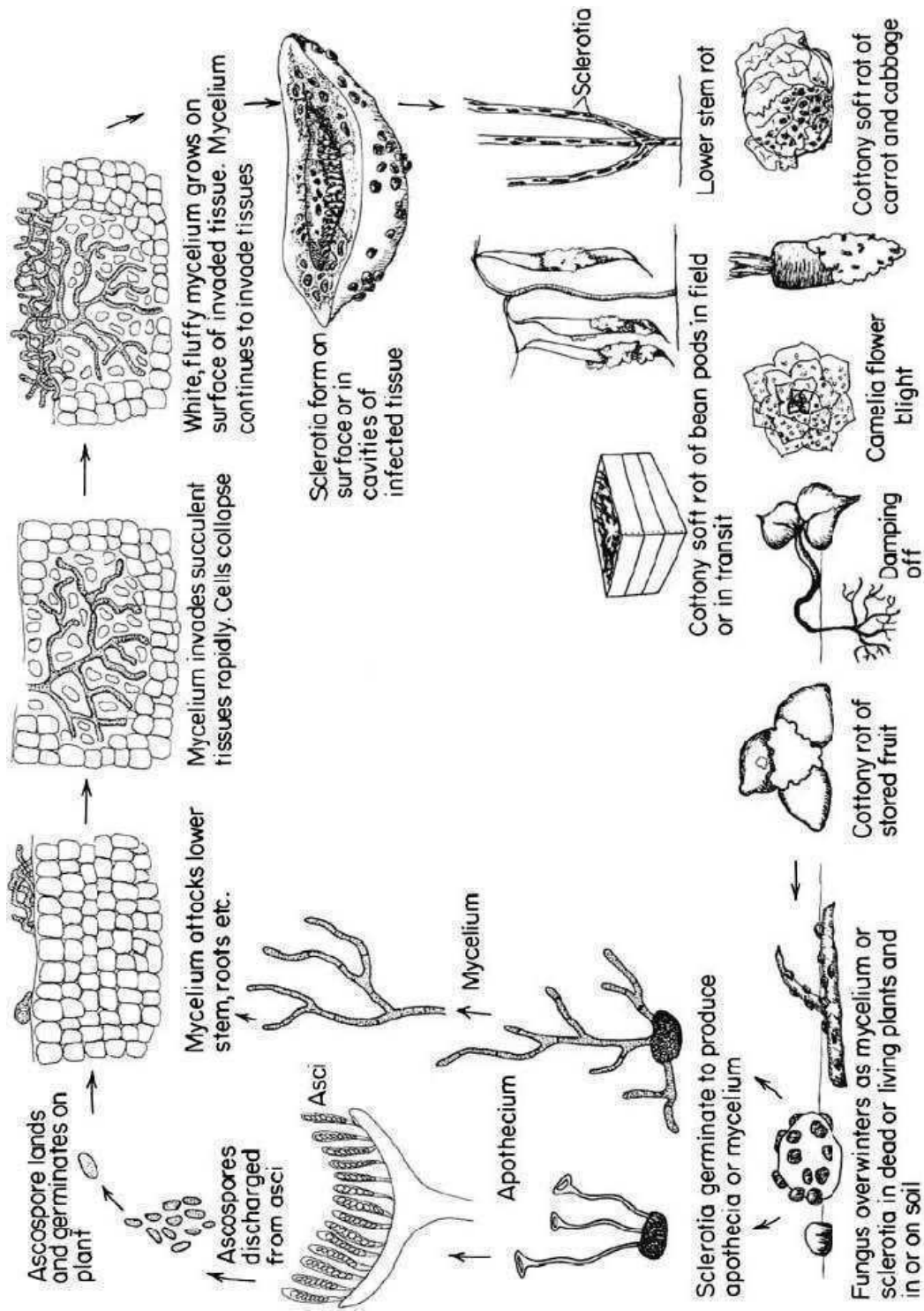


Figura 4. Ciclo de la enfermedad y síntomas producidos por *S. sclerotiorum* (Agrios, 1997).

1.5.4. Aspectos moleculares de la patogenicidad

Los estudios sobre los aspectos moleculares de la patogenicidad producida por microorganismos biotrofos por lo general se concentran en una interacción fina y sintonizada entre el patógeno y muchas veces su único hospedante (Basse & Steinberg, 2004; Thomma y col., 2003). Por el contrario, para la mayoría de los hongos necrotróficos que generalmente tienen un amplio rango de hospedantes, los estudios en aspectos moleculares se centran principalmente en la contribución de la actividad de las enzimas hidrolíticas y la producción de ciertos metabolitos que pueden actuar como toxinas (Kars & van Kan, 2004; Thomma, 2003; Toth y col., 2003). Éste también ha sido el tema principal para el estudio de *S. sclerotiorum*, con énfasis en el rol de las enzimas degradadoras de pared y el ácido oxálico (Bolton y col., 2006).

1.5.4.1. Enzimas degradadoras de pared celular.

Los hongos patógenos de plantas pueden colonizar fácilmente a sus hospedantes mediante la producción de un amplio rango de enzimas degradadoras de pared celular (EDPC), que incluyen pectinasas, β -1,3-glucanasas, glicosidasas, celulasas, xilanasas y cutinasas (Annis & Goodwin, 1997). La mayoría de estas enzimas están presentes como múltiples isoenzimas que se diferencian en su punto isoeléctrico, peso molecular, en su procesamiento o regulación transcripcional (Keon y col., 1987), dando al patógeno una gran flexibilidad para la penetración, colonización del hospedante y facilitando la creación de un grupo de nutrientes asimilables. En cultivo, la expresión de la mayoría de estas enzimas está fuertemente regulada a nivel transcripcional por la disponibilidad de fuentes de carbono y/o nitrógeno (Alghisi & Favaron, 1995). Así un mecanismo catabólico de represión por carbono permite que el hongo adapte su metabolismo a la disponibilidad de glucosa u otras fuentes de carbono que pueda metabolizar. Además, el pH ambiental puede también regular los niveles enzimáticos a nivel transcripcional (Cotton y col., 2003; Rollins & Dickman, 2001).

Durante la interacción con su hospedante, *S. sclerotiorum* secreta un completo complemento de enzimas degradadoras de pared que facilitan la penetración, maceración de tejidos y degradación de los componentes de pared celular (Hancock, 1966; Lumsden, 1969; Riou y col., 1991) (Tabla 2).

La pectina es el componente principal de la pared celular y las pectinasas producidas por *S. sclerotiorum* juegan un papel central en su degradación. *S. sclerotiorum* produce varias formas de estas enzimas pectinolíticas que son capaces de matar a las células y macerar tejidos vegetales en su favor (Alghisi & Favaron, 1995), sugiriendo su participación en la patogenicidad. Las poligalacturonasas (PGs) son importantes pectinasas que pueden degradar polímeros de pectato no esterificados, el polisacárido estructural de la laminilla media y de la pared celular primaria de las plantas superiores. La actividad PG en *S. sclerotiorum* es inducida por pectina o monómeros de pectina, como el ácido galacturónico, pero es reprimida por la presencia de azúcares simples (Fraissinet-Tachet & Fèvre, 1996; Riou y col., 1992).

Tabla 2. Genes de *S. sclerotiorum* que codifican para enzimas degradadoras de pared celular

Gen/Proteína	no. Acceso	Referencia
endoPGs Ácidas		
PG2	S13661	Waksman y col. (1991)
PG3	B60155	Waksman y col. (1991)
sspg3	AY312510	Li y col. (2004)
pg5	Y13669	Kasza y col. (2004)
sspg5	AY496277	Li y col. (2004)
pg6	AJ539086	Kasza y col. (2004)
pg7	AJ539087	Cotton y col. (2003)
PGa	CAF05669	Favaron y col. (2004)
endoPGs Neutras o Básicas		
pg1	L12023	Reymond y col. (1994)
pg2	L29040	Fraissinet-Tachet & Fèvre (1996)
pg3	L29041	Fraissinet-Tachet & Fèvre (1996)
sspg1d	AF501307	Li y col. (2004)
sspg6	AF501308	Li y col. (2004)
PGb	CAF05670	Favaron y col. (2004)
ExoPGs		
ssxpg1 (ADNc Parcial)	AY312511	Li y col. (2004)
ssxpg2 (ADNc parcial)	AY312512	Li y col. (2004)
Proteasa ácida no aspártica		
acp1	AF221843	Poussereau y col. (2001a)
Proteasa aspártica		
asps	AF271387	Poussereau y col. (2001b)

Las PGs han sido caracterizadas como factores de virulencia a través de la inhibición dirigida de genes en algunos patosistemas (García-Maceira y col., 2001; ten Have y col., 1998; Kars y col., 2005; Shieh y col., 1997; Wagner y col., 2000) pero no se cuenta con evidencias concluyentes sobre su rol universal en la virulencia de *S. sclerotiorum* (Gao y col., 1996; Scott-Craig y col., 1990). Las EndoPGs son enzimas que catalizan la hidrólisis de homogalacturonanos mientras que las ExoPGs rompen grupos glicosil mono o diméricos de los polisacáridos pécticos de pared, dando como resultado la fragmentación del sustrato y la liberación de potenciales nutrientes (Karns & Van Kan, 2004). Un gran número de endo y exoPGs han sido clonadas y caracterizadas en *S. sclerotiorum* (Tabla 2). Estudios moleculares han demostrado que este hongo puede producir múltiples formas (isoenzimas) de endoPGs como consecuencia de duplicaciones génicas, a través de modificaciones post-transcripcionales (glicosilación) o de aquellas que se producen después de haber sido secretada la proteína (proteólisis) (Bussink y col., 1992; Caprari y col., 1993; Fraissinet-Tachet y col., 1995). En este último se demostró que las enzimas pectinolíticas y las isoenzimas poligalacturonasas de *S. sclerotiorum* están codificadas por una familia multigénica compuesta por siete miembros y que constituyen dos subfamilias (Fraissinet-Tachet y col., 1995). Si bien la ventaja de poseer múltiples copias de este gen no ha sido demostrada experimentalmente, se podría especular que esto le conferiría flexibilidad y adaptabilidad a este patógeno con tan amplio rango de hospedantes.

Por su parte las plantas producen glicoproteínas asociadas a pared celular, llamadas proteínas inhibidoras de poligalacturonasas (PIPs), que son capaces de inhibir las endoPGs fúngicas (De Lorenzo y col., 2001). Los oligogalacturónidos liberados de la pared celular por la actividad de las endoPGs actúan como desencadenantes (*elicitors*) de la respuesta hipersensible (Davis y col., 1986). Se ha demostrado que las PIPs de *Phaseolus vulgaris*

impiden la respuesta hipersensible inducida por las endoPGs de *S. sclerotiorum* (Zuppini y col., 2005).

El estallido oxidativo es una reacción de defensa temprana de las plantas que produce especies reactivas de oxígeno como H₂O₂, que coincide con la respuesta hipersensible que aísla al patógeno (Wojtaszek, 1997). A pesar de que la respuesta hipersensible generalmente impide la colonización de patógenos biótrofos, la virulencia de los hongos necrotróficos como *S. sclerotiorum* y *Botrytis*, que obtienen nutrientes de los tejidos necróticos del hospedante, se vería fortalecida por esta respuesta (Govrin & Levine, 2000; Thomma y col., 2001). Por ejemplo, plantas de tabaco y *Arabidopsis* incapaces de iniciar una respuesta hipersensible, mostraron una mayor resistencia a *S. sclerotiorum* (Dickman y col., 2001; Govrin & Levin, 2000).

Las enzimas degradadoras de pared celular no pectinolíticas como proteasas, celulasas y glucoamilasas han recibido menos atención en estudios de *S. sclerotiorum* (Tabla 2). Debido a que más del 10% de la pared celular de las plantas está compuesta por proteínas (Carpita & Gibeaut, 1993), se asume que las proteasas deben cumplir un rol importante en el proceso de patogénesis de este hongo.

1.5.4.2. Ácido oxálico

El ácido oxálico (ácido etanodioco) es producido por todas las clases de hongos. Varias teorías han sido propuestas sobre su funcionalidad incluyendo roles en patogenia, competencia entre especies de hongos y control de los nutrientes ambientales y toxinas (Dutton & Evans, 1996).

La evidencia del ácido oxálico como agente patogénico de *S. sclerotiorum* se basa en la recolección de este ácido de tejidos infectados (de Bary, 1886; Ferrar & Walker, 1993; Godoy y col., 1990; Marciano y col., 1983), la correlación entre sus niveles y la severidad de la enfermedad (Bateman & Beer, 1965; Magro y col., 1984; Maxwell & Lumsden, 1970; Noyes & Hancock, 1981), y el desarrollo de síntomas de las enfermedades causadas por *S. sclerotiorum* luego de su aplicación directa en plantas (Bateman & Beer, 1965; Noyes & Hancock, 1981). Además, la secreción de ácido oxálico por *S. sclerotiorum* resulta en la formación de lesiones húmedas antes de la invasión de las hifas (Lumsden & Dow, 1973; Tu, 1985). Finalmente mutantes deficientes en la producción de oxalato, y con la batería de enzimas degradadoras de pared intacta, no son patogénicas en lentejas y ni en *Arabidopsis*, mientras que cepas revertantes que han recuperado la capacidad de producir ácido oxálico muestran un patrón normal de virulencia (Godoy y col., 1990).

Los mecanismos por los cuales el ácido oxálico colabora en la patogenia son diversos:

1. El ácido oxálico se acumula en los tejidos infectados y su concentración aumenta a medida que la colonización del hospedante va avanzando (Bateman, 1964; Bateman & Beer, 1965;). En consecuencia el pH extracelular disminuye hasta alrededor de 4-5, que es el pH óptimo de las enzimas degradadoras de pared celular, favoreciendo y aumentando de esta manera su actividad (Bateman & Beer, 1965; Magro y col., 1984; Marciano y col., 1983; Maxwell & Lumsden, 1970).
2. La disminución en el pH provocada por el ácido oxálico inhibe a las proteínas inhibidoras de poligalacturonasas del hospedante (Favaron y col., 2004).

3. El ácido oxálico está involucrado en la formación de los esclerocios mediante la disminución del pH del medioambiente, regulando la transcripción de genes necesarios para la patogénesis como el factor de transcripción *pac1* y *SmK1*, una MAPK quinasa necesaria para el desarrollo de los esclerocios (Chen y col., 2004; Rollins, 2003; Rollins & Dickman, 2001).
4. El ácido oxálico secuestra el Ca^{2+} de la pared celular, permitiendo a las poligalacturonasas hidrolizar los pectatos, alterando así la integridad de la pared celular del hospedantes (Bateman & Beer, 1965; Kurian & Stelzig, 1979). Además, las respuestas de defensa mediadas por Ca^{2+} pueden resultar comprometidas (Bateman & Beer, 1965)
5. Se ha demostrado que el ácido oxálico inhibe el estallido oxidativo, una importante defensa temprana de las plantas, en tabaco y soja (Cessna y col., 2000). El efecto inhibitorio de este proceso por el oxalato es independiente de su capacidad de acidificar y de su afinidad por Ca^{2+} . El oxalato podría inhibir este proceso en un paso de señalización anterior al ensamblado y activación de la oxidasa pero posterior al flujo de Ca^{2+} en el citosol de las células de la planta.
6. El ácido oxálico regula la función de las células oclusivas induciendo la apertura de los estomas e inhibiendo el cierre de los mismo regulado por ABA, originando la marchitez foliar durante la infección (Guimarães & Stotz, 2004).
7. El ácido oxálico inhibe la actividad de las polifenoloxidasas de la planta (Magro y col., 1984; Marciano y col., 1983)
8. El ácido oxálico puede, indirectamente, ser tóxico para la planta, debido a que las condiciones ácidas resultantes de su acumulación pueden debilitar a la planta y hacerla más susceptible al crecimiento del hongo (Noyes & Hancock, 1981; Rollins & Dickman, 2001)
9. Estudios recientes han demostrado que el ácido oxálico es un desencadenante (*elicitor*) de la muerte celular programada (*Programmed cell death*, PCD), que a su vez es requerida para el desarrollo de la enfermedad (Kim y col., 2008). Los mutantes fúngicos deficientes en ácido oxálico no son patogénicos y además en plantas inoculadas con la cepa no patogénica no se observaron signos de muerte celular programada (Godoy y col., 1990; Kim y col., 2008). El ácido oxálico induce la PCD independientemente de la habilidad de este ácido orgánico para disminuir el pH, evento que es requerido para la formación de esclerocios. A su vez el oxalato induce un aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) en la planta, que correlacionan con la PCD. Cuando la inducción de ROS es inhibida, la PCD inducida por oxalato. no se produce. La producción de ROS y la muerte celular programada inducidas por el ácido oxálico se correlacionan con el pH: a pH altos (pH: 5 a 6) se induce la producción de ROS y la PCD, mientras que a pH ácidos (pH: 3 a 4) la producción de ROS es inhibida al igual que la PCD. Por lo tanto existe una regulación dual de ROS, por un lado *S. sclerotiorum* inhibe el estallido oxidativo de la planta posiblemente en una manera independiente del pH vía ácido oxálico (Cessna y col., 2000), mientras que por otro lado también induce la generación de ROS en una manera dependiente del pH que es necesaria para la inducción de PCD (Kim y col., 2008). Esto posiblemente se

deba a que durante la invasión de los tejidos vegetales por *S. sclerotiorum* hay una diferencia temporal en los niveles de oxalato y en consecuencia en el pH. En los primeros estadios de la infección, al ser bajos los niveles de ácido oxálico secretados por el patógeno y consecuentemente altos los niveles de pH (>5) se activan en la planta la producción de ROS y la PCD, dando como resultado la muerte celular y la generación de un ambiente favorable para el desarrollo del patógeno, la adquisición de nutrientes y el establecimiento de una relación necrotrófica entre el patógeno y el hospedante. A medida que el ácido oxálico se acumula en los tejidos del hospedante, el pH disminuye acompañado de la inhibición del estallido oxidativo y la muerte celular programada. El pH bajo puede causar la muerte celular pero no vía PCD, sino una muerte celular necrotrófica, permitiendo al patógeno una mayor penetración e infección de los tejidos del hospedante (Kim y col., 2008). Por lo tanto para las interacciones planta-patógeno que involucran patógenos necrotróficos, el desarrollo de la enfermedad vs. la resistencia depende de cuál de ellos tiene el control del proceso de muerte celular programada (Govrin & Levine, 2000; Kim y col., 2008; Navarre & Wolpert, 1999; Van Baarlen y col., 2004).

1.5.4.3. Factores de necrosis y Muerte Celular Programada (PCD)

El ácido oxálico y las enzimas líticas producidas por patógenos necrotróficos tienen un rol adicional en la patogénesis induciendo la muerte celular programada. (Kim y col., 2008; Van Kan, 2006). El hongo necrotrófico *Botrytis cinerea* produce varias PGs, algunas de las cuales poseen actividad necrótica, y mientras que las PGs de *S. sclerotiorum* aumentan los niveles celulares de Ca^{2+} e inducen la PCD (Kars y col., 2005; Zuppini y col., 2005).

Otro grupo de activadores de la PCD que se encuentra en varios patógenos de plantas son los péptidos de necrosis e inducción de etileno (NEPs) (Pemberton & Salmond, 2004). NEP1 fue el primer péptido de este tipo en ser aislado a partir de filtrados de extracto de cultivo de *Fusarium oxysporum*, NEP1 consiste en una proteína de 24 kDA que produce necrosis e induce la producción de etileno en plantas de la especie *Erythroxylum coca* (Bae y col., 2006; Bailey, 1995). En los últimos años se han identificado proteínas de tipo NEP1 (*NEP1-like proteins*, NLPs) en bacterias, hongos y oomycetes, tanto en organismos patogénicos como no patogénicos y hemibiótrofos (Jores y col., 2003; García y col., 2007; Dallal Bashi y col., 2010). En estudios de transformación de *Colletotrichum coccodes* con el gen *Nep1* de *F. oxysporum*, se observó un aumento en la virulencia y en el espectro de hospedantes para este patógeno (Amsellmen y col., 2002). Se sabe que los NLPs producen el aumento de los niveles celulares de Ca^{2+} , activan proteínas quinasa activadas por mitógenos (*Mitogen Activated Protein Kinases*, MAPKs), promueven la inducción de ROS, etileno y proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Fellbrich y col., 2002; Jennings y col., 2001; Keates y col., 2003; Qutob y col., 2006; Veit y col., 2001). El mecanismo por el cual los NLPs logran estos efectos es desconocido, pero deben estar asociados con la superficie externa de la membrana celular para disparar la PCD (Qutob y col., 2006; Schouten y col., 2008). Keates y col. (2003) han reportado que los NLPs también tienen la capacidad de erosionar la cutícula de la planta hospedante, interaccionando directamente con compuestos lipofílicos de la cutícula o provocando la ruptura de los cloroplastos y la re-programación de la expresión génica que ocurre inmediatamente luego de la aplicación de

NEP1. Todos los NLPs descritos hasta el presente tienen un dominio conservado (GHRHDWE) y residuos de cisteína conservados en el extremo amino terminal. Según el número de residuos de cisteína los NLPs pueden ser clasificados en Tipo I y Tipo II, con dos o cuatro residuos de cisteínas respectivamente. Ambos tipos de NLPs son producidos por plantas y bacterias, mientras que el tipo I sólo ha sido descrito en oomycetes (Gijzen & Nürnberger, 2006). Mutaciones tanto en el dominio conservado, como en los residuos terminales de cisteína o cualquier alteración que afecte la estructura terciaria, suprimen la habilidad de estos péptidos de inducir la PCD o generar lesiones necróticas en la planta hospedante (Fellbrich y col 2002; Qutob y col., 2006; Shouten y col. 2008)

En *S. sclerotiorum* se han identificado y caracterizado dos genes que codifican para NLP, llamados SsNep1 y SsNep2, estos dos péptidos provocan necrosis en los tejidos de la planta hospedante y se expresan diferencialmente durante la infección. (Dallal Bashi y col., 2010). La expresión inicial de SsNep2 depende de la interacción del patógeno con una superficie sólida y de las vías de señalización mediadas por Ca^{2+} y AMPc. A pesar de que la inhibición de la expresión de SsNep2 se correlaciona con la pérdida o disminución de la patogenicidad, algunos tratamientos farmacológicos reducen la expresión de SsNep2 sin ningún efecto aparente en la virulencia (Dallal Bashi y col., 2010).

De todo lo anterior se desprende la importancia que tiene para un patógeno necrotrófico, poseer varios efectores capaces de iniciar la PDC en el hospedante y la necrosis de los tejidos vegetales para una infección exitosa.

1.5.5. Control de la enfermedad: resistencia y mecanismos de defensa

Las enfermedades causadas por *S. sclerotiorum* han sido tradicionalmente difíciles de controlar debido a que no hay altos niveles de resistencia en los cultivos afectados por este patógeno. Por ejemplo en el cultivo de soja y colza los mejoradores se basan en resistencias parciales a la podredumbre del tallo debido a que no hay líneas totalmente resistentes (Boland & Hall, 1987; Grau y col., 1982; Kim & Diers, 2000; Nelson y col., 1991; Zhao y col., 2004). A su vez el desarrollo de la enfermedad es altamente dependiente de las condiciones ambientales por lo que la búsqueda de resistencia en ensayos a campo es casi siempre problemática especialmente en condiciones naturales de infección. Más aun, no se ha podido establecer hasta el presente que porcentaje de la resistencia a esta enfermedad a campo es el resultado de una resistencia fisiológica o de un escape debido a mecanismos de floración, estructura del canopeo y maduración, factores, que han sido asociados con la severidad de la enfermedad (Boland & Hall, 1987; Kim & Diers, 2000; Nelson y col., 1991; Vear y col., 2008; Vear & Grezes-Besset, 2010).

Si bien la resistencia a *S. sclerotiorum* ha sido uno de los objetivos de los mejoradores de girasol en las últimas décadas, hasta el momento sólo se han identificado variedades que manifiestan más tolerancia que otras a la infección (Pereyra & Escande, 1994; Vear y col., 2008; Vear & Grezes-Besset, 2010). Esta tolerancia natural ha sido incorporada en un número limitado de híbridos comerciales, pero no proporciona protección completa al cultivo cuando las condiciones ambientales son favorables al desarrollo del hongo (Rashid & Seile, 2001).

La interacción Girasol-*Sclerotinia sclerotiorum* ha sido descrita como un carácter cuantitativo, con varios *loci* de carácter cuantitativo (QTL) detectados en líneas específicas,

órganos vegetales y condiciones ambientales de crecimiento (Bert y col., 2004; Genzbittel y col., 1998; Mestries y col., 1998). Estudios recientes han identificado varios QTLs asociados a la resistencia a *S. sclerotiorum* tanto en hojas de girasol, como en tallo y capítulo (Bert y col., 2002; Misic y col., 2004; Micic y col., 2005a; Micic y col., 2005b; Vear y col., 2008; Yue y col., 2008). Se han identificado varios QTL asociados a la resistencia a PHC, siendo los más frecuentes los asociados al gen recesivo de ramificación *b1* en el grupo de ligamiento 10, sin embargo cada uno ellos explicó menos del 20% de la variabilidad fenotípica. Esto último puede deberse tanto a efectos ambientales como al hecho de que varios QTLs de efecto pequeño están involucrados en la determinación de los niveles de resistencia (Vear y col 2008; Vear & Grezes-Besset, 2010). Vear y col (2008 y 2010) han observado que las líneas ramificadas poseen un mejor comportamiento frente a este patógeno que las líneas no ramificadas concluyendo que hay una asociación genética entre un QTL para la resistencia y el gen de ramificación en lugar de un efecto directo del fenotipo ramificado.

En Argentina se han identificado QTLs para resistencia a la PHC en líneas de buen comportamiento local, los cuales han sido localizados fundamentalmente en el grupo de ligamiento 10 del mapa genético de girasol (Maringolo, 2007). Este y otros QTLs localizados en forma preliminar están siendo mapeados en una población de referencia utilizada para el desarrollo de un mapa saturado de girasol, desarrollado por INTA en colaboración con ENSAT, Francia (Poormohammad Kiani y col., 2007).

Debido a la complejidad de la base genética de la resistencia a este patógeno, que limita el desarrollo de germoplasma resistente por medio del mejoramiento clásico, los métodos actuales de mejoramiento contemplan la utilización de estrategias basadas en herramientas genómicas. Estas herramientas incluyen tanto la utilización de marcadores neutros para el mapeo de QTLs como el desarrollo de marcadores funcionales desarrollados sobre genes candidatos para la resistencia al patógeno. El conocimiento de los factores determinantes de la patogénesis involucrada en el desarrollo de la enfermedad por parte del patógeno, y las respuestas de defensa del hospedante constituyen factores claves para la identificación de dichos genes candidatos.

Como se mencionó previamente, uno de los aspectos más destacados del mecanismo de invasión de *S. sclerotiorum* es la degradación de la pared celular y la producción de ácido oxálico. Por su parte, las plantas poseen un conjunto de proteínas que contrarrestan la estrategia invasiva del patógeno. En el caso de la podredumbre de tallo "PHT" en girasol, se ha descrito que la respuesta al ataque del hongo estaría relacionada con la inducción de la síntesis de proteínas de transferencia de lípidos (LTPs), proteínas inhibidoras de poligalacturonasas (PGIPs) y defensinas (Hegedus et al., 2008; Hu y col., 2003; Regente y col., 1997; Regente & de la Canal 2000; Regente & de la Canal, 2003; Urdangarín y col., 2000).

A su vez se han aislado y caracterizado varios genes de las enzimas oxalato oxidasa y oxalato decarboxilasa, capaces de degradar al ácido oxálico, (Dutton & Evans, 1996). La enzima oxalato oxidasa cataliza la oxidación dependiente de O₂ de ácido oxálico a CO₂ y H₂O₂ (Kotsira & Clonis, 1997). La enzima oxalato decarboxilasa degrada al oxalato generando formiato y CO₂ (Reinhardt y col., 2003). La introducción de estos genes en plantas de distintas especies ha dado como resultado la obtención de plantas transgénicas con resistencia a *S. sclerotiorum*. El gen oxalato oxidasa de cebada se introdujo en plantas

de canola y maní (Thompson y col., 1995; Livingstone y col., 2005), mientras que el de trigo se introdujo en álamo, tabaco, soja y girasol (Berna & Bernier, 1997; Burke & Rieseberg, 2003; Donaldson y col., 2001; Hu y col., 2003; Liang y col., 2001). El gen oxalato decarboxilasa del hongo basidiomiceto *Collybia velutipes* (syn. *Flammulina velutipes*) se ha introducido en plantas de tomate, tabaco, lechuga y soja (Kesarwani y col., 2000; Dias y col., 2006; Cunha y col., 2010), a su vez el gen de oxalato decarboxilasa del hongo basidiomiceto *Trametes versicolor* se ha introducido en plantas de tabaco (Walz y col., 2008). En estas plantas no se observaron lesiones producidas por la acumulación de H₂O₂ como se ha observado en el caso de las plantas transgénicas que expresan oxalato oxidasa (Hu y col., 2003; Walz y col., 2008)

El gen oxalato oxidasa pertenece a un conjunto de proteínas halladas únicamente en gramíneas que poseen actividad oxalato oxidasa y/o superóxido dismutasa y que se agrupan bajo la denominación de germinas (*germin*) (GPs) (Thomson & Lane, 1980). Posteriormente, Lane y col. (1991) las incluyeron dentro de la superfamilia de las cupinas por presentar los motivos funcionales característicos de estas últimas y asignaron a todos aquellos representantes de plantas de función desconocida a una nueva categoría que recibió el nombre de proteínas de tipo germinas (*Germin like protein*) (GLPs). A partir del análisis de las colecciones de ESTs desarrolladas previamente en el Instituto de Biotecnología (IB), se identificó un transcripto con similitud a una proteína del tipo germina (AN: ABW89137) (Fernández y col., 2003). Las proteínas del tipo germinas (GLPs) han sido vinculadas a la respuesta frente a estreses bióticos y abióticos (Bernier & Berna, 2001; Christensen y col., 2004; Schweizer y col., 1999a).

Otro grupo de genes involucrados en mecanismos de resistencia a este patógenos incluye aquellos que codifican para factores de transcripción. A partir de estudios realizados en arábidopsis se identificó un factor de transcripción de la familia de los WRKY involucrado en la resistencia a hongos necrotróficos llamado WRKY33 (Zheng y col., 2006). A su vez plantas de arábidopsis y colza infectadas con *S. sclerotiorum* mostraron un marcado aumento en los niveles de expresión de este gen a tiempos muy tempranos post inoculación (Lippok y col., 2007; Zhao y col., 2007; Zhao y col., 2009). Se ha demostrado que la vía de las MAP quinasas está involucrada en la activación de AtWRKY33 y que la quitina es un efector de esta vía (Andreasson y col 2005; Wan y col., 2004). Por otra parte, estudios realizados en arábidopsis demostraron que atWRKY33 actúa como un regulador positivo de las rutas de defensa mediadas por ácido jasmónico (JA) y etileno (ET), pero es un regulador negativo de las respuestas mediadas por el ácido salicílico (SA) y que la inducción de este gen mediada por el patógeno es independiente de esta hormona (Lippok y col., 2007; Zheng y col., 2006).

Recientemente, Giacomelli y col. (2010) identificaron al gen HAWRKY7 de girasol, un probable ortólogo del gen At WRKY33, sin embargo han observado que los patrones de expresión de este gen correlacionaban muy poco con los descriptos para atWRKY33.

Las infecciones por fitopatógenos dan como resultado cambios en el metabolismo secundario como consecuencia de la inducción de los mecanismos de defensa, así como también cambios en el metabolismo primario que afectan al crecimiento y el desarrollo de la planta. De esta manera, los ataques por patógenos causan pérdidas en los rendimientos, incluso en aquellas interacciones que no terminan en infección ni muerte de la planta.

Mientras que la regulación de las respuestas de la planta frente al ataque de patógenos ha sido estudiada intensamente por décadas, muy poco se sabe sobre los efectos de la infección del patógeno en el metabolismo primario. En los últimos años, el interés en este área de investigación ha incrementado, incluyendo estudios sobre efectos de la patogenia en la fotosíntesis, la partición de asimilados, la regulación fuente-destino en distintas interacciones planta-patógeno. De la misma manera, los estudios fitopatológicos más recientes tienen en consideración el estado fisiológico de los tejidos infectados a fin de esclarecer la sintonización fina de los mecanismos de infección (Berger y col., 2007). Por lo tanto, una mayor comprensión de los mecanismos de interconexión (*crosstalk*) metabólica involucrados en la interacción planta-patógeno es de suma importancia tanto para contribuir al conocimiento de estas interacciones así como para el desarrollo de herramientas moleculares para el mejoramiento asistido. Si bien los estudios de este tipo son aún limitados, recientemente Jobic y col. (2007) reportaron avances en el estudio del intercambio de metabolitos solubles entre girasol y el patógeno *S. sclerotiorum*. Asimismo Zulak y col. (2007), mediante estudios de los perfiles de metabolitos secundarios en tejidos celulares de otras especies luego de ser tratados con desencadenantes patogénicos, mostraron cambios drásticos en los alcaloides benzilisoquinolina como también cambios en los niveles de sacarosa, glucosa, glucosa 6- fosfato, adenosina y ácido linoleico. Estas observaciones junto con aquellas que muestran un efecto de la infección sobre la tasa fotosintética (Tang y col., 1996; Chou y col., 2000) y la partición del carbono (Hall & Williams 2000; Abood & Lösel, 2003), sugieren un rol importante del metabolismo en la contribución a la tolerancia de la planta frente a patógenos. De lo expuesto, se desprende la necesidad de la aplicación del estudio de perfiles metabólicos para ayudar al entendimiento de estos procesos particularmente cuando el tejido blanco del patógeno está representado por órganos destino tan complejos como las flores.

Recientemente se observó que las fitohormonas ácido jasmónico (JA), ácido salicílico (SA) y etileno (Et) están implicadas en las respuesta frente a *Sclerotinia sclerotiorum* (Guo & Stotz, 2007). A su vez la resistencia local a *Botrytis cinerea*, otro patógeno necrotrófico, está aumentada por la vía de SA (Ferrari y col., 2003), sugiriendo que la estricta separación de la defensa frente a patógenos biotrófos vía SA y necrotróficos vía JA/Et es una mera simplificación (Glazerbrook y col., 2005; Guo & Stotz, 2007; Thomma y col., 2001). Por otro lado el ácido oxálico, importante determinante de la patogenia de *S. sclerotiorum*, manipula el funcionamiento de las células oclusivas induciendo su apertura e inhibiendo el cerrado de los estomas regulado por ABA, produciendo de esta manera el marchitamiento foliar durante la infección de *S. sclerotiorum* (Guimarães & Stotz, 2004). Asimismo se observó que bajas concentraciones iniciales de ABA resultan en un estado de prealerta de defensa en una mutante de tomate deficiente en ABA (*Sitiens*), permitiendo a esta planta responder más temprana y fuertemente al desafío con el patógeno *B. cinerea* (Asselbergh y col., 2007). Por otro lado el agregado de ABA exógeno induce susceptibilidad en una interacción normalmente incompatible entre *Arabidopsis* y *P. syringae* pv *tomato*, mediante la supresión de la acumulación de lignina y SA. Además, el tratamiento con ABA inhibe la expresión de muchos genes relacionados con defensa (Mohr & Cahill, 2007). En un estudio mas reciente Perchepped y col. (2010), determinaron el rol de distintas vías de señalización en el mecanismo de resistencia inducible a *S. sclerotiorum* a través de la evaluación de mutantes

de *Arabidopsis* que tienen afectada la percepción, producción y/o transferencia de señales hormonales. Estos autores confirmaron que las vías de señalización relacionadas con respuestas inducibles involucran JA, ABA y Etileno, y son independientes del SA y que el óxido nítrico (NO) y especies ROS son señales claves para inducir respuestas de defensa a *S. sclerotiorum*.

El presente trabajo de tesis se enmarca dentro de un proyecto de genómica de girasol orientado a la caracterización funcional de regiones asociadas a caracteres de importancia agronómica en girasol, como la resistencia a *S. sclerotiorum*

El grupo Genómica de Girasol del Instituto de Biotecnología de INTA Castelar (GG-IB INTA Castelar) está abordando un análisis integral para identificar y caracterizar nuevas fuentes de resistencia a la PHC a través de la utilización de herramientas de la genómica que incluyen tanto estrategia de mapeo de QTL, mapeo por asociación como estrategias basadas en la caracterización de perfiles transcripcionales y metabólicos para la identificación de genes candidatos asociados a la resistencia. El grupo ha desarrollado herramientas genómicas como una colección de marcadores neutros SSRs altamente polimórficos (Paniego y col., 2002), un banco de ESTs órgano-específicos aislados de colecciones de ADN copia diferenciales (Fernández y col., 2003) y un mapa saturado de girasol cultivado (Poormohammad Kiani y col., 2007). Los trabajos de cooperación con el GFPG-INTA Balcarce han permitido la identificación de QTL asociados a la tolerancia a PHC en poblaciones F2, obtenidas a partir del cruzamiento de líneas elite sensibles y tolerantes (Maringolo, 2007). Más recientemente, se han optimizado estrategias de análisis de SNPs en girasol de mediano a alto procesamiento (Fusari y col., 2010), así como estudios de equilibrio de ligamiento para evaluar aplicaciones de estrategias de mapeo de asociación para caracteres complejos, como la resistencia a PHC. En forma complementaria al presente trabajo de tesis, se ha aislado y se está caracterizando funcionalmente un gen de la familia GLP en girasol, a través de sobre expresión en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* (Lia comunicación personal) y se ha aislado y caracterizado la región promotora de un gen que codifica para una proteína LPT (Zavallo y col., 2010).

Adicionalmente, se ha logrado establecer una plataforma bioinformática que integra herramientas dedicadas al procesamiento y análisis sistematizado de secuencias y aglutina los datos producidos por este proyecto y los datos disponibles internacionalmente para la especie.

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es identificar y caracterizar fuentes de resistencia a la infección con el patógeno *S. sclerotiorum*, a través de la caracterización de los perfiles metabólicos y transcripcionales de dos líneas de girasol con comportamiento contrastante frente a este patógeno, determinando asimismo el rol de los niveles de fitohormonas implicadas en esta respuesta.

Con el propósito de identificar y caracterizar molecularmente secuencias génicas involucradas en este sistema de interacción Girasol- *S. sclerotiorum* se plantearon los siguientes objetivos específicos:

2.2. Objetivos específicos

- Estudios de perfiles metabólicos por la técnica GC/MS en dos líneas de girasol con comportamiento contrastante frente a la podredumbre húmeda del capítulo
- Construcción de colecciones de ADN copia diferenciales y / o ecualizadas a partir de ARN mensajero aislado a distintos tiempos post-infección de capítulos de girasol de una línea resistente a la enfermedad
- Purificación, secuenciación, ordenamiento y anotación funcional de las secuencias ESTs generadas por análisis comparativo con secuencias nucleotídicas y proteicas depositadas en bases de datos de acceso público.
- Evaluación de expresión génica de los ESTs relacionados con defensa en líneas de girasol con comportamiento diferencial frente al patógeno, derivados de las colecciones de ADNc diferencial y de genes candidatos seleccionados de bases públicas, a través de análisis de perfiles transcripcionales por PCR cuantitativa (qPCR)
- Determinación de las fitohormonas ácido salicílico y ácido jasmónico en capítulos de girasol de la línea resistente y susceptible a distintos tiempos post-inoculación.
- Identificación de genes candidatos a estar involucrados en mecanismos de defensa a partir de la integración de información de perfiles metabólicos, hormonales y análisis transcripcionales.

2.3. Hipótesis

Los estudios de los perfiles metabólicos a partir de dos líneas de girasol con respuesta diferencial frente al patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, en conjunto con la construcción de clonotecas de ADNc substractivas de capítulos infectados y no infectados y la determinación de los niveles de ácido salicílico y ácido jasmónico, permitirán la identificación de genes candidatos robustos involucrados en la tolerancia a esta enfermedad y contribuirá a dilucidar los mecanismos de regulación de la respuesta del girasol frente a *S. sclerotiorum*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

Las dos líneas endocriadas utilizadas en este estudio, HA89 y RHA801, fueron originalmente provistas por J. Miller (NDSU, ND, EUA). La línea HA89 fue liberada como una línea mantenedora, ampliamente utilizada para cruzamientos y mejoramiento por su aptitud combinatoria (Van Becelaere & Miller 2004) pero descrita como susceptible a diferentes enfermedades (Oils Seed Sunflower, ND Experimental station, NDSU, USA) (Tabla 3). La línea RHA801 fue liberada como una línea restauradora seleccionada a partir de una población derivada de los siguientes parentales: RHA271, RHA273, RHA274, R344 y R494 (Roath y col., 1981) (Tabla 3). Esta línea es ramificada y fue caracterizada como moderadamente resistente frente al patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (Maringolo, 2007; Raimondi y col. 2003; Troglia y col., 2005 a y b; Vear y col. 2008; Vear y col. 2010). Las líneas HA89 y RHA801 son, además, progenitores de una población de mapeo evaluada para la detección de QTL asociados a resistencia a *Sclerotinia*, en la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) INTA Balcarce (Maringolo, 2007)

Tabla 3. Descripción de las líneas endocriadas del germoplasma público.

S: susceptible, R: resistente.¹Mildiu por *Plasmopara halstedii* (no se especifica raza), ²Marchitez por *Verticillium dahliae*, ³ Roya negra por *Puccinia hellianthi* (no se especifica raza), [†]Fecha: fecha de liberación al público. Material suministrado por el Dr. Jerry Miller. (NDSUND, EUA). ¹Parte de esta información se halla disponible en: <http://www.ag.ndsu.nodak.edu/aginfo/seedstock/varieties/VH-SUNF.htm>

Nombre	Pedigrí	† Fecha	Línea	Origen	Fenotipo	Comportamiento ante enfermedades		
						Mildiu ¹	Vert. ²	Roya ³
HA89	'VNIIMK 8931 Sel'	1971	Mantenedora (b)	USDA	No ramificada	S	R	S
RHA801	'Derivada de un restaurador compuesto'	1980	Restauradora	USA	Ramificada	R	R	R

3.2. Material patogénico

Para la producción de inóculo de *Sclerotinia sclerotiorum*, se colectaron esclerocios en suelos infectados de la zona de Balcarce (Prov. Buenos Aires, Argentina), que fueron almacenados en bolsas de papel. Para la producción de apotecios, se siguió el procedimiento descrito por Escande y col. (2002). Brevemente, esclerocios de *S. sclerotiorum* fueron almacenados durante 6 meses a -20°C. Al finalizar el almacenamiento se sembraron a 1 cm de profundidad en suelo estéril. Los cultivos se incubaron a 17°C en oscuridad con riego diario durante 7 días. Luego se expusieron a aproximadamente 2500 lux de luz día continua, tapados para mantener alta la humedad, hasta la emergencia de los apotecios (3 ó 4 días). Una vez emergidos, los apotecios fueron cortados, para evitar la pérdida de ascosporas, y colocados en placas de Petri en posición invertida. Se dejaron

secar 4 horas a 17°C y luego se conservaron a -20°C, hasta su uso. A partir de estas placas se preparó el inóculo que consistió en una dilución de 2500 ascosporas/ml de agua, esta última fue determinada utilizando un hemocitómetro (cámara de Neubauer). El inóculo se utilizó dentro de las 2 horas posteriores a su preparación y se mantuvo en heladera a 4°C hasta 30 min antes de su uso.

3.3. Ensayos a Campo

Se realizaron ensayos a campo en diferentes campañas para el análisis de perfiles metabólicos, enzimáticos, hormonales y para la identificación de transcritos de expresión diferencial.

3.3.1. Ensayo para análisis de perfiles metabólicos por GC/MS y perfiles transcripcionales de genes candidatos

El ensayo a campo se llevó a cabo en la Estación Experimental INTA-Balcarce (EEA Balcarce) en la provincia de Buenos Aires durante la campaña 2003/2004. Para el control de mildiu, inmediatamente antes de la siembra, se aplicó a las semillas metalaxil M en solución con agua corriente (3:1, v/v), siguiendo las dosis recomendada del principio activo metalaxil M (dosis líquida de formulado cada 100 kg de semillas 600 cm³) (Metalaxil-M Apron Gold, Syngenta Agro S.A., Balcarce, Argentina); por gramo de semilla se aplicó 0,0006 ml de la suspensión, colocándolo en una bolsa plástica y agitándolo para asegurar homogeneidad. Para el control del resto de las enfermedades fúngicas, se aplicó Mancozeb espolvoreándolo en las semillas a razón de 310 g de Mancozeb en polvo cada 100 kg de semillas (Mancozeb Dithane M-80, Dow Agrosiences Arg. S.A., Buenos Aires, Argentina), según las recomendaciones publicadas por Pérez Fernández & Corro Molas (2003).

Las semillas de girasol de ambas líneas fueron sembradas en el campo experimental en bloques completamente aleatorizados, en un suelo Argiudol típico con un contenido de materia orgánica del 5%, pH 6.2, en surcos de 8 m de longitud con una separación entre plantas de 20 cm dentro del surco y una separación de 75 cm entre surcos.

Para evitar escapes de la enfermedad, la inoculación asistida se llevó a cabo en el estado fenológico R5.2, (Schneiter & Miller, 1981), el cual es el periodo de máxima susceptibilidad a la infección por *S. sclerotiorum* en las áreas de siembra de este cultivo en Sudamérica (latitud 37_450 S, longitud 58_O) (Pedraza y col., 2004). Para ello se observó y registró la variable días a R5.2: número de días desde la siembra hasta que el 50% de las plantas en una parcela tuviera un 20 % del área del capítulo florecida (dos círculos de flores tubulares abiertas). Los capítulos de girasol fueron escogidos al azar en los surcos y fueron rociados con el inóculo (1 ml de una suspensión acuosa de 2.500 ascosporas/ml) según el método de Escande y col. (2002). En comparación con los métodos basados en la inyección de ácido oxálico (Baldini y col., 2002) o inoculación con micelio, el método de inoculación asistida con ascosporas se correlaciona significativamente con los de ataques naturales de *S. sclerotiorum*, y a su vez permite la detección de barreras naturales en el capítulo frente a PHC (Prats y col., 2003; Vear & Tourvieille, 1988; Tourvieille & Vear, 1984). A demás este método asegura una inoculación homogénea que es esencial para la identificación de niveles de resistencia en cada línea (Hahn, 2002).

Una vez inoculados, los capítulos fueron cubiertos con bolsas de papel kraft intemperie (Embaires S.A., Buenos Aires, Argentina) para mantener las condiciones de humedad. Asimismo se mantuvo la humedad adecuada en el ensayo mediante riego por aspersión. Los capítulos de ambas líneas fueron cosechados a distintos tiempos, incluyendo 0 y días 2, 4 y 12 post inoculación (DPI). Para cada tiempo se colectaron 5 capítulos, los cuales fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta el momento de su utilización. Durante los tiempos de muestreo no se observaron lesiones ni micelio en la superficie de los capítulos. Se evaluaron los síntomas de la enfermedad a partir del día 20 DPI y se calculó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC) a partir de los datos de incidencia (número de plantas infectadas/ número total de plantas) según la ecuación de Campbell & Madden (1990):

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=0}^{n-1} (y_i + y_{i+1}) / 2 * (t_{i+1} - t_i)$$

Donde

n: es el número de evaluaciones

y: la severidad o la incidencia

t: el número de días después de la siembra para cada evaluación

(t,y)= (0,0) es incluido como la primera observación

3.3.2. Ensayo para construcción de colecciones de ADNc substractivas, análisis de actividades enzimáticas, análisis transcripcional de genes candidatos y perfiles hormonales.

Se realizó un ensayo a campo para la línea RHA801 en la estación experimental INTA-Balcarce en la provincia de Buenos Aires durante la campaña 2008/2009, en las mismas condiciones de cultivo descriptas para el ensayo de análisis de perfiles metabolitos. Los capítulos de girasol fueron escogidos al azar en los surcos e inoculados con una suspensión de esporas del patógeno o con agua (*mock inoculated*) aplicando el procedimiento descrito anteriormente. Los capítulos fueron muestreados inmediatamente (día 0) y a los 1, 2 y 4 DPI (Días Post Inoculación) en ambos tratamientos. Para cada tiempo y tratamiento se colectaron 10 capítulos los cuales fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta el momento de su utilización. Durante los tiempos de muestreo no se observaron ni lesiones ni micelio en la superficie de los capítulos.

En la misma campaña se realizó un ensayo en el campo experimental de INTA Castelar con las líneas HA89 y RHA 801, en un diseño completamente aleatorizado y en las mismas condiciones de cultivo descriptas para Balcarce. La inoculación y colecta de muestras se realizó como se describe anteriormente.

3.4. Extracción, derivatización y detección de metabolitos de flores de girasol para análisis por la GC/MS

Se liofilizaron las flores tubulares de 4 replicas biológicas de cada tratamiento (0DPI, 2DPI, 4DPI, 12DPI) para cada línea. A partir de las muestras liofilizadas se extrajeron y derivatizaron los metabolitos de la fracción polar siguiendo el método descrito por Lisec y col. (2006). Brevemente, se realizó la extracción a partir de 30 mg de tejido liofilizado, se agregó 1,4 ml de etanol 100%, se mezcló con vortex; luego se agregó 60 µl de Ribitol (0,2 mg/ml) como control interno de cantidad para la fase polar, se mezcló con vortex y se lo incubó a 70°C con agitación. Se centrifugó 10 min. a 14.000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo de vidrio, al que se le agregó 750 µl de cloroformo y 1.500 µl de agua bidestilada, se mezcló con vortex y se centrifugó durante 15 min. a 4000 rpm, se incluyó un paso adicional de extracción con cloroformo debido a la alta proporción de compuestos no polares presentes en este tejido. Se tomaron alícuotas de la fase polar de 150 µl, se las evaporó a 37°C en un concentrador de tipo *speed vac* y se las guardó a -80°C hasta su uso. Se derivatizaron dos cantidades distintas de extracto (2,5 y 5 % [v/v]), se agregó 40 µl de hidrocloreuro de metoxamina (20 mg/ml de piridina).y se incubó a 37°C con agitación durante 2 horas, luego se agregaron 70 µl de MSTFA, (*N*-metil-*N*-trimetilsilil trifluoroacetamida), 7µl de Alkanmix y se volvió a incubar a 37°C durante 30 min. Una vez derivatizados, se inyectó 1 µl de extracto de cada muestra en un cromatógrafo gaseoso con analizador de masas cuadrupolo y muestreador automático (GS 8000 gas Chromatograph, Voyager quadropole mass spectrometer Thermo-Quest, Manchester, RU, y AS200 autosampler). La cromatografía fue llevada a cabo en una columna capilar SPB-50 (30m, 30 m × 0,25 mm diámetro interno × 0,25 µm espesor de film, Supelco, Belfonte, CA, EUA). La temperatura de inyección fue de 230°C, la interface fue fijada en 250°C y la fuente de iones fue ajustada a 200°C. Se utilizó helio como gas de arrastre a una tasa de flujo de 1ml m⁻¹. Los cromatogramas y los espectros fueron analizados con el programa MassLab (ThermoQuest, Manchester, RU).

Para la identificación de cada metabolito se utilizó el método del Índice de Retención (RI, *Retention Index*) y la similitud del espectro de masa (Fiehn y col., 2000; Wagner y col., 2003). El Índice de retención (RI) de un cierto compuesto químico se define como el tiempo de retención normalizado a los tiempos de retención de los alcanos que eluyen contiguos:

$$RI_x = 100 N_0 + 100 (\text{Log}_{10}RT_x - \text{Log}_{10}RT_{N_0}) / (\text{Log}_{10}RT_{N_1} - \text{Log}_{10}RT_{N_0})$$

Donde

X: nombre del compuesto

N₀: número de carbonos del alcano que eluye directamente antes que X

N₁: número de carbonos del alcano que eluye directamente después que X

RT: Tiempo de retención (min, seg o scans)

RI: Índice de Retención

El área de cada uno de los picos obtenidos por medio de este programa fue corregida por peso y volumen. Se dividió el valor del área para cada compuesto, por el peso fresco de cada muestra y por el valor del área del control interno, que en este caso fue ribitol. Los datos fueron normalizados a los del la línea susceptible al día 0 como fue descrito por Roessner-Tunali y col. (2000).

Con el fin de validar el método de cuantificación en girasol, se llevó a cabo un experimento de recombinación en el cual extractos de frutos de tomate y flores de girasol fueron analizadas por GS/MS solos o en mezclas estequiometricamente equivalentes como está detallado en Roessner-Tunali y col. (2003) Los metabolitos que estaban presentes en flores de girasol pero que en flores de tomate estaban bajo el límite de detección fueron determinados por comparación con bibliotecas comerciales de espectros de masa (ver Tohge & Fernie, 2009).

3.5. Análisis de actividades enzimáticas

3.5.1. Extracción de proteínas a partir de tejidos de flor

Las muestras de tejido de flor tomadas a los 0, 1, 2 y 4 DPI luego de ser inoculadas con el patógeno o con agua fueron molidas en mortero con nitrógeno líquido, hasta obtener un fino polvo. Al material así obtenido se le agregó *buffer* de extracción de proteínas (100 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 400 mM Sacarosa; 100 mM TrisHCl pH 8; 10% glicerol; 10 mM 2-Mercaptoetanol; 2 mM PMSF) en una proporción 300 ml por cada 100 mg de tejido (Sambrook & Maniatis, 1989). La mezcla se incubó en hielo durante 10 a 30 min y se centrifugó 12.000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo limpio. Las extracciones proteicas así obtenidas se conservaron a -20°C hasta su utilización.

3.5.2. Medición de la actividad enzimática

Todas las actividades enzimáticas fueron determinadas por triplicado a partir de las muestras tomadas a los 0, 1, 2, 4 DPI en capítulos inoculados con una suspensión de esporas o con agua para ambos líneas. Las invertasas vacuolar y citosólica y la sacarosa sintasa (en la dirección de degradación de sacarosa) fueron medidas como fue descrito por Zrenner y col. (1995). La actividad invertasa de pared celular fue determinada según el método de Kocal y col. (2008). La actividad catalasa fue medida según el método de Aebi (1984). La actividad de PAL (*phenyl-ammonia-lyase*: fenilamonio liasa) fue determinada como lo describió Zucker (1968). En cada caso se evaluaron de 3 a 6 réplicas biológicas.

3.6. Extracción de ARN

3.6.1. Extracción de RNA Total

Para la construcción de colecciones de ADNc diferenciales, la extracción de ARN total a partir de las flores tubulares del capítulo de girasol se realizó según el método de Louime y col. (2008) con algunas modificaciones. Este método es adecuado para muestras vegetales con alto contenido de polifenoles y polisacáridos. Se molieron todas las flores tubulares de cada capítulo con mortero y nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino. Para cada tratamiento (2 y 4 DPI inoculado e inoculado con agua) se utilizó como muestra un conjunto de 5 replicas biológicas (*pool*). A dos gramos de tejido de cada muestra se le agregó 1 volumen de *buffer* de extracción (0,25 M Tris-HCl (pH 8,0); 0,05 M EDTA (pH 8,0); 2,5 M NaCl; 2% CTAB; 3% PVP-40 y 5% 2-mercaptoetanol) precalentada a 65°C durante 15/20 min. Se mezcló con vórtex y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente, cada 2 minutos se mezclaba las muestras durante 4 segundos. Luego las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 16.000 g a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y se agregó un volumen de cloroformo: isoamílico 24:1 (v/v) a -20°C, se mezcló minuciosamente con un vórtex y se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 16.000 g a 4°C. Se tomó la fase acuosa cuidadosamente y se realizaron extracciones con cloroformo: isoamílico 24:1 (v/v) a -20°C, hasta no observar interface. Luego las muestras fueron precipitadas con 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH: 5,2) y 1 volumen de isopropanol frío. Se centrifugaron las muestras durante 10 min. a 16.000g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en agua bidestilada y tratada con DEPC (dietilpirocarbonato). Luego se le agregaron 0,5 volúmenes de CILi 8M y se lo dejó precipitando durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se centrifugaron las muestras a 16.000 g durante 20 min. a 4°C, se descartó el sobrenadante y el precipitado fue lavado dos veces con etanol 80%. Luego fueron resuspendidas en agua DEPC y guardadas a -80°C hasta su uso.

Para el análisis transcripcional de genes candidatos por PCR cuantitativa (qPCR), la extracción de ARN total se hizo a partir de 100 mg de tejido utilizando los reactivos incluidos en *RNAqueous Kit* (Ambion, Applied Biosystems, EUA), según las recomendaciones del fabricante. Al *buffer* de extracción se le adicionó el reactivo *Plant RNA Isolation Aid* (Ambion, Applied Biosystems, EUA), que posibilita la remoción de contaminantes como polisacáridos y polifenoles, los cuales son abundantes en los tejidos del capítulo de girasol.

3.6.2. Cuantificación, análisis de calidad e integridad del ARN

En todos los casos la concentración de las muestras de ARN se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm considerando que D.O. (260 nm) = 1 equivale a 40 µg/ml de ARN. También se determinó la pureza del ARN midiendo las absorbancias a 280 y 230 nm, que corresponden a los picos máximos de absorción de proteínas y polisacáridos y polifenoles respectivamente, y calculando las relaciones A 260/280 y A 260/230. Se consideró que la calidad del ARN era aceptable cuando dichas relaciones estaban entre 1,8 y 2,1 y mayor a 2, respectivamente. Para estas mediciones se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop 1000A (Thermo Scientific, EUA).

La integridad de ARN se analizó por la técnica de electroforesis en gel de agarosa 1,5% utilizando *buffer* de corrida ME (400 mM MOPS, 100mM acetato de Na, 10 mM EDTA pH 8,0, todo solubilizado en agua tratada con DEPC). Previa a la siembra en el gel se desnaturalizaron las muestras agregándoles *buffer* de siembra en una relación 1/3 v/v (60% formamida deionizada; ME 1,2X; 8,5% formaldehido; 0,01% p/v azul de bromofenol/xilen cianol), incubándolas durante 5 min a 65°C y transfiriéndolas inmediatamente a hielo (Sambrook & Maniatis, 1989).

3.6.3. Purificación de ARNm a partir de ARN total

La purificación de ARNm a partir de ARN total de tejido vegetal se realizó a partir de 200-500 µg de ARN total usando el sistema *NucleoTrap® mRNA Midi Purification* (Clontech, Takara, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método de purificación se basa en el uso de oligo d(T) acoplado a partículas de una matriz de sílica en suspensión que hibrida, en solución, con la región de poli(A)+ de los ARNm. El ARNm se eluye de la fase sólida añadiendo agua. Luego de aislado, el ARNm fue cuantificado a través de la absorbancia a luz UV a 260 nm mediante un espectrofotómetro NanoDrop 1000A (Thermo Scientific, EUA) como se detalló anteriormente.

3.7. Construcción de colecciones de ADNc

3.7.1. Síntesis de ADNc, hibridaciones y amplificaciones substractivas

Las clonotecas de ADNc diferenciales fueron construidas a partir de flores tubulares de girasol inoculadas e inoculadas con agua a los días 2 y 4 post inoculación. Para ello se utilizó *PCR-Select cDNA Subtraction Kit®* (Clontech, EUA). En la etapa inicial, el ADNc fue sintetizado a partir de 0,5-2,0 µg de poly (A+) ARN de dos tipos de tejido. El tejido blanco (llamado *tester*) y el tejido de referencia (llamado *driver*). Una vez sintetizado, el ADNc fue digerido con RsaI, que corta dejando extremos romos de 400 pb en promedio aproximadamente. La definición de tejido *tester* y tejido de *driver* depende de los intereses específicos de cada experimento. Se construyeron 4 colecciones de ADNc según se detalla a continuación:

Colección D2I-NI: el ADNc de flores a los 2 DPI con *S. Sclerotiorum* fue arrestado contra el ADNc de flores a los 2 DPI con agua.

Colección D2NI-I: el ADNc de flores a los 2 DPI con agua fue arrestado con ADNc de flores a los 2 DPI con *S. Sclerotiorum*.

Colección D4I-NI: el ADNc de flores a los 4 DPI con *S. Sclerotiorum* fue arrestado contra el ADNc de flores a los 4DPI con agua.

Colección D4NI-I: el ADNc de flores a los 4 DPI con agua fue arrestada con ADNc de flores a los 2 DPI inoculadas con *S. Sclerotiorum*.

En todos los casos, las poblaciones de ADNc fueron procesadas siguiendo las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones (Figura 5). El ADNc del tejido *tester* fue subdividido en dos fracciones iguales, y cada fracción fue ligada a diferentes adaptadores (1 y 2R). Se realizaron dos rondas de hibridación siguiendo las recomendaciones del proveedor. En la primera ronda de hibridación se adicionó un exceso de ADNc *driver* a cada

muestra de *tester*. Luego las muestras fueron calentadas y desnaturalizadas permitiendo la hibridación de las distintas moléculas de ADNc y generando las moléculas **a**, **b**, **c** y **d** en cada muestra (Figura 5). Durante la segunda hibridación, las fracciones de la primera hibridación fueron mezcladas sin ser desnaturalizadas junto con mas muestra *driver* desnaturalizada. En este paso las moléculas de ADNc simple cadena (ssADNc) **a** se re-asocian para formar un nuevo tipo de molécula **e**, estas nuevas moléculas de ADN doble cadena (dsADNc), poseen distintos extremos, que corresponden a las secuencias de los adaptadores 1 y 2R.

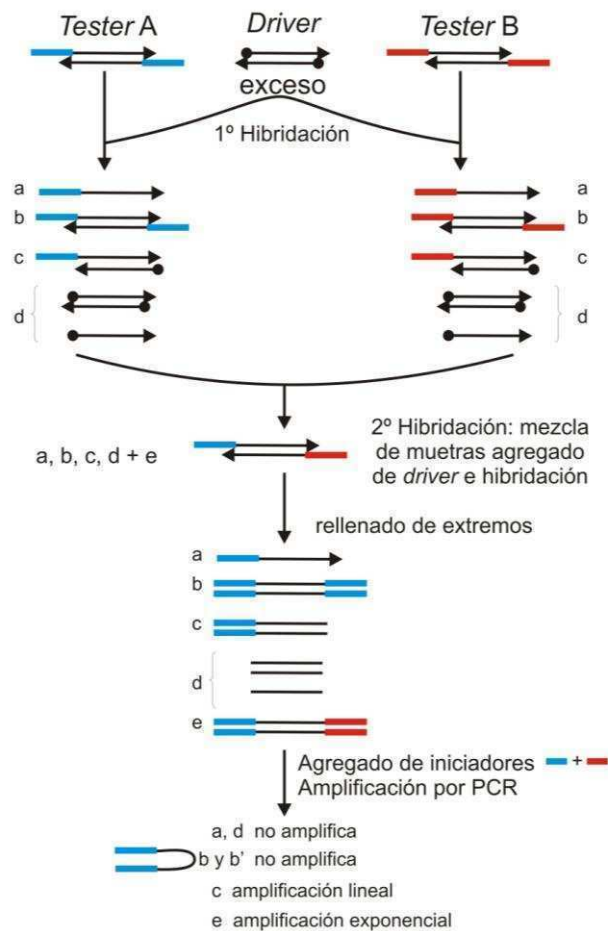


Figura 5. Representación esquemática de la metodología *PCR-Select cDNA Subtraction* (Diatchenko y col., 1996; Gurskaya y col., 1996).

En azul y en rojo se representan los adaptadores 1 y 2R respectivamente.

Los productos resultantes de las hibridaciones fueron sometidos a dos ciclos de PCR con oligonucleótidos específicos para amplificar secuencias diferencialmente expresadas. Dichas amplificaciones se realizaron en un termociclador de ADN PT 100 (MJ Research, EUA). La mezcla de reacciones de la PCR contenía 10x *buffer* de PCR ;0,2 mM dNTPs; 0,4 μ M PCR oligonucleótido 1 y *Advantage cDNA polimerasa* (Clontech, Takara, EUA). La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C (30 seg) seguido de 27

ciclos, y cada ciclo a su vez consistió en un paso de desnaturalización a 94°C (30 seg), un paso de hibridación a 66°C (30 seg) y un paso de elongación a 72°C (10 min). La segunda mezcla de PCR contenía 10x *buffer* de PCR; 0,2 mM dNTPs; 0,4 µM oligonucleótido anidado 1; 0,4 mM oligonucleótido anidado 2 y *Advantage cDNA polimerasa*. El programa de PCR utilizado constó de 12 ciclos, cada uno de los cuales consistió en un paso de desnaturalización a 94°C (30 seg), un paso de hibridación a 66°C (30 seg) y un paso de elongación a 72°C (1,5 min).

3.7.2. Clonado de las moléculas de dsADNc

Las moléculas de dsADNc fueron clonadas de manera no direccional en el *vector pGem-T-Easy Vector*® (Promega, EUA). La ligación de fragmentos de ADN se llevó a cabo utilizando 1 U de T4 ADN ligasa (Promega), en un volumen de reacción de 10 µl empleando la *buffer* de reacción provista por el fabricante de la enzima. Se utilizaron cantidades de inserto y vector tales que la relación molar entre ambos fuera de 5 a 1. La incubación se realizó durante 48 horas a 4°C.

3.7.3. Transformación de *E. coli*

Se utilizó la cepa DH5α comercial (Invitrogen, EUA) para las transformaciones. En un tubo de polipropileno de 1,5 mL estéril se mezclaron 50 µl de células competentes previamente descongeladas en hielo, con 4 µl de mezcla de ligación. Se incubó durante 30 min en hielo. Luego se transfirió durante 90 segundos a un baño termostático a 42°C y se colocó nuevamente en hielo durante 2-5 min. Las bacterias se recuperaron en 1 mL de LB líquido, incubando durante 1 hora a 37°C con agitación leve. Se centrifugaron 5 min a 3500 rpm, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en el medio remanente. Finalmente, alícuotas de 200 µl se sembraron en placas que contenían 15 ml de LB-agar suplementado con ampicilina y en presencia de X-gal e IPTG para la detección de clones recombinantes. Las placas fueron incubadas a 37°C durante toda la noche.

3.7.4. Selección de clones

Los clones recombinantes se seleccionaron por actividad de β- galactosidasa en un medio que contenía X-GAL e IPTG. Se seleccionaron las colonias blancas y se repicaron en placas 96 pocillos conteniendo 500 µl de medio *Terrific Broth* (Tartoff & Hobbs, 1987) suplementado con ampicilina, se los dejó incubando a 37°C con agitación durante toda la noche. Al día siguiente se separó una alícuota de 150 ml del cultivo en placas de 96 pocillos conteniendo 150 µl de *Freezing Medias* (36 mM K₂HPO₄; 13,2 mM KH₂PO₄; 1,7 mM citrato de sodio; 0,4 mM MgSO₄; 6,8 mM(NH₄)₂SO₄ en medio LB y 4,4 % glicerol) y se las almacenó a -80°C. El resto del cultivo remanente se utilizó para aislar los plásmidos recombinantes mediante el uso de *REAL 96 prep kit* (Qiagen, Alemania) siguiendo las recomendaciones del proveedor.

3.7.5. Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN se realizó por medio de espectrofotometría de fluorescencia mediante el equipo Spectra MAX GEMINI EM (Molecular Devices, EUA), utilizando el reactivo Hoechst 33258 (PolySciences, Cat # 09460), que se intercala homogéneamente entre las hebras del ADN, de acuerdo al protocolo que se detalla a continuación. El ADN extraído (2 ml/l) se mezcla con 200 ml de la solución de trabajo TNE-Hoechst (Hoechst 100 ng/ml y TNE 1X: 10 mM Tris; 200 mM NaCl; 1 mM EDTA, pH 7,4). Para determinar las concentraciones de las muestras se construyó una curva de calibrado con ADN genómico de timo de cabra de concentraciones crecientes conocidas: 22,5; 45; 90; 180; 360 y 720 ng/ml. El espectro se ajustó a una longitud de onda de excitación (λ) de 365 nm y una longitud de onda de emisión (λ) de 468 nm. Los datos de los estándares se ajustaron a una recta y las incógnitas se determinaron por extrapolación.

3.7.6. Secuenciación y Análisis de las secuencias

Los plásmidos se secuenciaron en la Unidad Genómica del Instituto de Biotecnología, INTA Castelar, mediante secuenciación directa a partir de oligonucleótidos específicos T7. Las secuencias obtenidas fueron transformadas al formato FASTA. Las secuencias correspondientes al vector y a los adaptadores fueron removidas. La anotación de las secuencias obtenidas se realizó mediante el paquete bioinformático Blast2GO (Götz y col., 2008) (<http://www.blast2go.de>), para encontrar similitud con secuencias conocidas, utilizando el algoritmo BLAST (Altschul y col., 1990). Luego se realizó un mapeo de los hits obtenidos en el paso anterior contra la base de datos de ontologías génicas (Gene Ontology), y finalmente se asignaron los términos GO a cada secuencia por medio de una fórmula de anotación propia de Blast2Go, que considera entre otros parámetros el código de evidencia (EC) de la anotación, promoviendo la asignación con evidencia experimental por sobre las asignaciones electrónicas. Blast2Go se usó también para mapear las secuencias anotadas en caminos metabólicos usando la base de datos KEGG. Las secuencias que no poseían similitud significativa contra la base de datos de proteínas del NCBI se compararon contra la base de ESTs de Girasol en el *Helianthus annuus* Gene Index (HaGI) (Dana Farber Cancer Institute T.G.I.P.) usando los algoritmos Blastn y tBlastx

3.8. Análisis transcripcional de genes candidatos

3.8.1. Northern Blot

Se sometieron a electroforesis 10 μ g de ARN de cada muestra junto con un marcador de peso molecular, en un gel de agarosa 1,5% con MOPS 1X como *buffer* de corrida. A las muestras se les agregó *buffer* de siembra conteniendo 60% formamida deionizada, 8,5% formaldehído y 0,01 % azul de bromofenol. La transferencia e hibridación se realizaron siguiendo las técnicas descriptas por Sambrook y col. (1989). Se utilizaron membranas *Hybond N+* (Amersham Pharmacia Biotech, RU). Para la prehibridación e hibridación se empleó la solución *Ultrasens* (*Ultrasensitive Hybridization Buffer*, Ambion, EUA). Se prehibridó durante 2 horas a 42°C y se hibridó durante toda la noche a la misma

temperatura. Luego de descartada la sonda, se realizaron dos lavados sucesivos a 65°C durante 15 min con 2X SSC (3M NaCl; 0,15M citrato de sodio, pH, 7) 0,1% SDS y otro de 10 minutos con 1X SSC, 0,1% SDS a temperatura ambiente. Se realizaron exposiciones a películas autoradiográficas durante distintos períodos de tiempo y luego éstas fueron escaneadas utilizando el equipo *Typhoon* 9400 (GeHealthcare, RU). El análisis de las imágenes adquiridas de esta manera se realizó utilizando el programa ImageQuant™ TL (GeHealthcare). Las sondas radiactivas se prepararon usando los templados de DNA purificados. Se marcaron radiactivamente con fósforo ($\alpha^{32}\text{PdCTP}$) (PerkinElmer NEN, EUA) haciendo uso del sistema *Prime-a-Gene Labeling System*, según las especificaciones del fabricante (Promega)

3.8.2. Tratamiento con ADNasa y chequeo por PCR

Se trataron 2 µg de cada muestra de ARN total con DNAsa (Invitrogen, EUA) según instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones, la incubación con la enzima se realizó durante 45 minutos para remover en su totalidad el ADN contaminante. Se chequeó la presencia de ADN contaminante realizando una reacción de PCR de los ARN tratados, la mezcla de PCR contenía: 1X *buffer* de Taq polimerasa (Invitrogen, EUA); 1,5mM Cl_2Mg , 0,25 µM de cada oligonucleótido; 0,2 mM dNTPs; 0,75 UE Taq Polimerasa (Invitrogen, EUA) en un volumen final de 25 µl

3.8.3. Síntesis de ADNc

Se sintetizó la primera cadena de ADNc a partir de 1 µg de ARN, utilizando 200 UE de *Superscript III* (Invitrogen), en presencia de *buffer* de primera cadena (50mM Tris-HCl pH 8,3; 75mM KCl; 3mM MgCl_2), 150ng/ml de hexanucleótidos al azar (Invitrogen, EUA), 10mM de dNTPs y 0,1 M DTT en 20 µl de reacción.

3.8.4. PCR en tiempo final

Las reacciones de PCR a tiempo final se realizaron utilizando una mezcla de PCR contenía: 1X *buffer* de Taq polimerasa (Invitrogen, EUA); 1,5mM MgCl_2 ; 0,25 µM de cada oligonucleótido; 0,2 mM dNTPs; 0,75 U Taq Polimerasa (Invitrogen, EUA) en un volumen final de 25 µl.

3.8.5. PCR cuantitativa (en tiempo real)

Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron utilizando el kit comercial *QuantiTect™ SYBR® Green PCR* (QIAGEN, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos fueron sintetizados utilizando el programa *Primer Express® v2.0* (Applied Biosystems, EUA). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl, según se describe en la Tabla 4:

Tabla 4. Componentes de la mezcla maestra de reacción de qPCR

Componentes	[final]
2X QuantiTect SYBR Green PCR	1X
Oligonucleótido A	0,3 μ M
Oligonucleótido B	0,3 μ M
ADNc	60 ng
H ₂ O bidestilada libre de RNAsa	Llevar a 25 μ l

Las reacciones se realizaron en un equipo *ABI Prism 7500 HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems, EUA) utilizando el siguiente programa: 10 min a 95°C y 15 seg a 95°C por 40 ciclos y 1 min a 60°C. Una vez terminada la amplificación se creó la curva de disociación, medida como cambios en los niveles de fluorescencia en función de la temperatura, de modo de detectar los productos no específicos. El programa de disociación utilizado fue el siguiente: 15 seg a 95°C, 15 seg a 60°C seguido de una suave rampa de 20 min desde 60°C a 95°C.

Se realizaron 3 réplicas técnicas y entre 3 y 5 replicas biológicas según el tratamiento. En la Tabla 5 se detallan los oligonucleótidos utilizados.

Se utilizó el programa *LinRegPCR, Analysis of quantitative RT-PCR data* (11.0) (Ruijter y col., 2009) para la determinación de las eficiencias de cada par de oligonucleótidos. Este programa determina, para cada una de las muestras de la placa, una ventana de linealidad, y realiza, en base a esto, un análisis de regresión lineal ajustando el conjunto de datos de PCR a una recta. Las eficiencias son calculadas en base a la pendiente de la curva de amplificación en la fase exponencial, para cada una de las muestras. Los valores de eficiencia pueden estar comprendidos entre 1 y 2. Una eficiencia igual a 2 ($E=2$), indica un nivel ideal del 100% en donde por cada ciclo de amplificación se duplicó la cantidad de producto. El análisis estadístico de los perfiles de expresión obtenidos en los ensayos por qPCR fue realizado con el programa *fgStatistics* (Di Rienzo, comunicación personal). Este programa permite realizar un análisis de la varianza para cada una de las comparaciones y estimar los p-valores correspondientes. Asimismo, *fgStatistics* permite comparar los perfiles de expresión de los diferentes genes en relación a los genes de referencia por medio de la fórmula (Pfaffl, 2001):

$$R = \frac{(E_{gen})^{\Delta Cq_{gen} \text{ (control - muestra)}}}{(E_{gen \text{ ref}})^{\Delta Cq_{gen \text{ ref}} \text{ (control - muestra)}}$$

Donde:

R: relación

E: eficiencia

Cq: se define como el ciclo a partir del cual la fluorescencia es estadísticamente significativa por encima del ruido de fondo (*background*).

Para los análisis de estabilidad del gen de referencia se utilizaron 4 replicas biológicas y 3 replicas técnicas de cada día post inoculación (0, 2 y 4 DPI) para dos órganos flor tubular y receptáculo. Los niveles de expresión de los genes de referencia fueron determinados por el número de ciclos (Ct) necesarios para que la fluorescencia relativa de amplificación llegara al umbral específico de detección. Los valores de Ct obtenidos fueron convertidos en cantidades relativas usando la eficiencia de PCR para cada gen y para cada órgano con el objetivo de calcular la estabilidad de expresión del gen. Para seleccionar los genes de referencia más estables a ser utilizados en este sistema girasol- *S. sclerotiorum* se realizó un ANOVA de dos factores para discriminar entre el efecto debido al órgano (flor o receptáculo) y el efecto debido al progreso de la enfermedad (días post-inoculación)

Tabla 5. Oligonucleótidos diseñados para PCR cuantitativa. AN: número de acceso

Nombre	Secuencia	Blast Hit	AN
9D4I-NI	F:5'GCAACAACAAGGCACCTCATT3' R:5'CCCCATTCACCGCTACGA3'	isoform b	ACU12388
18D4I-NI	F: 5'GTGTATAGATTGGGAGGGTGCAA3' R: 5'TGGATTCTTCTTGGGATCACAA3'	Defensine	P22357
88D4I-NI	F:5'AAGGGAGTTCGCCGATTT3' R:5'ATTCCTCTTCATGGCATGTC3'	AP2/ERF domain-containing transcription factor	XP_002319099
102D4I-NI	F:5'GGCGTAGGTCCCGCTGTTG3' R:5'AAATGAGGCCTTGCATCCC3'	3-ketoacyl- thiolase	XP_002299284
114D4NI-I	F:5'GCTAAAGAATTATTGCCTGCTCCTA3' R:5'ACCGACTGTTTCAGCAGCAACT3'	protein kinase	XP_002320210
116D2I-NI	F:5'ATGGGTGGATGGATGATGGT3' R:5'ACACAGATAGCGTTTGATTAATTGCT3	peroxidase	ACT21094
118D2I-NI	F:5'GCAATCAATGGTGTCAAGGA3' R:5'CCGGTGCAATGCTAAGTTG3'	chitinase-like protein	ABJ74186
128D4I-NI	F:5'TAGAGTCTTCACCGGCTTTTGTA3' R:5'GTTGGGATCCCGATGAAGAA3'	Ribosomal protein L24E	ABE80118
191D4NI-I	F:5'GGGACCGTAATGCATAAGAAGAA3' R:5'TCAACGAGGCCAAGTGAACA3'	cytochrome p450	ABC69409
201D4I-NI	F:5'ACACTTGCTCGGTTGCTTCA3' R:5'GTTTCACTTTCGGCAATGCA3'	cytochrome P450	XP_002531093
222D4I-NI	F:5'CGGTGGTGGTTGGTTACGAT3' R:5'TTCTCCGCCGACTTAACTTCA3'	ethylene responsive element binding factor	XP_002275892
222D4NI-I	F:5'TGTCCGAAGCCAGACCTGAT3' R:5'GCAGCTGGAGGCCACTGA3'	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (ACC)	AAC49824
271D4NI-I	F:5'TCAGCCGGGACAGATCCTA3' R:5'TTTCTCACTTCTTCTTGCTTTCTTC3'	cytochrome p450	XP_002278372
286D4NI-I	F:5'AAGTTGGCCATGGAAGATGTG3' R:5'ACATGCTGGCGACTCTTCA3'	ubiquitin-protein ligase	XP_002532897
334D4I-NI	F:5'GGAATCCCATTCGTGAAGTGA3' R:5'CACGCCTTACATGTCAAAAGCT3'	protein-s isoprenylcysteine O-methyltransferase	XP_002534313
360D4I-NI	F:5'TGGTCATGTTGGCAGTCAA3' R:5'GAATTGAGCCCCGACCCAA3'	basic chitinase	XP_002276563
407D4I-NI	F:5'ATGTCGTTCTTGTCGGTGGTT3' R:5'TCAGGGTTGATGCTCTTGCA3'	heat shock protein hsp70	AAV97978
456D4NI-I	F:5'TCAAAAACCTCCATTGCAAGTAGCT3' R:5'TGGCGGTGTTTATTAGGGTATGT3'	AP2/ERF domain-containing transcription factor	AAO13360
505D4I-NI	F:5'GGAAAGAATCCGTGCAATTAAGTT3' R:5'TGCATGGGAATCATATGTAAGCA3'	defensin	AAM27914
537D4I-NI	F:5'TCAGTGCTATGCGGAGAAACA3' R:5'CACCATGTGTCCGCTGATCT3'	GDP-L-galactose phosphorylase	ADB85572
548D4I-NI	F:5'AGTAGCCTCCCCGGGAAAT3' R:5'CTTAGTCATGTCCACATTCAAATCCT3'	lipid transfer protein	AAL27855
581D4I-NI	F:5'CCATCTTTGCCGATGAAAATC3' R:5'AGCATGAGGAGTTTGACCAATCA3'	cysteine protease	BAA96501
627D4I-NI	F:5'AATCTATGACCGCCAATCCTATG3' R:5'GTAATGCCCATCGGAAGTAGACA3'	acetoacetyl CoA thiolase	AAQ77242
684D4I-NI	F:5'CTTGATTTGGCCGACGGTTA3' R:5'GGAGCTGTTGGAGGACACAAAC3'	polyphenol oxidase	ACJ70698
712D4I-NI	F:5'TGAAGGGATCGGATGCAATC3' R:5'AATCAATATTAGGGTTTGCAGCTTTAG3'	auxin-responsive protein IAA7	CBI26357
728D4I-NI	F:5'TCTCGGAAAGGCCTTGAAAG3' R:5'GGCGGATCTCCTTGGAA3'	auxin-induced protein	AAB84222

Nombre	Secuencia	Blast Hit	AN
HaGLP1	F:5'GAATGCAACTGCGATAGCC3' R:5'CCGAATGTCTGTGCAAGGA3'	germin-like protein	ABW89137
WRKY7	F:5'CACATACGAACCCCTCCATGAGA3' R:5'AATGCCCCATTCAATCCTTAAA3'	WRKY33	NP_181381
PR5	F:5'TACCCACCCAACACATTGG3' R:5'CACCATCGGCACATTGAATC3'	pathogenesis-related protein 5-1 (PR5-1)	AF364864
Tubulina	F:5'TGAGTTGGTTCGGATTGAAG3' R:5'TTCAGCGAAGGCAGACGAG3'	pi-tubulin	AF401481
EF	F:5'TCCGGTAAAGAGCTCGAGAA3' R:5'TCAACGCTCTTGATCACACC3'	elongation factor 1- α	AY094064
GAPDH	F:5'CAGACAAGGACAAGGCTGCT3' R:5'GGTCAGGTGTGTATTTCGTGTTTC3'	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	BAJ17660
Actina	F:5'TGGTATGGGACAAAAGATGC3' R:5'TCAGTAAGAAGAACGGGATGC3'	actin	AAF82805
Ciclofilina	F:5'CTGCGAAGACTGAGTGGCTTG 3' R:5'TTCGAGCAGGTTCCGGATC3'	cyclophilin	ABV26711

3.9. Determinación de Jasmonatos (JAs) y Ácido Salicílico (SA) en capítulos de girasol

Las determinaciones se realizaron en muestras de flores de capítulos de las líneas HA89 y RHA801 procedentes del ensayo realizado en el campo experimental de INTA-Castelar, durante la campaña 2008/2009 como se describió anteriormente.

