

AUTORA

Amparo Primo Capella

DIRECTORA

M^a Ángeles Forner Giner

TUTOR ACADÉMICO

Carlos Mesejo Conejos

Caracterización fisiológica y molecular de la respuesta de patrones de cítricos a estrés por baja temperatura



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Recursos
y Tecnologías Agrícolas

Marzo, 2023



Caracterización fisiológica y molecular de la respuesta de patrones de cítricos a estrés por baja temperatura

AUTORA

Amparo Primo Capella

DIRECTORA

M^a Ángeles Forner Giner

TUTOR ACADÉMICO

Carlos Mesejo Conejos



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Recursos
y Tecnologías Agrícolas

Marzo, 2023

Agradecimientos

Muchas gracias a mi directora María Ángeles Forner por su paciencia, esfuerzo, apoyo y aliento tanto profesional como personal. ¡Nada era suficiente! Parecía que no llegaba nunca el final, pero, gracias por estar ahí, confiar y apostar por mí y permitirme alcanzarlo juntas.

Gracias a mi tutor de tesis Carlos Mesejo. Porque el día que te conocí me dijiste que no querías ser sólo un tutor “sobre el papel” y creo que lo hemos cumplido.

A Carmen, Jesús y Mary, porque han sido como unos padres, gracias por apoyarme siempre y ser la voz de la experiencia. No imagino mi estancia en el laboratorio de otra manera sin vosotros.

A mis “Hortis” Chelo, Yaiza, Eva... Porque no podría haber tenido unas mejores compañeras de departamento gracias, gracias y mil gracias. A tí, Lidia, porque no sólo hemos sido compañeras, hemos sido amigas y hemos hecho muchas horas de “terapia”. Porque una tesis doctoral no es fácil y se vive mejor cuando tienes a alguien que te comprende al lado. Muchas gracias, Ángeles Calatayud, por tener siempre el despacho abierto para cualquier duda y por hacer de vuestro laboratorio mi segunda casa.

A Ana Quiñones, por saber escuchar y dar los mejores consejos tanto personales como científicos. A Almudena Bermejo y Julia, gracias por el apoyo y estar ahí siempre.

Al grupo de postcosecha de Alejandra Salvador, Carmen, Rebeca, Pilar... Muchas gracias por vuestra ayuda y disposición. Siempre me he sentido como una más del equipo.

A mis padres, a mi hermano, en definitiva, a mi familia porque ellos me han inculcado los valores de la lucha, perseverancia, paciencia, independencia y me han empujado y apoyado para llegar a ser lo que soy...una cabezona enorme que, mejor o peor, ha conseguido sacar este doctorado.

A mi marido, amante, compañero, mejor amigo, mi todo... por estar día a día y vivir conmigo los mejores y peores momentos de estos años. Gracias por escucharme y acompañarme, porque siempre has estado pendiente de todos los problemas que surgían durante estos años.

A mis “Agustinas” Carol, Marina y Elena. Gracias por estar ahí para y por todo durante este tiempo. Sabéis lo mucho que ha costado. Nunca olvidaré vuestro intento por intentar leer y comprender el primer artículo que escribí de la tesis. Gracias por saber valorar un trabajo tan difícil de valorar, invisible e intangible para mucha gente como es la investigación. Porque un médico salva vidas, un arquitecto construye edificios y un cocinero alimenta el estómago y el alma... pero ¿qué hace un científico? ¿Piensa? Esta profesión va más allá, en ocasiones es difícil de explicar y ahí, está la clave.

Resumen

A escala mundial, la Citricultura es uno de los sectores dentro de la Fruticultura con mayor producción, superando los 158 millones de toneladas en el año, pero es sensible de un gran número de estreses abióticos al ser un cultivo subtropical. La baja temperatura es uno de los estreses abióticos que más afecta a los cítricos produciendo grandes pérdidas anuales. El cambio climático está muy presente dando lugar cambios en los patrones de El tiempo originando un gran número de olas de frío y calor. Pero gracias a la técnica del injerto y al uso de patrones de cítricos los problemas causados por los estreses abióticos pueden mejorarse. El IVIA cuenta con un programa de mejora de patrones cuyo objetivo es la búsqueda de nuevo material vegetal con el fin de satisfacer los problemas de la citricultura. Tradicionalmente, el patrón más tolerante a la baja temperatura es *Poncirus trifoliata*, el cual se han realizado la mayoría de los trabajos en la bibliografía. Como patrón sensible, se empleó *Citrus macrophylla* ya que se trata de un patrón del tipo limonero que se sabe popularmente de su sensibilidad al frío. También se empleó el patrón citrange Carrizo, el cual se trata de patrón comercial más cultivado en España en la actualidad y la variedad Tarocco Rosso, que se sabe de su pigmentación a causa de la baja temperatura. Así pues, los capítulos planteados en la presente tesis fueron: 1. *Estrés a baja temperatura a corto plazo*, 2. *Estrés a baja temperatura a largo plazo* y 3. *El efecto del patrón en la variedad Tarocco Rosso*.

Del capítulo 1 se extrajo que el mejor experimento para el rastreo de patrones de cítricos tolerantes a bajas temperaturas a corto plazo fue aplicando un estrés a 4 °C durante 5 días con períodos de aclimatación de 0, 5, 10 y 24 horas. Los genes que se seleccionaron como candidatos para realizar el rastreo de selección fueron los genes putativos de *CAMTA3*, *CAMTA5*, *CBF1* y *COR413IM1*. A pesar de no obtener la inducción de los genes putativos de síntesis y transporte de prolina a tiempos cortos, no se descartó como posible osmolito importante en la respuesta a frío dada la expresión basal del transportador *PROT2* en el patrón *Poncirus trifoliata*.

En el capítulo 2 se averiguó que la expresión de los genes *CP22*, *PSB27* y *PSB28* podrían ser los responsables de la mayor protección de los fotosistemas del patrón Carrizo frente al exceso de irradiación causado por la parada de la fotosíntesis. Lo que le podría conferir una mayor recuperación de la actividad fotosintética del FSII. Las acuaporinas resultaron tener una pequeña contribución en las relaciones hídricas del patrón tolerante Carrizo promoviendo un mayor paso de agua a nivel apoplástico repercutiendo en el potencial hídrico y en una menor deshidratación. La inducción de los genes de respuesta a baja temperatura tuvo lugar a partir de la ruta dependiente e independiente de CBF en ambos patrones,

aunque en mayor medida en el patrón Carrizo. Estos resultados sugieren que, a 15 días de frío, las plantas injertadas con el patrón Carrizo estaban ya totalmente aclimatadas a la exposición a bajas temperaturas, mientras que el patrón *Citrus macrophylla* continuaba luchando por mantener el ajuste de la expresión de miles de genes con el fin de enfrentarse al estrés. El estrés por exceso de irradiación podría estar activando a *HY5* en mayor medida en el patrón Carrizo, lo que podría estar activando la ruta de síntesis de antocianos dando lugar a una mejor aclimatación. El aminoácido prolina, el azúcar rafinosa y los antocianos podrían estar actuando como protectores de los fotosistemas y antioxidantes de mayor manera en las plantas injertadas con el patrón Carrizo. La mayor síntesis y concentración de hormona ABA en las raíces del patrón Carrizo junto con una mayor expresión génica en Carrizo de los genes transportadores de la familia *NRT1*, *ABCG40* y *ABCG22* sugieren una conexión entre patrón-variedad que estaría promoviendo una mayor señalización de la respuesta a ABA aportando una mejora en su respuesta frente a bajas temperaturas. Todo ello sugiere que la tolerancia a bajas temperaturas en los cítricos es un carácter transmisible de patrón a variedad y que además sería un carácter cuantitativo en el que estarían implicados muchos genes ejerciendo pequeños efectos aditivos.

En el capítulo 3 se obtuvo que Los frutos de Tarocco Rosso cultivados con el patrón citrange Carrizo tolerante a bajas temperaturas obtuvieron una mayor habilidad para la síntesis de ácido ferúlico y ácido clorogénico, dos potentes antioxidantes de interés comercial. Los frutos de Tarocco Rosso cultivados con el patrón citrange Carrizo tolerante a bajas temperaturas obtuvieron una mayor concentración de cianidin 3-(6'-malonilglucósido), cianidin 3-glucósido, delphinidín 3-glucósido y cianidin 3-(6'-dioxalil)-glucósido, antocianinas causantes de la deseada coloración en zumo de naranjas pigmentadas gracias al aumento de expresión de los genes de biosíntesis de antocianinas y flavonoides *FLS*, *DFR*, *CHS* y *CHI*. La activación de la ruta de antocianinas correlacionó con la activación del factor de transcripción putativo *PAP1*, por lo que se podría proponer como un posible inductor de la ruta de antocianinas en cítricos.

El tratamiento de postcosecha a 9 °C fue el tratamiento que mayor inducción produjo en la ruta de síntesis de antocianinas. Finalmente pudimos concluir que la elección de un patrón tolerante a bajas temperaturas, como es el caso de citrange Carrizo, potencia las cualidades deseadas de coloración y por ende de concentración de antocianos en los frutos de la variedad pigmentada Tarocco Rosso.

Resum

A escala mundial, la Citricultura és un dels sectors dins de la Fruticultura amb més producció, superant els 158 milions de tones a l'any, però és sensible d'un gran nombre d'estressos abiòtics per ser un cultiu subtropical. La baixa temperatura és un dels estressos abiòtics que més afecta els cítrics produint grans pèrdues anuals. El canvi climàtic està molt present donant lloc a canvis en els patrons de El temps originant un gran nombre d'onades de fred i calor. Però gràcies a la tècnica de l'empelt i a l'ús de patrons de cítrics, els problemes causats pels estressos abiòtics es poden millorar. L'IVIA compta amb un programa de millora de patrons que té com a objectiu la recerca de nou material vegetal per tal de satisfer els problemes de la citricultura. Tradicionalment, el patró més tolerant a la baixa temperatura és *Poncirus trifoliata*, el qual s'han realitzat la majoria dels treballs a la bibliografia. Com a patró sensible, es va fer servir *Citrus macrophylla* ja que es tracta d'un patró del tipus llimoner que se sap popularment de la seva sensibilitat al fred. També es va emprar el patró citrange Carrizo, el qual es tracta del patró comercial més cultivat a Espanya actualment i la varietat Tarocco Rosso, que se sap de la seva pigmentació a causa de la baixa temperatura. Així doncs, els capítols plantejats en aquesta tesi van ser: 1. *Estrès a baixa temperatura a curt termini*, 2. *Estrès a baixa temperatura a llarg termini* i 3. *L'efecte del patró en la varietat Tarocco Rosso*.

Del capítol 1 es va obtenir que el millor experiment per al rastreig de patrons de cítrics tolerants a baixes temperatures a curt termini va ser aplicant un estrès a 4 °C durant 5 dies amb períodes d'aclimatació de 0, 5, 10 i 24 hores. Els gens que es van seleccionar com a candidats per fer el rastreig de selecció van ser els gens putatius de *CAMTA3*, *CAMTA5*, *CBF1* i *COR413IM1*. Tot i no obtenir la inducció dels gens putatius de síntesi i transport de prolina a temps curts, no es va descartar com a possible osmolit important en la resposta a fred atesa l'expressió basal del transportador *PROT2* al patró *Poncirus trifoliata*.

Al capítol 2 es va descobrir que l'expressió dels gens *CP22*, *PSB27* i *PSB28* podrien ser els responsables de la major protecció dels fotosistemes del patró Carrizo davant l'excés d'irradiació causat per la parada de la fotosíntesi. El que li podria conferir una recuperació més gran de l'activitat fotosintètica del FSII. Les aquaporines van resultar tenir una menuda contribució en les relacions hídriques del patró tolerant Carrizo promovent un pas d'aigua més gran a nivell apoplàstic repercutint en el potencial hídric i en una menor deshidratació. La inducció dels gens de resposta a baixa temperatura va tenir lloc a partir de la ruta dependent i independent de CBF en ambdós patrons, encara que més en el patró Carrizo. Aquests resultats suggereixen que, a 15 dies de fred, les plantes empeltades amb el patró Carrizo estaven totalment aclimatades

a l'exposició a baixes temperatures, mentre que el patró *Citrus macrophylla* continuava lluitant per mantenir l'ajust de l'expressió de milers de gens per tal d'enfrontar-se a l'estrès. L'estrès per excés d'irradiació podria estar activant *HY5* en major mesura en el patró Carrizo, cosa que podria estar activant la ruta de síntesi d'antocians donant lloc a una millor aclimatació. L'aminoàcid prolina, el sucre rafinosa i els antocians podrien estar actuant com a protectors dels fotosistemes i antioxidants de més manera a les plantes empeltades amb el patró Carrizo. La major síntesi i concentració d'hormona ABA a les arrels del patró Carrizo juntament amb una major expressió gènica en Carrizo dels gens transportadors de la família *NRT1*, *ABCG40* i *ABCG22* suggereixen una connexió entre patró-varietat que estaria promovent una senyalització més gran de la resposta a ABA aportant una millora en la resposta davant de baixes temperatures. Tot això suggereix que la tolerància a baixes temperatures en els cítrics és un caràcter transmissible de patró a varietat i que a més seria un caràcter quantitatiu en què estarien implicats molts gens exercint xicotets efectes additius.

Al capítol 3 es va obtenir que Els fruits de Tarocco Rosso cultivats amb el patró citrange Carrizo tolerant a baixes temperatures van obtenir una habilitat més gran per a la síntesi d'àcid ferúlic i àcid clorogènic, dos potents antioxidants d'interès comercial. Els fruits de Tarocco Rosso cultivats amb el patró citrange Carrizo tolerant a baixes temperatures van obtenir una major concentració de cianidin 3-(6'-malonilglucòsid), cianidín 3-glucòsid, delphinidí 3-glucòsid i cianidín 3-(6'-diox glucòsid, antocianines causants de la desitjada coloració en suc de taronges pigmentades gràcies a l'augment d'expressió dels gens de biosíntesi d'antocianines i flavonoides *FLS*, *DFR*, *CHS* i *CHI*. L'activació de la ruta d'antocianines va correlacionar amb l'activació del factor de transcripció putatiu *PAP1*, per la qual cosa es podria proposar com a possible inductor de la ruta d'antocianines en cítrics.

El tractament de postcollita a 9 °C va ser el tractament que més inducció va produir a la ruta de síntesi d'antocianines. Finalment vam poder concloure que l'elecció d'un patró tolerant a baixes temperatures, com és el cas de citrange Carrizo, potencia les qualitats desitjades de coloració i, per tant, de concentració d'antocians en els fruits de la varietat pigmentada Tarocco Rosso.

Abstract

On a global scale, Citriculture is one of the sectors within Fruit Growing with the highest production, exceeding 158 million tons per year, but it is sensitive to many abiotic stresses as it is a subtropical crop. Low temperature is one of the abiotic stresses that most affects citrus, producing large annual losses. Climate change is very present, giving rise to changes in weather patterns, causing many cold and heat waves. But thanks to the grafting technique and the use of citrus rootstocks, problems caused by abiotic stresses can be improved. IVIA institute has a rootstock improvement program whose objective is to search for new plant material to satisfy the problems of Citriculture. Traditionally, the most low-temperature tolerant rootstock is *Poncirus trifoliata*, on which most of the work in the literature has been done. As a sensitive rootstock, *Citrus macrophylla* was used since it is a lemon type rootstock that is popularly known for its sensitivity to cold. The Carrizo citrange rootstock was also used, which is currently the most cultivated commercial rootstock in Spain, and the Tarocco Rosso variety, which is known for its pigmentation due to low temperature. Thus, the chapters proposed in this thesis were: 1. *Short-term low-temperature stress*, 2. *Long-term low-temperature stress*, and 3. *The rootstock effect on the Tarocco Rosso variety*.

From Chapter 1 it was concluded that the best experiment for screening citrus rootstocks tolerant to low temperatures in the short term was applying a stress at 4 °C for 5 days with acclimatization periods of 0, 5, 10 and 24 hours. The genes that were selected as candidates for screening were the putative *CAMTA3*, *CAMTA5*, *CBF1* and *COR413IM1* genes. Despite not obtaining the induction of putative proline synthesis and transport genes in short times, it was not ruled out as a possible important osmolyte in the response to cold given the basal expression of the *PROT2* transporter in the *Poncirus trifoliata* rootstock.

In chapter 2 it was found that the expression of the *CP22*, *PSB27* and *PSB28* genes could be responsible for the greater protection of the Carrizo rootstock photosystems against excess irradiation caused by the stoppage of photosynthesis. What could confer a greater recovery of the photosynthetic activity of the FSII. The aquaporins turned out to have a small contribution to the water relations of the tolerant Carrizo rootstock, promoting a greater passage of water at the apoplastic level, affecting the water potential and less dehydration. The induction of response genes at low temperature took place from the CBF-dependent and -independent pathway in both rootstocks, although to a greater extent in the Carrizo rootstock. These results suggest that, after 15 days of cold, the plants grafted with the Carrizo rootstock were already fully acclimatized to exposure to low temperatures, while the *Citrus macrophylla*

rootstock continued to struggle to maintain the adjustment of the expression of thousands of genes with the rootstock. In order to cope with stress. The stress due to excess irradiation could be activating *HY5* to a greater extent in the Carrizo rootstock, which could be activating the anthocyanin synthesis pathway, leading to better acclimatization. The amino acid proline, the sugar raffinose and the anthocyanins could be acting as protectors of the photosystems and antioxidants in a greater way in the plants grafted with the Carrizo rootstock. The higher synthesis and concentration of ABA hormone in the roots of the Carrizo rootstock together with a higher gene expression in Carrizo of the transporter genes of the *NRT1*, *ABCG40* and *ABCG22* family suggest a connection between rootstock-variety that would be promoting a greater response signalling to ABA providing an improvement in its response to low temperatures. All this suggests that tolerance to low temperatures in citrus is a trait that can be transmitted from rootstock to variety and that it would also be a quantitative trait in which many genes would be involved, exerting small additive effects.

In Chapter 3 it was found that Tarocco Rosso fruits grown with the citrange Carrizo rootstock tolerant to low temperatures obtained a greater ability to synthesise ferulic acid and chlorogenic acid, two powerful antioxidants of commercial interest. The fruits of Tarocco Rosso grown with the citrange Carrizo rootstock tolerant to low temperatures obtained a higher concentration of cyanidin 3-(6'-malonylglucoside), cyanidin 3-glucoside, delphinidin 3-glucoside and cyanidin 3-(6'-dioxalyl)-glycoside, anthocyanins that cause the desired coloration in pigmented orange juice thanks to the increased expression of the anthocyanin and flavonoid biosynthesis genes *FLS*, *DFR*, *CHS* and *CHI*. The activation of the anthocyanin pathway correlated with the activation of the putative transcription factor *PAP1*, so it could be proposed as a possible inducer of the anthocyanin pathway in citrus.

The postharvest treatment at 9 °C was the treatment that produced the greatest induction in the anthocyanin synthesis pathway. Finally, we were able to conclude that the choice of a rootstock tolerant to low temperatures, as is the case of citrange Carrizo, enhances the desired qualities of coloration and therefore of concentration of anthocyanins in the fruits of the pigmented variety Tarocco Rosso.

| | |
|--|----|
| Introducción | 01 |
| 1. Estrés abiótico | 01 |
| 2. Citricultura y estrés por frío | 02 |
| 3. Fundamentos de la respuesta a estrés por baja temperatura | 06 |
| 3.1 Respuesta molecular | 07 |
| 3.1.1 Respuesta a estrés por la ruta CBF independiente | 07 |
| 3.1.2 Respuesta a estrés por la ruta CBF dependiente | 07 |
| 3.1.3 Respuesta molecular en cítricos | 10 |
| 3.2 Respuesta fisiológica | 12 |
| 3.2.1 Fotosíntesis y baja temperatura | 12 |
| a. Fotoinhibición | 13 |
| 3.2.2 Potencial hídrico | 14 |
| a. Importancia de las acuaporinas y el transporte transcelular | 15 |
| b. PIPs y baja temperatura | 16 |
| 3.2.3 Respuesta fisiológica en cítricos | 16 |
| a. Respuesta del fotoperíodo | 16 |
| b. Respuesta de los cambios de membrana | 16 |
| c. Respuesta de las relaciones hídricas | 17 |
| 3.3 Respuesta bioquímica | 18 |
| 3.3.1 Osmoprotectores | 18 |
| 3.3.2 Prolina | 19 |
| 3.3.3 Antocianos. Biosíntesis, degradación y regulación | 20 |
| a. Biosíntesis y degradación | 20 |
| b. Regulación | 23 |
| 3.3.4 Respuesta bioquímica a baja temperatura en cítricos | 24 |
| a. Azúcares y almidón | 24 |
| b. Prolina | 24 |
| c. Antocianos | 25 |
| 3.4 Respuesta hormonal | 25 |
| 3.4.1 Ácido Abscísico | 25 |
| 3.4.2 Ácido Jasmónico | 26 |
| 3.4.3 Respuesta hormonal bajo estrés por baja temperatura en cítricos | 27 |
| 4. HIPÓTESIS | 28 |

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | Estrés por frío a corto plazo | 30 |
| | 1. Objetivos | 30 |
| | 2. Material y métodos | 31 |
| | 2.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento | 31 |
| | 2.1.1 Experimento 1 | 31 |
| | 2.1.2 Experimento 2 | 31 |
| | 2.2 Obtención de genes putativos | 32 |
| | 2.3 Aislamiento de RNA y cuantificación génica por RT-qPCR | 33 |
| | 2.4 Análisis estadísticos | 33 |
| | 3. Resultados | 34 |
| | 3.1 Experimento 1 | 34 |
| | 3.1.1 Respuesta génica a la baja temperatura en tiempos cortos | 34 |
| | 3.1.2 Expresión génica de la ruta de síntesis y transporte del aminoácido prolina y su cuantificación a tiempos cortos de exposición a baja temperatura | 36 |
| | 3.2 Experimento 2 | 38 |
| | 3.2.1 Expresión Relativa de genes putativos de respuesta a baja temperatura después de un período de aclimatación | 38 |
| | 3.2.2 Expresión génica de la ruta de síntesis y transporte del aminoácido prolina y su cuantificación a baja temperatura después de un período de aclimatación | 40 |
| | 4. Discusión | 44 |
| | 5. Conclusiones | 47 |

| | | |
|----------|---|----|
| 2 | Estrés por frío a largo plazo | 49 |
| | 1. Objetivos | 49 |
| | 2. Material y métodos | 50 |
| | 2.1. Experimento 3 | 50 |
| | 2.1.1 Material Vegetal y condiciones de crecimiento | 50 |
| | 2.1.2 Cálculo de la tasa de crecimiento | 50 |
| | 2.1.3 Actividad fotosintética | 51 |
| | 2.1.4 Componentes del potencial hídrico | 51 |
| | 2.1.5 RWC% (Relative Water Component) | 52 |

| | |
|---|-----------|
| 2.1.6. Medidas de fluorescencia | 52 |
| 2.1.7 Cuantificación de clorofila en hoja | 52 |
| 2.1.8 Extracción y cuantificación de Prolina | 52 |
| 2.1.9 Obtención de las secuencias de los genes putativos | 53 |
| 2.1.10 Aislamiento de RNA y cuantificación génica por RT-qPCR | 54 |
| 2.1.11 Análisis estadísticos | 54 |
| 2.2 Experimento 4 | 55 |
| 2.2.1 Material Vegetal y condiciones de crecimiento | 55 |
| 2.2.2 Azúcares solubles totales y almidón | 55 |
| 2.2.3 Extracción y cuantificación de Prolina | 55 |
| 2.2.4 Metabolitos secundarios | 56 |
| 2.2.5 Cuantificación de hormonas | 56 |
| 2.2.6 Aislamiento de RNA | 57 |
| 2.2.7 Análisis de la secuenciación de RNA | 58 |
| 2.2.8 Secuenciación del RNA y análisis de expresión | 59 |
| 2.2.9 Análisis estadísticos | 60 |
| 3. Resultados | 61 |
| 3.1 Experimento 3 | 61 |
| 3.1.1 Crecimiento vegetativo durante el ensayo a largo plazo de frío | 61 |
| 3.1.2 Cuantificación de la fotosíntesis a largo plazo a bajas temperaturas | 63 |
| 3.1.3 Relaciones hídricas, potencial osmótico, potencial hídrico y RWC% a bajas temperaturas a largo plazo | 64 |
| 3.1.4 Determinación de la fluorescencia de la clorofila durante bajas temperaturas a largo plazo | 66 |
| 3.1.5 Cuantificación de la concentración de prolina y los genes putativos de síntesis y degradación en frío a largo plazo | 70 |
| 3.2 Experimento 4 | 75 |
| 3.2.1 Cuantificación de osmoprotectores: almidón, azúcares totales y prolina en respuesta a frío a largo plazo | 75 |
| 3.2.2 La hormona ABA se acumula significativamente en las raíces del patrón Carrizo | 77 |
| 3.2.3 Las plantas de Citrus macrophylla presentaron más daños bajo estrés por frío | 78 |
| 3.2.4 Estudio transcriptómico y análisis de expresión diferencial | 80 |
| 3.2.4.1 Visión general del RNA-Seq | 80 |
| 3.2.4.2 La expresión diferencial entre Carrizo y Macrophylla es mayor a los 15 días de frío | 80 |

| | |
|--|------------|
| 3.2.4.3 La anotación funcional de los DEGs revela las rutas principales asociadas a la respuesta a frío a largo plazo | 81 |
| 3.2.4.4 Ruta de regulación CBF | 87 |
| 3.2.4.5 Señalización por luz y ciclo circadiano | 88 |
| 3.2.4.6 Cascadas de señalización de calcio y MAP kinasas | 89 |
| 3.2.4.7 Metabolismo de los azúcares y aminoácidos | 89 |
| 3.2.4.8 Metabolismo de antocianos y flavonoides | 91 |
| 3.2.4.9 Regulación hormonal | 91 |
| 3.2.4.10 Inhibición de la fotosíntesis, catabolismo de clorofilas y fluorescencia | 94 |
| 3.2.4.11 Acuaporinas PIP y las relaciones hídricas | 96 |
| 4. Discusión | 99 |
| 4.1 Parámetros fisiológicos. | 99 |
| 4.1.1 Los datos fisiológicos y transcriptómicos muestran diferencias relevantes entre los genotipos de patrones sensible y tolerante | 99 |
| 4.1.2 Fotosíntesis, fluorescencia y expresión génica | 99 |
| 4.1.3 Potencial hídrico y PIPs | 101 |
| 4.2. Datos transcriptómicos relacionados con la respuesta | 104 |
| 4.2.1 Activación de la respuesta a frío a largo plazo | 104 |
| 4.2.2 La acumulación de azúcares solubles fue mayor en carrizo y estos cambios correlacionan con la expresión génica | 109 |
| 4.2.3 Regulación hormonal | 110 |
| 4.2.4 Acumulación de prolina | 113 |
| 5. Conclusiones | 115 |

3

| | |
|--|------------|
| Efecto del patrón en la variedad pigmentada Tarocco Rosso | 116 |
| 1. Objetivos | 116 |
| 2. Material y métodos | 117 |
| 2.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento | 117 |
| 2.1.1 Experimento 5 | 117 |
| 2.1.2 Determinación de la calidad de fruto | 118 |

| | |
|---|-----|
| 2.1.3 Aislamiento de RNA y cuantificación de la expresión génica por RT-qPCR | 118 |
| 2.1.4 Cuantificación de polifenoles | 120 |
| 2.1.5 Análisis estadísticos | 121 |
| 3. Resultados | 121 |
| 3.1. Determinación de la calidad de la fruta | 121 |
| 3.2. Antocianinas, flavanonas y ácidos hidroxicinnámicos contenidos en los frutos | 124 |
| 3.3. Cuantificación transcriptómica de la ruta de biosíntesis de antocianos y regulación | 128 |
| 4. Discusión | 133 |
| 5. Conclusiones | 135 |

| | |
|-------------------------------|-----|
| Discusión General | 137 |
| Conclusiones Generales | 142 |
| Bibliografía | 143 |

Introducción

1. ESTRÉS ABIÓTICO

Las plantas son organismos sésiles que han de superar cualquier adversidad que ocurra a su alrededor, ya sea causado por cambios en el ambiente o por el ataque de algún agente externo. El estrés abiótico como la sequía, salinidad, cambios en las temperaturas (calor, frío y congelación), encharcamiento, toxicidad por metales pesados, desequilibrios nutricionales, ozono y radiaciones UV-B son los estreses principales que causan las pérdidas económicas de los cultivos (Anwar Hossain *et al.*, 2014).

Las plantas, por su naturaleza, siempre se han visto afectadas por el estrés abiótico, pero actualmente la frecuencia y la duración de dichos estreses se ha ido incrementando a causa del cambio climático y el calentamiento global. El cambio climático está produciendo cambios en la meteorología causando grandes sequías, olas de frío y encharcamiento por exceso de lluvias, entre otros. En referencia al cambio climático y el calentamiento global, puede parecer paradójico pensar en que las olas de frío puedan estar provocadas por el efecto invernadero. Actualmente hay muchas teorías sobre su origen, pero la realidad es que cada vez hay más cambios extremos dentro de las estaciones, relacionados con los regímenes hídricos, como lluvias intensas tras épocas de sequías extremas, o con desequilibrios térmicos, como inviernos con una temperatura media de 1 a 2 °C superior a los registros seguidos de olas de frío extremo (Rosenzweig *et al.*, 2001; Kodra, Steinhäuser and Ganguly, 2011; Cohen *et al.*, 2013; Trouet, Babst

and Meko, 2018). Es por ello, la importancia de nuevos programas de mejora con el fin de obtener nuevos cultivos más tolerantes a estreses abióticos. Los programas de mejora vegetal frente a estrés abiótico resultan muy complejos ya que se encuentran involucrados un gran número de rutas metabólicas. Para llevarlos a cabo, es necesario primero conocer bien el cultivo de interés, saber cómo le afecta el estrés a estudio y qué mecanismos de acción utiliza la planta para poder sobrevivir a él.

El estrés abiótico lleva a una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que afectan seriamente al crecimiento y productividad del cultivo. La sequía, salinidad, las temperaturas extremas y el estrés oxidativo son estreses que se encuentran interconectados, y alteran la homeostasis redox, las interacciones metabólicas y desacopla los procesos fisiológicos (Wang, Vinocur and Altman, 2003). Durante el período de estrés, la planta desencadena una respuesta general que suele comenzar con una disrupción en la homeostasis osmótica e iónica, seguido de daño en las proteínas funcionales y proteínas de la membrana, lo que altera principalmente la actividad fotosintética normal en la planta. Ello provoca una percepción y transducción de señales a partir de segundos mensajeros tales como la transducción a partir de Ca^{+2} o especies reactivas de oxígeno (ROS), entre otras. Estos segundos mensajeros actúan modificando la transcripción y activan o reprimen Factores de Transcripción (CBF/DREB, ABF, HSF, Bzip, myc/myb). Todos ellos suelen dar una respuesta específica frente al estrés. Los mecanismos que se suelen activar son los de detoxificación de ROS (SOD, PX,...), activación de chaperonas que asisten en el plegado de las proteínas afectadas, síntesis de osmoprotectores como la prolina, glicina o azúcares y la activación de transportadores de iones y acuaporinas con el fin de controlar las pérdidas de agua (Vierling and Kimpel, 1992) (Figura 1).

2. CITRICULTURA Y ESTRÉS POR FRÍO

A escala mundial, la Citricultura es uno de los sectores dentro de la Fruticultura con mayor producción, superando los 158 millones de toneladas en el año 2019 (FAOSTAT, Octubre 2019). En general, el mercado cítrico se divide, por orden de importancia, en producción de naranjas, mandarinas (tangerina, mandarina, clementina y satsuma), limones y limas. Los mayores productores en el ámbito mundial en 2018 fueron Brasil y China con cerca de 17 y 10 millones de toneladas de naranjas, respectivamente. España aparece entre los primeros diez product-

res mundiales (FAOSTAT, Octubre 2019) con una producción total de 4 millones de toneladas de naranjas en el año 2018. Destaca sobre todo en la producción de mandarinas con 2 millones de toneladas, quedando en segunda posición por detrás de China (19 millones de toneladas). Además, es el primer exportador mundial, exportando más del 50% de su producción.

Dentro de España, la Comunidad Valenciana tiene un gran protagonismo en el panorama citrícola, suponiendo el 56.2% de la superficie cultivada, aunque en los últimos años otras zonas como la Andalucía con el 27.1%, y Murcia, dedicada al limón y al pomelo (<https://www.mapa.gob.es/>).

Por todo ello, la importancia económica de la Citricultura en el mundo, y en España, está fuera de toda duda, por lo que cualquier problema en su cultivo puede producir grandes mermas en la producción.

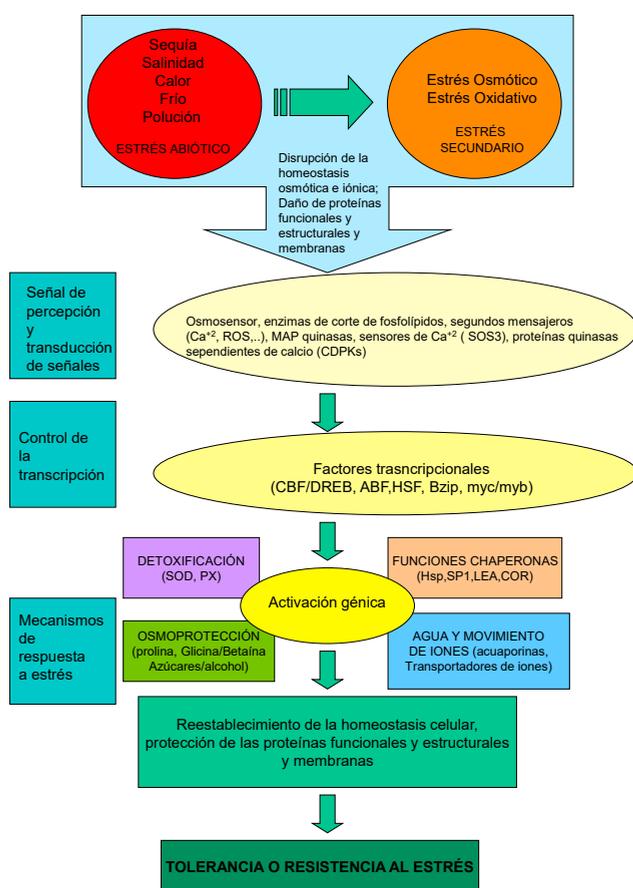


Figura 1. Representación esquemática de la percepción, control de la transcripción y mecanismos de respuesta frente al estrés abiótico (fuente propia).