3.9.1. Extracción y purificación de fitohormonas (JAs, SA)

Las hormonas fueron extraídas a partir de muestras liofilizadas de flores tubulares usando el protocolo modificado de Durgbanshi y col. (2005). Se homogenizaron 200 mg de tejido liofilizado de flores de girasol en un mortero con 5 ml de agua ultra pura. Como estándares internos para Jasmonatos se agregaron 100 ng de ácido jasmónico ($^2\text{H}_6$)JA y ácido 12-oxo-phytodienoico ($^2\text{H}_5$)OPDA entre otros JAs. Para ácido salicílico se utilizó como estándar 100 ng de ácido salicílico SA- $(^2\text{H}_6)$. Los extractos fueron transferidos a tubos Falcon de 50 ml, y centrifugados a 5000 rpm por 15 min. Se descartó el precipitado. Se ajustó el pH del sobrenadante a 2,8 con ácido acético al 15% y se extrajo 2 veces en igual volumen de dietil éter. Después de descartar la fase acuosa, la fase orgánica se evaporó y los extractos secos fueron disueltos en 1000 μl de metanol. Luego las muestras fueron filtradas a través de una jeringa con papel de filtro en una cámara de vacío a un flujo menor a 1 ml min $^{-1}$. El eluido fue evaporado a 35°C en un concentrador de tipo *Speed Vac*.

3.9.2. Identificación y cuantificación con LC-ESI-MS/MS

Las muestras fueron resuspendidas en 50 μl de metanol y separadas por un equipo HPLC Alliance 2695 (Waters, Milford, MA, EUA) provisto de una columna de fase reversa C $_{18}$ (100 mm x 2.1 mm, 3- μm). La separación se realizó usando un gradiente inicial de 40% de metanol y 60% de agua/alcohol culminado a los 25 min. con un 80% de metanol y 20% de agua/alcohol.

La identificación y cuantificación se realizó con un espectrómetro de masa con triple cuadrupolo (Quattro Ultima; Micromass, Manchester, RU), acoplado al HPLC. Se utilizó como fuente de iones un electrospray con ionización negativa (ESI-MS/MS). Para la identificación se utilizó espectrometría de masa de monitoreo de múltiple reacción (MRM) y

el programa (MassLynx™ v. 4.1, Micromass, Manchester, RU) y para la cuantificación el programa QuanLynx™ v. 4.1, Micromass, Manchester, RU).

3.10. Análisis estadístico

3.10.1. Análisis de perfiles metabólicos

Las diferencias en el contenido de metabolitos entre las líneas y los días post inoculación se determinaron utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores con efectos fijos mediante la utilización del paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK, EUA). Se consideraron dos niveles para el factor línea (RHA89: resistente; HA89: Susceptible) y cuatro niveles para el factor día post inoculación (DPI) (0, 2, 4, 12). Para aquellos metabolitos que mostraban efectos principales significativos ($p < 0,05$) y no presentaban interacción entre los factores, se realizaron comparaciones de a pares a lo largo de los tratamientos utilizando la prueba de Tukey (*Tukey honest significance difference test*) (Zar, 1984). En los casos que se detectó interacción significativa cada factor fue analizado por separado dentro de los niveles del otro factor por medio de una ANOVA de un factor y las comparaciones de a pares se realizaron mediante una prueba de Tukey en los casos que se detectaron diferencias significativas. El análisis jerárquico de agrupamiento (*Hierarchical Cluster Analysis*, HCA) y el análisis de componentes principales (*Principal Component Analysis*, PCA) fueron realizados con el programa Infostat (v2008 www.infostat.com.ar). Para el análisis de agrupamiento se calcularon las distancias euclídeas usando la medias del nivel de cada metabolito para cada línea y tiempo post inoculación, y este valor de distancias fue transformado mediante \log_{10} . Los dendogramas correspondientes fueron obtenidos utilizando el método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method*). Para el PCA, se calculó una matriz de correlación entre las variables basada en una matriz de datos estandarizada. Se realizó un análisis de correlación entre pares de metabolitos para cada una de las líneas analizadas usando el coeficiente de correlación de Spearman (r_s) calculado con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK, EUA). Las correlaciones sólo se realizaron para aquellos metabolitos cuantificados en todos los tiempos analizados.

Los pares de correlaciones fueron ordenados según el coeficiente de Spearman y se descartaron aquellos que poseían un valor de $r_s = 0$ y/o valores de $p = 1$. Las correlaciones que resultaron estadísticamente significativas fueron utilizadas para realizar un análisis de redes (Christensen & Nielsen, 2000), donde cada vértice corresponde a un metabolito y la unión entre vértices corresponde a una correlación significativa entre dos metabolitos. Las redes fueron luego sometidas al análisis cartográfico propuesto por Guimerá & Nunes-Amaral (2005). Los módulos fueron identificados en base a la magnitud de los coeficientes de correlación y por el método de agrupamiento de encadenamiento promedio (*average linkage clustering method*) implementado en el software EPCLUST (Vilo y col., 2003). Las redes fueron graficadas utilizando el paquete de programas NetDraw (Analytical Technology <http://www.analytictech.com/>). Se definieron como compuestos conectores o *hubs* aquellos metabolitos que presentaban un número de conexiones (correlaciones significativas) mayor

al promedio. El número promedio de conexiones por metabolito (PCM) fue calculado para cada línea por separado considerando únicamente las correlaciones significativas ($p < 0.01$).

3.10.2. Análisis de perfiles hormonales

Para el análisis de los perfiles hormonales se ajustó un modelo lineal mixto para un experimento tri-factorial con diseño completamente aleatorizado utilizando el paquete de programas Infostat 2006® (Grupo Infostat, FCA, Córdoba, Argentina). Los factores considerados fueron Línea, día post inoculación (DPI) y tratamiento (inoculado /inoculado con agua).

4. RESULTADOS

4.1. Estudio de perfiles metabólicos por CG/MS

4.1.1. Evaluación de la incidencia de enfermedad en las líneas en evaluación

En concordancia con resultados anteriores de evaluación del comportamiento de las líneas HA89 y RHA801 a infecciones artificiales con *S. sclerotiorum* (Escande y Troglia, comunicación personal), en el ensayo realizado en la campaña 2003/2004 se detectaron diferencias significativas entre la curva del progreso de la enfermedad acumulada (AUDPC) entre los días 21 y 42 post inoculación de los dos genotipos. Este valor fue de 2,36 para la línea RHA801 y de 5,83 para la línea HA89 (Figura 6). La mínima diferencia significativa para esta variable fue de 2,76 según la prueba de Waller-Duncan

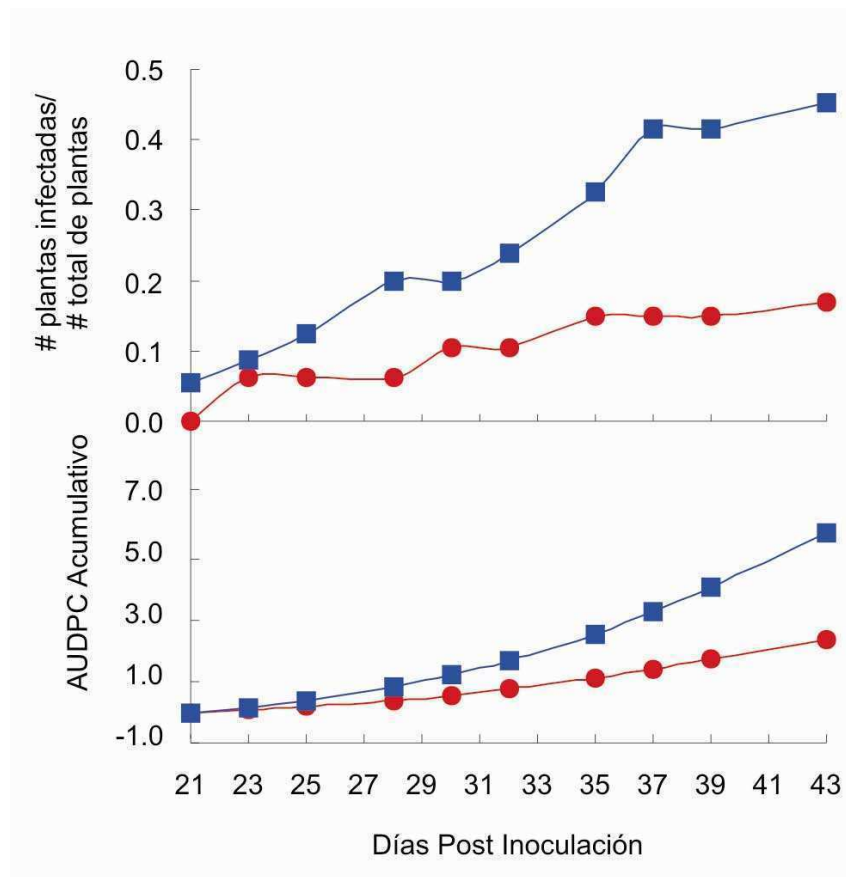


Figura 6. Curva del progreso de la enfermedad (arriba) y cálculo de AUDPC acumulativa (abajo).

En rojo y azul se encuentran representadas la línea RHA801 y la HA89 respectivamente.

Los síntomas de la enfermedad, necrosis floral seguida de manchas color marrón claro en el envés del capítulo y podredumbre húmeda del receptáculo, pudieron observarse recién al día 21 post inoculación. Bajo las condiciones del ensayo realizado como se describió en la sección 3.3, la enfermedad progresó normalmente, el patógeno consumió los tejidos del capítulo hasta dejar sólo las fibras de los tejidos vasculares y el micelio logró diferenciarse formando esclerocios.

El diseño experimental utilizado permitió evaluar cambios en perfiles metabólicos en flores, órgano de infección primario del patógeno, en estadios tempranos del proceso de infección, cuando aún no se evidencian síntomas de la enfermedad.

4.1.2. Detección de metabolitos en capítulos de girasol por medio de cromatografía gaseosa/ espectrofotometría de masa (GC/MS)

Dado que no existen antecedentes en el uso de GC/MS en flores de girasol y con el objetivo de validar los métodos utilizados para la medición de metabolitos en otras especies y tejidos, se llevó a cabo un experimento de recombinación, evaluando por GC/MS tanto extractos de frutos de tomate y de flores de girasol por separado (Figura 7A y Figura 7B), así como también en una mezcla de extractos de ambas especies estequiométricamente equivalentes (Figura 7C). Este experimento permitió: (I) Asegurar que los picos identificados para las muestras de girasol eran equivalentes a los identificados en los frutos de tomate y (II) Determinar la eficiencia del protocolo de extracción para este nuevo tejido. El primer punto es de particular importancia para la separación cromatográfica dado que diferentes composiciones de extractos pueden causar los llamados “efectos de matriz” dando como resultado cambios en los tiempos relativos de elución (para más detalle ver Wagner y col., 2003). A través de este análisis comparativo, se determinó que los picos para las muestras de girasol alineaban satisfactoriamente con aquellos que habían sido previamente anotados para frutos de tomate. Además este análisis reveló que el valor relativo determinado en la muestra de extracto simple de girasol podía ser recuperado en el extracto mezcla (Figura 7B y 7C). Para la mayor parte de los 63 metabolitos se recuperó entre 70 y 130% de la cantidad de extracto original de la muestra inyectada (Figura 7A, 7B y 7C). Los resultados de esta validación fueron similares a los obtenidos previamente cuando se había realizado la comparación entre los tejidos de tomate y papa (Roessner-Tunali y col., 2003). Además de los metabolitos comunes en ambos tejidos, se identificó un número de picos correspondientes a metabolitos presentes en las flores de girasol que en tomate estaban por debajo del límite de detección, incluyendo los metabolitos: homoserina, 2-oxoglutarato, fucosa/ramnosa, t-cafeato, gentiobiosa, maltitol, isomaltosa, clorogenato y rafinosa. En resumen, la aplicación de GC/MS permitió identificar 63 metabolitos mediante la utilización del método del índice de retención (IR) y la similitud del espectro de masa (Fiehn y col., 2000; Wagner y col., 2003), de los cuales se cuantificaron confiablemente 50 metabolitos de estructura química conocida, entre los que se incluyen 16 aminoácidos, 16 ácidos orgánicos, 8 di y trisacáridos, 4 polioles, 4 intermediarios fosforilados y 2 ácidos grasos.

A-Tomate

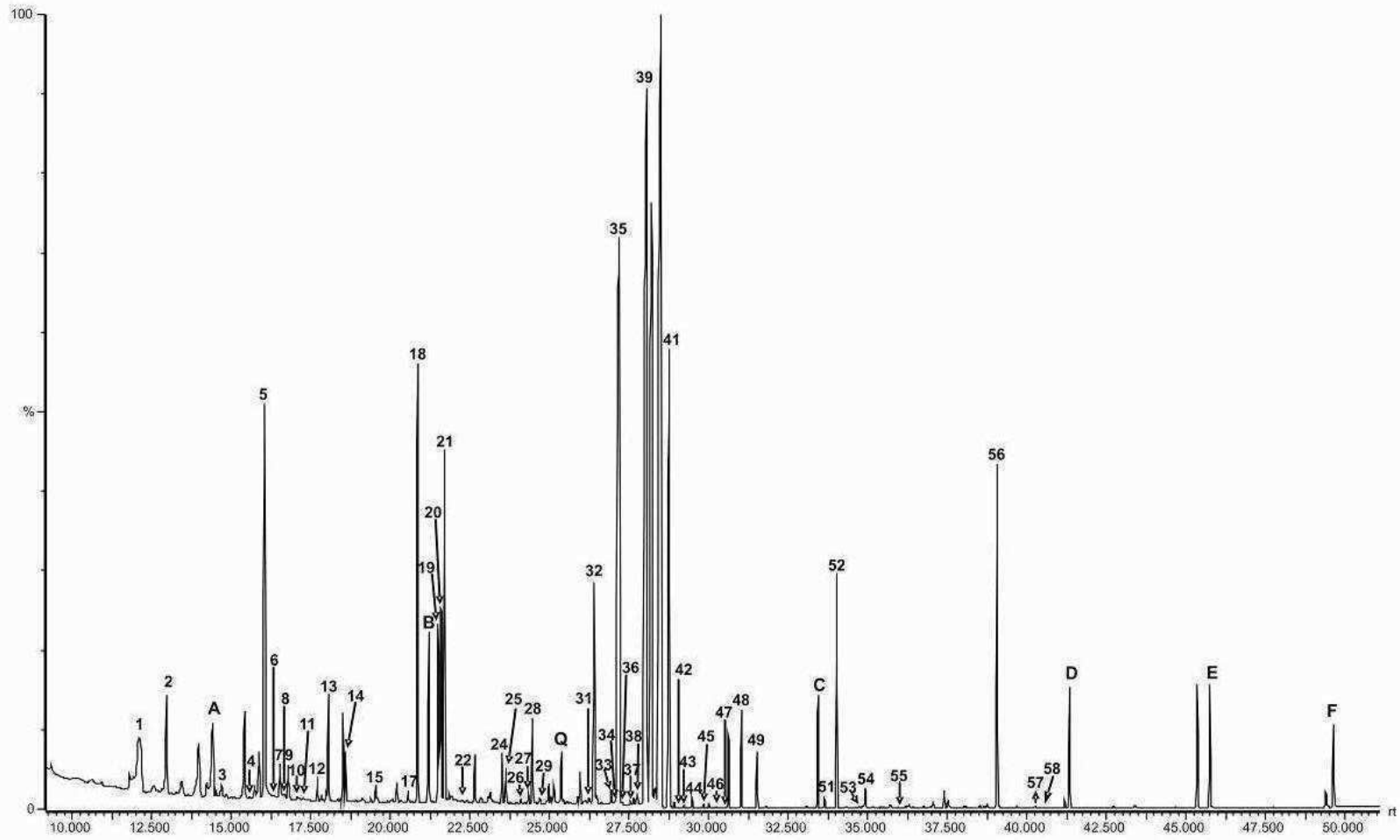


Figura 7A. Cromatograma iónico total obtenido por la técnica de GC-MS de extractos de frutos de tomate

B-Girasol

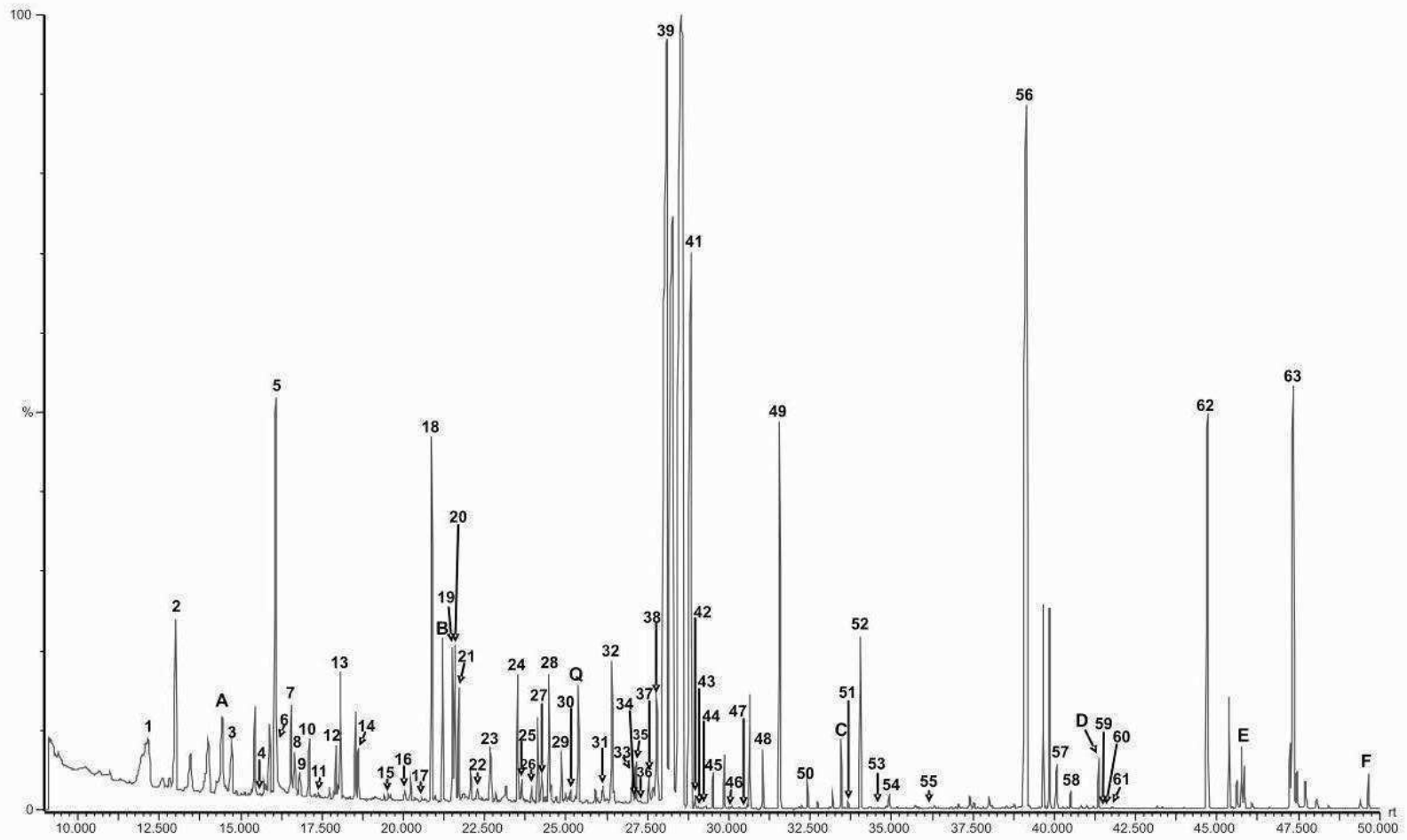


Figura 7 B. Cromatograma iónico total obtenido por la técnica de GC-MS de extractos de flores de girasol

C- Girasol + Tomate

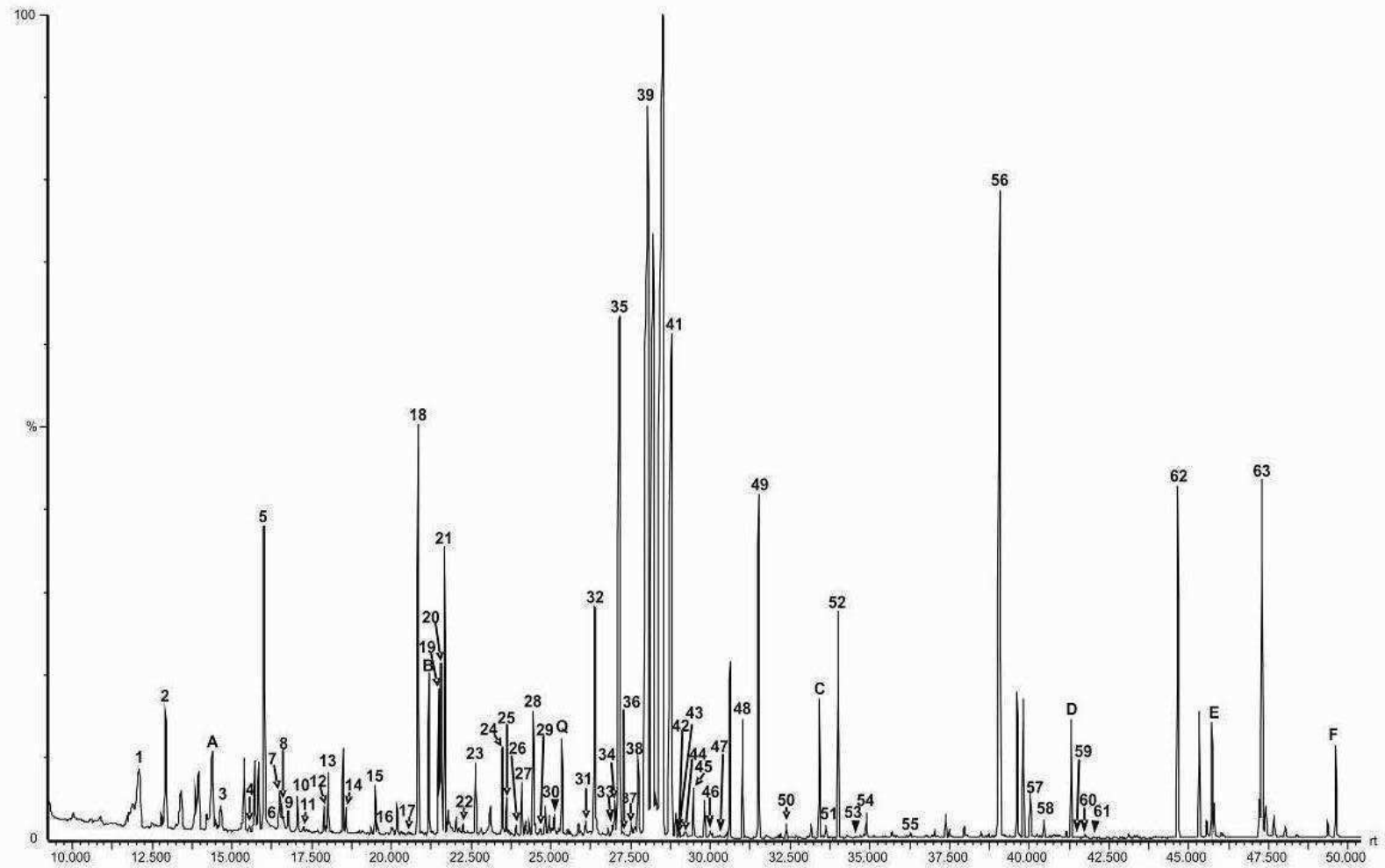


Figura 7 C. Cromatograma iónico total obtenido por la técnica de GC-MS de una mezcla estequiométrica de extractos de frutos de tomate y flores de girasol

Figura 7. Cromatogramas iónicos totales obtenidos por la técnica de GC-MS A. Extractos de frutos de tomate. B. Extractos de flores de girasol. C. Una mezcla estequiométrica de extractos de frutos de tomate y flores de girasol

Identificación de picos: 1, Alanina (99.8±17.3); 2, glicolato (115.0±16.0); 3, Valina (105.1±14.4); 4, benzoato (80.5±19.9); 5, fosforato (177.2±23.9); 6, glicerol (92.2±20.4); 7, isoleucina (130.5±16.6); 8, prolina (96.5±16.0); 9, glicina (78.8±29.1); 10, succinato (65.4±7.9); 11, glicerato (90.1±9.8); 12, fumarato (78.1±11.2); 13, serina (185.0±38.4); 14, Treonina (216.9±52.8); 15, β-Alanina (135.8±12.8); 16, homoserina (*); 17, citramalato (164.5±19.4); 18, malato (132.4±13.5); 19, Asp (135.5±23.1); 20, piroglutamato (147.3±14.0); 21, γ-aminobutirato (GABA) (162.0±13.8); 22, treonato (84.0±8.2); 23, 2-oxoglutarato (*); 24, Glu (129.7±14.0); 25, fenilalanina (127.8±28.7); 26, xilosa (134.7±7.5); 27, arabinosa (75.0±9.1); 28, Asn (130.0±23.4); 29, ribosa (83.0±7.3); 30, fucosa/ramnosa (*); 31, glicerol-1-P (74.0±4.1); 32, Gln (155.1±33.9); 33, shikimato (41.0±4.5); 34, ornitina/arginina (102.2±15.6); 35, citrato (121.8±16.8); 36, isocitrato (128.7±18.6); 37, dehidroascorbato (121.7±18.9); 38, quinato (70.0±3.8); 39, fructosa (105.7±8.3); 40, manose/galactosa (145.2±43.7); 41, glucosa (105.8±10.6); 42 manitol (195.6±56.1); 43, sorbitol/galactitol (310.1±56.6); 44, Tyr (99.1±21.2); 45, ononitol (78.4±11.6); 46 gluconato (77.2±16.2); 47, sacarato (106.2±16.5); 48, palmitato (137.6±8.8); 49, Mio-inositol (67.3±4.3); 50, t-cafeato (*); 51, Trp (129.7±4.2); 52, estearato (137.0±12.2); 53, fructosa-6-P (80.3±8.2); 54, glucosa-6-P (89.5±6.8); 55, Mio-inositol-1-P (111.1±34.6); 56, sacarosa (82.2±5.1); 57, maltosa (174.4±48.1); 58, trealosa (85.4±21.7); 59, gentiobiosa (*); 60, maltitol (*); 61, isomaltosa (*); 62, clorogenato (*); 63, rafinosa (*). Tiempo referencia: A, dodecano; B, pentadecano; C, docosano; D, octacosano; E, dotriacontano; F, hexatriacontano. Estándar de cuantificación Q, ribitol. * denota aquellos metabolitos detectados solamente en la flores de girasol. Los números entre paréntesis corresponden al % de recuperación ± SE (n=4).



Figura 8. Representación esquemática de las vías metabólicas analizadas en flores de girasol. Los metabolitos identificados están indicados en letra negra mientras que los metabolitos en gris corresponden a metabolitos no determinados pero incluidos en la figura por razones explicativas. Los nombres en rojo y azul representan a los metabolitos que están significativamente aumentados en la línea moderadamente resistente (RHA801) y en la susceptible (HA89) respectivamente. Los asteriscos indican los metabolitos en los cuales la interacción entre el genotipo y los días post inoculación es significativa

En la Figura 8 se representan se representan esquemáticamente las vías metabólicas que contienen a todos los metabolitos detectados y cuantificados en flores de girasol.

4.1.3. Cambios en los niveles metabólicos de flores de girasol en la línea moderadamente resistente RHA801 y en la línea susceptible HA89 infectados con *S. sclerotiorum*

El análisis de ANOVA mostró diferencias significativas en los niveles de metabolitos entre líneas, días post inoculación e interacción entre ambos factores (Tabla anexa 1). En las comparaciones post-hoc solo un número reducido de comparaciones de a pares mostraron diferencias significativas (Tabla anexa 2, 3 y 4). En la Figura 9 se representa esquemáticamente el perfil a distintos DAI, para los distintos metabolitos analizados para cada línea, a distintos DAI. A continuación se describen los resultados hallados para distintos metabolitos de acuerdo a su estructura química.

Análisis de niveles de azúcares y azúcares-alcoholes

Las diferencias en los niveles relativos del contenido de azúcares fueron significativamente afectadas por el factor día post inoculación, presentando solamente los valores de trealosa diferencias significativas entre líneas y días post inoculación (Figura 9A y Tabla Anexa 1). La interacción de ambas variables sólo fue significativa para el contenido de sacarosa. A pesar de que para la línea HA89 no se observaron diferencias significativas en sus niveles, para la línea RHA801 se observó una disminución al día 2 post inoculación, seguido de un aumento hasta llegar a los niveles iniciales al día 12 post inoculación (Figura 9A, Tabla Anexa 1 y 3). Entre los azúcares-alcoholes (polioles) cuantificados, el ononitol posee un valor de F significativo para el efecto del línea, presentando la línea moderadamente resistente niveles más altos que la susceptible, particularmente a los 2 y 4 DPI (Figura 9B y Tabla Anexa 1 y 2).

Análisis de los niveles de intermediarios fosforilados

Los niveles de los intermediarios fosforilados casi no se alteraron entre las dos líneas, sin embargo en la línea susceptible se observa un mayor nivel de estos metabolitos en los primeros días post inoculación. Los niveles del mio-inositol-1-fosfato fueron afectados por ambos factores, línea y días post inoculación, siendo su contenido significativamente mayor para la línea HA89 al día 2 post inoculación (Figura 9C, Tabla Anexa 1 y 2). La fructosa-6-fosfato mostró un efecto interacción significativo, a pesar de que no se observaron diferencias significativas en sus niveles para la línea RHA801, para la línea HA89 se observó un aumento en los niveles al día 2 post inoculación, seguido de una disminución al día 12 post inoculación (Figura 9C, Tablas anexa 1 y 3)

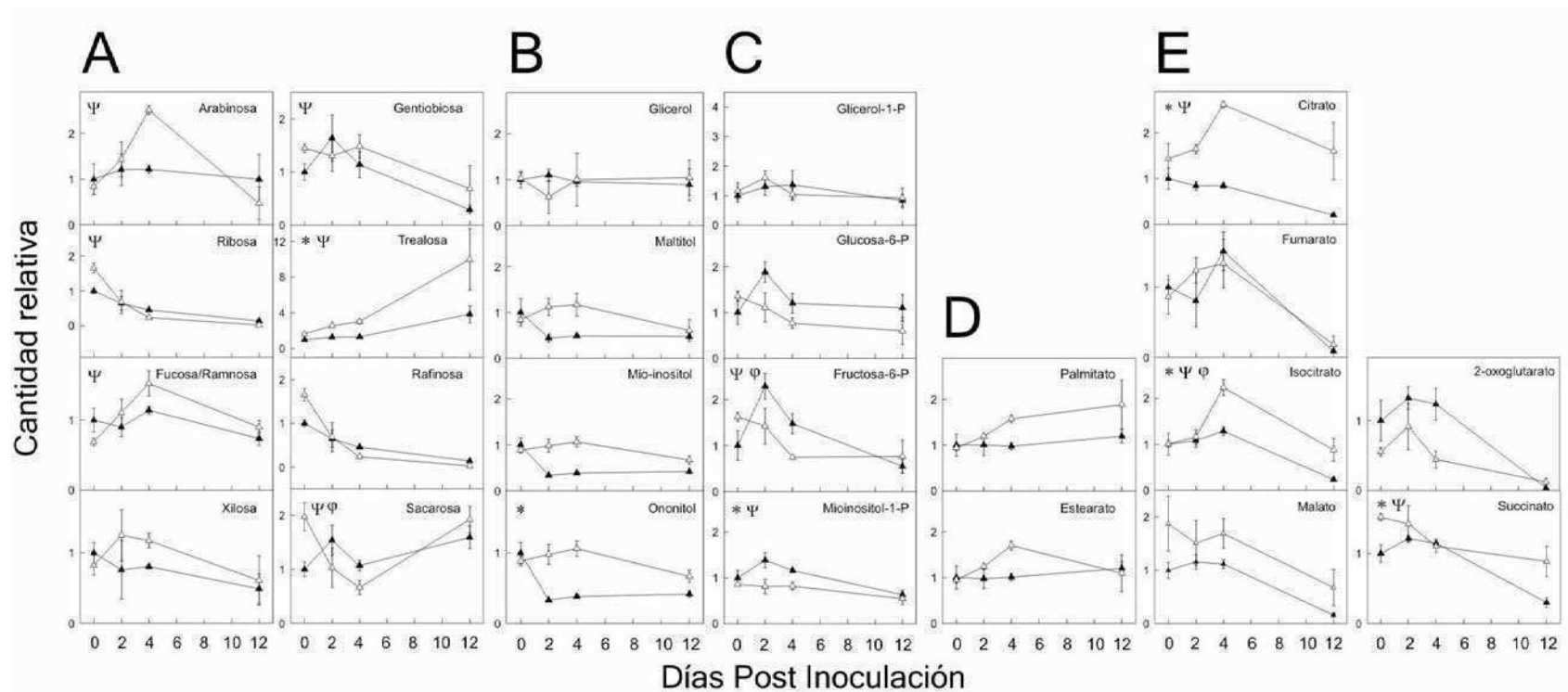


Figura 9. Perfiles metabólicos de flores de girasol a lo largo de la infección con *Sclerotinia sclerotiorum*. Contenido relativo de metabolitos de flores muestreadas a los 0, 2, 4 y 12 días post inoculación, Los contenidos de metabolitos fueron identificados y cuantificados por medio de GC-MS, y sus cantidades relativas fueron calculadas relativas al día 0 post-inoculación según lo descrito por Roessner-Tunali y col, (2003), Los gráficos muestran las cantidades relativas de **A**, azúcares solubles **B**, Polioles **C**, intermediarios fosfatados **D**, ácidos grasos **E**, ácidos del ciclo TCA, **F**, otros ácidos orgánicos **G**, aminoácidos, Los triángulos llenos y vacíos corresponden a los valores para la línea susceptible (HA89) y la línea resistente (RHA801) respectivamente, *, Ψ y φ indican efecto significativo del genotipo, de los días luego de la inoculación y de la interacción entre estos dos factores detectadas por un ANOVA de dos factores,

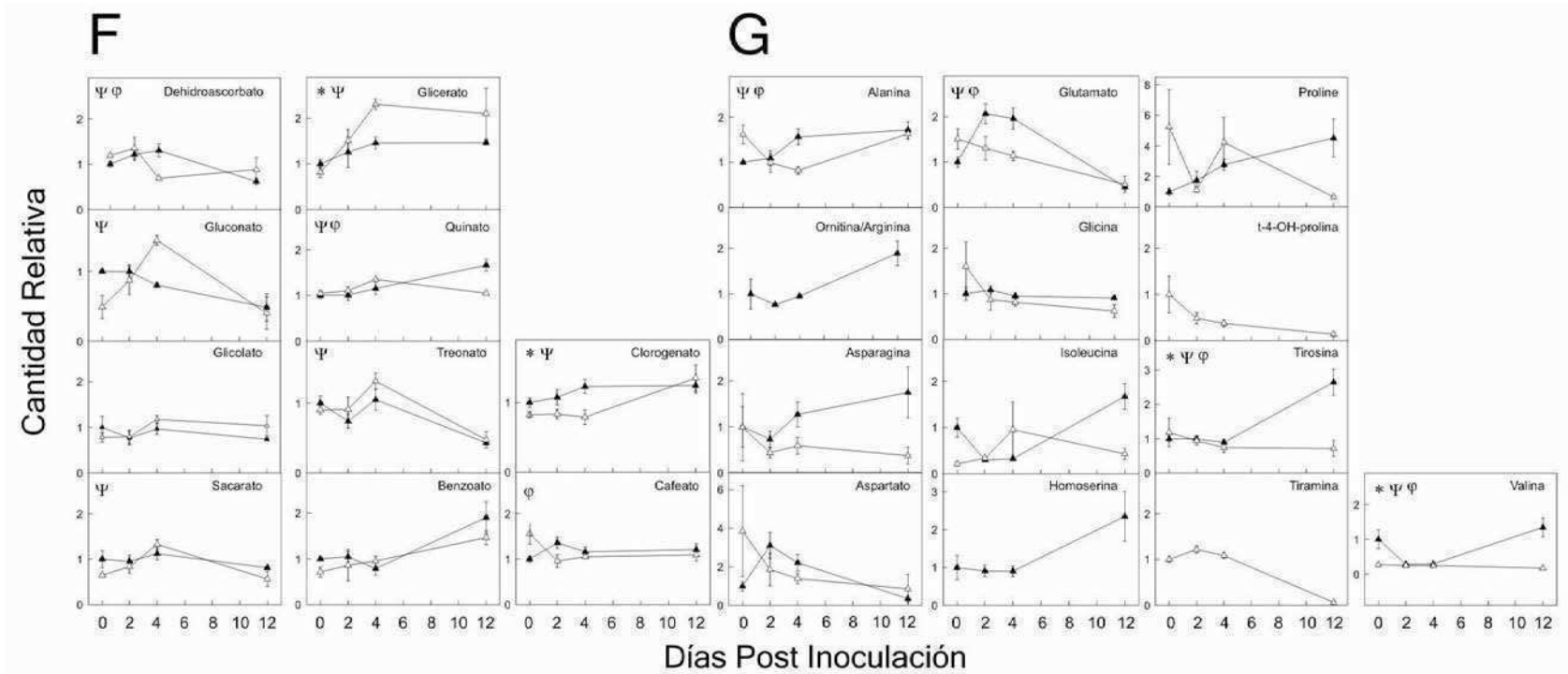


Figura 9. Perfiles metabólicos de flores de girasol a lo largo de la infección con *Sclerotinia sclerotiorum*, Contenido relativo de metabolitos de flores muestreadas a los 0, 2, 4 y 12 días post inoculación.

Los contenidos de metabolitos fueron identificados y cuantificados por medio de GC-MS, y sus cantidades relativas fueron calculadas relativas al día 0 post-inoculación según lo descrito por Roessner-Tunali y col, (2003), Los gráficos muestran las cantidades relativas de **A**, azúcares solubles **B**, Polioles **C**, intermediarios fosfatados **D**, ácidos grasos **E**. ácidos del ciclo TCA, **F**. otros ácidos orgánicos **G**. aminoácidos, Los triángulos llenos y vacíos corresponden a los valores para la línea susceptible (HA89) y la línea resistente (RHA801) respectivamente, *, Ψ y φ indican efecto significativo del genotipo, de los días luego de la inoculación y de la interacción entre estos dos factores detectadas por un ANOVA de dos factores.

Análisis de niveles de ácidos grasos

Los niveles de los ácidos orgánicos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) mostraron un patrón de cambio coordinado en las dos líneas, presentando varios de estos metabolitos un aumento a los días 2 o 4 post inoculación con una caída drástica a partir de entonces. El succinato, citrato e isocitrato son de particular interés debido a que presentaron niveles marcadamente elevados en la línea RHA801 (Figura 9E, Tabla anexa 1, 3 y 4). Para el contenido de isocitrato se observó una interacción significativa entre los efectos, observándose para la línea moderadamente resistente un incremento al día 4 post inoculación seguido de una disminución al día 12 post inoculación, mientras que para HA89 el único cambio detectado fue la disminución hacia el día 12 post inoculación (Tabla anexa 3). Además, cuando se compararon los dos líneas a los mismos tiempos post inoculación, se observó que la línea RHA801 contenía niveles significativamente mayores de isocitrato a los 4 y 12 días post inoculación (Tabla anexa 4). Los cambios del resto de los ácidos orgánicos mostraron un comportamiento mixto, constituyendo el día post inoculación el principal factor discriminante (Figura 9F). Se observaron diferencias significativas a los distintos tiempos post inoculación para los metabolitos gluconato, sacarato y treonato, mientras que ambos factores, días post inoculación y línea afectaron los contenidos del glicerato y clorogenato; el dehidroascorbato, quinato y t-cafeato mostraron interacciones significativas entre los dos factores estudiados. Los niveles de dehidroascorbato y t-cafeato no variaron debido al efecto del tratamiento en ninguna de las dos líneas, mientras que para el quinato sólo se observó un efecto del tratamiento para la línea HA89 mostrando un aumento hacia el día 12 post inoculación (Tabla anexa 1, 2, 3 y 4)

Análisis de niveles de aminoácidos

Los aminoácidos valina, tirosina y asparragina presentaron niveles más altos en la línea susceptible, además los dos primeros aminoácidos junto con alanina y glutamato presentaron interacciones significativas entre línea y días post inoculación (Figura 9G, Tabla anexa 1, 3 y 4)

En la Figura 8 se muestran los metabolitos que tuvieron efectos significativos para la línea (resultados en rojo y en azul)

4.1.4. Análisis de componentes principales (PCA) y Análisis jerárquico de Agrupamiento (conglomerados) (HCA) del complemento metabólico en las líneas moderadamente resistentes y susceptibles de girasol,

Dado que uno de los objetivos principales de este trabajo fue evaluar los complementos metabólicos de dos líneas de girasol con un grado de resistencia contrastante frente a la infección con *S. sclerotiorum*, se aplicaron análisis estadísticos multivariados al conjunto de datos combinados. El análisis de componentes principales (PCA) (Figura 10A) reveló que las muestras biológicas correspondientes a la línea susceptible HA89 se agruparon según el día post inoculación, y que el porcentaje de la varianza explicada por las dos primeras componentes, fue mayor al 70%. En el caso del línea moderadamente resistente (RHA801) solo se observó para las muestras correspondientes a los 0 DPI, mientras que a tiempos posteriores no se conformaron grupos claramente delimitados.

En un enfoque complementario, se realizó un análisis jerárquico de agrupamiento o de conglomerados (HCA) (Figura 10B). La aplicación de un análisis de conglomerados a las medias del nivel de cada metabolito para cada DPI, dio como resultado varias observaciones interesantes. Según este análisis, antes de la inoculación el complemento metabólico de la línea moderadamente resistente (RHA801) mostraba mayor similitud con el grupo conformado por la línea susceptible a los 0, 2 y 4 días post inoculación que con el grupo de muestras de la misma línea post-inoculación. Sin embargo, al poco tiempo de ser inoculadas, los representantes de la línea RHA801 se agruparon juntos (2 DPI y 4 DPI). Es interesante destacar que las muestras colectadas a los 12 días post inoculación de ambas líneas no muestran asociación con muestras a tiempos más tempranos (Figura 10B)

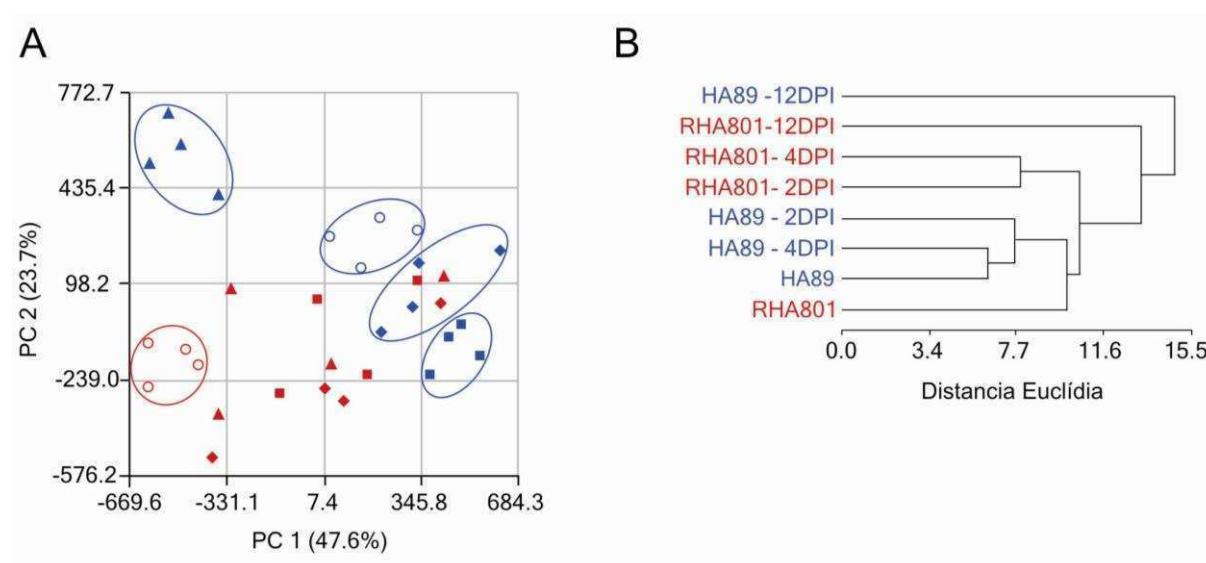


Figura 10. Análisis de Componentes Principales (PCA) y Análisis de Agrupamiento (HCA).

A. Análisis de Componentes Principales (PCA) de los perfiles metabólicos analizados en las flores de girasol. Los símbolos rojos y azules denotan las muestras de las líneas RHA801 y HA89 respectivamente. Los círculos vacíos corresponden a las muestras del día 0 post inoculación. Los triángulos, cuadrados y rombos corresponden a las muestras 2, 4 y 12 días post inoculación. PC: Componente Principal. Se representan los vectores 1 y 2 que incluyen el 71.3% de la variabilidad metabólica. **B.** Dendrograma obtenido a partir del Análisis de Agrupamiento (HCA) de los perfiles metabólicos analizados. Las distancias euclídeas entre categorías fueron calculadas utilizando los datos normalizados de los promedios de las medias de cada metabolito.

4.1.5. Análisis de correlación entre los niveles de metabolitos

El análisis de correlación entre pares de metabolitos dentro de cada línea involucró 989 comparaciones para HA89 y 928 RHA801. Un total de 109 y 175 mostraron un p-valor menor a 0,01 en la línea HA89 y RHA801 respectivamente. Este número es considerablemente mayor al que se hubiera esperado solamente por azar. De estos metabolitos solo 23 y 14 mostraron coeficientes de correlación negativos en la línea HA89 y RHA801 respectivamente. Sin embargo luego de la aplicación de la corrección estricta de Bonferroni, un total de 13 y 35 asociaciones resultaron significativas (α global=0,1) para las líneas HA89 y RHA801 respectivamente (Tabla anexa 5 y 6). Los resultados obtenidos por este análisis están representados en los análisis de conglomerados o *heatmaps* de la Figura 11 (A y B) y la Tabla anexa 5 y 6. Del total de las 284 correlaciones significativas, sólo 38 (menos del 40%) fueron compartidas entre ambas líneas, mientras que la mayoría de ellas

resultaron específicas específicas de cada línea. En efecto cuando los coeficientes de correlación fueron agrupados de acuerdo a la magnitud y naturaleza de la correlación utilizando el método de representación cartográfica descrito por Guimerà & Nunes Amaral (2005), pudieron observarse marcadas diferencias entre cada línea (Figura 11A y 11B). Se definieron 3 módulos de metabolitos para la línea moderadamente resistente (RHA801) y 4 módulos para la línea susceptible (HA89). Cada módulo se define como un subgrupo de metabolitos que poseía un mayor número de conexiones entre sí que con respecto a interacciones con metabolitos de otros grupos. Mientras que los módulos 4 de la línea HA89 y 3 de la línea RHA801 son esencialmente iguales, excepto por la presencia de la conexión con glicolato en la línea HA89, el resto de los módulos son cualitativa y cuantitativamente distintos entre las líneas. En la línea susceptible (HA89) la densidad de las líneas que cruzan la red circular conectando metabolitos, muestra que el número de conexiones tanto dentro como fuera de un módulo dado, es aproximadamente igual. Además, las conexiones entre los diferentes módulos están esencialmente representadas por correlaciones negativas (12 de 15 correlaciones significativas) (Figura 11A). Aunque la línea moderadamente resistente muestra un número total mayor de correlaciones en comparación con el susceptible, las conexiones entre módulos son claramente menores que las conexiones dentro de módulos y son todas positivas (Figura 11B). Mientras que los intermediarios del ciclo TCA 2-oxoglutarato, succinato, malato y el aminoácido glutamato son centros de múltiples conexiones en ambas líneas (Figura 11A y 11B, Tabla Anexa 5 y 6), otros metabolitos pueden ser considerados como centros de correlación línea-específicos (*hubs*). En el caso de la línea susceptible, por ejemplo, los aminoácidos isoleucina y homoserina, el ácido orgánico quinato y citrato y el monosacárido ramnosa están altamente conectados. Por el contrario en la línea moderadamente resistente los aminoácidos glicina y hidroxiprolina, los polioles manitol, glicerol y ononitol, el monosacárido arabinosa y la monoamina tiramina son los que se comportan como “centro” (*hub*) (Figura 11A y 11B). Estos análisis muestran una sincronización diferencial en el patrón metabólico de las células de las flores en las líneas evaluados

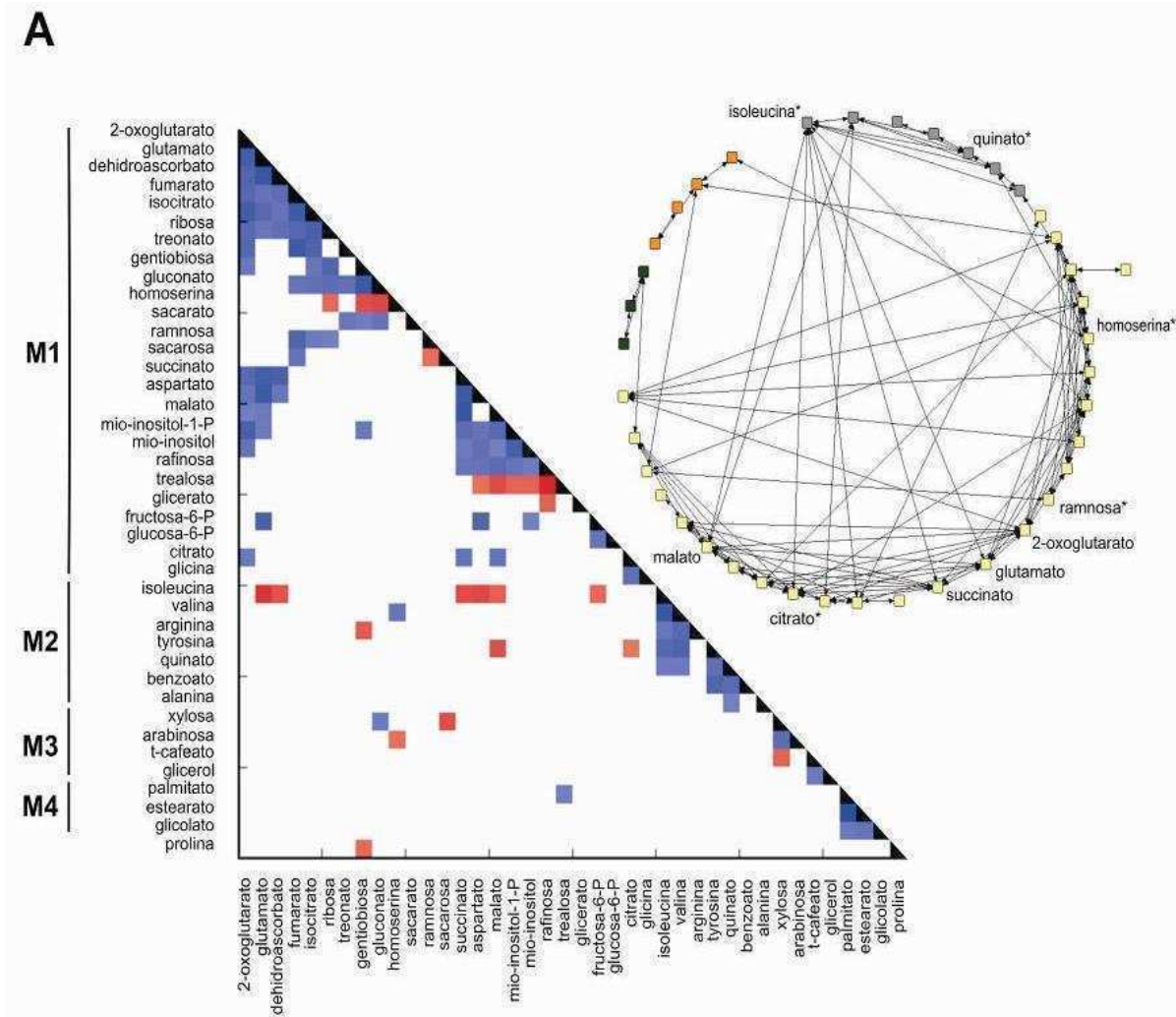


Figura 11. Visualización de las correlaciones significativas metabolito-metabolito ($p < 0,01$) (izquierda) y la representación circular de las redes (derecha) en dos líneas de girasol con comportamiento contrastante frente a *S. sclerotiorum*.

A. HA89 (susceptible) **B.** RHA801 (moderadamente resistente). Cada cuadrado del *heatmap* representa el coeficiente de correlación entre metabolitos. Los metabolitos fueron ordenados en concordancia con los módulos (M), Módulo 1 (M1) amarillo, módulo 2 (M2) gris, módulo 3 (M3) naranja y módulo 4 (M4) verde. Las líneas entre los módulos representan correlaciones significativas entre metabolitos. Los metabolitos marcados con un asterisco son los que fueron identificados como centros de correlación específicos de línea (*hubs*)

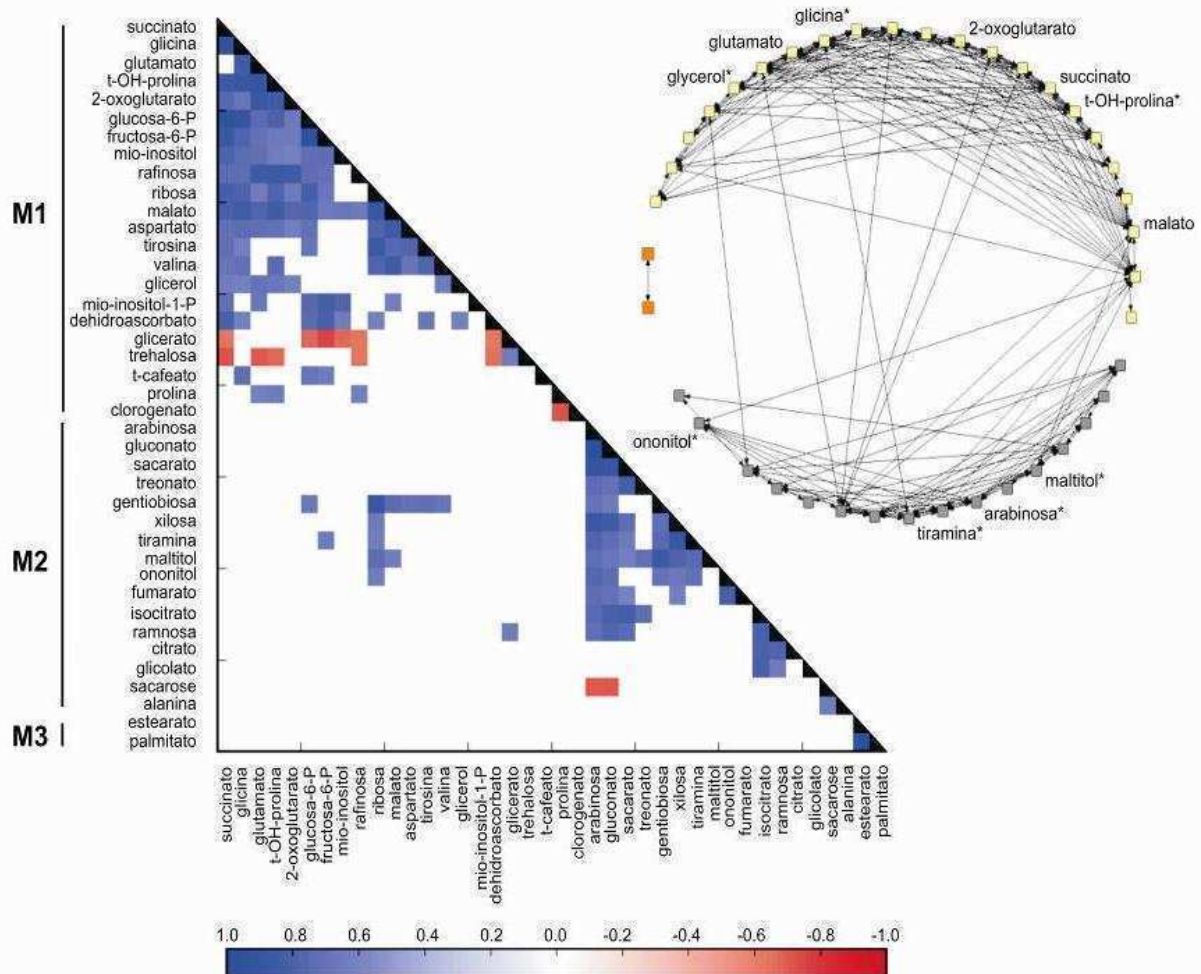
B

Figura 11. Visualización de las correlaciones significativas metabolito-metabolito ($p < 0,01$) (izquierda) y la representación circular de las redes (derecha) en dos líneas de girasol con comportamiento contrastante frente a *S. sclerotiorum*.

A. HA89 (susceptible) **B.** RHA801 (moderadamente resistente). Cada cuadrado del *heatmap* representa el coeficiente de correlación entre metabolitos. Los metabolitos fueron ordenados en concordancia con los módulos (M), Módulo 1 (M1) amarillo, módulo 2 (M2) gris, módulo 3 (M3) naranja y módulo 4 (M4) verde. Las líneas entre los módulos representan correlaciones significativas entre metabolitos. Los metabolitos marcados con un asterisco son los que fueron identificados como centros de correlación específicos de línea (*hubs*).

4.1.6. Medición de actividades enzimáticas.

Para corroborar si algunos de los cambios detectados en las diferentes vías metabólicas, tienen un correlato con diferencias en las actividades enzimáticas asociadas a dichas vías, se determinó la actividad de enzimas claves del metabolismo primario del carbono (sacarosa sintasa y las invertasas de pared celular, citológica y vacuolar), foto-respiración (catalasa) y del metabolismo de los fenilpropanoides (fenilalanina-amonio-liasa-PAL) a tiempos tempranos post inoculación (de 0 a 4 DPI) (Tabla 6).

Tabla 6. Actividades enzimáticas en flores de girasol de las líneas HA89 y RHA801.

Las actividades enzimáticas fueron determinadas en muestras de flores en los tiempos post-inoculación indicados. Los datos presentados son las medias \pm error estándar (SE) de las mediciones en 3 a 6 muestras independientes por línea. Las letras en rojo indican las diferencias significativas determinadas mediante una prueba T de student ($p < 0,05$) entre la muestra inoculada con agua (*mock*) y la muestra inoculada con *S. sclerotiorum*. nd: no detectado, -: no medido.

	Inoculado con agua (<i>mock</i>)				Inoculado		
	Días Post Inoculación						
	0	1	2	4	1	2	4
<i>Sacarosa Sintasa (nmol UDP-glu . min⁻¹ . mg proteína⁻¹)</i>							
HA89	8,59 \pm 0,78	-	-	9,34 \pm 0,56	-	-	9,42 \pm 0,96
RHA801	7,30 \pm 0,66	-	-	10,82 \pm 0,51	-	-	9,48 \pm 1,17
<i>Invertasa de Pared celular (μmol azúcares reductores . min⁻¹ . gDW⁻¹)</i>							
HA89	2,87 \pm 0,10	-	-	2,69 \pm 0,02	-	-	2,78 \pm 0,06
RHA801	2,75 \pm 0,03	-	-	2,35 \pm 0,10	-	-	2,41 \pm 0,15
<i>Invertasa citosólica (nmol azúcares reductores . min⁻¹ . mg proteína⁻¹)</i>							
HA89	0,51 \pm 0,01	-	-	0,20\pm0,01	-	-	0,28\pm0,02
RHA801	0,59 \pm 0,05	-	-	0,43 \pm 0,13	-	-	0,40 \pm 0,03
<i>Invertasa vacuolar (nmol azúcares reductores . min⁻¹ . mg proteína⁻¹)</i>							
HA89	1,13 \pm 0,05	-	-	0,50\pm0,02	-	-	0,67\pm0,04
RHA801	1,46 \pm 0,09	-	-	0,98 \pm 0,22	-	-	1,04 \pm 0,07
<i>Catalasa (Unidades . mg proteína⁻¹)</i>							
HA89	3,93 \pm 0,39	5,36 \pm 0,83	4,72 \pm 0,62	4,37 \pm 1,14	3,18 \pm 0,71	5,46 \pm 1,03	4,25 \pm 0,55
RHA801	2,64 \pm 0,64	2,51 \pm 0,32	2,57 \pm 0,27	1,88\pm0,22	3,61 \pm 0,61	2,38 \pm 0,32	5,65\pm1,21
<i>Fenilalanina amonio-liasa (nmol ácido cinámico . min⁻¹ . μg proteína⁻¹)</i>							
HA89	1,66 \pm 0,04	0,58 \pm 0,09	1,20 \pm 0,18	0,69 \pm 0,09	0,24 \pm 0,07	0,91 \pm 0,05	0,27 \pm 0,02
RHA801	0,63 \pm 0,01	0,65\pm0,05	nd	nd	0,34\pm0,08	0,11 \pm 0,02	nd

Se detectaron aumentos significativos en las actividades catalíticas de las invertasas vacuolar y citológica del 34% y 40 % respectivamente, cuando se compararon muestras inoculadas e inoculadas con agua (*mock*) al día 4 post inoculación en la línea susceptible (HA89). Sin embargo no se observaron diferencias en la línea moderadamente resistente (RHA801). No se observaron cambios en las actividades de las otras dos enzimas del catabolismo de la sacarosa (invertasas de pared celular y sacarosa sintasa) en ninguna de las dos líneas.

Con respecto a la actividad de catalasa (enzima degradadora de H₂O₂), se observó un aumento significativo en el línea moderadamente resistente (RHA801) al día 4 post inoculación, llegando a casi tres veces respecto de lo observado en las plantas inoculadas

con agua. Por el contrario, la actividad de PAL se redujo en un 50% a las 24 hs de la inoculación (1 DPI) en la línea moderadamente resistente respecto a su control inoculado con agua. No se observaron diferencias significativas en las actividades de estas dos enzimas en la línea susceptible (HA89) cuando se compararon las muestras inoculadas con el patógeno a los distintos días post inoculación y sus respectivos controles inoculados con agua.

4.2. Identificación de genes candidatos mediante análisis de perfiles transcripcionales y construcción de colecciones de ADNc substractivas

4.2.1. Extracción de ARN

Dada la necesidad de contar con ARN de alta calidad tanto para la construcción de colecciones de ADNc como para el estudio de perfiles transcripcionales por las técnicas de *northern blot*, RT-PCR (Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción Reversa) o PCR cuantitativa (qPCR), y considerando el alto contenido de polifenoles presente en los capítulos de girasol, se ensayaron distintos protocolos. Los métodos tradicionales de purificación de ARN así como los que incluyen extracción con el reactivo TRIzol (Invitrogen, EUA) y Qiagen RNeasy (Qiagen, Alemania) dieron como resultado ARN de color marrón difícil de resuspender y parcialmente degradado. En este trabajo se evaluaron los métodos de Chan y col. (2007), Daohong y col. (2004), Louime y col. (2008); Salzman y col. (1999), que fueron desarrollados para la extracción de RNA de tejidos vegetales con alto contenido de polifenoles. Los métodos de Chan y col. (2007), Daohong y col. (2004) a pesar de incluir PVP (polivinilpirrolidona) y agentes antioxidantes como el 2-mercaptoetanol y tiocianato de guanidinio en sus *buffers* de extracción dieron como resultado un ARN parcialmente degradado de color marrón y difícil de resuspender. El método de Salzman y col. (1999), con la modificación de utilizar fenol a pH ácido (pH 5,2) en lugar de básico, para evitar contaminaciones con ADN genómico, permitió obtener ARN con un buen rendimiento y de buena calidad, pero el protocolo es muy extenso (3 días).

Finalmente, la optimización del método descrito por Louime y col. (2008) (con modificaciones según se describe en la sección 4.2.1 de materiales y métodos) dio como resultado un ARN con un rendimiento entre 50 y 100 μg /gramo de tejido floral dependiendo del tratamiento, con una alta relación 260/280 (entre 1,8 y 2) y una relación 260/230 mayor a 2, indicando una mínima contaminación con proteínas, polisacáridos y polifenoles. Cuando se evaluó el ARN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para corroborar su integridad, las bandas correspondientes al ARN ribosomal de 28S y 18S pudieron observarse en forma nítida, la banda de ARNr 28S presentó una intensidad de aproximadamente el doble de la observada para la banda de ARNr 18S, indicando que el ARN obtenido no presentaba signos de degradación.

4.2.2. Evaluación de genes candidatos

A partir del análisis de las colecciones de ESTs (Fernández y col., 2003) desarrolladas previamente en el Instituto de Biotecnología (IB), se identificaron secuencias de genes que de acuerdo a sus posibles funciones habían sido descritas en otras especies como participes en la defensa frente a *S. sclerotiorum*: un gen que codifica un producto con similitud a una proteína de la familia de las proteínas del tipo germinas (*Germin-like protein*) con función probable de oxalato oxidasa /superóxido dismutasa (HaGLP1, AN: ABW89137), un inhibidor de poligalacturonasas (IP, AN: ABW89507) y una proteína de transferencia de lípidos (LTP1, AN: AAL27855).

Se analizó por la técnica de *northern blot* el perfil de la abundancia de estos 3 transcritos en botones florales (estadios R1, R2 y R3 según Schneider & Miller, 1981) en las líneas moderadamente resistentes RHA275, RHA801 y HA853, y en la línea susceptible HA89. Se observaron diferencias en los niveles endógenos de HaGLP1 e IP en los distintos líneas y entre los tres estadios de desarrollo floral analizados, mientras que para el gen LTP1 los niveles de expresión no mostraron diferencias entre líneas ni entre los distintos estadios del desarrollo floral (Figura 12A).

Luego se seleccionaron los genes HaGLP1 y LTP1 para llevar a cabo análisis de perfiles transcripcionales en capítulos de girasol desafiados con *S. sclerotiorum*, de líneas con distinto comportamiento frente al patógeno. El gen HaGLP1 fue elegido debido a que era un candidato fuerte según la literatura (Berna & Bernier, 1997; Burke & Rieseberg, 2003; Donaldson y col., 2001; Hu y col., 2003; Liang y col., 2001; Livingstone y col., 2005; Thompson y col., 1995) a estar implicado en la respuesta frente a *S. sclerotiorum* y el Gen LTP1 porque además de estar implicado en la respuesta al patógeno (Regente y col., 1997; Regente & de la Canal, 2000 y 2003) en el laboratorio se estaban llevando a cabo, en paralelo, estudios para la caracterización de su promotor.

Las líneas RHA275 y RHA801 mostraron un nivel constitutivo y una inducción temprana del nivel de HaGLP1 en capítulos de girasol analizados a distintos tiempos post inoculación (0, 2, 4 y 12 DPI), mientras que en la HA89, la inducción fue más tardía en el proceso infectivo (Figura 12B). Sin embargo para el gen de LTP1 los niveles se mantuvieron constantes a lo largo de todo el proceso infectivo (datos no mostrados).

A su vez se estudió la existencia de diferencias entre los niveles de estos dos transcritos entre flores de capítulos inoculados con el patógeno e inoculados con agua (NI, no infectadas o *mock*) a los mismos tiempos post inoculación en dos ambientes diferentes mediante la técnica de *northern blot* y PCR en tiempo real (qPCR). Para LTP1 no se detectaron diferencias en sus niveles de expresión entre flores infectadas y no infectadas (NI, inoculadas con agua) a los días 2 y 4 días post inoculación para ninguna de las dos líneas provenientes del ensayo de Castelar, ni tampoco para las muestras de la línea RHA801 provenientes del ensayo de EEA-INTA Balcarce, sin embargo la línea HA89 muestra un mayor nivel de LTP1 al momento de ser inoculada (día 0). Para la línea RHA801 tampoco se observaron diferencias significativas entre los tratamientos cuando se analizaron las muestras provenientes del ensayo de Castelar por la técnica de PCR en tiempo real (Figura 12C y Tabla 7)

Si bien por la técnica de *northern-blot* no fue posible detectar expresión de HaGLP1 en flores, cuando se realizó el análisis por la técnica de qPCR para las muestras de la línea

RHA801, provenientes del ensayo de Castelar, sí se pudo realizar la cuantificación por qPCR, no observándose diferencias significativas para este transcrito entre muestras inoculadas con patógeno y con agua a los distintos días post inoculación (Tabla 7). Estos resultados indican que HaGLP1 tiene baja expresión en las flores maduras a diferencia de lo encontrados en botón floral.

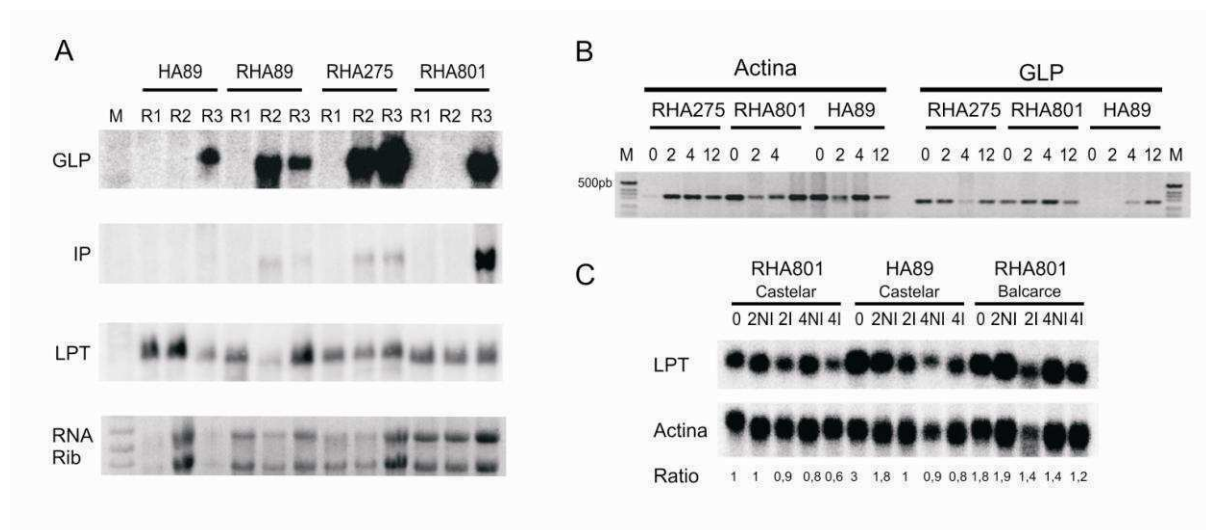


Figura 12. Análisis de expresión basado en abundancia de transcritos en líneas de girasol endocriadas moderadamente resistentes (RHA275, RHA801, HA853) y susceptible (HA89).

A. Northern Blot: Hibridación con sondas radioactivas específicas correspondientes al gen de HaGLP1, IP y LTP1 en botón floral en los estadios de desarrollo R1, R2 y R3 (Schneider & Miller, 1981). **B. RT-PCR:** Análisis de expresión de los transcritos correspondiente HaGLP1 y actina en capítulos de girasol a los 0, 2, 4 y 12 días post inoculación. **C. Northern Blot:** Hibridación con sondas radioactivas específicas correspondientes al gen LTP1 y actina en capítulos de girasol inoculados (I) o inoculados con agua (NI) a los 0, 2 y 4 días post inoculación. M: Marcador de de peso molecular.

Tabla 7. Medición de los niveles de HaGLP1 y LTP1 por qRT-PCR en la línea RHA801 proveniente del ensayo de Balcarce.

Se utilizó como gen de referencia actina. El índice de cambio o *change fold* en cada caso fue referido al día post inoculación indicado en la columna control. $p < 0,005$

Gen	Eficiencia	control	Blanco	R	Change fold	P-valor
HaGLP1	1,897	D0	D2NI	0,82	-0,28630419	0,2396
		D0	D4NI	0,74	-0,43440282	0,1887
		D0	D2I	1,71	0,77399633	0,2383
		D0	D4I	0,93	-0,10469738	0,4043
		D2NI	D4NI	0,9	-0,15200309	0,3734
		D2NI	D2I	2,09	1,06350294	0,1939
		D2NI	D4I	1,13	0,17632277	0,3538
		D4NI	D2I	2,32	1,21412481	0,1667
		D4NI	D4I	1,25	0,32192809	0,2773
LTP	1,886	D0	D2NI	0,79	-0,34007544	0,3724
		D0	D4NI	0,53	-0,91593574	0,2028
		D0	D2I	0,43	-1,21759144	0,1336
		D0	D4I	0,31	-1,68965988	0,1024
		D2NI	D4NI	0,67	-0,577767	0,1441
		D2NI	D2I	0,54	-0,88896869	0,1321
		D2NI	D4I	0,39	-1,35845397	0,0621
		D4NI	D2I	0,81	-0,30400619	0,3349
		D4NI	D4I	0,59	-0,76121314	0,1248

4.2.3. Construcción de colecciones de ADNc

Con el objetivo de identificar genes específicos de respuesta temprana a *S. sclerotiorum*, se construyeron 4 colecciones de ADNc mediante la técnica de hibridación substractiva (SSH) a partir de flores tubulares de la línea RHA801 inoculadas e inoculadas con agua a los días 2 y 4 post inoculación. Las colecciones realizadas fueron:

A. Colección D2I-NI: colección de ADNc de flores a los 2DPI inoculadas con *S. sclerotiorum* fue arrestada contra el ADNc de flores a los 2 DPI inoculadas con agua.

B. Colección D2NI-I: colección de ADNc de flores a los 2DPI inoculadas con agua fue arrestada con ADNc de flores a los 2DPI inoculadas con *S. sclerotiorum*.

C. Colección D4I-NI: colección de ADNc de flores a los 4DPI inoculadas con *S. sclerotiorum* fue arrestada contra el ADNc de flores a los 4DPI inoculadas con agua.

D. Colección D4NI-I: colección de ADNc de flores a los 4DPI inoculadas con agua fue arrestada con ADNc de flores a los 2DPI inoculadas con *S. sclerotiorum*.

Las secuencias identificadas para cada clonoteca junto con su correspondiente BlastX, su término asociado por anotación GO y código de identificación enzimático asociado (EC) se muestran en las Tablas anexas 7, 8, 9 y 10.

A. Colección D2I-NI

El objetivo de la construcción de esta colección fue identificar genes que se sobre-expresan a las 48 hs de producida la infección de por *S. Sclerotiorum*. Se obtuvieron un total de 134 clones recombinantes, de los cuales 88 resultaron secuencias únicas. Dentro de estos, el 19% son secuencias que no presentan similitud significativa contra ninguno de los accesos depositados en la base de datos de proteínas del NCBI. Dentro de este grupo, sólo el 25% presenta similitud con secuencias depositadas en la base de datos de ESTs de girasol (*Helianthus annuus Gene Index, HaGI*, Dana Farber Cancer Institute T.G.I.P., siendo el 75% restante genes no descritos previamente para girasol. Al 69.3% de los clones únicos el algoritmo Blast2GO le asignó al menos un término GO, de los cuales el 36 % poseía un código enzimático (EC) asociado (Tabla anexa 7). En la Figura 13A se grafica el análisis de clasificación según el proceso biológico. De acuerdo con esta clasificación, la mayoría de los genes que se expresaron diferencialmente por la acción del patógeno están involucrados en procesos de traducción de proteínas. El segundo grupo en importancia está constituido por 9 secuencias (9D2I-IN, 36I-NI, 77D2I-NI, 82I-NI, 93I-NI, 97I-NI, 116N2I-NI, 118I-IN, 126I-NI) de respuesta a estreses tanto abióticos como bióticos, entre los que se encuentran peroxidasa, subunidad 4 del proteosoma 26s, quitinasa clase IV, GDP-L-galactosa fosforilasa, LTP, glutatión-s-transferasa, enzima de biosíntesis de tiasol, endopeptidasa multicatalítica de la subunidad β del proteosoma.

B. Colección D2NI-I

Esta colección se construyó con el fin de identificar los genes cuya expresión está reducida por la acción del patógeno *S. sclerotiorum* a las 48 hs de producida la infección. Se obtuvo un total de 81 clones, de los cuales 75 fueron secuencias únicas. El algoritmo Blast2GO logró asignar al menos un término GO al 67% de estas secuencias únicas, mientras que al 22% también pudo asignar un código enzimático (EC) asociado. Por otro lado, 25 de estas secuencias, representando el 32% de las secuencias únicas, no presentaban similitud con secuencias proteicas depositadas en la base de datos del NCBI, ni en la base de datos de ESTs de del Girasol (Tabla anexa 8). En la Figura 13B se grafica la clasificación de estas secuencias según el proceso biológico en el cual están implicadas. De acuerdo a esta clasificación los genes cuya expresión se ve afectada por la inoculación con el patógeno estarían involucrados tanto en los procesos biológicos del metabolismo de proteínas como en los procesos de generación de precursores de metabolitos y energía. Asimismo, se detectó un grupo de 10 secuencias que codifican para genes involucrados en respuestas a estreses (3D2NI-I, 4D2NI-I, 22D2NI-I, 34 D2NI-I, 39D2NI-I, 41 NI-I, 50NI-I, 69 D2NI-I, 72 NI-I) entre los que se encuentran 2 tipos de defensinas, proteína ribosomal 40S, proteínas de tipo *heat shock*, ribonucleosido-difosfato reductasas, proteínas tipo *f-box*, proteína *ras-related gtp-binding*.

C. Colección D4I-NI

En esta clonoteca se identificaron los genes que se sobre expresan a los 4 días de la inoculación en respuesta a *S. sclerotiorum*. De los 746 clones secuenciados 446 fueron secuencias únicas, de las cuales el 16 % no poseen función conocida (Tabla anexa 9). Al

81% (362) de estas secuencias se le asignó un término GO por medio del algoritmo Blast2GO, a su vez el 45 % (116) tuvieron una función enzimática (EC) asociada.

Los genes involucrados en los procesos biológicos de traducción de proteínas, proteólisis y oxidorreducción fueron los más numerosos inducidos, así como los involucrados en distintas respuestas a estreses (Figura 13C y Tabla Anexa 9). A este grupo pertenecieron 31 clones (2D4I-NI, 16D4I-NI, 49D4I-NI, 57D4I-NI, 82D4I-NI, 88D4I-NI, 90D4I-NI, 102D4I-NI, 111D4I-NI, 262D4I-NI, 276D4I-NI, 277I-NI, 365I-NI, 344I-NI, 360D4I-NI, 404D4I-NI, 419D4I-NI, 487D4I-NI, 505D4I-NI, 507D4I-NI, 537D4I-NI, 548D4I-NI, 553D4I-NI, 560D4I-NI, 606D4I-NI, 623D4I-NI, 627D4I-NI, 678D4I-NI, 691D4I-NI, 712D4I-NI). Entre ellos hay clones que codifican para genes involucrados en respuestas a estrés oxidativo, en las vías del ácido jasmónico, salicílico, ABA y genes involucrados en respuesta a hongos como LTPs, defensinas y una *dynamain related protein*.

Por otro lado, de acuerdo al número de genes identificados, las vías metabólicas más afectadas fueron el ciclo de las pentosas fosfato, el metabolismo de los ácidos grasos, y la síntesis de ácido jasmónico.