El estrés por baja temperatura es uno de los estreses abióticos que produce más pérdidas. En EE.UU el estrés por congelación es el estrés abiótico que más pérdidas causa, en Diciembre de 1990, California sufrió unas pérdidas que se cuantificaron en 500 millones de dólares de fruta fresca y aproximadamente 450 000 ha de árboles afectados (Attaway, 1997). A lo largo de la historia en Valencia, las pérdidas por frío también han estado muy presentes en la historia de la Citricultura. En febrero de 1956 hubo un gran evento de descenso de temperaturas con tres grandes oleadas de aire polar ártico siberiano. Las temperaturas alcanzaron un mínimo histórico en el siglo XX en todo el mediterráneo (Núñez, Muedra and Aupí, 2006). En Valencia se alcanzaron temperaturas mínimas persistentes de -7.2 °C siendo la temperatura mínima la alcanzada en Vistabella con -19 °C (Núñez, Muedra and Aupí, 2006). Los daños de la helada en el campo valenciano se habían calculado en 22 500 millones de pesetas, de los que 4,500 millones fueron establecidos como merma previsible de la cosecha de la temporada siguiente. Los cítricos inservibles como consecuencia de la helada se calcularon en millón y medio de toneladas (Puche, 2006). Este evento de consecutivas olas de frío tuvo una gran repercusión ya que posteriormente coincidió con la muerte masiva de árboles injertados sobre naranjo amargo por la enfermedad de la tristeza de los cítricos (por sus siglas en inglés CTV) 20 años después de su detección en España, además de su expansión por la detección de los pulgones que la diseminan, *Toxoptera aurantii* y *Aphis spiraecola* (Cambra-Alvarez and Gorris-Grancha, 2004).

Los cítricos están considerados como un cultivo tropical y subtropical, el cual, generalmente, es vulnerable al frío y la congelación (Yelenosky 1979; Hara et al. 2003; Sakai and Larcher 2012). En España, los cítricos de mejor calidad se obtienen en zonas con un rango de temperaturas de entre 23 y 34 °C (con una temperatura mínima de 13 °C y una máxima de 39 °C, respectivamente) (Soler and Soler, 2018), con variaciones entre especies y variedades. Si la temperatura cae por debajo de este rango, puede causar daños masivos (Sakai and Larcher, 2012). Los cítricos requieren por un lado la reducción de la temperatura o bien un estrés hídrico para inducir la floración (Nishikawa 2013; Chica and Albrigo 2013). Además, la floración y, en consecuencia la producción, están marcadamente estimuladas por factores ambientales, entre los que se encuentra un régimen de temperaturas moderadamente bajas en condiciones subtropicales, y el estrés hídrico en condiciones tropicales (Davenport, 1990). La temperatura umbral que mata los brotes jóvenes es -12 °C (Nesbitt et al., 2002); sin embargo, hay cítricos que llegan a tolerar una temperatura de -10 °C (Yelenosky, 1991). Este es el caso de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. que es el patrón de cítricos más tolerante a las bajas temperaturas que se conoce (Peng et al., 2012; Inch et al., 2014; Wang, Zhang and Liu, 2015). Sin embargo, su gran sensibilidad a la clorosis férrica

hace que esté actualmente en desuso en el área Mediterránea cuyos suelos son extremadamente calcáreos (Forner-Giner *et al.*, 2009; Martínez-Cuenca *et al.*, 2013; Martínez-Cuenca, Quiñones and Forner-Giner, 2016; Martínez-Cuenca, Primo-Capella and Forner-Giner, 2017). En su lugar, encontramos un amplio uso del patrón citrange Carrizo [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck. x *P. trifoliata* (L.) Raf.] junto con otros híbridos Forner-Alcaide (Forner-Giner *et al.*, 2003; Forner, Forner-Giner and Alcaide, 2003; González-Mas *et al.*, 2009; Martínez-Cuenca *et al.*, 2013; Forner-Giner *et al.*, 2014; Martínez-Cuenca, Quiñones and Forner-Giner, 2016). Por ello, la importancia del empleo de *P. trifoliata* en la presente tesis como patrón tolerante y su caracterización frente a la baja temperatura.

Popularmente, en la zona Mediterránea se emplea como patrón la especie *Citrus macrophylla* Wester para el injerto con limoneros ya que de esta manera resulta tolerante al virus de la tristeza. Pero este vigoroso patrón se caracteriza por tener una alta sensibilidad a la baja temperatura (Inch *et al.* 2014; Joublan and Cordero 2002; Davies and Albrigo 1994; Yelenosky 1979) y cierta sensibilidad al virus de la tristeza si se injerta sobre otras variedades. Así pues, para el objeto de la presente tesis resulta un material vegetal ideal para tener en cuenta como patrón sensible a baja temperatura.

Dentro de las variedades, algunas de naranjo dulce [(*C. sinensis*) L. Osbeck] como son Tarocco, Moro y Sanguinello se caracterizan por la presencia de antocianinas tanto en flavedo como en pulpa, siendo el cultivo con el mayor contenido de flavonoides encontrado, tanto en frutas como en vegetales (Rapisarda and Giuffrida 1992). Se ha demostrado que el contenido de estos compuestos es dependiente de diferentes factores tanto endógenos de la especie (variedad pigmentada, proceso de maduración,...) como externos o ambientales (exposición a la luz, balance nutricional, hormonas, xenobióticos y cambios en la temperatura) (de Pascual-Teresa and Sanchez-Ballesta, 2008). Lo que hace a esta variedad de gran interés para el estudio del estrés por baja temperatura.

3. FUNDAMENTOS DE LA RESPUESTA A ESTRÉS POR BAJA TEMPERATURA

Se sabe que las plantas expuestas a un ambiente con unas condiciones específicas se encuentran adaptadas a un óptimo estado estacionario, donde su metabolismo se encuentra optimizado para dicha condición dada. Esto incluye ajustes en la concentración y actividad enzimática y en la concentración de los metabolitos que permiten al metabolismo funcionar de la manera más eficiente posible dentro de las condiciones en las que se encuentra. Cuando las plantas se exponen a un ambiente cambiante tiene lugar un amplio rango de respuestas que se dan con una temporalidad. La respuesta celular a los cambios de condición puede ser dividida en tres categorías.

1. La primera sería la **respuesta inmediata** de las reacciones bioquímicas cuando se enfrentan a la baja temperatura. La ecuación de Arrhenius puede describir el comportamiento de los pasos individuales de una ruta metabólica donde las reacciones enzimáticas muestran típicamente una disminución en su tasa de actividad cada 10 °C que desciende la temperatura (Herrmann, Schwartz and Johnson, 2019).
2. El segundo tipo de **respuesta es la activación post-traducciona l o mecanismos de regulación**. Estos procesos de regulación se dan después de segundos o minutos y hacen que la célula logre lo que, para una composición celular dada, pueda verse como un estado estable en el que la actividad de las enzimas y las concentraciones de intermediarios metabólicos sean estables. Después de un período largo de tiempo, los cambios en la concentración de proteínas podrán también dar lugar a cambios en la capacidad relativa de diferentes pasos metabólicos, una respuesta denominada aclimatación (Herrmann, Schwartz and Johnson, 2019).
3. Por último, una tercera respuesta es la **aclimatación** completa, un estado estable en el tiempo que se da ante un cambio en las condiciones ambientales. Es complejo establecer la diferencia entre los procesos de aclimatación y los procesos de regulación. No obstante, una comparación del estado estacionario original (condiciones de control) y el nuevo estado estacionario alcanzado (condiciones de tratamiento) identifica los requisitos para la aclimatación en el metabolismo de las plantas y puede usarse para identificar cambios metabólicos que permitan a las plantas optimizar su capacidad fotosintética en respuesta a cambio medioambiental (Herrmann, Schwartz and Johnson, 2019).

3.1 Respuesta molecular

La respuesta molecular a bajas temperaturas tiene lugar a partir de dos rutas de activación:

1. **Ruta de activación CBF independiente** (por sus siglas en inglés C-repeat binding factors). Que se da por la activación de los genes de respuesta *COR* (por sus siglas en inglés Cold-regulated) a partir de una ruta independiente de los factores de transcripción CBF.
2. **Ruta CBF-COR dependiente.** Se trata de una cascada de activación la cual desemboca en la activación de los genes de respuesta *COR* dependientes de los factores de transcripción CBF.

Estos genes de respuesta *COR* son rápidamente inducidos, después de minutos a horas por las bajas temperaturas (Thomashow, 1998). Muchos productos génicos son sugeridos para ser genes *COR* y actuar en la respuesta de aclimatación y subsiguiente tolerancia a frío (Liu *et al.*, 2019). Estos genes incluyen enzimas de síntesis de osmoprotectores, proteínas LEA (de sus siglas en inglés Late embryo-genesis abundant proteins), factores de transcripción, proteínas kinasas, proteínas asociadas al metabolismo de los lípidos, proteínas de respuesta a hormonas, modificadores de la pared celular y proteínas de cloroplasto (Liu *et al.*, 2019).

3.1.1 Respuesta a estrés por la ruta CBF independiente

La ruta CBF independiente de respuesta a bajas temperaturas se trata de factores de transcripción diferentes a los CBF que provocan la activación de genes de respuesta *COR*. Poco se conoce acerca de estos factores de transcripción, pero se vio en mutantes *cbf1*, *cbf2* y *cbf3* (simple, doble y triple mutantes) que los factores de transcripción *HSFC1*, *ZAT12* y *CZF1* regulan la expresión de genes de respuesta *COR* (Figura 2) (Park *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2017).

3.1.2 Respuesta a estrés por la ruta CBF dependiente

Secuencialmente, desde que el estrés es detectado por la planta, ocurre la desestabilización de la membrana, que es la primera causa del daño por congelación en plantas (Steponkus, 1984; Steponkus and Webb, 1992). Durante el proceso de aclimatación, el proceso de crioestabilidad de la membrana plasmática aumenta como consecuencia de la alteración en la composición de los lípidos que alteran su comportamiento frente a la deshidratación. El grupo de Uemura demostró que hay cambios en la composición de los lípidos durante la aclimatación a baja

temperatura (Lynch and Steponkus, 1987; Uemura, Joseph and Steponkus, 1995). En concreto, observaron el aumento en la proporción de fosfolípidos como consecuencia del incremento en la proporción de las especies di-insaturadas de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina; y, por otro lado, debido a una disminución en la proporción de lípidos cerebrosidos (Uemura, Joseph and Steponkus, 1995).

Esta desestabilización de la membrana plasmática causa el aumento de la concentración de calcio citosólico (Uemura, Joseph and Steponkus, 1995; Knight, 1999). Los cambios en las proteínas que actúan como sensores de calcio se activan directamente o a través de una cascada de señalización a partir de kinasas, induciendo a los preexistentes factores de transcripción la expresión de los genes responsables de la activación de la respuesta a frío (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1996; Catalá *et al.*, 2003; Knight and Knight, 2012). El aumento de calcio es transitorio, exhibiendo un pico característico, y es causado por un antiportador de calcio vacuolar específico CALCIUM EXCHANGER ($\text{Ca}^{+2}/\text{H}^{+}$) (Catalá *et al.*, 2003) que lleva a la planta a reaccionar repetidamente a la señal por bajas temperaturas (Figura 2). Así pues, comienza la segunda fase de activación de la respuesta a frío que se prolonga en el tiempo durante la tercera fase de respuesta a frío, la aclimatación (Liu *et al.*, 2019). El influjo de calcio llega a un Receptor Kinasa regulado por Calmodulina 1 y 2 (por sus siglas en inglés CRLK1 y CRLK2) y comienza una cascada de señalización de la ruta específica de frío (Figura 2) (Yang *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2017). Esta señalización comienza con la activación de proteínas kinasas (por sus siglas en inglés MPK) y que comprenden tres proteínas kinasas: MEKK, MKK y MPK que actúan consecutivamente (Liu, 2012; Liu and He, 2017). Estas MPKs son capaces de activar o reprimir al siguiente factor de transcripción de la ruta de señalización, ICE1 (por sus siglas en inglés inducer of CBF expresión 1), que es un factor de transcripción del tipo MYC-like hélice-vuelta-hélice que se une a los elementos *cis* de los promotores de los genes CBF (Chinnusamy *et al.*, 2003; Miura *et al.*, 2007; Ding *et al.*, 2015, 2018). Estas MPKs pueden activar o reprimir a ICE1 aguas arriba. Así pues, concretamente, MKK4/5 y MKK3/6 promueve la represión de ICE1 y por consiguiente la represión de la respuesta a bajas temperaturas aguas abajo (Li *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2017). Por el contrario, la expresión de ICE1 se induce por las MEKK1, MKK1/2 y MPK4 dando lugar por tanto a la activación de la ruta de respuesta a frío. Además de la regulación por MPKs, la estabilidad y, por tanto, la actividad de la proteína ICE1, también se encuentra regulada por la modificación post-traduccional de la sumoilación por la SUMO E3 ligasa SIZ1 (Dong *et al.*, 2006; Miura *et al.*, 2007; Thomashow, 2010). Así pues, ICE1 llega al núcleo y activa los factores de transcripción centrales de la respuesta a frío, los genes CBF. Esta ruta de activación de genes de respuesta juega un importante papel en la tolerancia al estrés por bajas

temperaturas no sólo en *Arabidopsis thaliana* (L.), Heynh., sino en otras especies arbóreas como álamo, abedul, manzano y cítricos (Puhakainen *et al.*, 2004; Benedict *et al.*, 2006; Wisniewski *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2015). Los genes *CBF* son también conocidos como DREBs (por sus siglas en inglés Dehydration-Responsive Element Binding Factors) y que en general comprende tres miembros *CBF1*, *CBF2* y *CBF3* (también llamados DREB1b, DREB1c y DREB1a, respectivamente) en *A. thaliana*, aunque esto puede variar dependiendo de la especie. Por ejemplo, en álamo se ha visto la inducción de cuatro genes *CBF* (*CBF1*, *CBF2*, *CBF3* y *CBF4*) en respuesta a bajas temperaturas (Benedict *et al.*, 2006). Así pues, los *CBF* activan los genes de respuesta a bajas temperaturas, llamados *COR* los cuales actúan durante la segunda fase de la respuesta (minutos-horas) y durante la fase de aclimatación (días-semanas) (Figura 2).

Además de ICE1, se conocen más activadores y represores del regulón *CBF* que se unen a sus promotores y son inducidos en presencia de frío. MYB15 es un factor de transcripción del tipo MYB que se ha visto que se activa en presencia de bajas temperaturas y se une directamente a los promotores de *CBF1*, *CBF2* y *CBF3* provocando así su activación (Agarwal *et al.*, 2006). Además, se piensa que también su expresión está regulada por la señalización de MPKs (Yano *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2017).

Otro factor de transcripción que activa la expresión de los *CBF* es el Activador de la Transcripción de Unión a Calmodulina (por sus siglas en inglés CAMTA) (Doherty *et al.*, 2009). CAMTA 1, CAMTA 2, CAMTA 3 y CAMTA 5 inducen a los *CBF*. Concretamente se ha visto que CAMTA 3 y CAMTA 5 actúan en los primeros minutos de la disminución de la temperatura y parece que se ha relacionado con los cambios repentinos de temperatura (día/noche) y no en los cambios progresivos de temperatura como sucede en los cambios de estación (Doherty *et al.*, 2009; Kidokoro *et al.*, 2017).

Las plantas procesan e integran las señales alrededor de ellas en los cambios estacionales, siendo la luz un elemento crucial para su respuesta a la aclimatación y tolerancia a frío. Los fitocromos (PHYA, PHYB, PHYC, PHYD y PHYE) absorben luz roja y roja lejana, mientras que los criptocromos (CRY1, CRY2 y CRY3) absorben luz azul y luz UV-A (Maibam *et al.*, 2013). Se sabe que los fitocromos activan los genes *COR* como el *COR15a* y el *COR14b* además de regular genes que son objetivo de los *CBF* en condiciones de luz roja cercana/lejana (Franklin and Whitelam, 2007).

Los fitocromos activan el factor de transcripción del tipo bZIP LONG HIPOCOTYL 5 (por sus siglas en inglés HY5). Este factor de transcripción está resultando ser un modulador central de la respuesta coordinada entre señalización por luz y desarrollo de la planta y regula otros genes a través de sub-redes

mediante otros reguladores (Catalá, Medina and Salinas, 2011). Se ha visto que HY5 se sobreexpresa por bajas temperaturas y media la inducción de genes que se expresan en presencia de este estrés debido a su unión a las Z-box de promotores, que constituyen un dominio LTRE (por sus siglas en inglés Low Temperature Response Element) u otros LTREs aún por caracterizar (Shin, Park and Choi, 2007).

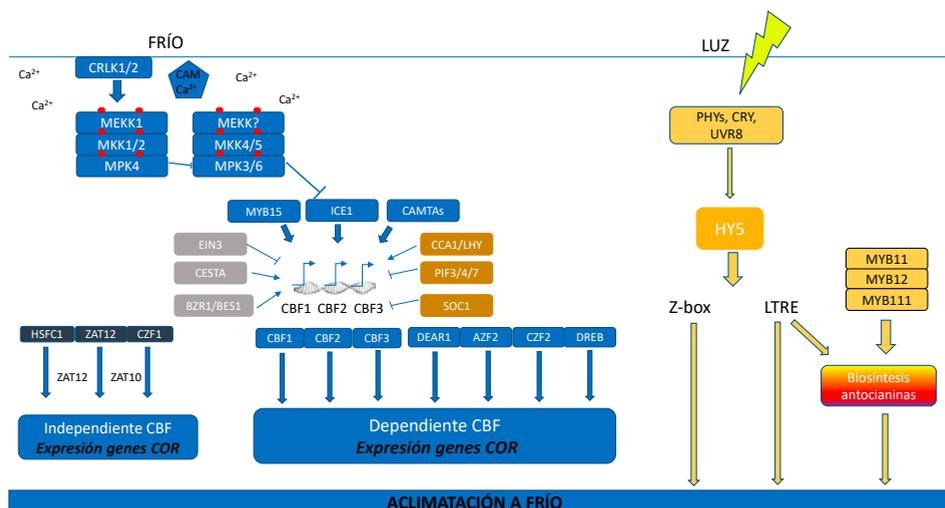


Figura 2. Representación esquemática de la respuesta a baja temperatura y aclimatación a partir de la ruta CBF dependiente, CBF independiente e inducción por luz (fuente propia).

3.1.3 Respuesta molecular en cítricos

La respuesta molecular a bajas temperaturas anteriormente citada es la respuesta general que se conoce en plantas. Pero se ha visto que en cítricos esta respuesta, en general, se encuentra conservada y coincide hasta cierto punto con la respuesta de *Arabidopsis* (Şahin-Çevik and Moore, 2006; Champ, Febres and Moore, 2007).

En cítricos, concretamente en *C. sinensis* Osbeck cv. Gannanzao injertado sobre *P. trifoliata* se ha visto que los genes CAMTA están conservados y que intervienen en procesos de regulación de estrés abiótico como frío, sal y sequía y que además responden a los tratamientos con las hormonas ABA y JAS (Ouyang *et al.*, 2019). Concretamente, después del tratamiento de estrés por frío se vio una inducción de 3 veces a las 24 y 48 horas de *CsCAMTA1*, *CsCAMTA2*, *CsCAMTA3*, *CsCAMTA4* y en menor medida *CsCAMTA5* (Ouyang *et al.*, 2019).

También se demostró la función de la MAPK3 en *P. trifoliata* a partir de un estudio realizado en cDNA Amplified Fragment Length Polymorphism (cDNA-AFLP) por lo que se demuestra que el proceso de señalización de bajas temperaturas estaría conservado (Meng *et al.*, 2008).

El inductor de la expresión de los genes *CBF*, *ICE1*, como se ha dicho anteriormente, tiene una regulación compleja. Es un bHLH y en cítricos existen varios trabajos en los cuales se dilucida la función y obtención de este factor de transcripción. El grupo de Liu Jihong ha realizado varios trabajos en *P. trifoliata* donde aisló un bHLH con posible función del factor ICE1 (Huang *et al.*, 2013, 2015; Geng *et al.*, 2019). En el primero de ellos, un grupo de genes de respuesta a estrés se sobreexpresó o reprimió en presencia de frío en limones transgénicos que portaban *ICE1* de *P. trifoliata*; en especial, se indujo un gen que codifica para una peroxidasa (POD) (Huang *et al.*, 2013). En un segundo trabajo, se demuestra como la sobreexpresión de *ICE1* de *P. trifoliata* en limón bajo estrés por frío mostró un aumento en la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la catalasa. En el mismo trabajo, vieron que *PtrICE1* juega un importante papel en la tolerancia a frío, y que puede ser modulada por la acción de los niveles de poliaminas que se encuentran interaccionando con el gen *ADC* (Huang *et al.*, 2015). Y un tercer artículo, la sobreexpresión del gen *ICE1* en pummelo dio lugar a líneas transgénicas que tenían un menor contenido en especies reactivas de oxígeno (ROS), consistente con el elevado nivel de expresión en genes que codifican para enzimas antioxidantes como eran la catalasa, la peroxidasa y la superóxido dismutasa (Geng *et al.*, 2019).

El gen *HOS1* también se consiguió aislar en cítricos en un trabajo del grupo de Zhong-Hai Sun en 2010 (Liu *et al.*, 2010). En dicho trabajo *PtHOS1* se clonó, se aisló su proteína y se cuantificó su expresión génica en raíz, hojas y tallo. Se observó que la expresión de *PtrHOS1* disminuyó en hojas, tallos y raíces después de los tratamientos con frío y ABA, sugiriendo que la expresión de *PtrHOS1* estaba reprimida por los tratamientos de baja temperatura y ABA (Liu *et al.*, 2010).

Los genes *CBF* se han conseguido aislar y clonar en cítricos, demostrando su función en la regulación del estrés a baja temperatura en dos importantes trabajos. El primero de ellos donde se consigue aislar *PtCBF1* de *P. trifoliata* y *CpCBF1* de *C. paradisi* Macf. de *C. paradisi* (Champ, Febres and Moore, 2007). *PtCBF1* acumula altos niveles de transcritos y además en un corto período de tiempo. Además, los transcritos de *CORc115*, gen inducido por bajas temperaturas del grupo II de proteínas LEA, también se acumula rápido y de forma temprana en *P. trifoliata* en respuesta a bajas temperaturas (Champ, Febres and Moore, 2007). En el segundo trabajo, se aisló también el *PtCBF1* de *P. trifoliata* junto a otras tres especies de cítricos, naranjo dulce (*C. sinensis*), pummelo (*Citrus grandis*) y rough

lemon (*Citrus jambhiri*) con una pauta abierta de lectura. Los resultados del análisis de alineamiento múltiple y los estudios filogenéticos con las secuencias de aminoácidos sugirieron que los dominios de unión AP2 que se unen a DNA y las secuencias de CBF estaban altamente conservadas en las cuatro proteínas de cítricos (He *et al.*, 2012).

3.2 Respuesta fisiológica

Una vez señalizada la bajada de la temperatura exterior, tienen lugar una serie de respuestas fisiológicas en la planta. La bajada de temperatura, sin llegar a la congelación, resulta dañina para los tejidos vegetales al perder fluidez en las membranas como consecuencia del aumento de la proporción de ácidos grasos insaturados para adaptarse a las nuevas condiciones.

También ocurren cambios en la estructura de los tilacoides de los cloroplastos. El contenido de clorofila, la actividad de enzimas fotosintéticos y el transporte electrónico están asociados a la bajada de temperaturas, sin embargo la relación entre los cambios fisiológicos no está del todo clara (Adam and Murthy, 2014). Se sabe que estos cambios en combinación con el cierre estomático son en gran parte responsables de la disminución de la fotosíntesis en invierno (Paul, Driscoll and Lawlor, 1992).

El resultado también resulta en fugas de iones causadas por la inactivación de los canales y bombas anclados en la membrana (Verslues *et al.*, 2006), por lo que afectará a cualquier proceso fisiológico que tenga lugar en la membrana, tanto celular como de cualquier otro orgánulo.

3.2.1 Fotosíntesis y baja temperatura

La fotosíntesis es uno de los procesos fisiológicos más sensibles a la temperatura, por ello, comprender los procesos fisiológicos que subyacen a la respuesta a la temperatura de la fotosíntesis y su aclimatación es importante tanto para la agricultura como para el medio ambiente. Muchas plantas muestran una gran capacidad de ajustar sus características fotosintéticas para sus necesidades de crecimiento dependiendo de la temperatura (Berry and Bjorkman, 1980; Yamori, Noguchi and Terashima, 2005; Yamori *et al.*, 2006, 2008, 2010).

Durante el periodo de baja temperatura, la capacidad de síntesis de glucosa es a veces el factor limitante sobre la capacidad de regeneración de fosfato (Pi) (Sharkey, 1985; Labate and Leegood, 1988; Strand *et al.*, 1997, 1999), pero esto depende de la especie y de la temperatura a la que se exponga (Yamori *et al.*, 2010). Otra importante limitación en el proceso de fotosíntesis a baja temperatura

es la regeneración de Ribulosa 1,5 bifosfato (RuBP) (Sage and Kubien, 2007; Yamori *et al.*, 2010; Yamori, Hikosaka and Way, 2014). Como resultado, la limitación de regeneración de la RuBP puede ser aliviada por la aclimatación al crecimiento a baja temperatura, y así, la carboxilación comienza a ser el factor limitante en el proceso de fotosíntesis. En plantas con menos aclimatación al estrés por baja temperatura, la regeneración de RuBP permanece limitante, independientemente de la temperatura de crecimiento, y no aumentará la capacidad fotosintética a baja temperatura (Yamori *et al.*, 2010). El alivio que se produce en la regeneración de RuBP en plantas que se adaptan a baja temperatura, se produce con el fin de reducir el exceso de energía de excitación dando lugar a un gran transporte de electrones, evitando así la fotoinhibición en hábitats fríos, donde varía mucho tanto la intensidad lumínica como la temperatura (Hikosaka *et al.*, 2006; Yamori *et al.*, 2010).

Algunos de los mecanismos que dan lugar a la aclimatación a la baja temperatura en plantas anuales de invierno también lo hacen a alta irradiación (Anderson, Chow and Park, 1995; Hüner *et al.*, 2012, 2016). Así pues, resultados preliminares muestran que el ajuste fotosintético que muestran plantas endurecidas al frío se parece al exhibido por las plantas expuestas a alta intensidad de luz, mientras que la respuesta fotosintética de las plantas no endurecidas es imitada por la de las plantas cultivadas a baja intensidad de luz. El papel de la luz en el desarrollo de la tolerancia a la congelación también fue indicado por la mejora de la tolerancia a la congelación en condiciones de luz elevada sin tratamiento con frío (Gray *et al.*, 1997). Estos resultados indican que la baja temperatura y la luz inducen rutas de señalización que se solapan, y aceleran otras en el desarrollo de la tolerancia a frío. Varios estudios muestran que la luz puede, también, incrementar el amplio rango de compuestos protectores tempranos que se conectan en el proceso de endurecimiento (Janda *et al.*, 2007; Szalai, Pap and Janda, 2009; Majláth *et al.*, 2012).

3.2.1.a Fotoinhibición

La fotoinhibición es el fenómeno que da lugar a la reducción de la actividad fotosintética principalmente debida a asimilación de CO₂ inducida por un exceso de luz (Baker, 1996). A pesar de que la reducción en la fotoasimilación puede ser dependiente de los daños a algunos componentes de la maquinaria fotosintética, frecuentemente el término inhibición se emplea para definir la inhibición de la actividad del Fotosistema II (FSII) (Powles, 1984; Aro, Virgin and Andersson, 1993; Murata *et al.*, 2007). Como la luz es la energía necesaria para conducir el proceso de la fotosíntesis, la fotoinhibición es inevitable cuando la luz excede la tasa fotosintética. Sin embargo, el alcance de la fotoinhibición depende del balance entre el fotodaño y la reparación del FSII (Demmig-Adams *et al.*, 2012).

Además de la alta irradiación, estreses como el encharcamiento o el exceso de minerales, la alta o baja temperatura, la toxicidad por metales pesados y la polución del aire, puede determinar cuál es el punto en el que la luz absorbida por los pigmentos de clorofila se vuelve excesiva para el requerimiento de la maquinaria (Murata *et al.*, 2007).

El fotosistema II es el componente más susceptible que puede ser dañado en las membranas del tilacoide. Así pues, el principal resultado del estrés abiótico es hacer que el FSII sea propenso a la fotoinhibición (Nishiyama, Allakhverdiev and Murata, 2006). Por otro lado, el Fotosistema I (FSI) es menos frecuente que se dañe debido al eficiente mecanismo de fotoprotección con el que previene la fotoinhibición (Gururani, Venkatesh and Tran, 2015). La fotoinhibición del FSI ocurre cuando el suministro de electrones del FSII excede su capacidad de aceptar electrones (Tikkanen and Grebe, 2018). El proceso de recuperación del FSI, cuando está fotodañado, es muy prolongado (Kudoh and Sonoike, 2002). Sin embargo, los mecanismos de fotoinhibición del FSI aún no se conocen bien.

3.2.2 Potencial hídrico

El balance hídrico en las plantas es de vital importancia para que se puedan llevar a cabo los procesos fisiológicos, celulares y metabólicos. El agua puede transportarse de tres maneras dentro de una planta.

1. Transporte apoplástico que se da a lo largo de las paredes celulares y sin barreras celulares, dando lugar a un transporte del agua a favor de potencial y a largas distancias.
2. Transporte por la ruta simplástica, que tiene lugar entre células a través de los plasmodesmos.
3. Transporte transcelular, a través de las membranas celulares.

Así pues, en presencia de un estrés abiótico como la sequía, salinidad o estrés por temperatura, la planta se encuentra en un compromiso entre el consumo de agua con el fin de poder realizar las funciones fisiológicas de fijación de CO₂, fotólisis del agua, transpiración o detener el consumo de recursos deteniendo así el crecimiento.

El transporte apoplástico a larga distancia es el transporte que utiliza la planta con el fin de suministrar y distribuir el agua a lo largo de diferentes tejidos. El estado hídrico de una planta se suele caracterizar por el potencial hídrico (Ψ_w) y el contenido relativo en agua, RWC% (de sus siglas en inglés Relative Water

Content en porcentaje, en relación a su hidratación máxima) (Turner, 1988). Los autores Flexas y Medrano en 2002 definieron tres grados de estrés hídrico (Flexas *et al.*, 2002):

1. Estrés hídrico leve: disminución del Ψ_w en algunos bares o una disminución al 100-85% del RWC.
2. Estrés hídrico moderado: una disminución del Ψ_w de hasta 12-15 bares o una disminución del RWC% entre el 85-70%
3. Estrés hídrico severo: una disminución del Ψ_w menor de 15 bares o una disminución del RWC% por debajo del 70%

Estos valores son generales ya que varían dependiendo de la especie (Flexas *et al.*, 2002).

3.2.2.a Importancia de las acuaporinas y el transporte transcelular

El transporte de agua transcelular se lleva a cabo principalmente por las acuaporinas. Las acuaporinas pertenecen a un grupo de proteínas altamente conservado de unión a membrana, mejor conocidas como MIP (por sus siglas en inglés Major Intrinsic Protein). Las plantas, como organismos sésiles que son, carecen de sistema circulatorio. Sus células contienen un gran número de orgánulos que necesitan una gran regulación de los requerimientos hídricos para adaptarse a las fluctuaciones del ambiente. Como se ha comentado anteriormente, es una gran familia de proteínas, siendo 35 genes los que codifican para acuaporinas en *Arabidopsis* (Johanson *et al.*, 2001; Maurel *et al.*, 2015), 31 en maíz (Chaumont *et al.*, 2001), 33 en arroz (Sakurai *et al.*, 2005), 47 en tomate (Reuscher *et al.*, 2013), 55 en álamo (Gupta and Sankararamkrishnan, 2009), 66 en soja (Zhang *et al.*, 2013), 50 en banana (Sreedharan, Shekhawat and Ganapathi, 2013), 71 en algodón (Park *et al.*, 2012), 41 en sorgo (Reddy *et al.*, 2015) y 34 en naranja dulce (de Paula Santos Martins *et al.*, 2015). Las MIPs se clasifican en diferentes familias dependiendo de sus patrones de expresión, los niveles de modificación de la secuencia de aminoácidos, la regulación y localización intracelular. Las PIPs (Plasma membrane intrinsic proteins), NIPs (Nodulin-26 like intrinsic proteins) y XIPs (Uncategorized X intrinsic proteins) se localizan generalmente en la membrana plasmática y se expresan en la superficie celular, mientras que las TIPs (Tonoplast intrinsic proteins) se localizan en la membrana del tonoplasto, la membrana de la vacuola (Johanson *et al.*, 2001). Sin embargo, algunas NIPs y las SIPs (Small basic intrinsic proteins) se localizan en el retículo endoplásmico (Maurel *et al.*, 2015).