D. Colección D4 NI-I

La construcción de esta colección permitió identificar los genes cuya expresión se reduce por la infección del patógeno *S. sclerotiorum* a los 4 días post inoculación. Del total de 527 clones secuenciados, 295 correspondieron a secuencias únicas, de las cuales el 14,3 % no poseen similitud con las secuencias proteicas depositadas en la base de datos del NCBI, ni en la base de datos de ESTs de girasol. El 72% de estas secuencias fueron anotadas asignándosele uno o varios términos GO. De las 212 secuencias anotadas, sólo al 18,7% se le asignó una función enzimática. La lista de clones correspondientes a esta colección se encuentra detallada en la Tabla anexa 10 junto con su descripción. En la figura 13D se representa la distribución de estos clones según el proceso biológico en el cual están involucrados. Entre las categorías más afectadas debido a la infección del patógeno se encuentran la traducción de proteínas, los procesos de oxidoreducción, los procesos de transducción de señales y de respuesta a diferentes estreses. Esta última categoría, está compuesta por 27 clones que fueron clasificados como de respuesta a estreses (2D4NI-I, 11D4NI-I, 43D4NI-I, 83D4NI-I, 104D4NI-I, 111D4NI-I, 116D4NI-I, 138D4NI-I, 156D4NI-I, 148D4NI-I, 158D4NI-I, 161D4NI-I, 193D4NI-I, 226D4NI-I, 296D4NI-I, 301D4NI-I, 329D4NI-I, 374D4NI-I, 381D4NI-I, 399D4NI-I, 400D4NI-I, 401D4NI-I, 480D4NI-I, 493D4NI-I, 494D4NI-I, 517D4NI-I, 530D4NI-I). Entre ellos hay secuencias correspondientes a genes que están involucrados en respuesta a hormonas como ácido jasmónico, ácido salicílico y auxina, genes que han sido vinculados con estrés biótico como los de respuesta a heridas, quitinasas y a estreses abióticos. Las vías metabólicas más afectadas por la presencia del patógeno fueron las involucradas en la biosíntesis de metabolitos secundarios, como flavonoides y fitohormonas, las del catabolismo de fenilpropanoides, y la fotosíntesis.

A

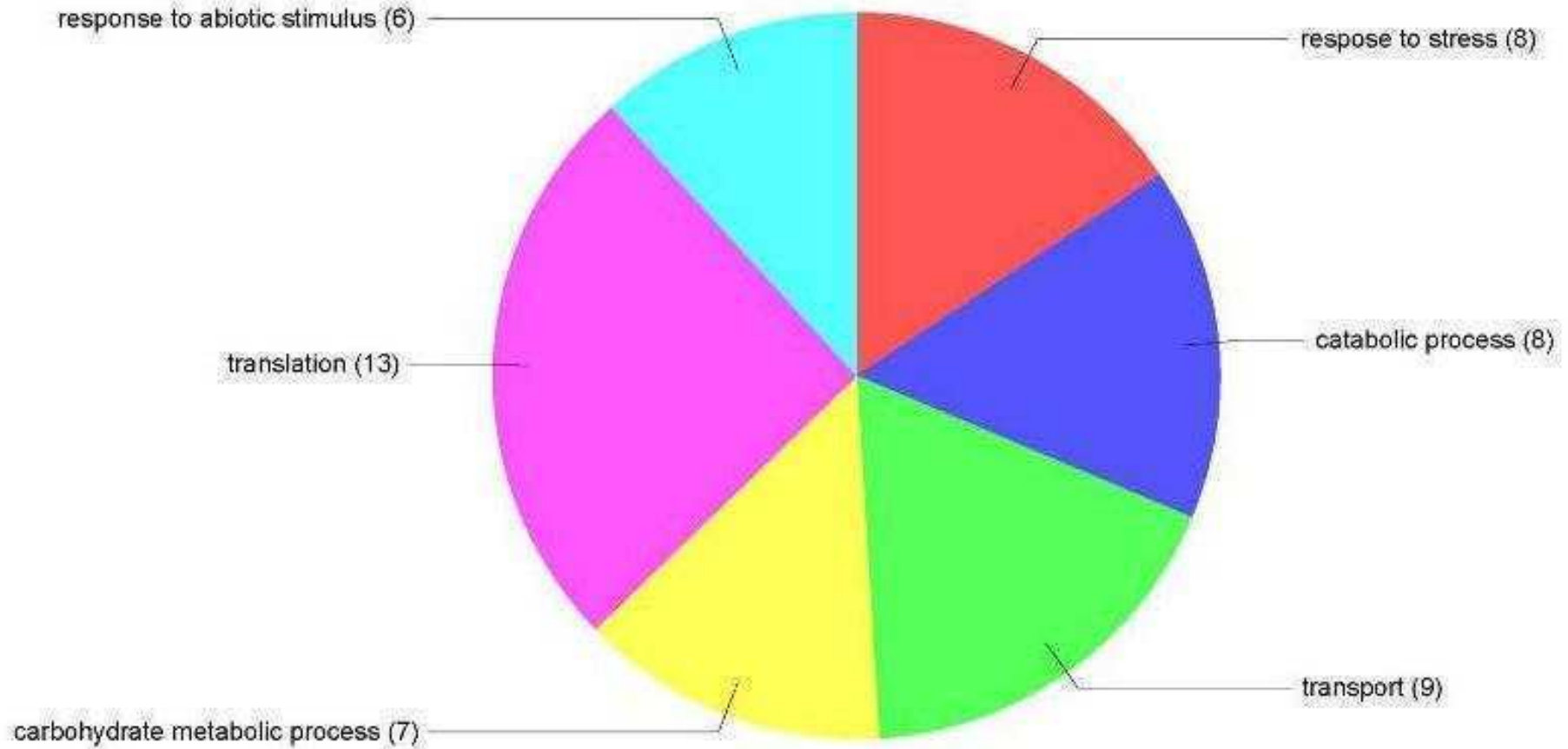


Figura 13. Distribución de secuencias según GO por proceso biológico para las cuatro colecciones de ADNc generadas. A.D2I-NI. B. D2NI-I. C. D4I-NI. D.D4NI-I. Entre paréntesis se asigna el número de secuencias pertenecientes a cada categoría. El nombre de cada categoría corresponde a la nomenclatura de la salida original del programa Blast2GO.

B

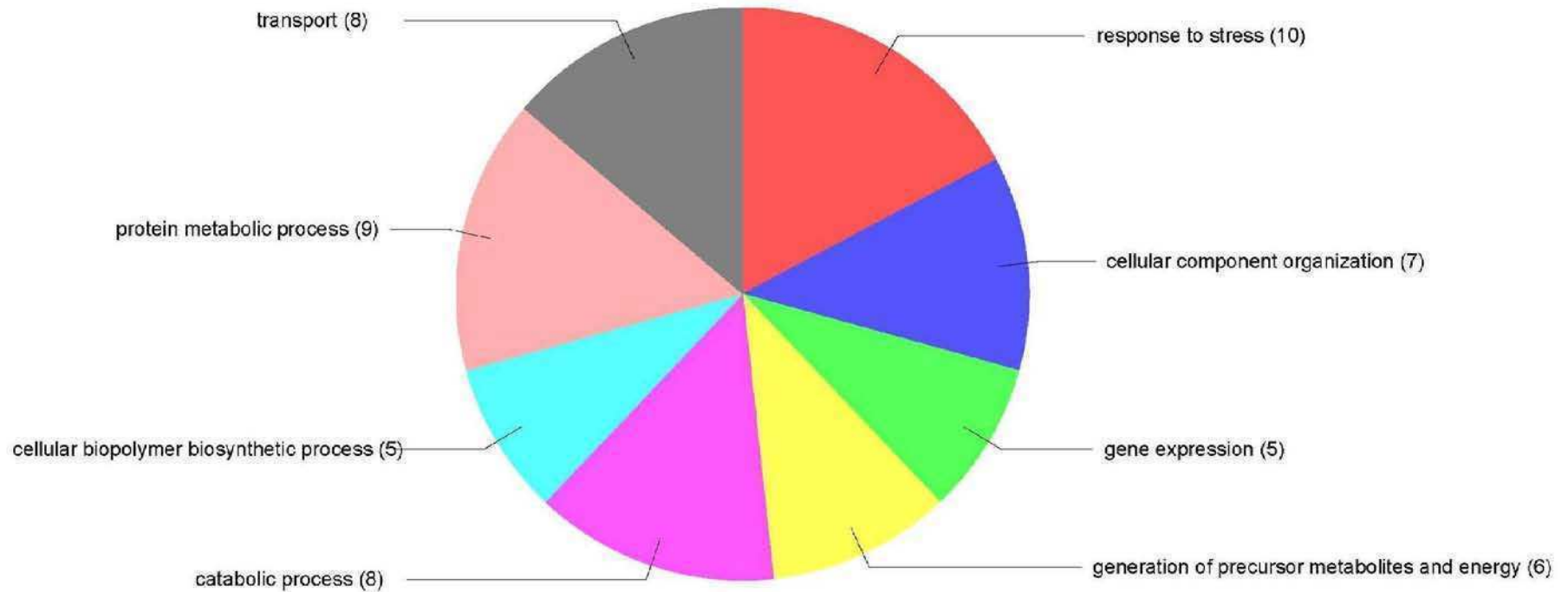


Figura 13. Distribución de secuencias según GO por proceso biológico para las cuatro colecciones de ADNc generadas.

A.D2I-NI. **B.** D2NI-I. **C.** D4I-NI. **D.**D4NI-I. Entre paréntesis se asigna el número de secuencias pertenecientes a cada categoría. El nombre de cada categoría corresponde a la nomenclatura de la salida original del programa Blast2GO.

C

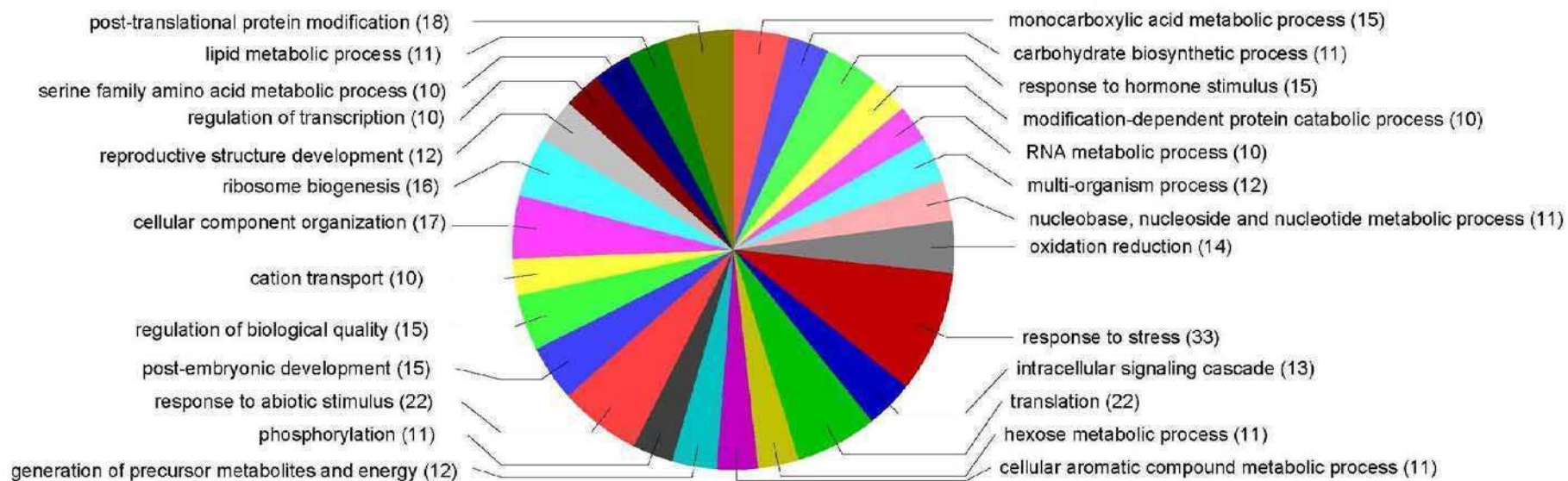


Figura 13. Distribución de secuencias según GO por proceso biológico para las cuatro colecciones de ADNc generadas. A. D2I-NI. B. D2NI-I. C. D4I-NI. D. D4NI-I. Entre paréntesis se asigna el número de secuencias pertenecientes a cada categoría. El nombre de cada categoría corresponde a la nomenclatura de la salida original del programa Blast2GO.

D

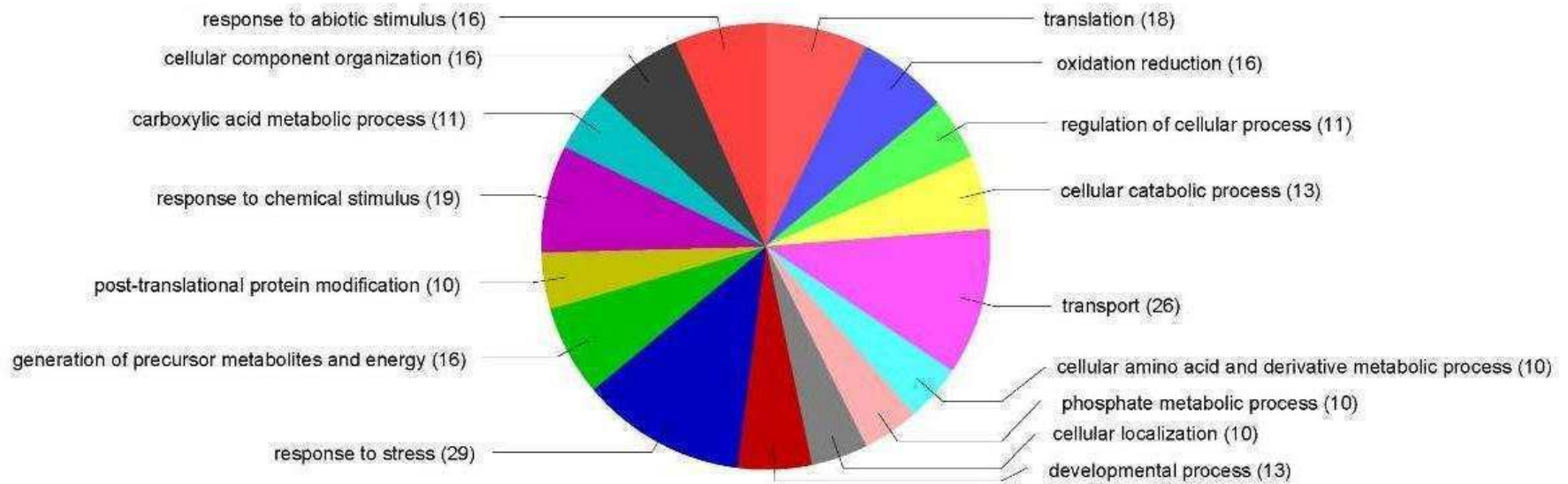


Figura 13. Distribución de secuencias según GO por proceso biológico para las cuatro colecciones de ADNc generadas. A.D2I-NI. B. D2NI-I. C. D4I-NI. D.D4NI-I. Entre paréntesis se asigna el número de secuencias pertenecientes a cada categoría. El nombre de cada categoría corresponde a la nomenclatura de la salida original del programa Blast2GO.

4.2.4 Estudios de perfiles de expresión por técnicas de PCR cuantitativa (qRT-PCR)

4.2.4.1. Evaluación de seis genes de referencia para ser utilizados en el método de cuantificación relativa.

Debido a que se ha demostrado que ningún gen de mantenimiento (*housekeeping*) es universal para ser utilizado como gen de referencia en los estudios de expresión por qRT-PCR (Vandesompele y col., 2002), se evaluó la estabilidad de 6 de ellos en flores y receptáculos de girasol (Ciclofilina (ABV26711), Factor de Elongación 1 α (AY094064), Tubulina (AF401481), Actina (AAF82805), RNA Ribosomal 18S (AF107577), GAPDH (BAJ17660). El análisis de cuantificación de la expresión mostró que los genes Ciclofilina (ABV26711), Factor de Elongación 1 α (AY094064), Actina (AAF82805) y GAPDH (BAJ17660) son estables en ambos tejidos a lo largo del progreso de la enfermedad y se observó que no había efecto debido al órgano (Tabla 8).

Tabla 8. Comparación de la estabilidad de expresión de distintos genes de referencia entre órganos del capítulo y días post (DPI) utilizando un análisis de varianza de dos factores (ANOVA).

Se consideraron dos niveles para el factor órgano (receptáculo y flores) y tres niveles fueron utilizados para el factor DPI (0, 2, 4). Df: grados de libertad; MS: cuadrados medios.

	Efecto	df	MS	df	MS	F	p-valor
	Efecto	Efecto	Efecto	Error	Error		
GDHA	Organo	1	9,56882E-06	18	0,063546807	0,000150579	0,990344346
	DPI	2	0,042954531	18	0,063546807	0,675951064	0,521122277
	Interacción	2	0,013602587	18	0,063546807	0,214056194	0,809328616
Actina	Organo	1	0,044212531	18	0,125870943	0,351252884	0,560777426
	DPI	2	0,101629548	18	0,125870943	0,807410717	0,461522967
	Interacción	2	0,140283331	18	0,125870943	1,114501357	0,349689275
Factor de Elongación -1α	Organo	1	0,000353088	18	0,052038349	0,006785146	0,935259998
	DPI	2	0,085108891	18	0,052038349	1,635503292	0,222515479
	Interacción	2	0,052246593	18	0,052038349	1,004001737	0,386027962
Cyclophiline	Organo	1	0,127104387	18	0,042940047	2,960043192	0,102490373
	DPI	2	0,021695271	18	0,042940047	0,505245626	0,611663401
	Interacción	2	0,022012912	18	0,042940047	0,51264292	0,607395828

4.2.4.2 Validación de genes candidatos

Con el fin de validar las clonotecas diferenciales obtenidas se sintetizó ADNc a partir de los ARNs de las muestras que habían sido utilizadas para su construcción. En ninguna de ellas se observó contaminación con ADN al someterlas a amplificación mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos para Actina. (Figura 13A).

Se seleccionaron un total de 25 secuencias de las distintas colecciones correspondientes a genes descritos como involucrados en respuesta a patógenos necrotrofos, 2 de la clonoteca D2I-NI (116I-NI, 118D2I-NI), 16 de la clonoteca D4I-NI (9D4I-NI, 18D4I-NI, 88D4I-NI, 102D4I-NI, 201D4I-NI, 222D4I-NI, 334D4I-NI, 360D4I-NI, 407D4I-NI, 505D4I-NI, 537D4I-NI, 548D4I-NI, 581D4I-NI, 627D4I-NI, 684D4I-NI, 712D4I-NI, 728D4I-NI) y 6 de la clonoteca

D4NI-I (114D4NI-I, 191D4NI-I, 222D4NI-I, 271D4NI-I, 286D4NI-I, 456D4NI-I). En las Tablas anexas 7, 9 y 10 se encuentran las descripciones de cada una de estas secuencias. De estos 25 oligonucleótidos, sólo 16 dieron productos de amplificación con eficiencias entre 1.8 y 2 y curvas de disociación sin la presencia de dímeros. En la figura 13 B y C se muestra a modo de ejemplo una curva de disociación y un gráfico de la magnitud de señal fluorescente generada en casa ciclo (dRn) vs ciclo para 5 diluciones seriadas al décimo correspondientes a un gen de defensina (18D4I-NI, AN: P22357).

A



B

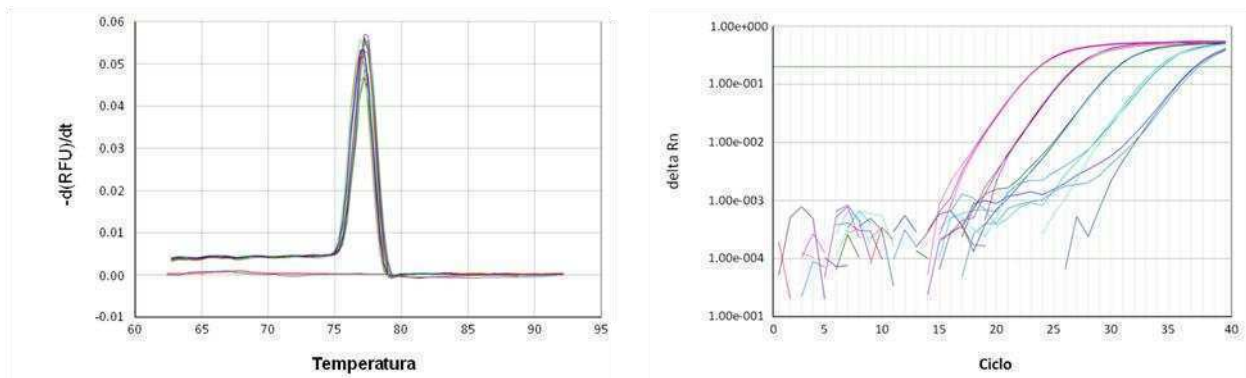


Figura 14. RT-PCR cuantitativa (qPCR).

A. Chequeo por PCR de los ARNs tratados con DNAsa, se amplificó el gen de referencia actina. **B.** Curva de disociación para el gen defensina (118D4I-NI, AN P22357) **C.** Grafico de dRn vs ciclo para diluciones seriadas al décimo para el gen defensina (1, 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000). M: marcador de peso molecular, D0: día cero, D2 y D4: días 2 y 4 post inoculación respectivamente. I: Inoculado con *S. sclerotiorum*, NI: inoculado con agua (*mock*). C+: control positivo de PCR

Los genes 118D2I-NI (*Chitinase* AN: ABJ74186) y 222D4I-NI (*Ethylene responsive element*, AN: XP_002275892) exhibieron diferencias en los patrones de expresión entre las réplicas biológicas dentro y entre tratamientos. Debido a que los niveles de estos genes presentaban mucha variación dentro de cada tratamiento no se calculo el R según la fórmula de Pfaffl (2001) para cada tratamiento como para el resto de los genes, sino que se calculó el nivel de cada gen para cada muestra individual (Figura 15A). Para el gen quitinasa (118D2I-NI) no se detectó expresión o los niveles fueron bajos para las muestras a los días 0, 2 y 4 Post inoculación de las muestras inoculadas con agua (NI), con la excepción de una sola muestra para el día 2 (D2NI.3), mientras que se observo una inducción de este gen en algunas de las muestras a los días 2 y 4 post inoculación de las muestras inoculadas con *S. sclerotiorum* (I) (Figura 15A). Para el gen Elemento de respuesta a etileno (222D4I-NI) se observó un marcado aumento en los niveles de expresión en algunas muestras al día 2 post inoculación. Por otro lado en aquellas réplicas en las que se expresaba 118D2I-NI (Quitinasa) los niveles de 222 D4I-NI (Elemento de respuesta a Etileno) eran muy bajos.

Para el resto de los genes analizados, las replicas biológicas dentro de cada tratamiento mostraron un comportamiento similar sin observarse diferencias significativas entre las flores inoculadas con *S. sclerotiorum* y las inoculadas con agua a los dos tiempos post-inoculación evaluados (Tabla 9). A pesar de lo observado para los genes de quitinasa y el elemento de respuesta a etileno ninguno de los genes testeados dio diferencias significativas entre las flores inoculadas con *S. sclerotiorum* y las inoculadas con agua a los dos tiempos post-inoculación evaluados (Tabla 9).

Tabla 9. Medición de los niveles transcripcionales de los distintos genes seleccionados para la validación de las clonotecas por RT-PCR cuantitativa.

D2NI y D4NI: flores control inoculados con agua a los 2 y 4 días post inoculación respectivamente, D2I y D4I: flores a los 2 y 4 días post inoculación respectivamente. Se utilizó como gen de referencia a actina. El índice de cambio o *change fold* a los 2 y 4 días post inoculación fue referido al control de cada día. $p < 0.005$.

Gen	Eficiencia	control	Blanco	R	Change fold	P-valor
9D4I-NI_Isoformab	1,904	D2NI	D2I	3,066	1,616	0,131
		D4NI	D4I	0,351	-1,511	0,120
18D4I-NI_Defensina	2,024	D2NI	D2I	0,580	-0,786	0,204
		D4NI	D4I	0,580	-0,786	0,211
88D4I-NI_AP2	1,939	D2NI	D2I	1,234	0,303	0,199
		D4NI	D4I	0,650	-0,621	0,151
201D4I-NI_Citocromo P450	1,865	D2NI	D2I	2,249	1,169	0,316
		D4NI	D4I	1,083	0,115	0,445
222D4I-NI_Respuesta a etileno	1,913	D2NI	D2I	1,844	0,883	0,287
		D4NI	D4I	1,402	0,487	0,234
334D4I-NI_O-metiltransferasa	1,874	D2NI	D2I	1,759	0,815	0,234
		D4NI	D4I	0,980	-0,028	0,484
407D4I-NI_hsp70	1,947	D2NI	D2I	1,139	0,187	0,449
		D4NI	D4I	1,007	0,010	0,494
548D4I-NI_LTP	1,886	D2NI	D2I	0,540	-0,889	0,132
		D4NI	D4I	0,590	-0,761	0,125
581D4I-NI_Cisteina proteasa	1,857	D2NI	D2I	1,875	0,907	0,202
		D4NI	D4I	1,777	0,829	0,124
728D4I-NI_Aldo-keto oxidasa	1,865	D2NI	D2I	1,930	0,949	0,288
		D4NI	D4I	0,900	-0,152	0,438
627D4I-NI_3-ketoacil tiolasa_1	1,864	D2NI	D2I	1,468	0,553	0,352
		D4NI	D4I	1,166	0,222	0,367
684D4I-NI_Polifenol Oxidasa	1,849	D2NI	D2I	1,102	0,141	0,460
		D4NI	D4I	0,683	-0,550	0,314
222D4NI-I_ACC	1,878	D2NI	D2I	1,850	0,888	0,252
		D4NI	D4I	0,810	-0,304	0,366
271D4NI-I_citocromo P450	1,805	D2NI	D2I	2,569	1,361	0,316
		D4NI	D4I	1,199	0,262	0,445
116D2I-NI_Peroxidasa	1,930	D2NI	D2I	1,150	0,202	0,383
		D4NI	D4I	0,610	-0,713	0,040

Por otro lado se evaluaron 2 genes candidatos descritos en la bibliografía como involucrados en la respuesta del girasol frente a *S. sclerotiorum*: a) el gen PR5-1, que codifica para una proteína *Thaumatin-like* (Hu y col. 2003), b) el gen WRKY7 que codifica para una proteína ortóloga al factor de transcripción WRKY33 de *Arabidopsis* (Giacomelli y col. 2010). Para el transcrito PR5-1 se observaron diferencias significativas entre el día 0 y las muestras inoculadas e inoculadas con agua a los días 2 y 4 post inoculación. Así mismo se observó que a pesar de que las diferencias no son significativas, los niveles de este transcrito aumentan del día 2 al día 4 en las flores no inoculadas, siendo los niveles del día 4 inoculado con agua equivalentes a los niveles alcanzados al día 2 y 4 post inoculación de las flores infectadas con el patógeno. Esto indicaría que el aumento en los niveles de PR5-1 está sujeto al desarrollo en la línea resistente RHA801 y que en las flores inoculadas con el patógeno este aumento se produce más tempranamente (Tabla 10).

El gen WRKY7 presentó niveles muy bajos o casi indetectables a los días 0, y 2 Post inoculación en las muestras inoculadas con agua, mientras que se observó un leve aumento en algunas muestras al día 4 post inoculación. Para las muestras inoculadas con el patógeno se observó un marcado aumento al día 2 post inoculación y un descenso de los mismos hacia el día 4 DPI. Este gen se comportó de manera similar a gen 222D4I-NI (Figura 15B) presentando niveles muy bajos o casi indetectables en las muestras en donde los niveles de quitinasa eran altos y niveles basales o muy altos en muestras que no expresaban quitinasa (Figura 15B)

Como se observó mucha variación entre los niveles de expresión de este gen entre las distintas replicas biológicas de cada tratamiento, los niveles relativos de este gen se calcularon de la misma manera que para el gen quitinasa y elemento de respuesta a etileno.

Tabla 10. Medición de los niveles de PR5-1 por qRT-PCR.

Se utilizó como gen de referencia actina. El índice de cambio o *change fold* en cada caso fue referido al día post inoculación indicado en la columna control. $p < 0,05$.

Gen	Eficiencia	control	Blanco	R	<i>Change fold</i>	P-valor
PR5-1	1,904	D0	D2NI	3,77	1,91456452	0,0343
		D0	D4NI	12,28	3,61823866	0,0133
		D0	D2I	13,08	3,70929064	0,0284
		D0	D4I	14,47	3,85499302	0,0104
		D2NI	D2I	3,47	1,79493566	0,1412
		D2NI	D4NI	3,26	1,70487196	0,0661
		D2NI	D4I	3,84	1,94110631	0,0574
		D4NI	D2I	1,07	0,0976108	0,4851
		D4NI	D4I	1,18	0,23878686	0,4141

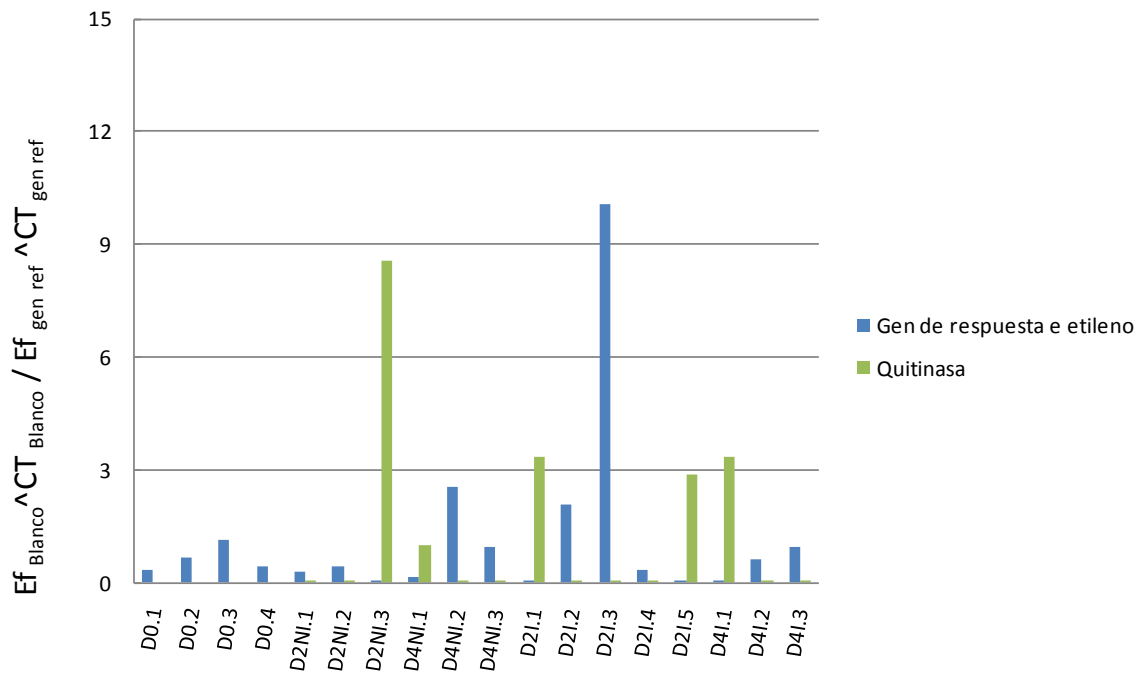
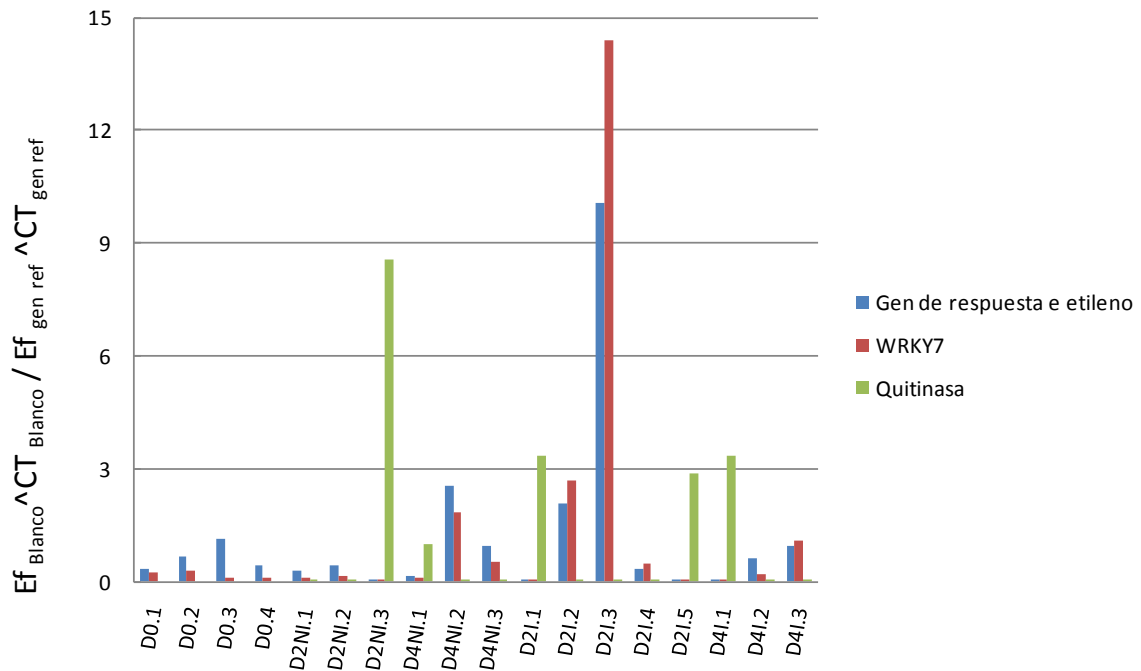
A**B**

Figura 15. Expresión relativa de los genes Elemento de respuesta a Etileno, Quitinasa, WRKY7.

A. Expresión relativa de los genes 222D4I-NI (*Ethylene responsive element*, AN: XP_002275892), 118D2I-NI (*Chitinase*, AN: ABJ74186) **B.** Expresión relativa de los genes 222D4I-NI (*Ethylene responsive element*, AN: XP_002275892), 118D2I-NI (*Chitinase*, AN: ABJ74186) y WRKY7 (WRKY33, AN). Para cada muestra se calculó el nivel relativo de cada transcrito en función del gen de referencia actina a los 0, 2 y 4 días post inoculación en muestras desafiadas con el patógeno (I) y muestras control (NI)

4.3. Análisis de perfiles hormonales

4.3.1. Cambios en los niveles de Ácido Jasmónico

Para el estudio del comportamiento de los niveles de jasmónico entre las dos líneas y los distintos tiempos post inoculación de flores inoculadas con el patógeno o con agua (NI) se ajustó un modelo lineal para un experimento tri-factorial con diseño completamente aleatorizado. El análisis del ajuste preliminar indicó la presencia de dos fuentes de heteroscedasticidad. Por una parte la variabilidad dependió del nivel medio alcanzado, a mayor medias mayor variabilidad, y por la otra a un efecto de variabilidad de la línea HA89, la cual tuvo una desviación estándar residual de aproximadamente el doble de la correspondiente a la línea RHA801. Bajo el modelo que contempla la heteroscedasticidad tanto los efectos principales Línea y Día post inoculación (DPI) como su interacción fueron significativos (Tabla 11). El efecto del tratamiento, inoculado con el patógeno vs. Inoculado con agua, también resultó significativo, mostrando las plantas inoculadas con los patógenos niveles superiores de ácido jasmónico (Tabla 11 y 12). Considerando la interacción entre Línea y DPI, las comparaciones de a pares fueron hechas en base a las categorías definidas por la combinación Línea y DPI (Tabla 12, Figura 16).

Tabla 11. Prueba de hipótesis marginales para el Ácido jasmónico (SC tipo III)

	numDF	F-valor	p-valor
Línea	1	7,99	0,0063
DPI	3	17,91	<0,0001
Tratamiento	1	5,16	0,0265
Línea*DPI	3	6,41	0,0007
Línea*Tratamiento	1	3,40	0,0700
DPI*Tratamiento	3	1,05	0,3787
Línea*DPI*Tratamiento	3	0,69	0,5594

Tabla 12. Medias ajustadas y errores estándares (E.E.) para el tratamiento.

DGC ($\alpha=0,05$). Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Tratamiento	Media	E.E.	
Inoculado con <i>S. sclerotiorum</i> (I)	2633,24	300,53	A
Inoculado con agua (NI)	1892,23	126,72	B

Tabla 13. Medias ajustadas y errores estándares del ácido jasmónico para la interacción Línea*DPI.

DGC ($\alpha=0,05$). Las Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Línea	DPI	Medias	E.E.	
HA89	D0	4588,64	1167,95	A
RHA801	D0	3207,99	315,71	A
RHA801	D1	3090,04	297,93	A
RHA801	D2	2925,60	292,35	A
RHA801	D4	1671,42	129,90	B
HA89	D1	1249,75	180,77	B
HA89	D2	722,38	87,10	C
HA89	D4	646,05	82,99	C

En la figura 16 se muestra la representación gráfica de las diferencias entre las medias de las combinaciones Línea-DPI, ordenadas por Línea. El nivel del ácido jasmónico disminuyó con el tiempo post inoculación pero la velocidad de disminución fue diferente para cada línea. En HA89 este descenso fue más rápido, detectándose diferencias significativas al primer día post inoculación, mientras que en RHA801 el nivel de jasmónico recién disminuyó significativamente al día 4 post inoculación

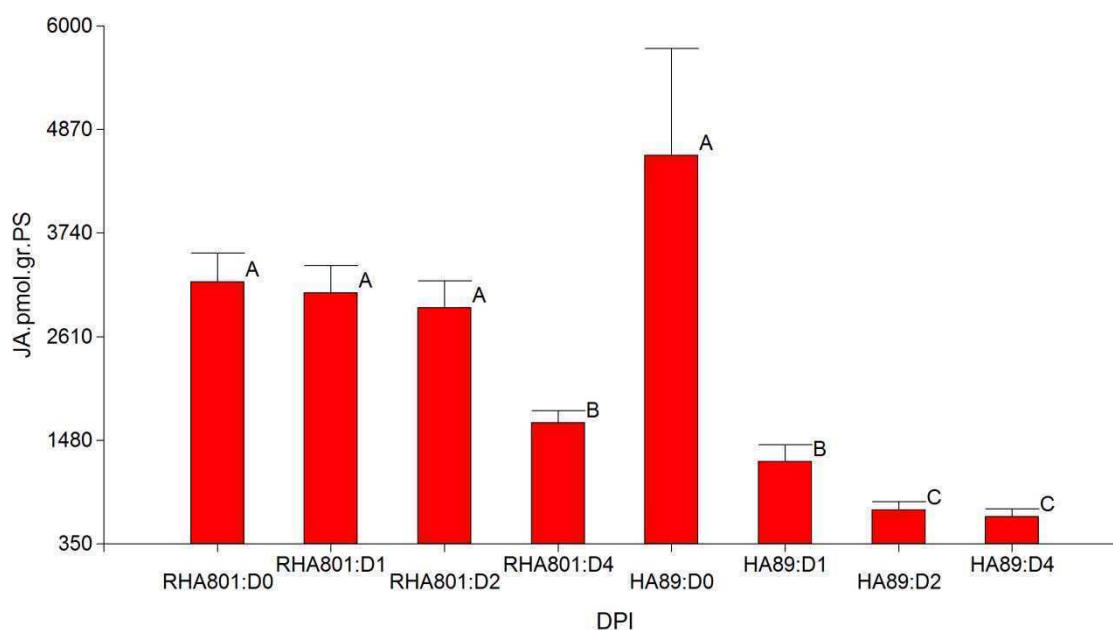


Figura 16. Representación gráfica de las medias de la combinación Línea*DPI (días post inoculación) para dos líneas de girasol RHA801 (moderadamente resistente) y HA89 (susceptible) a los 0, 1, 2 y 4 días post inoculación.

Las Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

4.3.2. Cambios en los niveles de Ácido Salicílico

Para el estudio del comportamiento de los niveles de ácido salicílico se ajustó un modelo lineal para un experimento tri-factorial con diseño completamente aleatorizado que consideró la heterogeneidad de varianzas. Los efectos principales días post inoculación y tratamiento no fueron significativos, pero si el efecto principal línea, las interacciones Línea*DPI y Línea*DPI*Tratamiento, por lo tanto solo se analizó la interacción Línea*DPI*Tratamiento comparando las medias de la interacción de estos tres factores (Tabla 14, 15)

Tabla 14. Prueba de Hipótesis marginales para el ácido salicílico. SC tipo III ($p < 0,05$)

	numDF	F-value	p-value
Línea	1	83,85	<0,0001
DPI	3	2,38	0,0782
Tratamiento	1	2,28	0,1358
Línea*DPI	3	8,01	0,0001
Línea*Tratamiento	1	3,55	0,0640
DPI*Tratamiento	3	3,04	0,0353
Línea*DPI*Tratamiento	3	4,71	0,0050

Tabla 15. Medias ajustadas y errores estándares del ácido salicílico para la interacción Línea-DPI-Tratamiento.

DGC ($\alpha=0,05$). Las Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p <= 0,05$). NI: inoculada con agua, I: Inoculado con *S. sclerotiorum*.

Línea	DPI	Tratamiento	Medias	S.E.	
HA89	D4	NI	343618,72	81668,89	A
HA89	D2	I	243279,93	50211,74	A
HA89	D1	I	201175,23	38419,30	A
HA89	D4	I	189218,84	35242,43	A
HA89	D1	NI	131462,26	21099,59	B
HA89	D0	I	105965,76	15573,18	B
RHA801	D0	I	88665,08	12115,24	B
HA89	D2	NI	87116,70	11818,28	B
HA89	D0	NI	84263,66	11276,75	B
RHA801	D4	I	50990,19	5557,62	C
RHA801	D0	NI	50192,78	5435,58	C
RHA801	D2	I	47848,96	5681,28	C
RHA801	D1	NI	43799,53	4486,37	C
RHA801	D4	NI	43398,73	4428,65	C
RHA801	D2	NI	37802,50	3645,99	C
RHA801	D1	I	36082,16	3414,46	C

En la figura 17 se muestra la representación gráfica de las diferencias entre las medias de las combinaciones Línea*DPI*tratamiento, ordenadas por día. Para la línea RHA801 no se detectaron diferencias en los niveles de esta hormona a lo largo del tiempo post inoculación excepto para el día 0 inoculado con *S. sclerotiorum* (I) en el cual los niveles fueron mayores que en los inoculados con agua (NI). Para la línea HA89 se detectó un aumento en las plantas inoculadas a partir del día 1 post inoculación con *S. sclerotiorum* y este aumento se mantiene a lo largo del tiempo, mientras que las flores inoculadas con agua los niveles de salicílico recién aumentan sus niveles al día 4 post inoculación .

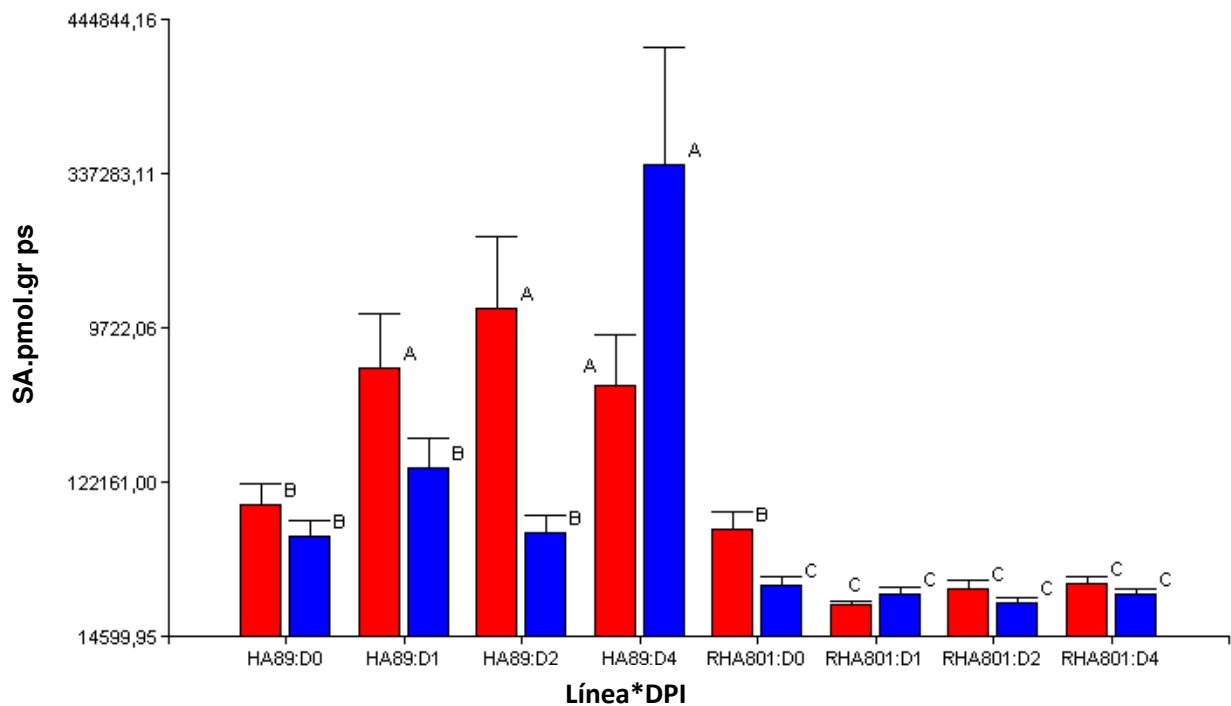


Figura 17. Representación gráfica de las medias de la combinación Línea*DPI*tratamiento para dos líneas de girasol RHA801 (moderadamente resistente) y HA89 (susceptible) a los 0, 1, 2 y 4 días post inoculación.

Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras en azul y rojo representan las flores inoculadas con agua e inoculadas con *S. sclerotiorum* respectivamente.

5. DISCUSIÓN

En este trabajo se estudiaron los perfiles metabólicos, transcripcionales y hormonales en flores de girasol de dos líneas con comportamiento contrastante frente a la podredumbre húmeda del capítulo (PHA). Dado que las flores de girasol constituyen el primer órgano blanco colonizado por *S. sclerotiorum*, se eligió estudiar estos perfiles a tiempos tempranos post inoculación (entre los días 0 y 12), basándose esta elección en trabajos previos que, mediante técnicas de teñido diferencial y microscopía de fluorescencia en secciones de las flores, han demostrado la existencia de diferencias entre genotipos resistentes y susceptibles en la germinación de las esporas y en el desarrollo fúngico, especialmente a partir del día 6 post-inoculación (Rodríguez y col., 2004; Pedraza, 2005).

El diseño experimental utilizado en este estudio consistió de dos líneas de girasol endocriadas con resistencia diferencial frente a la infección con *S. sclerotiorum*: RHA801 (moderadamente resistente) y HA89 (susceptible). Los capítulos de girasol fueron inoculados en el estadio de desarrollo R5.2, que corresponde al período de máxima susceptibilidad a la infección por *S. sclerotiorum* en las áreas de siembra de este cultivo en Sudamérica (latitud 37_ 450 S, longitud 58_ 180 W) (Pereyra y Escande, 1994).

En este trabajo se utilizó el método de inoculación asistida con ascosporas que permite discriminar los materiales genéticos por su comportamiento frente a *S. sclerotiorum* en condiciones que reproducen infecciones naturales, mientras que otros métodos, como el basado en la inyección de ácido oxálico en la cara dorsal del capítulo o la infección con micelio (Baldini y col., 2002) no lo hacen. Además, Vear & Tourvieille (1988) y Tourvieille & Vear (1984), han demostrado que los resultados obtenidos utilizando la inoculación asistida con ascosporas se correlacionan significativamente con los de ataques naturales del patógeno, además este método asegura una inoculación homogénea, que es esencial para la identificación precisa de los niveles de resistencia en cada línea (Hahn, 2002). Asimismo, la inoculación asistida con ascosporas, a diferencia de la metodología que utiliza micelio, permite detectar la presencia de barreras en capítulo que constituyen el sitio de inoculación natural para la PHC, y a partir de los cuales progresa la infección (Prats y col., 2003). En este contexto, puede considerarse que el diseño experimental utilizado en el presente trabajo constituye la mejor aproximación disponible para el estudio de la enfermedad en condiciones a campo.

5.1. Estudio de perfiles metabólicos por CG/MS

La mayoría de los estudios de perfiles metabólicos de la interacción planta-patógeno se han llevado a cabo con microorganismos biótropos (Bednarek y col., 2005; Jubault y col., 2008; Pedras y col., 2008) y simbioses (Desbrosses y col., 2005), aquellos que involucran patógenos necrotróficos son escasos hasta la fecha (Jobic y col., 2007; Dulermo y col., 2009). Este trabajo ilustra el potencial del estudio de los perfiles metabólicos para el análisis de cambios metabólicos asociados a la infección por *S. sclerotiorum* en flores de girasol, utilizando por

primera vez un enfoque basado en GC/MS (cromatografía gaseosa- espectrofotometría de masa). Este punto es de particular importancia debido a que, en la podredumbre húmeda del capítulo, las flores en desarrollo constituyen el órgano principal de entrada de *S. sclerotiorum*. Como único antecedente previo en girasol Jobic y col. (2007) han descrito la aplicación de un análisis de espectrofotometría NMR para el estudio de perfiles metabólicos en cotiledones infectados con *S. Sclerotiorum*, en el cual se identificaron 28 metabolitos. A pesar de las ventajas y desventajas de los enfoques de estudios de metabolitos por NMR y GC-MS, estas dos estrategias han sido propuestas como tecnologías complementarias para el estudio de perfiles metabólicos, especialmente en el contexto de la identificación de bio-marcadores (Ferne y col., 2004; Meyer y col., 2007). Si bien se detectaron alrededor de 15 metabolitos en común entre este trabajo y el mencionado anteriormente, el número de metabolitos identificados exclusivamente mediante la técnica de GC-MS resulto mucho mayor (48). El rol de las vías del metabolismo primario en la defensa de plantas a patógenos ha sido recientemente documentado por distintos autores (Chandra-Shekara y col., 2007; Depuydt y col., 2009; Kocal y col. 2008; Kachroo y col., 2004; Kachroo y col., 2008; Lipka y col., 2005 Price y col., 2003; Scheideler y col., 2002), poniendo en evidencia la importancia creciente que cobran los estudios de perfiles metabólicos para una mejor comprensión del metabolismo en la interacción planta-patógeno.

En el presente estudio se analizaron los compuestos involucrados en el metabolismo primario del carbono tanto en una línea moderadamente resistente (RHA801) como en una línea susceptible (HA89). Como fue demostrado en otros sistemas (ver Lindon y col., 2004), aquellos metabolitos cuyos niveles difieren entre materiales resistentes y susceptibles pueden transformarse en biomarcadores de rápido acceso con un alto poder de predicción para caracteres complejos. Los resultados obtenidos en esta tesis permitieron seleccionar un pequeño número de metabolitos a partir del perfil completo, que, al mostrar diferencias significativas entre genotipos tienen el potencial de poder discriminar las líneas endocriadas RHA801 y HA89, basándose en los cambios producidos en el metabolismo como consecuencia de la infección por *S. sclerotiorum* (Figura 8).

El análisis global del conjunto de datos utilizando PCA y HCA muestra diferencias metabólicas entre el cultivar moderadamente resistente y el susceptible inmediatamente antes de la inoculación (0 DPI), así como también diferentes patrones de cambio en los primeros estadios luego de la inoculación (2 DPI, 4DPI y 12 DPI). Según el análisis HCA, los perfiles metabólicos de la línea susceptible a los 2 y 4 días post-inoculación presentaron mayor similitud a los de la misma línea al 0 DPI que la similitud observada entre muestras inoculadas y el correspondiente 0 DPI en la línea moderadamente resistente (Figura 10). Sin embargo, las relaciones de similitud en la línea moderadamente resistente deben ser interpretadas con cautela debido a la gran variación entre replicas correspondientes al mismo día, hecho que se evidencia claramente en el análisis de PCA, haciendo de este ultimo una representación más acabada del complemento metabólico de cada línea. Desde el punto de vista biológico, la variación entre replicas de la línea RHA801 podría deberse a diferencias temporales en la expresión del mecanismo de respuesta o a un progreso diferencial del patógeno en el tejido hospedante.

A su vez, los análisis de correlación de redes sugieren que los cambios metabólicos están sincronizados a lo largo del tiempo en respuesta al patógeno en forma diferencial entre las células de las flores de las dos líneas evaluadas. Esto puede ser una consecuencia de las diferencias metabólicas preexistentes entre estos dos genotipos o deberse a cambios inducidos por el proceso de infección. Mientras que el genotipo susceptible presenta mayor número de interconexiones entre metabolitos de distintos módulos, el genotipo moderadamente resistente presenta mayor número de correlaciones intra-módulo, con excepción de metabolitos del ciclo del TCA. El análisis de correlación de redes también permitió la identificación de ciertos metabolitos (i.e. 2-oxoglutarato, succinato, malato y glutamato) que se comportan como conectores *hubs* en las dos líneas evaluadas. Es interesante observar que todos estos metabolitos pertenecen a la misma vía metabólica (el ciclo de los TCA está conectado con el metabolismo del glutamato), sugiriendo que estos puntos de la mencionada vía no están directamente relacionados con las diferencias observadas en la resistencia al patógeno y poseen un rol conservado entre ambas líneas. Sin embargo, los intermediarios del ciclo del TCA mantienen la estequiometría esperada en la línea susceptible, mientras que en la moderadamente resistente los niveles fluctúan sin guardar la misma relación unos respecto de otros, señalando a esta vía como posible punto de regulación metabólica. En la línea moderadamente resistente, los intermediarios del TCA citrato, isocitrato y succinato aumentan hacia los días 2 y 4 post inoculación y exhiben un descenso abrupto hacia el día 12 post inoculación. Una inhibición generalizada del ciclo de los TCA ha sido descrita en suspensiones de células de *Arabidopsis* sometidas a estrés oxidativo (Baxter y col., 2007); y una regulación diferencial de los genes que codifican para las enzimas involucradas en esta vía también ha sido descrita en diferentes sistemas de interacción planta-patógeno (Rhoads y col., 2006; Scheideler y col., 2002). Las diferencias observadas entre las líneas susceptible y moderadamente resistente aquí estudiadas sugiere la existencia de una tasa de respiración diferencial entre ambos genotipos que podría estar asociada a mecanismos de regulación de niveles de especies reactivas de oxígeno originadas por la respuesta al patógeno. Esta hipótesis es sustentada por el hecho de que la enzima degradadora de H_2O_2 , catalasa, posee una mayor actividad en las flores la línea moderadamente resistente cuando es desafiado con el patógeno, sugiriendo que el metabolismo es reconfigurado para contrarrestar los daños producidos por el estallido oxidativo en las células de este genotipo. Asimismo, se ha demostrado que la mayoría de los metabolitos identificados como conectores específicos de genotipo o *hubs* están implicados en vías de señalización que regulan varios aspectos de defensa en plantas. En la línea susceptible, el citrato, la isoleucina, el quinato, la homoserina y la ramnosa muestran el mayor número de conexiones en el análisis de redes. Un aumento de la relación carbono/nitrógeno ha sido propuesto como una respuesta general de la planta a la infección por patógenos, mediada por la regulación diferencial de los genes que codifican para las enzimas involucradas en las distintas vías del metabolismo primario, como el ciclo de TCA y la síntesis de aminoácidos (Zhu y col., 2007). Más aun, recientemente se ha propuesto que los conjugados de isoleucina con jasmonato y glucocinolatos estarían implicados en la respuesta de plantas a insectos herbívoros y patógenos (Chung y col., 2008; Mikkelsen & Halkier, 2003).

Los fenilpropanoides son el grupo más grande de metabolitos secundarios producidos por las plantas, principalmente en respuesta a estreses bióticos debido a su capacidad antioxidante y por sus propiedades como secuestradores de radicales libres (Korkina, 2007). Los precursores de los fenilpropanoides presentaron una respuesta diferencial en este estudio. En la línea susceptible (HA89) los niveles de tirosina aumentan 3 veces en los estadios tardíos mientras que otros metabolitos precursores, como el clorogenato, también mostraron un patrón de cambios diferencial en esta línea. En trabajos previos, genotipos de girasol resistentes a PHC han presentado contenidos más altos de compuestos fenólicos en brácteas, ya sea en forma constitutiva o inducible (Prats y col., 2003, 2007), así como también un aumento en la actividad de la enzima fenilalanina-amonio-liasa (PAL) a partir de los días 10 a 14 post inoculación (Prats y col., 2003). Sin embargo, los resultados de las mediciones de la actividad de PAL efectuadas en este trabajo sugieren que en las flores de los genotipos evaluados la inducción de síntesis de polifenoles derivados de la actividad de esta enzima no ocurre en los primeros días post inoculación. Los cambios observados en este trabajo en los niveles de los precursores de fenilpropanoides podrían conducir a una biosíntesis diferencial de otras hormonas relacionadas con defensa y desarrollo como son el ácido salicílico y auxinas. En efecto los niveles de ácido salicílico se vieron significativamente aumentados en la línea susceptible (Figura 17 y Tabla 15) A partir del análisis de las redes de correlación en la línea moderadamente resistente, se observa que el glicerol, el ononitol, el maltitol, la glicina, la hidroxiprolina, la arabinosa y la tiramina están altamente conectados. El glicerol y el ononitol son polialcoholes que han sido propuestos como mediadores en las respuestas a estreses bióticos (Kachroo y col., 2004; Kachroo y col., 2008) y abióticos (Sheveleva y col., 1997). La aplicación exógena de glicerol dispara la expresión constitutiva de genes relacionados con patogénesis en plantas de soja, estas plantas mostraron también resistencia a bacterias y oomycetes patogénicos (Kachroo y col., 2008).

Está bien documentado que en plantas la fotorespiración forma parte de un mecanismo disipatorio para disminuir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los cloroplastos y para moderar el daño oxidativo. Considerando que la producción de ROS es regulada por el ácido oxálico secretado por *S. sclerotiorum* (Kim y col., 2008), el hecho de que el intermediario de la fotorespiración glicina esté actuando como un centro específico (*Hub*) en la línea moderadamente resistente sugiere que podría jugar un papel preponderante en la regulación de los mecanismos de defensa contra este patógeno. Esto está adicionalmente sustentado por el incremento observado en la actividad de catalasa en esta línea luego de ser inoculado y por la detección de genes involucrados en la vía de la fotorespiración en las clonotecas aquí generadas. De esta manera, la regulación de la fotorespiración podría explicar en parte, la resistencia de la línea RHA801 frente a *Sclerotinia*.

Además del ácido oxálico, las enzimas degradadoras de pared también están implicadas en la patogénesis y en el desarrollo del patógeno observándose frecuentemente un incremento en los niveles de derivados de pared celular luego de la infección (Godoy y col., 1990). Estos derivados de pared actúan como desencadenantes de la defensa de la planta. En concordancia

los niveles de arabinosa en la línea RHA801 varían de una manera coordinada con un gran número de metabolitos, entre los que se encuentran también otros componentes de pared.

Las diferencias entre las dos líneas evaluadas en los niveles relativos de cada metabolito ponen de manifiesto la importancia de analizar los metabolismos del carbono y del nitrógeno y sus conexiones con el metabolismo secundario. Luego de la inoculación, la línea moderadamente resistente muestra cambios en el contenido de sacarosa. Estos cambios son similares a los observados en trabajos previos luego del desafío con patógenos y se ha demostrado también que son debidos a la actividad de invertasas específicas de órganos destino como respuesta general a patógenos (Fotopoulos y col., 2003; Roitsch y col., 2003; Scholes y col., 1994; Voegelé y col., 2006). Sin embargo, en este trabajo la línea RHA801 no mostró cambios ni en la actividad de las invertasas ni en la actividad de sacarosa sintasa cuando se compararon muestras inoculadas e inoculadas con agua a los distintos tiempos post inoculación. Por lo contrario, la línea susceptible mostró un aumento significativo en los niveles de actividad de las invertasas citológica y vacuolar. Estos resultados no se correlacionan con las diferencias relativas de sacarosa detectadas en este genotipo (Tabla 6 y Tabla anexa 3). A pesar de que este resultado fue inesperado, se ha reportado que los efectos de la infección patogénica sobre los niveles de azúcares varían considerablemente (Berger y col., 2007). Más aun, el análisis del contenido de azúcares y la actividad invertasa en regiones infectadas y regiones no infectadas de tejidos inoculados dan cuenta de un efecto fuerte sólo en la región infectada (Chou y col., 2000; Swarbrick y col., 2006). Esto evidencia la necesidad de un método que proporcione información de la distribución espacial de los componentes en el órgano, tejido y nivel subcelular para develar el origen de estas diferencias.

La movilización y el reciclado del nitrógeno en la planta hospedante durante el ataque y la invasión de patógenos ha sido descrita como una estrategia de defensa por diversos autores (Divon y col., 2006 y referencias). Los niveles de los metabolitos que censan el estado del nitrógeno celular, como el glutamato y la asparragina, mostraron un comportamiento contrastante e inesperado en las dos líneas analizadas en este trabajo. Mientras que en la línea susceptible estos dos metabolitos aumentan luego de la inoculación, ocurre lo contrario en la línea moderadamente resistente proporcionando más evidencias en apoyo a la idea de que la re movilización del nitrógeno es diferencialmente disparada en ambos tipos de interacción compatibles e incompatibles (Tavernier y col., 2007). En la interacción compatible *Arabidopsis thaliana*–*Plasmodiophora brassicae* el aumento del flujo metabólico desde arginina hacia prolina está asociado a la inducción por parte del patógeno de la degradación de arginina a amonio y ornitina. De esta manera, se asegura un mecanismo que desvía el nitrógeno de la planta a la producción de aminoácidos indispensables para la multiplicación del patógeno (Jubault y col., 2008).

En este trabajo, el aumento relativo de la prolina a lo largo del proceso de infección en la línea susceptible comparado con la línea moderadamente resistente concuerda con los resultados encontrados en otros sistemas compatibles, y podría jugar un papel preponderante en la determinación de la susceptibilidad del girasol a la infección mediada por *S. sclerotiorum*.

Para definir mejor las respuestas específicas de patosistema, se está llevando a cabo la generación de una población derivada de estos dos genotipos contrastantes. Es de esperar que el método de análisis de perfiles metabólicos establecido en este trabajo permitirá la evaluación de segregantes y la confirmación de los cambios metabólicos específicos aquí descriptos.

5.2. Identificación de genes candidatos mediante análisis de perfiles transcripcionales y construcción de colecciones de ADNc substractivas

La elección de un buen método de extracción de RNA es esencial para el desarrollo de técnicas de investigación moleculares, tales como la construcción de colecciones de ADNc y el estudio de perfiles transcripcionales tanto por las técnicas de *northern blot*, RT-PCR (Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción Reversa) o PCR cuantitativa. En este trabajo se evaluaron inicialmente los métodos tradicionales de purificación de ARN como los que incluyen extracción con el reactivo TRizol (Invitrogen, EUA) y Qiagen RNeasy (Qiagen, Alemania) pero ninguno de ellos brindó RNA de alta calidad a partir del material vegetal en estudio. Esto se debió al alto contenido de metabolitos secundarios como polifenoles y polisacáridos presentes en los tejidos florales de girasol. Los compuestos polifenólicos al oxidarse, se unen covalentemente a quinonas y luego a ácidos nucleicos y proteínas irreversiblemente, oxidándolos y degradándolos (Loomis y col., 1974). Esto da como resultado ARN difícil de resuspender y parcialmente degradado. Por otro lado, estos compuestos inhiben a las enzimas retrotranscriptasa reversa y ADN polimerasa (Koonjul y col., 1999; Staub y col., 1995; Su & Gibor, 1988) por lo tanto el ARN resultante no puede ser utilizado para transcripción reversa ni para la construcción de colecciones de ADNc.

Numerosos protocolos han sido desarrollados para la extracción de ARN de tejidos vegetales con alto contenido de polifenoles. En este trabajo se evaluaron los métodos de Chan y col. (2007), Daohong y col. (2004), Louime y col. (2008) y Salzman y col. (1999). Todos ellos poseen distintas concentraciones de PVP (polivinilpirrolidona) y agentes antioxidantes como 2-mercaptoetanol y tiocianato de guanidinio en sus *buffers* de extracción. El PVP es un inhibidor de polifenol oxidasas (Emine & Sule, 2004; Solange y col., 2001;), y a su vez se une a los polifenoles evitando su oxidación y su posterior unión a ácidos nucleicos (Salzman y col., 1999). El 2-mercaptoetanol en altas concentraciones inhibe a las polifenol oxidasas (Chang y col., 1993). Sin embargo, la mayoría de estos métodos dió como resultado un ARN parcialmente degradado, no apto para ser utilizado en técnicas de biología molecular debido al alto contenido de compuestos polifenólicos. Si bien el método de Salzman, que contempla la utilización de fenol a pH ácido (pH 5,2) en lugar de básico, para evitar contaminaciones con DNA genómico, permitió obtener ARN con un buen rendimiento y de buena calidad, el protocolo es muy extenso (3 días). Este protocolo incluye un paso de precipitación con etanol durante toda una noche previo a la extracción con fenol debido a que trazas de éste interfieren con el uso de PVP durante la extracción (Asif y col., 2000; Salzman y col., 1999;). Por otro lado

se observó que el rendimiento de la extracción dependía mucho de la calidad del fenol utilizado. Finalmente, la optimización del método de Louime 2008 (modificaciones según se describe en la sección 3.6.1) dio como resultado un ARN con un rendimiento, con una alta relación 260/280 y 260/230, indicando una mínima contaminación con proteínas, polisacáridos y polifenoles. Además el ARN obtenido no presentó signos de degradación. A su vez este método puede llevarse a cabo en 4 horas en comparación con el método alternativo basado en el protocolo de Salzman que es más laborioso y extenso.

En este trabajo se construyeron colecciones de ADNc por medio de la técnica de SSH (*Suppression subtractive hybridization*) para la identificación de secuencias cuyos niveles de expresión se encontraban aumentados o disminuidos debido a la infección por *S. sclerotiorum*. Esta técnica es ampliamente utilizada para la identificación de secuencias que diferencian dos muestras altamente relacionadas, y además, es uno de los métodos más poderosos utilizados para la generación de clonotecas de ADNc subtractivas (Akopyants y col., 1998; Diatchenko, 1996; Gurskaya y col., 1996; Lukianov y col., 1994; Rebrikov y col., 2004). La metodología SSH está basada en un efecto de “supresión de la reacción de PCR” (Lukyanov y col., 1995; Siebert y col., 1995), y combina la normalización y la substracción en un mismo proceso (Gurskaya y col., 1996). El paso de normalización equipara la abundancia de los fragmentos de ADNc en la población del *target* y el paso de substracción elimina las secuencias que son comunes en las dos poblaciones de ADNc comparadas. Esto aumenta drásticamente la probabilidad de obtener ADNc de bajo número de copias que se expresan diferencialmente. En efecto, por esta técnica se ha logrado enriquecer en 1000 veces secuencias de muy bajos niveles de expresión (Diatchenko, 1996; Gurskaya y col., 1996; Jin y col., 1997).

En este trabajo se obtuvieron 4 colecciones de ADNc a partir de flores de girasol de la línea RHA801 inoculadas con el patógeno e inoculadas con agua (*mock*) a los días 2 y 4 post inoculación. A partir de las colecciones D2 I-NI y D2NI-I se obtuvieron un total de 88 y 75 clones únicos respectivamente, mientras que a partir de las colecciones D4I-NI y D4NI-I se obtuvieron un total de 446 y 295 clones únicos respectivamente. De éstos, entre el 20 y 30% de las secuencias obtenidas no presentaron similitud a secuencias codificantes disponibles en bases de datos públicas ni en las bases de datos de ESTs de girasol. Esto sugiere que las mencionadas secuencias corresponden a genes involucrados en la respuesta del girasol frente a este patógeno que no han sido descritos previamente.

Las colecciones correspondientes a flores a los 2 días post inoculación tuvieron un menor tamaño que las correspondientes al día 4 post inoculación, a pesar de que la eficiencia de transformación en todas ellas fue de alrededor de 10^7 UFC/ml. Esto sugiere que los cambios a nivel transcripcional producidos por la infección del patógeno en estadios muy tempranos (2 DPI) afectan menor número de genes que los que ocurren en estadios medianamente tempranos (4 DPI), indicando que los cambios producidos a tiempos muy tempranos dispararían la activación de múltiples procesos biológicos en respuesta al patógeno, hecho que también puede observarse en la Figura 13.

De acuerdo con la anotación GO, la mayor parte de los genes afectados por la infección están involucrados en los procesos de síntesis de proteínas y proteólisis, así como también en los

procesos de respuesta a estrés oxidativo. Esto último indicaría, por un lado, la activación de la vía de señalización del estrés oxidativo en la línea moderadamente resistente (RHA801) en respuesta a *S. sclerotiorum*, y por otro, la activación de las enzimas involucradas en la degradación de H₂O₂ para la detoxificación de las células. Esta hipótesis es sustentada por los experimentos de perfiles metabólicos y por la mayor actividad catalasa observada en las flores de la línea moderadamente resistente al día 4 post inoculación, sugiriendo que la línea RHA801 sería capaz de contrarrestar el efecto inhibitorio producido por el ácido oxálico sobre el estrés oxidativo (Cessna y col., 2000).

La eficiencia de substracción obtenida en este trabajo fue baja (1 a 5%). De los 16 clones elegidos para validar las clonotecas obtenidas por la técnica de SSH, solo dos de ellos, quitinasa y un elemento de respuesta a etileno se expresaron diferencialmente entre las muestras inoculadas e inoculadas con agua a los 2 y 4 días post inoculación.

A pesar de que la técnica SSH es una metodología muy poderosa y ampliamente utilizada para la identificación de genes que se expresan diferencialmente, en la práctica no todos los genes diferencialmente expresados son igualmente enriquecidos por SSH, ni tampoco los genes comunes a ambas muestras son totalmente normalizados y arrestados (Diatchenko y col., 1996). El nivel de enriquecimiento y la eficiencia de substracción de un ADNc en particular depende de su abundancia original, de la relación de su concentración en la muestra que va a ser arrestada (*tester*), del número de genes que se expresan diferencialmente y de la complejidad del material de partida (Bui y col., 2005; Desai y col., 2000; Diatchenko y col., 1996). En clonotecas diferenciales obtenidas a partir de muestras provenientes de tratamientos en los cuales se inducen cambios en la expresión de pocos genes, el número de secuencias que escapan al proceso de substracción puede ser alto (*background*) a pesar de que las mismas deriven de un buen nivel de enriquecimiento en ADNc diferencialmente expresado (Bui y col., 2005; Desai y col., 2000; Diatchenko y col., 1996; Rebrikov y col., 2000). El *background* está representado por secuencias que se generan como diferenciales pero que al ser validadas por las técnicas de qPCR o por *northern blot* las diferencias en sus niveles de expresión no son significativas. El número de clones falsos positivos puede exceder considerablemente el número de clones que codifican para secuencias que realmente se expresan diferencialmente (Bui y col., 2005; Desai y col., 2000; Diatchenko y col., 1996; Rebrikov y col., 2000). Por esta razón, los clones que se obtuvieron como diferenciales a partir de las 4 clonotecas estudiadas deberán ser evaluados cuidadosamente en nuevos experimentos de hibridación (*differential screening*) o por la técnica de MOS (*Mirror Orientation Selection*) (Diatchenko y col., 1996; Rebrikov y col., 2000)

Por un lado, el hecho que las secuencias de ARN más abundantes, como por ejemplo, las secuencias que codifican para ARN ribosomal, estuvieran representadas por 5 a 6 clones como máximo, y por el otro lado el hecho que los Cts promedios determinados por qRT-PCR de los genes seleccionados para validar las clonotecas fueran desde 18 a 32, sugieren que para las clonotecas obtenidas en este estudio se ha logrado una disminución en los niveles de transcritos de alta expresión y un buen enriquecimiento en secuencias de bajo nivel de expresión (Cts 31 a 32), indicando una baja eficiencia en el paso de substracción

probablemente debido a la similitud de los tejidos comparados (flores a los 2 días post inoculación con *S. sclerotiorum* vs flores a los 2 días inoculadas con agua (*mock*) y flores a los 4 días post inoculación con *S. sclerotiorum* vs flores a los 4 días inoculadas con agua (*mock*).

Las secuencias que fueron elegidas para ser validadas por qRT-PCR corresponden a secuencias que codifican para probables genes PR (LTP, peroxidasa, defensina, quitinasa), genes involucrados en respuestas a estreses tanto bióticos como abióticos y genes involucrados en las vías de respuesta hormonales o que estaban involucradas en la respuesta de colza a *S. sclerotiorum* (Zhao y col., 2007) en ensayos de infección de hojas.

El hecho que estas secuencias no se encuentren diferencialmente expresadas entre las flores inoculadas e inoculadas con agua puede deberse a que los tejidos florales han mostrado no poseer respuestas de defensa inducibles (Ngugi & Schem, 2006; Zangerel y col., 1996). Esto es consistente con la teoría que predice que las flores, siendo estructuras ecológicamente valiosas, deberían estar protegidas por una defensa de tipo constitutivo en vez de inducible por daño (Ngugi & Schem, 2006; Rhoades y col., 1976). Se han identificados numerosos genes PR en diferentes estructuras florales como por ejemplo PR-10 (*ribonuclease type*) (,), PR-2 (b-1,3-glucanase) (Worrall y col., 1992), PR-3 (chitinase type I,II, IV,V,VI, VII), PR-4 (chitinase type I,II), PR-5 (*Thaumatin-like*), PR-8 (*chitinase type III*), PR-12 (*defensin*), PR-14 (LTP) y PR-15 (*Oxalate oxidase*) (Bufe y col., 1996; Hoffmann-Sommergruber y col., 2000; Markovic-Housley y col., 2003; Ngugi & Schem, 2006; Van Loon y col. 1996; Yagami, 2000).). Asimismo en un trabajo previo, nuestro grupo ha identificado numerosos genes de defensa en estadios tempranos de desarrollo del capítulo en girasol incluyendo secuencias con similitud a GLP (*germin like proteins*) y LTP (*lipid tranfer proteins*) entre otras a través de la construcción de colecciones de ADNc órgano específicas (Fernández y col., 2003).

Pese a que los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la mayoría de los transcritos escapan a la substracción, se identificaron dos genes, una quitinasa (118D2I-NI) y un elemento de respuesta a etileno (222D4I-NI) que se comportaron de manera diferencial entre los tratamientos (Figura 15). Por otro lado, los estudios de perfiles de transcripción del gen WRKY7, ortólogo al WRKY33 de *Arabidopsis* (Giacomelli y col., 2010), mostraron que este gen se comporta de manera similar al gen 222D4I-NI. Para el gen quitinasa (118D2I-NI) no se detectó expresión o los niveles fueron bajos para las muestras a los días 0, 2 y 4 post inoculación en las muestras inoculadas con agua (NI), con la excepción de una sola muestra para el día 2, mientras que se observó una inducción de este gen en algunas de las muestras a los días 2 y 4 post inoculación en las muestras inoculadas con *S. sclerotiorum* (I) Para los genes Elemento de respuesta a etileno (222D4I-NI) y WRKY7 se observó un marcado aumento en los niveles de expresión en algunas muestras al día 2 post inoculación. Es interesante destacar que en aquellas réplicas en las que se observo expresión de 118D2I-NI (Quitinasa) los niveles de 222 D4I-NI (Elemento de respuesta a Etileno) y WRKY7 fueron muy bajos.

Durante la infección fúngica, las células de la planta inducen la expresión de quitinasas que se acumulan en el sitio de penetración e hidrolizan la quitina que es el componente principal de las paredes de los hongos (Eckardt, 2008). De esta manera frenan el avance del patógeno y liberan quitooligosacáridos u oligómero de quitina, que a su vez actúan como desencantes de

la inducción de inmunidad innata en la planta contra el patógeno invasor (Boller, 1995; Eckardt, 2008; Miya y col., 2007; Passarinho y col., 2002; Schlumbaum y col., 1986; Shibuya y col., 2001; Stacey y col., 1997; Wan y col., 2008). De acuerdo con esto, la sobreexpresión de quitinasas en plantas dio como resultado una mayor resistencia a patógenos fúngicos (Brogue y col., 1991; Jach y col., 1995; Passarinho y col., 2002). Más aun, el tratamiento de plantas con quitooligosacáridos aumenta la resistencia de la planta frente a varios patógenos (Tanabe y col., 2006; Wan y col., 2008). Además estudios recientes de perfiles de expresión demostraron que los quitooligosacáridos son potentes reguladores de la expresión génica en plantas (Day y col., 2002; Ramonell y col., 2005; Wan y col., 2008; Zhang y col., 2002) sugiriendo que la percepción de quitina y la transducción de señales asociada están presentes en plantas para mediar la resistencia a enfermedades (Wan y col., 2008). El Receptor Kinasa1 LYS (LysM RLK1) también conocido como CERK1, es requerido para la activación de la respuesta inmune mediada por quitina (Miya y col., 2007; Wan y col., 2008). Asimismo, Libault y col. (2007) detectaron 118 factores de transcripción que responden a quitina, entre los cuales, WRKY33 y varios elementos de respuesta a etileno (AP2/ERE) se encuentran sobre expresados en respuesta a quitina. Por otro lado estudios de microarreglos en arroz y Arabidopsis han demostrado que un gran número de genes responden a quitina entre ellos proteínas relacionadas con patogénesis, factores de transcripción del tipo WRKY y proteínas relacionadas con defensa (Day y col., 2002; Wan y col., 2008, Zhang y col., 2002). Más aun, estudios realizados con mutantes de los genes de respuesta a quitina demuestran que estas tienen una mayor susceptibilidad a patógenos (Ramonell y col., 2006), sugiriendo una conexión entre los genes de inducción por quitina y los genes de resistencia a patógenos en plantas (Wan y col., 2008).

El gen de girasol WRKY7 es un probable ortólogo del WRKY33 de Arabidopsis (Giacomelli y col., 2010). Diversos estudios demuestran que este factor de transcripción está involucrado tanto en respuesta a estreses bióticos como abióticos, así como también en desarrollo floral (Berri y col., 2009; Eulgem y col., 2000; Eulgem & Somssich, 2007; Jiang & Deyholos, 2006; Jiang & Deyholos, 2009; Johnson y col., 2002; Laluck & Mengiste, 2010; Lippok y col., 2007; Rushton y col., 1996; Ulker y col., 2004). A su vez Zheng y col. (2006) mostraron que plantas mutantes de Arabidopsis para este gen presentaban una mayor susceptibilidad a hongos necrotróficos. Estudios hechos con líneas resistentes y susceptibles a *S. sclerotiorum* en Arabidopsis (Eulgem & Somssich, 2007; Perchepped y col., 2010), colza (Zhao y col., 2007; Zhao y col., 2009) y girasol (Giacomelli y col., 2010) mostraron diferentes resultados en relación con la expresión de este gen. En Arabidopsis y colza se observó un aumento de los transcritos en las líneas resistentes a tiempos muy tempranos post inoculación, 24hs y 4 días respectivamente, mientras que en las líneas susceptibles los niveles eran bajos. A tiempos tardíos, los niveles en las dos líneas eran similares en Arabidopsis, mientras que en colza al día 7 post inoculación los niveles de este gen disminuían en la línea moderadamente resistente y aumentaban en la línea susceptible. Por otro lado, en hojas de girasol, los niveles de WRK7 se vieron aumentados a las 24 hs post inoculación en la línea susceptible (Eulgem & Somssich, 2007; Perchepped y col., 2010, Zhao y col., 2007; Zhao y col., 2009) mientras que en la línea

resistente los niveles de este gen se mantuvieron constantes (Giacomelli y col., 2010). Si bien WRKY7 ha sido propuesto como probable ortólogo de WRKY33, su patrón de expresión en hojas de girasol fue distinto al observado para WRKY33 en Arabidopsis (Giacomelli y col., 2010). Esto sugiere que genes ortólogos pueden comportarse en forma diferencial en distintas especies y/o en diferentes tejidos vegetales (Giacomelli y col., 2010; Perchepped y col., 2010; Zhao y col., 2009).

En este trabajo se observó un aumento para el gen WRKY7 en la línea moderadamente resistente al día 2 post inoculación, en concordancia con lo observado para Arabidopsis y colza. Las diferencias entre los perfiles de expresión aquí obtenidos y los reportados por Giacomelli y col. (2010) pueden deberse a los órganos analizados en cada caso, flor y hoja respectivamente.

En lo concerniente a los resultados aquí presentados, es necesario considerar asimismo que la línea RHA801 presenta niveles de resistencia moderada al patógeno, lo que lleva a niveles de incidencia variables entre plantas, según las condiciones de infección imperantes al momento de floración. Esto explicaría las diferencias de los niveles de expresión entre replicas biológicas observadas para estos genes. Estudios de expresión concertada iniciados recientemente, utilizando un microarreglo de alta densidad, diseñado a partir de colecciones de ESTs de girasol disponibles en bases públicas permitirá estudiar los perfiles transcripcionales de estos genes y otros genes no evaluados en este trabajo, contribuyendo a esclarecer los mecanismos de respuesta que tienen lugar en tiempos tempranos de la infección de *S. sclerotiorum*.