3.2.2.b PIPs y estrés por baja temperatura

El transporte de agua transcelular, no vascular, se considera crucial para el mantenimiento de la presión por turgencia de la planta y la homeostasis de agua. La importancia del mantenimiento de la presión de turgencia incluye, 1) a nivel de célula, las reacciones metabólicas, división celular, diferenciación y elongación; 2) a nivel de tejido, el movimiento estomático; y 3) a nivel de órgano, el movimiento del pecíolo y el mantenimiento del estatus hídrico general de la planta (Afzal *et al.*, 2016).

Dentro de las funciones de las MIPs, las PIPs tienen funciones de transporte de agua, glicerol, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono y urea. Además, se sabe que intervienen en las respuestas a estrés abiótico como sal, boro, sequía y bajas temperaturas (Forrest and Bhava, 2007; Martínez-Cuenca *et al.*, 2015).

3.2.3 Respuesta fisiológica a baja temperatura en cítricos

3.2.3.a Respuesta del fotoperíodo frente a baja temperatura en cítricos

La respuesta a estrés por frío que tiene lugar a través de la luz también resultó estar conservada en cítricos y se ha demostrado en dos trabajos muy recientes. Uno de ellos, que se ha llevado a cabo en naranjas pigmentadas, se aisló el promotor de *CgRuby1* en *Citrus grandis* y se realizó a partir de plantas transgénicas en *A. thaliana* (Huang *et al.*, 2019). Se ha visto que el factor de transcripción HY5 se une al promotor de *Ruby1* dando lugar a la síntesis de antocianos y que además, esta respuesta está conservada en cítricos (Huang *et al.*, 2019). Otro trabajo muy reciente relacionado con la respuesta a luz es el realizado por el grupo de Juan Xu, en el que la sobreexpresión de *CsPIF8* dio lugar a un aumento de la síntesis de antocianos en presencia de las bajas temperaturas en plantas transgénicas de tomate y callos de pomelo (He *et al.*, 2020).

3.2.3.b Respuesta de los cambios de membrana frente a baja temperatura en cítricos

En los cítricos, también existen cambios en la estructura de las membranas celulares y la composición de lípidos como respuesta a la baja temperatura. La baja temperatura provoca pérdida de iones y roturas de membrana, dañando así los procesos que en ella tienen lugar, como se ha indicado anteriormente (Nordby and Yelenosky, 1985; Crifò *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012; Abouzari, Solouki, Golein, Fakheri and Sabouri, 2020; Abouzari, Solouki, Golein, Fakheri, Sabouri, *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2021).

Ya en el año 1985, el grupo de George Yelenosky analizó cómo las bajas temperaturas afectaban a los ácidos grasos. Se compararon tres genotipos,

C. sinensis, *P. trifoliata* y un híbrido entre (*Citrus paradisi* x *P. trifoliata*) x *C. sinensis*. La degradación, en general, de los ácidos grasos fue del 89% en fosfatidilcolina, del 83% en fosfatidilglicerol y del 50% en digalactosildiglicérido. En las hojas de los híbridos que habían sufrido el proceso de endurecimiento, los ácidos grasos totales durante el proceso de congelación y descongelación fue de un 12%. Tres especies moleculares de triacilglicerol ricas en ácido linoleico fueron mayores en los híbridos endurecidos al frío durante el proceso de congelación-descongelación. El aumento de especies insaturadas de triacilglicerol durante el proceso de congelación-descongelación, sugiere que el triacilglicerol tiene un papel importante en el mantenimiento de la fluidez de la membranas durante dicho proceso (Nordby and Yelenosky, 1985).

Al igual que ocurre en *C. sinensis* y *P. trifoliata*, en pomelo (*Citrus paradisi*) se vio que la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de ácidos grasos y la degradación de fosfolípidos se activa fuertemente a pesar de que varias desaturasas de ácidos grasos se encuentran reprimidas, excepto la proteína desaturasa acil-[acil-transportador] y el transportador estearoil-acil que se encuentran especialmente sobreexpresados en plantas aclimatadas a frío (Maul *et al.*, 2008). Al igual que ocurre en pomelo y otras especies de cítricos como en naranjas pigmentadas o mano de buda, tiene lugar la disminución de la expresión génica de algunas desaturasas (Crifò *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012).

3.2.3.c Respuesta de las relaciones hídricas a baja temperatura en cítricos

El balance hídrico de los cítricos ante la presencia de bajas temperaturas suele responder de una manera que puede resultar contradictoria. Las bajas temperaturas dan lugar al cierre de los estomas, disminución en la transpiración y un potencial osmótico (Ψ_{π}) muy disminuidos como ocurre en las situaciones de sequía extrema, e la planta intenta no perder agua por el proceso de transpiración. Sin embargo, suelen tener el Ψ_w del tallo y el RWC en unos valores típicos del crecimiento activo de plantas en buen estado de riego cuando hay temperaturas cálidas, como ocurre en los días soleados (Kriedemann and Barrs, 1981; Barkatky *et al.*, 2013). En este caso, es de tener en cuenta el movimiento de agua transcelular que ocurre a través de las acuaporinas.

3.3 Respuesta bioquímica

Como hemos ya mencionado anteriormente, la exposición a bajas temperaturas reduce termodinámicamente la cinética de las reacciones metabólicas desplazando su equilibrio de tal manera que resulta en una mayor probabilidad que las cadenas laterales no polares de las proteínas se expongan al medio acuoso de la célula. Esto afecta directamente a la estabilidad y solubilidad de las proteínas globulares (Siddiqui and Cavicchioli, 2006). Además, se traduce en la alteración de las proteínas y complejos proteínicos y consecuentemente a la regulación de las reacciones metabólicas. Para evitar este proceso, las plantas se protegen sintetizando diferentes osmolitos.

3.3.1 Osmoprotectores

Como una definición amplia, los osmoprotectores son compuestos pequeños, con carga eléctrica neutra y solutos orgánicos con una toxicidad baja. Se acumulan en grandes cantidades en las células, compensando el desequilibrio que sucede en el espacio extracelular cuando se presenta un estrés. Gracias a su alta solubilidad y pequeña interferencia en las rutas metabólicas, también se les llaman solutos compatibles. Según la web DEOP (por sus siglas en inglés Drangon Explorer of Osmoprotection Pathways) los osmoprotectores se pueden clasificar en tres clases:

1. Los que contienen compuestos cuaternarios de amonio y sus derivados. Un ejemplo de estos compuestos son las poliaminas y betaínas como la glicina betaína.
2. Los que contienen aminoácidos y derivados como la prolina y ectoína.
3. Los que contienen azúcares y derivados, como son los oligosacáridos (sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa y verbascosa), fructanos (polímeros de fructosa, oligosacáridos o polisacáridos) y azúcares alcohol (polioles como glicerol, inositol, arabiol, maltitol, sorbitol, manitol y D-ononitol).

Las especies de plantas de zonas templadas se aclimatan al ambiente durante el otoño redirigiendo su metabolismo hacia la síntesis de moléculas crioprotectoras como son los azúcares solubles (sacarosa, rafinosa, estaquiosa, trehalosa), azúcar-alcohol (sorbitol, ribitol, inositol) y compuestos nitrogenados de bajo peso molecular (prolina, glicina, betaína). Además, también contribuye la síntesis de proteínas dehidrinas, COR y HSPs (por sus siglas en inglés Heat Shock Proteins)

con el fin de estabilizar los fosfolípidos y proteínas de membrana y las proteínas citoplasmáticas, manteniendo las interacciones hidrofóbicas y la homeostasis, la eliminación de ROS; otros solutos son liberados del simplasto y sirven para proteger la membrana plasmática de la adhesión del hielo y subsiguiente rotura celular comentada anteriormente (Hare, Cress and Van Staden, 1998; Iba, 2002; Wang, Vinocur and Altman, 2003; Chen and Murata, 2008).

3.3.2 Prolina

La prolina es un aminoácido que como se ha visto anteriormente actúa como osmo-protector. Realiza múltiples funciones en la célula, pero sobre todo juega un importante papel en el ajuste osmótico aumentando la capacidad de resistir la deshidratación celular. La prolina es capaz de acumularse en algunas especies como los cítricos (Yelenosky, 1979, 1985; Kushad and Yelenosky, 1987b; Vu and Yelenosky, 1992, 1993) en presencia de algunos estreses abióticos como la salinidad, sequía, encharcamiento y estrés por temperatura (calor, frío y congelación) (Kishor *et al.*, 2005; Verbruggen and Hermans, 2008; Szabados and Saviouré, 2010; Verslues and Sharma, 2010; Anwar Hossain *et al.*, 2014; Kaur and Asthir, 2015; Saibi *et al.*, 2015). La prolina realiza sus funciones a nivel celular promoviendo la estabilización de las estructuras subcelulares y membranas, la estabilización de proteínas a la desnaturalización y la detoxificación y mantenimiento de las ROS (Kishor *et al.*, 2005; Szabados and Saviouré, 2010).

La prolina se sintetiza, principalmente, a partir del aminoácido glutamato (Figura 3), que es reducido en el citosol a glutamato-5-semialdehído (GSA) por la pirrolina-5-carboxilatosintasa 1 y 2 (por sus siglas en inglés P5CS1 y P5SC2) y espontáneamente se convierte en pirrolina-5-carboxilato (P5C). P5C reductasa (P5CR) reduce el P5C en prolina. Sin embargo, el catabolismo de la prolina ocurre en la mitocondria vía prolina deshidrogenasa (PDH) que produce P5C de nuevo y la delta 1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa (P5CDH) que convierte la P5C en glutamato. Alternativamente, la prolina también se puede sintetizar por otra ruta a partir de la ornitina, que se transamina en la mitocondria por la delta ornitina aminotransferasa (dOAT) para producir GSA y P5C, que es entonces convertido en prolina (Hare and Cress, 1997; Szabados and Saviouré, 2010; Anwar Hossain *et al.*, 2014; Kaur and Asthir, 2015).

Pero para combatir varios de los estreses abióticos, el transporte del aminoácido L-prolina es vital. El transporte de prolina a través de la membrana plasmática durante estrés abiótico se lleva a cabo por dos tipos de transportadores. El primero forma parte de la familia AAAP (por sus siglas en inglés amino acid/auxinpermease) y el segundo APC (por sus siglas en inglés amino acid-polyamine choline). Además, en *A. thaliana* se conoce una familia de transportadores (PROT) relacionados con el transporte en estrés abiótico y cuya expresión está asociado

baja temperatura dado su propiedad como antioxidante y de detoxificación de ROS (Zhang *et al.*, 2018). Como hemos indicado al inicio de la introducción, las variedades de cítricos pigmentadas resultan tener un alto contenido en antocianinas, y su síntesis depende de la temperatura, lo que las hace de gran interés en este estudio.

Las antocianinas son pigmentos solubles en agua de la familia de los flavonoides y que se relacionan en procesos como desarrollo, defensa y adaptación a ambientes desfavorables como son el daño por exceso de luz UV y frío (Cai *et al.*, 2020), como se ha indicado anteriormente.

Las antocianinas son glicósidos y acilglicósidos de las antocianidinas y su ruta de síntesis y degradación es conocida ampliamente. Sin embargo, poco se conoce sobre su regulación. A continuación, se describen dichos procesos.

Las antocianinas libres se sintetizan por la ruta secundaria de los flavonoides y sus enzimas de biosíntesis se encuentran bien caracterizados. La síntesis comienza a partir del aminoácido fenilalanina que pasa a ácido trans-cinámico por la eliminación de un grupo amonio por la enzima PAL (por sus siglas en inglés fenilalanina amonio liasa) (Figura 4). En los siguientes pasos tienen lugar 4 hidroxilaciones del ácido trans-cinámico que genera ácido p-coumárico y esto lo realiza la enzima C4H (por sus siglas en inglés cinamato 4 hidroxilasa). A continuación, el ácido p-coumárico se activa por la 4CL (por sus siglas en inglés 4-cumarato-CoA ligasa). El primer enzima de la ruta de biosíntesis de antocianinas es la CHS (por sus siglas chalcona sintetasa) que condensa las moléculas de malonil-CoA y de p-cumaroyl-CoA (Figura 4b) para producir la naringina chalcona, que está implicada no sólo en el proceso de biosíntesis de antocianinas, sino que también en la síntesis de compuestos fenólicos. Seguidamente, la naringina chalcona se isomeriza por la CHI (por sus siglas chalcona isomerasa) a flavonona naringina, que a continuación se convierte en dihidrocamferol por la F3H (por sus siglas flavonona 3'-hidroxilasa). Este dihidrocamferol es el punto de partida de tres compuestos más, el dihidroflavonol, la hidroquercitina y la dihidromiricetina y que son el resultado de las reacciones catalizadas por la F3'H y F3'5'H (por sus siglas flavonoide 3' hidroxilasa y flavonoide 3'5' hidroxilasa, respectivamente). Posteriormente la dihidroflavonol 4-reductasa (por sus siglas DFR) puede reducir los dihidroflavonoles en sus respectivas leucoantocianidinas (leucopelargonina, leucocianidina y leucodelfinidina). Finalmente, la antocianidín sintetasa (por sus siglas en inglés ANS) convierte las leucoantocianidinas en antocianidinas aportándoles el color característico a cada una de las tres. Una vez formadas (pelargonidina, cianidina y delfinidina) han de ser modificadas a su forma activa, así pues la UDP-glucosa-flavonoide glucosil transferasa (por sus siglas en inglés UFGT) cataliza la adición de una glucosa en la posición 3-OH de las antocianidinas, incrementando así su hidrofobicidad y estabilidad (Lo Piero, 2015).

La degradación de antocianos viene marcada por diferentes factores que hacen que el proceso de biosíntesis cese. Estos procesos son principalmente ambientales. La luz, la calidad de la luz y su intensidad son inductores de la ruta de biosíntesis de antocianos, ya que son unos potentes antioxidantes protectores de los fotosistemas. Pero, al igual que la luz, en tabaco y pomelo, la oscuridad también se ha visto que da lugar a la degradación de antocianos (Y. Liu *et al.*, 2017; Rey *et al.*, 2021).

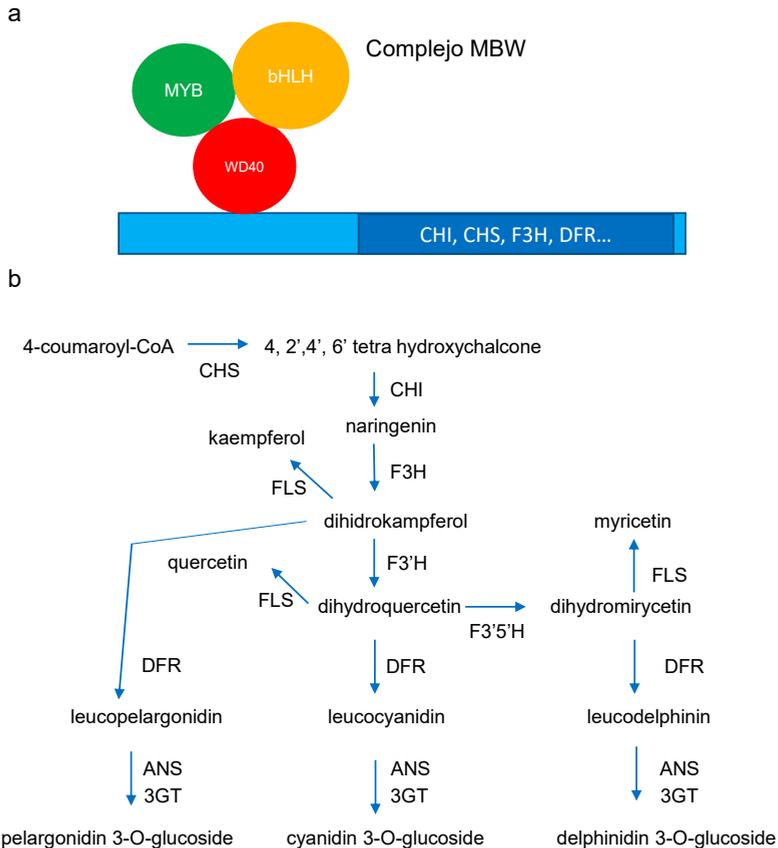


Figura 4. Representación de la regulación y ruta síntesis de antocianinas. a) esquema del complejo MBW de activación de los genes de síntesis de antocianinas. b) representación esquemática de la ruta de antocianinas y los genes que codifican a sus enzimas de síntesis; *CHS* (chalcona sintetasa), *CHI* (chalcona isomerasa), *FLS* (flavonol sintetasa), *F3H* (flavonona 3'-hidroxilasa), *F3'H* (flavonoide 3' hidroxilasa), *F3'5'H* (flavonoide 3'5' hidroxilasa), *DFR* (dihidroflavonol 4-reductasa), *ANS* (antocianidin sintetasa) y *UFGT* o *3GT* (UDP-glucosa-flavonoide glucosil transferasa).

Como se ha indicado anteriormente la temperatura es el otro factor ambiental importante en el activación y represión de la ruta de biosíntesis de antocianos. Al contrario que las bajas temperaturas, las altas temperaturas reprimieron la expresión de los activadores de la ruta de biosíntesis y/o indujeron a los represores (Yamane *et al.*, 2006; Rowan *et al.*, 2009; Lin-Wang *et al.*, 2011).

Las ruta de degradación de antocianos tiene lugar por un primer paso de eliminación de la glucosilación de los antocianos llevada a cabo por una enzima β -glucosilasa (Behrens *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018). A continuación, la ruta de degradación se diversifica en dos pasos que los llevan por un lado una enzima polifenol oxidasa y por otro lado una peroxidasa vacuolar de clase III (Behrens *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018). Poco se sabe sobre los genes que codifican para dichos enzimas, ya que se trata de enzimas con familias génicas muy grandes que dificulta la detección de su gen putativo en cítricos.

3.3.3.b Regulación de la ruta de síntesis de antocianos

También se considera de gran importancia la regulación de la ruta de síntesis de antocianos. Se sabe que existe un complejo llamado MBW que regula los genes estructurales de la síntesis de antocianos (Figura 4a) (Stracke *et al.*, 2007; Dubos *et al.*, 2010). Este complejo se compone de 3 factores de transcripción que son un R2R3-MYB, un bHLH y un WD40, de ahí las siglas del complejo.

El factor de transcripción R2R3-MYB asociado al complejo MBW está compuesto por un grupo de factores de transcripción PAP1/MYB75, PAP2/MYB90, MYB113 y MYB114 (Shi and Xie, 2014). De los anteriores factores, PAP1/MYB75 es el factor de transcripción esencial para la síntesis de la ruta en *Arabidopsis* ya que mutantes para este gen dieron lugar a plantas aciánicas (Shi and Xie, 2014). También se vio que PAP2, MYB113 y MYB114 activaron los genes *DFR* y *ANS* (Shi and Xie, 2014) aunque de una manera no tan intensa como PAP1 (Petroni and Tonelli, 2011).

Los factores bHLH que forman parte del complejo MBW son GL3, EGL3 y TT8 y juegan un importante papel modulando la biosíntesis de antocianinas y protoantocianinas (Baudry *et al.*, 2004; Zhao and Dixon, 2009). Ambos GL3 y EGL3 pueden estimular la expresión del gen de biosíntesis F3'H, pero EGL3 además se ha visto que puede estimular los genes de la ruta *DFR* y *ANS* (Petroni and Tonelli, 2011). TT8 es necesario en silicuas y células endoteliales en *Arabidopsis* para una expresión regular del gen *DFR* (Nesi *et al.*, 2000).

El factor WD-40 del complejo lo compone el gen *TTG1* y hasta el momento es el único factor WD-40 que se conoce que se une al complejo MDW (van Nocker and Ludwig, 2003). Se expresa de manera constitutiva en todos los tejidos de la planta en desarrollo y además en algunas situaciones de cambios ambientales a nivel transcripcional (Figura 4) (Cominelli *et al.*, 2008; Olsen *et al.*, 2009).

El grupo de Cominelli (Cominelli *et al.*, 2008), demostró que EGL3, PAP1 y TTG1 componen en complejo principal MBW e induce la ruta de biosíntesis de antocianos. A continuación, este complejo activaría la expresión de *TT8* que competiría con *EGL3* por la unión al complejo (Baudry, Caboche and Lepiniec, 2006).

3.3.4 Respuesta bioquímica a baja temperatura en cítricos

En cítricos también se ha demostrado que el aumento del contenido de osmo-protectores es una respuesta conservada ante el estrés por baja temperatura, y existen numerosos estudios que así lo demuestran.

3.3.4.a Azúcares y almidón

Alguno de los trabajos más actuales y relevantes en la síntesis de azúcares y almidón, se han obtenido en *C. junos* Sieb ex Tan (Jiang *et al.*, 2021); se realizó un estudio proteómico demostrando que la mayoría de las especies de proteínas diferencialmente presentes (DAPS por sus siglas en inglés) participan en el metabolismo del almidón y el metabolismo de la sacarosa basándose en las bases de datos de COG, KEGG y de análisis de interacción de proteínas. Así pues, vieron que la enzima almidón sintasa (A0A067H6P7), la enzima ramificante alfa 1,4 glucan 1 (A0A2H5PA48) y la glucosa 1 fosfato adeniltransferasa (V4S7Z6) se acumulaban menos, mientras que la poligalacturonasa (A0A067H357) y la manitol deshidrogenasa (A0A2H5Q4U0) se acumularon en mayor medida durante el estrés por frío. Además, los datos fisiológicos también demostraron que el contenido en glucosa, fructosa y almidón soluble incrementaron significativamente. Otro artículo relevante es el realizado en el patrón *P. trifoliata* donde se aisló el gen *PtrBAM1* y se sobreexpresó en plantas de tabaco dando lugar a la degradación de almidón, incremento de maltosa y azúcares solubles, pero sin embargo, su homólogo de *Citrus limon*, no respondió (Peng *et al.*, 2014). Además, análisis bioinformáticos y llevados a cabo por Yeast one-hybrid mostraron que en el promotor de *PtrBAM1* hay una zona de reconocimiento del gen *PtrCBF* (Peng *et al.*, 2014).

3.3.3.b Prolina

El aminoácido prolina además de otorgar la tolerancia a frío, se ha visto que resulta de gran ayuda para la selección de genotipos tolerantes (Rai and Penna, 2013; Abouzari, Solouki, Golein, Fakheri and Sabouri, 2020; Abouzari, Solouki, Golein, Fakheri, Sabouri, *et al.*, 2020; Primo-Capella *et al.*, 2021). En dos trabajos realizados por Abouzar Abouzari seleccionan a través de resultados fisiológicos y selección de 2 marcadores moleculares en los cromosomas 5 y 8 (CT21 y GT03, respectivamente) dos marcadores asociados al contenido de prolina (Abouzari, Solouki, Golein, Fakheri and Sabouri, 2020; Abouzari, Solouki, Golein, Fakheri, Sabouri, *et al.*, 2020).

3.3.3.c Antocianos

La respuesta a frío de síntesis de antocianos es ampliamente conocida y conservada en cítricos, y existen numerosos trabajos que muestran este hecho, donde además de medir la concentración de antocianos y flavonoides cuantifican la expresión de los genes de biosíntesis comparándola entre varios genotipos de cítricos (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2000; Lo Piero, Puglisi and Petrone, 2006; Crifò *et al.*, 2011; Mohammadian, Mobrami and Sajedi, 2011; Perotti *et al.*, 2015; Mohammadrezakhani *et al.*, 2019a; Sicilia *et al.*, 2020). El grupo de Angela Roberta Lo Piero se ha dedicado al análisis de la ruta de síntesis de antocianos en cítricos. Uno de sus trabajos se centra en el análisis del transcriptoma de la variedad pigmentada de cítricos *Tarocco Sciara* (Crifò *et al.*, 2011). En dicho trabajo observaron que el incremento en los transcritos que intervienen en la actividad de reorganización de los lípidos de membrana principalmente dirigida hacia la saturación de lípidos, codificó para enzimas que formaban parte de mecanismos de defensa y con funciones de protección frente al daño oxidativo, proceso de ajuste osmótico, así como algunos genes implicados en el metabolismo primario y secundario. En particular, los resultados mostraron que el estrés por frío induce modificaciones indudablemente hacia el aumento de la ruta de biosíntesis de antocianos y flavonoides y proponen que el aumento de antocianinas sujeto a estrés por frío puede contribuir al control celular del potencial osmótico (Crifò *et al.*, 2011).

3.4 Respuesta hormonal

3.4.1 Ácido abscísico

En plantas superiores, el ABA regula varios aspectos del crecimiento de la planta como son el desarrollo de las semillas y la maduración, la germinación y el cierre estomático (Chater *et al.*, 2011; Finkelstein, 2013). Además, el ABA es necesario en la activación transcripcional de los genes que intervienen en la respuesta a deshidratación, baja temperatura y otros estreses (Verslues and Bray, 2006; Nakashima, Ito and Yamaguchi-Shinozaki, 2009). La activación de los genes de respuesta de ABA conducen a la síntesis de proteínas pertenecientes a diferentes familias, incluyendo proteínas cloroplásticas que intervienen en la realización de la fotosíntesis y producción y detoxificación de ROS (Rook *et al.*, 2006). Otros genes regulados por ABA codifican para factores de transcripción, chaperonas, enzimas de síntesis de osmolitos, proteínas LEA y proteínas COR (Bray, 1997; Thomashow, 1999; Finkelstein and Gibson, 2002; Vishwakarma *et al.*, 2017).

La respuesta a ABA se induce por la activación de varias proteínas quinasas incluyendo la SnRK2s, CPK3, SOS2, CIPK24 y CIPK23 en *Arabidopsis* y

MdCIPk22 en manzano, los cuales afectan los cambios en la fosforilación de múltiples reguladores aguas abajo (Guo *et al.*, 2001; Boudsocq *et al.*, 2007; Ho *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2009; Mehlmer *et al.*, 2010; Umezawa *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Ding *et al.*, 2015, 2018; Ma *et al.*, 2019).

Una vez tiene lugar la unión entre el ABA y sus receptores, PYL interacciona con las PP2Cs del tipo A que a su vez libera la inhibición de las SnRK2.2/3/6 (Y. Huang *et al.*, 2014; S. Lee *et al.*, 2015; Saruhashi *et al.*, 2015; Stevenson *et al.*, 2016; Hwang *et al.*, 2018; Nguyen *et al.*, 2019; Shinozawa *et al.*, 2019).

El aumento de la concentración de la hormona ABA se correlaciona con un aumento en la biosíntesis de ABA en *Arabidopsis* y arroz (Baron, Schroeder and Stasolla, 2012; Maruyama *et al.*, 2014), y ocurre en respuesta al estrés por frío en diversas especies. La aplicación exógena de ABA promueve tolerancia al estrés por bajas temperaturas y los mutantes de ABA exhiben la resistencia alterada. Sin embargo, se piensa que el ABA no actúa a nivel de expresión de los genes *CBF* sino que ejercería el control aguas arriba (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Chen *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010; Hua *et al.*, 2013; Nakashima, Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2014; Ding *et al.*, 2015; Lee and Seo, 2015).

3.4.2 Ácido Jasmónico

El ácido jasmónico (por sus siglas JA) es una hormona que interviene en estreses de tipo biótico y abiótico, y se piensa que reprime el crecimiento en presencia de estrés por frío. El JA es una hormona del tipo oxilipina, cuya concentración aumenta en estrés por frío en diferentes especies de plantas incluyendo maíz, arroz y *Arabidopsis* (Kosová *et al.*, 2012; Du, Liu and Xiong, 2013; Hu *et al.*, 2013; Maruyama *et al.*, 2014). El incremento de la concentración de JA se correlaciona con el incremento de expresión de los genes de biosíntesis en *Arabidopsis* y arroz (Du, Liu and Xiong, 2013; Hu *et al.*, 2013) y la represión de los genes que codifican para los genes que intervienen en el catabolismo de JA en arroz (Du, Liu and Xiong, 2013). Una vez aumenta la concentración de JA se produce la unión con su receptor COI1 y se inicia la señalización por ubiquitinación, y de este modo, se estimula la degradación dependiente del proteasoma de las proteínas JAZ, que reprimen la expresión de los genes de respuesta a JA. La aplicación exógena de JA aumenta la inducción de los *CBF* y los genes aguas arriba de los *CBF* después del tratamiento a bajas temperaturas y promueven así la tolerancia, al igual que ocurre con el ABA. En *Arabidopsis* se piensa que los represores JAZ1 y JAZ4 interaccionan directamente con los factores de transcripción ICE1 y ICE2 para reprimir directamente su efecto (Hu *et al.*, 2013). Además, se ha visto mediante un ensayo de microarray en plantas mutantes *coi1* que se ven alterados algunos genes COR correspondientes a la ruta CBF-independiente (Hu *et al.*, 2013).

3.4.3 Respuesta hormonal bajo estrés por baja temperatura en cítricos

En cítricos expuestos a baja temperatura se ha visto que también están afectados por las hormonas ABA y JA, y varios son los estudios que se han realizado en los que está implicada la respuesta a frío (Liu *et al.*, 2010; Xian *et al.*, 2014; He *et al.*, 2016; Ouyang *et al.*, 2019). Además, existen varios trabajos en cítricos donde la aplicación de ABA externo tuvo su efecto frente a la baja temperatura.. Uno de ellos donde los resultados indicaron que la aplicación de ABA foliar a los cítricos efectivamente incrementó la tolerancia durante el evento de congelación que tuvo lugar, pero no lo hizo a través de la aplicación de ABA en el suelo (Melgoza *et al.*, 2014). Posteriormente, se realizó otro experimento de aplicación de ABA comparando *P. trifoliata* vs. *Citrus limonia* y se vio que las hojas pretratadas con ABA expuestas a bajas temperaturas pueden reducir el daño de la membrana significativamente. Sin embargo, el pretratamiento de ABA en presencia de frío estuvo influenciado de manera irregular en la peroxidación de lípidos y en la actividad de enzimas antioxidantes (Hua *et al.*, 2013).

4. HIPÓTESIS

De acuerdo con lo expuesto, nuestra hipótesis de trabajo fue que la tolerancia a bajas temperaturas mostrada por los genotipos tolerantes de algunos patrones de cítricos podría transmitirse a la variedad.

Para probar esto hemos determinado:

1. La respuesta fisiológica de los patrones de cítricos a estrés por bajas temperaturas a largo término.
2. La influencia de diferentes osmoprotectores en la respuesta a frío por bajas temperaturas a largo término.
3. Respuesta transcriptómica a bajas temperaturas a largo término.
4. Perfil transcriptómico de genes de tolerancia a estrés por bajas temperaturas a tiempos cortos.
5. Efecto del patrón en frutos de variedades pigmentadas expuestos a bajas temperaturas.

Así pues, hemos realizado experimentos con el fin de obtener:

- Información sobre la respuesta fisiológica, bioquímica y transcriptómica de la tolerancia transmitida a la variedad a largo término de estrés.
- Un protocolo rápido a tiempos cortos para el cribado de nuevos patrones de cítricos tolerantes a bajas temperaturas.
- Demostración del efecto del patrón en variedades pigmentadas en condiciones de campo.

Estrés por frío a corto plazo

1. OBJETIVOS

1. Definir la mejor manera de inducir la respuesta a bajas temperaturas en plántulas de patrones de cítricos.
2. Determinar la expresión de genes de respuesta frente a baja temperatura en patrones de cítricos que tiene lugar en las primeras horas de exposición.
3. Integrar dichos genes en un programa de selección de patrones de cítricos tolerantes a la baja temperatura.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se emplearon semillas de citrange Carrizo, *C. macrophylla* y *P. trifoliata* Rubidoux a las que se les eliminó la testa y parcialmente el tegmen con el fin de no dañar el embrión. Posteriormente se esterilizaron durante 15 min al 2% v/v de una solución comercial de lejía (0.5 M de NaClO) y se aclararon con 3 lavados de agua destilada previamente autoclavada a 120 °C durante 20 min. A continuación, se transfirieron a un medio de crecimiento (5 mM KNO₃, 5 mM Ca (NO₃)₂, 4 mM MgSO₄, 0.6 mM KH₂PO₄, 0.7 μM MoO₃, 9 μM MnCl₂ · 4H₂O, 18 μM Zn SO₄ · 7H₂O, 0.40 μM CuSO₄ · 5H₂O, 43 μM Fe-EDDHA), se justó el pH a 5.8 con KOH y se añadió 0.4% de Plant Agar (Duchefa, 2031 BHaarlem, The Netherlands). El medio de crecimiento se autoclavó y se distribuyó en tubos de 150 × 25 mm (40 mL por tubo), posteriormente se sembraron las semillas (una por tubo) que germinaron en una cámara de crecimiento (Sanyo MCR-350H, Sanyo Electric Biochemical Co, Japan) a 24/22 °C de temperatura 16h luz /8h de oscuridad respectivamente y 250 μmol m⁻² s⁻¹ de densidad de flujo de fotón fotosintético.

2.1.1 Experimento 1

Después de 8 semanas de crecimiento, se procedió al tratamiento a 4 °C durante 0 (CT, Control), 4, 8, 24 y 96 horas con un fotoperíodo de 16 h luz /8h de oscuridad de los genotipos *C. macrophylla* (sensible al frío) y *P. trifoliata* (tolerante al frío). Para cada genotipo y tiempo se emplearon 5 réplicas biológicas de un 'pool' de 2 plantas cada uno, empleando en total 50 plantas por cada genotipo.