5.3. Estudio de los perfiles hormonales para Ácido salicílico y ácido jasmónico en dos líneas de girasol con comportamiento contrastante frente a *S. sclerotiorum*

En este trabajo se midieron los niveles de las fitohormonas Ácido jasmónico (JA) y Ácido salicílico (SA) y en una línea de girasol moderadamente (RHA801) y en una línea susceptible (HA89) a *S. sclerotiorum*. Se observó que el nivel inicial de JA era igual para ambas líneas y que disminuye en ambas con el tiempo post inoculación, sin embargo la velocidad de disminución es mayor para la línea HA89. Estudios previos sobre mutantes insensibles a jasmónico (*coi1-1*) demostraron que esta hormona es la señal de activación de la defensa tanto en respuesta a *S. sclerotiorum* como a hongos necrotróficos en general (Guo & Stotz, 2007; Lorenzo & Solano, 2005; Perchepped y col., 2010). En este trabajo los niveles de jasmónico fueron mayores en las plantas inoculadas que en las inoculadas con agua independientemente de la línea, sin embargo la mayor velocidad de disminución en la línea HA89, así como un menor nivel de esta hormona al día 4 post inoculación en comparación con la línea RHA801, podrían estar asociados a su susceptibilidad frente a este patógeno.

Por otra parte, Perchepped y col. (2010) demostraron que mutantes de Arabidopsis afectadas en la acumulación de ácido salicílico (*sid1/eds5* and *sid2/eds16*) o en la vía de señalización (*npri1-1*) y plantas transgénicas de Arabidopsis *nahG* incapaces de acumular SA (Cao y col.,

1994; Friedrich y col., 1995; Rogers & Ausubel, 1997; Wildermuth y col., 2001) no mostraban ninguna diferencia significativa en la resistencia a *S. sclerotiorum* cuando eran comparadas con el genotipo WT (col1, resistente), estableciendo claramente que el ácido salicílico no contribuye a la resistencia contra *S. sclerotiorum*. En concordancia, en este trabajo no se detectaron cambios significativos en los niveles de esta hormona para la línea moderadamente resistente (RHA801).

Sin embargo para la línea susceptible se detectó un aumento en los niveles de SA en flores inoculadas a partir del día 1 post inoculación. Esto último se condice con el aumento significativo de salicílico en plantas de cacao infectadas con *Moniliophthora perniciosa* en comparación con plantas no infectadas (Chavez & Gianfagn, 2007). Estos hallazgos junto con lo observado por Chavez & Gianfagn (2007) sugieren que los hongos necrotróficos inducen la acumulación de SA en los tejidos enfermos.

6. CONCLUSIONES

- Se optimizó con éxito la técnica de GC-MS en flores de girasol, detectándose 63 metabolitos en flores de girasol de dos líneas con comportamiento contrastante frente al patógeno *S. sclerotiorum* y de éstos se cuantificaron 50 de estructura molecular conocida, no descriptos previamente en este sistema.
- El análisis comparativo de perfiles metabólicos a distintos tiempos post inoculación condujo a la identificación de un grupo de metabolitos que constituyen biomarcadores que permiten discriminar ambas líneas basándose en los cambios producidos en el metabolismo como consecuencia de la infección por *S. sclerotiorum*. Entre estos se pueden citar para la línea resistente (RHA 801): metabolitos del ciclo de los ácidos tricarbónicos (citrato, isocitrato, succinato), azúcares (trehalosa), azúcares alcoholes (manitol, ononitol) mientras que para la línea susceptible (HA89) se destacan cambios en aminoácidos (valina, asparragina, tirosina, prolina).
- Los estudios de cambios metabólicos concertados permitieron detectar una regulación metabólica diferencial entre la línea susceptible y moderadamente resistente en el sistema girasol-*S. sclerotiorum*. Los análisis de correlación de redes sugieren que los cambios metabólicos están sincronizados a lo largo del tiempo en respuesta al patógeno, particularmente en la línea susceptible.
- La línea resistente presentó cambios significativos en intermediarios del ciclo de TCA que señalan a esta vía como posible punto de regulación metabólica en respuesta a *S. sclerotiorum*, a través de la regulación de la generación de ROS. La disminución en los niveles de estos intermediarios de TCA a partir del día 4 post inoculación, coincide con un aumento de la actividad catalasa en la línea resistente, enzima clave para disminuir los niveles de ROS cuya acumulación facilita el proceso de infección a patógeno necrotróficos. Así mismo se detectó que el intermediario de la foto-respiración glicina actúa como un centro específico de regulación en la línea resistente, sugiriendo que podría jugar un papel preponderante en la regulación de los mecanismos de defensa contra este patógeno.
- Los niveles de los metabolitos que censan el estado del nitrógeno celular, como el glutamato y asparragina mostraron un comportamiento contrastante en las dos líneas contrastantes. Mientras que en la línea susceptible estos dos metabolitos aumentan luego de la inoculación, en la línea resistente ocurre lo contrario, proporcionando más evidencias en apoyo a la idea de que la re-mobilización del nitrógeno es diferencialmente disparada en ambas líneas. Asimismo en la línea susceptible se identificaron aumentos en los niveles de prolina, aminoácido que ha sido asociado a susceptibilidad a patógenos en otros sistemas, a lo largo del proceso de infección, remarcando la importancia del mismo en este proceso infeccioso.
- A través de la construcción de clonotecas diferenciales obtenidas por técnica SSH a partir de flores de girasol inoculadas de la línea moderadamente resistente a los 2 y 4 días post inoculación, se identificaron 904 clones únicos, de los cuales 146 representan secuencias no descriptas previamente para girasol que representan secuencias expresadas nuevas para girasol. La mayoría de estas secuencias presentan similitud a

genes involucrados en la traducción y procesamiento de proteínas, así como también un gran número de secuencias involucradas en respuesta a estreses tanto bióticos como abióticos.

- Si bien se identificaron diferencias en los perfiles transcripcionales entre plantas inoculadas y plantas inoculadas con agua para algunos de los genes candidatos analizados por qRT-PCR (quitinasa, elemento de respuesta a etileno y factor de transcripción de tipo WRKY) a tiempos tempranos post inoculación, para un número importante de genes evaluados, se detectan niveles de expresión altos aun en condiciones control. Esto confirma la presencia de factores de defensa pre existente en flores, previo a la infección del patógeno, en el genotipo resistente.
- Los análisis de perfiles hormonales para las fitohormonas Acido salicílico (SA) y Acido jasmónico (JA) en flores de girasol a distinto tiempo post inoculación revelaron diferencias entre ambas líneas. En el caso de JA, la disminución de los niveles de este regulador a tiempos tempranos post inoculación en la línea susceptible así como un menor nivel de esta hormona al día 4 post inoculación en esta línea, en comparación con la línea resistente, indicarían una posible asociación entre niveles de JA y respuestas de defensa diferenciales entre ambas líneas. Por otro lado, el SA no contribuiría a la resistencia a *S. sclerotiorum* dado que no se identificaron cambios en los perfiles de SA en la línea moderadamente resistente. Sin embargo la identificación de aumento en los niveles de SA en flores inoculadas de la línea susceptible a partir del día 1 post inoculación indicaría que este patógeno necrótico induce la acumulación de SA en los tejidos enfermos.

Este trabajo constituye el primer estudio integrado de cambios a nivel metabólico y transcripcional que tiene lugar en estadios tempranos del proceso de infección de flores de girasol por el patógeno necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum*, en dos líneas contrastantes en su respuesta al mismo. Dada la complejidad de la base genética de la resistencia a este patógeno, la identificación de marcadores metabólicos así como de marcadores funcionales derivados de genes candidatos que permitan discriminar entre líneas resistentes y susceptibles representa una importante contribución a la generación de herramientas genómicas de utilidad al mejoramiento asistido.

7. REFERENCIAS

- Abawi, G. S. & Grogan, R. G. (1979) Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, 69: 899-904.
- Abood, J. K. & Lösel, D. M. (2003) Changes in carbohydrate composition of cucumber leaves during the development of powdery mildew infection. *Plant Pathol.* 52: 256-265.
- Adams, P. B. & Ayers, W. A. (1979) Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, 69: 896-899.
- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Method. Enzymol.* 105: 121-125
- Agrios, G. N. (1997) *Plant Pathology*, 4th edn. San Diego: Academic Press.
- Akopyants, N. S., Fradkov, A., Diatchenko, L., Hill, J. E., Siebert, P. D., Lukyanov, S. A., Sverdlov, E. D., Berg, D. E. (1998) PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 (22): 13108-13113.
- Al-Chaarani, G. R., Roustae, A., Gentzbittel, L., Mokrani, L., Barrault, G., Dechamp-Guillaume, G., Sarrafi, A. (2002) A QTL analysis of sunflower partial resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines (RILs). *Theor. Appl. Genet.* 104: 490-496.
- Al-Chaarani, G. R., Gentzbittel, L., Huang, X.Q., Sarrafi, A. (2004) Genotypic variation and identification of QTLs of agronomic traits, using AFLP and SSR markers in RILs of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 109, 1353-1360.
- Alghisi, P. & Favaron, F. (1995) Pectin-degrading enzymes and plant parasite interactions. *Eur. J. Plant Pathol.* 101: 365-375.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Amsellem, Z., Cohen, B. A., Gressel, J. (2002) Engineering hypovirulence in a mycoherbicidal fungus for efficient weed control. *Nat. Biotechnol.* 20: 1035-1039.
- Andreasson, E., Jenkins, T., Brodersen, P., Thorgrimsen, S., Petersen, N. H., Zhu, S., Qiu, J. L., Micheelsen, P., Rocher, A., Petersen, M., Newman, M. A., Bjorn Nielsen, H., Hirt, H., Somssich, I., Mattsson, O., Mundy, J. (2005) The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *EMBO J.* 24: 2579-89.
- Annis, S. L. & Goodwin, P. H. (1997) Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes in plant pathogenic fungi. *Eur. J. Plant Pathol.* 103: 1-14.

Anonymous (2005) Sclerotinia Initiative Brochure. Fargo, ND: United States Department of Agriculture, www.whitemoldresearch.com.

ASAGIR. Asociación Argentina de girasol, 2008. <http://www.asagir.org.ar/asagir2008/>

Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Buttlar, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinsky, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T. (2000) The gene Ontology Consortium. *Nature Genet.* 25: 25-29

Asif, M. H., Dhawan, P., Nath, P. (2000) A simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 18 (2): 109-115.

Asselbergh, B., Curvers, K., Franca, S. C., Audenaert, K., Vuylsteke, M., Van Breusegem, F., Hofte, M. (2007) Resistance to *Botrytis cinerea* in sitiens, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiol.* 144: 1863-1877.

Aukerman, M.J., Sakai, H. (2003) Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell*, 15: 2730-2741. doi:10.1105/tpc.016238.

Bae, H., Moon, S.K., Richard, C. S., Bae, H.-J., Bailey, B. (2006) Necrosis and ethylene inducing peptide from *Fusarium oxysporum* induces a complex cascade of transcripts associated with signal transduction and cell death in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 141: 1056-1067.

Bailey, B. A. (1995) Purification of a protein from culture filtrate of *Fusarium oxysporum* that induces ethylene and necrosis in leaves of *Erythroxylum coca*. *Phytopathology*, 85: 1250-1255.

Baldini, M., Turi, M., Vischi, M., Vannozzi, G., Olivieri, P. (2002) Evaluation of genetic variability for *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary resistance in sunflower and utilization of associated molecular markers. *Helia*, 25(86): 177-190.

de Bary, A. (1886) Ueber einige Sclerotinien and Sclerotienkrankheiten. *Bot. Zeitung*, 44: 377-474.

Basse, C. & Steinberg, G. (2004) *Ustilago maydis*, a model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity. *Mol. Plant Pathol.* 4: 83-92.

Bateman, D. F. (1964) An induced mechanism of tissue resistance to polygalacturonase in Rhizoctonia-infected hypocotyls of bean. *Phytopathology*, 54: 438-445.

- Bateman, D. F. & Beer, S. V. (1965) Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotinia rolfii*. *Phytopathology*, 55: 204-211.
- Baxter, C. J., Redestig, H., Schauer, N., Repsilber, D., Patil, K.R., Nielsen, J., Selbig, J., Liu, J., Fernie, A. R., Sweetlove, L. J., (2007). The metabolic response of heterotrophic *Arabidopsis* cells to oxidative stress. *Plant Physiol.* 143: 312-325.
- Bell, A. A. & Wheeler, M. H. (1986) Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24: 411-451.
- Bednarek, P., Schneider, B., Svatos, A., Oldham, L.J., Hahlbrock, K. (2005) Structural complexity, differential response to infection, and tissue specificity of indolic and phenylpropanoid secondary metabolism in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* 38:1058-1070.
- Berger, S., Sinha, A. K., Roitsch, T. (2007) Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany*, 58 (15-16): 4019-4026.
- Berna, A., Bernier, F. (1997) Regulated expression of wheat germin gene in tobacco: oxalate oxidase activity and apoplastic localization of the heterologous protein. *Plant Molecular Biology* 33: 417-29.
- Bernier F. & Berna A. (2001) Germins and germin-like proteins: plant do-all proteins, but what do they do exactly? *Plant Physiol. Biochem.* 39: 545-554
- Berri, S., Abbruscato, P., Faivre-Rampant, O., Brasileiro, A. C.M., Fumasoni, I., Satoh, K., Kikuchi, S., Mizzi, L., Morandini, P., Pè, M.E., Piffanelli, P. (2009) Characterization of WRKY co-regulatory networks in rice and *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* 9:120
- Bert, P. F., Dechamp-Guillaume, G., Serre, F., Jouan, I., De Labrouhe, D. T., Nicolas, P., Vear, F. (2004) Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 3. Characterisation of QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phoma macdonaldi*. *Theor. Appl. Genet.* 109: 865-874.
- Bert, P. F., Jouan, I., De Labrouhe, D. T., Serre, F., Nicolas, P., Vear, F. (2002) Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L) 1. QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Diaporthe helianthi*. *Theor. Appl. Genet.* 105: 985-993.
- Boland, G. J. & Hall, R. (1987) Evaluating soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* under field conditions. *Plant Dis.* 71: 934-936.

Boland, G. J. & Hall, R. (1994) Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. Can. J. Plant Pathol. 16: 93-108.

Bolton, M. D., Thomma, B. P. H. J., Nelson, B. D. (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. Mol. Plant Pathol. 7(1): 1-16

Boller, T. (1995). Chemoperception of microbial signals in plant cells. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46: 189-214.

Brogue, K., Chet, I., Holliday, M., Cressman, R., Biddle, P., Knowlton, S., Mauvais, C. J., Broglie, R. (1991) Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. Science, 254: 1194-1197.

Bruniard J. M. (2002). Presente y Futuro de la Investigación en Girasol en Argentina. IDIA XXI: 140-143

Bui, L. C., Léandri, R. D., Renard, J. P., Duranthon, V. (2005) SSH adequacy to preimplantation mammalian development: Scarce specific transcripts cloning despite irregular normalization. BMC Genomics, 6:155. doi: 10.1186/1471-2164-6-155

Bufe, A., Spangfort, M. D., Kahlert, H., Schlaak, M., Becker, W-M. (1996) The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity. Planta, 199: 413-415

Bulawa, C. E., Miller, D. W., Henry, L. K., Becke, J. M. (1995) Attenuated virulence of chitin-deficient mutants of *Candida albicans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 10570-10574.

Burke, J. M. & Riesenber, L. H. (2003) Fitness effect of transgenic disease resistance in sunflowers. Science 300: 1250.

Bussink, H., Buxton, F., Fraaye, B., de Graaff, L., Visser, J. (1992) The polygalacturonases of *Aspergillus niger* are encoded by a family of diverged genes. Eur. J. Biochem. 208: 83-90.

Cao, H., Bowling, S. A., Gordon, S. A., Dong, X. (1994) Characterization of an Arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. Plant Cell 6:1583-1592.

Campbell, C. L. & Madden, L. V., (1990). Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley and Sons, New York.

Caprari, C., Bergmann, C., Micheli, Q., Salvi, C., Alberheim, P., Darvill, A., Cervone, F., De Lorenzo, G. (1993) *Fusarium moniliforme* secretes four endopolygalacturonases derived from a single gene product. Physiol. Mol. Plant Pathol. 43: 453-462.

- Carpita, N. C. & Gibeaut, D. M. (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the wall during growth. *Plant J.* 3: 1-30.
- Carter, C., Graham, R. A., Thornburg, R. W. (1998) *Arabidopsis thaliana* contains a large family of germin-like proteins: characterization of cDNA and genomic sequences encoding 12 unique family members. *Plant Mol. Biol.* 38: 929-943.
- Carter, C., Graham, R. A., Thornburg, R. W. (1999) Nectarin I is a novel, soluble germin-like protein expressed in the nectar of *Nicotiana sp.* *Plant Mol. Biol.* 41: 207-216.
- Carter, C., Thornburg, R. W. (2000) Tobacco nectarin I – purification and characterization as a germin-like, manganese superoxide dismutase implicated in the defense of floral reproductive tissues. *J. Biol. Chem.* 275: 36726-36733
- Cessna, S. G., Sears, V. E., Dickman, M. B., Low, P. S. (2000) Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *Plant Cell*, 12: 2191-2200
- Chan, K-L., Ho, C-L., Namasivayam, P., Napis, S. (2007) A simple and rapid method for RNA isolation from plant tissues with high phenolic compounds and polysaccharides. *Nature Protocols*, 184. DOI: 10.1038/nprot.2007.184
- Chandra-Shekara, A.C., Venugopal, S.C., Barman, S.R., Kachroo, A., Kachroo, P., 2007. Plastidial fatty acid levels regulate resistance gene-dependent defense signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 7277–7282.
- Chang, S., Puryear, J., Cairney, J. (1993) A simple method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11: 113-116
- Chaves, F. C. & Gianfagna, T. J. (2007) Necrotrophic phase of *Moniliophthora perniciosa* causes salicylic acid accumulation in infected stems of cacao. *Physiol. Mol. Plant P.* 69: 104-108. doi:10.1016/j.pmpp.2007.02.003
- Chen, C. & Dickman, M. B. (2005) cAMP blocks MAPK activation and sclerotial development via Rap-1 in a PKA-independent manner in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mol. Microbiol.* 55: 299-311.
- Chen, C., Harel, A., Gorovoits, R., Yarden, O., Dickman, M. B. (2004) MAPK regulation of sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum* is linked with pH and cAMP sensing. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 17: 404-413.
- Chou, H. M., Bundock, N., Rolfe, S. A., Scholes, J. D. (2000) Infection of *Arabidopsis thaliana* leaves with *Albugo Candida* (white blister rust) causes a reprogramming of host metabolism. *Mol. Plant Pathol.* 1: 99-113.

Christensen, B. & Nielsen, J. (2000) Metabolic network analysis. A powerful tool in metabolic engineering. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2000;66: 209-231.

Christensen, A. B., Thordal-Christensen, H., Zimmermann, G., Gjetting, T., Lyngkjaer, M. F., Dudler, R., Schweizer, P. (2004) The germin-like protein GLP4 exhibits superoxide dismutase activity and is an important component of quantitative resistance in wheat and barley. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17: 109-117.

Christias, C. & Lockwood, J. L. (1973) Conversion of mycelial constituents in four sclerotium-forming fungi in nutrient deprived conditions. *Phytopathology*, 63: 602-605.

Chung, H. S., Koo, A. J. K., Gao, X., Jayanty, S., Thines, B., Jones, A. D., Howe, G. A. (2008) Regulation and Function of Arabidopsis JASMONATE ZIM-Domain Genes in Response to Wounding and Herbivory. *Plant Physiol.* 146: 952-964

Clarkson, J. P., Staveley, J., Phelps, K., Young, C. S., Whipps, J. M. (2003) Ascospore release and survival in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycol. Res.* 107: 213-222.

Cober, E. R., Rioux, S., Rajcan, I., Donaldson, P. A., Simmonds, D. H. (2003) Partial resistance to white mold in a transgenic soybean line. *Crop Sci.* 43:92-95.

CONICET. La Argentina en Mapas: Evolución de la Agricultura. <http://www.laargentinaenmapas.com.ar/>

Cotton, P., Kasza, Z., Bruel, C., Rasclé, C., Fèvre, M. (2003) Ambient pH controls the expression of endopolygalacturonase genes in the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 227: 163-169.

CREA. (2010) El girasol tendrá la peor campaña de los últimos 28 años. Portal Institucional <http://www.redcrea.org.ar/aacrea/site/PortalInstitucional-internet>.

Cunha, W. G., Tinoco, M. L. P., Pancoti, H. L., Ribeiro, R. E., Aragão, F. J. L. (2010), High resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in transgenic soybean plants transformed to express an oxalate decarboxylase gene. *Plant Pathol.* 59:654-660

Dana Farber Cancer Institute T.G.I.P.* The Helianthus annuus Gene Index (HaGI) <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/qireport.pl?gudb=Sunflower><
<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/qireport.pl?gudb=Sunflower%5d...>>

Davis, K. R., Darvill, A. G., Albersheim, P., Dell, A. (1986) Host-pathogen interactions. XXIX. Oligogalacturonides released from sodium polypectate by endopolygalacturonic acid lyase are elicitors of phytoalexin in soybean. *Plant Physiol.* 80: 568-577.

- Day, R. B., Akimoto, C., Nishizawa, Y., Yazaki, J., Nakamura, K., Fujii, F., Shimb, K., Yamamoto, K., Sakata, K., Sasaki, T., Kishimoto, N., Kikuchi, S., Shibuya, N., Minami, E. (2002) Large-scale identification of elicitor-responsive genes in suspension-cultured rice cells by DNA microarray. *Plant Biotechnol.* 19: 153-155.
- Dallal Bashi, Z., Hegedus, D. D., Buchwaldt, L., Rimmer, S. R., Borhan, M. H. (2010) Expression and regulation of *Sclerotinia sclerotiorum* necrosis and ethylene-inducing peptides (NEPs). *Mol. Plant Pathol.* 11: 43-53.
- Daohong, W., Bochu, W., Biao, L., Chuanren, D., Jin, Z. (2004) Extraction of total RNA from *Chrysanthemum* containing high levels of phenolic and carbohydrates. *Colloid. Surface B.* 36(2): 111-114
- De Lorenzo, G., D'Ovidio, R., Cervone, F. (2001) The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39: 313-335.
- Depuydt, S., Trenkamp, S., Fernie, A. R., Elftieh, S., Renou, J-P., Vuylsteke, M., Holsters, M., Vereecke, D. (2009) An Integrated Genomics Approach to Define Niche Establishment by *Rhodococcus fascians*. *Plant Physiol.* 149: 1366-1386.
- Desai, S., Hill, J., Trelogan, S., Diatchenko, L., Siebert, P. (2000) Identification of differentially expressed genes by suppression subtractive hybridization, in *Functional Genomics* (Hunt, S. P. and Livesey, F. J., eds.), Oxford University Press, 81-111.
- Desbrosses, G., Kopka, J., Udvardi, M. K. (2005) *Lotus japonicus* Metabolic Profiling. Development of Gas Chromatography-Mass Spectrometry Resources for the Study of Plant-Microbe Interactions. *Plant Physiol.* 137: 1302-1318.
- Dias, B. B. A., Cunha, W. G., Morais, L. S., Vianna, G. R., Rech, E. L., de Capdeville, G., Aragão, F. J. L. (2006) Expression of an oxalate decarboxylase gene from *Flammulina* sp. in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) plants and resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathol.* 55: 187-193
- Diatchenko, L., Lau, Y. F. C., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D., Siebert, P.D. (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 6025-6030.
- Diatchenko, L., Chenchik, A., Siebert, P. D. (1998) Suppression subtractive hybridization: a method for generating subtracted cDNA libraries starting from poly (A⁺) or total RNA. In *RT-PCR Methods for gene cloning and analysis*. Eds Siebert, P. & Larrik, J. (Bio Techniques Books, MA) pp. 213-239.

Dickman, M. B. & Mitra, A. (1992) *Arabidopsis thaliana* as a model for studying *Sclerotinia sclerotiorum* pathogenesis. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41: 255-263.

Dickman, M. B., Park, Y. K., Oltersdorf, T., Li, W., Clemente, T., French, R. (2001) Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 98: 6957-6962.

Divon, H. H., Ziv, C., Davydov, O., Yarden, O., Fluhr, R. (2006) The global nitrogen regulator, FNR1, regulates fungal nutrition-genes and fitness during *Fusarium oxysporum* pathogenesis. *Mol. Plant Pathol.* 7: 485-497.

Donaldson, P. A., Anderson, T., Lane, B. G., Davidson, A. L., Simmonds, D. H. (2001) Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat gf-2.8 (germin) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 59: 297-307.

Druka, A., Kudrna, D., Kannangara, C. G., von Wettstein, D., Kleinhofs, A. (2002) Physical and genetic mapping of barley (*Hordeum vulgare*) germin-like cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 850-855

Dumas, B., Sailland, A., Cheviet, J. P., Freyssinet, G., Pallett, K. (1993) Identification of barley oxalate oxidase as a germin-like protein. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III-Sciences de la Vie.* 316: 793-798.

Dulermo, T., Rasclé, C., Chinnici, G., Gout, E., Bligny, R., Cotton, P. (2009) Dynamic carbon transfer during pathogenesis of sunflower by the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*: from plant hexoses to mannitol. *New Phytologist*, 183: 1149–1162.

Durgbanshi A, Arbona V, Pozo O, Miersch O, Sancho J. V, Gómez-Cadenas A (2005) Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 53: 8437–8442.

Dutton, M. V. & Evans, C. S. (1996) Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Can. J. Microbiol.* 42: 881-895.

Eckardt, N.A. (2008) Chitin Signaling in Plants: Insights into the Perception of Fungal Pathogens and Rhizobacterial Symbionts. *Plant Cell*, 20: 241-243.

Emine, Z. Y. & Sule, P. (2004) Purification and characterization of pear (*Pyrus communis*) polyphenol oxidase. *Turk. J. Chem.* 28: 547-557.

Escande, A. R., Laich, F. S., Pedraza, M. V. (2002) Field testing of honeybee-dispersed *Trichoderma spp.* to manage sunflower head rot (*Sclerotinia sclerotiorum*). *Plant Pathol.* 51: 346-351.

Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S., Somssich, I.E. (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* 5: 199-206.

Eulgem T, Somssich IE (2007) Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr Opin Plant Biol* 10: 366–371

Favaron, F., Sella, L., D'Ovidio, R. (2004) Relationships among endopolygalacturonase, oxalate, pH, and plant polygalacturonase inhibiting protein (PGIP) in the interaction between *Sclerotinia sclerotiorum* and soybean. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17: 1402-1409.

Fellbrich, G., Romanski, A., Varet, A., Blume, B., Brunner, F., Enelhardt, S., Felix, G., Kemmerling, B., Krzymowska, M., Nurnberger, T. (2002) NPP1, a Phytophthora-associated trigger of plant defense in parsley and Arabidopsis. *Plant J.* 32: 375-390.

Fernie, A.R. (2007). The future of metabolic phytochemistry: larger numbers of metabolites, higher resolution, greater understanding. *Phytochemistry* 68, 2861–2880.

Fernie, A.R., Trethewey, R.N., Krotzky, A.J., Willmitzer, L. (2004). Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 1–7.

Ferrar, P. H. & Walker, J. R. L. (1993) o-Diphenol oxidase inhibition - an additional role for oxalic acid in the phytopathogenic arsenal of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium rolfsii*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 43: 415-422.

Ferrari, S., Plotnikova, J. M., De Lorenzo, G., Ausubel, F. M. (2003) Arabidopsis local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. *Plant J.* 35: 193-205.

Fernandez, P., Paniego, N., Lew, S., Hopp, H. E., Heinz, R. A. (2003) Differential representation of sunflower ESTs in enriched organ-specific cDNA libraries in a small scale sequencing project. *BMC Genomics*, 4:40. doi: 10.1186/1471-2164-4-40

Fernandez, P., Di Rienzo, J., Fernandez, L., Hopp, H. E., Paniego, N., Heinz, R. A. (2008) Transcriptomic identification of candidate genes involved in sunflower responses to chilling and salt stresses based on cDNA microarray analysis. *BMC Plant Biol.* 8(1):11. doi:10.1186/1471-2229-8-11

Fiehn, O., Kopka, J., Dörmann, P., Altmann, T., Trethewey, R. N., Willmitzer, L. (2000) Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat. Biotechnol.* 18: 1157-1161.

Fotopoulos, V., Gilbert, M. J., Pittman, J. K., Marvier, A.C., Buchanan, A.J., Sauer, N., Hall, J. L., Williams, L. E. (2003) The monosaccharide transporter gene, AtSTP4, and the cell-wall invertase, Atbfruct1, are induced in Arabidopsis during infection with the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiol.* 132: 821-829.

Fraissinet-Tachet, L. & Fèvre, M. (1996) Regulation by galacturonic acid of pectinolytic enzyme production by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Curr. Microbiol.* 33: 49-53.

Fraissinet-Tachet, L., Reymond-Cotton, R., Fèvre, M. (1995) Characterization of a multigene family encoding an endopolygalacturonase in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Curr. Microbiol.* 29: 96-100.

Friedrich, L., Vernooij, B., Gaffney, T., Morse, A., and Ryals, J. (1995). Characterization of tobacco plants expressing a bacterial salicylate hydroxylase gene. *Plant Mol. Biol.* 29: 959-968.

Fuckel, L. (1870) *Symbolic mycologicae. Beitrage zur Kenntniss der Rheinischen Pilze.* Jhrb. Nassauischen Vercins Naturk. 23, 1–459.

Funk, V. A., Bayer, R. J., Keeley, S., Chan, R., Watson, L., Gemeinholzer, B., Schilling, E., Panero, J. L., Baldwin, B. G., Garcia-Jagas, N., Susanna, A., Jansen, R. K. (2005) Everywhere but Antarctica: using a supertree to understand the diversity and distribution of the *Compositae*. *Biol Skr* 55: 343-374.

Fusari, C. M., Lia V.V., Nishinakamasu, V., Zubrzycki, J. E., Puebla A.F., Alberto E. Maligne, A.E, Hopp, E.H , Heinz R. A , Paniego, N. (2010) Single nucleotide polymorphism genotyping by heteroduplex analysis in sunflower (*Helianthus annuus* L.) *Molec. Breeding.* DOI: 10.1007/s11032-010-9462-9

Gao, S., Choi, G. H., Shain, L., Nuss, D. L. (1996) Cloning and targeted disruption of *enpg-1*, encoding the major in vitro extracellular endopolygalacturonase of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1984-1990.

Garcia, O., Macedo, J., Tiburcio, R., Zapparoli, G., Rincones, J., Bittencourt, L., Ceita, G., Micheli, F., Gesteira, A., Mariano, A., Schiavinato, M., Medrano, F., Meinhardt, L., Pereira, G., Cascardo, J. (2007) Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. *Mycol. Res.* 3: 443-455.

Garcia-Maceira, F.I., Di Pietro, A., Huertas-Gonzalez, M.D., Ruiz-Roldan, M.C., Roncero, M. I. G. (2001) Molecular characterization of an endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* expressed during early stages of infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2191-2196.

Gentzbittel, L., Mouzeyar, S., Badaoui, S., Mestries, E., Vear, F., Tourvieille De Labrouhe, D., Nicolas, P. (1998) Cloning of molecular markers for disease resistance in sunflower, *Helianthus annuus* L. *Theor. Appl. Genet.* 96: 519-525.

Gentzbittel, L., Abbott, A., Galaud, J. P., Georgi, L., Fabre, F., Liboz, T., Alibert, G. (2002) A bacterial artificial chromosome (BAC) library for sunflower, and identification of clones containing genes for putative transmembrane receptors. *Mol. Genet. Genomics*, 266: 979-987

- Giacomelli, J. I., Ribichich, K. F., Dezar, C. A., Chan, R.L. (2010) Expression analyses indicate the involvement of sunflower WRKY transcription factors in stress responses, and phylogenetic reconstruction reveal the existence of a novel clade in the *Asteraceae*. *Plant Sci.* 178(4): 398-410.
- Gijzen, M. & Nürnberger, T. (2006) Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. *Phytochemistry*, 67: 1800-1807.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 205-227.
- Godfrey, D., Able, A. J., Dry, I. B. (2007) Induction of a grapevine germin-like protein (VvGLP3) gene is closely linked to the site of *Erysiphe necator* infection: A possible role in defense?. *Mol Plant-Microbe Interact.* 20(9): 1112-1125.
- Godoy, G., Steadman, J. R., Dickman, M. B., Dam, R. (1990) Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 37: 179-191.
- Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Williams, T. D., Nagaraj, S. H., Nueda, M. J., Robles, M., Talón, M., Dopazo, J., Conesa, A. (2008) High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucl. Acids Res.* 36(10): 3420-3435.
- Grau, C. R., Radke, V. L., Gillespie, F. L. (1982) Resistance of soybean cultivars to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis.* 66: 506-508.
- Grovin, E. M. & Levine, A. (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by necrotrophic pathogen *Botrytis Cinerea*. *Curr. Biol.* 10: 3703-3711
- Guimarães, R. L. & Stotz, H. U. (2004) Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. *Plant Physiol.* 136: 3703-3711.
- Guimerà, R., Nunes Amaral, L. A. (2005) Functional cartography of complex metabolic networks. *Nature* 433, 895–900.
- Guo, X. & Stotz, H. U. (2007) Defense against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis* is dependent on jasmonic acid, salicylic acid, and ethylene signaling. *Mol Plant-Microbe Interact.* 20(11): 1384-1395.
- Gurskaya, N. G., Diatchenko, L., Chenchik, A., Siebert, P. D., Khaspekov, G. L., Lukyanov, K. A., Vagner, L. L., Ermolaeva, O. D., Lukyanov, S. A., Sverdlov, E. D. (1996) Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristat 13-acetate. *Anal. Biochem.* 240: 90-97.

Hahn, V. (2002) Genetic variation for resistance to *Sclerotinia* head rot in sunflower inbred lines. *Field Crops Res.* 77:153-159.

Hall, J. L. & Williams, L. E. (2000) Assimilate transport and partitioning in fungal biotrophic interactions. *Aust. J. Plant Pathol.* 27: 549-559

Hancock, J. C. (1966) Degradation of pectic substances associated with pathogenesis by *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower and tomato stems. *Phytopathology*, 56: 975-979.

Harel, A., Gorovits, R., Yarden, O. (2005) Changes in protein kinase A activity accompany sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, 95: 397-404.

ten Have, A., Mulder, W., Visser, J., van Kan, J. A. (1998) The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinera*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 1009-1016.

Hegedus, D., Li, R., Buchwaldt, L., Parkin, I., Whitwill, S., Coutu, C., Bekkaoui, D. and Rimmer, R. (2008) *Brassica napus* possesses an expanded set of polygalacturonase inhibitor protein genes that are differentially regulated in response to *Sclerotinia sclerotiorum* infection, wounding and defence hormone treatment. *Planta*, 228: 241–253.

Henson, J. M., Butler, M. J., Day, A.W. (1999) The dark side of mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 447-471.

Heywood, V. H. (1978) *Flowering Plants of the World*. Mayflower Books, New York.

Hoffmann-Sommergruber K. (2000) Plant allergens and pathogenesis-related proteins What do they have in common? *Int. Arch. Allergy Immunol.* 122: 155-66

Holley, R. C. & Nelson, B. (1986) Effect of plant population and inoculums density on incidence of *Sclerotinia* wilt of sunflower. *Phytopathology*, 76: 71-74.

Hu, X., Bidney, D. L., Yalpani, N., Duvick, J. P., Crasta, O., Folkerts, O., Lu, G. (2003) Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiol.* 133: 170-181.

Huang, X., Madan, A (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9: 868-877.

Ingaramo, J. (2010) Girasol: volver a ser los primeros. Agrositio. <http://www.agrositio.com/vertex/vertex.asp?id=110365&se=1001>

Inglis, G. D. & Boland, G. J. (1990) The microflora of bean and rapeseed petals and the influence of the microflora of bean petals on white mold. *Can. J. Plant Pathol.* 12: 129-134.

- Jach, G., Gornhardt, B., Mundy, J., Logemann, J., Pinsdorf, E., Leah, R., Schell, J., Maas, C. (1995) Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J.* 8: 97-109.
- Jennings, J. C., Apel-Birkhold, P. C., Mock, N. M., Baker, C. J., Anderson, J. D, Bailey, B. A. (2001) Induction of defense responses in tobacco by the protein Nep1 from *Fusarium oxysporum*. *Plant Sci.* 161: 891-899.
- Ji, W., Wright, M. B., Cai, L., Flament, A., Lindpaintner, K. (2002) Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes. *BMC Genomics*, 3:12. doi:10.1186/1471-2164-3-12
- Jiang, Y. & Deyholos, M.K. (2006) Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed *Arabidopsis* roots reveals novel classes of responsive genes, *BMC Plant Biol.* 6: 25.
- Jiang, Y. & Deyholos, M. K. (2009) Functional characterization of *Arabidopsis* NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses, *Plant Mol. Biol.* 69: 91-105.
- Jin, H., Cheng, X., Diatchenko, L., Siebert, P. D., Huang, C. C. (1997) Differential screening of a subtracted cDNA library: a method to search for genes preferentially expressed in multiple tissues. *BioTechniques*, 23: 1084-1086.
- Jobic, C., Boisson, A. M., Gout, E., Rasclé, C., Fevre, M., Cotton, P., Bligny, R. (2007) Metabolic processes and carbon nutrient exchanges between host and pathogen sustain the disease development during sunflower infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Planta*, 226: 251-265.
- Johnson, C. S., Kolevski, B., Smyth, D. R. (2002) TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor, *Plant Cell* 14:1359-1375.
- Jores, J., Appel, B., Lewin, A. (2003) Cloning and molecular characterization of a unique hemolysin gene of *Vibrio pommerensis* sp. Nov.: development of a DNA probe for the detection of the hemolysin gene and its use in identification of related *Vibrio* spp. from the Baltic Sea. *FEMS Microbiol. Lett.* 229: 223-229.
- Jurick, W. M. I. I., Dickman, M. B., Rollins, J. A. (2004) Characterization and functional analysis of a cAMP-dependent protein kinase A catalytic subunit gene (*pka1*) in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 64: 155-163.
- Jubault, M., Hamon, C., Gravot, A., Lariagon, C., Delourme, R., Bouchereau, A., Manzanares-Dauleux, M.J. (2008) Differential regulation of root arginine catabolism and polyamine metabolism in clubroot-susceptible and partially resistant *Arabidopsis* genotypes. *Plant Physiol.* 146: 2008-2019.

- Kachroo, A., Daqi, F., Havens, W., Navarre, D., Kachroo, P., Ghabrial, S. (2008). An oleic acid-mediated pathway induces constitutive defense signaling and enhanced resistance to multiple pathogens in soybean. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21: 564-575.
- Kachroo, A., Venugopal, S. C., Lapchyk, L., Falcone, D., Hildebrand, D., Kachroo, P. (2004). Oleic acid levels regulated by glycerolipid metabolism modulate defense gene expression in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 5152–5157.
- Kars, I., Krooshof, G. H., Wagemakers, L., Joosten, R., Benen, J. A. E., van Kan, J. A. L. (2005) Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *Plant J.* 43: 213-225.
- Kars, I. & van Kan, J. A. L. (2004) Extracellular enzymes and metabolites involved in pathogenesis of *Botrytis*. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. (Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N., eds). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 99-118.
- Kasza, Z., Vagvölgyi, C., Fèvre, M., Cotton, P. (2004) Molecular characterization and in planta detection of *Sclerotinia sclerotiorum* endopolygalacturonase genes. *Curr. Microbiol.* 48: 208-213.
- Keates, S.E., Kostman, T.A., Anderson, J.D. and Bailey, B.A. (2003) Altered gene expression in three plant species in response to treatment with Nep1, a fungal protein that causes necrosis. *Plant Physiol.* 132: 1610-1622.
- Keon, J. P. R., Byrde, R.J.W., Cooper, R. M. (1987) Some aspects of fungal enzymes that degrade plant cell walls. In *Fungal Infection of Plants* (Pegg, G.F. and Ayres, P.G., eds). Cambridge: Cambridge University Press, pp. 133-157.
- Kesarwani, M., Azam, M., Natarajan, K., Mehta, A., Datta, A. (2000) Oxalate decarboxylase from *Collybia velutipes*. Molecular cloning and its overexpression to confer resistance to fungal infection in transgenic tobacco and tomato. *Journal of Biological Chemistry* 275: 7230-8.
- Kesseli, R. V, Michelmore, R. W. (1997) The Compositae: systematically fascinating but specifically neglected. In: *Genome Mapping in Plants*, A.H. Paterson ed. R.G. Landes Co. Georgetown, TX. pp: 179-191.
- Kiani, S. P., Talia, P., Maury, P., Grieu, P., Heinz, R., Perrault, A., Nishinakamasu, V., Hopp, E., Gentzbittel, L., Paniego, N., Sarrafi, A. (2007) Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. *Plant Sci.* 172: 773-787.

Kim, H. S. & Diers, B. W. (2000) Inheritance of partial resistance to *Sclerotinia* stem rot in soybean. *Crop Sci.* 40: 55-61.

Kim, K. S., Min, J. Y., Dickman M. (2008) Oxalic Acid an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21(5): 605-612.

Knecht, K., Seyffarth, M., Desel, C., Thurau, T., Sherameti, I., Lou, B., Oelmüller, R., Cai, D. (2010) Expression of *BvGLP-1* Encoding a Germin-Like Protein from Sugar Beet in *Arabidopsis thaliana* Leads to Resistance Against Phytopathogenic Fungi. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23(4): 446-457.

Kocal, N., Sonnewald, U., Sonnewald, S. (2008) Cell wall bound invertase limits sucrose export and is involved in symptom development and inhibition of photosynthesis during compatible interaction between tomato and *Xanthomonas campestris pv vesicatoria*. *Plant Physiol.* 148, 1523–1536.

Koonjul, P. K., Brandt, W. F., Farrant, J. M., Linddsey G. G (1999) Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contaminations of RNA. *Nucleic Acids Res.* 27(3):915-916.

Korkina, L. G. (2007) Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Cell Mol. Biol.* 53: 15-25.

Kotsira, V.P. & Clonis, Y. D. (1997) Oxalate oxidase from barley roots: purification to homogeneity and study of some molecular, catalytic, and binding properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 340: 239-49.

Kurian, P. & Stelzig, D. A. (1979) The synergistic role of oxalic acid and endopolygalacturonase in bean leaves infected by *Cristulariella pyramidalis*. *Phytopathology*, 69: 1301-1304.

Laluk, K. & Mengiste, T. (2010) Necrotroph Attacks on Plants: Wanton Destruction or Covert Extortion? In *The Arabidopsis Book*, Vol. null (16 September 2010), 1-34.

Lane, B. G., Bernier, F., Dratewka-Kos, E., Shafai, R., Kennedy, T. D., Pyne, C., Munro, J. R., Vaughan, T., Walters D., Altomare, F. (1991) Homologies between members of the germin gene family in hexaploid wheat and similarities between these wheat germins and certain *Physarum* spherulins. *J. Biol. Chem.* 266: 10461-10469.

Lane, B. G., Dunwell, J. M., Ray, J. A., Schmitt, M. R., Cuming, A. C. (1993) Germin, a protein marker of early plant development, is an oxalate oxidase. *J. Biol. Chem.* 268: 12239-12242.

- Li, R., Rimmer, R., Buchwaldt, L., Sharpe, A. G., Senguin-Swartz, G., Hegedus, D. D. (2004) Interaction of *Sclerotinia sclerotiorum* with *Brassica napus*: cloning and characterization of endo- and exopolygalacturonases expressed during saprophytic and parasitic modes. *Fungal Genet. Biol.* 41: 754-765.
- Liang, H., Maynard, C. A., Allen, R. D., Powell, W. A. (2001) Increased *Septoria musiva* resistance in transgenic hybrid poplar leaves expressing a wheat oxalate oxidase gene. *Plant Mol. Biol.* 45: 619-629.
- Libault, M., Wan, J., Czechowski, T., Xu, D., Udvardi, M., Stacey, G. (2007) Identification of 118 Arabidopsis transcription factor and 30 ubiquitin ligase genes involved in plant defense via chitin signaling. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20: 900-911.
- Libert, M. A. (1837) *Plante cryptogamicae arduennae (Exsiccati) no. 326*. Publicado por el autor.
- Lindon, J. C., Holmes, E., Bollard, M. E., Stanley, E. G., Nicholson, J. K., 2004. Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis. *Biomarkers* 9, 1–31.
- Lipka, V., Dittgen, J., Bednarek, P., Bhat, R., Wiermer, M., Stein, M., Landtag, J., Brandt, W., Rosahl, S., Scheel, D., 2005. Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in Arabidopsis. *Science* 310, 1180–1183.
- Lippok, B., Birkenbihl, R. P., Rivory, G., Brummer, J., Schmelzer E., Logemann, E., Somssich, I. E. (2007) Expression of AtWRKY33 encoding a pathogen- or PAMP-responsive WRKY transcription factor is regulated by a composite DNA motif containing W box elements. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20: 420–429.
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., Fernie, A.R. (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat. Protoc.* 1, 387–396.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D., (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25: 402-408.
- Livingstone, D. M., Hampton, J. L., Phipps, P. M., Grabau, E. A. (2005) Enhancing resistance to *Sclerotinia minor* in peanut by expressing a barley oxalate oxidase gene. *Plant Physiol.* 137: 1354-1362.
- Loomis, W. D. (1974) Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods. Enzymol.* 31: 528-544.
- Lorenzo, O., & Solano, R. (2005.) Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8:532-540.

- Louime, C., Vasanthaiah, H. K. N., Jittayasothorn, Y., Lu, J., Basha, S. M., Thipyapong, P., Boonkerd., N. (2008) A Simple and Efficient Protocol for High Quality RNA Extraction and Cloning of Chalcone Synthase Partial cds from *Muscadine* Grape Cultivars (*Vitis Rotundifolia Michx.*) European Journal of Scientific Research, 22 (2): 232-240
- Lukyanov, S. A., Gurskaya, N. G., Lukyanov, K. A., Tarabykin, V. S., Sverdlov, E. D. (1994) Highly efficient subtractive hybridization of cDNA. J. Bioorgan. Chem. 20: 386-388.
- Lukyanov, K. A., Launer, G. A., Tarabykin, V. S., Zaraisky, A. G., Lukyanov, S. A. (1995) Inverted terminal repeats permit the average length of amplified DNA fragments to be regulated during preparation of cDNA libraries by polymerase chain reaction. Anal. Biochem. 229: 198-202
- Lumsden, R. D. (1969) *Sclerotinia sclerotiorum* infection of bean and the production of cellulase. Phytopathology, 59: 653-657
- Lumsden, R. D. (1979) Histology and physiology of pathogenesis in plant diseases caused by *Sclerotinia* species. Phytopathology, 69: 890-896.
- Lumsden, R. D. & Dow, R. L. (1973) Histopathology of *Sclerotinia sclerotiorum* infection of bean. Phytopathology, 63: 708-715.
- Lytovchenko, A., Bieberich, K., Willmitzer, L., Fernie, A. R. (2002) Carbon assimilation and metabolism in potato leaves deficient in plastidial phosphoglucomutase. Planta, 215: 802-811.
- Magro, P., Marciano, P., Di Lenna, P. (1984) Oxalic acid production and its role in pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. FEMS Microbiol. Lett. 24: 9-12.
- Manosalva, P. M., Davidson, R. M., Liu, B., Zhu, X., Hulbert, S. H., Leung, H., Leach, J. E. (2009) A Germin-Like protein gene family functions as a complex quantitative trait locus conferring broad-spectrum disease resistance in rice. Plant Physiol. 149(1): 286-296.
- Marciano, P., Di Lenna, P., Magro, P. (1983) Oxalic acid, cell wall degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower. Physiol. Plant Pathol. 22: 339-345.
- Maringolo, C. (2007) Mapeo de QTL asociados a resistencia a la podredumbre húmeda del capítulo de girasol (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary). Tesis Magister Scientiae. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Mar del Plata. Estación Experimental INTA-Balcarce, Argentina.

- Marković-Housley, Z., Degano, M., Lamba, D., Von Roepenack-Lahaye, E., Clemens, S., Susani, M., Ferreira, F., Scheiner, O., Breiteneder, H. (2003) Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. *J. Mol. Biol.* 325:123-133
- Maxwell, D. P. & Lumsden, R. D. (1970) Oxalic acid production by *Sclerotinia sclerotiorum* in infected bean and in culture. *Phytopathology*, 60: 1395-1398.
- Mclean, D. M. (1958) Role of dead flower parts in infection of certain crucifers by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Plant Dis. Report*, 42: 663-666
- Mestries, E., Gentzbittel, L., Tourvieille De Labrouhe, D., Nicolas, P., Vear, F. (1998.) Analyses of quantitative trait loci associated with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflowers (*Helianthus annuus* L.) using molecular markers. *Mol. Breeding*, 4: 215-226.
- Meyer, R. C., Steinfath, M., Liseč, J., Becher, M., Witucka-Wall, H., Törjék, O., Fiehn, O., Eckardt, A., Willmitzer, L., Selbig, J., Altmann, T. (2007) The metabolic signature related to high plant growth rate in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 4759–4764.
- Micic, Z., Hahn, V., Bauer, E., Schon, C. C., Knapp, S. J., Tang, S., Melchinger, A. E. (2004) QTL mapping of midstalk *Sclerotinia*-rot resistance in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 109: 1474-1484.
- Micic, Z., Hahn, V., Bauer, E., Melchinger, A. E., Knapp, S. J., Tang, S., Schon, C. C. (2005a) Identification and validation of QTL for *Sclerotinia* midstalk rot resistance in sunflower by selective genotyping. *Theor. Appl. Genet.* 111: 233-242.
- Micic, Z., Hahn, V., Bauer, E., Schon, C. C., Melchinger, A. E. (2005b) QTL mapping of resistance to *Sclerotinia* midstalk rot in RIL of sunflower population NDBLOSsel x CM625. *Theor. Appl. Genet.* 110: 1490-1498.
- Mikkelsen, M. D., Halkier, B. A. (2003) Metabolic engineering of valine and isoleucine derived glucosinolates in *Arabidopsis* expressing CYP79D2 from cassava. *Plant Physiol.* 131: 773:779.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., Shibuya, N. (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:19613-19618.
- Mohr, P. G. & Cahill, D. M. (2007) Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in *Arabidopsis* infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Funct. Integr. Genomics*, 7: 181-191.
- Navarre, D. A., Wolpert, T. J. (1999) Victorin induction of an apoptotic/senescence-like responses in oats. *Plant Cell*, 11: 237-250.

- Nelson, B. D., Helms, T. C., Olson, M. A. (1991) Comparison of laboratory and field evaluations of resistance in soybean to *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Dis. 75: 662-665.
- Ngugi, H. K. & Scherm, H. (2006) Biology of Flower-Infecting Fungi. Annu. Rev. Phytopathol 44: 261-282
- Noyes, R. D. & Hancock, J. G. (1981) Role of oxalic acid in the Sclerotinia wilt of sunflower. Physiol. Plant Pathol. 18: 123-132.
- Paniego, N., Heinz, R., Hopp, H.E., 2006. Sunflower. In: Kole, C. (Ed.), Genome Mapping and Molecular Breeding Vol. II (Oilseeds). Springer, Berlin, Heidelberg, Germany, pp. 153–178.
- Passarinho, P. & de Vries, S. C. (2002) Arabidopsis. Chitinase: a Genomic Survey. In The Arabidopsis Book, C.R. Somerville and E.M. Meyerowitz, eds, (Rockville, MD: American Society of Plant Biologists), doi/10.1199/tab.002, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>.
- Pedras, M.S., Zheng, Q. A., Gadagi, R. S., Rimmer, S. R.(2008) Phytoalexins and polar metabolites from the oilseeds canola and rapeseed: differential metabolic responses to the biotroph *Albugo candida* and to abiotic stress. Phytochemistry 69, 894–910.
- Pedraza, M. V.; Pereyra, V. R., Escande, A. R. (2004) Infection courts and length of susceptible period related to sunflower head rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) resistance. Helia 27(44):171-182.
- Pemberton, C. L. & Salmond, G. P. C. (2004) The Nep1-like proteins—a growing family of microbial elicitors of plant necrosis. Mol. Plant Pathol. 5: 353–359.
- Perchepied, L., Balagué, C., Riou, C., Claudel-Renard, C., Rivière, N., Grezes-Besset, B., Roby, D. (2010). Nitric Oxide Participates in the Complex Interplay of Defense-Related Signaling Pathways Controlling Disease Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*. Mol. Plant-Microb. Interact. 23(7): 846-860
- Pereyra, V. R. & Bazzalo, M. E. (1988) Podredumbre del capítulo de girasol. Jornada de actualización técnica para profesionales. INTA Balcarce
- Pereyra, V. R. & Bazzalo, M. E. (1990) Comportamiento del girasol frente a la podredumbre del capítulo provocada por el hongo *Sclerotinia Sclerotiorum*. Serie Materiales de Divulgación N°19, INTA Balcarce.
- Pereyra, V. R. & Escande, A. (1994) Manual de reconocimiento de enfermedades del Girasol en la Argentina. Ed del INTA CERBAS, 122 pp
- Pereyra, V. R. & Valetti, O. E. (1993) Producción de girasol, manual para productores del sudeste Bonaerense. Ed. INTA Balcarce. 140 pp

Pérez Fernández, J. (2002) Enfermedades: Identificación y manejo. En: Manual práctico para el cultivo de girasol. Ed. Hemisferio Sur. 142-152

Pérez Fernández, J. & Corro Molas, A. (2003) Efectos de los fungicidas curasemillas y fechas de siembra sobre Mildiu del girasol causado por *Plasmopora halstedii* (Fasrl.). Boletín de divulgación técnica N° 77. EEA Anguil. Cultivos de cosecha gruesa Actualizaciones. pp.178-188.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29 (9): 2002-2007. 4.2.4.

Poormohammad Kiani, S., Talia, P., Maury, P., Grieu, P., Heinz, R. A., Perrault, A., Nishinakamasu, V., Hopp, H. E., Gentzbittel, L., Paniego, N., Sarrafi, N. (2007) Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. *Plant Science*, 172: 773-787.

Poussereau, N., Creton, S., Billon-Grand, G., Rascle, C., Fèvre, M. (2001a) Regulation of *acp1*, encoding a non-aspartyl acid protease expressed during pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Microbiology*, 147: 717-726.

Poussereau, N., Gente, S., Rascle, C., Billon-Grand, G., Fèvre, M. (2001b) *aspS* encoding an unusual aspartyl protease from *Sclerotinia sclerotiorum* is expressed during phytopathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 194: 27-32.

Prats, E., Bazzalo, M. E., León, A., Jorrín, J. V. (2003) Accumulation of soluble phenolic compounds in sunflower capitula correlates with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Euphytica* 132, 321-329.

Prats, E., Bazzalo, M. E., León, A., Jorrin, J. V. (2006) Fungitoxic effect of scopolin and related coumarins on *Sclerotinia sclerotiorum*. A way to overcome sunflower head rot. *Euphytica* 147, 451–460.

Prats, E., Galindo, J.C., Bazzalo, M. E., Leon, A., Macias, F. A., Rubiales, D., Jorrin, J. V. (2007) Antifungal activity of a new phenolic compound from capitulum of a head rot-resistant sunflower genotype. *J. Chem. Ecol.* 33, 2245-2253.

Price, J., Li, T.C., Kang, S.G., Na, J.K., Jang, J.C., (2003). Mechanisms of glucose signaling during germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 132, 1424–1438.

Purdy, L. H. (1979) *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology*, 69: 875-880.

Qutob, D., Kamoun, S. & Gijzen, M. (2002) Expression of *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy. *Plant J.* 32: 361–373.

Qutob, D., Kemmerling, B., Brunner, F., Kufner, I., Engelhardt, S., Gust, A.A., Luberaeki, B., Seitz, U. H., Stahl, D., Rauhut, T., Glawischnig, E., Schween, G., Lacombe, B., Watanabe, N., Lam, E., Schlichting, R., Scheel, D., Nau, K., Dodt, G., Hubert, D., Gijzen, M., Nummerger, T. (2006) Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1 like proteins. *Plant Cell*, 18: 3721-3744.

Raimondi, J., Fernandez, P., Peluffo, L., Paniego, N., Pereyra, V., Hopp, E., Heinz, R., Escande, A. R. (2003) Identificación y caracterización de fuentes de resistencia a la Podredumbre Húmeda del Capítulo de Girasol (*Sclerotinia sclerotiorum*) mediante Marcadores Moleculares. Taller ASAGIR 2003. http://www.asagir.org.ar/2doCongreso_murales.asp.

Ramonell, K., Berrocal Lobo, M., Koh, S., Wan, J., Edwards, H., Stacey, G., Somerville, S. (2005) Loss-of-function mutations in chitin responsive genes show increased susceptibility to the powdery mildew pathogen *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiol.* 138: 1027-1036.

Ramputh, A. I., Arnason, J. T., Cass, L., Simmonds, J. A. (2002) Reduced herbivory of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) on corn transformed with germin, a wheat oxalate oxidase gene. *Plant Sci.* 162: 431-440.

Rashid, K. Y. & Seiler, G. (2001) Proceedings of the 23rd Sunflower Research Workshop, National Sunflower Association, 18.

Raven, P. H. & Axelrod, D. I. (1974) Angiosperm biogeography and past continental movements. *Ann. Missouri Bot. Gard* 61: 539-673

Rebrikov, D. V., Britanova, O. V., Gurskaya, N. G., Lukyanov, K. A., Tarabykin, V. S., Lukyanov, S. A. (2000) Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. *Nucleic Acids Res.* 28, e90

Rebrikov, D.V., Desai S.M., Siebert, P.D., Lukyanov, S.A. (2004). Suppression Subtractive Hybridization. *Methods in Molecular Biology, Gene Expression Profiling: Methods and Protocols*, 258:107-134

Regente M. & de la Canal L. (2003) A cDNA encoding a putative lipid transfer protein expressed in sunflower seeds. *J. plant Physiol.* 160: 201-203.

Regente M. & de la Canal L. (2000) Purification, characterization and antifungal properties of a lipid-transfer protein from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *Physiol. Plantarum* 110, 158-163.

- Regente, M. C., Oliva, C. R., Feldman, M. L., Castagnaro, A. P. and de la Canal, L. (1997) A sunflower leaf antifungal peptide active against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiol. Plantarum*, 100: 178-182.
- Reinhardt, L. A., Svedruzic, D., Chang, C. H., Cleland, W. W., Richards, N. G. J. (2003) Heavy atom isotope effects on the reaction catalyzed by the oxalate decarboxylase from *Bacillus subtilis*. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 1244-52.
- Reymond, P., Deleage, G., Rasclé, C., Fèvre, M. (1994) Cloning and sequence analysis of a polygalacturonase-encoding gene from the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Gene*, 146: 233-237.
- Rhoades, D.F. & Cates, R.G. (1976) Toward a general theory of plant antiherbivore chemistry. *Recent Adv. Phytochem.* 10:168–210
- Rhoads, D.M., Umbach, A.L., Subbaiah, C.C., Siedow, J.N., 2006. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant Physiol.* 141, 357–366.
- Rice, W. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225.
- Richards, E., Reichardt, M., Rogers, S. (1994). Preparation of genomic DNA from plant tissue. In: F. M. Ausubel., R. Brent., R. E. Kingston., D. D. Moore., J.G. Seidman., J.A. Smith. and K. Struhl (eds): *Current protocols in Molecular Biology*. J Wiley and Sons, New York. pp 2.3.1-2.3.7.
- Riou, C., Freyssinet, G., Fèvre, M. (1991) Production of cell wall-degrading enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1478-1484.
- Riou, C., Freyssinet, G., Fèvre, M. (1992) Purification and characterization of extracellular pectinolytic enzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 578-583.
- Roath, W. W., Miller, J. F., Gulya, T. J. (1981). Registration of RHA 801 Sunflower Germplasm1 (Reg. No. GP 5) *Crop Sci.* 21: 479-479.
- Robinson, S. P. & Dry I. B. (1992) Broad Bean Leaf Polyphenol Oxidase Is a 60-Kilodalton Protein Susceptible to Proteolytic Cleavage. *Plant Physiol.* 99: 317-323.
- Rodríguez, M. A., Venedikian, N., Bazzalo, M. E., Godeas, A. (2004) Histopathology of *Sclerotinia sclerotiorum* attack on flower parts of *Helianthus annuus* heads in tolerant and susceptible varieties. *Mycopathologia* 157, 291–302.

- Roessner, U., Wagner, C., Kopka, J., Trethewey, R.N., Willmitzer, L. (2000) Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography–mass spectrometry. *Plant J.* 23, 131–142.
- Roessner, U., Luedemann, A., Brust, D., Fiehn, O., Linke, T., Willmitzer, L., Fernie, A.R. (2001) Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *Plant Cell* 13, 11–29
- Roessner-Tunali, U., Hegemann, B., Lytovchenko, A., Carrari, F., Bruedigam, C., Granot, D., Fernie, A. R. (2003). Metabolic profiling of transgenic tomato plants overexpressing hexokinase reveals that the influence of hexose phosphorylation diminishes during fruit development. *Plant Physiol.* 133: 84-99.
- Rogers, E. E. & Ausubel, F. M. (1997) Arabidopsis enhanced disease susceptibility mutants exhibit enhanced susceptibility to several bacterial pathogens and alterations in PR-1 gene expression. *Plant Cell* 9: 305-316.
- Roitsch, T., Balibrea, M. E., Hofmann, M., Proels, R., Sinha, A. K. (2003) Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *J. Exp. Bot.* 382: 513-524.
- Rollins, J. A. (2003) The *Sclerotinia sclerotiorum* pac1 gene is required for sclerotial development and virulence. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 16: 785-795.
- Rollins, J. A. & Dickman, M. B. (1998) Increase in endogenous and exogenous cyclic AMP levels inhibits sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2539-2544.
- Rollins, J. A. & Dickman, M. B. (2001) pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a pacC/RIM1 homolog. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 75-81.
- Rönicke, S., Hahn, V., Vogler, A., Friedt, W. (2005). Quantitative trait loci analysis of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower. *Phytopathology* 95, 834–839.
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. B., Moorman, A. F. M. (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucl. Acids Res.* 37 (6): e45. doi: 10.1093/nar/gkp045
- Rushton, P.J., Torres, J. T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K., Somssich, I. E. (1996) Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *EMBO J.* 15-5690;5700.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Edn. 2. 7.43 -7.45 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA).

- Salzman, R. A., Fujita, T., Zhu-Salzman, K., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A. (1999) An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. *Plant Mol. Biol. Repr.* 17: 11-17.
- Schauer, N., Semel, Y., Roessner, U., Gur, A., Balbo, I., Carrari, F., Pleban, T., Perez-Melis, A., Bruedigam, C., Kopka, J., Willmitzer, L., Zamir, D., Fernie, A.R. (2006) Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nat. Biotechnol.* 24, 447–454.
- Scheideler, M., Schlaich, N. L., Fellenberg, K., Beissbarth, T., Hauser, N. C., Vingron, M., Slusarenko, A. J., Hoheisel, J.D. (2002) Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defense metabolism in *Arabidopsis thaliana* using cDNA arrays. *J. Biol. Chem.* 277: 10555-10561.
- Schlumbaum, A., Mauch, F., Vögeli, U., Boller, T. (1986) Plant chitinases are potent fungal growth inhibitors. *Nature*, 324: 365-367.
- Schneider, M., Droz, E., Malnoe, P., Chatot, C., Bonnel, E., Metraux, J. P. (2002) Transgenic potato plants expressing oxalate oxidase have increased resistance to oomycete and bacterial pathogens. *Potato Res.* 45: 177-185.
- Schneiter, A. A., & Miller, J. F. (1981) Description of Sunflower Growth Stages. *Crop Sci.* 21:901-903.
- Scholes, J. D., Lee, P. J., Horton, P., Lewis, D. H. (1994) Invertase: understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. *New Phytol.* 126, 213–222.
- Schouten, A., Van Baarlen, P., Van Kan, J. (2008) Phytotoxic Nep1 like proteins from the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* associate with membranes and the nucleus of plant cells. *New Phytol.* 177: 493-505.
- Schweizer, P., Christoffel, A., Dudler, R. (1999) Transient expression of members of the germin-like gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistance. *Plant J.* 20: 540-552.
- Scott-Craig, J. S., Panaccione, D., Cervone, F., Walton, J. D. (1990) Endopolygalacturonase is not required for pathogenicity of *Cochliobolus carbonum* on maize. *Plant Cell*, 2: 1191-1200.
- Seiler, G. J. & Riesberg, L. H. (1997) Systematics, origin and germplasm resources of the wild and domesticated sunflower. In *Sunflower technology and production*, Schneiter, A. A. (ed.) Amer. Soc. Agronomy, Madison, WI: 21-66.
- Senkoylu, N., Dale, N. (2006). Nutritional evaluation of a high-oil sunflower meal in broiler starter diets. *J. Appl. Poult. Res.* 15, 40–47.

- Sheveleva, E., Chmara, W., Bohnert, H.J., Jensen, R.G. (1997). Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiol.* 115, 1211–1219.
- Shibuya, N. & Minami, E. (2001) Oligosaccharide signaling for defense responses in plant. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 59: 223-233.
- Shieh, M. T., Brown, R. L., Whitehead, M. P., Cary, J. W., Cotty, P. J., Cleveland, T. E., Dean, R. A. (1997) Molecular genetic evidence for the involvement of a specific polygalacturonase, P2c, in the invasion and spread of *Aspergillus flavus* in cotton bolls. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3548-3552.
- Siebert, P. D., Chenchik, A., Kellogg, D. E., Lukyanov, K. A., Lukyanov, S. A. (1995) An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 23: 1087-1088.
- Solange, F. L. F., Norma, A., Vera, R. C. V. (2001) Micropropagation of *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 37: 471-475.
- Soulie, M.C., Perino, C., Piffeteau, A., Choquer, M., Malfatti, P., Cimerman, A., Kunz, C., Boccara, M., Vidal-Cros, A. (2006) *Botrytis cinerea* virulence is drastically reduced after disruption of chitin synthase class III gene (Bcchs3a). *Cell Microbiol.* 8:1310-1321.
- Stacey, G. & Shibuya, N. (1997) Chitin recognition in rice and legumes. *Plant Soil*, 194:161-169.
- Staub U., Polivka H., Gross H.J. (1995) Two rapid microscale procedures for isolation of total RNA from leaves rich in polyphenols and polysaccharides: application for sensitive detection of grapevine viroids. *J Virol Methods.* 52(1-2):209-218.
- Su, X. & Gibor, A. (1988) method for RNA isolation from marine macro-algae. *Anal. Biochem.* 174(2): 650-657
- Sumner, L. W., Mendes, P., Dixon, R. A. (2003) Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry* 62: 817-836.
- Swarbrick, P. J., Schulze-Lefert, P., Scholes, J. D. (2006) Metabolic consequences of susceptibility and resistance in barley leaves challenged with powdery mildew. *Plant Cell Environ.* 29:1061-1076.
- Tabuchi, T., Kumon, T., Azuma, T., Nanmori, T., Yasuda, T. (2003) The expression of a germin-like protein with superoxide dismutase activity in the halophyte *Atriplex lentiformis* is differentially regulated by wounding and abscisic acid. *Physiol. Plantarum* 118: 523-531.

- Tanabe, S., Okada, M., Jikumaru, Y., Yamane, H., Kaku, H., Shibuya, N., Minami, E. (2006) Induction of resistance against rice blast fungus in rice plants treated with a potent elicitor, N acetylchitooligosaccharide. *Biosci Biotechnol Biochem.* 70: 1599-1605.
- Tang, X., Frederick, R.D., Zhou, J., Halterman, D.A., Jia, Y., Martin, G.B. (1996). Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science* 274: 260-263.
- Tang, S., Yu, J. K., Slabaugh, M. B., Shintani, D. K., Knapp, S. J. (2002) Simple sequence repeat map of the sunflower genome. *Theor. Appl. Genet.* 105: 1124-1136.
- Tartoff, K. D & Hobbs, C. A. (1987) Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Research Laboratories Focus.* 9:12.
- Tavernier, V., Cadiou, S., Pageau, K., Lauge´ , R., Reisdorf-Cren, M., Langin, T., Masclaux-Daubresse, C. (2007) The plant nitrogen mobilization promoted by *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus* leaves depends on fungus pathogenicity. *J. Exp. Bot.* 58: 3351-3360.
- Thomma, B. P. H. J. (2003) *Alternaria spp.* from general saprophyte to specific parasite. *Mol. Plant Pathol.* 4: 225-236.
- Thomma, B. P., Penninckx, I. A., Broekaert, W. F., Cammue, B. P. (2001) The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Curr. Opin. Immunol.* 13: 63-68.
- Thompson, C. , Dunwell, J. M., Johnstone, C. E., Lay, V. , Ray, J., Schmitt, M. , Watson, H., Nisbet, G. (1995) Degradation of oxalic acid by transgenic oilseed rape plants expressing oxalate oxidase. *Euphytica* 85: 169-72.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673-4680
- Thompson, E. W. & Lane, B. G. (1980) Relation of protein synthesis in imbibing wheat embryos to the cell-free translational abilities of bulk mRNA from dry and imbibing embryos. *J. Biol. Chem.* 255: 5965-5970.
- Tohge, T. & Fernie, A. R. (2009) Web-based resources for mass-spectrometry-based metabolomics: a user guide. *Phytochemistry* 70, 450–456.
- Toth, I. K., Bell, K. S., Holeva, M. C., Birch, P. R. J. (2003) Soft rot erwiniae: from genes to genomes. *Mol. Plant Pathol.* 4: 17-30.

Tourvieille, D. & Vear, F. (1984) Comparraison des méthodes d' estimation de la résitance du tournesol à *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Agronomie*, 4(6): 517-525.

Trogliá, C., Maringolo, C., Quiroz, F., Escande, A. (2005 a). Identificación de fuentes diversas de resistencia a la podredumbre húmeda del capítulo (*Sclerotinia sclerotiorum*): desarrollo y evaluación de poblaciones para el mapeo de QTLs. III Congreso Argentino de Girasol, Buenos Aires, Junio de 2005. <http://www.asagir.org.ar/comunicaciones2.asp>. [Consulta: 2007].

Trogliá, C., Maringolo, C., Quiroz, F., Escande, A. (2005 b). Caracterización fenotípica de podredumbre húmeda del capítulo por *sclerotinia sclerotiorum* en dos poblaciones de girasol. 13º Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Carlos Paz, Córdoba, Argentina. pp.328.

Tu, J. C. (1985) Tolerance of white bean (*Phaseolus vulgaris*) to white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) associated with tolerance to oxalic acid. *Physiol. Plant Pathol.* 26: 111-117.

Turkington, T. K. & Morrall, R. A. A. (1993) Use of petal infestation to forecast *Sclerotinia* stem rot of canola: the influence of inoculum variation over the flowering period and canopy density. *Phytopathology*, 83: 682-689.

Ulker, B. & Somssich I.E. (2004) WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function, *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:491-498.

Urdangarín, M. C., Norero, N. S., Broekaert, W. F., de la Canal, L. (2000) A defensin gene expressed in sunflower inflorescence. *Plant Physiol Biochem.* 38: 253-258.

Van Baarlen, P., Staats, M., Van Kan, J. A. L. (2004) Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen *Botrytis elliptica*. *Mol. Plant Pathol.* 5: 559-574.

Van Becellare, G. & Miller, J. F. (1994) Inheritance of resistance to *Sclerotinia* Head Rot in sunflower. www.sunflower/nsa.com/research/research-workshop/documents 94. pdf. [Consulta: 2006].

Van Kan, J. (2006) Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci.* 11: 247-253.

Van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J. (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:135-62.

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 Biology*, 3(7): research0034.1-0034.11

- Vear, F., Tourvieille, D. (1988) Heredity of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflowers. II. Study of capitulum resistance to natural and artificial ascospores infections. *Agronomie*. 8: 503-508.
- Vear, F., Jouan-Dufournel, I., Bert, P. F., Serre, F., Cambon, F., Pont, C., Walser, P., Roche, S., Tourvieille de Labrouhe, D., Vincourt, P. (2008) QTL for capitulum resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower. Proc 17th Int Sunflower Conf, 8-12/6/2008 Cordoba, Spain: 605-610.
- Vear, F., Grezes-Besset, B. (2010) Progress in breeding sunflowers for resistance to *Sclerotinia*. Proc of the International Symposium Sunflower Breeding on Resistance to Diseases. 2010. Krasdonar. Rusia: 30-35.
- Veit, S., Worle, J. M., Nurnberger, T., Koch, W., Seitz, H. U. (2001) A novel protein elicitor (PaNie) from *Pythium aphanidermatum* induces multiple defence responses in carrot, *Arabidopsis*, and tobacco. *Plant Physiol*. 127: 832–841.
- Vilo, J., Kapushesky, M., Kemmeren, P., Sarkans, U., Brazma, A. (2003) Expression profiler. In: Parmigiani, G., Garrett, E., Irizarry, R., Zeger, S. (Eds.), *The Analysis of Gene Expression Data: Methods and Software*. Springer Verlag, New York, NY (p. 5).
- Voegelé, R. T., Wirsel, S., Möll, U., Lechner, M., Mendgen, K. (2006). Cloning and characterization of a novel invertase from the obligate biotroph *Uromyces fabae* and analysis of expression patterns of host and pathogen invertases in the course of infection. *Mol. Plant Microbe Interact*. 19: 625-634.
- Wagner, F., Kusserow, H., Schafer, W. (2000) Cloning and targeted disruption of two polygalacturonase genes in *Penicillium olsonii*. *FEMS Microbiol. Lett*. 186: 293-299.
- Wagner, C., Sefkow, M., Kopka, J. (2003) Construction and application of a mass spectral and retention time index database generated from plant GC/EI-TOF-MS metabolite profiles. *Phytochemistry*, 62: 887-900.
- Waksman, G., Keon, J. P., Turner, G. (1991) Purification and characterization of two endopolygalacturonases from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1073: 43-48.
- Walz, A., Zingen-Sell, I., Theisen, S., Kortekamp, A. (2008) Reactive oxygen intermediates and oxalic acid in the pathogenesis of the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Eur. J. Plant. Pathol.* (2008) 120:317–330
- Wan, J., Zhang, S., Stacey, G. (2004) Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway in *Arabidopsis* by chitin. *Mol. Plant Pathol*. 5:125-135.
- Wan, J., Zhang, X. C., Stacey, G. (2008) Chitin signaling and plant disease resistance. *Plant Signal. Behav.* 3(10): 831-833.

- Wan, J., Zhang, X. C., Neece, D., Ramonell, K. M., Clough, S., Kim, S.Y., Stacey, M.G., Stacey, G. A. (2008) LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in Arabidopsis. *Plant Cell*, 20: 471-481.
- Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G., and Ausubel, F. M. (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414:562-565.
- Willetts, H. J. and Wong, J. A. (1980) The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. *Bot. Rev.* 46: 101-165.
- Wojtaszek, P. (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322: 681-692.
- Worrall, D., Hird, D. L., Hodge, R., Paul, W., Draper, J., Scott, R. (1992) Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. *Plant Cell*, 4: 759-771.
- Yagami, T. (2000) Defense-related proteins as families of cross-reactive plant allergens. *Recent Res. Dev. Allergy Clin. Immunol.* 1: 41-64
- Yamahara T, Shiono T, Suzuki T, Tanaka K, Takio S, Sato K, Yamazaki S, Satoh T. (1999) Isolation of a germin-like protein with manganese superoxide dismutase activity from cells of a moss, *Barbula unguiculata*. *J. Biol. Chem.* 274: 33274-33278.
- Yue B , Radi SA, Vick BA, Cai X, Tang s, Knapp SJ, Gulya TJ, Miller JF, Hu J. (2008) Identifying Quantitative Trait Loci for Resistance to Sclerotinia Head Rot in Two USDA Sunflower Germplasms. *Phytopathology.* 98(8): 926-931.
- Zangerl, A.R. & Rutledge C.E. (1996) The probability of attack and patterns of constitutive and induced defense: a test of optimal defense theory. *Am. Nat.* 147:599-608.
- Zavallo D, Lopez Bilbao M, Hopp H, Heinz R. (2010) Isolation and functional characterization of two novel seed-specific promoters from sunflower (*Helianthus annuus L.*). *Plant Cell Reports* 29:239-248.
- Zar, J. H., (1984) Biostatistical analysis. Prentice-Hall, New Jersey.
- Zhang, B., Ramonell, K., Somerville, S., Stacey, G. (2002) Characterization of early, chitin-induced gene expression in Arabidopsis. *Mol Plant-Microbe Interact.* 15: 963-970.
- Zhao, J., Buchwaldt, L., Rimmer, S. R., Sharpe, A., McGregor, L., Bekkaoui, D., Hegedus, D. (2009) Patterns of differential gene expression in Brassica napus cultivars infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mol Plant Pathol.* 10(5):635-49.

Zhao, J., Peltier, A. J., Meng, J., Osborn, T. C., Grau, C.R. (2004) Evaluation of *Sclerotinia* stem rot resistance in oilseed *Brassica napus* using a petiole inoculation technique under greenhouse conditions. *Plant Dis.* 88: 1033-1039.

Zhao, J., Wang, J., An, L., Doerge, R. W., Chen, Z. J., Grau, G. R., Meng, J., Osborn, T. C. (2007) Analysis of gene expression profiles in response to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica napus*. *Planta*, 227(1): 13-24.

Zheng, Z., Abu Qamar, S., Chen, Z., Mengiste, T. (2006) Arabidopsis WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant Journal* (2006) 48, 592–605

Zhou, F. S., Zhang, Z. G., Gregersen, P. L., Mikkelsen, J. D., de Neergaard, E., Collinge, D. B., Thordal-Christensen, H. (1998) Molecular characterization of the oxalate oxidase involved in the response of barley to the *powdery mildew* fungus. *Plant Physiol.* 117: 33-41.

Zhu, L., Liu, X., Liu, X., Jeannotte, R., Reese, J., Harris, M., Stuart, J., Chen, M., (2007) Hessian fly (*Mayetiola destructor*) attack causes dramatic shift in carbon/nitrogen metabolism in wheat. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21, 70–78.

Zimmermann, G., Baumlein, H., Mock, H. P., Himmelbach, A., Schweizer, P. (2006) The multigene family encoding germin-like proteins of barley. Regulation and function in Basal host resistance. *Plant Physiol.* 142 (1): 181-192.

Zrenner, R., Salanoubat, M., Willmitzer, L., Sonnewald, U. (1995). Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.* 7, 97–107.

Zucker, M. (1968) Sequential induction of phenylalanine ammonia-lyase and a lyase-inactivating system in potato tuber disks. *Plant Physiol.* 43, 365–374.

Zulak, K. G., Cornish, A., Daskalchuk, T. E., Deyholos, M. K., Goodenowe, D. B., Gordon, P. M., Klassen, D., Pelcher, L. E., Sensen, C. W., Facchini, P. J. (2007) Gene transcript and metabolite profiling of elicitor-induced *opium poppy* cell cultures reveals the coordinate regulation of primary and secondary metabolism. *Planta*, 225: 1085-1106.

Zuppini, A., Navazio, L., Sella, L., Castiglioni, C., Favaron, F., Mariani, P. (2005) An endopolygalacturonase from *Sclerotinia sclerotiorum* induces calcium-mediated signaling and programmed cell death in soybean cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18: 849-855.