2.1.2 Experimento 2

Después de 8 semanas de crecimiento se procedió al tratamiento de los genotipos citrange Carrizo, *C. macrophylla* y *P. trifoliata* a 4 °C con un fotoperíodo de 16h luz /8h de oscuridad durante 5 días. Las plantas CT (Control) se mantuvieron en las condiciones de crecimiento. Tras el tratamiento de frío, las plantas se pasaron a una cámara de aclimatación a 24/22 °C de temperatura 16h luz /8h donde estuvieron durante 0, 5, 10 y 24 horas hasta la recogida de muestras. En este caso para cada tiempo se contó con 5 réplicas biológicas y un 'pool' de 2 plantas por réplica biológica con un total de 50 plantas por genotipo.

2.2 Obtención de los genes putativos

Todos los genes putativos en cítricos fueron consultados en *A. thaliana*, y fueron chequeados en “The Arabidopsis Information Resource web” (TAIR) <https://www.arabidopsis.org/>. Se realizó un tBLASTn para *Citrus clementina* en la página del Consorcio Internacional del Genoma de Cítricos, Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) (Goodstein et al., 2012) (Tabla 1).

Tabla1. Oligonucleótidos obtenidos para la cuantificación de la expresión génica de los siguientes genes putativos.

| Nombre | GeneBank | Phytozome ^a | Oligos 5' – 3' |
|---------------------------------|-------------|------------------------|---|
| <i>Respuesta frío</i> | | | |
| CAMTA1 | LOC18034255 | Ciclev10027833m | FOR 5' TTCCCGTGAACCAAGGAGTC 3' REV 5' CAGACATGAAGGTGTCATCATCCAA 3' |
| CAMTA3 | LOC18035748 | Ciclev10024764m | FOR 5' TCAGTATCCAGAAGCGAGGGATC 3' REV 5' TCTGCGTTGCTCAGAGCCAT 3' |
| CAMTA5 | LOC18031834 | Ciclev10004273m | FOR 5' GAAGAATATCGGAGGATGAAGCTGG 3' REV 5' CCATATCTGGGTCAAGTAGCCT REV 3' |
| ICE1 | LOC18051975 | Ciclev10015052m | FOR 5' GCCTTGGGTGGACATTCAGCAG 3' REV 5' CTGCTTGGGCAAGACATCCTGG 3' |
| CBF1 | LOC18033409 | Ciclev10007068m | FOR 5' TGGGATGCCAGATTGTTG 3' REV 5' CCTCCACAATTAGACTGAGGTGGT 3' |
| COR413IM1 | LOC18053244 | Ciclev10016585m | FOR 5' CTCTTGGTTATTGTGGCTCCTCATC 3' REV 5' TGGCAACAACCTGAACCTTGCTC 3' |
| <i>Ruta síntesis de Prolina</i> | | | |
| P5CS1 | LOC18044634 | Ciclev10030839m | FOR 5' AAGGAAGCGGGCAAGTGGT 3' REV 5' CCTCGTGGATGATTCCGACCC 3' |
| P5CS2 | LOC18038188 | Ciclev10011176m | FOR 5' ATCCTGAGCGTCCCTTCTTC 3' REV 5' CCATCTACGACGTGCCATTCC 3' |
| d-OAT | LOC18051867 | Ciclev10015647m | FOR 5' TCAAGGAGAGGCTGGGGTTA 3' REV 5' CGAACTTCTTCCCAATCAGAGG 3' |
| PROT1 | LOC18043556 | Ciclev10031324m | FOR 5' TGGCTGGGAGTTTCAACAGTTCTC 3' REV 5' CAAACACCAGATTAGCACATGCC 3' |
| PROT2 | LOC18047579 | Ciclev10020150m | FOR 5' CTGGGCTTACGGCTCCAGTGTATC 3' REV 5' GTGTCAAGGCTCTCGTAAACTGGCG 3' |
| <i>Genes de referencia</i> | | | |
| UBC4 | ATUBC4 | Ciclev10009771m | FOR 5' TGGACGCTTCAGTCTGTTTG 3' REV 5' TCGTCAATCACCCCTTCTTT 3' |
| ACTIN | β-ACTIN | Ciclev10025866m | FOR 5' CAGTGTTTGGATTGGAGGATCA 3' REV 5' TCGCCCTTTGAGATCCACAT 3' |

^aLa anotación se muestra en formato proveniente del GeneBank y Phytozome, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> and <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>.

2.3 Aislamiento de RNA y cuantificación génica por RT-qPCR

Las muestras de hoja se recogieron, se introdujeron en N₂ líquido y se almacenaron a -80 °C. El RNA se extrajo a partir de 100 mg de tejido con el Kit RNase Plant Mini Kit (Qiagen) con el tampón RLT- β-mercaptoethanol (SigmaAldrich). La contaminación con DNA genómico se eliminó con el Kit RNase-Free DNase Set (Qiagen, CA, USA) a partir de digestión en columna, acorde a las instrucciones del fabricante. El RNA purificado (1 µg) fue empleado para realizar la reacción de transcripción reversa con la enzima (SuperScript III Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) en un volumen total de 20 µl. El cDNA copia se diluyó 50 veces y se emplearon 2 µl como molde para la reacción de RT-PCR en un volumen final de 20 µl. La reacción de RT-PCR cuantitativa se realizó en un termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) empleando la polimerasa Ex Taq (TliRNase H plus) (Takara Europe, S.A.S, Saint Germain en Laye, FR) con el intercalante TB Greenpremix. El programa de PCR consistió en 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 seg a 95 °C, y 1 min a 60 °C. La especificidad de la reacción la otorgó la presencia de un solo pico en la curva de disociación y a través de estimaciones en el tamaño del producto amplificado que se comprobó a partir de una electroforesis de agarosa. Los transcritos de los genes CiclevActin y CiclevUBC4, amplificados con oligonucleótidos específicos, se usaron como genes de referencia (Tabla 1) (Agüero *et al.*, 2014; Estornell *et al.*, 2016) y los cálculos de ANOVA simple y regresión lineal se realizaron con los valores de CT para examinar la variación de nuestros genes de referencia (Brunner, Yakovlev and Strauss, 2004). El factor de normalización de los genes de referencia se calculó por el valor de la media geométrica de ambos genes (Brunner, Yakovlev and Strauss, 2004). La expresión relativa se midió por el procedimiento de curva estándar con cinco puntos de dilución (Pfaffl, 2001). Los resultados se realizaron con la media de las tres muestras biológicas independientes con tres réplicas técnicas de cada una de ellas.

2.4 Análisis estadísticos

Los datos de los experimentos de RT-qPCR (en adelante RT-PCR) resultaron de la media y desviación standard de tres muestras biológicas con un 'pool' de dos plantas por muestra biológica y tres réplicas técnicas por muestra biológica (n=6 por genotipo y tiempo). Los resultados de la cuantificación del aminoácido prolina resultaron de la media y desviación de cinco muestras biológicas con un 'pool' de dos plantas por muestra biológica (n=10 por genotipo y tiempo). Los resultados

se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) usando el Statgraphics Centurion versión 16.1 (Statistical Graphics, Englewood Cliffs, NJ, USA). Se utilizó el estadístico ANOVA con el método LSD (diferencias mínimas de significancia) al $P < 0.05$.

3. RESULTADOS

3.1 Experimento 1

3.1.1 Respuesta génica a la baja temperatura en tiempos cortos

Se cuantificó la expresión de los genes de respuesta a baja temperatura que se conocen que son clave en los primeros momentos de exposición a frío. Estos genes de respuesta se muestran en la Figura 5 a-f para los genotipos de *P. trifoliata* (en adelante PON) y *C. macrophylla* (en adelante MAC) sin injertar. Los genes CAMTA (Figura 5a-5c), considerados como “cold shock genes” aumentaron de manera discreta, aunque con diferencias entre ambos patrones. *CAMTA1* aumentó la expresión con el tiempo en ambos patrones siendo del doble a las 56 horas de exposición con respecto al tiempo 0, aunque no hubo diferencias entre patrones. La expresión de *CAMTA3* fue mayor a partir de las 56 horas de exposición a baja temperatura en plántulas de PON siendo significativamente 3 veces mayor que en plántulas MAC. La expresión de *CAMTA5* no fue del todo concluyente para ambos patrones, aunque a las 8 horas de frío las plántulas de PON tuvieron una expresión 2 veces mayor que las plántulas de MAC. Los resultados del factor de transcripción *ICE1* resultaron también ser discretos. Después de 4 horas de exposición a frío, la expresión aumentó en ambos patrones, de 1 a 1.5 veces en PON y de 0.25 a 0.6 veces en MAC con respecto al tiempo 0. En ambos casos la expresión se reprimió a tiempos posteriores. La expresión del gen putativo *CBF1* resultó más interesante para el patrón PON, ya que aumentó sobre 9 veces a las 4 horas de frío con respecto al tiempo inicial, y 4 veces después de las 56 horas de exposición. Sin embargo, las plántulas del patrón MAC no indujeron la respuesta a frío a través del gen *CBF1* o dicha inducción no fue detectada. La Figura 5f, muestra la expresión del gen de respuesta *COR413 IM1* que se activa por los factores de transcripción CBF. En plántulas de PON la expresión se reprimió 4 veces a las 4, 8 y 24 horas de frío con respecto al tiempo inicial. Sin embargo, la expresión aumentó de nuevo a las 56 horas de frío. El patrón MAC no cambió su expresión con el tiempo.

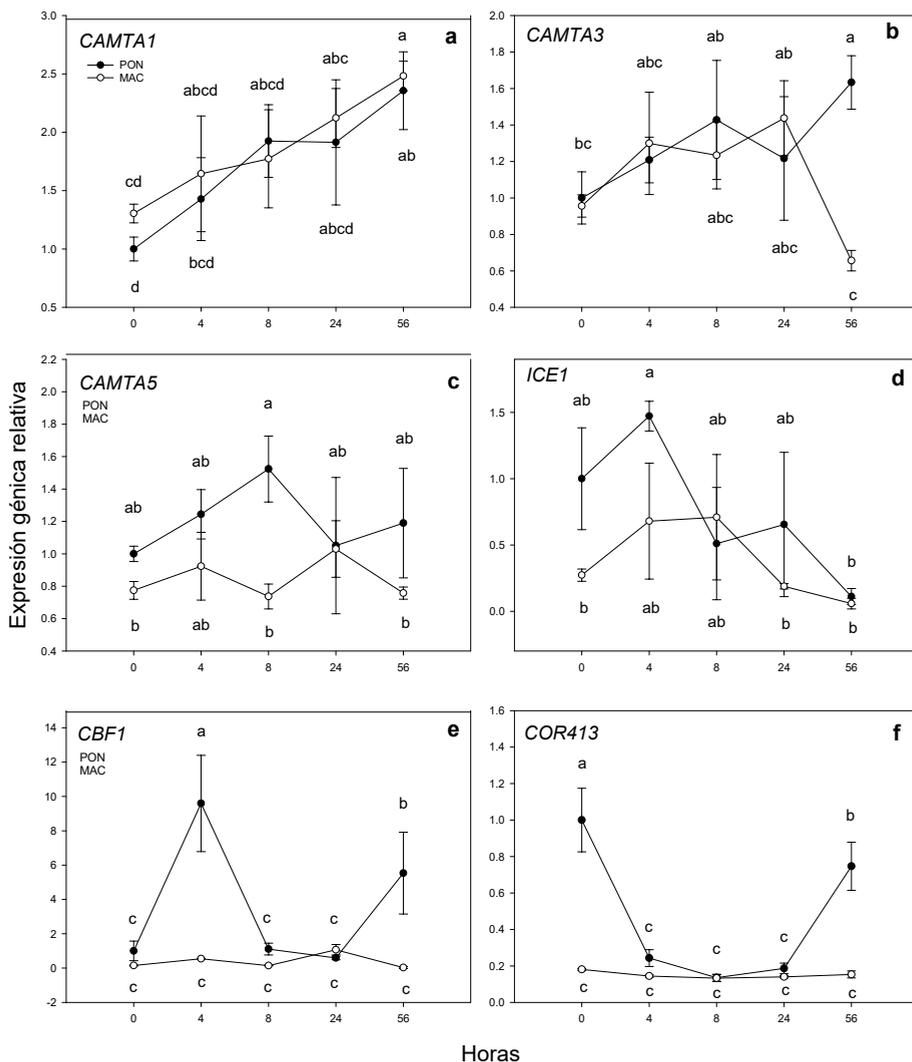


Figura 5. Expresión relativa de los genes putativos de respuesta a baja temperatura. Plántulas de *P. trifoliata* (PON) y *C. macrophylla* (MAC) de 2 meses se sometieron a 4 °C durante 0, 4, 8, 24 y 56 horas. a, b y c) corresponde a los genes putativos CAMTA1 (LOC18034255), CAMTA3 (LOC18035748) y CAMTA5 (LOC18031834). d y e) corresponden a los factores de transcripción centrales de la respuesta a frío ICE1 (LOC18051975) y CBF1 (LOC18033409). f) expresión del gen putativo COR413 IM1 (LOC18053244). Los valores mostrados representan la media \pm DS entre 3 réplicas biológicas (n=3) y 3 réplicas técnicas. Las letras indican el efecto del tratamiento a diferentes tiempos que se probó con un test LSD del ANOVA múltiple.

3.1.2 Expresión génica de la ruta de síntesis y transporte del aminoácido prolina y su cuantificación a tiempos cortos de exposición a baja temperatura

Como hemos indicado previamente, la cuantificación de la expresión génica de la ruta de síntesis de la prolina y la cuantificación de su concentración en hoja se determinó como método rápido de rastreo de patrones tolerantes. A continuación, en la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos. Los dos genes principales de síntesis de prolina en situaciones de estrés (Figura 6a y 6b) son *P5CS1* y *dOAT*. La expresión relativa de *P5CS1* (Figura 6a) aumentó en ambos casos con el tiempo de exposición siendo significativamente mayor la expresión a las 24 horas de exposición en el patrón sensible MAC con una inducción de 2 veces respecto a su control a las 0 horas de frío. El gen putativo *dOAT* (Figura 6b) también tuvo la tendencia de aumentar con el tiempo alcanzando un pico a las 24 horas en el patrón MAC, significativamente mayor que PON, con un aumento de expresión de 1.6 en tiempo 0 hasta 2.5 a tiempo 24 horas. Sin embargo, después de 56 horas de exposición a baja temperatura disminuyó en ambos casos.

También se cuantificó la expresión relativa de los dos transportadores putativos de prolina *PROT1* y *PROT2* (Figura 6c y 6d). La expresión de *PROT1* (Figura 6c) comenzó a aumentar después de 56 horas de exposición a baja temperatura. A las 56 horas de frío, PON aumentó significativamente su expresión en 3 veces mientras que en el patrón MAC aumentó el doble de expresión a las 56 horas. En el caso de *PROT2* (Figura 6d), la expresión fue disminuyendo con el tiempo en el patrón MAC hasta 4 veces a las 56 horas. En cambio, el patrón PON no cambió la expresión del transportador de prolina *PROT2*.

En la concentración de prolina en hoja no se observó una tendencia clara para ambos patrones en estas condiciones de estrés, probablemente debido a que los tiempos evaluados resultaron demasiado cortos para poder detectar una subida en la concentración de osmolitos.

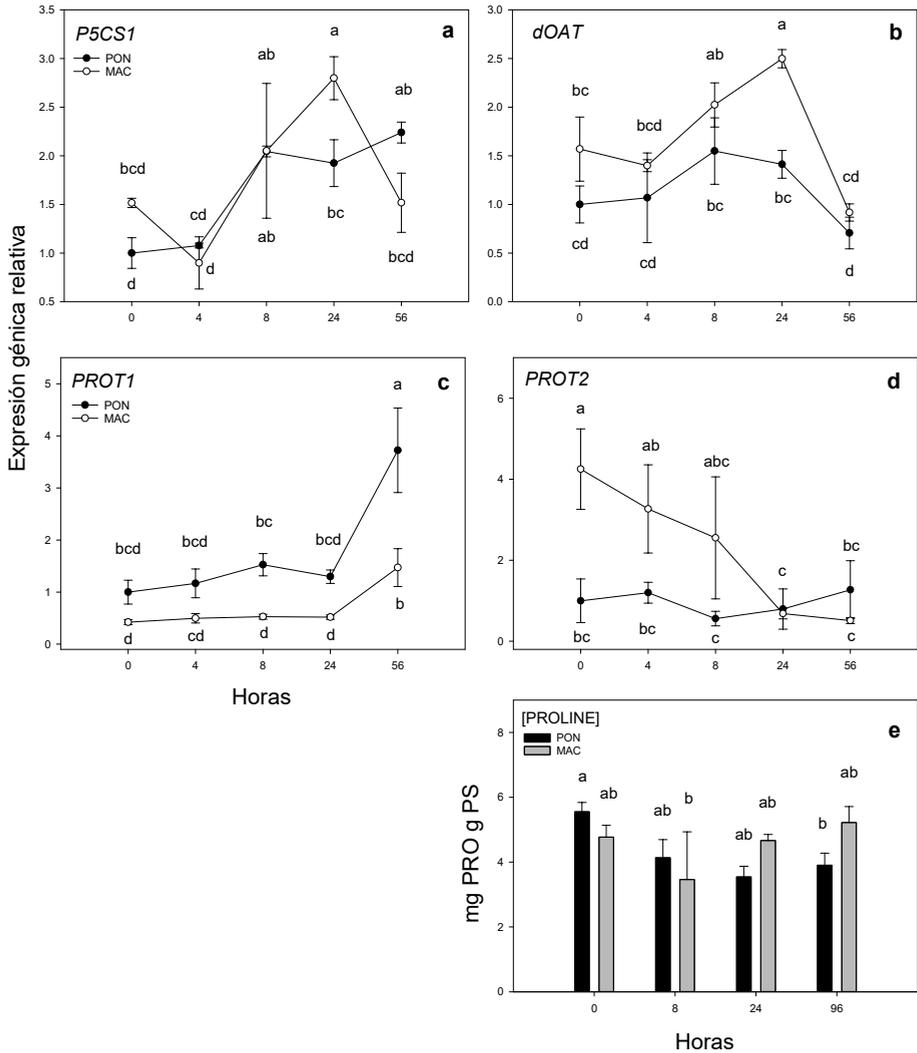


Figura 6. Expresión relativa de los genes putativos de la ruta de síntesis y transporte de prolina. Plántulas de *P. trifoliata* (PON) y *C. macrophylla* (MAC) de 2 meses se sometieron a 4 °C durante 0, 4, 8, 24 y 56 horas. a y b) corresponden a los genes putativos de síntesis de prolina P5CS1 (LOC18044634) y dOAT (LOC18051867). c y d) corresponden a los transportadores de prolina PROT1 (LOC18043556) y PROT2 (LOC18047579). e) Cuantificación del aminoácido prolina en hojas. Los valores mostrados representan la media \pm DS entre 3 réplicas biológicas (n=3), 5 réplicas para la cuantificación de prolina (n=5) y 3 réplicas técnicas para ambos. Las letras indican el efecto del tratamiento a diferentes tiempos que se probó con un test LSD del ANOVA múltiple.