8. APÉNDICE

Tabla anexa 1. Comparación de los niveles de metabolitos entre genotipos y días post inoculación (DPI) mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores. Se consideraron 2 niveles para el factor genotipo (RHA801: resistente: HA89: susceptible) y 4 para el factor DPI (0, 2, 4 y 12). Los efectos significativos están resaltados en rojo. df: grados de libertad, MC: cuadrado de medias. * p < 0.05

Metabolito	Efecto	df Efecto	MS Efecto	df Error	MS Error	F	p-valor
ALANINA	Genotipo	1	81,00	24	170,20	0,475890	0,49691
	DPI	3	967,92	24	170,20	5,686933	0,00434 *
	Interacción	3	1025,49	24	170,20	6,025164	0,00329 *
ASPARAGINA	Genotipo	1	20,29	24	4,43	4,578504	0,04275 *
	DPI	3	2,65	24	4,43	0,598133	0,62243
	Interacción	3	5,09	24	4,43	1,149200	0,34951
GLUTAMATO	Genotipo	1	347,67	24	94,33	3,685762	0,06684
	DPI	3	1567,03	24	94,33	16,612627	0,00000 *
	Interacción	3	562,65	24	94,33	5,964845	0,00345 *
GLICINA	Genotipo	1	0,13	24	35,27	0,003645	0,95236
	DPI	3	74,99	24	35,27	2,125765	0,12341
	Interacción	3	59,45	24	35,27	1,685255	0,19676
TIROSINA	Genotipo	1	4,29	24	0,48	8,913465	0,00642 *
	DPI	3	2,57	24	0,48	5,332419	0,00586 *
	Interacción	3	4,26	24	0,48	8,844412	0,00040 *
VALINA	Genotipo	1	5,00	24	4675,52	20,202269	0,00015 *
	DPI	3	26947,54	24	4675,52	5,763542	0,00408 *
	Interacción	3	34067,06	24	4675,52	7,286264	0,00122 *
ARABINOSA	Genotipo	1	5356,50	24	6619,59	0,809189	0,37730
	DPI	3	31287,21	24	6619,59	4,726458	0,00993 *
	Interacción	3	19371,02	24	6619,59	2,926317	0,05429
RAMNOSA/FUCOSA	Genotipo	1	0,30	24	0,22	1,358397	0,25527
	DPI	3	1,36	24	0,22	6,255345	0,00273 *
	Interacción	3	0,54	24	0,22	2,486891	0,08481
RIBOSA	Genotipo	1	25,73	24	34,75	0,740474	0,39802
	DPI	3	140,03	24	34,75	4,029603	0,01870 *
	Interacción	3	5,00	24	34,75	0,143760	0,93267
SACAROSA	Genotipo	1	410,57	24	1194,76	0,343644	0,56321
	DPI	3	6318,99	24	1194,76	5,288914	0,00608 *
	Interacción	3	5397,76	24	1194,76	4,517860	0,01196 *
TREALOSA	Genotipo	1	682,95	24	80,05	8,532077	0,00748 *
	DPI	3	393,96	24	80,05	4,921777	0,00835 *
	Interacción	3	138,24	24	80,05	1,727069	0,18817
GENTIOBIOSA	Genotipo	1	3,14	24	2,68	1,169178	0,29032
	DPI	3	13,32	24	2,68	4,962713	0,00806 *
	Interacción	3	2,35	24	2,68	0,875217	0,46770

Continuación Tabla Anexa 1

XYLOSA							
	Genotipo	1	78,20	24	64,19	1,218277	0,28064
	DPI	3	89,27	24	64,19	1,390755	0,26973
	Interacción	3	42,63	24	64,19	0,664155	0,58222
BENZOATO							
	Genotipo	1	0,00	24	5,25	0,000127	0,99110
	DPI	3	12,92	24	5,25	2,463093	0,08691
	Interacción	3	7,70	24	5,25	1,467940	0,24829
DEHIDROASCORBATO							
	Genotipo	1	0,00	24	0,12	0,001963	0,96503
	DPI	3	0,53	24	0,12	4,492131	0,01224 *
	Interacción	3	0,41	24	0,12	3,429867	0,03306 *
CLOROGENATO							
	Genotipo	1	7671,48	24	1235,23	6,210580	0,02000 *
	DPI	3	6631,99	24	1235,23	5,369041	0,00568 *
	Interacción	3	2755,02	24	1235,23	2,230373	0,11062
GLUCONATO							
	Genotipo	1	4084,41	24	6296,30	0,648699	0,42849
	DPI	3	40623,73	24	6296,30	6,451997	0,00233 *
	Interacción	3	13323,32	24	6296,30	2,116055	0,12467
GLICERATO							
	Genotipo	1	7,62	24	1,72	4,439448	0,04575 *
	DPI	3	10,01	24	1,72	5,828318	0,00386 *
	Interacción	3	2,63	24	1,72	1,531042	0,23205
GYCOLATO							
	Genotipo	1	0,88	24	1,73	0,511118	0,48155
	DPI	3	2,14	24	1,73	1,241594	0,31656
	Interacción	3	1,91	24	1,73	1,108385	0,36511
T-CAFEATO							
	Genotipo	1	0,40	24	13,12	0,030399	0,86305
	DPI	3	8,49	24	13,12	0,646871	0,59255
	Interacción	3	63,17	24	13,12	4,815095	0,00918 *
QUINATO							
	Genotipo	1	103,51	24	95,49	1,083908	0,30820
	DPI	3	479,63	24	95,49	5,022612	0,00765 *
	Interacción	3	787,69	24	95,49	8,248502	0,00060 *
SACARATO							
	Genotipo	1	1,62	24	0,80	2,023024	0,16780
	DPI	3	5,06	24	0,80	6,306509	0,00262 *
	Interacción	3	1,43	24	0,80	1,781436	0,17758
TREONATO							
	Genotipo	1	7,79	24	5,81	1,340468	0,25834
	DPI	3	80,84	24	5,81	13,907743	0,00002 *
	Interacción	3	5,42	24	5,81	0,933263	0,43991
PALMITATO							
	Genotipo	1	198,01	24	238,90	0,828841	0,37166
	DPI	3	167,51	24	238,90	0,701159	0,56059
	Interacción	3	48,78	24	238,90	0,204168	0,89249
ESTEARATO							
	Genotipo	1	749,15	24	512,77	1,460985	0,23855
	DPI	3	457,87	24	512,77	0,892932	0,45905
	Interacción	3	133,78	24	512,77	0,260905	0,85282
CITRATO							
	Genotipo	1	4634,21	24	138,99	33,342014	0,00001 *
	DPI	3	444,71	24	138,99	3,199601	0,04139 *
	Interacción	3	341,32	24	138,99	2,455713	0,08757

Continuación Tabla Anexa 1

FUMARATE							
Genotipo	1	47,64	24	472,30	0,100873	0,75353	
DPI	3	4679,30	24	472,30	9,907449	0,00020	*
Interacción	3	313,31	24	472,30	0,663358	0,58269	
ISOCITRATO							
Genotipo	1	0,18	24	0,01	13,272511	0,00129	*
DPI	3	0,25	24	0,01	18,715412	0,00000	*
Interacción	3	0,05	24	0,01	3,913760	0,02084	*
SUCCINATO							
Genotipo	1	6135,36	24	577,28	10,628093	0,00332	*
DPI	3	6617,23	24	577,28	11,462821	0,00007	*
Interacción	3	1289,64	24	577,28	2,234000	0,11020	
GLUCOSA-6-P							
Genotipo	1	3,13	24	0,78	4,015562	0,05649	
DPI	3	2,14	24	0,78	2,744195	0,06522	
Interacción	3	1,59	24	0,78	2,039936	0,13506	
GLCEROL-3-P							
Genotipo	1	55,70	24	36,62	1,521037	0,22941	
DPI	3	47,41	24	36,62	1,294558	0,29907	
Interacción	3	55,38	24	36,62	1,512157	0,23679	
MIO-INOSITOL-1-P							
Genotipo	1	0,76	24	0,07	11,433830	0,00247	*
DPI	3	0,45	24	0,07	6,723556	0,00188	*
Interacción	3	0,11	24	0,07	1,687221	0,19634	
FRUCTOSA-6-P							
Genotipo	1	0,17	24	0,16	1,087119	0,30750	
DPI	3	1,14	24	0,16	7,333556	0,00118	*
Interacción	3	0,61	24	0,16	3,895649	0,02120	*
ONONITOL							
Genotipo	1	35,39	24	2,17	16,277088	0,00048	*
DPI	3	3,98	24	2,17	1,831175	0,16843	
Interacción	3	5,10	24	2,17	2,344715	0,09822	

Tabla Anexa 2. Comparación Post hoc para los metabolitos que mostraron interacciones no significativas entre genotipo y días post inoculación (DPI). Método de la Mínima Diferencia Significativa de Tukey. Los valores-p significativos (<0,05) se encuentran resaltados en rojo, CM: contenido medio

ASPARAGINA									
		HA89 ODPI	HA89 2DPI	HA89 4DPI	HA89 12DPI	RHA801 ODPI	RHA801 2DPI	RHA801 4DPI	RHA801 12DPI
CM		2,70	1,97	3,42	4,71	2,67	1,17	1,58	1,00
	HA89 0DPI								
	HA89 2DPI	0,9996							
	HA89 4DPI	0,9996	0,9736						
	HA89 12DPI	0,8681	0,5973	0,9862					
	RHA801 0DPI	1,0000	0,9997	0,9996	0,8608				
	RHA801 2DPI	0,9656	0,9993	0,7938	0,2943	0,9685			
	RHA801 4DPI	0,9943	1,0000	0,9135	0,4408	0,9951	1,0000		
	RHA801 12DPI	0,9414	0,9977	0,7321	0,2452	0,9457	1,0000	0,9999	
ARABINOSA									
		HA89 ODPI	HA89 2DPI	HA89 4DPI	HA89 12DPI	RHA801 ODPI	RHA801 2DPI	RHA801 4DPI	RHA801 12DPI
CM		125,44	151,16	152,22	124,72	104,65	178,99	314,19	59,21
	HA89 0DPI								
	HA89 2DPI	0,9998							
	HA89 4DPI	0,9997	1,0000						
	HA89 12DPI	1,0000	0,9998	0,9997					
	RHA801 0DPI	1,0000	0,9910	0,9897	1,0000				
	RHA801 2DPI	0,9798	0,9997	0,9997	0,9782	0,8931			
	RHA801 4DPI	0,0536	0,1330	0,1377	0,0521	0,0241	0,3090		
	RHA801 12DPI	0,9380	0,7469	0,7364	0,9413	0,9922	0,4533	0,0038	
RAMNOSA/FUCOSA									
		HA89 ODPI	HA89 2DPI	HA89 4DPI	HA89 12DPI	RHA801 ODPI	RHA801 2DPI	RHA801 4DPI	RHA801 12DPI
CM		1,75	1,57	1,99	1,29	1,20	1,93	2,67	1,58
	HA89 0DPI								
	HA89 2DPI	0,9994							
	HA89 4DPI	0,9947	0,9008						
	HA89 12DPI	0,8512	0,9869	0,4236					
	RHA801 0DPI	0,7126	0,9446	0,2874	1,0000				
	RHA801 2DPI	0,9992	0,9542	1,0000	0,5353	0,3810			
	RHA801 4DPI	0,1490	0,0508	0,4812	0,0071	0,0038	0,3743		
	RHA801 12DPI	0,9994	1,0000	0,9035	0,9862	0,9428	0,9558	0,0516	
RIBOSA									
		HA89 ODPI	HA89 2DPI	HA89 4DPI	HA89 12DPI	RHA801 ODPI	RHA801 2DPI	RHA801 4DPI	RHA801 12DPI
CM		18,61	21,45	20,98	12,64	22,56	23,37	21,28	13,65
	HA89 0DPI								
	HA89 2DPI	0,9968							
	HA89 4DPI	0,9990	1,0000						
	HA89 12DPI	0,8339	0,4354	0,5026					
	RHA801 0DPI	0,9778	1,0000	0,9999	0,2958				
	RHA801 2DPI	0,9405	0,9997	0,9989	0,2139	1,0000			
	RHA801 4DPI	0,9979	1,0000	1,0000	0,4595	1,0000	0,9996		
	RHA801 12DPI	0,9272	0,5820	0,6522	1,0000	0,4216	0,3179	0,6077	

Continuación Tabla Anexa 2

TREALOSA									
		HA89 ODPI	HA89 2DPI	HA89 4DPI	HA89 12DPI	RHA801 ODPI	RHA801 2DPI	RHA801 4DPI	RHA801 12DPI
CM		4,34	3,72	5,29	10,14	6,59	7,88	15,09	30,89
	HA89 ODPI								
	HA89 2DPI	1,0000							
	HA89 4DPI	1,0000	1,0000						
	HA89 12DPI	0,9815	0,9676	0,9935					
	RHA801 ODPI	1,0000	0,9998	1,0000	0,9991				
	RHA801 2DPI	0,9991	0,9975	0,9999	1,0000	1,0000			
	RHA801 4DPI	0,6877	0,6275	0,7741	0,9925	0,8729	0,9409		
	RHA801 12DPI	0,0067	0,0053	0,0095	0,0537	0,0153	0,0244	0,2440	
GENTIOBIOSA									
		HA89 ODPI	HA89 2DPI	HA89 4DPI	HA89 12DPI	RHA801 ODPI	RHA801 2DPI	RHA801 4DPI	RHA801 12DPI
CM			2,97	4,86	3,38	0,87	4,28	3,87	4,39
	HA89 ODPI								
	HA89 2DPI	0,7264							
	HA89 4DPI	1,0000	0,8966						
	HA89 12DPI	0,6184	0,0374	0,4062					
	RHA801 ODPI	0,9427	0,9996	0,9926	0,1070				
	RHA801 2DPI	0,9927	0,9876	0,9998	0,2070	1,0000			
	RHA801 4DPI	0,9153	0,9999	0,9855	0,0884	1,0000	0,9998		
	RHA801 12DPI	0,9912	0,2680	0,9364	0,9690	0,5395	0,7538	0,4816	
CLOGENATO									
		HA89 ODPI	HA89 2DPI	HA89 4DPI	HA89 12DPI	RHA801 ODPI	RHA801 2DPI	RHA801 4DPI	RHA801 12DPI
CM		164,57	177,03	202,60	205,15	135,42	137,27	130,25	222,55
	HA89 ODPI								
	HA89 2DPI	0,9996							
	HA89 4DPI	0,7842	0,9651						
	HA89 12DPI	0,7270	0,9431	1,0000					
	RHA801 ODPI	0,9321	0,7027	0,1698	0,1403				
	RHA801 2DPI	0,9510	0,7460	0,1941	0,1612	1,0000			
	RHA801 4DPI	0,8569	0,5747	0,1144	0,0933	1,0000	1,0000		
	RHA801 12DPI	0,3173	0,6064	0,9914	0,9962	0,0328	0,0386	0,0205	
GLUCONATO									
		HA89 ODPI	HA89 2DPI	HA89 4DPI	HA89 12DPI	RHA801 ODPI	RHA801 2DPI	RHA801 4DPI	RHA801 12DPI
CM		173,01	176,75	187,98	82,22	108,06	193,04	320,26	88,98
	HA89 ODPI								
	HA89 2DPI	1,0000							
	HA89 4DPI	1,0000	1,0000						
	HA89 12DPI	0,7355	0,6964	0,5732					
	RHA801 ODPI	0,9363	0,9166	0,8374	0,9997				
	RHA801 2DPI	1,0000	1,0000	1,0000	0,5174	0,7925			
	RHA801 4DPI	0,1957	0,2199	0,3054	0,0060	0,0175	0,3503		
	RHA801 12DPI	0,8013	0,7658	0,6480	1,0000	1,0000	0,5921	0,0079	

Continuación Tabla Anexa 2

GLICERATO									
		HA89 ODPI	HA89 2DPI	HA89 4DPI	HA89 12DPI	RHA801 ODPI	RHA801 2DPI	RHA801 4DPI	RHA801 12DPI
CM		2,52	3,17	3,68	3,69	2,06	3,79	5,81	5,29
	HA89 ODPI								
	HA89 2DPI	0,9963							
	HA89 4DPI	0,9086	0,9992						
	HA89 12DPI	0,9040	0,9991	1,0000					
	RHA801 ODPI	0,9996	0,9250	0,6581	0,6500				
	RHA801 2DPI	0,8618	0,9971	1,0000	1,0000	0,5829			
	RHA801 4DPI	0,0292	0,1267	0,3295	0,3361	0,0093	0,3933		
	RHA801 12DPI	0,0970	0,3351	0,6592	0,6673	0,0336	0,7316	0,9991	
SACARATO									
		HA89 ODPI	HA89 2DPI	HA89 4DPI	HA89 12DPI	RHA801 ODPI	RHA801 2DPI	RHA801 4DPI	RHA801 12DPI
CM		3,50	3,34	3,92	2,84	2,26	2,92	4,64	1,97
	HA89 ODPI								
	HA89 2DPI	1,0000							
	HA89 4DPI	0,9971	0,9806						
	HA89 12DPI	0,9635	0,9925	0,6825					
	RHA801 ODPI	0,5334	0,6898	0,1973	0,9820				
	RHA801 2DPI	0,9827	0,9976	0,7594	1,0000	0,9624			
	RHA801 4DPI	0,6282	0,4723	0,9445	0,1330	0,0191	0,1702		
	RHA801 12DPI	0,2826	0,4118	0,0820	0,8620	0,9998	0,7993	0,0065	
TREONATO									
		HA89 ODPI	HA89 2DPI	HA89 4DPI	HA89 12DPI	RHA801 ODPI	RHA801 2DPI	RHA801 4DPI	RHA801 12DPI
CM		10,44	7,71	10,94	4,49	9,40	9,48	13,70	4,95
	HA89 ODPI								
	HA89 2DPI	0,7444							
	HA89 4DPI	1,0000	0,5670						
	HA89 12DPI	0,0337	0,5697	0,0174					
	RHA801 ODPI	0,9984	0,9714	0,9829	0,1211				
	RHA801 2DPI	0,9990	0,9637	0,9872	0,1109	1,0000			
	RHA801 4DPI	0,5573	0,0322	0,7354	0,0005	0,2339	0,2522		
	RHA801 12DPI	0,0608	0,7351	0,0322	1,0000	0,2005	0,1851	0,0008	
CITRATO									
		HA89 ODPI	HA89 2DPI	HA89 4DPI	HA89 12DPI	RHA801 ODPI	RHA801 2DPI	RHA801 4DPI	RHA801 12DPI
CM		21,85	18,40	18,39	4,45	31,36	35,90	57,14	34,95
	HA89 ODPI								
	HA89 2DPI	0,9999							
	HA89 4DPI	0,9999	1,0000						
	HA89 12DPI	0,4501	0,7035	0,7040					
	RHA801 ODPI	0,9407	0,7706	0,7701	0,0599				
	RHA801 2DPI	0,6960	0,4427	0,4422	0,0179	0,9993			
	RHA801 4DPI	0,0061	0,0023	0,0023	0,0002	0,0795	0,2235		
	RHA801 12DPI	0,7618	0,5108	0,5103	0,0232	0,9998	1,0000	0,1829	

Continuación Tabla Anexa 2

FUMARATO

	HA89 ODPI	HA89 2DPI	HA89 4DPI	HA89 12DPI	RHA801 ODPI	RHA801 2DPI	RHA801 4DPI	RHA801 12DPI
CM	44,89	36,13	67,74	3,90	38,73	55,52	59,93	8,24
HA89 ODPI								
HA89 2DPI	0,9990							
HA89 4DPI	0,8069	0,4682						
HA89 12DPI	0,1812	0,4443	0,0074					
RHA801 ODPI	0,9999	1,0000	0,5716	0,3508				
RHA801 2DPI	0,9965	0,9040	0,9919	0,0453	0,9523			
RHA801 4DPI	0,9734	0,7745	0,9995	0,0239	0,8578	1,0000		
RHA801 12DPI	0,2926	0,6168	0,0143	1,0000	0,5119	0,0821	0,0448	

SUCCINATO

	HA89 ODPI	HA89 2DPI	HA89 4DPI	HA89 12DPI	RHA801 ODPI	RHA801 2DPI	RHA801 4DPI	RHA801 12DPI
CM	87,38	105,99	100,15	26,47	132,62	124,17	96,41	77,56
HA89 ODPI								
HA89 2DPI	0,9516							
HA89 4DPI	0,9942	1,0000						
HA89 12DPI	0,0274	0,0021	0,0048					
RHA801 ODPI	0,1826	0,7640	0,5568	0,0002				
RHA801 2DPI	0,4050	0,9572	0,8423	0,0003	0,9996			
RHA801 4DPI	0,9994	0,9991	1,0000	0,0080	0,4243	0,7262		
RHA801 12DPI	0,9989	0,7031	0,8785	0,0946	0,0583	0,1576	0,9485	

MIO-INOSITOL-1-P

	HA89 ODPI	HA89 2DPI	HA89 4DPI	HA89 12DPI	RHA801 ODPI	RHA801 2DPI	RHA801 4DPI	RHA801 12DPI
CM	1,08	1,50	1,25	0,69	0,93	0,88	0,89	0,59
HA89 ODPI								
HA89 2DPI	0,3416							
HA89 4DPI	0,9774	0,8765						
HA89 12DPI	0,4106	0,0037	0,0774					
RHA801 ODPI	0,9885	0,0740	0,6307	0,8852				
RHA801 2DPI	0,9505	0,0428	0,4722	0,9601	1,0000			
RHA801 4DPI	0,9582	0,0462	0,4935	0,9527	1,0000	1,0000		
RHA801 12DPI	0,1782	0,0011	0,0250	0,9994	0,6053	0,7593	0,7393	

ONONITOL

	HA89 ODPI	HA89 2DPI	HA89 4DPI	HA89 12DPI	RHA801 ODPI	RHA801 2DPI	RHA801 4DPI	RHA801 12DPI
CM	4,99	2,52	3,04	3,04	5,42	5,99	6,50	4,09
HA89 ODPI								
HA89 2DPI	0,3005							
HA89 4DPI	0,5793	0,9996						
HA89 12DPI	0,5835	0,9996	1,0000					
RHA801 ODPI	0,9999	0,1471	0,3398	0,3433				
RHA801 2DPI	0,9760	0,0484	0,1326	0,1343	0,9992			
RHA801 4DPI	0,8250	0,0161	0,0487	0,0494	0,9635	0,9996		
RHA801 12DPI	0,9866	0,7988	0,9685	0,9696	0,8982	0,6100	0,3257	

Tabla Anexa 3. Prueba de comparación Post hoc para metabolitos que presentaron interacciones significativas entre las variables. Comparaciones de los DPI dentro de los genotipos. Se muestran las pruebas de comparaciones de a pares que dieron significativas en una ANOVA de un factor. ns: no significativo, ** $p < 0,05$

Genotipo	Metabolito	DPI	0DPI	2DPI	4DPI	Media	
R H A 8 0 1	ALANINA	0 DPI				65,86351636	
		2 DPI	**			40,22139192	
		4 DPI	**	ns		33,27645011	
		12 DPI	ns	**	**	66,33463651	
	GLUTAMATO	0 DPI					39,0479315
		2 DPI	ns				33,81194702
		4 DPI	ns	ns			29,40592202
		12 DPI	**	**	ns		13,09097436
	SACAROSA	0 DPI					147,5725593
		2 DPI	**				76,79355652
		4 DPI	**	ns			49,32947816
		12 DPI	ns	ns	**		143,6149516
	ISOCITRATO	0 DPI					0,359053684
2 DPI		ns				0,412421976	
4 DPI		**	**			0,796880839	
12 DPI		ns	ns	**		0,313000283	
H A 8 9	ALANINA	0 DPI				40,68673856	
		2 DPI	ns			44,38407162	
		4 DPI	ns	ns		63,5317347	
		12 DPI	**	*	ns	69,82115188	
	GLUTAMATO	0 DPI					25,89437213
		2 DPI	**				53,52175486
		4 DPI	**	ns			50,71499427
		12 DPI	ns	**	**		11,59490259
	TYROSINA	0 DPI					1,499701965
		2 DPI	ns				1,494090182
		4 DPI	ns	ns			1,34135402
		12 DPI	**	**	**		3,972424537
	VALINA	0 DPI					194,982606
2 DPI		ns				67,31711417	
4 DPI		ns	ns			70,16017627	
12 DPI		ns	**	**		326,2218443	
QUINATO	0 DPI					52,15088795	
	2 DPI	ns				52,30989725	
	4 DPI	ns	ns			59,98621464	
	12 DPI	**	**	**		86,57829845	
ISOCITRATO	0 DPI					0,356640221	
	2 DPI	ns				0,385729997	
	4 DPI	ns	ns			0,45842059	
	12 DPI	**	**	**		0,083673596	
FRUCTOSA-6-P	0 DPI					0,757527353	
	2 DPI	**				1,737110694	
	4 DPI	ns	ns			1,118660274	
	12 DPI	ns	**	ns		0,415680538	

Tabla Anexa 4. Prueba de comparación Post hoc para metabolitos que presentaron interacciones significativas entre los factores. Comparación de los genotipos dentro de DPI, * p<0,05, ** p<0,025, *** p<0,001, ns: no significativo

Metabolito	Genotipo	Media			
		0 DPI	2 DPI	4 DPI	12 DPI
ALANINA	HA89	40,68673856	44,38407162	63,5317347	69,82115188
	RHA801	65,86351636	40,22139192	33,27645011	66,33463651
		**	ns	***	ns
GLUTAMATO	HA89	25,89437213	53,52175486	50,71499427	11,59490259
	RHA801	39,0479315	33,81194702	29,40592202	13,09097436
		ns	***	***	ns
TIROSINE	HA89	1,499701965	1,494090182	1,34135402	3,972424537
	RHA801	1,77146756	1,419105853	1,113472803	1,073121252
		ns	ns	ns	***
VALINA	HA89	194,982606	67,31711417	70,16017627	326,2218443
	RHA801	65,56718104	58,44479619	59,07724309	40,95228277
		**	ns	ns	***
SACAROSA	HA89	74,79214655	115,0152456	79,90910069	118,9384134
	RHA801	147,5725593	76,79355652	49,32947816	143,6149516
		***	ns	ns	ns
DEHIDROASCORBATO	HA89	1,168385982	1,41554545	1,518539982	0,72190413
	RHA801	1,386963364	1,5789965	0,852568932	1,027444712
		ns	ns	**	ns
T-CAFEATO	HA89	13,86158724	18,80607665	16,06366249	16,72771617
	RHA801	21,58187634	13,27445546	14,56743663	15,14217772
		***	*	ns	ns
QUINATO	HA89	52,15088795	52,30989725	59,98621464	86,57829845
	RHA801	58,95109469	54,85453003	69,32053594	53,51113096
		ns	ns	ns	***
ISOCITRATO	HA89	0,356640221	0,385729997	0,45842059	0,083673596
	RHA801	0,359053684	0,412421976	0,796880839	0,313000283
		ns	ns	***	**
FRUCTOSA-6-P	HA89	0,757527353	1,737110694	1,118660274	0,415680538
	RHA801	1,230279975	1,076166654	0,565077556	0,576179813
		ns	*	ns	ns

Tabla Anexa 4. Prueba de comparación Post hoc para metabolitos que presentaron interacciones significativas entre los factores. Comparación de los genotipos dentro de DPI, * p<0,05, ** p<0,025, *** p<0,001, ns: no significativo

Metabolito	Genotipo	Media			
		0 DPI	2 DPI	4 DPI	12 DPI
ALANINA	HA89	40,68673856	44,38407162	63,5317347	69,82115188
	RHA801	65,86351636	40,22139192	33,27645011	66,33463651
		**	ns	***	ns
GLUTAMATO	HA89	25,89437213	53,52175486	50,71499427	11,59490259
	RHA801	39,0479315	33,81194702	29,40592202	13,09097436
		ns	***	***	ns
TIROSINE	HA89	1,499701965	1,494090182	1,34135402	3,972424537
	RHA801	1,77146756	1,419105853	1,113472803	1,073121252
		ns	ns	ns	***
VALINA	HA89	194,982606	67,31711417	70,16017627	326,2218443
	RHA801	65,56718104	58,44479619	59,07724309	40,95228277
		**	ns	ns	***
SACAROSA	HA89	74,79214655	115,0152456	79,90910069	118,9384134
	RHA801	147,5725593	76,79355652	49,32947816	143,6149516
		***	ns	ns	ns
DEHIDROASCORBATO	HA89	1,168385982	1,41554545	1,518539982	0,72190413
	RHA801	1,386963364	1,5789965	0,852568932	1,027444712
		ns	ns	**	ns
T-CAFEATO	HA89	13,86158724	18,80607665	16,06366249	16,72771617
	RHA801	21,58187634	13,27445546	14,56743663	15,14217772
		***	*	ns	ns
QUINATO	HA89	52,15088795	52,30989725	59,98621464	86,57829845
	RHA801	58,95109469	54,85453003	69,32053594	53,51113096
		ns	ns	ns	***
ISOCITRATO	HA89	0,356640221	0,385729997	0,45842059	0,083673596
	RHA801	0,359053684	0,412421976	0,796880839	0,313000283
		ns	ns	***	**
FRUCTOSA-6-P	HA89	0,757527353	1,737110694	1,118660274	0,415680538
	RHA801	1,230279975	1,076166654	0,565077556	0,576179813
		ns	*	ns	ns

Tabla Anexa 5 . Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea HA89. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
RHAMNOSE vs STEARATE	-0,002941	0,991375
STEARATE vs ONONITOL	0,002941	0,991375
ARGININE vs T-CAFFEATE	0,005882	0,982750
ARGININE vs PALMITATE	0,005882	0,982750
RHAMNOSE vs GLUCOSE-6-P	0,005882	0,982750
THREALOSE vs T-CAFFEATE	0,005882	0,982750
GLYCERATE vs 2-OXOGLUTARATE	-0,005882	0,982750
BENZOATE vs GLUCOSE-6-P	-0,008824	0,974128
FUMARATE vs GLUCOSE-6-P	0,008824	0,974128
ARGININE vs STEARATE	-0,011765	0,965508
RHAMNOSE vs PALMITATE	-0,011765	0,965508
THREALOSE vs GLYCEROL	0,011765	0,965508
XYLOSE vs CITRATE	0,011765	0,965508
T-CAFFEATE vs CITRATE	-0,011765	0,965508
HOMOSERINE vs GLYCOLATE	0,014706	0,956892
ARABINOSE vs CITRATE	-0,014706	0,956892
RAFFINOSE vs T-CAFFEATE	0,014706	0,956892
XYLOSE vs FRUCTOSE-6-P	-0,014706	0,956892
BENZOATE vs ONONITOL	-0,014706	0,956892
CHLOROGENATE vs THREONATE	-0,014706	0,956892
T-CAFFEATE vs ISOCITRATE	0,014706	0,956892
ASPARTATE vs CHLOROGENATE	-0,014706	0,956892
ASPARAGINE vs FUMARATE	0,017647	0,948280
VALINE vs STEARATE	0,017647	0,948280
RHAMNOSE vs MALATE	-0,017647	0,948280
DEHYDROASCORBATE vs MALTITOL	-0,017647	0,948280
ASPARAGINE vs ONONITOL	-0,020588	0,939674
MYO-INOSITOL-1-P vs ARABINOSE	0,020588	0,939674
DEHYDROASCORBATE vs PALMITATE	-0,020588	0,939674
QUINATE vs STEARATE	-0,020588	0,939674
MALATE vs GLYCEROL	-0,020588	0,939674
ASPARTATE vs SUCROSE	0,020588	0,939674
ALANINE vs GLYCEROL	-0,023529	0,931074
TYROSINE vs ARABINOSE	-0,023529	0,931074
GLYCERATE vs THREONATE	0,023529	0,931074
ISOLEUCINE vs T-CAFFEATE	-0,026471	0,922481
ARABINOSE vs GLYCOLATE	0,026471	0,922481
SACCHARATE vs CITRATE	-0,026471	0,922481
MYO-INOSITOL-1-P vs MALTITOL	-0,026471	0,922481
ASPARTATE vs XYLOSE	0,026471	0,922481
SUCROSE vs PALMITATE	-0,029412	0,913896
DEHYDROASCORBATE vs STEARATE	0,029412	0,913896
T-CAFFEATE vs PALMITATE	0,029412	0,913896
ASPARAGINE vs RHAMNOSE	0,032353	0,905320
TYROSINE vs GLUCOSE-6-P	-0,032353	0,905320
TYROSINE vs GLYCEROL	-0,032353	0,905320
RHAMNOSE vs GLYCEROL	0,032353	0,905320
MYO-INOSITOL-1-P vs RHAMNOSE	-0,032353	0,905320
RIBOSE vs CHLOROGENATE	0,032353	0,905320
T-CAFFEATE vs STEARATE	-0,032353	0,905320
QUINATE vs SACCHARATE	0,032353	0,905320
VALINE vs MALTITOL	0,035294	0,896753

Tabla Anexa 5 . Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea HA89. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
THREALOSE vs MALTITOL	0,035294	0,896753
GLYCOLATE vs SUCCINATE	0,035294	0,896753
RIBOSE vs GLUCOSE-6-P	-0,038235	0,888198
SUCROSE vs SUCCINATE	0,038235	0,888198
CHLOROGENATE vs SUCCINATE	0,038235	0,888198
CHLOROGENATE vs FRUCTOSE-6-P	-0,038235	0,888198
THREONATE vs GLUCOSE-6-P	-0,038235	0,888198
PALMITATE vs ONONITOL	0,038235	0,888198
ASPARAGINE vs 2-OXOGLUTARATE	-0,041176	0,879654
GLYCINE vs SUCROSE	0,041176	0,879654
TYROSINE vs PALMITATE	0,041176	0,879654
GLUTAMATE vs MALTITOL	-0,044118	0,871122
GLUCONATE vs GLUCOSE-6-P	0,044118	0,871122
SACCHARATE vs MALATE	0,044118	0,871122
RHAMNOSE vs FRUCTOSE-6-P	0,047059	0,862604
GLYCOLATE vs GLYCEROL	0,047059	0,862604
STEARATE vs GLYCEROL	0,047059	0,862604
QUINATE vs PALMITATE	0,050000	0,854100
MYO-INOSITOL-1-P vs ASPARAGINE	-0,052941	0,845610
GLUTAMATE vs GLYCERATE	0,052941	0,845610
ISOLEUCINE vs SACCHARATE	-0,052941	0,845610
SUCCINATE vs GLYCEROL	0,052941	0,845610
TYROSINE vs STEARATE	-0,055882	0,837137
ARABINOSE vs QUINATE	0,055882	0,837137
RHAMNOSE vs SUCCINATE	0,055882	0,837137
THREALOSE vs SUCROSE	0,055882	0,837137
ASPARTATE vs GLYCEROL	0,055882	0,837137
GLYCINE vs HOMOSERINE	0,058824	0,828681
VALINE vs SACCHARATE	0,058824	0,828681
BENZOATE vs MYO-INOSITOL	0,058824	0,828681
CITRATE vs ONONITOL	-0,058824	0,828681
FUMARATE vs GLYCEROL	0,058824	0,828681
ARGININE vs ONONITOL	-0,061765	0,820242
GLYCINE vs GLUCONATE	0,061765	0,820242
MYO-INOSITOL-1-P vs SUCROSE	-0,061765	0,820242
BENZOATE vs STEARATE	0,061765	0,820242
DEHYDROASCORBATE vs GLYCERATE	0,061765	0,820242
ALANINE vs ARABINOSE	0,064706	0,811821
ASPARAGINE vs MALTITOL	0,064706	0,811821
BENZOATE vs MALTITOL	0,064706	0,811821
GLYCERATE vs T-CAFFEATE	0,064706	0,811821
STEARATE vs FUMARATE	-0,064706	0,811821
ASPARTATE vs GLYCOLATE	-0,064706	0,811821
ALANINE vs GLYCINE	-0,067647	0,803420
ISOLEUCINE vs XYLOSE	-0,067647	0,803420
TYROSINE vs XYLOSE	-0,067647	0,803420
SUCROSE vs CHLOROGENATE	0,067647	0,803420
QUINATE vs MALTITOL	-0,067647	0,803420
PALMITATE vs MALTITOL	-0,067647	0,803420
CITRATE vs GLUCOSE-6-P	-0,067647	0,803420
ASPARAGINE vs RIBOSE	-0,070588	0,795039
ISOLEUCINE vs PROLINE	0,070588	0,795039

Tabla Anexa 5 . Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea HA89. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
PROLINE vs ARABINOSE	0,070588	0,795039
TYROSINE vs SACCHARATE	0,070588	0,795039
SUCROSE vs FRUCTOSE-6-P	0,070588	0,795039
STEARATE vs FRUCTOSE-6-P	-0,070588	0,795039
ASPARAGINE vs FRUCTOSE-6-P	-0,073529	0,786679
THREALOSE vs ARABINOSE	0,073529	0,786679
ASPARAGINE vs STEARATE	-0,076471	0,778341
TYROSINE vs GLYCEROL	0,076471	0,778341
VALINE vs PALMITATE	0,079412	0,770025
ARABINOSE vs BENZOATE	0,079412	0,770025
GLYCOLATE vs SACCHARATE	-0,079412	0,770025
FRUCTOSE-6-P vs GLYCEROL	0,079412	0,770025
ARABINOSE vs MALATE	-0,082353	0,761733
SUCROSE vs MALATE	-0,082353	0,761733
GLUCONATE vs GLYCOLATE	0,082353	0,761733
PALMITATE vs GLYCEROL	0,082353	0,761733
ASPARAGINE vs THREONATE	0,085294	0,753465
GLYCINE vs ARABINOSE	-0,085294	0,753465
ISOLEUCINE vs STEARATE	0,085294	0,753465
CHLOROGENATE vs MYO-INOSITOL	-0,085294	0,753465
ALANINE vs GLYCEROL	0,088235	0,745222
THREALOSE vs HOMOSERINE	0,088235	0,745222
ISOLEUCINE vs SUCROSE	0,088235	0,745222
RAFFINOSE vs XYLOSE	-0,088235	0,745222
THREALOSE vs GLYCEROL	0,088235	0,745222
BENZOATE vs GLYCEROL	0,088235	0,745222
PALMITATE vs CITRATE	0,088235	0,745222
2-OXOGLUTARATE vs ONONITOL	-0,088235	0,745222
ASPARTATE vs RHAMNOSE	0,088235	0,745222
ASPARAGINE vs MYO-INOSITOL	-0,091176	0,737005
GLYCINE vs MALTITOL	0,091176	0,737005
RIBOSE vs GLYCOLATE	0,091176	0,737005
QUINATE vs GLYCEROL	0,091176	0,737005
ALANINE vs MYO-INOSITOL	-0,094118	0,728814
GLYCINE vs BENZOATE	-0,094118	0,728814
XYLOSE vs MYO-INOSITOL	-0,094118	0,728814
STEARATE vs SUCCINATE	-0,094118	0,728814
ASPARAGINE vs PALMITATE	-0,097059	0,720651
GLYCINE vs VALINE	-0,097059	0,720651
GLYCINE vs STEARATE	0,097059	0,720651
GLYCINE vs GLUCOSE-6-P	0,097059	0,720651
ISOLEUCINE vs GLYCEROL	-0,097059	0,720651
ARABINOSE vs FRUCTOSE-6-P	0,097059	0,720651
RIBOSE vs T-CAFFEATE	0,097059	0,720651
THREONATE vs GLYCEROL	0,097059	0,720651
VALINE vs GLUCOSE-6-P	-0,100000	0,712516
SUCROSE vs STEARATE	-0,100000	0,712516
GLYCOLATE vs FRUCTOSE-6-P	0,100000	0,712516
THREONATE vs GLYCEROL	0,100000	0,712516
ISOLEUCINE vs MALTITOL	0,102941	0,704410
MYO-INOSITOL-1-P vs BENZOATE	-0,102941	0,704410
MYO-INOSITOL-1-P vs CHLOROGENATE	-0,102941	0,704410

Tabla Anexa 5 . Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea HA89. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
GLYCERATE vs FRUCTOSE-6-P	-0,102941	0,704410
T-CAFFEATE vs GLYCEROL	0,102941	0,704410
PALMITATE vs FUMARATE	-0,102941	0,704410
STEARATE vs MALTITOL	-0,102941	0,704410
ASPARAGINE vs GLUTAMATE	-0,105882	0,696334
ASPARAGINE vs GLUCONATE	-0,105882	0,696334
ASPARAGINE vs GLUCOSE-6-P	-0,105882	0,696334
GLUTAMATE vs STEARATE	-0,105882	0,696334
GLYCINE vs RHAMNOSE	0,105882	0,696334
GLYCINE vs GLYCOLATE	0,105882	0,696334
HOMOSERINE vs GLYCERATE	-0,105882	0,696334
RIBOSE vs ONONITOL	0,105882	0,696334
STEARATE vs CITRATE	0,105882	0,696334
HOMOSERINE vs MYO-INOSITOL	-0,108824	0,688288
THREALOSE vs XYLOSE	-0,108824	0,688288
XYLOSE vs DEHYDROASCORBATE	0,108824	0,688288
GLYCOLATE vs MALATE	-0,108824	0,688288
T-CAFFEATE vs ONONITOL	-0,108824	0,688288
QUINATE vs GLYCEROL	-0,108824	0,688288
SACCHARATE vs GLYCEROL	0,108824	0,688288
ASPARTATE vs ARABINOSE	0,108824	0,688288
PROLINE vs GLYCOLATE	0,111765	0,680274
PALMITATE vs FRUCTOSE-6-P	-0,111765	0,680274
ARGININE vs SACCHARATE	-0,114706	0,672291
GLUTAMATE vs PROLINE	-0,114706	0,672291
TYROSINE vs MYO-INOSITOL	-0,114706	0,672291
FRUCTOSE-6-P vs MALTITOL	-0,114706	0,672291
ASPARAGINE vs ISOCITRATE	0,117647	0,664341
GLYCINE vs TYROSINE	-0,117647	0,664341
ARABINOSE vs DEHYDROASCORBATE	0,117647	0,664341
RAFFINOSE vs MALTITOL	-0,117647	0,664341
THREALOSE vs ASPARAGINE	0,120588	0,656425
GLYCERATE vs GLUCOSE-6-P	-0,120588	0,656425
T-CAFFEATE vs MALATE	0,120588	0,656425
GLYCEROL vs MALTITOL	0,120588	0,656425
MYO-INOSITOL-1-P vs GLYCEROL	0,120588	0,656425
ALANINE vs MALATE	-0,123529	0,648542
GLYCINE vs FRUCTOSE-6-P	0,123529	0,648542
PROLINE vs T-CAFFEATE	0,123529	0,648542
PROLINE vs GLYCEROL	-0,123529	0,648542
ARABINOSE vs ONONITOL	0,123529	0,648542
THREALOSE vs GLUCOSE-6-P	-0,123529	0,648542
XYLOSE vs QUINATE	-0,123529	0,648542
PALMITATE vs SUCCINATE	-0,123529	0,648542
ASPARAGINE vs GLYCOLATE	0,126471	0,640694
RHAMNOSE vs CHLOROGENATE	0,126471	0,640694
THREALOSE vs BENZOATE	0,126471	0,640694
MALATE vs GLUCOSE-6-P	0,126471	0,640694
ASPARAGINE vs GLYCEROL	-0,129412	0,632882
GLUTAMATE vs XYLOSE	0,129412	0,632882
HOMOSERINE vs GLYCEROL	-0,129412	0,632882
VALINE vs THREONATE	-0,129412	0,632882

Tabla Anexa 5 . Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea HA89. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
SUCROSE vs MYO-INOSITOL	0,129412	0,632882
XYLOSE vs MALATE	-0,129412	0,632882
MYO-INOSITOL-1-P vs XYLOSE	-0,129412	0,632882
BENZOATE vs SACCHARATE	-0,129412	0,632882
BENZOATE vs PALMITATE	0,129412	0,632882
ASPARTATE vs ALANINE	-0,129412	0,632882
ASPARTATE vs ASPARAGINE	-0,129412	0,632882
RHAMNOSE vs T-CAFFEATE	-0,132353	0,625106
SUCROSE vs SACCHARATE	-0,132353	0,625106
GLUCONATE vs MALATE	0,132353	0,625106
GLYCOLATE vs GLUCOSE-6-P	0,132353	0,625106
ALANINE vs RHAMNOSE	-0,135294	0,617367
THREULOSE vs VALINE	0,135294	0,617367
GENTIOBIOSE vs T-CAFFEATE	0,135294	0,617367
GLYCERATE vs STEARATE	0,135294	0,617367
GLYCOLATE vs GLYCEROL	0,135294	0,617367
SACCHARATE vs SUCCINATE	0,135294	0,617367
XYLOSE vs BENZOATE	-0,138235	0,609666
BENZOATE vs GLYCEROL	-0,138235	0,609666
CHLOROGENATE vs CITRATE	-0,138235	0,609666
CITRATE vs MALTITOL	0,138235	0,609666
GLYCINE vs PALMITATE	0,141176	0,602003
ISOLEUCINE vs GLYCOLATE	-0,141176	0,602003
CHLOROGENATE vs ISOCITRATE	0,141176	0,602003
GLUCONATE vs GLYCERATE	0,141176	0,602003
GLYCERATE vs ISOCITRATE	0,141176	0,602003
2-OXOGLUTARATE vs MALTITOL	0,141176	0,602003
GLUTAMATE vs GLYCEROL	0,144118	0,594378
HOMOSERINE vs SUCCINATE	-0,144118	0,594378
PROLINE vs TYROSINE	0,144118	0,594378
PROLINE vs DEHYDROASCORBATE	-0,144118	0,594378
CHLOROGENATE vs FUMARATE	0,144118	0,594378
CHLOROGENATE vs GLUCOSE-6-P	0,144118	0,594378
GLUTAMATE vs PALMITATE	-0,147059	0,586793
RAFFINOSE vs SUCROSE	0,147059	0,586793
GLYCOLATE vs QUINATE	-0,147059	0,586793
ARGININE vs SUCROSE	0,150000	0,579249
HOMOSERINE vs RAFFINOSE	-0,150000	0,579249
HOMOSERINE vs MALATE	-0,150000	0,579249
ARABINOSE vs SUCCINATE	-0,150000	0,579249
GLYCOLATE vs 2-OXOGLUTARATE	0,150000	0,579249
THREULOSE vs RHAMNOSE	0,152941	0,571745
XYLOSE vs 2-OXOGLUTARATE	0,152941	0,571745
BENZOATE vs FRUCTOSE-6-P	-0,152941	0,571745
CHLOROGENATE vs SACCHARATE	0,152941	0,571745
T-CAFFEATE vs THREONATE	-0,152941	0,571745
ASPARTATE vs PROLINE	-0,152941	0,571745
GLUTAMATE vs CHLOROGENATE	0,155882	0,564282
GLYCINE vs CHLOROGENATE	0,155882	0,564282
GLYCINE vs SACCHARATE	-0,155882	0,564282
ISOLEUCINE vs PALMITATE	0,155882	0,564282
STEARATE vs ISOCITRATE	-0,155882	0,564282

Tabla Anexa 5 . Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea HA89. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
FUMARATE vs MYO-INOSITOL	0,155882	0,564282
DEHYDROASCORBATE vs ONONITOL	-0,158824	0,556861
GLUCONATE vs GLYCEROL	0,158824	0,556861
PROLINE vs VALINE	0,161765	0,549483
ARABINOSE vs CHLOROGENATE	-0,161765	0,549483
ARABINOSE vs SACCHARATE	0,161765	0,549483
GENTIOBIOSE vs GLUCOSE-6-P	0,161765	0,549483
PALMITATE vs GLUCOSE-6-P	0,161765	0,549483
ISOCITRATE vs GLUCOSE-6-P	0,161765	0,549483
GENTIOBIOSE vs GLYCERATE	-0,167647	0,534857
GLYCERATE vs PALMITATE	0,167647	0,534857
ISOCITRATE vs ONONITOL	0,167647	0,534857
ALANINE vs GLUCOSE-6-P	-0,170588	0,527610
VALINE vs GLYCEROL	-0,170588	0,527610
GLUCONATE vs SUCCINATE	0,170588	0,527610
QUINATE vs GLUCOSE-6-P	-0,170588	0,527610
STEARATE vs GLUCOSE-6-P	0,170588	0,527610
MALATE vs GLYCEROL	0,170588	0,527610
MALITOL vs MYO-INOSITOL	-0,170588	0,527610
GLUTAMATE vs SUCROSE	-0,173529	0,520407
PROLINE vs XYLOSE	-0,173529	0,520407
TYROSINE vs GLUCONATE	-0,173529	0,520407
VALINE vs XYLOSE	-0,173529	0,520407
GLUCOSE-6-P vs GLYCEROL	0,173529	0,520407
ASPARAGINE vs DEHYDROASCORBATE	-0,176471	0,513251
GLYCINE vs QUINATE	-0,176471	0,513251
ARABINOSE vs THREONATE	0,176471	0,513251
RIBOSE vs RAFFINOSE	0,176471	0,513251
RIBOSE vs GLYCEROL	0,176471	0,513251
SUCROSE vs ONONITOL	-0,176471	0,513251
T-CAFFEATE vs SACCHARATE	0,176471	0,513251
STEARATE vs 2-OXOGLUTARATE	-0,176471	0,513251
ALANINE vs ONONITOL	-0,179412	0,506140
MYO-INOSITOL-1-P vs HOMOSERINE	-0,179412	0,506140
GLYCERATE vs GLYCEROL	-0,179412	0,506140
PALMITATE vs 2-OXOGLUTARATE	-0,179412	0,506140
STEARATE vs GLYCEROL	0,179412	0,506140
ALANINE vs ISOLEUCINE	0,182353	0,499075
GLYCINE vs ONONITOL	-0,182353	0,499075
ISOLEUCINE vs GLYCEROL	-0,182353	0,499075
XYLOSE vs CHLOROGENATE	-0,182353	0,499075
BENZOATE vs CHLOROGENATE	0,182353	0,499075
CHLOROGENATE vs 2-OXOGLUTARATE	0,182353	0,499075
CHLOROGENATE vs GLYCEROL	0,182353	0,499075
QUINATE vs MYO-INOSITOL	-0,182353	0,499075
ASPARTATE vs GLYCEROL-1-P	0,182353	0,499075
GLUTAMATE vs ONONITOL	-0,185294	0,492057
ARABINOSE vs MYO-INOSITOL	0,185294	0,492057
RAFFINOSE vs GLYCEROL	0,185294	0,492057
GENTIOBIOSE vs ONONITOL	0,185294	0,492057
RHAMNOSE vs MYO-INOSITOL	-0,188235	0,485087
XYLOSE vs STEARATE	-0,188235	0,485087

Tabla Anexa 5 . Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea HA89. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
T-CAFFEATE vs FUMARATE	-0,188235	0,485087
GLUCOSE-6-P vs GLYCEROL	0,188235	0,485087
ARABINOSE vs 2-OXOGLUTARATE	0,191176	0,478164
RIBOSE vs GLYCERATE	0,191176	0,478164
GLUCONATE vs T-CAFFEATE	-0,191176	0,478164
PALMITATE vs GLYCEROL	0,191176	0,478164
ALANINE vs DEHYDROASCORBATE	-0,194118	0,471290
GLUTAMATE vs ARABINOSE	0,194118	0,471290
ARABINOSE vs PALMITATE	-0,194118	0,471290
SUCROSE vs GENTIOBIOSE	-0,194118	0,471290
VALINE vs SUCROSE	0,197059	0,464464
RHAMNOSE vs QUINATE	-0,197059	0,464464
ASPARTATE vs GLYCERATE	-0,197059	0,464464
ISOLEUCINE vs GLYCERATE	0,200000	0,457688
ISOLEUCINE vs THREONATE	-0,200000	0,457688
VALINE vs GLYCERATE	0,200000	0,457688
VALINE vs T-CAFFEATE	0,200000	0,457688
ARABINOSE vs STEARATE	-0,200000	0,457688
GENTIOBIOSE vs GLYCOLATE	-0,200000	0,457688
XYLOSE vs SUCCINATE	-0,200000	0,457688
XYLOSE vs GLYCEROL	0,200000	0,457688
CHLOROGENATE vs GLYCEROL	0,200000	0,457688
CHLOROGENATE vs MALTITOL	-0,200000	0,457688
MYO-INOSITOL-1-P vs ALANINE	-0,202941	0,450961
PROLINE vs GLYCEROL	-0,202941	0,450961
PROLINE vs ONONITOL	-0,202941	0,450961
CHLOROGENATE vs GLUCONATE	-0,202941	0,450961
QUINATE vs ONONITOL	0,202941	0,450961
ALANINE vs SACCHARATE	-0,205882	0,444285
GLYCINE vs XYLOSE	-0,205882	0,444285
VALINE vs GLYCOLATE	-0,205882	0,444285
CHLOROGENATE vs MALATE	-0,205882	0,444285
PALMITATE vs ISOCITRATE	-0,205882	0,444285
GLYCEROL vs ONONITOL	0,205882	0,444285
ASPARTATE vs HOMOSERINE	-0,205882	0,444285
HOMOSERINE vs GLUCOSE-6-P	0,208824	0,437659
XYLOSE vs GLYCOLATE	0,208824	0,437659
XYLOSE vs PALMITATE	-0,208824	0,437659
THREONATE vs MYO-INOSITOL	0,208824	0,437659
ALANINE vs SUCCINATE	-0,211765	0,431083
GLYCINE vs ISOLEUCINE	-0,211765	0,431083
GLYCINE vs PROLINE	-0,211765	0,431083
GLYCERATE vs FUMARATE	0,211765	0,431083
ALANINE vs ASPARAGINE	0,214706	0,424559
ALANINE vs RIBOSE	-0,214706	0,424559
HOMOSERINE vs ONONITOL	-0,214706	0,424559
VALINE vs ONONITOL	0,214706	0,424559
RHAMNOSE vs RAFFINOSE	-0,214706	0,424559
ALANINE vs VALINE	0,217647	0,418087
HOMOSERINE vs T-CAFFEATE	0,217647	0,418087
ISOLEUCINE vs RHAMNOSE	-0,217647	0,418087
PROLINE vs FRUCTOSE-6-P	-0,217647	0,418087

Tabla Anexa 5 . Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea HA89. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
MYO-INOSITOL-1-P vs VALINE	-0,217647	0,418087
SUCROSE vs GLYCERATE	-0,217647	0,418087
GLYCOLATE vs T-CAFFEATE	-0,217647	0,418087
ARGININE vs MALTITOL	-0,220588	0,411666
ASPARAGINE vs SACCHARATE	0,220588	0,411666
GLYCEROL vs GLYCEROL-1-P	0,220588	0,411666
GLYCEROL vs MYO-INOSITOL	0,220588	0,411666
DEHYDROASCORBATE vs GLYCEROL	0,223529	0,405298
GLYCOLATE vs THREONATE	0,223529	0,405298
FRUCTOSE-6-P vs ONONITOL	-0,223529	0,405298
GLYCEROL vs MALTITOL	0,223529	0,405298
ASPARTATE vs T-CAFFEATE	0,223529	0,405298
ALANINE vs PALMITATE	-0,226471	0,398983
VALINE vs MYO-INOSITOL	-0,226471	0,398983
CITRATE vs GLYCEROL	0,226471	0,398983
GLUCOSE-6-P vs ONONITOL	-0,226471	0,398983
ARGININE vs XYLOSE	-0,229412	0,392720
RAFFINOSE vs FUMARATE	0,229412	0,392720
SUCROSE vs GLUCOSE-6-P	0,229412	0,392720
GLYCOLATE vs MALTITOL	0,229412	0,392720
MYO-INOSITOL-1-P vs QUINATE	-0,229412	0,392720
SACCHARATE vs GLYCEROL	0,229412	0,392720
GLYCEROL vs ONONITOL	0,229412	0,392720
HOMOSERINE vs FRUCTOSE-6-P	-0,232353	0,386511
T-CAFFEATE vs FRUCTOSE-6-P	0,232353	0,386511
SACCHARATE vs MYO-INOSITOL	0,232353	0,386511
PROLINE vs SUCCINATE	-0,235294	0,380356
THREALOSE vs TYROSINE	0,235294	0,380356
VALINE vs GLYCEROL	-0,235294	0,380356
ARABINOSE vs RAFFINOSE	-0,235294	0,380356
ASPARAGINE vs T-CAFFEATE	-0,238235	0,374254
ISOLEUCINE vs ARABINOSE	-0,238235	0,374254
THREALOSE vs ONONITOL	0,238235	0,374254
CHLOROGENATE vs ONONITOL	0,238235	0,374254
GLYCERATE vs MALTITOL	0,238235	0,374254
PROLINE vs PALMITATE	0,241176	0,368207
RHAMNOSE vs CITRATE	0,241176	0,368207
GLYCERATE vs SACCHARATE	0,241176	0,368207
ARGININE vs GLYCOLATE	-0,244118	0,362214
PROLINE vs STEARATE	0,244118	0,362214
ARGININE vs GLYCERATE	0,247059	0,356275
SUCROSE vs CITRATE	-0,247059	0,356275
XYLOSE vs SACCHARATE	0,247059	0,356275
TYROSINE vs T-CAFFEATE	0,250000	0,350391
THREALOSE vs FUMARATE	-0,250000	0,350391
ASPARAGINE vs ARABINOSE	0,252941	0,344563
GLUTAMATE vs T-CAFFEATE	0,252941	0,344563
GLYCINE vs GLYCERATE	-0,252941	0,344563
PROLINE vs MALATE	-0,252941	0,344563
PROLINE vs GLUCOSE-6-P	-0,252941	0,344563
RAFFINOSE vs GLYCEROL	-0,252941	0,344563
DEHYDROASCORBATE vs GLYCEROL	0,252941	0,344563

Tabla Anexa 5 . Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea HA89. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
GLYCERATE vs MYO-INOSITOL	-0,252941	0,344563
SACCHARATE vs GLUCOSE-6-P	0,252941	0,344563
GLYCOLATE vs ONONITOL	0,255882	0,338790
T-CAFFEATE vs MALTITOL	-0,255882	0,338790
PROLINE vs RHAMNOSE	-0,258824	0,333072
MYO-INOSITOL-1-P vs GLYCOLATE	-0,258824	0,333072
ALANINE vs HOMOSERINE	0,261765	0,327410
GLYCINE vs GLYCEROL	0,261765	0,327410
RAFFINOSE vs GLUCONATE	0,261765	0,327410
SUCROSE vs QUINATE	0,261765	0,327410
CITRATE vs FRUCTOSE-6-P	0,261765	0,327410
GLYCEROL vs FRUCTOSE-6-P	0,261765	0,327410
GLUTAMATE vs GLYCOLATE	0,264706	0,321804
GLYCINE vs THREONATE	0,264706	0,321804
PROLINE vs SUCROSE	0,264706	0,321804
PROLINE vs BENZOATE	0,264706	0,321804
TYROSINE vs MALTITOL	0,264706	0,321804
RAFFINOSE vs GLUCOSE-6-P	0,264706	0,321804
FUMARATE vs ONONITOL	0,264706	0,321804
ALANINE vs STEARATE	-0,267647	0,316254
PROLINE vs MYO-INOSITOL	-0,267647	0,316254
ARABINOSE vs GLUCOSE-6-P	-0,267647	0,316254
GLUCONATE vs MYO-INOSITOL	0,267647	0,316254
T-CAFFEATE vs 2-OXOGLUTARATE	0,267647	0,316254
ALANINE vs GLUTAMATE	-0,270588	0,310761
THREALOSE vs ALANINE	0,270588	0,310761
GLYCINE vs GENTIOBIOSE	0,270588	0,310761
ISOLEUCINE vs GLUCOSE-6-P	-0,270588	0,310761
ARABINOSE vs GLYCEROL	-0,270588	0,310761
GENTIOBIOSE vs XYLOSE	0,270588	0,310761
DEHYDROASCORBATE vs SACCHARATE	0,270588	0,310761
GLYCEROL vs MYO-INOSITOL	0,270588	0,310761
GLUTAMATE vs GLYCEROL	0,273529	0,305323
ISOLEUCINE vs GLUCONATE	-0,273529	0,305323
VALINE vs 2-OXOGLUTARATE	-0,273529	0,305323
RIBOSE vs QUINATE	-0,273529	0,305323
RIBOSE vs STEARATE	-0,273529	0,305323
RAFFINOSE vs SACCHARATE	0,273529	0,305323
BENZOATE vs GLYCERATE	0,273529	0,305323
DEHYDROASCORBATE vs CHLOROGENATE	0,273529	0,305323
MYO-INOSITOL-1-P vs GLUCOSE-6-P	0,273529	0,305323
RIBOSE vs MALTITOL	0,276471	0,299942
TYROSINE vs CHLOROGENATE	0,279412	0,294618
THREONATE vs FRUCTOSE-6-P	0,279412	0,294618
2-OXOGLUTARATE vs GLUCOSE-6-P	0,279412	0,294618
ASPARAGINE vs BENZOATE	0,282353	0,289350
ASPARAGINE vs MALATE	-0,282353	0,289350
ISOLEUCINE vs CHLOROGENATE	0,282353	0,289350
TYROSINE vs GENTIOBIOSE	-0,282353	0,289350
DEHYDROASCORBATE vs T-CAFFEATE	0,288235	0,278984
STEARATE vs MALATE	-0,288235	0,278984
SUCCINATE vs MALTITOL	-0,288235	0,278984

Tabla Anexa 5 . Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea HA89. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
GLYCINE vs FUMARATE	0,291176	0,273887
ALANINE vs XYLOSE	-0,294118	0,268847
ALANINE vs 2-OXOGLUTARATE	-0,294118	0,268847
ALANINE vs MALTITOL	-0,294118	0,268847
ARGININE vs ARABINOSE	-0,294118	0,268847
ASPARAGINE vs GLYCINE	-0,294118	0,268847
TYROSINE vs RHAMNOSE	-0,294118	0,268847
ARABINOSE vs T-CAFFEATE	-0,294118	0,268847
QUINATE vs 2-OXOGLUTARATE	-0,294118	0,268847
PROLINE vs ISOCITRATE	-0,297059	0,263863
GENTIOBIOSE vs BENZOATE	-0,297059	0,263863
GLUCOSE-6-P vs MALTITOL	-0,297059	0,263863
ARGININE vs THREONATE	-0,300000	0,258936
HOMOSERINE vs GLYCEROL	-0,300000	0,258936
BENZOATE vs GLYCOLATE	-0,300000	0,258936
PALMITATE vs MYO-INOSITOL	-0,300000	0,258936
MYO-INOSITOL-1-P vs GLYCEROL	0,300000	0,258936
ALANINE vs CHLOROGENATE	0,302941	0,254067
HOMOSERINE vs STEARATE	0,302941	0,254067
PROLINE vs FUMARATE	-0,302941	0,254067
VALINE vs RAFFINOSE	-0,302941	0,254067
RAFFINOSE vs ISOCITRATE	0,302941	0,254067
GENTIOBIOSE vs CHLOROGENATE	-0,302941	0,254067
BENZOATE vs T-CAFFEATE	0,302941	0,254067
ASPARAGINE vs RAFFINOSE	-0,305882	0,249254
TYROSINE vs THREONATE	-0,305882	0,249254
MYO-INOSITOL-1-P vs TYROSINE	-0,305882	0,249254
RIBOSE vs PALMITATE	-0,305882	0,249254
QUINATE vs THREONATE	-0,308824	0,244499
FUMARATE vs FRUCTOSE-6-P	0,308824	0,244499
HOMOSERINE vs DEHYDROASCORBATE	-0,311765	0,239800
HOMOSERINE vs PALMITATE	0,311765	0,239800
VALINE vs RHAMNOSE	-0,311765	0,239800
BENZOATE vs GLUCONATE	-0,311765	0,239800
CHLOROGENATE vs GLYCOLATE	0,311765	0,239800
THREONATE vs ONONITOL	0,311765	0,239800
STEARATE vs MYO-INOSITOL	-0,311765	0,239800
HOMOSERINE vs CITRATE	-0,314706	0,235158
THREALOSE vs ISOLEUCINE	0,314706	0,235158
PROLINE vs SACCHARATE	-0,314706	0,235158
RAFFINOSE vs DEHYDROASCORBATE	0,314706	0,235158
SUCROSE vs GLYCEROL	-0,314706	0,235158
THREALOSE vs DEHYDROASCORBATE	-0,314706	0,235158
THREALOSE vs SACCHARATE	-0,314706	0,235158
GLYCERATE vs GLYCOLATE	0,314706	0,235158
GLYCERATE vs GLYCEROL	0,314706	0,235158
ISOCITRATE vs GLYCEROL	0,314706	0,235158
HOMOSERINE vs 2-OXOGLUTARATE	-0,317647	0,230573
SUCROSE vs 2-OXOGLUTARATE	-0,317647	0,230573
HOMOSERINE vs PROLINE	0,320588	0,226045
TYROSINE vs GLYCOLATE	-0,320588	0,226045
THREALOSE vs QUINATE	0,320588	0,226045

Tabla Anexa 5 . Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea HA89. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
THREALOSE vs ISOCITRATE	-0,320588	0,226045
XYLOSE vs GLUCOSE-6-P	-0,320588	0,226045
GLYCOLATE vs CITRATE	0,320588	0,226045
FUMARATE vs MALTITOL	0,320588	0,226045
ASPARAGINE vs TYROSINE	0,323529	0,221574
RHAMNOSE vs SACCHARATE	0,323529	0,221574
RAFFINOSE vs GLYCOLATE	-0,323529	0,221574
SUCROSE vs DEHYDROASCORBATE	-0,323529	0,221574
GLUCONATE vs QUINATE	-0,323529	0,221574
PROLINE vs RIBOSE	-0,326471	0,217159
DEHYDROASCORBATE vs GLYCOLATE	0,326471	0,217159
DEHYDROASCORBATE vs GLUCOSE-6-P	0,326471	0,217159
SACCHARATE vs MALTITOL	0,326471	0,217159
2-OXOGLUTARATE vs GLYCEROL	0,326471	0,217159
ASPARTATE vs MALTITOL	-0,326471	0,217159
ARGININE vs BENZOATE	0,329412	0,212801
ASPARAGINE vs XYLOSE	0,329412	0,212801
GLYCINE vs RIBOSE	0,329412	0,212801
ARABINOSE vs ISOCITRATE	0,329412	0,212801
ASPARTATE vs BENZOATE	-0,329412	0,212801
ALANINE vs GLYCOLATE	-0,332353	0,208500
ASPARAGINE vs SUCROSE	-0,332353	0,208500
HOMOSERINE vs SACCHARATE	-0,332353	0,208500
PROLINE vs MALTITOL	-0,332353	0,208500
T-CAFFEATE vs QUINATE	0,332353	0,208500
FUMARATE vs GLYCEROL	0,332353	0,208500
ISOCITRATE vs MALTITOL	0,332353	0,208500
ASPARTATE vs GLUCONATE	0,332353	0,208500
HOMOSERINE vs SUCROSE	0,335294	0,204255
BENZOATE vs SUCCINATE	-0,335294	0,204255
2-OXOGLUTARATE vs GLYCEROL	0,335294	0,204255
ASPARTATE vs SACCHARATE	0,335294	0,204255
ASPARTATE vs STEARATE	-0,335294	0,204255
ALANINE vs TYROSINE	0,338235	0,200066
ASPARAGINE vs CHLOROGENATE	0,338235	0,200066
THREALOSE vs GLYCINE	-0,338235	0,200066
PROLINE vs CITRATE	-0,338235	0,200066
TYROSINE vs ONONITOL	0,338235	0,200066
RIBOSE vs BENZOATE	-0,338235	0,200066
GLUCONATE vs CITRATE	0,338235	0,200066
MALATE vs MALTITOL	-0,338235	0,200066
ARGININE vs CHLOROGENATE	0,341176	0,195933
CHLOROGENATE vs STEARATE	0,341176	0,195933
GLUCONATE vs STEARATE	-0,341176	0,195933
PALMITATE vs MALATE	-0,341176	0,195933
SUCCINATE vs GLYCEROL	0,341176	0,195933
ALANINE vs GENTIOBIOSE	-0,344118	0,191856
ALANINE vs ISOCITRATE	-0,344118	0,191856
MYO-INOSITOL-1-P vs ARGININE	-0,344118	0,191856
RHAMNOSE vs GLYCEROL	0,344118	0,191856
BENZOATE vs 2-OXOGLUTARATE	-0,344118	0,191856
MYO-INOSITOL-1-P vs T-CAFFEATE	0,344118	0,191856

Tabla Anexa 5 . Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea HA89. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
ARABINOSE vs FUMARATE	0,347059	0,187834
RAFFINOSE vs ONONITOL	-0,347059	0,187834
DEHYDROASCORBATE vs GLUCONATE	0,347059	0,187834
GLUCONATE vs PALMITATE	-0,347059	0,187834
MYO-INOSITOL-1-P vs GLYCERATE	-0,347059	0,187834
SUCCINATE vs GLUCOSE-6-P	0,347059	0,187834
ASPARTATE vs ONONITOL	-0,347059	0,187834
THREALOSE vs ARGININE	0,350000	0,183869
TYROSINE vs GLYCERATE	0,350000	0,183869
QUINATE vs ISOCITRATE	-0,350000	0,183869
ISOCITRATE vs GLYCEROL	0,350000	0,183869
ALANINE vs BENZOATE	0,352941	0,179959
ALANINE vs GLYCERATE	0,352941	0,179959
ALANINE vs FUMARATE	-0,352941	0,179959
ARGININE vs GLYCEROL	-0,352941	0,179959
PROLINE vs 2-OXOGLUTARATE	-0,352941	0,179959
XYLOSE vs ISOCITRATE	0,352941	0,179959
ASPARTATE vs GLYCINE	0,352941	0,179959
GLYCINE vs ISOCITRATE	0,355882	0,176104
THREALOSE vs GLUCONATE	-0,355882	0,176104
MYO-INOSITOL-1-P vs GLUCONATE	0,355882	0,176104
MYO-INOSITOL-1-P vs FUMARATE	0,355882	0,176104
ALANINE vs T-CAFFEATE	0,358824	0,172304
ASPARAGINE vs GENTIOBIOSE	-0,358824	0,172304
THREALOSE vs RIBOSE	-0,358824	0,172304
THREALOSE vs CHLOROGENATE	0,358824	0,172304
THREONATE vs STEARATE	-0,358824	0,172304
ASPARTATE vs QUINATE	-0,358824	0,172304
ALANINE vs SUCROSE	0,361765	0,168559
ARGININE vs GLUCOSE-6-P	-0,361765	0,168559
TYROSINE vs FRUCTOSE-6-P	-0,361765	0,168559
ARABINOSE vs GENTIOBIOSE	0,361765	0,168559
CHLOROGENATE vs PALMITATE	0,361765	0,168559
T-CAFFEATE vs MYO-INOSITOL	0,361765	0,168559
ALANINE vs RAFFINOSE	-0,364706	0,164868
CITRATE vs MYO-INOSITOL	0,364706	0,164868
GLYCINE vs RAFFINOSE	0,367647	0,161232
T-CAFFEATE vs SUCCINATE	0,367647	0,161232
QUINATE vs FRUCTOSE-6-P	-0,367647	0,161232
THREONATE vs PALMITATE	-0,367647	0,161232
ASPARAGINE vs HOMOSERINE	0,370588	0,157650
GLUTAMATE vs GLYCINE	0,370588	0,157650
VALINE vs GLUCONATE	-0,370588	0,157650
RAFFINOSE vs BENZOATE	-0,370588	0,157650
T-CAFFEATE vs GLUCOSE-6-P	0,370588	0,157650
ASPARTATE vs THREONATE	0,370588	0,157650
TYROSINE vs 2-OXOGLUTARATE	-0,373529	0,154123
THREONATE vs MALATE	0,373529	0,154123
ISOCITRATE vs MYO-INOSITOL	0,373529	0,154123
TYROSINE vs SUCROSE	0,376471	0,150648
RHAMNOSE vs GENTIOBIOSE	0,376471	0,150648
GLYCOLATE vs ISOCITRATE	0,376471	0,150648

Tabla Anexa 5 . Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea HA89. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
ARGININE vs GLYCEROL	-0,379412	0,147227
ASPARAGINE vs ISOLEUCINE	0,379412	0,147227
GLUTAMATE vs HOMOSERINE	-0,379412	0,147227
VALINE vs ARABINOSE	-0,379412	0,147227
SUCROSE vs MALTITOL	-0,379412	0,147227
GLYCERATE vs SUCCINATE	-0,379412	0,147227
ASPARTATE vs PALMITATE	-0,379412	0,147227
THREALOSE vs CITRATE	-0,382353	0,143859
GLYCOLATE vs MYO-INOSITOL	-0,382353	0,143859
GLUTAMATE vs RHAMNOSE	0,385294	0,140544
GENTIOBIOSE vs MALTITOL	0,385294	0,140544
QUINATE vs FUMARATE	-0,385294	0,140544
MYO-INOSITOL-1-P vs ONONITOL	-0,388235	0,137282
ASPARAGINE vs SUCCINATE	-0,391176	0,134071
THREALOSE vs GLUTAMATE	-0,391176	0,134071
ISOLEUCINE vs ONONITOL	0,391176	0,134071
GENTIOBIOSE vs GLYCEROL	0,391176	0,134071
GLYCERATE vs ONONITOL	0,391176	0,134071
THREONATE vs SUCCINATE	0,391176	0,134071
ALANINE vs CITRATE	-0,394118	0,130913
GLYCERATE vs CITRATE	-0,394118	0,130913
ARGININE vs RHAMNOSE	-0,397059	0,127806
MYO-INOSITOL-1-P vs PROLINE	-0,397059	0,127806
VALINE vs ISOCITRATE	-0,397059	0,127806
RHAMNOSE vs 2-OXOGLUTARATE	0,397059	0,127806
THREALOSE vs FRUCTOSE-6-P	-0,397059	0,127806
HOMOSERINE vs TYROSINE	0,400000	0,124750
TYROSINE vs RAFFINOSE	-0,400000	0,124750
RIBOSE vs FRUCTOSE-6-P	0,400000	0,124750
BENZOATE vs DEHYDROASCORBATE	-0,400000	0,124750
SACCHARATE vs ONONITOL	0,400000	0,124750
GLUCOSE-6-P vs MYO-INOSITOL	0,400000	0,124750
HOMOSERINE vs BENZOATE	0,402941	0,121746
SUCROSE vs BENZOATE	0,402941	0,121746
GLUTAMATE vs BENZOATE	-0,405882	0,118792
VALINE vs FUMARATE	-0,405882	0,118792
MYO-INOSITOL-1-P vs STEARATE	-0,405882	0,118792
ALANINE vs THREONATE	-0,408824	0,115888
GLYCINE vs T-CAFFEATE	0,408824	0,115888
ARABINOSE vs MALTITOL	0,408824	0,115888
GENTIOBIOSE vs GLYCEROL	0,408824	0,115888
BENZOATE vs MALATE	-0,408824	0,115888
SUCCINATE vs ONONITOL	-0,408824	0,115888
ARGININE vs RAFFINOSE	-0,411765	0,113034
ISOLEUCINE vs MYO-INOSITOL	-0,414706	0,110229
XYLOSE vs ONONITOL	0,414706	0,110229
DEHYDROASCORBATE vs QUINATE	-0,414706	0,110229
DEHYDROASCORBATE vs MYO-INOSITOL	0,417647	0,107474
FUMARATE vs MALATE	0,417647	0,107474
ISOLEUCINE vs BENZOATE	0,420588	0,104768
RAFFINOSE vs CHLOROGENATE	-0,420588	0,104768
XYLOSE vs GLYCERATE	0,420588	0,104768

Tabla Anexa 5 . Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea HA89. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
GLUCONATE vs FRUCTOSE-6-P	0,420588	0,104768
ALANINE vs FRUCTOSE-6-P	-0,423529	0,102109
ASPARAGINE vs PROLINE	0,423529	0,102109
GLUTAMATE vs GLUCOSE-6-P	0,423529	0,102109
ISOLEUCINE vs FUMARATE	-0,423529	0,102109
GENTIOBIOSE vs QUINATE	-0,423529	0,102109
GLUTAMATE vs QUINATE	-0,426471	0,099499
SUCROSE vs GLYCEROL	0,426471	0,099499
MYO-INOSITOL-1-P vs PALMITATE	-0,426471	0,099499
ASPARTATE vs GLUCOSE-6-P	0,426471	0,099499
ARGININE vs GLYCINE	-0,429412	0,096936
HOMOSERINE vs THREONATE	-0,429412	0,096936
RHAMNOSE vs GLYCERATE	0,429412	0,096936
GLUCONATE vs GLYCEROL	0,432353	0,094421
TYROSINE vs RIBOSE	-0,438235	0,089530
ARABINOSE vs RHAMNOSE	0,441176	0,087154
QUINATE vs SUCCINATE	-0,441176	0,087154
ARGININE vs MYO-INOSITOL	-0,444118	0,084823
HOMOSERINE vs CHLOROGENATE	0,444118	0,084823
HOMOSERINE vs ISOCITRATE	-0,444118	0,084823
MYO-INOSITOL-1-P vs ISOLEUCINE	-0,444118	0,084823
RHAMNOSE vs ONONITOL	0,444118	0,084823
VALINE vs DEHYDROASCORBATE	-0,447059	0,082537
RIBOSE vs MYO-INOSITOL	0,447059	0,082537
GENTIOBIOSE vs MALATE	0,447059	0,082537
QUINATE vs MALATE	-0,447059	0,082537
ISOCITRATE vs MALATE	0,447059	0,082537
ASPARAGINE vs CITRATE	-0,450000	0,080296
ISOLEUCINE vs 2-OXOGLUTARATE	-0,450000	0,080296
RIBOSE vs XYLOSE	0,450000	0,080296
RAFFINOSE vs THREONATE	0,450000	0,080296
SACCHARATE vs FUMARATE	0,450000	0,080296
RIBOSE vs SACCHARATE	0,452941	0,078099
RIBOSE vs GLYCEROL	0,452941	0,078099
ARGININE vs MALATE	-0,455882	0,075945
ARABINOSE vs SUCROSE	-0,455882	0,075945
GLUTAMATE vs GLUCONATE	0,458824	0,073836
GLUTAMATE vs SACCHARATE	0,458824	0,073836
GLYCINE vs DEHYDROASCORBATE	0,458824	0,073836
ISOLEUCINE vs ISOCITRATE	-0,458824	0,073836
PROLINE vs QUINATE	0,458824	0,073836
THREALOSE vs GLYCOLATE	0,458824	0,073836
GENTIOBIOSE vs CITRATE	0,458824	0,073836
MALATE vs FRUCTOSE-6-P	0,458824	0,073836
ARGININE vs FUMARATE	-0,461765	0,071768
VALINE vs FRUCTOSE-6-P	-0,461765	0,071768
RHAMNOSE vs BENZOATE	-0,461765	0,071768
TYROSINE vs ISOCITRATE	-0,464706	0,069744
VALINE vs CHLOROGENATE	0,464706	0,069744
SUCROSE vs GLYCOLATE	-0,464706	0,069744
ASPARTATE vs FUMARATE	0,464706	0,069744
PROLINE vs RAFFINOSE	-0,467647	0,067761

Tabla Anexa 5 . Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea HA89. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
ARABINOSE vs GLYCEROL	0,467647	0,067761
ALANINE vs ARGININE	0,470588	0,065819
ARGININE vs TYROSINE	0,470588	0,065819
HOMOSERINE vs MALTITOL	-0,470588	0,065819
RIBOSE vs CITRATE	0,470588	0,065819
RIBOSE vs MALATE	0,470588	0,065819
RAFFINOSE vs STEARATE	-0,470588	0,065819
CITRATE vs GLYCEROL	0,470588	0,065819
MYO-INOSITOL-1-P vs GLYCINE	0,473529	0,063919
ISOLEUCINE vs RAFFINOSE	-0,473529	0,063919
VALINE vs SUCCINATE	-0,473529	0,063919
SUCROSE vs GLUCONATE	-0,473529	0,063919
GENTIOBIOSE vs SUCCINATE	0,473529	0,063919
FUMARATE vs SUCCINATE	0,473529	0,063919
ASPARTATE vs CITRATE	0,473529	0,063919
ASPARAGINE vs VALINE	0,476471	0,062059
MYO-INOSITOL-1-P vs SACCHARATE	0,476471	0,062059
THREALOSE vs THREONATE	-0,479412	0,060239
XYLOSE vs THREONATE	0,479412	0,060239
ONONITOL vs MYO-INOSITOL	-0,479412	0,060239
ARGININE vs 2-OXOGLUTARATE	-0,482353	0,058459
VALINE vs RIBOSE	-0,482353	0,058459
BENZOATE vs THREONATE	-0,482353	0,058459
ISOCITRATE vs SUCCINATE	0,482353	0,058459
RHAMNOSE vs MALTITOL	0,485294	0,056718
GENTIOBIOSE vs DEHYDROASCORBATE	0,485294	0,056718
MYO-INOSITOL-1-P vs CITRATE	0,485294	0,056718
ALANINE vs GLUCONATE	-0,488235	0,055015
PROLINE vs CHLOROGENATE	0,488235	0,055015
VALINE vs GENTIOBIOSE	-0,488235	0,055015
RAFFINOSE vs PALMITATE	-0,488235	0,055015
HOMOSERINE vs QUINATE	0,491176	0,053350
RIBOSE vs SUCCINATE	0,491176	0,053350
GLYCOLATE vs FUMARATE	0,491176	0,053350
THREONATE vs MALTITOL	0,491176	0,053350
PROLINE vs THREONATE	-0,494118	0,051723
SACCHARATE vs PALMITATE	-0,494118	0,051723
SACCHARATE vs STEARATE	-0,494118	0,051723
ISOLEUCINE vs GENTIOBIOSE	-0,497059	0,050134
ARGININE vs DEHYDROASCORBATE	-0,500000	0,048580
GLYCINE vs MALATE	0,500000	0,048580
HOMOSERINE vs FUMARATE	-0,502941	0,047063
RHAMNOSE vs DEHYDROASCORBATE	0,502941	0,047063
GENTIOBIOSE vs STEARATE	-0,502941	0,047063
GLYCINE vs GLYCEROL	0,505882	0,045582
HOMOSERINE vs XYLOSE	-0,505882	0,045582
ISOLEUCINE vs CITRATE	-0,505882	0,045582
GLUTAMATE vs RAFFINOSE	0,508824	0,044135
ISOLEUCINE vs RIBOSE	-0,508824	0,044135
HOMOSERINE vs RHAMNOSE	-0,511765	0,042723
RAFFINOSE vs CITRATE	0,511765	0,042723
GENTIOBIOSE vs PALMITATE	-0,511765	0,042723

Tabla Anexa 5 . Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea HA89. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
SACCHARATE vs FRUCTOSE-6-P	0,511765	0,042723
THREONATE vs CITRATE	0,511765	0,042723
ARGININE vs ISOCITRATE	-0,514706	0,041346
RAFFINOSE vs GENTIOBIOSE	0,514706	0,041346
DEHYDROASCORBATE vs THREONATE	0,514706	0,041346
GLUCONATE vs ONONITOL	0,514706	0,041346
ARGININE vs ASPARAGINE	0,517647	0,040002
ASPARAGINE vs QUINATE	0,517647	0,040002
ASPARAGINE vs GLYCEROL	-0,517647	0,040002
BENZOATE vs CITRATE	-0,517647	0,040002
MALATE vs ONONITOL	-0,517647	0,040002
BENZOATE vs ISOCITRATE	-0,520588	0,038691
CHLOROGENATE vs T-CAFFEATE	0,520588	0,038691
MYO-INOSITOL-1-P vs THREONATE	0,520588	0,038691
VALINE vs BENZOATE	0,523529	0,037413
THREALOSE vs 2-OXOGLUTARATE	-0,523529	0,037413
GLYCERATE vs MALATE	-0,523529	0,037413
SACCHARATE vs 2-OXOGLUTARATE	0,523529	0,037413
ARGININE vs HOMOSERINE	0,526471	0,036167
HOMOSERINE vs ISOLEUCINE	0,526471	0,036167
XYLOSE vs GLYCEROL	-0,526471	0,036167
DEHYDROASCORBATE vs CITRATE	0,526471	0,036167
GLUTAMATE vs CITRATE	0,529412	0,034952
PROLINE vs GLYCERATE	0,532353	0,033769
RIBOSE vs SUCROSE	-0,532353	0,033769
RAFFINOSE vs 2-OXOGLUTARATE	0,532353	0,033769
CHLOROGENATE vs QUINATE	0,532353	0,033769
QUINATE vs CITRATE	-0,532353	0,033769
ARGININE vs PROLINE	0,535294	0,032616
ARGININE vs SUCCINATE	-0,535294	0,032616
VALINE vs MALATE	-0,535294	0,032616
GENTIOBIOSE vs FUMARATE	0,535294	0,032616
ASPARAGINE vs GLYCERATE	0,538235	0,031493
RAFFINOSE vs FRUCTOSE-6-P	0,538235	0,031493
ISOCITRATE vs FRUCTOSE-6-P	0,538235	0,031493
ASPARTATE vs RIBOSE	0,538235	0,031493
DEHYDROASCORBATE vs FRUCTOSE-6-P	0,541176	0,030400
VALINE vs CITRATE	-0,544118	0,029336
ARABINOSE vs GLUCONATE	0,544118	0,029336
RHAMNOSE vs XYLOSE	0,544118	0,029336
ASPARTATE vs VALINE	-0,544118	0,029336
ASPARTATE vs GENTIOBIOSE	0,544118	0,029336
GLUTAMATE vs VALINE	-0,547059	0,028301
TYROSINE vs FUMARATE	-0,547059	0,028301
GENTIOBIOSE vs FRUCTOSE-6-P	0,547059	0,028301
XYLOSE vs MALTITOL	0,547059	0,028301
SUCROSE vs THREONATE	-0,550000	0,027294
GENTIOBIOSE vs MYO-INOSITOL	0,550000	0,027294
ARGININE vs RIBOSE	-0,552941	0,026314
XYLOSE vs FUMARATE	0,552941	0,026314
MYO-INOSITOL-1-P vs DEHYDROASCORBATE	0,552941	0,026314
GLYCERATE vs QUINATE	0,552941	0,026314

Tabla Anexa 5 . Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea HA89. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
GLUTAMATE vs THREONATE	0,555882	0,025362
SUCROSE vs ISOCITRATE	-0,558824	0,024437
ASPARTATE vs TYROSINE	-0,558824	0,024437
GLUTAMATE vs MYO-INOSITOL	0,561765	0,023537
ASPARTATE vs ISOCITRATE	0,561765	0,023537
GLUCONATE vs 2-OXOGLUTARATE	0,564706	0,022663
ARABINOSE vs GLYCERATE	0,567647	0,021815
RHAMNOSE vs GLYCOLATE	0,567647	0,021815
THREALOSE vs PROLINE	0,570588	0,020991
MYO-INOSITOL-1-P vs RIBOSE	0,570588	0,020991
GLYCINE vs MYO-INOSITOL	0,573529	0,020191
RAFFINOSE vs QUINATE	-0,573529	0,020191
THREALOSE vs GLYCERATE	0,573529	0,020191
CITRATE vs ISOCITRATE	0,573529	0,020191
TYROSINE vs DEHYDROASCORBATE	-0,576471	0,019415
GLUTAMATE vs GENTIOBIOSE	0,579412	0,018663
THREALOSE vs GENTIOBIOSE	-0,579412	0,018663
ARGININE vs QUINATE	0,582353	0,017933
2-OXOGLUTARATE vs FRUCTOSE-6-P	0,582353	0,017933
ASPARTATE vs ARGININE	-0,582353	0,017933
ALANINE vs PROLINE	0,585294	0,017225
GLUTAMATE vs TYROSINE	-0,585294	0,017225
ARABINOSE vs RIBOSE	0,585294	0,017225
ARGININE vs GLUTAMATE	-0,588235	0,016540
RHAMNOSE vs GLUCONATE	0,588235	0,016540
MYO-INOSITOL-1-P vs ISOCITRATE	0,588235	0,016540
MALTITOL vs ONONITOL	0,588235	0,016540
RHAMNOSE vs THREONATE	0,591176	0,015876
GLUCONATE vs MALTITOL	0,591176	0,015876
ARGININE vs FRUCTOSE-6-P	-0,600000	0,014007
PROLINE vs GLUCONATE	-0,600000	0,014007
CHLOROGENATE vs GLYCERATE	0,600000	0,014007
CITRATE vs FUMARATE	0,600000	0,014007
GLYCINE vs SUCCINATE	0,602941	0,013424
THREALOSE vs SUCCINATE	-0,605882	0,012860
ARGININE vs GLUCONATE	-0,608824	0,012315
THREALOSE vs STEARATE	0,611765	0,011788
BENZOATE vs FUMARATE	-0,611765	0,011788
SUCCINATE vs FRUCTOSE-6-P	0,611765	0,011788
TYROSINE vs SUCCINATE	-0,614706	0,011279
RIBOSE vs THREONATE	0,614706	0,011279
DEHYDROASCORBATE vs MALATE	0,614706	0,011279
SACCHARATE vs ISOCITRATE	0,614706	0,011279
ARGININE vs CITRATE	-0,617647	0,010788
SUCROSE vs T-CAFFEATE	0,617647	0,010788
MYO-INOSITOL-1-P vs FRUCTOSE-6-P	0,617647	0,010788
GLYCINE vs 2-OXOGLUTARATE	0,620588	0,010314
GENTIOBIOSE vs THREONATE	0,620588	0,010314
ALANINE vs QUINATE	0,623529	0,009856
TYROSINE vs CITRATE	-0,623529	0,009856
MALATE vs MYO-INOSITOL	0,623529	0,009856
FRUCTOSE-6-P vs MYO-INOSITOL	0,623529	0,009856

Tabla Anexa 5 . Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea HA89. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
RHAMNOSE vs RIBOSE	0,629412	0,008988
GENTIOBIOSE vs SACCHARATE	0,635294	0,008182
2-OXOGLUTARATE vs MALATE	0,635294	0,008182
THREALOSE vs PALMITATE	0,638235	0,007801
RHAMNOSE vs ISOCITRATE	0,641176	0,007434
RAFFINOSE vs MYO-INOSITOL	0,641176	0,007434
RHAMNOSE vs SUCROSE	-0,644118	0,007082
ASPARTATE vs TREHALOSE	-0,644118	0,007082
MYO-INOSITOL-1-P vs GLUTAMATE	0,647059	0,006742
HOMOSERINE vs ARABINOSE	-0,647059	0,006742
ISOLEUCINE vs QUINATE	0,647059	0,006742
XYLOSE vs GLUCONATE	0,647059	0,006742
ISOLEUCINE vs FRUCTOSE-6-P	-0,650000	0,006416
PROLINE vs GENTIOBIOSE	-0,650000	0,006416
VALINE vs QUINATE	0,650000	0,006416
T-CAFFEATE vs GLYCEROL	0,650000	0,006416
2-OXOGLUTARATE vs CITRATE	0,652941	0,006102
GLUTAMATE vs MALATE	0,655882	0,005801
HOMOSERINE vs RIBOSE	-0,655882	0,005801
SUCCINATE vs MYO-INOSITOL	0,655882	0,005801
GLYCOLATE vs PALMITATE	0,661765	0,005234
XYLOSE vs T-CAFFEATE	-0,664706	0,004967
THREALOSE vs MYO-INOSITOL	-0,667647	0,004712
GENTIOBIOSE vs 2-OXOGLUTARATE	0,667647	0,004712
MYO-INOSITOL-1-P vs GENTIOBIOSE	0,667647	0,004712
HOMOSERINE vs VALINE	0,673529	0,004233
SACCHARATE vs THREONATE	0,673529	0,004233
GLUTAMATE vs RIBOSE	0,676471	0,004008
ISOLEUCINE vs MALATE	-0,676471	0,004008
RAFFINOSE vs GLYCERATE	-0,676471	0,004008
ARGININE vs ISOLEUCINE	0,679412	0,003793
GENTIOBIOSE vs ISOCITRATE	0,679412	0,003793
ASPARTATE vs DEHYDROASCORBATE	0,679412	0,003793
ARGININE vs GENTIOBIOSE	-0,682353	0,003588
GLUCONATE vs FUMARATE	0,685294	0,003392
GLUCOSE-6-P vs FRUCTOSE-6-P	0,685294	0,003392
MYO-INOSITOL-1-P vs RAFFINOSE	0,688235	0,003204
2-OXOGLUTARATE vs MYO-INOSITOL	0,688235	0,003204
RAFFINOSE vs SUCCINATE	0,691176	0,003025
GLUCONATE vs SACCHARATE	0,691176	0,003025
ASPARTATE vs 2-OXOGLUTARATE	0,691176	0,003025
ASPARTATE vs MYO-INOSITOL-P	0,691176	0,003025
GLYCOLATE vs STEARATE	0,694118	0,002854
ASPARTATE vs RAFFINOSE	0,694118	0,002854
GLUTAMATE vs FUMARATE	0,697059	0,002691
CITRATE vs SUCCINATE	0,697059	0,002691
DEHYDROASCORBATE vs ISOCITRATE	0,700000	0,002535
CITRATE vs MALATE	0,700000	0,002535
SUCROSE vs FUMARATE	-0,702941	0,002387
ISOLEUCINE vs DEHYDROASCORBATE	-0,708824	0,002112
GLUCONATE vs ISOCITRATE	0,708824	0,002112
TYROSINE vs MALATE	-0,711765	0,001984

Tabla Anexa 5 . Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea HA89. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
SUCROSE vs XYLOSE	-0,711765	0,001984
GLYCINE vs CITRATE	0,714706	0,001863
ISOLEUCINE vs SUCCINATE	-0,714706	0,001863
HOMOSERINE vs GENTIOBIOSE	-0,717647	0,001748
TYROSINE vs QUINATE	0,717647	0,001748
RIBOSE vs DEHYDROASCORBATE	0,717647	0,001748
ASPARTATE vs MYO-INOSITOL	0,720588	0,001638
THREALOSE vs MALATE	-0,723529	0,001534
GLUCONATE vs THREONATE	0,723529	0,001534
ARABINOSE vs XYLOSE	0,729412	0,001343
RIBOSE vs GLUCONATE	0,732353	0,001255
DEHYDROASCORBATE vs FUMARATE	0,732353	0,001255
HOMOSERINE vs GLUCONATE	-0,735294	0,001172
RAFFINOSE vs MALATE	0,738235	0,001093
ASPARTATE vs ISOLEUCINE	-0,738235	0,001093
MYO-INOSITOL-1-P vs SUCCINATE	0,741176	0,001018
RIBOSE vs 2-OXOGLUTARATE	0,744118	0,000948
BENZOATE vs QUINATE	0,747059	0,000882
ARGININE vs VALINE	0,750000	0,000820
ISOLEUCINE vs TYROSINE	0,752941	0,000761
THREALOSE vs MYO-INOSITOL-1-P	-0,752941	0,000761
2-OXOGLUTARATE vs SUCCINATE	0,752941	0,000761
MYO-INOSITOL-1-P vs MALATE	0,752941	0,000761
GLUTAMATE vs ISOCITRATE	0,755882	0,000706
RIBOSE vs FUMARATE	0,758824	0,000654
THREONATE vs 2-OXOGLUTARATE	0,758824	0,000654
2-OXOGLUTARATE vs FUMARATE	0,761765	0,000605
RHAMNOSE vs FUMARATE	0,773529	0,000439
RIBOSE vs GENTIOBIOSE	0,773529	0,000439
TYROSINE vs BENZOATE	0,776471	0,000404
DEHYDROASCORBATE vs 2-OXOGLUTARATE	0,776471	0,000404
ASPARTATE vs FRUCTOSE-6-P	0,779412	0,000372
GLUTAMATE vs ISOLEUCINE	-0,782353	0,000341
THREONATE vs ISOCITRATE	0,785294	0,000313
TYROSINE vs VALINE	0,788235	0,000286
DEHYDROASCORBATE vs SUCCINATE	0,800000	0,000199
MYO-INOSITOL-1-P vs 2-OXOGLUTARATE	0,800000	0,000199
GLUTAMATE vs FRUCTOSE-6-P	0,802941	0,000181
RIBOSE vs ISOCITRATE	0,808824	0,000148
MYO-INOSITOL-1-P vs MYO-INOSITOL	0,808824	0,000148
GLUTAMATE vs SUCCINATE	0,820588	0,000098
GLUTAMATE vs 2-OXOGLUTARATE	0,826471	0,000079
2-OXOGLUTARATE vs ISOCITRATE	0,829412	0,000071
THREALOSE vs RAFFINOSE	-0,841176	0,000044
ASPARTATE vs SUCCINATE	0,844118	0,000039
THREONATE vs FUMARATE	0,850000	0,000031
GENTIOBIOSE vs GLUCONATE	0,852941	0,000027
FUMARATE vs ISOCITRATE	0,855882	0,000023
ASPARTATE vs GLUTAMATE	0,858824	0,000020
ISOLEUCINE vs VALINE	0,870588	0,000011
GLUTAMATE vs DEHYDROASCORBATE	0,888235	0,000004
MALATE vs SUCCINATE	0,897059	0,000002

Tabla Anexa 5 . Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea HA89. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Serman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
PALMITATE vs STEARATE	0,988235	0,000000

Anexa 6. Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea RHA801. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
ASPARAGINE vs MALTITOL	-0,002941	0,991375
GLYCINE vs CITRATE	0,002941	0,991375
MYO-INOSITOL-1-P vs PROLINE	0,002941	0,991375
CHLOROGENATE vs ASPARAGINE	0,002941	0,991375
ALANINE vs RIBOSE	0,005882	0,982750
ASPARAGINE vs RHAMNOSE	0,005882	0,982750
ASPARAGINE vs SUCCINATE	-0,005882	0,982750
PROLINE vs XYLOSE	0,005882	0,982750
T-OH-PROLINE vs GLYCEROL	0,005882	0,982750
DEHYDROASCORBATE vs CHLOROGENATE	-0,005882	0,982750
T-CAFFEATE vs PALMITATE	0,005882	0,982750
XYLOSE vs T-CAFFEATE	0,008824	0,974128
T-CAFFEATE vs MALTITOL	0,008824	0,974128
SACCHARATE vs STEARATE	0,008824	0,974128
ISOLEUCINE vs RIBOSE	-0,011765	0,965508
TYRAMINE vs BENZOATE	0,011765	0,965508
BENZOATE vs GLUCONATE	-0,011765	0,965508
THREONATE vs PALMITATE	-0,011765	0,965508
ALANINE vs QUINATE	-0,014706	0,956892
TYROSINE vs ISOCITRATE	-0,014706	0,956892
GLUCONATE vs MYO-INOSITOL	0,014706	0,956892
GLUTAMATE vs CITRATE	-0,017647	0,948280
BENZOATE vs MALTITOL	-0,017647	0,948280
ALANINE vs 2-OXOGLUTARATE	-0,020588	0,939674
ASPARAGINE vs CITRATE	0,020588	0,939674
T-OH-PROLINE vs BENZOATE	-0,020588	0,939674
ARABINOSE vs PALMITATE	0,020588	0,939674
T-OH-PROLINE vs CITRATE	-0,023529	0,931074
DEHYDROASCORBATE vs QUINATE	0,023529	0,931074
GLUCONATE vs STEARATE	0,023529	0,931074
GLYCOLATE vs FRUCTOSE-6-P	-0,026471	0,922481
CITRATE vs GLUCOSE-6-P	-0,026471	0,922481
ISOLEUCINE vs GLYCEROL	-0,029412	0,913896
THREONATE vs GLYCEROL	0,029412	0,913896
MYO-INOSITOL-1-P vs SUCROSE	0,032353	0,905320
T-CAFFEATE vs STEARATE	-0,032353	0,905320
ASPARTATE vs ISOLEUCINE	0,032353	0,905320
ASPARTATE vs RHAMNOSE	-0,032353	0,905320
RAFFINOSE vs BENZOATE	-0,038235	0,888198
GLYCERATE vs THREONATE	0,038235	0,888198
ISOLEUCINE vs MALATE	-0,038235	0,888198
TREHALOSE vs ASPARAGINE	-0,041176	0,879654
ISOLEUCINE vs ISOCITRATE	0,044118	0,871122
ARABINOSE vs BENZOATE	-0,044118	0,871122
TYROSINE vs CITRATE	-0,050000	0,854100
BENZOATE vs ONONITOL	-0,050000	0,854100
T-OH-PROLINE vs SUCROSE	0,052941	0,845610
MYO-INOSITOL vs RHAMNOSE	0,052941	0,845610
PROLINE vs ISOCITRATE	0,055882	0,837137
GLUCONATE vs T-CAFFEATE	-0,055882	0,837137
ASPARAGINE vs MYO-INOSITOL	0,058824	0,828681
PROLINE vs STEARATE	0,058824	0,828681

Anexa 6. Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea RHA801. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
ASPARTATE vs CITRATE	0,058824	0,828681
TYRAMINE vs CITRATE	0,061765	0,820242
GENTIOBIOSE vs PALMITATE	-0,061765	0,820242
CHLOROGENATE vs STEARATE	0,061765	0,820242
TYROSINE vs RHAMNOSE	0,064706	0,811821
RHAMNOSE vs 2-OXOGLUTARATE	0,064706	0,811821
TREHALOSE vs GLUCONATE	-0,064706	0,811821
THREONATE vs STEARATE	-0,064706	0,811821
ARABINOSE vs MYO-INOSITOL	0,067647	0,803420
GLUCONATE vs ASPARAGINE	0,067647	0,803420
MALATE vs GLYCEROL	0,067647	0,803420
CHLOROGENATE vs GLYCOLATE	0,070588	0,795039
ASPARAGINE vs 2-OXOGLUTARATE	-0,070588	0,795039
VALINE vs ASPARAGINE	-0,073529	0,786679
2-OXOGLUTARATE vs CITRATE	0,073529	0,786679
ASPARAGINE vs ONONITOL	0,076471	0,778341
TREHALOSE vs SUCROSE	-0,076471	0,778341
CHLOROGENATE vs MYO-INOSITOL	0,076471	0,778341
GLYCOLATE vs GLUCOSE-6-P	-0,076471	0,778341
FRUCTOSE-6-P vs GLYCEROL	-0,076471	0,778341
ASPARAGINE vs STEARATE	0,079412	0,770025
ISOLEUCINE vs TYRAMINE	-0,079412	0,770025
ISOLEUCINE vs GLYCOLATE	0,079412	0,770025
TYROSINE vs GLYCEROL	0,079412	0,770025
RAFFINOSE vs CITRATE	-0,079412	0,770025
BENZOATE vs GLYCERATE	0,079412	0,770025
CHLOROGENATE vs GLYCERATE	0,079412	0,770025
ALANINE vs MALATE	0,079412	0,770025
ISOLEUCINE vs MALTITOL	-0,082353	0,761733
PROLINE vs MYO-INOSITOL	0,082353	0,761733
T-OH-PROLINE vs RHAMNOSE	-0,082353	0,761733
RHAMNOSE vs CHLOROGENATE	-0,082353	0,761733
ISOCITRATE vs FRUCTOSE-6-P	0,082353	0,761733
GLUTAMATE vs RHAMNOSE	-0,085294	0,753465
XYLOSE vs BENZOATE	-0,085294	0,753465
T-CAFFEATE vs SACCHARATE	0,085294	0,753465
ALANINE vs ISOLEUCINE	-0,088235	0,745222
PROLINE vs CITRATE	-0,088235	0,745222
RHAMNOSE vs SUCCINATE	-0,088235	0,745222
DEHYDROASCORBATE vs GLYCEROL	0,088235	0,745222
GLYCINE vs RHAMNOSE	-0,091176	0,737005
VALINE vs STEARATE	-0,091176	0,737005
TREHALOSE vs GLYCEROL	0,091176	0,737005
CITRATE vs FRUCTOSE-6-P	-0,091176	0,737005
GLYCEROL vs GLYCEROL	-0,091176	0,737005
MYO-INOSITOL-1-P vs GLYCEROL	-0,091176	0,737005
ASPARAGINE vs GLYCINE	0,094118	0,728814
ASPARAGINE vs THREONATE	0,094118	0,728814
VALINE vs CITRATE	0,094118	0,728814
SUCROSE vs ASPARAGINE	0,094118	0,728814
ASPARAGINE vs ONONITOL	0,094118	0,728814
STEARATE vs FUMARATE	-0,094118	0,728814

Anexa 6. Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea RHA801. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
GLYCEROL vs ONONITOL	0,094118	0,728814
PROLINE vs TYRAMINE	0,097059	0,720651
BENZOATE vs GLUCOSE-6-P	0,097059	0,720651
ASPARAGINE vs MALTITOL	-0,097059	0,720651
ALANINE vs PROLINE	0,100000	0,712516
GLUTAMATE vs ASPARAGINE	-0,100000	0,712516
ISOLEUCINE vs XYLOSE	-0,100000	0,712516
TREHALOSE vs SACCHARATE	-0,100000	0,712516
ASPARTATE vs ISOCITRATE	0,100000	0,712516
ASPARAGINE vs GLUCOSE-6-P	-0,102941	0,704410
ISOLEUCINE vs FUMARATE	0,102941	0,704410
TYROSINE vs SACCHARATE	0,102941	0,704410
BENZOATE vs 2-OXOGLUTARATE	0,102941	0,704410
DEHYDROASCORBATE vs GLUCONATE	0,102941	0,704410
ISOCITRATE vs GLUCOSE-6-P	0,102941	0,704410
GLUTAMATE vs ISOLEUCINE	-0,105882	0,696334
SUCROSE vs GLYCEROL	-0,105882	0,696334
SUCCINATE vs GLYCEROL	0,105882	0,696334
ALANINE vs ASPARTATE	0,105882	0,696334
ISOLEUCINE vs PROLINE	0,108824	0,688288
T-CAFFEATE vs FUMARATE	0,108824	0,688288
ASPARAGINE vs FUMARATE	0,111765	0,680274
GLYCINE vs GLYCOLATE	-0,111765	0,680274
ISOLEUCINE vs TYROSINE	0,111765	0,680274
TYRAMINE vs ASPARAGINE	-0,114706	0,672291
TYRAMINE vs GLYCEROL	0,114706	0,672291
GENTIOBIOSE vs STEARATE	-0,114706	0,672291
FUMARATE vs GLYCEROL	0,114706	0,672291
BENZOATE vs MALATE	0,114706	0,672291
GLYCINE vs GLYCEROL	0,117647	0,664341
ISOLEUCINE vs GENTIOBIOSE	0,117647	0,664341
RIBOSE vs CITRATE	0,117647	0,664341
RAFFINOSE vs GLUCONATE	0,117647	0,664341
ISOLEUCINE vs CITRATE	0,120588	0,656425
SUCROSE vs STEARATE	0,120588	0,656425
BENZOATE vs FUMARATE	-0,120588	0,656425
GLYCOLATE vs 2-OXOGLUTARATE	-0,120588	0,656425
ASPARTATE vs SUCROSE	-0,120588	0,656425
SUCROSE vs MALATE	-0,120588	0,656425
GLUTAMATE vs GLYCOLATE	-0,123529	0,648542
ISOLEUCINE vs ARABINOSE	0,123529	0,648542
T-OH-PROLINE vs ISOCITRATE	0,123529	0,648542
VALINE vs SUCROSE	-0,123529	0,648542
VALINE vs ISOCITRATE	0,123529	0,648542
TREHALOSE vs QUINATE	-0,123529	0,648542
XYLOSE vs GLYCEROL	-0,123529	0,648542
ALANINE vs STEARATE	-0,126471	0,640694
MYO-INOSITOL-1-P vs ALANINE	-0,126471	0,640694
RAFFINOSE vs GLYCOLATE	-0,126471	0,640694
RAFFINOSE vs ASPARAGINE	-0,126471	0,640694
DEHYDROASCORBATE vs SACCHARATE	0,126471	0,640694
CHLOROGENATE vs CITRATE	-0,126471	0,640694

Anexa 6. Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea RHA801. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
T-CAFFEATE vs GLYCEROL	0,126471	0,640694
STEARATE vs 2-OXOGLUTARATE	-0,126471	0,640694
CITRATE vs MALTITOL	0,126471	0,640694
ALANINE vs T-OH-PROLINE	0,129412	0,632882
GLYCERATE vs SACCHARATE	0,129412	0,632882
GLYCINE vs GLUCONATE	0,132353	0,625106
TYROSINE vs THREONATE	0,132353	0,625106
GLYCERATE vs MALTITOL	-0,132353	0,625106
CITRATE vs MYO-INOSITOL	-0,132353	0,625106
GLYCOLATE vs MALATE	-0,132353	0,625106
ALANINE vs GLUTAMATE	0,135294	0,617367
PROLINE vs GLYCEROL	-0,135294	0,617367
TYROSINE vs BENZOATE	-0,135294	0,617367
GLYCOLATE vs T-CAFFEATE	0,135294	0,617367
ISOLEUCNE vs THREONATE	-0,138235	0,609666
VALINE vs BENZOATE	0,138235	0,609666
ARABINOSE vs GLYCEROL	-0,138235	0,609666
GENTIOBIOSE vs GLYCOLATE	0,138235	0,609666
DEHYDROASCORBATE vs THREONATE	0,138235	0,609666
T-CAFFEATE vs ISOCITRATE	0,138235	0,609666
ISOLEUCINE vs T-OH-PROLINE	-0,141176	0,602003
ISOLEUCINE vs GLUCONATE	0,141176	0,602003
PROLINE vs RHAMNOSE	-0,141176	0,602003
BENZOATE vs ISOCITRATE	0,141176	0,602003
GLYCOLATE vs FUMARATE	0,141176	0,602003
GLYCEROL vs MALTITOL	0,141176	0,602003
T-OH-PROLINE vs ASPARAGINE	-0,144118	0,594378
TYRAMINE vs T-CAFFEATE	0,144118	0,594378
GLUTAMATE vs STEARATE	-0,147059	0,586793
RHAMNOSE vs GLUCOSE-6-P	-0,147059	0,586793
ALANINE vs GLYCEROL	0,150000	0,579249
ISOLEUCINE vs GLYCEROL	-0,150000	0,579249
TREHALOSE vs ARABINOSE	-0,150000	0,579249
SUCROSE vs QUINATE	-0,150000	0,579249
RHAMNOSE vs MALATE	0,150000	0,579249
PROLINE vs GLYCERATE	-0,152941	0,571745
RHAMNOSE vs DEHYDROASCORBATE	-0,152941	0,571745
RIBOSE vs SUCROSE	-0,152941	0,571745
TREHALOSE vs CITRATE	0,152941	0,571745
GLYCOLATE vs SUCCINATE	-0,152941	0,571745
STEARATE vs MALTITOL	-0,152941	0,571745
ASPARAGINE vs GLUCONATE	-0,155882	0,564282
RAFFINOSE vs SUCROSE	0,155882	0,564282
RAFFINOSE vs ISOCITRATE	0,155882	0,564282
GENTIOBIOSE vs CITRATE	0,155882	0,564282
T-CAFFEATE vs THREONATE	0,155882	0,564282
2- vs GLYCEROL	-0,155882	0,564282
ALANINE vs GENTIOBIOSE	-0,158824	0,556861
GLUTAMATE vs BENZOATE	0,158824	0,556861
TYRAMINE vs STEARATE	-0,158824	0,556861
SUCROSE vs GLYCOLATE	-0,158824	0,556861
BENZOATE vs THREONATE	0,158824	0,556861

Anexa 6. Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea RHA801. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
QUINATE vs STEARATE	0,158824	0,556861
SACCHARATE vs MYO-INOSITOL	0,158824	0,556861
ALANINE vs ASPARAGINE	-0,161765	0,549483
ASPARAGINE vs RIBOSE	0,161765	0,549483
ASPARAGINE vs DEHYDROASCORBATE	-0,161765	0,549483
PROLINE vs ARABINOSE	0,161765	0,549483
RAFFINOSE vs GLYCEROL	-0,161765	0,549483
SACCHARATE vs GLYCEROL	-0,161765	0,549483
ASPARAGINE vs ISOCITRATE	-0,164706	0,542148
GLUTAMATE vs ISOCITRATE	0,164706	0,542148
VALINE vs SACCHARATE	0,164706	0,542148
SUCROSE vs DEHYDROASCORBATE	0,164706	0,542148
CHLOROGENATE vs FRUCTOSE-6-P	-0,164706	0,542148
T-CAFFEATE vs CITRATE	0,164706	0,542148
GLUTAMATE vs GLYCEROL	-0,167647	0,534857
GLYCINE vs ASPARAGINE	-0,167647	0,534857
T-OH-PROLINE vs GLUCONATE	0,167647	0,534857
SUCROSE vs GLYCEROL	0,167647	0,534857
T-OH-PROLINE vs SACCHARATE	0,170588	0,527610
TREHALOSE vs MALTITOL	-0,170588	0,527610
GENTIOBIOSE vs GLYCERATE	-0,170588	0,527610
BENZOATE vs T-CAFFEATE	0,170588	0,527610
THREONATE vs GLYCEROL	0,170588	0,527610
GLYCEROL vs MALTITOL	0,170588	0,527610
ALANINE vs GLUCOSE-6-P	0,173529	0,520407
GLYCINE vs BENZOATE	0,173529	0,520407
RHAMNOSE vs BENZOATE	0,173529	0,520407
TREHALOSE vs BENZOATE	0,173529	0,520407
ASPARTATE vs GLYCEROL	-0,173529	0,520407
PALMITATE vs MALATE	-0,173529	0,520407
PROLINE vs SUCROSE	-0,176471	0,513251
MYO-INOSITOL-1-P vs CHLOROGENATE	-0,176471	0,513251
ASPARTATE vs BENZOATE	-0,176471	0,513251
BENZOATE vs GLYCEROL	0,179412	0,506140
ALANINE vs BENZOATE	0,182353	0,499075
ALANINE vs FRUCTOSE-6-P	0,182353	0,499075
ISOLEUCINE vs CHLOROGENATE	-0,182353	0,499075
ARABINOSE vs DEHYDROASCORBATE	0,182353	0,499075
BENZOATE vs CITRATE	0,182353	0,499075
STEARATE vs GLYCEROL	-0,182353	0,499075
TYROSINE vs T-CAFFEATE	0,185294	0,492057
VALINE vs GLYCOLATE	-0,185294	0,492057
SUCROSE vs SUCCINATE	0,185294	0,492057
TREHALOSE vs ISOCITRATE	0,185294	0,492057
GLYCINE vs ARABINOSE	0,188235	0,485087
TYRAMINE vs QUINATE	0,188235	0,485087
RHAMNOSE vs FRUCTOSE-6-P	-0,188235	0,485087
QUINATE vs ASPARAGINE	0,188235	0,485087
SACCHARATE vs GLYCEROL	0,188235	0,485087
GLYCINE vs SACCHARATE	0,191176	0,478164
T-OH-PROLINE vs STEARATE	-0,191176	0,478164
RAFFINOSE vs SACCHARATE	0,191176	0,478164

Anexa 6. Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea RHA801. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
RAFFINOSE vs STEARATE	-0,191176	0,478164
CHLOROGENATE vs SUCCINATE	-0,191176	0,478164
SACCHARATE vs GUCOSE-6-P	0,191176	0,478164
MYO-INOSITOL-1-P vs ASPARAGINE	-0,197059	0,464464
ARABINOSE vs GLYCEROL	0,197059	0,464464
XYLOSE vs GLYCERATE	-0,197059	0,464464
GLYCOLATE vs MALTITOL	0,197059	0,464464
T-CAFFEATE vs ONONITOL	0,197059	0,464464
ASPARAGINE vs GLYCEROL	-0,197059	0,464464
FUMARATE vs GLYCEROL	0,197059	0,464464
RIBOSE vs ASPARAGINE	-0,200000	0,457688
BENZOATE vs SACCHARATE	0,200000	0,457688
QUINATE vs FRUCTOSE-6-P	0,200000	0,457688
ASPARAGINE vs SUCROSE	-0,202941	0,450961
ISOLEUCINE vs ONONITOL	0,202941	0,450961
ARABINOSE vs RAFFINOSE	0,202941	0,450961
GLYCINE vs STEARATE	-0,205882	0,444285
ISOLEUCINE vs 2-OXOGLUTARATE	-0,205882	0,444285
VALINE vs RHAMNOSE	0,205882	0,444285
RHAMNOSE vs RIBOSE	0,205882	0,444285
RHAMNOSE vs T-CAFFEATE	-0,205882	0,444285
XYLOSE vs ASPARAGINE	-0,205882	0,444285
GLUCONATE vs SUCCINATE	0,205882	0,444285
GLUCONATE vs FRUCTOSE-6-P	0,205882	0,444285
ASPARAGINE vs TYROSINE	0,208824	0,437659
BENZOATE vs SUCCINATE	0,208824	0,437659
BENZOATE vs FRUCTOSE-6-P	0,208824	0,437659
DEHYDROASCORBATE vs ISOCITRATE	-0,208824	0,437659
MYO-INOSITOL-1-P vs ASPARAGINE	-0,208824	0,437659
ISOCITRATE vs GLYCEROL	0,208824	0,437659
ASPARAGINE vs 2-OXOGLUTARATE	0,211765	0,431083
T-OH-PROLINE vs GLYCOLATE	-0,211765	0,431083
GLUCONATE vs GLYCERATE	0,211765	0,431083
SUCROSE vs GLUCOSE-6-P	0,214706	0,424559
MYO-INOSITOL-1-P vs GLYCOLATE	0,214706	0,424559
SACCHARATE vs SUCCINATE	0,214706	0,424559
ASPARAGINE vs GLUTAMATE	0,217647	0,418087
TYROSINE vs PALMITATE	-0,217647	0,418087
BENZOATE vs DEHYDROASCORBATE	0,217647	0,418087
ASPARAGINE vs SACCHARATE	-0,220588	0,411666
GLYCINE vs ISOLEUCINE	-0,220588	0,411666
GLYCINE vs CHLOROGENATE	-0,220588	0,411666
GLYCOLATE vs MYO-INOSITOL	-0,220588	0,411666
PROLINE vs T-CAFFEATE	0,223529	0,405298
PROLINE vs GLUCOSE-6-P	0,223529	0,405298
GLUCONATE vs GLUCOSE-6-P	0,223529	0,405298
CITRATE vs MALATE	0,223529	0,405298
ALANINE vs TYRAMINE	-0,226471	0,398983
GLUTAMATE vs GLUCONATE	0,226471	0,398983
PROLINE vs TYROSINE	0,226471	0,398983
TREHALOSE vs GENTIOBIOSE	-0,226471	0,398983
XYLOSE vs GLYCEROL	0,226471	0,398983

Anexa 6. Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea RHA801. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
STEARATE vs MALATE	-0,226471	0,398983
ASPARAGINE vs T-CAFFEATE	-0,229412	0,392720
RAFFINOSE vs XYLOSE	0,229412	0,392720
GLYCERATE vs QUINATE	0,229412	0,392720
MYO-INOSITOL-1-P vs CITRATE	0,229412	0,392720
RAFFINOSE vs QUINATE	0,232353	0,386511
TREHALOSE vs THREONATE	-0,232353	0,386511
ONONITOL vs MYO-INOSITOL	0,232353	0,386511
TYROSINE vs QUINATE	0,235294	0,380356
TYROSINE vs STEARATE	-0,235294	0,380356
VALINE vs CHLOROGENATE	-0,235294	0,380356
VALINE vs T-CAFFEATE	0,235294	0,380356
RIBOSE vs STEARATE	-0,235294	0,380356
CHLOROGENATE vs ISOCITRATE	-0,235294	0,380356
XYLOSE vs STEARATE	-0,238235	0,374254
ASPARTATE vs PALMITATE	-0,238235	0,374254
ALANINE vs VALINE	0,241176	0,368207
PROLINE vs MALTITOL	0,241176	0,368207
XYLOSE vs CITRATE	0,241176	0,368207
CHLOROGENATE vs GLUCOSE-6-P	-0,241176	0,368207
CHLOROGENATE vs GLYCEROL	0,241176	0,368207
SACCHARATE vs FRUCTOSE-6-P	0,241176	0,368207
ISOLEUCINE vs VALINE	0,244118	0,362214
GLUCONATE vs GLYCEROL	-0,244118	0,362214
QUINATE vs GLYCEROL	0,244118	0,362214
GENTIOBIOSE vs T-CAFFEATE	0,247059	0,356275
CHLOROGENATE vs GLYCEROL	-0,247059	0,356275
ALANINE vs TYROSINE	0,250000	0,350391
TREHALOSE vs RHAMNOSE	0,250000	0,350391
GLUCONATE vs GLYCEROL	0,250000	0,350391
GLYCEROL vs MYO-INOSITOL-1-P	0,250000	0,350391
TYROSINE vs CHLOROGENATE	-0,252941	0,344563
ARABINOSE vs FRUCTOSE-6-P	0,252941	0,344563
XYLOSE vs MYO-INOSITOL	0,252941	0,344563
PROLINE vs RIBOSE	0,255882	0,338790
T-OH-PROLINE vs ARABINOSE	0,255882	0,338790
ARABINOSE vs GLUCOSE-6-P	0,258824	0,333072
RHAMNOSE vs RAFFINOSE	-0,258824	0,333072
RIBOSE vs ISOCITRATE	0,258824	0,333072
CHLOROGENATE vs SACCHARATE	-0,258824	0,333072
MYO-INOSITOL-1-P vs STEARATE	-0,258824	0,333072
MYO-INOSITOL-1-P vs ISOLEUCINE	-0,261765	0,327410
PROLINE vs GENTIOBIOSE	0,261765	0,327410
ASPARAGINE vs ASPARTATE	0,261765	0,327410
ARABINOSE vs SUCCINATE	0,264706	0,321804
SUCROSE vs FRUCTOSE-6-P	0,264706	0,321804
THREONATE vs FRUCTOSE-6-P	0,264706	0,321804
GLYCEROL vs ONONITOL	0,264706	0,321804
GLYCINE vs SUCROSE	0,270588	0,310761
PROLINE vs FUMARATE	0,270588	0,310761
BENZOATE vs GLYCEROL	0,270588	0,310761
DEHYDROASCORBATE vs CITRATE	-0,270588	0,310761

Anexa 6. Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea RHA801. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
2-OXOGLUTARATE vs ISOCITRATE	0,270588	0,310761
ASPARAGINE vs CHLOROGENATE	-0,273529	0,305323
ISOLEUCINE vs SUCCINATE	-0,273529	0,305323
QUINATE vs GLYCEROL	0,273529	0,305323
ALANINE vs MALTITOL	-0,276471	0,299942
CHLOROGENATE vs QUINATE	-0,276471	0,299942
CHLOROGENATE vs THREONATE	-0,276471	0,299942
MALTITOL vs MYO-INOSITOL	0,276471	0,299942
ASPARTATE vs STEARATE	-0,276471	0,299942
GLUCONATE vs 2-OXOGLUTARATE	0,279412	0,294618
PALMITATE vs GLUCOSE-6-P	-0,282353	0,289350
ALANINE vs ONONITOL	-0,285294	0,284139
ISOLEUCINE vs RHAMNOSE	0,285294	0,284139
ISOLEUCINE vs QUINATE	0,285294	0,284139
PROLINE vs ONONITOL	0,285294	0,284139
TYROSINE vs GLUCONATE	0,285294	0,284139
RHAMNOSE vs STEARATE	0,285294	0,284139
STEARATE vs CITRATE	0,285294	0,284139
ASPARTATE vs SACCHARATE	0,285294	0,284139
ALANINE vs DEHYDROASCORBATE	0,288235	0,278984
T-CAFFEATE vs 2-OXOGLUTARATE	0,288235	0,278984
ALANINE vs SUCCINATE	0,291176	0,273887
TYRAMINE vs MYO-INOSITOL	0,291176	0,273887
GLYCERATE vs MALATE	-0,291176	0,273887
MYO-INOSITOL-1-P vs VALINE	0,294118	0,268847
GLYCOLATE vs GLYCEROL	0,294118	0,268847
ISOCITRATE vs MALATE	0,294118	0,268847
CHLOROGENATE vs MALTITOL	-0,297059	0,263863
PALMITATE vs FRUCTOSE-6-P	-0,297059	0,263863
FUMARATE vs MYO-INOSITOL	0,297059	0,263863
ASPARAGINE vs FRUCTOSE-6-P	-0,300000	0,258936
ISOLEUCINE vs MYO-INOSITOL	-0,300000	0,258936
PROLINE vs THREONATE	0,300000	0,258936
VALINE vs ARABINOSE	0,300000	0,258936
TYRAMINE vs GLYCOLATE	0,300000	0,258936
RHAMNOSE vs PALMITATE	0,300000	0,258936
SUCROSE vs BENZOATE	0,300000	0,258936
PALMITATE vs SUCCINATE	-0,300000	0,258936
ASPARTATE vs GLUCONATE	0,300000	0,258936
TYROSINE vs GLYCERATE	-0,302941	0,254067
DEHYDROASCORBATE vs T-CAFFEATE	0,302941	0,254067
T-CAFFEATE vs GLYCEROL	0,302941	0,254067
QUINATE vs MALTITOL	0,302941	0,254067
PALMITATE vs GLYCEROL	-0,302941	0,254067
TREHALOSE vs ISOLEUCINE	0,305882	0,249254
VALINE vs XYLOSE	0,305882	0,249254
XYLOSE vs CHLOROGENATE	-0,305882	0,249254
ALANINE vs T-CAFFEATE	0,308824	0,244499
ISOLEUCINE vs SUCROSE	-0,308824	0,244499
BENZOATE vs QUINATE	0,308824	0,244499
PROLINE vs SUCCINATE	0,311765	0,239800
VALINE vs GLYCEROL	0,311765	0,239800

Anexa 6. Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea RHA801. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
RHAMNOSE vs GLYCEROL	-0,311765	0,239800
XYLOSE vs GLYCOLATE	0,311765	0,239800
T-OH-PROLINE vs XYLOSE	0,314706	0,235158
DEHYDROASCORBATE vs GLYCOLATE	-0,314706	0,235158
QUINATE vs GLUCOSE-6-P	0,314706	0,235158
PALMITATE vs CITRATE	0,314706	0,235158
VALINE vs TYRAMINE	0,317647	0,230573
STEARATE vs GLYCEROL	-0,317647	0,230573
ALANINE vs XYLOSE	-0,323529	0,221574
GLUTAMATE vs SACCHARATE	0,323529	0,221574
ISOLEUCINE vs GLUCOSE-6-P	-0,323529	0,221574
GENTIOBIOSE vs MYO-INOSITOL	0,323529	0,221574
GLYCOLATE vs QUINATE	0,323529	0,221574
CITRATE vs ONONITOL	0,323529	0,221574
ALANINE vs MYO-INOSITOL	0,326471	0,217159
GLUTAMATE vs ARABINOSE	0,326471	0,217159
THREONATE vs GLUCOSE-6-P	0,326471	0,217159
TYROSINE vs GLYCOLATE	-0,329412	0,212801
TREHALOSE vs VALINE	-0,329412	0,212801
THREONATE vs MYO-INOSITOL	0,329412	0,212801
STEARATE vs GLUCOSE-6-P	-0,329412	0,212801
TYROSINE vs ARABINOSE	0,332353	0,208500
RIBOSE vs CHLOROGENATE	-0,332353	0,208500
STEARATE vs SUCCINATE	-0,332353	0,208500
GLUTAMATE vs XYLOSE	0,335294	0,204255
RIBOSE vs SACCHARATE	0,335294	0,204255
CITRATE vs GLYCEROL	0,335294	0,204255
ASPARTATE vs GLYCOLATE	-0,335294	0,204255
TYRAMINE vs SUCROSE	-0,338235	0,200066
TREHALOSE vs XYLOSE	-0,338235	0,200066
TREHALOSE vs CHLOROGENATE	0,338235	0,200066
TREHALOSE vs ONONITOL	-0,338235	0,200066
GLYCERATE vs ISOCITRATE	0,338235	0,200066
SACCHARATE vs MALATE	0,338235	0,200066
RIBOSE vs T-CAFFEATE	0,341176	0,195933
QUINATE vs SUCCINATE	0,341176	0,195933
ASPARAGINE vs T-OH-PROLINE	0,344118	0,191856
PROLINE vs BENZOATE	-0,344118	0,191856
TYRAMINE vs RHAMNOSE	0,344118	0,191856
DEHYDROASCORBATE vs ONONITOL	0,344118	0,191856
QUINATE vs 2-OXOGLUTARATE	0,344118	0,191856
ALANINE vs GLYCINE	0,347059	0,187834
PROLINE vs QUINATE	0,347059	0,187834
SUCROSE vs GENTIOBIOSE	-0,347059	0,187834
QUINATE vs MYO-INOSITOL	0,347059	0,187834
ALANINE vs FUMARATE	-0,350000	0,183869
STEARATE vs FRUCTOSE-6-P	-0,350000	0,183869
GLYCINE vs XYLOSE	0,352941	0,179959
GLYCERATE vs GLYCEROL	-0,352941	0,179959
GLYCERATE vs GLYCEROL	0,352941	0,179959
THREONATE vs SUCCINATE	0,352941	0,179959
PALMITATE vs MYO-INOSITOL	-0,352941	0,179959

Anexa 6. Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea RHA801. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
ISOCITRATE vs GLYCEROL	-0,352941	0,179959
ISOLEUCINE vs DEHYDROASCORBATE	-0,355882	0,176104
SACCHARATE vs 2-OXOGLUTARATE	0,358824	0,172304
MYO-INOSITOL-1-P vs ISOCITRATE	0,358824	0,172304
ASPARAGINE vs MALATE	0,358824	0,172304
CHLOROGENATE vs MALATE	-0,361765	0,168559
GLUCONATE vs MALATE	0,361765	0,168559
TYRAMINE vs GLYCERATE	-0,364706	0,164868
ASPARTATE vs ARABINOSE	0,364706	0,164868
ALANINE vs GLYCERATE	-0,367647	0,161232
GLYCINE vs THREONATE	0,367647	0,161232
GLYCINE vs FUMARATE	0,367647	0,161232
TYRAMINE vs CHLOROGENATE	-0,367647	0,161232
SUCROSE vs ONONITOL	-0,367647	0,161232
XYLOSE vs 2-OXOGLUTARATE	0,367647	0,161232
BENZOATE vs GLYCOLATE	0,367647	0,161232
STEARATE vs MYO-INOSITOL	-0,367647	0,161232
GLYCERATE vs GLYCOLATE	0,370588	0,157650
GLYCOLATE vs ONONITOL	0,370588	0,157650
STEARATE vs ISOCITRATE	0,370588	0,157650
ASPARAGINE vs GLYCERATE	0,373529	0,154123
RHAMNOSE vs GENTIOBIOSE	0,373529	0,154123
TREHALOSE vs TYRAMINE	-0,376471	0,150648
ARABINOSE vs 2-OXOGLUTARATE	0,376471	0,150648
FUMARATE vs FRUCTOSE-6-P	0,376471	0,150648
ASPARTATE vs THREONATE	0,376471	0,150648
ASPARAGINE vs QUINATE	0,379412	0,147227
MYO-INOSITOL-1-P vs MALTITOL	0,379412	0,147227
MYO-INOSITOL-1-P vs TYROSINE	0,382353	0,143859
VALINE vs THREONATE	0,382353	0,143859
RAFFINOSE vs GENTIOBIOSE	0,382353	0,143859
SUCROSE vs THREONATE	-0,382353	0,143859
SUCROSE vs MYO-INOSITOL	0,382353	0,143859
CHLOROGENATE vs 2-OXOGLUTARATE	-0,382353	0,143859
ASPARAGINE vs TYRAMINE	-0,388235	0,137282
TYROSINE vs RAFFINOSE	0,388235	0,137282
VALINE vs FRUCTOSE-6-P	0,388235	0,137282
DEHYDROASCORBATE vs FUMARATE	0,388235	0,137282
ASPARTATE vs ONONITOL	0,388235	0,137282
ISOLEUCINE vs T-CAFFEATE	-0,391176	0,134071
TYRAMINE vs RAFFINOSE	0,391176	0,134071
SUCROSE vs CITRATE	-0,391176	0,134071
TREHALOSE vs PROLINE	-0,394118	0,130913
RAFFINOSE vs ONONITOL	0,394118	0,130913
BENZOATE vs MYO-INOSITOL	0,394118	0,130913
GLYCOLATE vs THREONATE	0,394118	0,130913
VALINE vs FUMARATE	0,397059	0,127806
MYO-INOSITOL-1-P vs BENZOATE	0,397059	0,127806
MYO-INOSITOL-1-P vs QUINATE	0,400000	0,124750
ASPARTATE vs XYLOSE	0,402941	0,121746
ASPARTATE vs GLYCERATE	-0,402941	0,121746
ARABINOSE vs MALATE	0,402941	0,121746

Anexa 6. Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea RHA801. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
RIBOSE vs GLYCEROL	0,411765	0,113034
T-OH-PROLINE vs TYRAMINE	0,414706	0,110229
CHLOROGENATE vs GLUCONATE	-0,417647	0,107474
RIBOSE vs QUINATE	0,420588	0,104768
ISOLEUCINE vs FRUCTOSE-6-P	-0,423529	0,102109
GENTIOBIOSE vs CHLOROGENATE	-0,423529	0,102109
XYLOSE vs DEHYDROASCORBATE	0,426471	0,099499
GLYCERATE vs 2-OXOGLUTARATE	-0,426471	0,099499
T-CAFFEATE vs QUINATE	0,426471	0,099499
FUMARATE vs MALTITOL	0,426471	0,099499
VALINE vs RAFFINOSE	0,429412	0,096936
TYRAMINE vs ISOCITRATE	0,429412	0,096936
PALMITATE vs ISOCITRATE	0,429412	0,096936
FRUCTOSE-6-P vs MALTITOL	0,429412	0,096936
T-CAFFEATE vs MALATE	0,429412	0,096936
RAFFINOSE vs CHLOROGENATE	-0,432353	0,094421
FUMARATE vs GLUCOSE-6-P	0,432353	0,094421
TYRAMINE vs MALATE	0,432353	0,094421
ALANINE vs GLYCEROL	0,435294	0,091952
GLYCINE vs PROLINE	0,435294	0,091952
SUCROSE vs MALTITOL	-0,435294	0,091952
FRUCTOSE-6-P vs ONONITOL	0,435294	0,091952
PROLINE vs MALATE	0,435294	0,091952
XYLOSE vs MALATE	0,435294	0,091952
TYROSINE vs MYO-INOSITOL	0,438235	0,089530
GENTIOBIOSE vs ISOCITRATE	0,438235	0,089530
GLYCERATE vs STEARATE	0,438235	0,089530
SUCROSE vs ISOCITRATE	-0,441176	0,087154
XYLOSE vs FRUCTOSE-6-P	0,441176	0,087154
ASPARTATE vs T-CAFFEATE	0,444118	0,084823
GLYCINE vs ONONITOL	0,447059	0,082537
T-OH-PROLINE vs QUINATE	0,447059	0,082537
VALINE vs MYO-INOSITOL	0,447059	0,082537
MYO-INOSITOL-1-P vs ARABINOSE	0,447059	0,082537
MYO-INOSITOL-1-P vs GLUCONATE	0,447059	0,082537
RHAMNOSE vs GLYCEROL	0,450000	0,080296
ALANINE vs GLYCOLATE	-0,452941	0,078099
GLYCINE vs TYRAMINE	0,452941	0,078099
SUCROSE vs FUMARATE	-0,452941	0,078099
ASPARAGINE vs GLYCEROL	0,455882	0,075945
GLUTAMATE vs MALTITOL	0,455882	0,075945
VALINE vs DEHYDROASCORBATE	0,455882	0,075945
XYLOSE vs GLUCOSE-6-P	0,455882	0,075945
PROLINE vs VALINE	0,458824	0,073836
ASPARTATE vs TYRAMINE	0,458824	0,073836
RIBOSE vs GLUCONATE	0,461765	0,071768
MYO-INOSITOL-1-P vs GENTIOBIOSE	0,461765	0,071768
ASPARTATE vs CHLOROGENATE	-0,461765	0,071768
RHAMNOSE vs MALTITOL	0,464706	0,069744
RIBOSE vs THREONATE	0,464706	0,069744
TREHALOSE vs GLYCOLATE	0,464706	0,069744
GENTIOBIOSE vs DEHYDROASCORBATE	0,464706	0,069744

Anexa 6. Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea RHA801. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
TREHALOSE vs TYROSINE	-0,467647	0,067761
GLUTAMATE vs CHLOROGENATE	-0,470588	0,065819
RAFFINOSE vs DEHYDROASCORBATE	0,470588	0,065819
SUCROSE vs GLYCERATE	-0,470588	0,065819
TREHALOSE vs MYO-INOSITOL-1-P	-0,470588	0,065819
2-OXOGLUTARATE vs ONONITOL	0,470588	0,065819
GLUCONATE vs QUINATE	0,473529	0,063919
T-CAFFEATE vs MYO-INOSITOL	0,473529	0,063919
GLYCEROL vs MYO-INOSITOL	0,473529	0,063919
TREHALOSE vs MALATE	-0,473529	0,063919
ARABINOSE vs QUINATE	0,476471	0,062059
ARABINOSE vs CITRATE	0,476471	0,062059
CITRATE vs FUMARATE	0,476471	0,062059
FUMARATE vs SUCCINATE	0,476471	0,062059
GLYCINE vs MALTITOL	0,479412	0,060239
TYROSINE vs FUMARATE	0,479412	0,060239
GLYCERATE vs T-CAFFEATE	-0,479412	0,060239
FUMARATE vs ISOCITRATE	0,479412	0,060239
GLYCEROL vs FRUCTOSE-6-P	0,479412	0,060239
ASPARAGINE vs PROLINE	0,482353	0,058459
T-OH-PROLINE vs CHLOROGENATE	-0,482353	0,058459
T-OH-PROLINE vs THREONATE	0,482353	0,058459
ARABINOSE vs CHLOROGENATE	-0,482353	0,058459
XYLOSE vs SUCCINATE	0,482353	0,058459
MYO-INOSITOL-1-P vs T-CAFFEATE	0,482353	0,058459
T-OH-PROLINE vs GLYCERATE	-0,485294	0,056718
RHAMNOSE vs ONONITOL	0,485294	0,056718
SUCCINATE vs ONONITOL	0,485294	0,056718
GLUCOSE-6-P vs MALTITOL	0,485294	0,056718
MALATE vs ONONITOL	0,485294	0,056718
TYROSINE vs XYLOSE	0,488235	0,055015
TYRAMINE vs THREONATE	0,488235	0,055015
ARABINOSE vs GLYCOLATE	0,488235	0,055015
GLUTAMATE vs T-CAFFEATE	0,491176	0,053350
GENTIOBIOSE vs QUINATE	0,491176	0,053350
GENTIOBIOSE vs 2-OXOGLUTARATE	0,491176	0,053350
ASPARTATE vs QUINATE	0,491176	0,053350
VALINE vs ONONITOL	0,494118	0,051723
TYRAMINE vs 2-OXOGLUTARATE	0,494118	0,051723
SUCROSE vs SACCHARATE	-0,494118	0,051723
MYO-INOSITOL-1-P vs ONONITOL	0,494118	0,051723
ASPARTATE vs MALTITOL	0,494118	0,051723
GLUTAMATE vs QUINATE	0,497059	0,050134
T-OH-PROLINE vs T-CAFFEATE	0,497059	0,050134
RAFFINOSE vs THREONATE	0,497059	0,050134
GENTIOBIOSE vs FUMARATE	0,497059	0,050134
MYO-INOSITOL-1-P vs XYLOSE	0,497059	0,050134
QUINATE vs FUMARATE	0,497059	0,050134
ALANINE vs SACCHARATE	-0,500000	0,048580
ARABINOSE vs RIBOSE	0,500000	0,048580
RHAMNOSE vs FUMARATE	0,500000	0,048580
TREHALOSE vs PALMITATE	0,500000	0,048580

Anexa 6. Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea RHA801. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
TREHALOSE vs STEARATE	0,500000	0,048580
MYO-INOSITOL-1-P vs THREONATE	0,500000	0,048580
GLUTAMATE vs TYRAMINE	0,502941	0,047063
ASPARTATE vs PROLINE	0,502941	0,047063
GLUTAMATE vs TYROSINE	0,505882	0,045582
GLUTAMATE vs GENTIOBIOSE	0,505882	0,045582
GLUTAMATE vs THREONATE	0,505882	0,045582
MYO-INOSITOL-1-P vs GLYCERATE	-0,505882	0,045582
GLUCOSE-6-P vs GLYCEROL	0,505882	0,045582
FUMARATE vs MALATE	0,505882	0,045582
ALANINE vs RHAMNOSE	-0,508824	0,044135
GLYCINE vs QUINATE	0,508824	0,044135
RHAMNOSE vs QUINATE	0,508824	0,044135
SUCROSE vs XYLOSE	-0,508824	0,044135
ASPARTATE vs FUMARATE	0,508824	0,044135
ALANINE vs CITRATE	-0,511765	0,042723
GLUTAMATE vs ONONITOL	0,514706	0,041346
T-OH-PROLINE vs FUMARATE	0,514706	0,041346
PROLINE vs GLYCEROL	0,517647	0,040002
MYO-INOSITOL-1-P vs ASPARTIC	0,517647	0,040002
DEHYDROASCORBATE vs MALATE	0,517647	0,040002
PROLINE vs 2-OXOGLUTARATE	0,523529	0,037413
BENZOATE vs CHLOROGENATE	0,523529	0,037413
ISOCITRATE vs ONONITOL	0,523529	0,037413
SUCCINATE vs MALTITOL	0,523529	0,037413
ALANINE vs THREONATE	-0,526471	0,036167
GLYCOLATE vs STEARATE	0,526471	0,036167
MYO-INOSITOL-1-P vs FUMARATE	0,526471	0,036167
ASPARTATE vs DEHYDROASCORBATE	0,526471	0,036167
T-OH-PROLINE vs MALTITOL	0,529412	0,034952
RHAMNOSE vs XYLOSE	0,529412	0,034952
GLUCOSE-6-P vs ONONITOL	0,529412	0,034952
ALANINE vs ARABINOSE	-0,532353	0,033769
MYO-INOSITOL-1-P vs T-OH-PROLINE	0,532353	0,033769
RIBOSE vs RAFFINOSE	0,532353	0,033769
TREHALOSE vs RIBOSE	-0,532353	0,033769
ISOCITRATE vs MALTITOL	0,532353	0,033769
THREONATE vs MALATE	0,532353	0,033769
CHLOROGENATE vs FUMARATE	-0,535294	0,032616
CHLOROGENATE vs ONONITOL	-0,535294	0,032616
TYROSINE vs TYRAMINE	0,538235	0,031493
ISOLEUCINE vs PALMITATE	0,541176	0,030400
ASPARAGINE vs ISOLEUCINE	0,544118	0,029336
RHAMNOSE vs THREONATE	0,544118	0,029336
RAFFINOSE vs GLYCEROL	0,544118	0,029336
SUCROSE vs T-CAFFEATE	0,544118	0,029336
XYLOSE vs ISOCITRATE	0,544118	0,029336
QUINATE vs ISOCITRATE	0,544118	0,029336
QUINATE vs ONONITOL	0,544118	0,029336
GLUTAMATE vs GLYCERATE	-0,547059	0,028301
GLUTAMATE vs FUMARATE	0,547059	0,028301
T-OH-PROLINE vs DEHYDROASCORBATE	0,547059	0,028301

Anexa 6. Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea RHA801. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
TYROSINE vs GLYCEROL	0,547059	0,028301
GENTIOBIOSE vs SACCHARATE	0,547059	0,028301
ASPARTATE vs MYO-INOSITOL	0,550000	0,027294
GENTIOBIOSE vs THREONATE	0,555882	0,025362
GLYCERATE vs CITRATE	0,555882	0,025362
TREHALOSE vs GLYCEROL	-0,558824	0,024437
GLYCOLATE vs PALMITATE	0,558824	0,024437
GLYCOLATE vs GLYCEROL	-0,558824	0,024437
GLUTAMATE vs DEHYDROASCORBATE	0,561765	0,023537
T-OH-PROLINE vs ONONITOL	0,561765	0,023537
MYO-INOSITOL-1-P vs RIBOSE	0,561765	0,023537
ISOLEUCINE vs GLYCERATE	0,564706	0,022663
TYROSINE vs MALTITOL	0,564706	0,022663
RAFFINOSE vs T-CAFFEATE	0,564706	0,022663
GENTIOBIOSE vs FRUCTOSE-6-P	0,564706	0,022663
TREHALOSE vs FRUCTOSE-6-P	-0,567647	0,021815
DEHYDROASCORBATE vs PALMITATE	-0,567647	0,021815
MYO-INOSITOL-1-P vs DEHYDROASCORBATE	0,567647	0,021815
QUINATE vs THREONATE	0,567647	0,021815
TYROSINE vs 2-OXOGLUTARATE	0,570588	0,020991
THREONATE vs FUMARATE	0,570588	0,020991
MALTITOL vs ONONITOL	0,570588	0,020991
ASPARAGINE vs VALINE	0,573529	0,020191
VALINE vs QUINATE	0,573529	0,020191
THREONATE vs ONONITOL	0,573529	0,020191
GLYCINE vs GLYCERATE	-0,576471	0,019415
DEHYDROASCORBATE vs 2-OXOGLUTARATE	0,576471	0,019415
GLUCONATE vs GLYCOLATE	0,576471	0,019415
SACCHARATE vs CITRATE	0,576471	0,019415
ISOLEUCINE vs STEARATE	0,579412	0,018663
VALINE vs GLUCOSE-6-P	0,579412	0,018663
RIBOSE vs MYO-INOSITOL	0,579412	0,018663
DEHYDROASCORBATE vs STEARATE	-0,579412	0,018663
T-CAFFEATE vs SUCCINATE	0,579412	0,018663
THREONATE vs 2-OXOGLUTARATE	0,579412	0,018663
XYLOSE vs THREONATE	0,582353	0,017933
QUINATE vs SACCHARATE	0,582353	0,017933
2-OXOGLUTARATE vs MALTITOL	0,582353	0,017933
ALANINE vs GLUCONATE	-0,585294	0,017225
MYO-INOSITOL-1-P vs TYRAMINE	0,585294	0,017225
GLUCONATE vs CITRATE	0,585294	0,017225
SUCROSE vs CHLOROGENATE	0,588235	0,016540
VALINE vs MALTITOL	0,591176	0,015876
QUINATE vs CITRATE	0,591176	0,015876
T-OH-PROLINE vs GENTIOBIOSE	0,594118	0,015232
TYRAMINE vs GLUCOSE-6-P	0,594118	0,015232
RHAMNOSE vs SUCROSE	-0,594118	0,015232
RIBOSE vs FUMARATE	0,594118	0,015232
MALATE vs GLYCEROL	0,594118	0,015232
TYROSINE vs FRUCTOSE-6-P	0,597059	0,014610
TYRAMINE vs SUCCINATE	0,597059	0,014610
2-OXOGLUTARATE vs FUMARATE	0,597059	0,014610

Anexa 6. Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea RHA801. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
ASPARTATE vs RAFFINOSE	0,597059	0,014610
VALINE vs 2-OXOGLUTARATE	0,600000	0,014007
TYRAMINE vs FUMARATE	0,600000	0,014007
SACCHARATE vs ONONITOL	0,600000	0,014007
RAFFINOSE vs MYO-INOSITOL	0,602941	0,013424
TREHALOSE vs FUMARATE	-0,602941	0,013424
GENTIOBIOSE vs SUCCINATE	0,602941	0,013424
GLYCOLATE vs SACCHARATE	0,602941	0,013424
T-OH-PROLINE vs TYROSINE	0,605882	0,012860
TYRAMINE vs DEHYDROASCORBATE	0,605882	0,012860
MYO-INOSITOL-1-P vs RAFFINOSE	0,605882	0,012860
MYO-INOSITOL-1-P vs 2-OXOGLUTARATE	0,605882	0,012860
MYO-INOSITOL-1-P vs GLYCINE	0,611765	0,011788
ASPARTATE vs GLYCEROL-1-P	0,611765	0,011788
QUINATE vs MALATE	0,611765	0,011788
GLUTAMATE vs VALINE	0,614706	0,011279
TREHALOSE vs 2-OXOGLUTARATE	-0,614706	0,011279
TREHALOSE vs MYO-INOSITOL	-0,614706	0,011279
ASPARTATE vs FRUCTOSE-6-P	0,614706	0,011279
GLYCOLATE vs CITRATE	0,617647	0,010788
TREHALOSE vs ASPARTATE	-0,617647	0,010788
ALANINE vs ISOCITRATE	-0,620588	0,010314
TREHALOSE vs GLYCINE	-0,620588	0,010314
GLYCINE vs GENTIOBIOSE	0,620588	0,010314
TREHALOSE vs GLUCOSE-6-P	-0,620588	0,010314
SACCHARATE vs FUMARATE	0,623529	0,009856
DEHYDROASCORBATE vs GLYCERATE	-0,626471	0,009414
DEHYDROASCORBATE vs GLYCEROL	0,626471	0,009414
GLYCINE vs DEHYDROASCORBATE	0,629412	0,008988
GLYCINE vs GLYCEROL	0,629412	0,008988
2-OXOGLUTARATE vs MYO-INOSITOL	0,629412	0,008988
RIBOSE vs DEHYDROASCORBATE	0,632353	0,008578
GLYCINE vs TYROSINE	0,635294	0,008182
RAFFINOSE vs GLYCERATE	-0,635294	0,008182
SACCHARATE vs MALTITOL	0,635294	0,008182
2-OXOGLUTARATE vs GLYCEROL	0,635294	0,008182
MYO-INOSITOL-1-P vs MALATE	0,635294	0,008182
GLUTAMATE vs PROLINE	0,638235	0,007801
PROLINE vs RAFFINOSE	0,638235	0,007801
XYLOSE vs FUMARATE	0,638235	0,007801
ASPARTATE vs 2-OXOGLUTARATE	0,638235	0,007801
TYRAMINE vs RIBOSE	0,641176	0,007434
DEHYDROASCORBATE vs MYO-INOSITOL	0,641176	0,007434
T-CAFFEATE vs FRUCTOSE-6-P	0,641176	0,007434
SUCCINATE vs GLYCEROL	0,641176	0,007434
ALANINE vs SUCROSE	0,644118	0,007082
GLUTAMATE vs RIBOSE	0,644118	0,007082
VALINE vs GLYCEROL	0,644118	0,007082
RHAMNOSE vs GLYCERATE	0,644118	0,007082
TREHALOSE vs RAFFINOSE	-0,644118	0,007082
T-OH-PROLINE vs MYO-INOSITOL	0,647059	0,006742
RIBOSE vs ONONITOL	0,647059	0,006742

Anexa 6. Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea RHA801. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
TREHALOSE vs GLYCERATE	0,647059	0,006742
GLYCERATE vs SUCCINATE	-0,647059	0,006742
MALATE vs MALTITOL	0,647059	0,006742
2-OXOGLUTARATE vs GLUCOSE-6-P	0,650000	0,006416
2-OXOGLUTARATE vs FRUCTOSE-6-P	0,650000	0,006416
MALATE vs FRUCTOSE-6-P	0,650000	0,006416
PROLINE vs T-OH-PROLINE	0,652941	0,006102
TYRAMINE vs FRUCTOSE-6-P	0,652941	0,006102
RHAMNOSE vs GLYCOLATE	0,652941	0,006102
RAFFINOSE vs MALATE	0,652941	0,006102
RIBOSE vs 2-OXOGLUTARATE	0,655882	0,005801
GENTIOBIOSE vs GLUCONATE	0,655882	0,005801
TREHALOSE vs DEHYDROASCORBATE	-0,658824	0,005511
T-OH-PROLINE vs FRUCTOSE-6-P	0,661765	0,005234
TYRAMINE vs SACCHARATE	0,661765	0,005234
RIBOSE vs XYLOSE	0,661765	0,005234
GENTIOBIOSE vs GLUCOSE-6-P	0,664706	0,004967
GLYCERATE vs MYO-INOSITOL	-0,664706	0,004967
XYLOSE vs ONONITOL	0,667647	0,004712
MALATE vs MYO-INOSITOL	0,673529	0,004233
TREHALOSE vs T-OH-PROLINE	-0,676471	0,004008
GLYCERATE vs GLUCOSE-6-P	-0,676471	0,004008
MYO-INOSITOL-1-P vs GLUTAMATE	0,679412	0,003793
T-OH-PROLINE vs GLYCEROL	0,679412	0,003793
RIBOSE vs FRUCTOSE-6-P	0,679412	0,003793
TYROSINE vs DEHYDROASCORBATE	0,682353	0,003588
GLUCONATE vs MALTITOL	0,682353	0,003588
ASPARTATE vs VALINE	0,682353	0,003588
TYROSINE vs GLUCOSE-6-P	0,685294	0,003392
VALINE vs SUCCINATE	0,688235	0,003204
GLYCINE vs 2-OXOGLUTARATE	0,691176	0,003025
VALINE vs GENTIOBIOSE	0,691176	0,003025
T-CAFFEATE vs GLUCOSE-6-P	0,694118	0,002854
GLUTAMATE vs GLYCEROL	0,697059	0,002691
ARABINOSE vs SUCROSE	-0,700000	0,002535
ARABINOSE vs GENTIOBIOSE	0,700000	0,002535
GENTIOBIOSE vs ONONITOL	0,702941	0,002387
RAFFINOSE vs FRUCTOSE-6-P	0,705882	0,002246
SUCROSE vs GLUCONATE	-0,705882	0,002246
GLUCONATE vs THREONATE	0,705882	0,002246
GLUCONATE vs FUMARATE	0,705882	0,002246
TREHALOSE vs GLUTAMATE	-0,708824	0,002112
GLUTAMATE vs FRUCTOSE-6-P	0,708824	0,002112
ASPARTATE vs T-OH-PROLINE	0,708824	0,002112
ASPARTATE vs GENTIOBIOSE	0,708824	0,002112
ASPARTATE vs GLUCOSE-6-P	0,708824	0,002112
PROLINE vs CHLOROGENATE	-0,711765	0,001984
TYRAMINE vs ONONITOL	0,711765	0,001984
MYO-INOSITOL-1-P vs SUCCINATE	0,714706	0,001863
ASPARTATE vs SUCCINATE	0,714706	0,001863
THREONATE vs MALTITOL	0,717647	0,001748
TREHALOSE vs SUCCINATE	-0,720588	0,001638

Anexa 6. Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea RHA801. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
ASPARTATE vs GLUTAMATE	0,720588	0,001638
GLYCINE vs VALINE	0,723529	0,001534
ARABINOSE vs RHAMNOSE	0,723529	0,001534
GLUTAMATE vs MYO-INOSITOL	0,726471	0,001436
TYROSINE vs GENTIOBIOSE	0,726471	0,001436
TYROSINE vs SUCCINATE	0,726471	0,001436
GLYCINE vs T-CAFFEATE	0,729412	0,001343
GENTIOBIOSE vs XYLOSE	0,729412	0,001343
GLUCOSE-6-P vs MYO-INOSITOL	0,732353	0,001255
GLYCINE vs RAFFINOSE	0,735294	0,001172
TYRAMINE vs GLUCONATE	0,735294	0,001172
ARABINOSE vs FUMARATE	0,735294	0,001172
ARABINOSE vs THREONATE	0,738235	0,001093
RAFFINOSE vs GLUCOSE-6-P	0,738235	0,001093
XYLOSE vs SACCHARATE	0,738235	0,001093
GLUCONATE vs ONONITOL	0,738235	0,001093
THREONATE vs ISOCITRATE	0,738235	0,001093
FRUCTOSE-6-P vs MYO-INOSITOL	0,738235	0,001093
ARABINOSE vs MALTITOL	0,741176	0,001018
RAFFINOSE vs SUCCINATE	0,741176	0,001018
ASPARTATE vs GLYCINE	0,741176	0,001018
GLUTAMATE vs GLUCOSE-6-P	0,744118	0,000948
RHAMNOSE vs SACCHARATE	0,744118	0,000948
RIBOSE vs MALTITOL	0,744118	0,000948
GLYCINE vs MYO-INOSITOL	0,747059	0,000882
GENTIOBIOSE vs MALATE	0,747059	0,000882
T-OH-PROLINE vs VALINE	0,750000	0,000820
TYRAMINE vs MALTITOL	0,750000	0,000820
ARABINOSE vs ISOCITRATE	0,752941	0,000761
TYRAMINE vs GENTIOBIOSE	0,755882	0,000706
DEHYDROASCORBATE vs GLUCOSE-6-P	0,755882	0,000706
GLYCERATE vs FRUCTOSE-6-P	-0,755882	0,000706
2-OXOGLUTARATE vs SUCCINATE	0,761765	0,000605
MYO-INOSITOL-1-P vs GLUCOSE-6-P	0,761765	0,000605
TYROSINE vs MALATE	0,761765	0,000605
ARABINOSE vs ONONITOL	0,770588	0,000477
2-OXOGLUTARATE vs MALATE	0,770588	0,000477
MALATE vs GLUCOSE-6-P	0,773529	0,000439
RHAMNOSE vs GLUCONATE	0,776471	0,000404
MYO-INOSITOL-1-P vs MYO-INOSITOL	0,776471	0,000404
ASPARTATE vs TYROSINE	0,776471	0,000404
GLUTAMATE vs MALATE	0,776471	0,000404
T-OH-PROLINE vs RIBOSE	0,782353	0,000341
TYROSINE vs VALINE	0,782353	0,000341
RHAMNOSE vs CITRATE	0,782353	0,000341
ASPARTATE vs RIBOSE	0,782353	0,000341
GLYCINE vs FRUCTOSE-6-P	0,788235	0,000286
VALINE vs RIBOSE	0,788235	0,000286
TYRAMINE vs ARABINOSE	0,788235	0,000286
SUCCINATE vs MYO-INOSITOL	0,791176	0,000262
GLYCINE vs RIBOSE	0,794118	0,000239
XYLOSE vs MALTITOL	0,794118	0,000239

Anexa 6. Análisis de correlación de a pares para cada metabolito dentro de la línea RHA801. Las correlaciones y sus significancias fueron determinadas utilizando el coeficiente de Spearman's y calculadas con el paquete de programas estadísticos STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK). Los niveles de significancia fueron corregidos mediante comparaciones múltiples utilizando los procedimientos de Bonferroni con un α global= 0.05 (verde) o 0.10 (rojo)

Pair of metabolites	Correlation coefficient	Significance
CITRATE vs ISOCITRATE	0,800000	0,000199
T-OH-PROLINE vs GLUCOSE-6-P	0,802941	0,000181
RHAMNOSE vs ISOCITRATE	0,805882	0,000164
DEHYDROASCORBATE vs SUCCINATE	0,805882	0,000164
GLUCONATE vs ISOCITRATE	0,808824	0,000148
GLYCOLATE vs ISOCITRATE	0,808824	0,000148
FUMARATE vs ONONITOL	0,811765	0,000134
MALATE vs SUCCINATE	0,811765	0,000134
DEHYDROASCORBATE vs FRUCTOSE-6-P	0,817647	0,000109
RIBOSE vs SUCCINATE	0,823529	0,000088
SACCHARATE vs THREONATE	0,823529	0,000088
MYO-INOSITOL-1-P vs FRUCTOSE-6-P	0,823529	0,000088
RIBOSE vs GLUCOSE-6-P	0,826471	0,000079
SACCHARATE vs ISOCITRATE	0,826471	0,000079
GLYCINE vs MALATE	0,838235	0,000050
T-OH-PROLINE vs MALATE	0,838235	0,000050
GLUTAMATE vs GLYCINE	0,841176	0,000044
GLUTAMATE vs SUCCINATE	0,844118	0,000039
T-OH-PROLINE vs 2-OXOGLUTARATE	0,844118	0,000039
ASPARTATE vs MALATE	0,844118	0,000039
RAFFINOSE vs 2-OXOGLUTARATE	0,847059	0,000035
XYLOSE vs GLUCONATE	0,850000	0,000031
VALINE vs MALATE	0,850000	0,000031
T-OH-PROLINE vs SUCCINATE	0,852941	0,000027
T-OH-PROLINE vs RAFFINOSE	0,855882	0,000023
GLUTAMATE vs RAFFINOSE	0,858824	0,000020
TYROSINE vs RIBOSE	0,861765	0,000018
GENTIOBIOSE vs MALTITOL	0,861765	0,000018
ARABINOSE vs XYLOSE	0,867647	0,000013
RIBOSE vs GENTIOBIOSE	0,870588	0,000011
SUCCINATE vs FRUCTOSE-6-P	0,870588	0,000011
RIBOSE vs MALATE	0,873529	0,000010
GLUTAMATE vs 2-OXOGLUTARATE	0,879412	0,000007
GLYCINE vs T-OH-PROLINE	0,885294	0,000005
TYRAMINE vs XYLOSE	0,885294	0,000005
GLUCONATE vs SACCHARATE	0,891176	0,000004
GLYCINE vs GLUCOSE-6-P	0,900000	0,000002
ARABINOSE vs SACCHARATE	0,902941	0,000002
GLUTAMATE vs T-OH-PROLINE	0,905882	0,000001
SUCCINATE vs GLUCOSE-6-P	0,929412	0,000000
GLYCINE vs SUCCINATE	0,938235	0,000000
GLUCOSE-6-P vs FRUCTOSE-6-P	0,938235	0,000000
ARABINOSE vs GLUCONATE	0,982353	0,000000
PALMITATE vs STEARATE	0,994118	0,000000

Tabla Anexa 7 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D2I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	BlastX	Hit ACC	E-Value	Similarity	Score	GOs	Enzyme Codes	InterProScan
1D2I-NI	af467657_1 type 2 metallothionein-like protein	BAC57959	1,29E-21	90	105,916	F:binding		no IPS match
2D2I-NI	No similarity					No GO term found		no IPS match
3D2I-NI	protein kinase	XP_002524739	3,80E-05	93	51,2174	F:protein kinase activity; F:ATP binding; F:protein tyrosine kinase activity; P:protein amino acid phosphorylation; F:protein serine/threonine kinase activity		no IPS match
7D2I-NI	pollen-specific protein	XP_002283525	6,06E-87	91	325,094	F:binding		no IPS match
9D2I-NI	26s proteasome subunit 4	XP_002526219	3,00E-138	99	495,738	P:protein metabolic process; P:catabolic process; C:cytosol; C:protein complex; C:intracellular; P:response to stress; P:response to biotic stimulus; P:anatomical structure morphogenesis; P:multicellular organismal development; P:response to abiotic stimulus; F:nucleotide binding; F:hydrolase activity; P:growth; P:cell differentiation; P:regulation of biological process; C:nucleus; C:plasma membrane		no IPS match
10D2I-NI	fructose bisphosphate aldolase	BAA77604	1,30E-21	98	105,916	C:organelle; C:thylakoid; C:plastid; P:carbohydrate metabolic process; P:generation of precursor metabolites and energy; P:catabolic process; F:catalytic activity; P:biological_process; C:ribosome; C:cell; C:extracellular region; P:biosynthetic process; P:nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process; P:secondary metabolic process; P:metabolic process	EC:4.1.2.13	IPR000741; IPR013785; SSF51569 (SUPERFAMILY)
11D2I-NI	TC55016					No GO term found		SignalP (SIGNALP)
13D2I-NI	drh1 (dead box rna helicase 1) atp-dependent rna helicase atpase	XP_002300045	3,10E-140	96	469,159	F:RNA binding; F:nucleotide binding; F:hydrolase activity; F:protein binding		PTHR10967 (PANTHER), PTHR10967:SF50 (PANTHER)
15D2I-NI	No similarity					No GO term found		no IPS match

Tabla Anexa 7 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D2I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	BlastX	Hit ACC	E-Value	Similarity	Score	GOs	Enzyme Codes	InterProScan
16D2I-NI	CD857247					No GO term found		no IPS match
18D2I-NI	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	XP_002510957	4,78E-32	74	140,584	F:molecular_function; P:biological_process		no IPS match
21D2I-NI	drosophila melanogaster cg9091	ADD20464	3,09E-31	98	137,887	C:ribosome; F:structural molecule activity; F:binding; P:translation; F:RNA binding; P:biological_process	EC:3.6.5.3	SignalP (SIGNALP)
22D2I-NI	cysteine proteinase	BAC75924	2,39E-54	98	215,312	C:cell; C:endoplasmic reticulum; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; F:peptidase activity; P:protein metabolic process; P:catabolic process	EC:3.4.22.0	no IPS match
23D2I-NI	No similarity					No GO term found		
25D2I-NI	hexa ubiquitin protein	XP_002452705	0	100	875,93	C:cytoplasm; C:nucleus; P:protein modification process		no IPS match
25D2I-NI	ubiquitin [Micromonas pusilla CCMP1545]	ADC29516	5,39E-50	100	200,29	No GO term found		no IPS match
27D2I-NI	hypothetical protein [Helianthus annuus]	AAR23802	1,68E-05	66	52,373	No GO term found		no IPS match
29D2I-NI	gdp dissociation inhibitor	XP_002513702	2,73E-35	97	151,369	F:enzyme regulator activity; P:protein transport; P:biological_process		no IPS match
33D2I-NI	chch domain containing expressed	XP_002269289	1,71E-13	94	78,9518	F:protein binding; C:plastid		SignalP (SIGNALP)
34D2I-NI	dehydration-responsive protein rd22	ACV60360	1,46E-67	76	260,381	No GO term found		no IPS match
36D2I-NI	multicatalytic endopeptidase proteasome beta subunit	XP_002527995	6,04E-27	79	123,635	P:protein metabolic process; P:catabolic process; F:nucleic acid binding; F:peptidase activity; P:response to stress; P:response to abiotic stimulus; C:cytoplasm; C:protein complex; C:intracellular; C:plasma membrane		SignalP (SIGNALP)

Tabla Anexa 7 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D2I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	BlastX	Hit ACC	E-Value	Similarity	Score	GOs	Enzyme Codes	InterProScan
38D2I-NI	ac034106_9 a tumor-related protein from nicotiana tabacum gb	CBI35471	2,81E-08	84	61,6178	C:cell wall; C:apoplast; P:biological_process		no IPS match
39D2I-NI	TC32785 NPR1 [Helianthus annuus]					No GO term found		no IPS match
40D2I-NI	No similarity					No GO term found		SignalP (SIGNALP)
41D2I-NI	mip pip subfamily	ABO69705	1,04E-75	95	288,115	P:transport; C:cell; F:transporter activity		no IPS match
42D2I-NI	ubiquitin fusion protein	ABQ32305	3,53E-43	100	177,563	C:ribosome; F:structural molecule activity; F:protein binding; P:protein modification process; P:reproduction; P:embryonic development; C:nucleus; P:translation; P:biological_process	EC:3.6.5.3	no IPS match
43D2I-NI	BU036012					No GO term found		no IPS match
44D2I-NI	gtpase activator	XP_002321174	1,75E-166	89	377,481	P:regulation of Rab GTPase activity; F:Rab GTPase activator activity; C:intracellular		no IPS match
46D2I-NI	cation transport protein chac	CBI20802	6,04E-56	78	211,846	P:biological_process		no IPS match
47D2I-NI	No similarity					No GO term found		no IPS match
49D2I-NI	calcium ion binding	XP_002512244	1,93E-17	65	92,0485	F:calcium ion binding; P:biological_process		no IPS match
50D2I-NI	No similarity					No GO term found		SignalP (SIGNALP)
51D2I-NI	cbs domain containing	XP_002279210	1,47E-28	73	130,183	C:vacuole		no IPS match
52D2I-NI	thioredoxin m	CBI20319	2,42E-48	92	197,208	P:cellular homeostasis; P:regulation of biological process; F:electron carrier activity; F:catalytic activity; P:metabolic process		no IPS match
53D2I-NI	o-succinylhomoserine sulfhydrylase	XP_002299428	0	93	683,33	F:binding; P:catabolic process; P:cellular amino acid and derivative metabolic process; F:catalytic activity; C:cytosol	EC:4.4.1.11	IPR000277; IPR015421; IPR015422; IPR015424; PTHR11808:SF9 (PANTHER)
55D2I-NI	No similarity					No GO term found		SignalP (SIGNALP)

Tabla Anexa 7 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D2I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	BlastX	Hit ACC	E-Value	Similarity	Score	GOs	Enzyme Codes	InterProScan
56D2I-NI	storage protein	NP_850118	1,05E-68	89	264,233	F:molecular_function; P:biological_process		IPR007877
57D2I-NI	ubiquinol-cytochrome c reductase complex ubiquinone-binding protein qp-c	XP_002533341	3,29E-09	88	64,6994	C:protein complex; C:mitochondrion; P:transport; P:generation of precursor metabolites and energy		SignalP (SIGNALP)
59D2I-NI	at5g25280 f18g18_20	XP_002285428	8,86E-56	73	221,861	P:biological_process		no IPS match
60D2I-NI	anion exchanger family protein	XP_002272575	6,63E-71	79	270,011	C:endosome; F:transporter activity; C:plasma membrane; C:cell; P:biological_process; P:transport; P:ion transport		no IPS match
61D2I-NI	thioesterase family protein	XP_002320776	5,99E-13	68	78,9518	F:acyl-CoA thioesterase activity; F:hydrolase activity, acting on ester bonds; P:biological_process		SignalP (SIGNALP)
63D2I-NI	No similarity					No GO term found		SignalP (SIGNALP)
66D2I-NI	No similarity					No GO term found		SignalP (SIGNALP)
67D2I-NI	No similarity					No GO term found		no IPS match
68D2I-NI	No similarity					No GO term found		no IPS match
69D2I-NI	ribosomal protein isoform b	XP_002057754	1,62E-11	98	72,4034	P:cytoskeleton organization; P:cell cycle; F:structural molecule activity; C:lipid particle; C:ribosome; C:cytosol; P:translation; P:biological_process; P:carbohydrate metabolic process	EC:3.6.5.3	IPR018483
70D2I-NI	tubulin alpha	AAK94059	4,25E-33	100	144,05	P:biological_process; C:protein complex; F:nucleotide binding; P:cellular component organization; F:structural molecule activity; F:hydrolase activity; C:cytoskeleton	EC:3.6.5.1; EC:3.6.5.2; EC:3.6.5.3; EC:3.6.5.4	no IPS match
74D2I-NI	No similarity					No GO term found		SignalP (SIGNALP)
75D2I-NI	signal peptidase complex subunit 2	ACU13439	5,19E-15	89	83,9593	F:peptidase activity; P:protein metabolic process; C:cell; C:endoplasmic reticulum; C:protein complex		no IPS match
76D2I-NI	No similarity					No GO term found		SignalP (SIGNALP)

Tabla Anexa 7 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D2I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	BlastX	Hit ACC	E-Value	Similarity	Score	GOs	Enzyme Codes	InterProScan
77D2I-NI	unknown [Populus trichocarpa]	ADB85572	2,82E-40	76	167,933	P:response to stress; P:response to biotic stimulus; P:response to endogenous stimulus; F:transferase activity; F:protein binding; P:biological_process; P:biosynthetic process; P:response to abiotic stimulus; P:carbohydrate metabolic process	EC:2.7.7.22	PTHR20884 (PANTHER), PTHR20884:SF3 (PANTHER)
78D2I-NI	betaine proline transporter	NP_001045145	4,89E-08	75	60,8474	C:cell		no IPS match
79D2I-NI	protein	XP_002285410	9,83E-170	89	600,897	C:cell; C:mitochondrion; C:plasma membrane		no IPS match
81D2I-NI	No similarity					F:structural molecule activity; C:ribosome; P:translation	EC:3.6.5.3	IPR007836
82D2I-NI	hypothetical protein [Vitis vinifera]	AAV85888	3,95E-34	100	147,517	P:response to stress; F:transferase activity; F:glutathione transferase activity		no IPS match
86D2I-NI	mob1-like protein	ACU13512	4,11E-15	93	84,3445	F:kinase activity; C:nucleus; F:protein binding; C:plastid		SignalP (SIGNALP)
87D2I-NI	No similarity					No GO term found		no IPS match
88D2I-NI	No similarity					No GO term found		no IPS match
89D2I-NI	predicted protein [Populus trichocarpa]	XP_002302443	1,49E-35	66	132,109	F:molecular_function; P:biological_process		no IPS match
90D2I-NI	myo-inositol-1-phosphate synthase	Q9LW96	0	97	956,051	C:cytoplasm; P:biosynthetic process; P:carbohydrate metabolic process; F:binding; P:lipid metabolic process; F:catalytic activity	EC:5.5.1.4	no IPS match
91D2I-NI	beta-fructosidase	CAD12104	1,85E-20	92	102,064	F:hydrolase activity; C:vacuole; P:carbohydrate metabolic process	EC:3.2.1.26	no IPS match
92D2I-NI	vacuolar atpase subunit dva41	ABN08957	1,98E-154	98	550,051	C:vacuole; P:generation of precursor metabolites and energy; P:nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process; P:ion transport; P:biosynthetic process; C:cell; C:protein complex; F:hydrolase activity; F:transporter activity; C:plasma membrane	EC:3.6.3.14	no IPS match
93D2I-NI	af467945_1 lipid transfer protein isoform 1	AAQ96338	1,00E-05	69	53,1434	P:lipid transport; F:lipid binding; P:transport		no IPS match

Tabla Anexa 7 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D2I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	BlastX	Hit ACC	E-Value	Similarity	Score	GOs	Enzyme Codes	InterProScan
96D2I-NI	cwp _x _arath ame: full= cell wall protein flags: precursor	CAH03797	1,35E-18	67	95,9005	C:endomembrane system; P:biological_process		no IPS match
97D2I-NI	cml7_arath ame: full=calmodulin-like protein 7	XP_002301768	6,80E-23	95	110,153	P:reproduction; C:nucleus; F:calcium ion binding; P:response to stress; P:response to abiotic stimulus		no IPS match
98D2I-NI	protein disulfide	CAA72092	9,51E-17	92	89,7373	P:cellular homeostasis; P:regulation of biological process; C:endoplasmic reticulum; F:catalytic activity	EC:5.3.4.1	no IPS match
99D2I-NI	TC53135					No GO term found		SignalP (SIGNALP)
102D2I-NI	a chain structural view of a fungal toxin acting on a 14-3-3 regulatory complex	O65352	5,86E-22	100	107,071	F:protein binding		no IPS match
103D2I-NI	protein phosphatase	XP_002510354	1,49E-25	93	119,013	F:phosphoprotein phosphatase activity; C:plastid; P:protein modification process	EC:3.1.3.16	no IPS match
107D2I-NI	cytochrome c1	ABO84810	2,09E-70	99	269,626	C:vacuole; C:protein complex; C:mitochondrion; F:binding; P:transport; C:cell; F:electron carrier activity; P:generation of precursor metabolites and energy		SignalP (SIGNALP)
108D2I-NI	ribosomal protein cytosolic	ACU13960	4,37E-33	100	144,05	C:vacuole; F:structural molecule activity; C:ribosome; C:cytosol; C:cell; P:translation; F:RNA binding; P:biological_process	EC:3.6.5.3	no IPS match
109D2I-NI	actin depolymerizing	AAL91667	1,58E-19	92	98,9821	F:actin binding; C:intracellular		no IPS match
110D2I-NI	ribosomal protein	XP_002321226	9,71E-136	94	487,649	P:translation; P:multicellular organismal development; F:binding; C:nucleolus; F:structural molecule activity; P:transport; P:cellular component organization; P:biological_process; F:protein binding; C:plastid; C:vacuole; C:ribosome; C:cytosol; C:plasma membrane; F:RNA binding	EC:3.6.5.3	no IPS match
111D2I-NI	No similarity					No GO term found		no IPS match

Tabla Anexa 7 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D2I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	BlastX	Hit ACC	E-Value	Similarity	Score	GOs	Enzyme Codes	InterProScan
113D2I-NI	ribosomal protein l30	Q9M5M6	3,23E-36	98	154,451	F:structural molecule activity; C:ribosome; C:cytosol; P:translation; P:biological_process	EC:3.6.5.3	IPR000231; IPR004038; G3DSA:3.30.1330.30 (GENE3D), PTHR11449:SF1 (PANTHER), SSF55315 (SUPERFAMILY) no IPS match
114D2I-NI	isoform b	XP_002021930	5,29E-07	84	57,3806	F:structural molecule activity; C:ribosome; P:translation; P:biological_process	EC:3.6.5.3	no IPS match
115D2I-NI	phenylalanine ammonia-lyase	CAL91038	6,22E-32	97	140,198	C:cytoplasm; F:catalytic activity; P:cellular amino acid and derivative metabolic process; P:secondary metabolic process; P:biosynthetic process; P:catabolic process	EC:4.3.1.0	no IPS match
116D2I-NI	at4g21960 t8o5_170	ACT21094	1,60E-69	92	266,929	F:binding; P:metabolic process; F:catalytic activity; F:antioxidant activity; F:electron carrier activity; F:calcium ion binding; P:response to stress	EC:1.11.1.7	no IPS match
117D2I-NI	eukaryotic translation initiation factor 4e	AAP86602	3,79E-13	94	77,7962	F:RNA binding; F:translation factor activity, nucleic acid binding; C:ribosome; P:regulation of biological process; P:translation		SignalP (SIGNALP)
118D2I-NI	class iv chitinase	ABJ74186	1,93E-69	89	266,159	F:hydrolase activity; P:response to stress; P:cell death; P:carbohydrate metabolic process; P:catabolic process; P:reproduction; P:embryonic development; F:carbohydrate binding	EC:3.2.1.14	SignalP (SIGNALP)
118D2I-NI	TC53135					No GO term found		no IPS match
119D2I-NI	No similarity					C:cellular_component		IPR008879
123D2I-NI	multifunctional aminoacyl-trna ligase-like protein	XP_002301553	6,00E-77	87	291,582	C:cytoplasm; F:catalytic activity; P:nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process; P:translation; P:cellular amino acid and derivative metabolic process; F:nucleotide binding; C:cell	EC:6.1.1.15	no IPS match
124D2I-NI	constans protein	ABH09237	5,48E-85	64	247,284	C:intracellular; F:binding		IPR000315

Tabla Anexa 7 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D2I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	BlastX	Hit ACC	E-Value	Similarity	Score	GOs	Enzyme Codes	InterProScan
126D2I-NI	at5g54770 mbg8_3	O23787	1,84E-144	90	516,924	P:response to stress; P:response to abiotic stimulus; P:biosynthetic process; F:electron carrier activity; C:plastid; C:thylakoid; C:cell; C:mitochondrion; F:protein binding		no IPS match
130D2I-NI	No similarity					No GO term found		SignalP (SIGNALP)
133D2I-NI	TC50242					No GO term found		SignalP (SIGNALP)
134D2I-NI	hypothetical protein [Vitis vinifera]	CBI21310	4,45E-105	75	386,341	F:hydrolase activity; P:carbohydrate metabolic process; P:catabolic process; P:lipid metabolic process	EC:3.1.4.46	no IPS match

Tabla Anaxa 8 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D2I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Sequence	Description	Hit ACC	E-Value	Similarity	GOs	Enzyme Codes	InterProScan
1D2NI-I	No similarity				No GO term found		SignalP (SIGNALP)
2D2NI-I	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	XP_002298594	5,34E-15	100	P:metabolic process; F:catalytic activity; F:nucleotide binding; P:biosynthetic process; P:carbohydrate metabolic process; P:generation of precursor metabolites and energy; P:catabolic process	EC:1.2.1.12	no IPS match
4D2NI-I	40s ribosomal protein	XP_002322150	2,55E-112	93	C:nucleolus; C:vacuole; F:structural molecule activity; C:plasma membrane; F:RNA binding; C:ribosome; C:cytosol; C:plastid; P:translation; P:response to stress; P:response to abiotic stimulus; P:biological_process	EC:3.6.5.3	SignalP (SIGNALP)
3D2NI-I	conserved hypothetical protein	XP_002519217	1,71E-29	85	P:response to stress; P:response to abiotic stimulus; C:plasma membrane		no IPS match
5D2NI-I	No similarity	ABK26259	2,21E-05	77	No GO term found		SignalP (SIGNALP)
6D2NI-I	delta-12 oleate desaturase	AAL68982	8,59E-66	97	P:metabolic process; P:lipid metabolic process; F:catalytic activity	EC:1.3.1.35	no IPS match
7D2NI-I	plastid protein	XP_002334594	8,62E-10	93	P:nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process; P:organelle organization; C:plastid; C:mitochondrion		no IPS match
22D2NI-I	actin-depolymerizing factor 6	BAG70999	6,37E-21	92	F:actin binding; C:intracellular		SignalP (SIGNALP)
33D2NI-I	21 kda protein	XP_002264799	9,84E-14	67	F:enzyme inhibitor activity; F:pectinesterase activity		no IPS match

Tabla Anaxa 8 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D2I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Sequence	Description	Hit ACC	E-Value	Similarity	GOs	Enzyme Codes	InterProScan
34D2NI-I	21 kda protein (defensein)	P22357	5,48E-28	91	F:hydrolase activity; C:extracellular region; P:response to stress; P:cellular component organization; C:cell wall; P:response to abiotic stimulus; F:enzyme regulator activity; P:carbohydrate metabolic process	EC:3.1.1.11	SignalP (SIGNALP)
39D2NI-I	40s ribosomal protein	XP_002322150	4,08E-64	81	C:vacuole; F:structural molecule activity; C:plasma membrane; F:RNA binding; C:ribosome; C:cytosol; C:plastid; P:translation; P:response to stress; P:response to abiotic stimulus; P:biological_process	EC:3.6.5.3	no IPS match
10D2NI-I	predicted protein [Populus trichocarpa]	XP_002277137	4,63E-27	85	C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; F:nucleic acid binding; F:transferase activity; P:metabolic process	EC:2.1.1.0	IPR002052
12D2NI-I	UDP-glucosyltransferase, putative [Ricinus communis]	XP_002265409	7,84E-128	71	F:transferase activity; P:metabolic process		IPR002213; PTHR11926:SF15 (PANTHER), SignalP (SIGNALP), SSF53756 (SUPERFAMILY)
13D2NI-I	vacuolar protein sorting-associated protein	ACU20084	1,16E-41	89	P:protein transport; P:transport; C:endosome; C:protein complex		no IPS match
15D2NI-I	protein	CBI29308	1,67E-21	79	C:cytosol; C:plasma membrane		no IPS match
16D2NI-I	calmodulin binding	CAA52782	5,36E-143	99	P:biological_process; F:calmodulin binding		no IPS match
17D2NI-I	type 2 metallothionein-like protein	BAC57959	4,06E-22	90	F:binding		IPR000347

Tabla Anaxa 8 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D2I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Sequence	Description	Hit ACC	E-Value	Similarity	GOs	Enzyme Codes	InterProScan
18D2NI-I	ribonucleoside-diphosphate reductase small chainNo similarity	XP_002269951	7,00E-170	93	P:biosynthetic process; P:DNA metabolic process; F:binding; P:multicellular organismal development; P:regulation of biological process; P:cell cycle; P:metabolic process; P:nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process; P:cell death; F:catalytic activity; P:response to stress; C:protein complex; C:cytoplasm	EC:1.17.4.1	no IPS match
19D2NI-I	membrane steroid-binding protein 1	AAD34615	1,76E-10	95	F:binding; C:plastid; C:thylakoid; P:generation of precursor metabolites and energy		no IPS match
20D2NI-I	serologically defined breast cancer antigen ny-br-84No similarity	XP_002284045	7,71E-88	87	F:molecular_function; P:biological_process		IPR012936; PTHR10984 (PANTHER), PTHR10984:SF7 (PANTHER)
21D2NI-I	rieske iron-sulfur protein	XP_002512828	2,29E-26	98	C:protein complex; C:mitochondrion; F:catalytic activity; F:transporter activity; F:electron carrier activity; F:binding; C:cell; P:generation of precursor metabolites and energy; P:ion transport	EC:1.10.2.2	no IPS match
23D2NI-I	chloroplast nucleoid dna binding	AAM66061	1,04E-39	88	C:cell wall; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; F:peptidase activity; P:protein metabolic process; P:catabolic process; C:cell	EC:3.4.23.0	SignalP (SIGNALP)
24D2NI-I	No similarity				No GO term found		no IPS match

Tabla Anaxa 8 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D2I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Sequence	Description	Hit ACC	E-Value	Similarity	GOs	Enzyme Codes	InterProScan
28D2NI-I	cytochrome p450	XP_002298594	4,04E-15	97	F:electron carrier activity; F:heme binding; F:iron ion binding; F:monooxygenase activity		SignalP (SIGNALP)
29D2NI-I	No similarity	CBI15967	1,88E-58	67	No GO term found		no IPS match
30D2NI-I	tonoplast intrinsic	ACV52008	6,21E-99	87	C:cell; F:transporter activity; P:transport		IPR000425; IPR012269; PTHR19139:SF30 (PANTHER)
35D2NI-I	protein	XP_002330428	3,39E-72	90	C:cell		no IPS match
37D2NI-I	arginine decarboxylase	XP_002513004	1,16E-30	96	P:catabolic process; P:cellular amino acid and derivative metabolic process; F:catalytic activity; P:biosynthetic process; F:binding	EC:4.1.1.19	no IPS match
40D2NI-I	No similarity	AAQ11374	2,21E-05	80	No GO term found		SignalP (SIGNALP)
41D2NI-I	ras-related gtp-binding protein	CBI32577	2,44E-66	98	P:protein transport; C:plasma membrane; F:nucleotide binding; P:signal transduction		SignalP (SIGNALP)
42D2NI-I	No similarity				No GO term found		no IPS match
43D2NI-I	ubiquinol-cytochrome c reductase	XP_002300924	1,19E-19	93	C:mitochondrion; F:catalytic activity; F:transporter activity; P:generation of precursor metabolites and energy; P:ion transport	EC:1.10.2.2	SignalP (SIGNALP)
44D2NI-I	No similarity				No GO term found		no IPS match
45D2NI-I	scp20_arath ame: full=serine carboxypeptidase-like 20 flags: precursor	CBI35583	2,36E-31	91	F:peptidase activity; C:peroxisome; P:protein metabolic process; P:catabolic process	EC:3.4.16.0	no IPS match
46D2NI-I	anther-specific protein sf2	AAB19813	4,54E-14	100	C:extracellular region; C:cell wall; P:cellular component organization		SignalP (SIGNALP)

Tabla Anaxa 8 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D2I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Sequence	Description	Hit ACC	E-Value	Similarity	GOs	Enzyme Codes	InterProScan
47D2NI-I	60s ribosomal protein l7a (extensin)	CBI15705	1,14E-103	98	C:nucleolus; F:structural molecule activity; C:plasma membrane; P:biological_process; C:ribosome; C:cytosol; C:plastid; P:translation	EC:3.6.5.3	no IPS match
48D2NI-I	pectin acetylerase	AAP72959	0	97	C:cell; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle		IPR004963; PTHR21562 (PANTHER), PF03283 (PFAM)
49D2NI-I	GH15252 [Drosophila grimshawi]	XP_001984005	3,29E-17	52	F:catalytic activity		SignalP (SIGNALP)
50D2NI-I	f-box family	XP_002270412	1,00E-35	67	F:carbohydrate binding; P:reproduction; P:embryonic development		no IPS match
51D2NI-I	dreg-2 like protein	ACU19698	1,19E-14	95	C:cell		no IPS match
52D2NI-I	proteinNo similarity	XP_002526721	3,09E-15	71	C:endomembrane system; P:biological_process		no IPS match
53D2NI-I	mitochondrial-processing peptidase beta subunit	CBI22296	2,11E-24	96	F:peptidase activity; P:protein metabolic process; P:catabolic process; F:binding; C:mitochondrion	EC:3.4.24.0	IPR011237; IPR011249; PTHR11851 (PANTHER), PTHR11851:SF58 (PANTHER)
54D2NI-I	No similarity				No GO term found		no IPS match
55D2NI-I	No similarity				No GO term found		no IPS match
56D2NI-I	40s ribosomal protein	AAD47346	6,73E-18	98	C:ribosome; F:structural molecule activity; P:translation; P:biological_process	EC:3.6.5.3	no IPS match
57D2NI-I	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	XP_002524437	2,49E-09	64	No GO term found		no IPS match
58D2NI-I	tonoplast intrinsic protein	ACJ53709	2,60E-30	90	P:transport; C:cell; F:transporter activity		IPR000425; PTHR19139:SF30 (PANTHER)
59D2NI-I	aldo keto (auxin induced protein)	AAB84222	5,75E-22	97	F:catalytic activity; P:metabolic process		SignalP (SIGNALP)
60D2NI-I	er lumen protein retaining receptor	XP_002270894	3,13E-83	79	P:protein transport; F:receptor activity; P:signal transduction		no IPS match

Tabla Anaxa 8 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D2I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Sequence	Description	Hit ACC	E-Value	Similarity	GOs	Enzyme Codes	InterProScan
61D2NI-I	pectate lyase	XP_002265100	4,10E-53	90	No GO term found		IPR002022; IPR011050; IPR012334; IPR018082
62D2NI-I	No similarity				No GO term found		SignalP (SIGNALP)
63D2NI-I	hypothetical protein Bm1_05555 [Brugia malayi]	ABK29471	9,21E-12	84	No GO term found		no IPS match
64D2NI-I	not1 n-terminal ccr4-not complex component family expressed	CBI29924	7,04E-28	89	F:transcription regulator activity; P:transcription; P:regulation of biological process; C:nucleus		no IPS match
65D2NI-I	cysteine protease 1 precursor	BAC75923	3,97E-10	100	F:hydrolase activity; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; F:peptidase activity; P:protein metabolic process; P:catabolic process; P:lipid metabolic process	EC:3.1.1.4; EC:3.4.22.0	no IPS match
66D2NI-I	No similarity				No GO term found		no IPS match
68D2NI-I	zim motif family expressed	BAG68657	3,96E-08	48	No GO term found		no IPS match
69D2NI-I	heat shock protein 83	P51819	3,19E-12	92	P:protein metabolic process; F:protein binding; C:cytoplasm; F:nucleotide binding; P:response to stress		IPR001404; IPR020576; SignalP (SIGNALP), SSF110942 (SUPERFAMILY)
70D2NI-I	seven-transmembrane-domain protein 1	XP_002300945	9,74E-46	86	C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; C:cell		no IPS match
71D2NI-I	cysteine proteinase	XP_002515048	5,89E-35	72	F:peptidase activity; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle		no IPS match
72D2NI-I	defensin amp1 protein	P22357	4,50E-30	95	C:extracellular region; P:response to stress; C:cell wall; P:cellular component organization		SignalP (SIGNALP)
73D2NI-I	No similarity				No GO term found		SignalP (SIGNALP)
74D2NI-I	uncharacterized protein at3g49720	P26519	3,75E-56	95	C:plastid; C:thylakoid; C:Golgi apparatus; C:plasma membrane		SignalP (SIGNALP)

Tabla Anaxa 8 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D2I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Sequence	Description	Hit ACC	E-Value	Similarity	GOs	Enzyme Codes	InterProScan
76D2NI-I	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase				C:cytoplasm; F:nucleotide binding; P:metabolic process; P:carbohydrate metabolic process; P:generation of precursor metabolites and energy; P:catabolic process; F:catalytic activity; P:biosynthetic process	EC:1.2.1.12	SignalP (SIGNALP)
77D2NI-I	No similarity				No GO term found		SignalP (SIGNALP)

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
4D4I-NI	TC56784	XP_002452705	0	100	C:cytoplasm; C:nucleus; P:protein modification process		no IPS match
8D4I-NI	60s ribosomal protein l18a	ACS96446	1,20E-11	88	F:structural constituent of ribosome; C:plasma membrane; P:ribosome biogenesis; C:cytosolic large ribosomal subunit; P:translation	EC:3.6.5.3	SignalP (SIGNALP)
7D4I-NI	predicted protein	XP_002304079	1,53E-23	71	C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle		
9D4I-NI	isoform b	ACU12388	2,79E-58	91	P:mitotic spindle elongation; F:structural constituent of ribosome; EC:3.6.5.3 C:lipid particle; C:cytosolic small ribosomal subunit; P:translation; P:ribosome biogenesis		no IPS match
10D4I-NI	plasminogen activator inhibitor 1 rna-binding	XP_002272562	1,53E-06	85	No GO term found		PTHR12299 (PANTHER), PTHR12299:SF4 (PANTHER)
11D4I-NI	protein	XP_002297639	1,29E-37	92	C:peroxisome; P:auxin metabolic process; F:ligase activity		SignalP (SIGNALP)
12D4I-NI	oligopeptide transporter opt family	XP_002522882	2,37E-23	89	C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; C:membrane		no IPS match
14D4I-NI	water channel-like protein	AAT74898	8,28E-45	98	P:response to water deprivation; C:vacuole; P:water transport; C:plasma membrane; C:integral to membrane; F:water channel activity; C:mitochondrion		SignalP (SIGNALP)
16D4I-NI	erd7 protein	XP_002305512	6,10E-29	84	P:response to water deprivation; P:response to cold; P:response to high light intensity; P:response to salt stress		SignalP (SIGNALP)
22D4I-NI	sucrose synthetase	BAB20799	7,75E-22	92	P:suspensor development; P:sucrose biosynthetic process; F:sucrose synthase activity; P:starch metabolic process	EC:2.4.1.13	no IPS match
24D4I-NI	early-responsive to dehydration erd	XP_002518432	2,80E-08	73	C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; C:membrane; C:plasma membrane		no IPS match
25D4I-NI	flavonol synthase flavanone 3-	XP_002263617	1,29E-13	74	P:metabolic process; F:oxidoreductase activity		no IPS match

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
26D4I-NI	protein arginine n-methyltransferase	XP_002282760	1,14E-33	90	F:protein-arginine N-methyltransferase activity; F:identical protein binding; C:nucleus		SignalP (SIGNALP)
27D4I-NI	carbon catabolite repressor	XP_002317830	1,78E-71	83	P:response to cold; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; F:calcium ion binding; P:glycolysis; C:nucleus; F:glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating) activity; P:gluconeogenesis	EC:1.2.1.12	no IPS match
28D4I-NI	unknown	ABK26259	7,13E-06	77	No GO term found		no IPS match
31D4I-NI	cysteine desulfurylase, putative	XP_002523229	6,92E-15	96	P:response to selenium ion; P:cysteine metabolic process; F:pyridoxal phosphate binding; P:iron incorporation into metallo-sulfur cluster; F:cysteine desulfurase activity; F:selenocysteine lyase activity; P:selenium metabolic process; F:transaminase activity; C:chloroplast	EC:2.8.1.7; EC:4.4.1.16; EC:2.6.1.0	no IPS match
32D4I-NI	nadh-ubiquinone oxidoreductase subunit	XP_002465711	2,12E-24	97	C:respiratory chain complex I; P:photorespiration; P:embryonic development ending in seed dormancy; C:plastid; C:mitochondrial membrane		IPR009346
35D4I-NI	TC47775	XP_002308323	1,68E-41	60	F:protein binding		no IPS match
36D4I-NI	cystathionine gamma-synthase	AAR92031	1,00E-13	93	F:pyridoxal phosphate binding; F:cystathionine gamma-synthase activity; P:methionine biosynthetic process; P:cysteine metabolic process	EC:2.5.1.48	SignalP (SIGNALP)
39D4I-NI	probable receptor-like protein kinase	XP_002281725	1,55E-20	59	F:kinase activity; C:plasma membrane		no IPS match
40D4I-NI	cysteine protease 1 precursor	BAC75923	1,46E-65	100	F:phospholipase A2 activity; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; F:cysteine-type endopeptidase activity; P:proteolysis; P:phospholipid catabolic process	EC:3.1.1.4; EC:3.4.22.0	no IPS match
41D4I-NI	TC51941				No GO term found		no IPS match
45D4I-NI	cyclic nucleotide and calmodulin-regulated ion channel	CAN71702	6,96E-32	69	F:calmodulin binding; C:integral to membrane; F:ion channel activity; P:ion transport; C:plasma membrane		no IPS match

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
46D4I-NI	atp-binding cassette	XP_002534113	5,56E-57	81	F:ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances; P:multidrug transport; C:plasma membrane		IPR013525; PTHR19241 (PANTHER), PTHR19241:SF10 (PANTHER), SignalP (SIGNALP)
47D4I-NI	<u>TC53226</u>			0	No GO term found		no IPS match
49D4I-NI	lactate dehydrogenase	CAA70100	3,10E-15	89	C:cytoplasm; F:binding; P:anaerobic glycolysis; C:plasma membrane; F:L-lactate dehydrogenase activity; P:oxidation reduction; P:response to abscisic acid stimulus; P:response to salt stress; P:gluconeogenesis; P:cysteine metabolic process	EC:1.1.1.27	no IPS match
53D4I-NI	protein	XP_002530877	1,37E-07	83	C:vacuole		no IPS match
54D4I-NI	nitrate transporter	XP_002511519	1,36E-62	85	C:membrane; P:oligopeptide transport; P:response to nematode; F:calcium ion binding; F:transporter activity		no IPS match
57D4I-NI	dynammin-related protein expressed	XP_002326882	2,82E-40	83	F:GTP binding; P:response to cadmium ion; C:plasma membrane; P:defense response to fungus; P:vesicle-mediated transport; C:mitochondrion; F:GTPase activity	EC:3.6.5.1; EC:3.6.5.2; EC:3.6.5.3; EC:3.6.5.4	no IPS match
59D4I-NI	conserved hypothetical protein	XP_002524294	4,03E-55	79	C:membrane		no IPS match
61D4I-NI	<u>TC40695</u>	XP_002285308	6,67E-116	91	C:plastid		no IPS match
65D4I-NI	hypothetical protein	BAC92585	7,43437	48	No GO term found		
67D4I-NI	ser thr protein phosphatase family expressed	XP_002528725	1,96E-59	83	C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; F:protein serine/threonine phosphatase activity; F:acid phosphatase activity; P:protein amino acid dephosphorylation; C:protein serine/threonine phosphatase complex; P:riboflavin metabolic process; P:hexachlorocyclohexane metabolic process	EC:3.1.3.2	SignalP (SIGNALP)

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
70D4I-NI	peptide transporter-like	XP_002519847	8,41E-13	90	No GO term found		SignalP (SIGNALP)
71D4I-NI	nam (no apical meristem)-like protein	XP_002284830	1,95E-09	49	P:multicellular organismal development; P:regulation of transcription; C:cellular_component; F:transcription factor activity; F:DNA binding		no IPS match
72D4I-NI	PGPS/D7	AAD02549	1,10E-04	59	No GO term found		no IPS match
73D4I-NI	ac036104_11 contains weak Similitud to dna-binding protein (gt-1a) from nicotiana tabacum gb	CBI18199	9,54E-25	54	C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle		no IPS match
74D4I-NI	peroxisomal membrane protein	XP_002512372	1,59E-27	83	F:binding; C:mitochondrial inner membrane; F:ATP transmembrane transporter activity; C:peroxisome; P:mitochondrial transport; P:fatty acid beta-oxidation; F:ADP transmembrane transporter activity; P:ATP transport; P:ADP transport		no IPS match
75D4I-NI	anion exchanger family protein	CBI37003	3,83E-26	70	C:endosome; C:plasma membrane; P:boron transport; F:boron transporter activity		SignalP (SIGNALP)
77D4I-NI	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate	ABB88836	4,29E-49	94	F:4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate reductase activity; F:4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase activity; C:chloroplast stroma; P:isopentenyl diphosphate biosynthetic process, mevalonate-independent pathway; P:response to antibiotic	EC:1.17.1.2; EC:1.17.4.3	no IPS match
79D4I-NI	putative protein [Arabidopsis thaliana]	AAN31807	4,74E-56	85	C:plant-type cell wall		no IPS match
80D4I-NI	af466359_1 swp1	CBI34155	2,76E-85	88	C:mediator complex; P:positive regulation of transcription; P:positive regulation of cell proliferation		no IPS match
81D4I-NI	hypothetical protein [Helianthus annuus]	AAR23802	4,60E-11	59	No GO term found		no IPS match

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
82D4I-NI	lipid transfer protein	Q39950	7,52E-46	91	F:lipid binding; P:lipid transport		no IPS match
84D4I-NI	predicted protein [Nematostella vectensis]/26S ribosomal RNA BLASTN	BAB33421	8,63E-10	97	No GO term found		IPR019636
85D4I-NI	rapid alkalinization factor 2	AAR00326	4,64E-18	76	C:apoplast; P:cell-cell signaling; C:plant-type cell wall; F:signal transducer activity		
86D4I-NI	clp protease regulatory subunit clpx	CBI16961	8,18E-32	85	F:peptidase activity; F:ATPase activity; F:protein binding; F:ATP binding; C:plastid; P:protein transport		no IPS match
88D4I-NI	ap2 erf domain-containing transcription factor	XP_002319099	2,78E-08	80	P:defense response; P:jasmonic acid mediated signaling pathway; F:transcription activator activity; F:transcription factor activity; P:ethylene mediated signaling pathway; P:regulation of transcription, DNA-dependent; P:positive regulation of transcription; C:transcription factor complex		no IPS match
89D4I-NI	<u>CD856677</u>				No GO term found		
90D4I-NI	root allergen protein	BAC10911	3,46E-14	77	P:response to biotic stimulus; P:defense response		SignalP (SIGNALP)
91D4I-NI	gmp synthetase	AAO42053	6,04E-27	95	P:GMP biosynthetic process; P:glutamine metabolic process; P:biosynthetic process; F:ATP binding; F:GMP synthase (glutamine-hydrolyzing) activity; P:purine base metabolic process; P:glutamate metabolic process	EC:6.3.5.2	no IPS match
92D4I-NI	<u>BQ970140</u>				No GO term found		no IPS match
93D4I-NI	serine threonine-protein kinase	XP_002530292	2,11E-40	86	P:protein amino acid phosphorylation; F:protein tyrosine kinase activity; F:ATP binding; F:protein serine/threonine kinase activity; P:serine family amino acid metabolic process	EC:2.7.10.0; EC:2.7.11.0	SignalP (SIGNALP)

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
95D4I-NI	p21-rho-binding domain-containing protein	XP_002529837	5,99E-13	53	C:apical plasma membrane; P:pollen tube growth		no IPS match
96D4I-NI	predicted protein [Populus trichocarpa]	XP_002329544	9,56E-09	58	F:molecular_function; P:biological_process		no IPS match
98D4I-NI	beta-galactosidase precursor-like protein	Q9LFA6	2,24E-42	84	C:beta-galactosidase complex; C:apoplast; F:beta-galactosidase activity; F:cation binding; P:galactose metabolic process; P:glycosaminoglycan catabolic process; P:glycosphingolipid metabolic process; P:glycerolipid metabolic process	EC:3.2.1.23	IPR001944; IPR008979; PTHR23421:SF2 (PANTHER)
100D4I-NI	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	XP_002273577	2,65E-12	71	C:mitochondrion; P:P		no IPS match
102D4I-NI	3-ketoacyl- thiolase	XP_002299284	1,69E-43	96	P:glyoxysome organization; C:peroxisome; C:mitochondrion; C:nucleolus; F:acetyl-CoA C-acyltransferase activity; P:jasmonic acid biosynthetic process; P:fatty acid beta-oxidation; C:chloroplast; C:plasma membrane	EC:2.3.1.16	IPR002155; IPR016039; IPR020610; IPR020613; IPR020617; G3DSA:3.40.47.20 (GENE3D), PTHR18919:SF15 (PANTHER), tmhmm (TMHMM) IPR002293; IPR015606; SignalP (SIGNALP)
106D4I-NI	cationic amino acid	XP_002281463	1,58E-27	80	P:L-arginine import; F:cationic amino acid transmembrane transporter activity; F:L-lysine transmembrane transporter activity; F:arginine transmembrane transporter activity; C:integral to membrane; P:L-glutamate import; F:L-glutamate transmembrane transporter activity; P:cation transport; P:polyamine transport; P:lysine transport		

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
107D4I-NI	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g02 4221 [Sorghum bicolor]/ 26S RIBOSOMAL RNA BLASTN	BAB33421	9,62E-17	95	No GO term found		no IPS match
110D4I-NI	predicted protein	XP_002333719	1,04E-31	84	C:vacuole; F:antiporter activity; P:response to nematode; C:plasma membrane; P:transport		no IPS match
111D4I-NI	dna binding	ACU20895	3,14E-76	76	P:response to jasmonic acid stimulus; P:response to gibberellin stimulus; P:response to cadmium ion; P:regulation of transcription; P:response to salicylic acid stimulus; P:response to auxin stimulus; F:transcription factor activity; P:response to salt stress; C:transcription factor complex		no IPS match
113D4I-NI	sec61 transport protein	ACU23375	1,16E-68	97	F:P-P-bond-hydrolysis-driven protein transmembrane transporter activity; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; C:plasma membrane; P:protein secretion; C:mitochondrion; C:chloroplast envelope		SignalP (SIGNALP)
114D4I-NI	probable serine threonine-protein kinase wnk4	XP_002320210	2,33E-22	77	F:protein kinase activity; F:ATP binding; P:protein amino acid phosphorylation; F:protein serine/threonine kinase activity		no IPS match
116D4I-NI	alcohol oxidase	XP_002272123	6,36E-73	81	C:plastid; C:endoplasmic reticulum		no IPS match
118D4I-NI	protein transport protein sec61 alpha subunit	XP_002522260	8,67E-58	100	F:P-P-bond-hydrolysis-driven protein transmembrane transporter activity; C:plasma membrane; P:protein secretion; C:mitochondrion; C:chloroplast envelope		no IPS match
122D4I-NI	hypothetical protein	XP_002283140	4,03E-54	88	C:vacuole; F:protein dimerization activity; F:aminoacylase activity; EC:3.5.1.14 P:cellular amino acid metabolic process; P:proteolysis; F:metallopeptidase activity; P:urea cycle intermediate metabolic process		SignalP (SIGNALP)
123D4I-NI	conserved hypothetical protein	XP_002276709	4,92E-31	73	C:chloroplast inner membrane; C:chloroplast thylakoid membrane; C:mitochondrion		no IPS match

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
126D4I-NI	unnamed protein product	XP_002283278	5,27E-07	77	No GO term found		SignalP (SIGNALP)
127D4I-NI	60s ribosomal protein l24	ABE80118	2,85E-31	98	P:gynoecium development; P:translation; F:structural constituent of ribosome; P:ribosome biogenesis; P:auxin mediated signaling pathway; C:cytosolic large ribosomal subunit; C:plasma membrane	EC:3.6.5.3	no IPS match
128D4I-NI	sugar transporter	XP_002516010	7,86E-19	76	C:membrane; F:sugar:hydrogen symporter activity; P:carbohydrate transport		SignalP (SIGNALP)
131D4I-NI	ribosomal protein s23	XP_002625811	8,79E-58	81	F:structural constituent of ribosome; C:small ribosomal subunit; P:translation; P:ribosome biogenesis	EC:3.6.5.3	no IPS match
136D4I-NI	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) e1 alpha subunit	XP_002301442	2,25E-96	96	F:pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) activity; P:oxidation reduction; P:glycolysis; C:plastid; P:gluconeogenesis; P:isoleucine biosynthetic process; P:leucine biosynthetic process; P:valine biosynthetic process; C:pyruvate dehydrogenase complex	EC:1.2.4.1	no IPS match
138D4I-NI	receptor serine-threonine protein	AAO41930	2,88E-61	87	No GO term found		SignalP (SIGNALP)
143D4I-NI	<u>TC49719</u>	XP_002510359	0	96	F:protein binding; P:photomorphogenesis; C:signalosome; P:G2 phase of mitotic cell cycle; P:cullin deneddylation		no IPS match
144D4I-NI	unknown protein	NP_175166	3,36E-14	86	C:plasma membrane		SignalP (SIGNALP)
152D4I-NI	polyubiquitin containing 7 ubiquitin monomers	ACZ69386	8,55E-34	92	P:protein modification process		no IPS match

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
153D4I-NI	serine threonine protein kinase with wd40 repeats	XP_002274841	2,07E-11	77	F:kinase activity		IPR001680; IPR011046; IPR015943; IPR017986; IPR019781; IPR019782; PTHR19857 (PANTHER), PTHR19857:SF2 (PANTHER) no IPS match
154D4I-NI	gtpase 8	ACU20932	4,40E-25	88	P:protein transport; C:plasma membrane; F:GTP binding; P:small GTPase mediated signal transduction		no IPS match
155D4I-NI	conserved hypothetical protein	XP_002525604	5,47E-12	48	No GO term found		no IPS match
156D4I-NI	protein	ACU16690	3,55E-27	96	C:ribosome; P:protein modification process; F:structural constituent of ribosome; P:translation; P:ribosome biogenesis	EC:3.6.5.3	no IPS match
161D4I-NI	lipase-like protein	XP_002510125	1,92E-25	93	No GO term found		IPR006873
162D4I-NI	elongation factor 2	NP_001154611	1,14E-17	93	F:translation elongation factor activity; F:GTP binding; F:GTPase activity; C:ribosome; P:regulation of translational elongation	EC:3.6.5.1; EC:3.6.5.2; EC:3.6.5.3; EC:3.6.5.4	SignalP (SIGNALP)
163D4I-NI	lysine histidine transporter	XP_002265308	3,58E-100	90	C:integral to membrane; P:amino acid import; F:acidic amino acid transmembrane transporter activity; F:neutral amino acid transmembrane transporter activity; P:acidic amino acid transport; P:neutral amino acid transport		SignalP (SIGNALP)
164D4I-NI	unnamed protein product [Vitis vinifera]	XP_002274196	2,25E-13	94	C:membrane		SignalP (SIGNALP)

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
165D4I-NI	xylem serine proteinase 1	CAA67429	1,20E-41	89	F:identical protein binding; C:plant-type cell wall; F:serine-type endopeptidase activity; P:mucilage metabolic process during seed coat development; P:mucilage extrusion from seed coat; P:proteolysis; P:negative regulation of catalytic activity; C:apoplast	EC:3.4.21.0	no IPS match
166D4I-NI	chch domain containing expressed	XP_002269289	2,19E-13	94	C:chloroplast		SignalP (SIGNALP)
168D4I-NI	<u>TC53305</u>	XP_002285591	7,94E-86	90	C:eukaryotic translation initiation factor 3 complex; P:translational initiation; F:nucleic acid binding; F:nucleotide binding; C:cytoplasm; P:translation; F:RNA binding; F:protein binding; F:translation initiation factor activity		IPR011400; IPR013979; SSF82171 (SUPERFAMILY)
170D4I-NI	<u>TC53370</u>	ABK93321	7,10E-12	94	F:molecular_function; P:biological_process		no IPS match
173D4I-NI	kinase-like protein	CBI37450	2,47E-28	88	P:protein amino acid phosphorylation; F:ATP binding; F:protein serine/threonine kinase activity; P:serine family amino acid metabolic process	EC:2.7.11.0	no IPS match
175D4I-NI	transcriptional corepressor leunig	CAF18245	9,46E-20	94	F:protein binding		no IPS match
177D4I-NI	SF16 protein	CAA52782	8,54E-93	100	P:biological_process; F:calmodulin binding		no IPS match
179D4I-NI	plasma membrane H ⁺ -ATPase	BAC77531	4,29E-05	65	F:hydrolase activity; F:ATP binding; F:metal ion binding; C:integral to membrane; C:membrane; P:proton transport; P:ATP biosynthetic process; P:metabolic process; F:catalytic activity; F:nucleotide binding; F:ATPase activity; F:hydrogen ion transmembrane transporter activity; F:hydrogen-exporting ATPase activity, phosphorylative mechanism; F:hydrolase activity, acting on acid anhydrides, catalyzing transmembrane movement of substances; P:cation transport; P:ion transport; P:transport; F:ATPase activity, coupled to transmembrane movement of ions, phosphorylative mechanism; F:magnesium ion binding; C:plasma membrane		SignalP (SIGNALP)

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
186D4I-NI	salicylic acid-binding protein 2	AAR87711	3,25E-12	70	F:hydrolase activity		SignalP (SIGNALP)
189D4I-NI	eukaryotic translation initiation factor 5a- expressed	EEE59965	5,97E-19	97	F:translation initiation factor activity; C:mitochondrion; C:ribosome; P:regulation of translational initiation; F:RNA binding; F:translation elongation factor activity; P:translational frameshifting; P:peptidyl-lysine modification to hypusine; F:ribosome binding; P:positive regulation of translational elongation; P:positive regulation of translational termination		IPR001884; IPR012340; IPR016027; IPR020189; PTHR11673:SF2 (PANTHER)
190D4I-NI	ras-related protein raba1b	XP_002281955	3,54E-35	79	F:GTP binding; C:plasma membrane; P:intracellular protein transport		no IPS match
192D4I-NI	acyl-activating enzyme	XP_002285701	5,59E-17	87	C:peroxisome; P:auxin metabolic process; F:ligase activity		SignalP (SIGNALP)
195D4I-NI	<u>TC52816</u>	XP_002319189	1,25E-41	77	P:photoperiodism; C:cell wall; P:hydrogen peroxide catabolic process; C:peroxisome; C:mitochondrion; P:cell death; P:response to cold; P:cell redox homeostasis; F:catalase activity; C:chloroplast envelope; C:plant-type vacuole membrane; F:cationic amino acid transmembrane transporter activity; C:chloroplast stroma; P:cellular response to sulfate starvation; P:cellular response to nitrogen starvation; P:response to cadmium ion; C:cytosolic ribosome; P:cellular response to phosphate starvation; C:plasma membrane; C:apoplast; P:tryptophan metabolic process; P:peroxidase reaction; P:methane metabolic process; P:cation transport; P:amino acid transport; P:polyamine transport	EC:1.11.1.6	no IPS match
196D4I-NI	ribosomal protein s23	ACN79509	2,98E-42	97	F:structural constituent of ribosome; C:small ribosomal subunit; P:translation; P:ribosome biogenesis	EC:3.6.5.3	no IPS match
197D4I-NI	unnamed protein product	XP_002285711	6,68E-26	88	P:biological_process		no IPS match

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
199D4I-NI	jacalin lectin family protein	NP_849691	1,06E-07	53	F:glucose binding; F:mannose binding; P:agglutination involved in conjugation		no IPS match
200D4I-NI	atp binding protein	XP_002271765	1,16E-43	77	F:microtubule motor activity; C:microtubule associated complex; C:microtubule; P:trichome morphogenesis; C:Golgi stack; F:ATP binding; P:microtubule-based movement		no IPS match
201D4I-NI	cytochrome p450	XP_002531093	4,33E-39	86	No GO term found		no IPS match
206D4I-NI	dna double-strand break repair rad50	XP_002273488	9,56E-09	53	F:methyltransferase activity; F:transferase activity; F:signal transducer activity; P:chemotaxis; C:membrane; P:signal transduction		SignalP (SIGNALP)
207D4I-NI	hypothetical protein	XP_002265235	5,91E-44	74	No GO term found		no IPS match
208D4I-NI	homeobox protein	BAA05624	5,77E-06	58	No GO term found		no IPS match
209D4I-NI	hypothetical protein	XP_002517420	1,58E-05	75	No GO term found		SignalP (SIGNALP)
210D4I-NI	hypothetical protein	NP_180777	1,84E-07	75	C:plastid chromosome		no IPS match
211D4I-NI	unknown	ABK95718	3,69E-32	85	C:chloroplast inner membrane		no IPS match
212D4I-NI	proteasome subunit	ACU14087	2,79E-16	96	C:proteasome core complex; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; P:ubiquitin-dependent protein catabolic process; C:nucleus; C:cytosol; F:threonine-type endopeptidase activity	EC:3.4.25.0	SignalP (SIGNALP)
213D4I-NI	60s ribosomal protein l10a	XP_002282641	1,95E-91	97	P:translation; P:adaxial/abaxial pattern formation; F:RNA binding; P:RNA processing; P:post-embryonic organ development; C:nucleolus; F:structural constituent of ribosome; C:cytosolic large ribosomal subunit; C:plasma membrane; P:ribosome biogenesis	EC:3.6.5.3	SignalP (SIGNALP)
216D4I-NI	conserved hypothetical protein	XP_002519688	2,60E-41	78	P:biological_process		no IPS match
220D4I-NI	21 kda protein	XP_002322406	4,46E-14	84	F:pectinesterase activity; C:endomembrane system; P:shade avoidance; F:enzyme inhibitor activity; P:starch metabolic process; P:sucrose metabolic process	EC:3.1.1.11	IPR006501

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
222D4I-NI	ethylene responsive element binding factor	XP_002275892	7,71E-06	60	No GO term found		no IPS match
222D4I-NI	ethylene responsive element binding factor	XP_002275892	8,61E-25	66	P:regulation of transcription, DNA-dependent; F:transcription repressor activity; F:DNA binding; F:protein binding; P:ethylene mediated signaling pathway		IPR001471; IPR016177
224D4I-NI	unknown	AAM63025	1,38E-15	76	C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; C:plasma membrane		no IPS match
225D4I-NI	hypothetical protein isoform 1	<u>XP_002263342.1</u>	1,00E-04	72	P:embryonic development ending in seed dormancy; C:microtubule; P:xylem and phloem pattern formation; F:motor activity; F:protein binding; C:chloroplast thylakoid membrane; P:trichome branching; F:GTPase activity; P:cell plate formation involved in plant-type cell wall biogenesis; F:GTP binding; C:plasma membrane	EC:3.6.5.1; EC:3.6.5.2; EC:3.6.5.3; EC:3.6.5.4	no IPS match
228D4I-NI	No Similarity	XP_002276108	1,88E-04	60	No GO term found		no IPS match
229D4I-NI	<u>TC44933</u>	ADB64456	1,21E-55	94	P:DNA endoreduplication; P:protein deubiquitination; P:trichome branching; F:ubiquitin-protein ligase activity; P:protein ubiquitination; C:intracellular	EC:6.3.2.19	IPR000569; PTHR11254 (PANTHER), PTHR11254:SF73 (PANTHER), SignalP (SIGNALP)
230D4I-NI	formate mitochondrial precursor	XP_002517338	3,37E-60	94	P:oxidation reduction; C:mitochondrion; F:NAD or NADH binding; F:oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor; F:formate dehydrogenase activity; C:formate dehydrogenase complex; P:formate metabolic process; P:methane metabolic process; P:glyoxylate metabolic process	EC:1.1.1.0; EC:1.2.1.2	no IPS match
231D4I-NI	elongation factor 1-alpha	ABV26710	6,93E-34	100	F:translation elongation factor activity; F:GTP binding; F:GTPase activity; C:ribosome; P:regulation of translational elongation	EC:3.6.5.1; EC:3.6.5.2; EC:3.6.5.3; EC:3.6.5.4	no IPS match

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
235D4I-NI	hypothetical protein	CAN68209	3,55E-12	59	No GO term found		no IPS match
239D4I-NI	alpha- β -glucan-protein synthase	ABG76000	9,92E-67	92	C:plant-type cell wall; P:cell wall organization; C:Golgi apparatus; C:cell junction; P:cellulose biosynthetic process; C:extracellular region; F:transferase activity, transferring hexosyl groups	EC:2.4.1.0	SignalP (SIGNALP)
239D4I-NI	seed specific protein bn15d1b	ACK38177	8,13E-08	66	C:mitochondrion; P:biological_process		no IPS match
249D4I-NI	mip pip subfamily	ABB88840	6,02E-27	96	C:integral to membrane; F:water channel activity; P:water transport		SignalP (SIGNALP)
250D4I-NI	adp-ribosylation factor 3	ACU22796	1,94E-55	70	P:transport; P:auxin metabolic process; P:regulation of transcription, DNA-dependent; P:vegetative phase change; C:Golgi stack; P:response to auxin stimulus; P:abaxial cell fate specification; F:protein binding; F:transcription factor activity; C:plasma membrane; C:transcription factor complex		no IPS match
251D4I-NI	GL23790 [Drosophila persimilis]	AAM77681	3,54E-11	71	P:proteolysis; F:metallopeptidase activity; F:zinc ion binding		SignalP (SIGNALP)
256D4I-NI	ubiquitin	ADC29516	2,24E-21	96	No GO term found		no IPS match
258D4I-NI	phd-finger protein	ACJ84468	2,84E-53	81	F:DNA binding; F:methylated histone residue binding; C:nucleus; F:zinc ion binding; P:regulation of transcription, DNA-dependent		no IPS match
260D4I-NI	<u>DY929466</u>	AAC32421	1,85E-12	51	C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle		no IPS match
262D4I-NI	xyloglucan galactosyltransferase katamari expressed	ACY08857	2,56E-40	97	C:mitochondrion; C:integral to Golgi membrane; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; P:salicylic acid mediated signaling pathway; P:unidimensional cell growth; P:xyloglucan biosynthetic process; P:endomembrane organization; F:transferase activity, transferring glycosyl groups; P:fructose biosynthetic process		no IPS match

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
271D4I-NI	actin 1	AAP73457	0	100	C:cytoskeleton; C:cytoplasm; F:ATP binding; F:protein binding		IPR004000; IPR004001; IPR020902; G3DSA:3.30.420.4 0 (GENE3D), G3DSA:3.90.640.1 0 (GENE3D), SSF53067 (SUPERFAMILY)
276D4I-NI	quinone oxidoreductase	XP_002279359	4,38E-22	91	P:oxidation reduction; F:oxidoreductase activity; F:zinc ion binding; C:plasma membrane; P:response to oxidative stress		IPR002085; IPR011032; PTHR11695:SF5 (PANTHER) no IPS match
277D4I-NI	stress-induced protein sti1-like protein	BAH19733	4,43E-14	97	P:response to high light intensity; P:response to hydrogen peroxide; F:binding; C:plasma membrane; P:response to heat		no IPS match
279D4I-NI	zinc finger	XP_002510573	6,41E-21	69	P:lipid metabolic process; F:lipase activity; F:hydrolase activity, acting on ester bonds		no IPS match
286D4I-NI	<u>TC46722</u>	ACU18529	2,81E-113	74	P:nucleotide-excision repair; P:response to cold; C:nucleus; F:damaged DNA binding; P:proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process		IPR000449; IPR000626; IPR004806; IPR006636; IPR009060; IPR014761; IPR015360; IPR015940; IPR019955; G3DSA:1.10.8.10 (GENE3D), G3DSA:3.10.20.90 (GENE3D), PTHR10621 (PANTHER), SSF54236 (SUPERFAMILY)

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
287D4I-NI	mip pip subfamily	ACB38232	3,42E-22	98	P:transport; C:integral to membrane; F:transporter activity		no IPS match
296D4I-NI	inositol phosphatase-like protein	ACU18621	1,42E-27	86	C:plastid outer membrane; P:G-protein coupled receptor protein signaling pathway; P:protein import into chloroplast thylakoid membrane; P:sugar mediated signaling; P:thylakoid membrane organization; F:protein binding; C:chloroplast thylakoid membrane; C:chloroplast stroma; P:photosystem II assembly; P:protein import into chloroplast stroma; C:plastid inner membrane; C:stromule		no IPS match
300D4I-NI	14-3-3 protein	XP_002316863	1,71E-29	92	F:protein domain specific binding		SignalP (SIGNALP)
302D4I-NI	protein binding	XP_002527435	8,15E-16	90	F:protein binding; P:response to light stimulus; F:signal transducer activity; P:signal transduction		SignalP (SIGNALP)
308D4I-NI	chloroplast chlorophyll a b binding protein	ABX71549	2,50E-33	100	P:photosynthesis, light harvesting; C:photosystem II; F:magnesium ion binding; P:protein-chromophore linkage; F:chlorophyll binding; C:integral to membrane; C:chloroplast; C:thylakoid; C:photosystem I		no IPS match
314D4I-NI	stem 28 kda glycoprotein precursor	XP_002299744	8,37E-11	85	F:acid phosphatase activity		no IPS match
318D4I-NI	coated vesicle membrane	XP_002265343	8,25E-24	93	C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; F:protein transmembrane transporter activity; P:intracellular protein transport; C:integral to membrane		SignalP (SIGNALP)
321D4I-NI	ubiquitin carboxyl-terminal	CBI21158	1,97E-12	74	No GO term found		no IPS match
322D4I-NI	leaf senescence related	CBI38035	1,32E-21	73	C:cell part		no IPS match
323D4I-NI	unknown protein	EEE53986	1,87E-04	74	C:membrane		IPR005016; PTHR10383:SF2 (PANTHER), SignalP (SIGNALP)

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
324D4I-NI	transcription factor	AAO22982	3,87E-89	91	F:identical protein binding; F:sequence-specific DNA binding; F:transcription factor activity; P:regulation of transcription, DNA-dependent; C:transcription factor complex		IPR002100; IPR002487; PTHR11945 (PANTHER), PTHR11945:SF19 (PANTHER)
326D4I-NI	electron transporter heat shock protein binding protein	XP_002281976	1,79E-15	84	F:protein binding; C:chloroplast		no IPS match
328D4I-NI	cationic amino acid transporter	XP_002321859	1,17E-123	85	P:L-arginine import; F:cationic amino acid transmembrane transporter activity; F:L-lysine transmembrane transporter activity; F:arginine transmembrane transporter activity; C:membrane; P:L-glutamate import; F:L-glutamate transmembrane transporter activity; P:cation transport; P:polyamine transport; P:lysine transport		no IPS match
330D4I-NI	unknown	ACJ83912	8,71E-18	97	C:mitochondrion		no IPS match
331D4I-NI	endoribonuclease protein kinase ire1-like protein	XP_002275036	2,97E-10	66	F:kinase activity; P:activation of signaling protein activity involved in unfolded protein response; F:endoribonuclease activity; C:extrinsic to endoplasmic reticulum membrane		no IPS match
332D4I-NI	glucose-6-phosphate dehydrogenase	XP_002323796	1,23E-69	98	F:binding; F:glucose-6-phosphate dehydrogenase activity; P:oxidation reduction; C:cytosol; P:pentose-phosphate shunt, oxidative branch; P:glutathione metabolic process	EC:1.1.1.49	no IPS match
334D4I-NI	protein-s isoprenylcysteine o-methyltransferase	XP_002534313	3,93E-57	77	F:carboxyl-O-methyltransferase activity; C:integral to membrane; P:negative regulation of abscisic acid mediated signaling; P:C-terminal protein amino acid methylation; P:flower development; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; F:protein-S-isoprenylcysteine O-methyltransferase activity; P:shoot development; C:endoplasmic reticulum	EC:2.1.1.100	no IPS match

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
335D4I-NI	cytochrome oxidase subunit ii	AAT94317	3,64E-48	93	C:mitochondrial inner membrane; F:copper ion binding; F:electron carrier activity; F:heme binding; C:integral to membrane; F:cytochrome-c oxidase activity; P:electron transport; P:mitochondrial electron transport, cytochrome c to oxygen; P:proton transport; C:respiratory chain complex IV	EC:1.9.3.1	no IPS match
336D4I-NI	No Similarity	ABK60177	3,63E-09	78	No GO term found		no IPS match
338D4I-NI	expansin	AAF35901	5,96E-98	97	C:extracellular region; P:plant-type cell wall organization; C:membrane		SignalP (SIGNALP)
341D4I-NI	calcium-dependent protein kinase	CAG27839	5,20E-39	89	P:protein amino acid phosphorylation; F:calmodulin-dependent protein kinase activity; P:serine family amino acid metabolic process	EC:2.7.11.17	no IPS match
343D4I-NI	transport protein	ACU19295	1,57E-19	100	F:P-P-bond-hydrolysis-driven protein transmembrane transporter activity; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; C:membrane; P:protein transport; C:chloroplast envelope		SignalP (SIGNALP)
344D4I-NI	plastoglobules associated protein	XP_002524410	7,72E-27	70	C:chloroplast thylakoid membrane; P:response to stress		no IPS match
345D4I-NI	60s ribosomal protein	XP_002523090	1,06E-39	95	C:ribosome; F:structural constituent of ribosome; P:translation; P:ribosome biogenesis	EC:3.6.5.3	no IPS match
347D4I-NI	<u>TC50192</u>	CBI39753	6,65E-22	81	No GO term found		no IPS match
348D4I-NI	unnamed protein product	CBI40569	1,20E-11	68	No GO term found		IPRO17986; IPRO19782; PTHR13950 (PANTHER), PTHR13950:SF2 (PANTHER)
349D4I-NI	2-nitropropane dioxygenase-like protein	NP_851263	4,54E-19	92	P:metabolic process; P:response to symbiotic fungus; P:response to cadmium ion; F:catalytic activity		no IPS match
350D4I-NI	cytosolic ribosomal protein s11	XP_002267523	9,50E-41	98	F:structural constituent of ribosome; C:cell wall; P:embryonic development ending in seed dormancy; C:cytosolic small ribosomal subunit; C:membrane; P:translation; P:ribosome biogenesis	EC:3.6.5.3	no IPS match

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
351D4I-NI	membrane protein	XP_002321905	1,86E-63	89	C:integral to membrane		SignalP (SIGNALP)
354D4I-NI	cysteine proteinase	Q10992	1,49E-39	100	F:cysteine-type endopeptidase inhibitor activity		SignalP (SIGNALP)
355D4I-NI	60s ribosomal protein l22-2	XP_002321004	1,53E-22	96	C:nucleolus; F:structural constituent of ribosome; C:plasma membrane; C:cytosolic large ribosomal subunit; P:translation; P:ribosome biogenesis	EC:3.6.5.3	no IPS match
356D4I-NI	<u>GE508451</u>	EEC72678	2,50E-27	83	F:fumarylacetoacetase activity; P:tyrosine metabolic process; P:styrene catabolic process	EC:3.7.1.2	no IPS match
357D4I-NI	rglg2 (ring domain ligase2) ubiquitin-protein ligase	XP_002511290	8,31E-21	90	P:cytokinin metabolic process; F:ubiquitin-protein ligase activity; P:auxin metabolic process; F:zinc ion binding; C:plasma membrane; P:protein ubiquitination; F:protein binding	EC:6.3.2.19	IPR001841; PTHR10857 (PANTHER), SSF57850 (SUPERFAMILY) SignalP (SIGNALP)
358D4I-NI	metal-transporting p-type atpase	ACU18111	4,34E-09	87	F:peptidase activity; P:ubiquitin-dependent protein catabolic process; P:photosynthetic electron transport chain; C:chloroplast envelope; F:ATPase activity, coupled to transmembrane movement of ions, phosphorylative mechanism; C:proteasome core complex; F:copper ion transmembrane transporter activity; C:plasma membrane; P:copper ion transport		
360D4I-NI	<u>TC47158</u>	XP_002276563	7,88E-140	83	P:multidimensional cell growth; P:root epidermal cell differentiation; P:chitin catabolic process; P:response to water deprivation; P:response to salt stress; P:response to cytokinin stimulus; P:response to heat; P:lignin biosynthetic process; P:cell wall macromolecule catabolic process; F:chitinase activity; P:regulation of salicylic acid metabolic process	EC:3.2.1.14	no IPS match
362D4I-NI	proteasome subunit alpha type 3	ABK22658	1,76E-55	96	C:proteasome core complex; P:ubiquitin-dependent protein catabolic process; C:nucleus; C:cytosol; F:threonine-type endopeptidase activity	EC:3.4.25.0	IPR010916
363D4I-NI	atp binding	XP_002324102	6,96E-15	89	F:DNA binding; C:plastid		no IPS match

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
364D4I-NI	3-hydroxyisobutyryl-coenzyme a hydrolase	XP_002332092	1,10E-104	70	F:3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase activity; P:xanthophyll biosynthetic process; P:response to auxin stimulus; P:fatty acid beta-oxidation; P:valine catabolic process; F:carotene beta-ring hydroxylase activity; P:carotene metabolic process; P:isoleucine catabolic process; P:leucine catabolic process; P:beta-alanine metabolic process	EC:3.1.2.4	no IPS match
365D4I-NI	aspartic proteinase	ABI78942	3,45E-30	88	P:lipid metabolic process; C:vacuole; F:aspartic-type endopeptidase activity; P:proteolysis; P:response to salt stress	EC:3.4.23.0	SignalP (SIGNALP)
366D4I-NI	probable serine threonine-protein kinase wnk4	CBI40585	1,54E-43	90	F:protein kinase activity; P:protein amino acid autophosphorylation		no IPS match
367D4I-NI	dehydrin [Helianthus annuus]	CAA63341	1,25E-08	100	No GO term found		no IPS match
368D4I-NI	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7	XP_002305792	4,83E-74	95	F:translation initiation factor activity; C:chloroplast; C:ribosome; P:regulation of translational initiation		IPR007783
371D4I-NI	sac3 ganp family protein	EFJ24018	3,92E-09	94	No GO term found		
373D4I-NI	TC47997	XP_002272757	1,73E-39	80	C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle		no IPS match
374D4I-NI	carboxylic ester	XP_002528712	1,62E-32	77	F:lipase activity; P:lipid catabolic process		no IPS match
376D4I-NI	light-inducible protein atls1	ACU13203	8,63E-42	93	P:response to other organism; P:inflammatory response; C:chloroplast		no IPS match
381D4I-NI	conserved hypothetical protein	XP_002532943	3,23E-12	92	F:molecular_function; P:biological_process		no IPS match
383D4I-NI	nadh-ubiquinone oxidoreductase subunit	XP_002265849	6,83E-31	96	C:respiratory chain complex I; P:photorespiration; P:embryonic development ending in seed dormancy; C:plastid; C:mitochondrial membrane		SignalP (SIGNALP)

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
384D4I-NI	delta-12 oleate desaturase	EEE67046	4,80E-16	80	P:oxidation reduction; P:lipid metabolic process; C:membrane; F:phosphatidylcholine desaturase activity	EC:1.3.1.35	no IPS match
385D4I-NI	hypothetical protein	XP_002278197	1,52E-70	82	C:vacuole; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; C:plasma membrane; F:sugar:hydrogen symporter activity; C:chloroplast; P:carbohydrate transport		no IPS match
386D4I-NI	fimbrin protein	XP_002515869	8,71E-37	87	C:vacuole; F:actin binding		no IPS match
387D4I-NI	non-canonical ubiquitin conjugating thioredoxin y	XP_002519212	4,09E-31	96	P:ubiquitin-dependent protein catabolic process; F:ubiquitin-protein ligase activity; P:regulation of protein metabolic process; P:protein ubiquitination	EC:6.3.2.19	no IPS match
388D4I-NI	thioredoxin y	XP_002266350	7,10E-28	86	F:electron carrier activity; P:cell redox homeostasis; P:glycerol ether metabolic process; C:chloroplast stroma; F:protein disulfide oxidoreductase activity; P:electron transport		SignalP (SIGNALP)
389D4I-NI	blight-associated protein p12 precursor	BAD22243	1,73E-05	75	C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle		no IPS match
390D4I-NI	alpha-glucan branching enzyme	CBI26672	9,64E-25	65	F:hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds; P:carbohydrate metabolic process	EC:3.2.1.0	SignalP (SIGNALP)
396D4I-NI	<u>DY925286</u>	XP_002516872	6,05E-25	64	F:molecular_function; P:biological_process		no IPS match
397D4I-NI	<u>TC51774</u>	XP_002520788	1,79E-21	100	C:ribosome; F:structural constituent of ribosome; P:translation	EC:3.6.5.3	no IPS match
402D4I-NI	protein	XP_002267135	1,33E-18	79	No GO term found		no IPS match
403D4I-NI	cellulose synthase a catalytic subunit 6	AAQ63935	9,70E-21	75	F:binding; F:transferase activity, transferring glycosyl groups; C:membrane		SignalP (SIGNALP)
404D4I-NI	lipid transfer protein precursor	ABK96812	4,00E-10	96	P:defense response to fungus; P:lipid transport; P:defense response to Gram-positive bacterium; P:xenobiotic metabolic process; F:lipid binding; F:transporter activity		SignalP (SIGNALP)

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
405D4I-NI	leucine zipper-ef-hand containing transmembrane	XP_002309727	3,30E-17	76	C:mitochondrion		SignalP (SIGNALP)
407D4I-NI	heat shock	AAV97978	4,73E-64	98	P:protein amino acid phosphorylation; F:ATP binding; F:protein serine/threonine kinase activity; P:serine family amino acid metabolic process	EC:2.7.11.0	no IPS match
408D4I-NI	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	CBI18564	1,13E-33	89	No GO term found		SignalP (SIGNALP)
410D4I-NI	protein disulfide isomerase	BAI67717	1,59E-60	87	P:cell redox homeostasis; C:endoplasmic reticulum; F:protein disulfide isomerase activity; C:endoplasmic reticulum lumen	EC:5.3.4.1	no IPS match
413D4I-NI	phosphate/phosphoenolpyruvate translocator precursor	AAB40648	2,22E-05	65	F:triose-phosphate transmembrane transporter activity; P:triose phosphate transport; C:plastid inner membrane; C:integral to membrane; C:chloroplast; F:antiporter activity; C:mitochondrion		no IPS match
418D4I-NI	proteasome subunit alpha type 1	ACJ84423	8,39E-37	96	C:proteasome core complex; P:ubiquitin-dependent protein catabolic process; C:cytosol; F:threonine-type endopeptidase activity	EC:3.4.25.0	SignalP (SIGNALP)
419D4I-NI	TC40719	XP_002332475	7,50E-54	65	C:plastid envelope; P:response to osmotic stress; P:plastid organization; C:membrane; F:ion channel activity; P:ion transport		no IPS match
420D4I-NI	ribosomal protein s16	CAJ17204	2,16E-24	100	C:ribosome; F:structural constituent of ribosome; P:translation; P:ribosome biogenesis	EC:3.6.5.3	no IPS match
421D4I-NI	predicted protein	XP_002311311	2,03E-14	87	C:membrane		no IPS match
424D4I-NI	membrane protein 8	CBI15732	8,58E-05	65	No GO term found		no IPS match
425D4I-NI	unknown	ACJ85352	1,41E-60	86	P:metabolic process; C:mitochondrion; F:catalytic activity		no IPS match

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
427D4I-NI	hyuc-like protein	NP_193740	1,79E-15	89	C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; F:protein dimerization activity; P:ureide catabolic process; F:allantoate deiminase activity; P:proteolysis; F:metallopeptidase activity; P:purine base metabolic process	EC:3.5.3.9	SignalP (SIGNALP)
428D4I-NI	predicted protein	XP_002301816	3,90E-10	54	P:lipid metabolic process; C:mitochondrion		no IPS match
429D4I-NI	predicted protein	XP_002311071	2,12E-101	90	F:serine-type carboxypeptidase activity; C:vacuole; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; P:proteolysis	EC:3.4.16.0	no IPS match
431D4I-NI	dna-binding -like	XP_002266305	2,55E-12	93	F:nucleic acid binding		SignalP (SIGNALP)
434D4I-NI	protein	CBI15579	2,15E-53	91	P:cell redox homeostasis; F:electron carrier activity; C:mitochondrion; F:protein disulfide oxidoreductase activity; P:electron transport		IPR004046; IPR010987; PTHR12782 (PANTHER) SignalP (SIGNALP)
436D4I-NI	cytochrome c oxidase subunit iii	NP_075453	2,46E-44	85	P:mitochondrial electron transport, cytochrome c to oxygen; C:integral to membrane; C:mitochondrion; F:cytochrome-c oxidase activity; P:proton transport; C:respiratory chain complex IV	EC:1.9.3.1	SignalP (SIGNALP)
437D4I-NI	transcription factor	XP_002280253	7,22E-41	84	P:regulation of transcription; F:transcription factor activity; C:transcription factor complex		no IPS match
438D4I-NI	2-oxoglutarate e1 subunit	XP_002279332	1,17E-06	90	C:mitochondrion		no IPS match
440D4I-NI	chlorophyll a b-binding apoprotein cp26 precursor	ACX71300	3,39E-57	67	C:chloroplast stromal thylakoid; C:plastoglobule; P:nonphotochemical quenching; C:PSII associated light-harvesting complex II; P:photosynthesis; C:mitochondrion; C:photosystem II antenna complex		no IPS match
441D4I-NI	protein kinase conserved	XP_002312329	3,57E-62	65	F:protein serine/threonine/tyrosine kinase activity		no IPS match
443D4I-NI	hypothetical protein [Ricinus communis]	XP_002283091	8,05E-22	81	No GO term found		no IPS match
444D4I-NI	rho gtpase	XP_002328831	2,47E-41	84	C:intracellular; P:signal transduction		no IPS match

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
446D4I-NI	predicted protein [Populus trichocarpa]	AAW56451	7,41E-65	93	C:plant-type cell wall; C:Golgi apparatus		no IPS match
447D4I-NI	lim-domain protein	AAF75284	1,30E-61	99	F:zinc ion binding		SignalP (SIGNALP)
450D4I-NI	selenoprotein precursor	CBI24673	7,19E-41	93	C:endomembrane system; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle		SignalP (SIGNALP)
451D4I-NI	60s acidic ribosomal protein p2	ACK77644	3,06E-23	84	F:structural constituent of ribosome; C:cytosolic large ribosomal subunit; P:translational elongation; P:ribosome biogenesis		no IPS match
454D4I-NI	60s ribosomal protein l24	XP_002881455	2,19E-15	97	P:gynoecium development; P:translation; F:structural constituent of ribosome; P:ribosome biogenesis; P:auxin mediated signaling pathway; C:cytosolic large ribosomal subunit; C:plasma membrane	EC:3.6.5.3	
454D4I-NI	60s ribosomal protein l24	ABE80118	1,37E-56	98	P:gynoecium development; P:translation; F:structural constituent of ribosome; P:ribosome biogenesis; P:auxin mediated signaling pathway; C:cytosolic large ribosomal subunit; C:plasma membrane	EC:3.6.5.3	no IPS match
456D4I-NI	chaperonin containing t-complex protein beta	XP_002285912	1,94E-28	97	C:cytoplasm; P:protein folding; C:anchored to plasma membrane; C:cell wall; F:ATP binding; F:unfolded protein binding		IPR002423; IPR012716; G3DSA:1.10.560.10 (GENE3D), SSF54849 (SUPERFAMILY)
457D4I-NI	pr17c precursor	XP_002269365	7,40E-31	72	No GO term found		no IPS match
458D4I-NI	larval serum protein 1 beta chain	XP_001994261	1,32E-05	82	F:oxygen transporter activity; P:transport		SignalP (SIGNALP)
459D4I-NI	slt1 protein	XP_002263786	2,05E-31	91	F:metallocarboxypeptidase activity; P:hyperosmotic salinity response	EC:3.4.17.0	no IPS match
460D4I-NI	gata transcription	XP_002515981	7,06E-12	73	F:metal ion binding; F:DNA binding		SignalP (SIGNALP)
462D4I-NI	ubiquitinating enzyme	XP_002309194	7,47E-54	99	P:ubiquitin-dependent protein catabolic process; F:ubiquitin-protein ligase activity; P:regulation of protein metabolic process; P:protein ubiquitination	EC:6.3.2.19	no IPS match

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
463D4I-NI	nadph- protochlorophyllide oxidoreductase	BAB93004	2,63E-81	96	F:binding; F:protochlorophyllide reductase activity; P:oxidation reduction; P:chlorophyll biosynthetic process; C:chloroplast; P:photosynthesis, dark reaction	EC:1.3.1.33	SignalP (SIGNALP)
466D4I-NI	<u>CX943603</u>	ACU16777	3,19E-22	75	C:mitochondrion		no IPS match
472D4I-NI	gras family transcription factor	ABE02823	4,03E-39	80	C:cytosol; P:response to xenobiotic stimulus; F:transcription factor activity; P:positive regulation of gene-specific transcription; C:transcription factor complex		no IPS match
477D4I-NI	pyruvate dehydrogenase e1 component subunit beta	ACF17670	1,49E-98	97	C:chloroplast envelope; F:transketolase activity; P:pentose-phosphate shunt; P:carbon utilization	EC:2.2.1.1	no IPS match
479D4I-NI	gtp-binding protein alpha	XP_002310767	1,34E-33	85	P:response to sucrose stimulus; F:signal transducer activity; P:response to mannitol stimulus; P:response to abscisic acid stimulus; P:G-protein coupled receptor protein signaling pathway; P:response to glucose stimulus; P:response to fructose stimulus; C:nucleus; F:guanyl nucleotide binding		IPR001019; PTHR10218:SF90 (PANTHER)
484D4I-NI	ralf precursor	CBI26076	8,14E-16	91	C:apoplast; P:cell-cell signaling; C:plant-type cell wall; F:signal transducer activity; P:signal transduction		IPR008801
487D4I-NI	defensin amp1 protein	AAM27914	2,47E-12	69	P:defense response; F:molecular_function; C:cell wall; P:cell wall organization; C:extracellular region		no IPS match
490D4I-NI	protein kinase chloroplast	XP_002304131	1,29E-05	71	No GO term found		no IPS match
494D4I-NI	prt1 protein	ABK94910	3,51E-13	79	P:ubiquitin-dependent protein catabolic process; F:ubiquitin-protein ligase activity; C:ubiquitin ligase complex; P:protein ubiquitination	EC:6.3.2.19	no IPS match
495D4I-NI	<u>TC45642</u>	CAN83835	5,21E-45	65	No GO term found		no IPS match
496D4I-NI	60s ribosomal protein l34	XP_002522429	3,31E-47	98	C:nucleolus; F:structural constituent of ribosome; P:ribosome biogenesis; C:cytosolic large ribosomal subunit; C:chloroplast; C:membrane; P:translation	EC:3.6.5.3	no IPS match
504D4I-NI	metallothionein-like protein	ABA27037	6,36E-11	78	F:metal ion binding		SignalP (SIGNALP)

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
505D4I-NI	defensin amp1 protein	AAM27914	2,47E-12	69	P:defense response; F:molecular_function; C:cell wall; P:cell wall organization; C:extracellular region		no IPS match
507D4I-NI	nadp-malic enzyme malate dehydrogenase (oxaloacetate decarboxylating) (nadp+)	P37223	1,85E-30	86	F:metal ion binding; F:NAD or NADH binding; P:response to stress; P:malate metabolic process; P:oxidation reduction; C:plastid; F:malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating) (NADP+) activity; P:pyruvate metabolic process; P:tricarboxylic acid cycle; P:carbon utilization	EC:1.1.1.40	no IPS match
509D4I-NI	delta tonoplast intrinsic protein	CAA65184	5,81E-38	98	C:plant-type cell wall; C:plant-type vacuole membrane; C:plasma membrane; F:ammonia transporter activity; F:methylammonium transmembrane transporter activity; C:integral to membrane; F:water channel activity; C:chloroplast; P:methylammonium transport; P:water transport		no IPS match
510D4I-NI	fructose-bisphosphate aldolase	ABA27085	1,15E-09	100	C:cytoplasm; P:glycolysis; F:fructose-bisphosphate aldolase activity; P:fructose metabolic process; P:mannose metabolic process; P:inositol metabolic process; P:gluconeogenesis; P:pentose-phosphate shunt; P:carbon utilization	EC:4.1.2.13	no IPS match
511D4I-NI	<u>TC57604</u>	XP_002284674	6,00E-68	57	F:molecular_function; P:biological_process		no IPS match
512D4I-NI	26s proteasome regulatory subunit s2	XP_002277029	1,74E-82	92	P:regulation of protein catabolic process; C:proteasome regulatory particle, base subcomplex; F:binding; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; C:plasma membrane; P:ubiquitin-dependent protein catabolic process; P:regulation of cell cycle; F:enzyme regulator activity; C:nucleus		no IPS match
516D4I-NI	<u>TC54020</u>				No GO term found		
517D4I-NI	predicted protein [Populus trichocarpa]	CBI36644	4,45E-14	92	C:plastid		SignalP (SIGNALP)
527D4I-NI	probable serine threonine-protein kinase wnk6	XP_002320210	8,57E-10	66	F:kinase activity; F:protein kinase activity; F:ATP binding; P:protein amino acid phosphorylation; C:cellular_component; F:protein serine/threonine kinase activity		no IPS match

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
537D4I-NI	GDP-L-galactose phosphorylase	ADB85572	5,32E-61	79	P:defense response to bacterium; P:response to jasmonic acid stimulus; F:mannose-1-phosphate guanylyltransferase (GDP) activity; F:GDP-galactose:myoinositol-1-phosphate guanylyltransferase activity; F:galactose-1-phosphate guanylyltransferase (GDP) activity; F:GDP-galactose:glucose-1-phosphate guanylyltransferase activity; F:glucose-1-phosphate guanylyltransferase (GDP) activity; P:L-ascorbic acid biosynthetic process; F:GDP-galactose:mannose-1-phosphate guanylyltransferase activity; P:response to heat; P:fructose metabolic process; P:mannose metabolic process	EC:2.7.7.22	no IPS match
538D4I-NI	probable plasma membrane intrinsic protein 1c	NP_001077441	7,46E-17	100	P:response to water deprivation; C:vacuole; P:water transport; C:plasma membrane; C:integral to membrane; F:water channel activity; C:mitochondrion		SignalP (SIGNALP)
542D4I-NI	hypothetical protein	XP_002285487	7,89E-43	97	C:endomembrane system; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; C:endoplasmic reticulum; F:carbohydrate binding		no IPS match
543D4I-NI	dna-directed rna polymerase ii	AAY85195	2,16E-40	82	F:DNA-directed RNA polymerase activity; F:ribonucleoside binding; F:DNA binding; C:nucleolus; P:purine base metabolic process; P:pyrimidine base metabolic process; P:transcription, DNA-dependent	EC:2.7.7.6	no IPS match
547D4I-NI	protein	XP_002311128	4,46E-38	94	C:chloroplast		no IPS match
548D4I-NI	lipid transfer protein	AAL27855	4,69E-14	80	P:response to stimulus; F:lipid binding; P:lipid transport		IPR000528; IPR013770; IPR016140
549D4I-NI	equilibrative nucleoside transporter ent3	CBI40869	6,04E-06	66	P:pyrimidine nucleoside transport; F:nucleoside transmembrane transporter activity; P:nucleoside transport		SignalP (SIGNALP)
550D4I-NI	beta- insoluble isoenzyme 3	CBI30319	9,46E-20	80	F:hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds; P:carbohydrate metabolic process	EC:3.2.1.0	no IPS match

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
552D4I-NI	lsp1g_drome ame: full=larval serum protein 1 gamma chain ame: full=hexamerin-1-gamma flags: precursor	AAB58985	1,45E-04	78	F:oxygen transporter activity; P:transport		SignalP (SIGNALP)
553D4I-NI	uridine diphosphate glucose epimerase	XP_002283103	9,49E-54	87	P:pollen development; P:galactose biosynthetic process; F:protein dimerization activity; P:response to stress; F:UDP-glucose 4-epimerase activity; F:coenzyme binding; C:cytosol; P:nucleotide metabolic process; P:nucleotide-sugar metabolic process	EC:5.1.3.2	no IPS match
555D4I-NI	60s ribosomal protein l29	XP_002276776	1,57E-06	88	F:structural constituent of ribosome; P:translation; C:cytosolic large ribosomal subunit; P:ribosome biogenesis; C:ribosome; C:nucleolus; C:intracellular		no IPS match
559D4I-NI	unnamed protein product	CBI24430	1,06E-15	91	P:biological_process		no IPS match
560D4I-NI	ca2+ antiporter cation exchanger	XP_002516261	4,19E-44	92	C:cytoplasmic vesicle membrane; C:mitochondrion; F:sodium ion transmembrane transporter activity; F:potassium ion transmembrane transporter activity; F:manganese ion transmembrane transporter activity; F:cation:cation antiporter activity; C:vacuolar membrane; P:cellular cation homeostasis; P:response to cation stress; P:sodium ion transport; P:potassium ion transport; P:manganese ion transport		SignalP (SIGNALP)
564D4I-NI	glutamine-dependent asparagine synthetase	AAF74755	4,15E-36	95	P:response to sucrose stimulus; F:asparagine synthase (glutamine-hydrolyzing) activity; P:response to absence of light; P:cellular response to sucrose starvation; P:response to glucose stimulus; P:cellular amino acid catabolic process; P:response to fructose stimulus; P:alanine metabolic process; P:asparagine biosynthetic process; P:aspartate metabolic process	EC:6.3.5.4	SignalP (SIGNALP)
565D4I-NI	pgps d12	NP_001047231	1,12E-24	64	No GO term found		no IPS match

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
566D4I-NI	calmodulin-domain protein kinase cdpk isoform 5	ABY55551	2,65E-101	95	F:calmodulin-dependent protein kinase activity; P:protein amino acid phosphorylation; P:regulation of anion channel activity; P:abscisic acid mediated signaling; C:plasma membrane; F:calcium ion binding; F:ATP binding; P:regulation of stomatal movement; P:serine family amino acid metabolic process	EC:2.7.11.17	no IPS match
567D4I-NI	ripening-related protein	XP_002318283	4,10E-05	66	F:enzyme inhibitor activity; F:pectinesterase activity		no IPS match
573D4I-NI	hypothetical protein	XP_002515995	4,26E-25	88	C:chloroplast envelope		SignalP (SIGNALP)
575D4I-NI	ankyrin repeat-like protein	XP_002509569	4,51E-14	50	P:biological_process; F:protein binding		no IPS match
581D4I-NI	cysteine proteinase aalp	BAA96501	9,35E-12	92	C:vacuole; F:transcription factor activity; F:cysteine-type endopeptidase activity; F:hydrolase activity; P:aging; F:cysteine-type peptidase activity; F:peptidase activity; P:proteolysis; F:protein binding; C:endomembrane system; P:response to ethylene stimulus; P:regulation of transcription		no IPS match
585D4I-NI	predicted protein [Populus trichocarpa]	XP_002302741	9,37E-11	51	No GO term found		SignalP (SIGNALP)
591D4I-NI	thioredoxin f	ABB77434	1,32E-37	81	P:response to cadmium ion; F:selenium binding; P:cell redox homeostasis		no IPS match
593D4I-NI	alcohol dehydrogenase	XP_002305695	1,51E-95	91	P:oxidation reduction; F:oxidoreductase activity; F:zinc ion binding; C:chloroplast		no IPS match
596D4I-NI	clathrin assembly	XP_002324864	2,04E-61	79	F:phospholipid binding; C:plasma membrane		IPR018271
597D4I-NI	family small gtpase	CBI39638	5,76E-38	100	C:plastid; F:GTP binding; P:small GTPase mediated signal transduction		no IPS match
598D4I-NI	af361576_1 at1g60730 f8a5_24	ABA26995	5,29E-36	86	F:oxidoreductase activity; P:oxidation reduction		IPR001395; PTHR11732:SF12 (PANTHER)

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
599D4I-NI	metal ion binding	XP_002278542	8,48E-23	73	F:metal ion binding; P:metal ion transport		no IPS match
600D4I-NI	amino acid binding	AAK74028	9,42E-20	69	F:amino acid binding; P:metabolic process		no IPS match
606D4I-NI	glucan endo- β -glucosidase	CBI23036	2,27E-10	79	P:defense response; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; F:glucan endo-1,3- β -D-glucosidase activity; F:cation binding; P:starch metabolic process; P:sucrose metabolic process	EC:3.2.1.39	no IPS match
607D4I-NI	asparagine synthetase [Helianthus annuus]	AAF02775	0	99	No GO term found		IPR001962; IPR006426; IPR014729; IPR017932; G3DSA:3.60.20.10 (GENE3D), PTHR11772 (PANTHER), SignalP (SIGNALP), SSF52402 (SUPERFAMILY), SSF56235 (SUPERFAMILY)
615D4I-NI	periplasmic β -glucosidase	BAF43576	1,49E-41	89	C:apoplast; P:carbohydrate metabolic process; F:hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	EC:3.2.1.0	no IPS match
616D4I-NI	predicted protein	XP_002317757	2,02E-14	95	C:mitochondrion; P:embryonic development ending in seed dormancy		SignalP (SIGNALP)
618D4I-NI	rna-binding protein	XP_002264308	4,10E-36	81	F:nucleic acid binding		SignalP (SIGNALP)
622D4I-NI	flavin-binding monooxygenase-like family protein	CBI32269	1,54E-14	68	No GO term found		SignalP (SIGNALP)

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
623D4I-NI	vacuolar type atpase subunit a	P09469	4,83E-64	99	C:cell wall; F:hydrogen ion transporting ATP synthase activity, rotational mechanism; P:response to salt stress; C:plant-type vacuole; P:ATP synthesis coupled proton transport; C:vacuolar membrane; F:ATP binding; P:pollen development; F:proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism; P:Golgi organization; C:chloroplast; C:proton-transporting V-type ATPase, V1 domain; C:plasma membrane; C:proton-transporting ATP synthase complex	EC:3.6.3.14	no IPS match
624D4I-NI	<u>TC51326</u>	ACU17946	3,09E-23	88	C:membrane; P:embryonic development ending in seed dormancy		IPR005016; IPR011009; G3DSA:1.10.510.10 (GENE3D), PTHR10383:SF2 (PANTHER) no IPS match
625D4I-NI	coiled-coil domain-containing	XP_002315962	7,07E-36	92	F:molecular_function; P:biological_process		no IPS match
626D4I-NI	poly -binding protein	AAF66825	9,47E-63	75	F:nucleic acid binding		no IPS match
627D4I-NI	3-ketoacyl- thiolase	AAQ77242	1,34E-112	99	P:glyoxysome organization; C:peroxisome; C:mitochondrion; C:nucleolus; F:acetyl-CoA C-acyltransferase activity; P:jasmonic acid biosynthetic process; P:fatty acid beta-oxidation; C:chloroplast; C:plasma membrane; P:isoleucine catabolic process; P:leucine catabolic process; P:valine catabolic process; P:bile acid biosynthetic process; P:benzoate metabolic process; P:acyl-carrier-protein biosynthetic process	EC:2.3.1.16	no IPS match
628D4I-NI	ac034106_9 a tumor-related protein from nicotiana tabacum gb	CBI35471	2,75E-11	85	C:cell wall; C:apoplast		SignalP (SIGNALP)

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
629D4I-NI	tubulin alpha	ACN40181	4,92E-21	100	P: microtubule-based movement; C: protein complex; F: GTP binding; P: protein polymerization; F: structural molecule activity; F: GTPase activity; C: microtubule	EC:3.6.5.1; EC:3.6.5.2; EC:3.6.5.3; EC:3.6.5.4	no IPS match
630D4I-NI	arginine decarboxylase	AAR84411	5,05E-39	75	P: cellular amino acid and derivative metabolic process; P: cellular amine metabolic process; F: lyase activity		IPR002985; PTHR11482 (PANTHER)
631D4I-NI	40s ribosomal protein s23	ACU14595	2,37E-23	100	F: structural constituent of ribosome; C: cytosolic small ribosomal subunit; P: translation; P: ribosome biogenesis	EC:3.6.5.3	no IPS match
632D4I-NI	cinnamoyl reductase	AAP46143	1,35E-83	95	P: cellular metabolic process; F: coenzyme binding; F: catalytic activity		no IPS match
634D4I-NI	villin 2 protein	CBI29827	1,03E-10	82	F: actin binding; P: cytoskeleton organization; C: cellular_component		no IPS match
636D4I-NI	metallothionein-like protein	ABA27037	6,56E-11	78	F: metal ion binding		no IPS match
637D4I-NI	gdsI-motif lipase hydrolase-like	XP_002522520	2,54E-31	82	C: cytoplasmic membrane-bounded vesicle; P: lipid metabolic process		IPR001087; PTHR22835 (PANTHER), PTHR22835:SF39 (PANTHER), SignalP (SIGNALP)
640D4I-NI	ax110p-like protein	XP_002306733	1,24E-08	80	F: binding; F: electron carrier activity; F: oxidoreductase activity; P: metabolic process; F: catalytic activity		no IPS match
641D4I-NI	14-3-3 protein	O65352	1,23E-48	97	F: protein domain specific binding		no IPS match
643D4I-NI	hsp 70-like protein	XP_002331133	6,11E-77	98	P: protein folding; C: chloroplast envelope; P: response to cold; P: response to cadmium ion; F: ATP binding; C: chloroplast stroma; F: unfolded protein binding; C: nucleus; P: response to heat; C: mitochondrion		SignalP (SIGNALP)
645D4I-NI	ac016662_4 enolase 31277-33713	BAF24948	3,55E-19	87	C: phosphopyruvate hydratase complex; F: monooxygenase activity; F: phosphopyruvate hydratase activity; F: magnesium ion binding; P: glycolysis; C: chloroplast; P: tryptophan biosynthetic process; P: gluconeogenesis; P: tyrosine biosynthetic process; P: L-phenylalanine biosynthetic process	EC:4.2.1.11	no IPS match

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
648D4I-NI	vesicle-associated membrane protein 725	XP_002264270	9,49E-45	90	C:integral to membrane; C:endosome; P:vesicle-mediated transport; C:plasma membrane		no IPS match
651D4I-NI	40s ribosomal protein	AAN52388	3,67E-08	48	F:structural constituent of ribosome; C:lipid particle; P:translation; C:ribonucleoprotein complex; C:ribosome; C:intracellular		no IPS match
652D4I-NI	frne protein	CBI16932	2,43E-64	83	F:protein disulfide oxidoreductase activity; C:plastid; C:outer membrane-bounded periplasmic space; P:electron transport		no IPS match
656D4I-NI	rna binding	CBI30340	1,00E-29	82	C:mitochondrion; F:binding		IPR000504; IPR012677; PTHR10432 (PANTHER), PTHR10432:SF32 (PANTHER), SSF54928 (SUPERFAMILY)
660D4I-NI	cbl-interacting protein kinase 23	XP_002279222	4,51E-64	90	C:cytosol; P:stomatal movement; F:protein serine/threonine kinase activity; P:response to water deprivation; C:mitochondrion; P:potassium ion import; P:response to nutrient; F:ATP binding; F:protein binding; P:signal transduction; C:nucleus; C:plasma membrane; P:protein amino acid phosphorylation; P:serine family amino acid metabolic process	EC:2.7.11.0	no IPS match
661D4I-NI	seed storage globulin precursor gi	XP_002329103	1,01E-34	65	P:biological_process; F:nutrient reservoir activity		no IPS match
665D4I-NI	papain-like cysteine peptidase xbcp3	AAD54424	3,62E-80	87	C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; F:cysteine-type endopeptidase activity; P:proteolysis	EC:3.4.22.0	no IPS match

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
674D4I-NI	protein-tyrosine kinase	XP_002274354	7,07E-28	66	C:plasma membrane; F:protein serine/threonine/tyrosine kinase activity; C:mitochondrion	EC:2.7.112.1	IPR001245; IPR011009; G3DSA:1.10.510.10 (GENE3D), PTHR23257 (PANTHER), PTHR23257:SF81 (PANTHER) no IPS match
676D4I-NI	enoyl hydratase-like protein	XP_002297858	2,28E-49	86	P:fatty acid catabolic process; F:delta3,5-delta2,4-dienoyl-CoA isomerase activity; C:peroxisome; F:enoyl-CoA hydratase activity; P:isoleucine catabolic process; P:leucine catabolic process; P:lysine catabolic process; P:tryptophan metabolic process; P:valine catabolic process; P:fatty acid biosynthetic process; P:benzoate metabolic process; P:beta-alanine metabolic process; P:limonene catabolic process	EC:4.2.1.17	no IPS match
677D4I-NI	kd orf	JQ1541	1,54E-42	98	No GO term found		SignalP (SIGNALP)
678D4I-NI	ubiquitin-like protein	XP_002521706	8,59E-18	91	P:protein modification process		no IPS match
680D4I-NI	ubiquitin-conjugating enzyme e2-17 kda	ADB28900	2,83E-32	100	P:modification-dependent protein catabolic process; P:regulation of protein metabolic process; P:post-translational protein modification; F:small conjugating protein ligase activity		SignalP (SIGNALP)
682D4I-NI	basic pr-1 protein precursor	CAD60273	4,11E-20	78	C:extracellular region		no IPS match
684D4I-NI	polyphenol oxidase	ACJ70698	1,68E-15	70	C:plastid; F:metal ion binding; P:oxidation reduction; F:catechol oxidase activity; F:oxidoreductase activity; C:chloroplast; F:copper ion binding; P:metabolic process		

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
685D4I-NI	plasma membrane h+ atpase	XP_002459489	6,56E-74	93	F:hydrogen-exporting ATPase activity, phosphorylative mechanism; C:integral to membrane; P:ATP biosynthetic process; F:ATP binding; F:magnesium ion binding; P:proton transport; C:plasma membrane; P:oxidative phosphorylation	EC:3.6.3.6	no IPS match
686D4I-NI	predicted protein	XP_002303597	7,55E-48	81	F:catalytic activity; C:mitochondrion		SignalP (SIGNALP)
688D4I-NI	esterase, putative	CAB87770	2,02E-38	88	P:metabolic process; F:hydrolase activity		no IPS match
690D4I-NI	eukaryotic translation initiation factor 3	XP_002330655	5,66E-17	85	C:plasma membrane		SignalP (SIGNALP)
691D4I-NI	protein disulfide-isomerase	XP_002515309	2,54E-41	88	C:plant-type cell wall; C:endoplasmic reticulum lumen; P:response to endoplasmic reticulum stress; C:plasma membrane; P:cell redox homeostasis; P:embryonic development ending in seed dormancy; F:protein disulfide isomerase activity; P:double fertilization forming a zygote and endosperm; C:endoplasmic reticulum	EC:5.3.4.1	no IPS match
692D4I-NI	predicted protein	XP_002309261	4,16E-12	91	C:mitochondrion		no IPS match
693D4I-NI	cysteine proteinase	BAC75924	5,38E-52	100	C:vacuole; C:endomembrane system; C:endoplasmic reticulum lumen; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; F:cysteine-type endopeptidase activity; P:proteolysis; C:endoplasmic reticulum	EC:3.4.22.0	no IPS match
694D4I-NI	kinesin light chain	AAM13438	7,04E-34	81	F:binding		SignalP (SIGNALP)
695D4I-NI	short-chain dehydrogenase reductase sdr	ACZ34296	2,24E-70	84	F:catalytic activity		IPR002198; IPR002347; IPR016040; PTHR19410:SF19 (PANTHER)

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
699D4I-NI	carnitine acylcarnitine translocase	CBI36143	2,57E-29	81	F:L-ornithine transmembrane transporter activity; F:carnitine:acyl carnitine antiporter activity; F:binding; C:mitochondrial inner membrane; P:mitochondrial transport; P:ornithine transport		no IPS match
702D4I-NI	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase nima-interacting 4	XP_002514732	7,44E-54	98	P:protein folding; F:peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity	EC:5.2.1.8	no IPS match
703D4I-NI	unnamed protein product	XP_002280988	1,45E-09	67	No GO term found		no IPS match
704D4I-NI	dihydropyrimidine dehydrogenase	CBI15610	5,54E-51	95	P:UMP biosynthetic process; F:dihydroorotate oxidase activity; C:chloroplast; P:'de novo' pyrimidine base biosynthetic process	EC:1.3.3.1	no IPS match
705D4I-NI	nam-like protein 7	AAM34770	8,45E-14	44	P:response to chitin; P:multicellular organismal development; C:cellular_component; F:transcription factor activity		SignalP (SIGNALP)
708D4I-NI	hypothetical protein	XP_002281496	1,29E-05	78	No GO term found		no IPS match
709D4I-NI	phi-1-like protein	BAG16530	1,04E-73	85	C:plant-type cell wall		no IPS match
712D4I-NI	auxin-responsive protein iaa7	CBI26357	2,76E-58	98	P:lateral root morphogenesis; P:response to jasmonic acid stimulus; P:response to water deprivation; P:regulation of transcription, DNA-dependent; P:response to wounding; F:transcription repressor activity; F:protein dimerization activity; F:transcription factor activity; P:gravitropism; P:auxin mediated signaling pathway; P:negative regulation of transcription; C:transcriptional repressor complex; C:transcription factor complex		SignalP (SIGNALP)
713D4I-NI	conserved hypothetical protein	XP_002530962	1,37E-08	53	No GO term found		SignalP (SIGNALP)
715D4I-NI	acyl- synthetase-like protein	XP_002270385	6,00E-51	97	P:metabolic process; F:catalytic activity; C:plastid; C:plasma membrane		no IPS match
721D4I-NI	cytochrome p450	XP_002303566	1,61E-115	82	C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; F:iron ion binding		IPR002114

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
722D4I-NI	membrane protein	BAD94992	4,01E-23	98	C:plastid; C:membrane		SignalP (SIGNALP)
726D4I-NI	unnamed protein product	CBI34376	2,24E-05	65	No GO term found		no IPS match
727D4I-NI	myosin heavy expressed	CAN64061	6,29E-37	63	C:plasma membrane		IPR008545; PD936484 (PRODOM)
728D4I-NI	aldo keto	AAB84222	1,13E-25	97	F:oxidoreductase activity; P:oxidation reduction		no IPS match
730D4I-NI	unnamed protein product	CBI24858	9,84E-100	82	F:RNA binding; P:RNA processing		no IPS match
731D4I-NI	proton myo-inositol transporter	XP_002278770	2,62E-37	78	C:membrane; F:sugar:hydrogen symporter activity; P:carbohydrate transport		SignalP (SIGNALP)
732D4I-NI	membrane protein	XP_002518164	1,45E-58	94	C:plastid; C:membrane		no IPS match
733D4I-NI	pollen specific protein	AAF00549	7,22E-33	95	P:cell differentiation		no IPS match
735D4I-NI	squalene epoxidase	XP_002301139	6,32E-38	62	P:oxidation reduction; F:oxidoreductase activity; P:metabolic process; C:integral to membrane; C:membrane; F:squalene monooxygenase activity; F:FAD binding		no IPS match
736D4I-NI	cell division protein	CBI37548	2,28E-143	91	F:metalloendopeptidase activity; F:ATP binding; C:integral to membrane; F:nucleoside-triphosphatase activity; P:proteolysis; F:zinc ion binding; C:plastid	EC:3.4.24.0; EC:3.6.1.15	IPR000215
738D4I-NI	glycine decarboxylase complex h-protein	XP_002278252	4,30E-70	93	P:glycine catabolic process; F:glycine dehydrogenase (decarboxylating) activity; F:ATP binding; C:glycine cleavage complex; C:mitochondrion; P:L-serine metabolic process; P:threonine metabolic process	EC:1.4.4.2	no IPS match
741D4I-NI	adenosine diphosphatase	XP_002525470	6,32E-66	87	F:calmodulin binding; F:ATPase activity; P:pollen germination; F:nucleotide diphosphatase activity	EC:3.6.1.9	SignalP (SIGNALP)
743D4I-NI	predicted protein	XP_002314371	2,58E-30	65	F:hydrolase activity; F:catalytic activity		no IPS match
748D4I-NI	60s ribosomal protein	ACJ02353	4,28E-16	93	C:ribosome; F:structural constituent of ribosome; P:translation; P:ribosome biogenesis	EC:3.6.5.3	SignalP (SIGNALP)
33D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
34D4I-NI	No Similarity				No GO term found		SignalP (SIGNALP)
48D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
68D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
97D4I-NI	No Similarity				No GO term found		SignalP (SIGNALP)
121D4I-NI	No Similarity				No GO term found		SignalP (SIGNALP)
129D4I-NI	No Similarity				No GO term found		SignalP (SIGNALP)
171D4I-NI	No Similarity				No GO term found		SignalP (SIGNALP)
178D4I-NI	No Similarity				No GO term found		SignalP (SIGNALP)
198D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
215D4I-NI	No Similarity				No GO term found		SignalP (SIGNALP)
226D4I-NI	No Similarity				No GO term found		SignalP (SIGNALP)
232D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
234D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
243D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
245D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
254D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
270D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
280D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
288D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
301D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
316D4I-NI	No Similarity				No GO term found		SignalP (SIGNALP)
319D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
329D4I-NI	No Similarity				No GO term found		SignalP (SIGNALP)
340D4I-NI	No Similarity				No GO term found		SignalP (SIGNALP)
342D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match

Tabla Anexa 9 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4I-NI con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Identificación	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
352D4I-NI	No Similarity				No GO term found		IPRO10916
378D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
380D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
399D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
400D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
417D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
422D4I-NI	No Similarity				No GO term found		SignalP (SIGNALP)
423D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
432D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
435D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
452D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
461D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
467D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
475D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
482D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
554D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
569D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
570D4I-NI	No Similarity				No GO term found		SignalP (SIGNALP)
571D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
579D4I-NI	No Similarity				No GO term found		SignalP (SIGNALP)
605D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
619D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
620D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
654D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
657D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
666D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
675D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
696D4I-NI	No Similarity				No GO term found		SignalP (SIGNALP)
697D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match
710D4I-NI	No Similarity				No GO term found		no IPS match

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
2D4NI-I	nadh-ubiquinone oxidoreductase 18 kda subunit	CBI38470	9,29E-26	85	C:mitochondrial inner membrane; F:ferric-chelate reductase activity; C:respiratory chain complex I; F:NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity; P:response to osmotic stress; P:cold acclimation; P:electron transport chain	EC:1.16.1.7; EC:1.6.5.3	IPR006885; PTHR12219:SF8 (PANTHER)
4D4NI-I	ring zinc finger protein	CBI21277	3,31E-29	72	F:protein binding; C:plastid		no IPS match
5D4NI-I	adhesion regulating molecule family	XP_002265472	7,93E-34	84	C:intracellular part; P:cell adhesion		SignalP (SIGNALP)
7D4NI-I	a chain crystal structure of heltuba complexed to man(1-3)man	AAL84816	5,17E-21	56	F:monosaccharide binding		no IPS match
11D4NI-I	breast carcinoma amplified	CBI32303	2,26E-35	57	P:response to starvation; C:mitochondrion		no IPS match
12D4NI-I	membrane protein at1g17200	CAA54463	1,97E-20	100	C:membrane		no IPS match
15D4NI-I	formate mitochondrial precursor	XP_002517338	1,07E-85	96	P:oxidation reduction; C:mitochondrion; F:NAD or NADH binding; F:oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor; F:formate dehydrogenase activity	EC:1.1.1.0; EC:1.2.1.2	no IPS match
16D4NI-I	ring finger	XP_002284899	1,92E-15	57	P:response to chitin; F:binding		no IPS match
21D4NI-I	ankyrin-like protein	XP_002311530	5,58E-23	81	C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; C:plasma membrane		PTHR18958 (PANTHER), PTHR18958:SF119 (PANTHER), SignalP (SIGNALP)
24D4NI-I	unnamed protein product [Vitis vinifera]	CBI34152	8,34E-78	91	C:plastoglobule; P:protein amino acid phosphorylation; F:protein kinase activity; F:ATP binding		SignalP (SIGNALP)

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
28D4NI-I	tyramine n-feruloyltransferase 4	EFH56039	1,89E-15	95	P:metabolic process; F:N-acetyltransferase activity; C:chloroplast		no IPS match
29D4NI-I	peptidylprolyl isomerase	CBI41091	5,70E-28	89	P:protein folding; F:calmodulin binding; C:vacuole; P:response to stress; F:peptidylprolyl cis-trans isomerase activity	EC:5.2.1.8	no IPS match
33D4NI-I	translation initiation factor 5a	Q9SC12	4,03E-29	96	P:translational initiation; F:translation initiation factor activity; C:mitochondrion		no IPS match
34D4NI-I	40s ribosomal protein s11	XP_002066094	6,27E-30	95	C:ribosome; F:structural constituent of ribosome; P:translation; F:rRNA binding	EC:3.6.5.3	no IPS match
39D4NI-I	epidermis-specific secreted glycoprotein ep1	XP_002283223	4,65E-38	73	C:endomembrane system; F:sugar binding		no IPS match
43D4NI-I	component of cytochrome b6-f complex	CAM57109	4,44E-60	99	P:transport; F:2 iron, 2 sulfur cluster binding; C:integral to membrane; P:defense response to bacterium; P:nonphotochemical quenching; F:plastoquinol-plastocyanin reductase activity; C:cytochrome b6f complex; P:photosynthetic electron transport in cytochrome b6/f; C:chloroplast thylakoid membrane; F:electron transporter, transferring electrons from cytochrome b6/f complex of photosystem II activity; F:iron ion binding; C:plasma membrane	EC:1.10.99.1	no IPS match
44D4NI-I	chalcone isomerase	ABY73742	1,74E-80	99	P:flavonoid biosynthetic process; F:chalcone isomerase activity	EC:5.5.1.6	no IPS match
47D4NI-I	protein z	XP_002510281	8,11E-46	84	F:cysteine-type endopeptidase inhibitor activity; C:nonplast		no IPS match

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
48D4NI-I	hypothetical protein	CAN77030	3,61E-38	88	F:binding; C:mitochondrial inner membrane; F:ATP transmembrane transporter activity; C:peroxisome; P:mitochondrial transport; P:fatty acid beta-oxidation; C:integral to membrane; F:ADP transmembrane transporter activity		no IPS match
50D4NI-I	profilin 4	AAX77688	2,37E-13	100	P:actin cytoskeleton organization; C:phragmoplast; C:nucleus; C:actin cytoskeleton; F:actin monomer binding		no IPS match
49D4NI-I	TC54041				No GO term found		
53D4NI-I	hypothetical protein	XP_002284407	1,51E-85	85	P:response to gibberellin stimulus; C:cytoplasm; P:response to auxin stimulus; P:response to chitin; F:transcription regulator activity; F:protein binding		no IPS match
54D4NI-I	predicted protein [Populus trichocarpa]	XP_002269322	2,69E-19	68	No GO term found		no IPS match
56D4NI-I	hypothetical protein [Sorghum bicolor]	XP_002444275	1,16E-04	71	No GO term found		no IPS match
56D4NI-I	hypothetical protein [Sorghum bicolor]	XP_002444275	4,09E-04	71	No GO term found		no IPS match
59D4NI-I	mitochondrial f1- gamma subunit	ACU17752	1,32E-64	95	C:proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1); C:cell wall; F:hydrogen ion transporting ATP synthase activity, rotational mechanism; C:nucleolus; C:mitochondrial inner membrane; P:ATP synthesis coupled proton transport; F:proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism; C:chloroplast	EC:3.6.3.14	no IPS match
66D4NI-I	major latex	ADG43176	6,19E-30	66	P:response to biotic stimulus; P:defense response; F:F; C:C		no IPS match

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
67D4NI-I	ubiquitin protein ligase	CBI32615	1,19E-57	87	P:protein deubiquitination		no IPS match
73D4NI-I	ring finger-like protein	XP_002313256	5,31E-13	80	F:DNA binding; F:zinc ion binding; C:plastid		no IPS match
76D4NI-I	nadh-ubiquinone oxidoreductase 13 kda-b subunit	XP_002513634	6,82E-72	85	C:mitochondrial inner membrane; C:respiratory chain complex I; P:photorespiration; F:oxidoreductase activity, acting on NADH or NADPH; C:chloroplast; P:respiratory electron transport chain		SignalP (SIGNALP)
77D4NI-I	predicted protein [Populus trichocarpa]	XP_002272171	3,80E-24	82	C:mitochondrion; C:plastid		IPR008479
78D4NI-I	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	XP_002315071	2,65E-30	95	F:NAD or NADH binding; P:oxidation reduction; P:glycolysis; F:glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating) activity; C:plastid	EC:1.2.1.12	IPR000173; IPR020829; SignalP (SIGNALP), SSF55347 (SUPERFAMILY)
83D4NI-I	60s ribosomal protein l23a	ABK26337	5,84E-12	76	P:response to high light intensity; P:response to cold; P:response to oxidative stress; F:structural constituent of ribosome; P:ribosome biogenesis; C:cell wall; C:cytosolic large ribosomal subunit; P:translation; F:rRNA binding; F:nucleotide binding	EC:3.6.5.3	SignalP (SIGNALP)
87D4NI-I	remorin-like protein	AAD28506	7,51E-12	70	F:galacturonate binding; P:cell-cell signaling; F:DNA binding; C:plasma membrane		no IPS match
88D4NI-I	syringomycin biosynthesis enzyme -like	XP_002457202	2,51E-55	91	C:nucleus; F:oxidoreductase activity; F:electron carrier activity		no IPS match
92D4NI-I	TC49590				No GO term found		

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
99D4NI-I	vacuolar sorting protein 4b	AAF21428	1,69E-19	92	F:ATP binding; F:nucleoside-triphosphatase activity	EC:3.6.1.15	IPR015415; PTHR23074 (PANTHER), PTHR23074:SF4 (PANTHER) SignalP (SIGNALP)
104D4NI-I	nascent polypeptide associated complex alpha chain	BAF46352	5,99E-61	92	P:response to salt stress; C:cytosolic ribosome		
104D4NI-I	putative / alpha-NAC, putative	NP_187845	6,97E-13	97	P:protein transport; P:response to salt stress; C:cytosolic ribosome		no IPS match
110D4NI-I	TC43728				No GO term found		
111D4NI-I	plasma membrane H ⁺ -ATPase [Plantago major]	CAH58642	6,88E-73	89	C:plasma membrane; P:response to salt stress; F:hydrogen-exporting ATPase activity, phosphorylative mechanism	EC:3.6.3.6	no IPS match
112D4NI-I	reverse transcriptase	AAF91388	2,95E-19	60	F:RNA-directed DNA polymerase activity	EC:2.7.7.49	SignalP (SIGNALP)
115D4NI-I	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	XP_002528996	1,03E-45	93	C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; C:endoplasmic reticulum		no IPS match
116D4NI-I	elongation factor	XP_002523907	5,60E-76	96	F:translation elongation factor activity; P:response to cold; F:GTP binding; F:copper ion binding; C:plasma membrane; C:chloroplast; P:translation; F:GTPase activity	EC:3.6.5.3; EC:3.6.5.1; EC:3.6.5.2; EC:3.6.5.4	SignalP (SIGNALP)
117D4NI-I	receptor-like protein kinase	XP_002277409	9,17E-21	63	C:endomembrane system; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle		IPR000719; IPR001245; IPR011009; G3DSA:3.30.200.20 (GENE3D), PTHR23258 (PANTHER) no IPS match
124D4NI-I	interferon-related protein	XP_002285282	3,53E-63	81	No GO term found		no IPS match
125D4NI-I	salicylic acid-induced fragment 1 protein	EFH66470	6,33E-19	94	C:membrane		no IPS match

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
130D4NI-I	cysteine proteinase inhibitor b	Q10993	1,14E-28	94	C:endomembrane system; F:cysteine-type endopeptidase inhibitor activity; F:endopeptidase inhibitor activity		no IPS match
132D4NI-I	TC50346				No GO term found		
133D4NI-I	TC47812				No GO term found		
141D4NI-I	programmed cell death 6-interacting	XP_002311485	2,65E-05	80	No GO term found		no IPS match
145D4NI-I	nadh dehydrogenase chain-like protein	ACU14720	1,60E-28	78	F:oxidoreductase activity, acting on NADH or NADPH, quinone or similar compound as acceptor; C:respiratory chain complex I	EC:1.6.5.0	no IPS match
146D4NI-I	eukaryotic translation initiation factor 3 delta subunit	AAK49947	2,13E-93	97	C:CUL4 RING ubiquitin ligase complex; P:response to salt stress; F:nucleotide binding; F:protein binding		IPR001680; IPR011046; IPR015943; IPR017986; IPR019775; IPR019781; IPR019782; IPR020472; PTHR19877 (PANTHER), PTHR19877:SF1 (PANTHER) SignalP (SIGNALP)
148D4NI-I	predicted protein [Populus trichocarpa]	XP_002302622	3,60E-24	82	P:defense response to bacterium; C:chloroplast envelope; C:chloroplast thylakoid membrane		
158D4NI-I	probable nadp-dependent oxidoreductase p1	ACN65116	1,69E-149	90	C:cytosol; P:oxidation reduction; C:nucleus; F:zinc ion binding; F:2-alkenal reductase activity; P:response to oxidative stress	EC:1.3.1.74	no IPS match

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
161D4NI-I	multicatalytic endopeptidase proteasome beta subunit	XP_002527995	9,29E-58	91	C:cytosol; P:ubiquitin-dependent protein catabolic process; F:zinc ion binding; P:response to salt stress; P:regulation of transcription, DNA-dependent; F:threonine-type endopeptidase activity; F:DNA binding; C:proteasome core complex; C:nucleus; C:plasma membrane	EC:3.4.25.0	IPR001353; G3DSA:3.60.20.10 (GENE3D), PTHR11599 (PANTHER), PTHR11599:SF4 (PANTHER), SSF56235 (SUPERFAMILY) no IPS match SignalP (SIGNALP)
163D4NI-I	dna-binding -like	XP_002311776	8,98E-11	90	F:nucleic acid binding		
164D4NI-I	zinc finger homeodomain protein 1	XP_002534013	2,06E-17	67	F:DNA binding		SignalP (SIGNALP)
168D4NI-I	CD856677				No GO term found		
179D4NI-I	Protein C20orf11, putative [Ricinus communis]	XP_002521405	5,34E-18	90	C:integral to membrane		SignalP (SIGNALP)
181D4NI-I	receptor protein kinase perk1	CBI32578	6,40E-29	71	F:protein kinase activity; C:plastid		no IPS match
182D4NI-I	dna-dependent atpase snf2h	XP_002275787	1,14E-30	74	F:hydrolase activity, acting on acid anhydrides, in phosphorus-containing anhydrides; F:nucleic acid binding; P:chromatin remodeling; C:nucleus	EC:3.6.1.0	SignalP (SIGNALP)
183D4NI-I	hypothetical membrane spanning protein	XP_001863291	5,90E-09	73	No GO term found		no IPS match
186D4NI-I	chlorophyll a b-binding protein	XP_002463016	1,55E-25	87	C:membrane; C:chloroplast; P:photosynthesis, light harvesting		no IPS match
187D4NI-I	isopentenyl diphosphate isomerase i	ABG56530	4,09E-76	94	P:isoprenoid biosynthetic process; P:chlorophyll biosynthetic process; F:hydrolase activity; F:magnesium ion binding; P:photosynthesis; F:isopentenyl-diphosphate delta-isomerase activity	EC:5.3.3.2	no IPS match
191D4NI-I	cytochrome p450	ABC69409	4,07E-26	73	F:metal ion binding		no IPS match

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
193D4NI-I	heat shock protein 82	ABX76302	5,45E-39	96	P:protein folding; F:unfolded protein binding; F:ATP binding; P:response to stress		SignalP (SIGNALP)
194D4NI-I	unnamed protein product [Vitis vinifera]	XP_002285434	9,32E-50	76	C:plastid		SignalP (SIGNALP)
199D4NI-I	mn-specific cation diffusion facilitator transporter	XP_002282508	7,25E-31	100	F:manganese:hydrogen antiporter activity; P:response to copper ion; C:Golgi apparatus; C:late endosome; P:cellular manganese ion homeostasis; P:response to manganese ion; F:manganese ion transmembrane transporter activity; P:cation transport; C:membrane		SignalP (SIGNALP)
200D4NI-I	60s ribosomal protein l17	ABK93299	1,97E-52	98	C:nucleolus; C:vacuole; F:structural constituent of ribosome; C:cytosolic large ribosomal subunit; C:membrane; P:translation	EC:3.6.5.3	no IPS match
201D4NI-I	BSD domain-containing protein [Arabidopsis thaliana]	NP_569021	2,38E-34	68	F:F; P:P		no IPS match
202D4NI-I	protein	XP_002509755	9,47E-39	80	F:RNA polymerase II transcription factor activity; P:transcription initiation from RNA polymerase II promoter; C:transcription factor TFIIE complex		no IPS match
205D4NI-I	hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]	ABL97961	2,01E-33	75	C:plastid chromosome		no IPS match
209D4NI-I	mitochondrial carrier	XP_002317745	6,56E-44	91	F:binding; C:mitochondrial inner membrane; P:mitochondrial transport; C:integral to membrane; F:transporter activity		no IPS match

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
217D4NI-I	chloroplast-localized ptr - binding protein1	XP_002517999	1,23E-17	97	C:plastid outer membrane; P:G-protein coupled receptor protein signaling pathway; P:protein import into chloroplast thylakoid membrane; P:sugar mediated signaling pathway; P:thylakoid membrane organization; F:protein binding; C:chloroplast thylakoid membrane; C:chloroplast stroma; P:photosystem II assembly; P:protein import into chloroplast stroma; C:plastid inner membrane; C:stromule		no IPS match
218D4NI-I	amino acid binding	XP_002272024	1,55E-68	85	F:amino acid binding		SignalP (SIGNALP)
222D4NI-I	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	AAC49824	2,20E-107	95	P:ethylene biosynthetic process; P:ripening; F:L-ascorbic acid binding; F:iron ion binding; F:obs-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase activity; P:oxidation reduction	EC:1.14.17.4	no IPS match
226D4NI-I	wound-induced protein wi12	XP_002520818	2,30E-45	68	P:response to fungus; P:response to stress; P:aging		no IPS match
230D4NI-I	signal recognition particle 9 kda protein	EFH52199	7,51E-28	86	C:signal recognition particle, endoplasmic reticulum targeting; C:signal recognition particle receptor complex; P:negative regulation of translational elongation; F:7S RNA binding; F:protein binding; P:SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane; F:signal recognition particle binding	EC:3.6.5.4	SignalP (SIGNALP)
231D4NI-I	phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family protein ubiquitin family protein	XP_002277933	3,65E-90	85	C:peroxisome; F:inositol or phosphatidylinositol kinase activity		no IPS match
232D4NI-I	GL23790 [Drosophila persimilis]	XP_002012780	3,74E-11	67	P:proteolysis; F:metallopeptidase activity; F:zinc ion binding		SignalP (SIGNALP)

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
236D4NI-I	TC45413				No GO term found		
237D4NI-I	senescence-associated protein	ACU13678	3,69E-11	80	P:aging		SignalP (SIGNALP)
239D4NI-I	hydrolyzing o-glycosyl	ABD28427	8,53E-20	55	F:hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds; P:carbohydrate metabolic process		no IPS match
242D4NI-I	receptor protein kinase perk1	XP_002280718	9,33E-27	71	F:protein kinase activity		SignalP (SIGNALP)
243D4NI-I	anion exchange protein	EFH58370	2,59E-52	97	C:endosome; C:plasma membrane; F:anion exchanger activity; P:boron transport; F:boron transmembrane transporter activity		SignalP (SIGNALP)
246D4NI-I	60s ribosomal protein l7	ABC01902	1,20E-76	82	C:nucleolus; F:structural constituent of ribosome; C:cytosolic large ribosomal subunit; P:translation	EC:3.6.5.3	no IPS match
247D4NI-I	er lumen protein retaining	ABK22143	5,20E-45	84	F:receptor activity; F:ER retention sequence binding; P:protein retention in ER lumen; C:integral to membrane; C:endoplasmic reticulum; P:protein transport		no IPS match
249D4NI-I	calcium-dependent protein kinase	XP_002264564	5,06E-98	90	P:protein amino acid phosphorylation; F:calcium ion binding; F:ATP binding; F:protein serine/threonine kinase activity	EC:2.7.11.0	no IPS match
250D4NI-I	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	CBI28112	5,61E-31	82	C:mitochondrion		no IPS match
252D4NI-I	regulatory-associated protein of	XP_002533827	2,17E-63	69	F:protein binding; P:cell growth; P:embryonic development ending in seed dormancy		no IPS match

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
256D4NI-I	actin-like protein arp6	XP_002285295	4,23E-23	80	F:structural constituent of cytoskeleton; C:chromatin remodeling complex; P:cell proliferation; F:protein binding; P:actin filament-based process; P:chromatin remodeling; P:negative regulation of flower development		no IPS match
259D4NI-I	adenylate kinase	XP_002442055	3,29E-31	84	F:ATP binding; F:adenylate kinase activity; P:purine nucleotide metabolic process	EC:2.7.4.3	no IPS match
267D4NI-I	u2 snrnp auxiliary large subunit	CBI17547	6,36E-97	91	F:RNA binding; P:nuclear mRNA splicing, via spliceosome; C:nucleus; F:nucleotide binding		no IPS match
269D4NI-I	ribosomal protein l3	CBI29701	1,96E-52	95	C:ribosome; F:structural constituent of ribosome; P:translation	EC:3.6.5.3	no IPS match
270D4NI-I	unnamed protein product [Vitis vinifera]	CBI37124	2,06E-25	85	P:intracellular transport		no IPS match
271D4NI-I	cytochrome p450	XP_002278372	3,77E-67	82	F:oxidoreductase activity; F:iron ion binding		no IPS match
272D4NI-I	ribose 5-phosphate isomerase	CBI16263	5,21E-82	89	F:ribose-5-phosphate isomerase activity; P:cellulose biosynthetic process; C:plastid; P:pentose-phosphate shunt, non-oxidative branch; P:uridine biosynthetic process	EC:5.3.1.6	no IPS match
273D4NI-I	60s ribosomal protein	XP_002530136	1,36E-21	69	C:ribosome		no IPS match
277D4NI-I	40s ribosomal protein sa (laminin receptor-like protein)	CBI35816	4,63E-17	87	P:mature ribosome assembly; F:structural constituent of ribosome; C:plasma membrane; C:cytosolic small ribosomal subunit; C:chloroplast; C:nucleus; P:translation; P:response to salt stress	EC:3.6.5.3	no IPS match
286D4NI-I	ubiquitin-fusion degradation protein 2-like short=ub fusion protein 2-like	XP_002532897	3,65E-78	91	P:modification-dependent protein catabolic process; P:protein ubiquitination; F:ubiquitin-protein ligase activity; C:ubiquitin ligase complex	EC:6.3.2.19	no IPS match

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
291D4NI-I	y3136_arath ame: full=clavaminase synthase-like protein at3g21360	EFH59560	4,12E-18	71	C:nucleus		IPR003819; SSF51197 (SUPERFAMILY)
296D4NI-I	aldose reductase	EFH49259	2,46E-18	87	P:oxidation reduction; F:aldehyde reductase activity; P:response to stress	EC:1.1.1.21	no IPS match
301D4NI-I	heat shock protein cognate 70	AAS57912	1,71E-78	89	No GO term found		no IPS match
302D4NI-I	phenylalanine ammonia-lyase 2	ABN79671	7,12E-18	97	C:cytoplasm; F:ammonia ligase activity; P:phenylpropanoid metabolic process; P:biosynthetic process; F:ammonia-lyase activity; P:L-phenylalanine catabolic process	EC:4.3.1.0	no IPS match
305D4NI-I	at3g13050 mgh6_16	XP_002273636	2,76E-54	91	C:membrane; F:sugar:hydrogen symporter activity; P:transport		no IPS match
307D4NI-I	af138266_1 papain-like cysteine proteinase isoform iii	BAD10859	9,14E-58	88	P:proteolysis; F:cysteine-type endopeptidase activity	EC:3.4.22.0	no IPS match
308D4NI-I	nucleoside triphosphatase	XP_002312246	1,91E-73	73	C:vacuole		IPR000407; PTHR11782:SF4 (PANTHER)
309D4NI-I	---NA---	ABD32582	2,20E-09	44	No GO term found		no IPS match
318D4NI-I	at5g11170 f2i11_60	XP_002285072	3,54E-85	99	C:nucleolus; F:ATP-dependent helicase activity; F:nucleic acid binding; P:response to cadmium ion; F:ATP binding		no IPS match

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
323D4NI-I	60s ribosomal protein l37	ACJ83830	2,57E-47	97	F:structural constituent of ribosome; C:cytosolic ribosome; P:ribosome biogenesis; C:cytosolic large ribosomal subunit; C:ribonucleoprotein complex; F:rRNA binding; P:translation; F:zinc ion binding; F:RNA binding; C:ribosome; C:intracellular; F:metal ion binding; C:plastid		no IPS match
329D4NI-I	pyruvate decarboxylase	AAO72533	9,57E-47	95	F:thiamin pyrophosphate binding; F:pyruvate decarboxylase activity; F:magnesium ion binding	EC:4.1.1.1	SignalP (SIGNALP)
330D4NI-I	ef-hand containing	CAA04670	3,54E-38	85	F:calcium ion binding		SignalP (SIGNALP)
331D4NI-I	elongation factor 2	XP_002513404	1,31E-32	93	C:cytoplasm; F:translation elongation factor activity; F:GTP binding; P:translation; F:GTPase activity	EC:3.6.5.3; EC:3.6.5.1; EC:3.6.5.2; EC:3.6.5.4	no IPS match
333D4NI-I	snf1-related protein kinase	XP_002306053	1,96E-36	97	P:detection of nutrient; F:protein binding; F:protein kinase activity; C:nuclear ubiquitin ligase complex		SignalP (SIGNALP)
337D4NI-I	hydrolyzing o-glycosyl	XP_002523937	1,35E-17	80	P:carbohydrate metabolic process; C:plant-type cell wall; C:membrane		no IPS match
338D4NI-I	cold stable orthophosphate dikinase	Q39734	1,10E-93	96	F:pyruvate, phosphate dikinase activity; F:kinase activity; P:phosphorylation; F:ATP binding; F:magnesium ion binding; C:chloroplast stroma; C:cytosol; P:photosynthesis	EC:2.7.9.1	no IPS match
346D4NI-I	b chain x-ray structure of a lysine decarboxylase-like protein from arabidopsis thaliana gene at2g37210	XP_002323469	2,11E-91	95	F:F; P:P		no IPS match

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
353D4NI-I	protein aq_1857	EFH47322	2,36E-41	77	C:mitochondrion		no IPS match
355D4NI-I	hypothetical protein [Vitis vinifera]	XP_002279687	3,88E-147	94	P:nitrogen compound metabolic process; F:hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds; C:chloroplast		no IPS match
360D4NI-I	h(\+)-transporting atpase plant fungi plasma membrane	BAC77531	4,40E-05	65	F:hydrolase activity; F:ATP binding; F:metal ion binding; C:integral to membrane; C:membrane; P:proton transport; P:ATP biosynthetic process; P:metabolic process; F:catalytic activity; F:nucleotide binding; F:ATPase activity; F:hydrogen ion transmembrane transporter activity; F:hydrogen-exporting ATPase activity, phosphorylative mechanism; F:hydrolase activity, acting on acid anhydrides, catalyzing transmembrane movement of substances; P:cation transport; P:ion transport; P:transport; F:ATPase activity, coupled to transmembrane movement of ions, phosphorylative mechanism; F:magnesium ion binding; C:plasma membrane		SignalP (SIGNALP)
362D4NI-I	aldehyde dehydrogenase	XP_002511424	1,12E-76	94	P:response to cadmium ion; F:aldehyde dehydrogenase (NAD) activity; F:ATP binding; F:3-chloroallyl aldehyde dehydrogenase activity; C:mitochondrion	EC:1.2.1.3	no IPS match
363D4NI-I	amino acid transporter	XP_002270908	6,47E-32	85	F:amine transmembrane transporter activity; C:integral to membrane		no IPS match
365D4NI-I	jasmonate-induced protein	EAY93540	6,41E-23	54	No GO term found		no IPS match

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
366D4NI-I	prefoldin subunit 6	XP_002305336	4,56E-36	91	P:cortical microtubule organization; P:protein folding; F:unfolded protein binding; C:prefoldin complex		IPR002777; IPR009053; G3DSA:1.10.287.370 (GENE3D), PTHR21431 (PANTHER)
368D4NI-I	urease accessory protein	NP_001056337	8,57E-48	97	P:positive regulation of metalloenzyme activity; F:nickel ion binding; F:ATP binding; P:nitrogen compound metabolic process; C:membrane; C:mitochondrion		IPR003495; SSF52540 (SUPERFAMILY)
369D4NI-I	40s ribosomal protein s23	ABB16993	1,63E-75	99	F:structural constituent of ribosome; C:small ribosomal subunit; P:translation	EC:3.6.5.3	no IPS match
371D4NI-I	conserved hypothetical protein [<i>Ricinus communis</i>]	XP_002519822	7,48E-05	92	No GO term found		no IPS match
374D4NI-I	protein phosphatase 2c	CAB90633	4,83E-59	84	P:response to water deprivation; C:protein serine/threonine phosphatase complex; P:response to cold; F:protein serine/threonine phosphatase activity; F:protein binding; P:protein amino acid dephosphorylation; P:regulation of stomatal movement; P:negative regulation of abscisic acid mediated signaling pathway		IPR001932; IPR014045; IPR015655; PTHR13832:SF87 (PANTHER)
376D4NI-I	glucan endo- β -glucosidase	XP_002523810	2,47E-15	85	No GO term found		no IPS match
377D4NI-I	f-box family protein	XP_002273717	5,44E-72	74	C:mitochondrion; F:F; P:P		IPR006652; IPR011043; IPR013089; IPR015915; PTHR23230:SF184 (PANTHER)

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
380D4NI-I	protein kinase ck2 regulatory subunit ck2b3	CAD32500	1,39E-51	94	P:protein amino acid phosphorylation; F:kinase activity; F:protein binding; C:protein kinase CK2 complex; F:protein kinase CK2 regulator activity		no IPS match
381D4NI-I	af308738_1 j2p	AAG24642	1,73E-24	96	P:protein folding; F:unfolded protein binding; P:response to stress; F:heat shock protein binding; F:zinc ion binding; C:plasma membrane		SignalP (SIGNALP)
384D4NI-I	presenilin-like aspartic	EEY61471	1,44E-37	48	; C:integral to membrane		SignalP (SIGNALP)
388D4NI-I	chitinase	XP_002523521	8,63E-75	71	No GO term found		no IPS match
390D4NI-I	atp adp translocator	ACU24302	1,55E-65	92	P:protein amino acid phosphorylation; C:mitochondrial inner membrane; F:protein kinase activity; P:transport; F:ATP binding; C:integral to membrane; F:transporter activity		no IPS match
391D4NI-I	nadh ubiquinone oxidoreductase b22-like subunit	XP_002512999	1,34E-16	95	P:photorespiration; C:mitochondrial membrane; C:plasma membrane; C:respiratory chain complex I		PTHR12868 (PANTHER)
392D4NI-I	poly -binding protein	AAF66824	3,90E-16	75	F:binding		no IPS match
395D4NI-I	predicted protein [Populus trichocarpa]	ACU14961	3,57E-06	60	No GO term found		SignalP (SIGNALP)
398D4NI-I	unnamed protein product [Vitis vinifera]	XP_002272409	2,29E-16	84	F:methyltransferase activity; P:metabolic process		no IPS match
399D4NI-I	chitinase ib	ACH92946	1,69E-56	81	F:chitinase activity; P:plant-type hypersensitive response; C:vacuole; P:chitin catabolic process; P:response to biotic stimulus; P:cell wall macromolecule catabolic process; F:chitin binding; P:polysaccharide catabolic process	EC:3.2.1.14	no IPS match

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
400D4NI-I	30s ribosomal protein s5	Q9ST69	1,54E-25	96	P:translation; P:response to antibiotic; C:small ribosomal subunit; P:response to cold; F:rRNA binding; F:structural constituent of ribosome; C:chloroplast thylakoid membrane; C:chloroplast stroma; P:response to cadmium ion; C:nucleus	EC:3.6.5.3	no IPS match
401D4NI-I	plastidic aldolase	ABB02640	2,70E-104	98	C:plastoglobule; P:response to oxidative stress; P:response to cadmium ion; P:glycolysis; F:fructose-bisphosphate aldolase activity; C:mitochondrion	EC:4.1.2.13	SignalP (SIGNALP)
402D4NI-I	endoxyloglucan glycosyltransferase	XP_002313201	3,16E-27	88	P:cellular glucan metabolic process; F:hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds; C:endomembrane system; C:apoplast; C:cell wall; F:xyloglucan:xyloglucosyl transferase activity	EC:3.2.1.0; EC:2.4.1.207	no IPS match
402D4NI-I	f-box and wd40 domain	CBI18973	2,26E-08	78	C:plastid; F:zinc ion binding; F:protein binding		no IPS match
404D4NI-I	potassium transporter 7 short	XP_002303189	6,87E-37	79	F:potassium ion transmembrane transporter activity; C:membrane; P:potassium ion transport		no IPS match
406D4NI-I	rrm-containing protein	NP_568522	1,51E-58	92	P:oxidation reduction; F:nucleic acid binding; F:oxidoreductase activity; F:nucleotide binding		no IPS match
407D4NI-I	protein	XP_002277736	5,74E-89	87	C:endomembrane system; C:cell wall; P:carbohydrate metabolic process		no IPS match
408D4NI-I	adp-ribosylation arf	XP_002322463	4,49E-80	95	C:intracellular; F:GTP binding; P:small GTPase mediated signal transduction		no IPS match
410D4NI-I	Protein AFR, putative [Ricinus communis]	XP_002531581	4,21E-07	63	No GO term found		no IPS match
411D4NI-I	protein	XP_002318159	2,04E-17	69	C:endomembrane system; P:P		no IPS match

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
414D4NI-I	aldehyde dehydrogenase	XP_002321583	9,63E-39	94	P:oxidation reduction; F:3-chloroallyl aldehyde dehydrogenase activity; F:aldehyde dehydrogenase (NAD) activity	EC:1.2.1.3	no IPS match
415D4NI-I	pleckstrin homology domain-containing protein lipid-binding start domain-containing protein	EFH52528	2,37E-37	89	F:phosphoinositide binding		no IPS match
416D4NI-I	multidrug resistance	BAG16522	3,81E-40	86	No GO term found		no IPS match
417D4NI-I	hippocampus abundant transcript 1	XP_002266084	7,21E-39	86	C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; C:membrane		no IPS match
418D4NI-I	galactose oxidase	XP_002510488	8,06E-97	78	C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle		no IPS match
419D4NI-I	membrane steroid-binding protein 1	XP_002510808	2,49E-19	94	F:heme binding; C:chloroplast thylakoid membrane; P:electron transport chain		SignalP (SIGNALP)
422D4NI-I	eukaryotic translation initiation factor 5	XP_002270702	2,82E-47	67	C:cytoplasm; F:binding; C:nucleus; P:translation	EC:3.6.5.3	no IPS match
425D4NI-I	methylenetetrahydrofolate reductase	CAN82572	9,89E-44	90	P:methionine metabolic process; P:oxidation reduction; F:methylenetetrahydrofolate reductase (NADPH) activity	EC:1.5.1.20	no IPS match
426D4NI-I	scp16_arath ame: full=serine carboxypeptidase-like 16 flags: precursor	AAD01265	1,43E-50	54	P:proteolysis; F:serine-type carboxypeptidase activity		no IPS match
428D4NI-I	psi type iii chlorophyll a b-binding protein	ABN48563	1,75E-40	100	C:plastoglobule; P:photosynthesis, light harvesting; C:light-harvesting complex; C:photosystem II; F:magnesium ion binding; P:protein-chromophore linkage; F:chlorophyll binding; C:integral to membrane; C:photosystem I; C:chloroplast thylakoid membrane		SignalP (SIGNALP)

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
431D4NI-I	---NA---	ABK93596	2,17E-116	95	P:translation; P:adaxial/abaxial pattern formation; F:zinc ion binding; C:nucleolus; F:structural constituent of ribosome; P:nucleocytoplasmic transport; P:protein complex assembly; P:ribosome biogenesis; F:protein binding; C:chloroplast; C:vacuole; C:cytosolic large ribosomal subunit; C:plasma membrane; F:5S rRNA binding	EC:3.6.5.3	IPR005484; IPR005485; G3DSA:3.30.420.100 (GENE3D), PTHR23410:SF1 (PANTHER), SSF53137 (SUPERFAMILY)
432D4NI-I	zinc finger	CBI30639	1,99E-48	74	P:lipid metabolic process; C:endomembrane system; F:hydrolase activity, acting on ester bonds		no IPS match
434D4NI-I	thioredoxin m	ABS84825	8,04E-49	93	P:cell redox homeostasis; F:electron carrier activity; F:protein disulfide oxidoreductase activity; P:glycerol ether metabolic process		IPR005746; IPR006662; IPR012335; IPR012336; IPR013766; IPR015467; IPR017936; IPR017937; PTHR10438:SF13 (PANTHER), SignalP (SIGNALP)
437D4NI-I	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g028860 [Sorghum bicolor]	XP_002467478	1,45E-05	66	No GO term found		SignalP (SIGNALP)
438D4NI-I	60s ribosomal	Q9XF97	3,44E-41	96	C:nucleolus; C:vacuole; F:structural constituent of ribosome; C:plasma membrane; C:cell wall; C:cytosolic large ribosomal subunit; C:chloroplast; P:translation	EC:3.6.5.3	no IPS match
439D4NI-I	At5g19860 [Arabidopsis thaliana]	ACN40087	8,35E-11	70	C:vacuole		no IPS match

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
439D4NI-I	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	ACN40087	6,49E-15	72	C:vacuole		no IPS match
440D4NI-I	phenylalanine ammonia lyase	AAL55242	5,16E-69	100	C:cytoplasm; F:ammonia ligase activity; P:phenylpropanoid metabolic process; P:biosynthetic process; F:ammonia-lyase activity; P:L-phenylalanine catabolic process	EC:4.3.1.0	no IPS match
442D4NI-I	f-box family protein	XP_002532719	2,31E-07	50	No GO term found		no IPS match
444D4NI-I	-oxoglutarate 3-dioxygenase	Q05963	1,52E-60	99	P:flavonoid biosynthetic process; F:naringenin 3-dioxygenase activity; F:L-ascorbic acid binding; F:iron ion binding; P:oxidation reduction; F:oxidoreductase activity, acting on single donors with incorporation of molecular oxygen, incorporation of two atoms of oxygen	EC:1.14.11.9; EC:1.13.11.0	no IPS match
445D4NI-I	protein	XP_002318216	3,69E-71	72	C:mitochondrion		no IPS match
447D4NI-I	actin 7	ABK96176	2,68E-65	97	C:cytoskeleton; C:cytoplasm; F:ATP binding; F:protein binding		no IPS match
450D4NI-I	wd-40 repeat protein	XP_002281247	6,45E-11	89	F:protein binding; C:CUL4 RING ubiquitin ligase complex		no IPS match
451D4NI-I	skp1-like 2	ABB77425	1,10E-34	92	P:ubiquitin-dependent protein catabolic process; F:protein binding		no IPS match
452D4NI-I	kunitz-type protease inhibitor kpi-d2	XP_002331922	1,92E-10	44	F:endopeptidase inhibitor activity		no IPS match
455D4NI-I	unconventional myosin heavy chain	AAB71529	2,39E-26	97	F:actin binding; C:myosin complex; F:ATP binding; F:motor activity		no IPS match
456D4NI-I	ap2 erf domain-containing transcription factor	AAO13360	6,74E-22	65	F:DNA binding		IPR001471; IPR016177
464D4NI-I	inosine-uridine nucleoside n-ribohydrolase	CBI30265	7,46E-67	88	F:hydrolase activity		no IPS match
465D4NI-I	predicted protein [Populus trichocarpa]	XP_002329006	4,30E-13	64	P:P		no IPS match

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
466D4NI-I	at5g01340 t10o8_50	ACU18503	1,29E-11	97	F:binding; C:mitochondrial inner membrane; P:mitochondrial transport; C:integral to membrane; C:plastid; F:transporter activity		IPR001993; PTHR11896:SF62 (PANTHER), SignalP (SIGNALP)
467D4NI-I	predicted protein [Populus trichocarpa]	XP_002301449	5,93E-09	65	F:DNA binding		no IPS match
468D4NI-I	auxin-repressed protein	XP_002283180	4,56E-09	80	F:F		no IPS match
469D4NI-I	signal recognition particle 54 kD protein	XP_002517663	1,30E-48	98	F:mRNA binding; P:SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane; C:signal recognition particle, endoplasmic reticulum targeting; F:nucleoside-triphosphatase activity; F:7S RNA binding	EC:3.6.5.4; EC:3.6.1.15	no IPS match
471D4NI-I	glutathione transferase	ABQ96852	6,80E-46	75	P:response to stimulus; F:transferase activity		IPR004046; IPR010987; IPR017933; PTHR11260 (PANTHER), PTHR11260:SF8 (PANTHER), SignalP (SIGNALP)
472D4NI-I	translation initiation factor (eif-4a)	AAR23806	8,05E-78	98	P:translational initiation; F:ATP-dependent helicase activity; P:response to cadmium ion; C:plasma membrane; F:RNA binding; F:protein binding; C:cell wall; F:ATP binding; F:translation initiation factor activity		no IPS match
473D4NI-I	delta-12 oleate desaturase	ACR15954	5,68E-56	76	C:endoplasmic reticulum; P:metabolic process; F:delta12-fatty acid dehydrogenase activity; F:omega-6 fatty acid desaturase activity	EC:1.14.99.33	no IPS match

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
474D4NI-I	protein	CBI34472	2,48E-55	92	No GO term found		no IPS match
476D4NI-I	calcium-dependent protein	XP_002281956	1,03E-08	82	F:calmodulin-dependent protein kinase activity; EC:2.7.11.17 P:protein amino acid phosphorylation; C:plasma membrane; F:calcium-dependent protein serine/threonine phosphatase activity; F:protein binding; F:calcium ion binding; F:ATP binding		SignalP (SIGNALP)
477D4NI-I	cold acclimation protein	XP_002270855	1,14E-21	46	P:P		no IPS match
478D4NI-I	3-like protein	ACV71016	1,50E-71	82	C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; C:integral to membrane		no IPS match
479D4NI-I	pectate lyase	AAB69766	2,36E-29	68	C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle		no IPS match
480D4NI-I	histone h1	ACG31918	4,12E-17	89	C:nucleosome; F:DNA binding; P:nucleosome assembly; C:nucleus		SignalP (SIGNALP)
481D4NI-I	flavine-containing monooxygenase	XP_002520689	7,67E-25	75	No GO term found		SignalP (SIGNALP)
483D4NI-I	p23 tumor	XP_002516930	3,66E-71	92	C:cytoplasm; F:calcium ion binding		no IPS match
484D4NI-I	vacuolar atp synthase subunit c	XP_002275510	6,49E-157	94	C:vacuolar proton-transporting V-type ATPase, V1 domain; C:plant-type vacuole; P:ATP synthesis coupled proton transport; F:proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism; P:lignin biosynthetic process; P:unidimensional cell growth; C:chloroplast; C:plasma membrane	EC:3.6.3.14	no IPS match
485D4NI-I	vacuolar sorting protein	XP_002319833	3,11E-126	96	C:ESCRT II complex; P:vesicle-mediated transport		IPR007286; SSF46785 (SUPERFAMILY)

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
488D4NI-I	zip transporter	BAE48709	3,33E-44	85	C:integral to membrane; P:response to nematode; P:zinc ion transport; F:zinc ion transmembrane transporter activity		IPR003689; PTHR11040 (PANTHER), PTHR11040:SF1 (PANTHER), SignalP (SIGNALP)
491D4NI-I	succinate dehydrogenase subunit 3	ACU13221	3,12E-10	64	F:succinate dehydrogenase activity; P:mitochondrial electron transport, succinate to ubiquinone; C:membrane; C:mitochondrion	EC:1.3.99.1	no IPS match
492D4NI-I	kinase interacting protein 1-like	CBI25338	2,06E-23	75	No GO term found		no IPS match
493D4NI-I	glyceraldehyde 3-phosphate	AAR84410	1,84E-82	99	F:glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating) activity; C:cytosol; P:seed development; P:response to sucrose stimulus; P:response to salt stress; P:oxidation reduction; P:response to heat; F:NAD or NADH binding; P:glycolysis; P:gluconeogenesis; C:mitochondrial envelope; C:chloroplast; P:response to cadmium ion; P:response to hydrogen peroxide; C:nucleus; C:plasma membrane; C:apoplast	EC:1.2.1.12	no IPS match
494D4NI-I	14-3-3 protein	XP_002285700	1,04E-90	94	P:defense response to bacterium; C:plant-type cell wall; F:protein domain specific binding; P:response to cadmium ion; C:plasma membrane; F:protein phosphorylated amino acid binding; C:chloroplast; C:nucleus; C:cytosol; P:brassinosteroid mediated signaling pathway		no IPS match
495D4NI-I	syntaxin-81 short= 81	XP_002316241	2,67E-41	83	F:protein binding; P:vesicle-mediated transport; C:membrane		no IPS match

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
496D4NI-I	dead box atp-dependent rna	ADB07168	7,38E-92	96	F:nucleic acid binding; F:ATP binding; F:ATP-dependent helicase activity		no IPS match
497D4NI-I	11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase-like	XP_002511144	1,24E-06	61	C:endomembrane system; P:response to abscisic acid stimulus; F:oxidoreductase activity; P:response to brassinosteroid stimulus		no IPS match
498D4NI-I	stress enhanced protein 2	XP_002528680	4,51E-09	53	No GO term found		no IPS match
498D4NI-I	stress enhanced protein 2	XP_002306351	2,71E-46	70	F:DNA binding; F:protein binding; P:ovule development; C:chloroplast thylakoid membrane		PF00504 (PFAM)
500D4NI-I	TC57166				No GO term found		
505D4NI-I	cytosolic glutamine synthetase	Q43785	1,39E-74	98	C:cytoplasm; F:glutamate-ammonia ligase activity; P:nitrogen fixation; P:glutamine biosynthetic process	EC:6.3.1.2	no IPS match
506D4NI-I	obe2 protein binding zinc ion binding	AAP22954	7,51E-50	91	C:plastid; F:protein binding; P:maintenance of shoot apical meristem identity; P:root meristem specification; P:maintenance of root meristem identity; C:nucleus		no IPS match
507D4NI-I	peptidyl-prolyl isomerase cwc27	NP_001148692	3,75E-04	53	F:peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity; F:isomerase activity		no IPS match
508D4NI-I	21 kda protein	XP_002263278	1,69E-35	82	F:pectinesterase activity; F:pectinesterase inhibitor activity	EC:3.1.1.11	no IPS match
509D4NI-I	rna polymerase iii subunit-like protein	XP_002267664	2,59E-44	77	C:endomembrane system; F:DNA-directed RNA polymerase activity; P:transcription; F:DNA binding		no IPS match
514D4NI-I	adeninephosphoribosyl transferase	ABB86271	1,36E-45	93	F:adenine phosphoribosyltransferase activity; C:plant-type cell wall; P:phosphate transport; C:plasma membrane; F:inorganic phosphate transmembrane transporter activity; F:sugar:hydrogen symporter activity; P:nucleoside metabolic process; C:chloroplast; C:cytosol; P:adenine salvage	EC:2.4.2.7	SignalP (SIGNALP)

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
515D4NI-I	TO86-3 [Taraxacum officinale]	ABA27037	1,53E-04	76	No GO term found		SignalP (SIGNALP)
517D4NI-I	predicted protein [Populus trichocarpa]	XP_002308081	9,86E-44	76	C:nucleus; P:cellular response to phosphate starvation		no IPS match
519D4NI-I	predicted protein [Populus trichocarpa]	XP_002309816	6,09E-42	72	C:plastid		IPR012881
520D4NI-I	clathrin assembly protein ap17-like protein	XP_002268045	2,53E-44	100	F:protein binding; C:membrane coat; F:protein transporter activity; P:vesicle-mediated transport; P:intracellular protein transport; C:mitochondrion		SignalP (SIGNALP)
521D4NI-I	triosephosphate cytosolic	XP_002283693	2,44E-87	94	C:cytoplasm; P:gluconeogenesis; P:fatty acid biosynthetic process; F:triose-phosphate isomerase activity; P:pentose-phosphate shunt; P:glycolysis	EC:5.3.1.1	no IPS match
522D4NI-I	uncharacterized protein at2g23090	BAH97744	2,97E-32	100	F:F; P:P		no IPS match
524D4NI-I	monodehydroascorbate reductase	ABK32073	4,39E-20	50	P:oxidation reduction; C:cytoplasm; F:oxidoreductase activity; F:monodehydroascorbate reductase (NADH) activity; F:FAD binding		no IPS match
525D4NI-I	UDP-glucosyltransferase, putative [Ricinus communis]	XP_002519419	9,03E-71	79	F:transferase activity, transferring glycosyl groups		no IPS match
526D4NI-I	extracellular calcium sensing receptor	ACU20222	2,82E-59	85	C:chloroplast thylakoid membrane; F:receptor activity; C:mitochondrion		no IPS match
527D4NI-I	endo-xyloglucan transferase-like protein	ABL10091	2,11E-14	75	P:response to water deprivation; F:catalytic activity		IPR008985; IPR010713; IPR013320
530D4NI-I	rd2 protein	XP_002512913	3,54E-54	89	P:response to desiccation		no IPS match
531D4NI-I	cyclin-like protein	XP_002529611	3,47E-16	47	No GO term found		no IPS match
533D4NI-I	unnamed protein product [Vitis vinifera]	CBI18775	2,22E-11	73	C:plasma membrane		SignalP (SIGNALP)

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
537D4NI-I	hypothetical protein [Vitis vinifera]	XP_002275221	1,16E-89	95	P:protein folding; C:endoplasmic reticulum lumen; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; C:plasma membrane; F:heat shock protein binding; F:unfolded protein binding		IPR002939; IPR003095; IPR008971; IPR015609; G3DSA:2.60.260.20 (GENE3D), PTHR11821:SF69 (PANTHER) no IPS match
538D4NI-I	sec24-like copii protein	XP_002311138	3,94E-37	45	C:COPII vesicle coat; P:ER to Golgi vesicle-mediated transport; F:zinc ion binding; P:intracellular protein transport; F:protein binding; P:protein transport; P:transport		no IPS match
540D4NI-I	unnamed protein product [Vitis vinifera]	XP_002282028	2,63E-57	77	No GO term found		no IPS match
541D4NI-I	eukaryotic translation initiation factor 3	XP_002285591	6,05E-22	93	C:eukaryotic translation initiation factor 3 complex; P:translational initiation; F:RNA binding; F:protein binding; F:translation initiation factor activity; F:nucleotide binding		no IPS match
542D4NI-I	40s ribosomal protein	ACF06624	2,44E-26	100	C:ribosome; F:structural constituent of ribosome; P:translation; F:rRNA binding	EC:3.6.5.3	no IPS match
543D4NI-I	PREDICTED: hypothetical protein isoform 1	XP_002275261	1,16E-54	67	C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; C:vacuole		no IPS match
545D4NI-I	chloroplast light-harvesting chlorophyll a b-binding protein	ABW89216	6,87E-25	100	C:membrane; C:chloroplast; P:photosynthesis, light harvesting		no IPS match
546D4NI-I	cell division related protein	EFH61104	2,70E-54	78	F:DNA binding; F:heat shock protein binding		IPR001005; IPR009057; IPR014778; IPR015609; IPR017877; PTHR11821:SF29 (PANTHER)

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
548D4NI-I	hypothetical protein [Helianthus annuus]	AAR23802	1,23E-06	68	No GO term found		no IPS match
550D4NI-I	f1f0-atpase inhibitor protein	XP_002523820	6,93E-23	71	C:nucleolus; C:vacuole; C:respiratory chain complex I; P:photorespiration; C:mitochondrial membrane		no IPS match
552D4NI-I	glutaredoxin protein	XP_002270781	9,70E-20	93	C:endomembrane system; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle		no IPS match
553D4NI-I	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	CAN72399	3,33E-69	77	C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; C:endoplasmic reticulum		no IPS match
554D4NI-I	seed protein	CAN75850	7,28E-39	77	P:response to jasmonic acid stimulus; P:defense response to fungus, incompatible interaction; C:peroxisome; C:chloroplast stroma; C:cytosol		no IPS match
556D4NI-I	high mobility group family	CAJ38371	1,92E-26	96	P:chromatin assembly or disassembly; C:chromatin; C:nucleus; F:transcription factor activity; F:structural constituent of chromatin; F:chromatin binding		no IPS match
558D4NI-I	acyl carrier protein	ACE06753	3,42E-38	80	P:fatty acid biosynthetic process; F:acyl carrier activity; F:cofactor binding; C:chloroplast; F:phosphopantetheine binding		no IPS match
564D4NI-I	amb a	AAX85388	3,69E-73	81	F:pectate lyase activity; P:P		no IPS match
566D4NI-I	chloroplast light-harvesting chlorophyll a b-binding protein	ABW89213	6,22E-30	100	P:photosynthesis, light harvesting; C:photosystem II; F:magnesium ion binding; P:protein-chromophore linkage; F:chlorophyll binding; C:integral to membrane; C:chloroplast;		no IPS match
568D4NI-I	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	XP_002514361	2,64E-41	89	C:chloroplast		SignalP (SIGNALP)

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
569D4NI-I	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	XP_002524437	9,34E-23	68	C:plastid		no IPS match
570D4NI-I	tha1 (threonine aldolase 1) aldehyde-lyase threonine aldolase	CBI22386	4,96E-48	90	F:threonine aldolase activity; P:threonine catabolic process	EC:4.1.2.5	no IPS match
572D4NI-I	amino acid permease 6	ADB92670	2,23E-64	88	P:aspartate transport; P:response to nematode; F:neutral amino acid transmembrane transporter activity; P:neutral amino acid transport; F:acidic amino acid transmembrane transporter activity; C:plasma membrane; P:tryptophan transport		no IPS match
573D4NI-I	serine-threonine protein	XP_002265619	5,85E-57	90	C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle		no IPS match
574D4NI-I	short-chain dehydrogenase reductase family protein	XP_002274932	8,79E-45	78	P:metabolic process; C:chloroplast inner membrane		no IPS match
13D4NI-I	No similarity				No GO term found		
40D4NI-I	No similarity				No GO term found		
75D4NI-I	No similarity				No GO term found		
90D4NI-I	No similarity				No GO term found		
96D4NI-I	No similarity				No GO term found		
110D4NI-I	No similarity				No GO term found		
131D4NI-I	No similarity				No GO term found		
149D4NI-I	No similarity				No GO term found		
153D4NI-I	No similarity				No GO term found		
159D4NI-I	No similarity				No GO term found		
169D4NI-I	No similarity				No GO term found		
207D4NI-I	No similarity				No GO term found		
228D4NI-I	No similarity				No GO term found		
262D4NI-I	No similarity				No GO term found		

Tabla Anexa 10 - Lista de clones no redundantes de la Clonoteca D4NI-I con su correspondiente identificación GO, similitud BLASTX (identificación), su código enzimático EC asociado y resultado InterProScan

Secuencia	Descripción	Hit ACC	E-Value	Similitud	GOs	Código enzimático	InterProScan
263D4NI-I	No similarity				No GO term found		
316D4NI-I	No similarity				No GO term found		
327D4NI-I	No similarity				No GO term found		
340D4NI-I	No similarity				No GO term found		
341D4NI-I	No similarity				No GO term found		
356D4NI-I	No similarity				No GO term found		
367D4NI-I	No similarity				No GO term found		
375D4NI-I	No similarity				No GO term found		
385D4NI-I	No similarity				No GO term found		no IPS match
387D4NI-I	No similarity				No GO term found		
396D4NI-I	No similarity				No GO term found		SignalP (SIGNALP)
403D4NI-I	No similarity				No GO term found		
436D4NI-I	No similarity				No GO term found		
441D4NI-I	No similarity				No GO term found		
443D4NI-I	No similarity				No GO term found		
446D4NI-I	No similarity				No GO term found		
449D4NI-I	No similarity				No GO term found		
453D4NI-I	No similarity				No GO term found		
486D4NI-I	No similarity				No GO term found		
489D4NI-I	No similarity				No GO term found		
490D4NI-I	No similarity				No GO term found		
501D4NI-I	No similarity				No GO term found		
502D4NI-I	No similarity				No GO term found		
510D4NI-I	No similarity				No GO term found		
529D4NI-I	No similarity				No GO term found		
535D4NI-I	No similarity				No GO term found		
559D4NI-I	No similarity				No GO term found		
565D4NI-I	No similarity				No GO term found		