3.2 Experimento 2

3.2.1 Expresión Relativa de genes putativos de respuesta a baja temperatura después de un período de aclimatación

Al igual que se realizó en el ensayo a tiempos cortos, queríamos ver qué ocurría con los genes de respuesta temprana durante el tiempo de aclimatación, esperando ver su inducción y comprobar el tiempo que tarda en desaparecer dicha inducción y ver la diferencia entre los patrones. Así pues, la Figura 7a muestra la expresión del gen putativo *CAMTA1*, el cual no mostró diferencias significativas entre los patrones. Su expresión tuvo un incremento de expresión del doble a tiempo 0 y 5 horas de aclimatación, y después de 10 horas volvió a los valores control. La expresión del gen putativo *CAMTA3* (Figura 7b) tuvo una respuesta similar a la de *CAMTA1*, aunque su expresión tardó más en alcanzar los valores control en los tres patrones. La expresión del gen putativo *CAMTA5* (Figura 7c) aumentó en casi 9 veces de una manera significativa en el patrón PON después de los 5 días expuesto a la baja temperatura a tiempo 0 de aclimatación. En los patrones CAR y MAC este incremento no fue tan alto, de modo que en CAR la expresión aumentó 5 veces y en MAC aumentó en 3.5 veces. Sin embargo, la expresión a las 5 horas de aclimatación descendió, alcanzando los valores control a las 10 horas de aclimatación en los tres patrones. Como en el experimento anterior, la expresión de *ICE1* (Figura 7d) no resultó concluyente. La expresión de *ICE1* después del tratamiento de frío, a los 0 días de aclimatación, resultó reprimida en los patrones PON y CAR. Sin embargo, la expresión del patrón MAC no cambió en el tiempo. El gen putativo *CBF1*, factor de transcripción central de la respuesta a frío (Figura 7e), tuvo un patrón de expresión muy interesante, ya que después del tratamiento de 5°C, a tiempo 0 de aclimatación, su expresión aumentó significativamente en los patrones PON y CAR en 27 y 20 veces respectivamente con respecto al control sin frío, mientras que en MAC la expresión no cambió. Con el proceso de aclimatación, la expresión de *CBF1* disminuyó a valores de control en los tres patrones. El gen putativo *COR413 IM1* (Figura 7f) aumentó en 9 veces su expresión durante la aclimatación con respecto a las plantas sin tratamiento, a tiempos 5 y 10 horas. Sin embargo, los patrones CAR y MAC aumentaron la expresión a las 10 y 24 horas de la aclimatación cerca de 2 veces en los dos patrones.

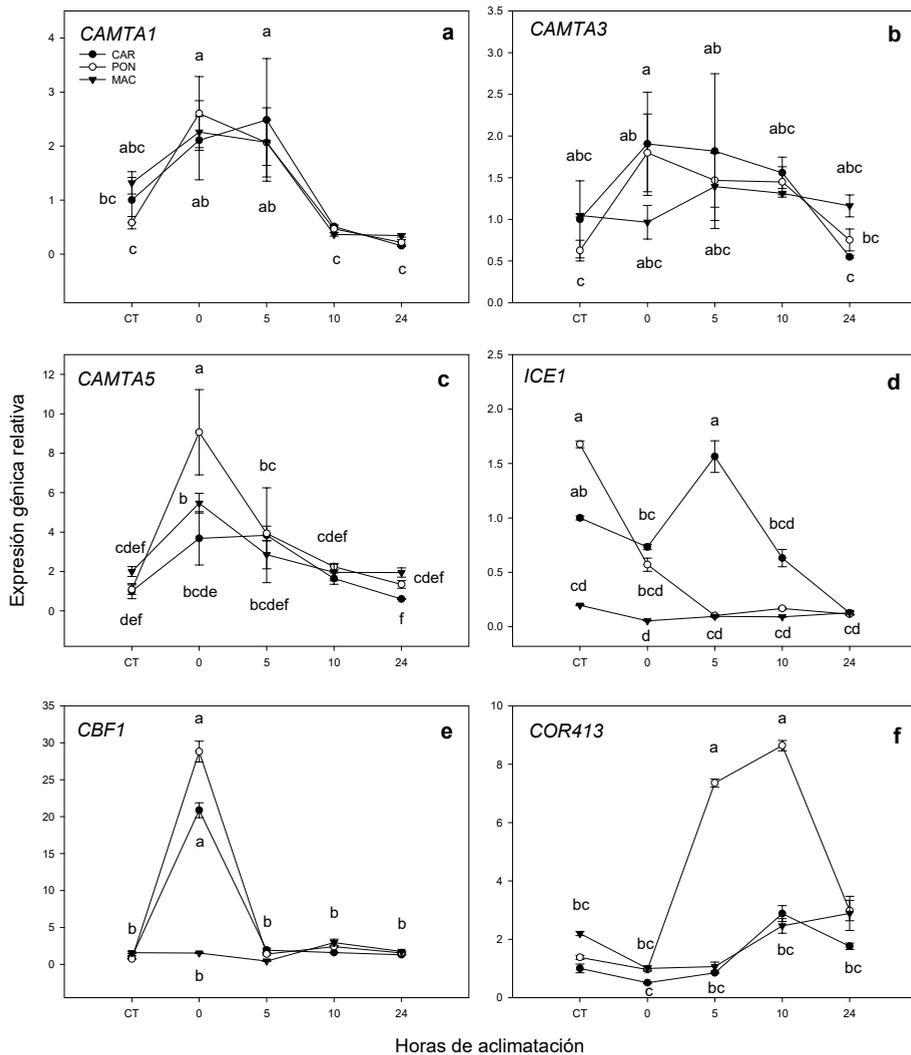


Figura 7. Expresión relativa de los genes putativos de respuesta a baja temperatura. Plántulas de *P. trifoliata* (PON), cítrange Carrizo (CAR) y *C. macrophylla* (MAC) de 2 meses se sometieron a 4 °C durante 5 días, y posteriormente se llevaron a aclimatar durante 0, 5, 10 y 24 horas a una temperatura de 24/22 °C y un fotoperiodo de 16h luz /8h oscuridad. a, b y c) corresponden a los genes putativos CAMTA1 (LOC18034255), CAMTA3 (LOC18035748) y CAMTA5 (LOC18031834). d y e) corresponden a los factores de transcripción centrales de la respuesta a frío ICE1 (LOC18051975) y CBF1 (LOC18053244). f) expresión del gen putativo COR413 IM1 (LOC18053244). Los valores mostrados representan la media ± DS entre 3 réplicas biológicas (n=3) y 3 réplicas técnicas. Las letras indican el efecto del tratamiento a diferentes tiempos que se probó con un test LSD del ANOVA múltiple.

3.2.2 Expresión génica de la ruta de síntesis y transporte del aminoácido prolina y su cuantificación a baja temperatura después de un período de aclimatación

También quisimos evaluar qué ocurría en la ruta de síntesis y transporte de prolina durante el proceso de aclimatación. El gen de síntesis *P5CS1* (Figura 8a) aumentó su expresión 5 veces respecto al control a los tiempos 0, 5 y 10 horas de aclimatación en el patrón PON. Después de 24 horas de aclimatación, la expresión de *P5CS1* en PON disminuyó a valores iniciales. El patrón CAR aumentó en 4 veces su expresión a las 0 horas de aclimatación y disminuyó hasta valores control a las 10 horas de la aclimatación. El patrón MAC aumentó la expresión durante la aclimatación alcanzando un máximo después de 10 horas. El gen putativo de síntesis de prolina *dOAT* (Figura 8b) aumentó progresivamente entre 2 y 3 veces su expresión en PON y CAR alcanzando un máximo a las 10 horas de aclimatación. El patrón MAC sin embargo tuvo un patrón de expresión muy diferente a PON y CAR, ya que aumentó la expresión de *dOAT* en 6 veces a las 5 horas de aclimatación y fue disminuyendo su expresión hasta valores iniciales a las 24 horas de la aclimatación. A continuación, se muestra la expresión del transportador putativo *PROT1* que está relacionado con el transporte de prolina a larga distancia, o transporte floemático, y el transportador *PROT2* que estaría relacionado con el transporte de prolina específico de raíz. La expresión del gen putativo *PROT1* (Figura 8c) también tuvo un patrón de expresión muy diferente entre MAC y los dos patrones tolerantes PON y CAR. La expresión del transportador en CAR y PON fue progresiva y alcanzó un máximo de cerca de 3 veces a las 5 horas en CAR y a las 10 horas de aclimatación en PON. Sin embargo, en el patrón MAC aumentó la expresión en 6 veces a las 0 horas de aclimatación con respecto a su control. El gen del transportador *PROT2* (Figura 8d) reprimió su expresión con el tratamiento a baja temperatura en CAR y MAC y recuperó a las 24 horas de aclimatación sus valores iniciales. Sin embargo, el patrón PON no cambió su expresión durante el ensayo, siendo su expresión relativa cercana a 0. Finalmente, en la Figura 8e se muestra la concentración del aminoácido prolina en las hojas. Dada la expresión de los genes de síntesis de prolina, tanto *P5CS1* y *dOAT*, esperaríamos una mayor concentración de aminoácido prolina en hojas de PON que en CAR o MAC. Sin embargo, la concentración de prolina fue mayor en el patrón MAC de manera significativa en el control, a tiempo 0 y a tiempo 5 horas de aclimatación. Después de 24 horas de aclimatación la concentración del aminoácido prolina fue significativamente mayor en PON que en los patrones CAR y MAC.

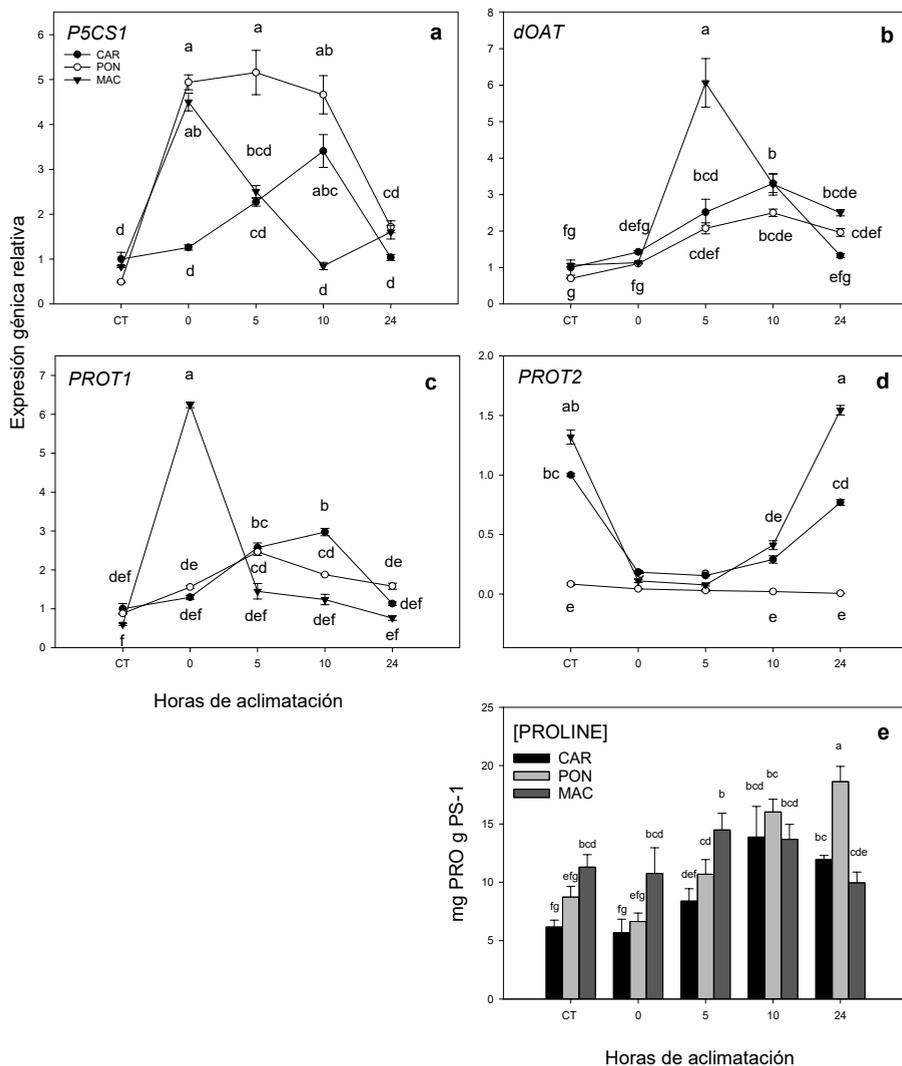


Figura 8. Expresión relativa de los genes putativos de la ruta de síntesis y transporte de prolina. Plántulas de *P. trifoliata* (PON), citrange Carrizo (CAR) y *C. macrophylla* (MAC) de 2 meses se sometieron a 4 °C durante 5 días y posteriormente se llevaron a aclimatar durante 0, 5, 10 y 24 horas a una temperatura de 24/22 °C y un fotoperíodo de 16h luz /8h oscuridad. a y b) corresponden a los genes putativos de síntesis de prolina P5CS1 (LOC18044634) y dOAT (LOC18051867). c y d) corresponden a los transportadores de prolina PROT1 (LOC18043556) y PROT2 (LOC18047579). e) Cuantificación del aminoácido prolina en hojas. Los valores mostrados representan la media \pm DS entre 3 réplicas biológicas (n=3) para la cuantificación génica y 5 réplicas para la cuantificación de prolina (n=5) y 3 réplicas técnicas para ambos. Las letras indican el efecto del tratamiento a diferentes tiempos que se probó con una prueba LSD del ANOVA múltiple.

Como se ha indicado anteriormente, la expresión de los transportadores se ha visto acotada a ciertos tejidos o ciertas funciones. Estudios previos indican que el transportador PROT1 se expresa en floema por lo que se asocia al transporte a larga distancia. Sin embargo, el transportador PROT2 se expresa principalmente en raíces. Así pues, se determinó la expresión de los genes putativos *PROT1* y *PROT2* en las raíces (Figura 9). En el gen putativo *PROT1* (Figura 9a), la expresión en CAR, MAC y PON no resultó ser del todo clara ya que cada genotipo obtuvo un patrón de expresión muy diferente. En MAC la expresión génica fue muy baja en general, aunque a tiempo 0 horas aumentó su expresión en 5 veces y posteriormente se mantuvo a niveles de expresión del control. El patrón MAC se reprimió 10 veces con el tratamiento de frío a 0 horas de expresión. El patrón PON mantuvo su expresión a lo largo del ensayo. En el caso de la expresión del gen putativo *PROT2* (Figura 9b) el patrón MAC no tuvo cambios de expresión. El patrón CAR aumentó la expresión 3 veces con respecto a su control a las 5 horas de aclimatación, aunque sin ser significativo respecto a MAC. Sin embargo, PON no aumentó en gran medida la síntesis de transportador durante el tratamiento de baja temperatura, pero se observó que el nivel basal de expresión génica era cerca de 5 veces mayor que las raíces de los otros dos genotipos. Finalmente, la cuantificación del aminoácido prolina en raíces no arrojó resultados significativos, ya que no cambió con el tiempo.

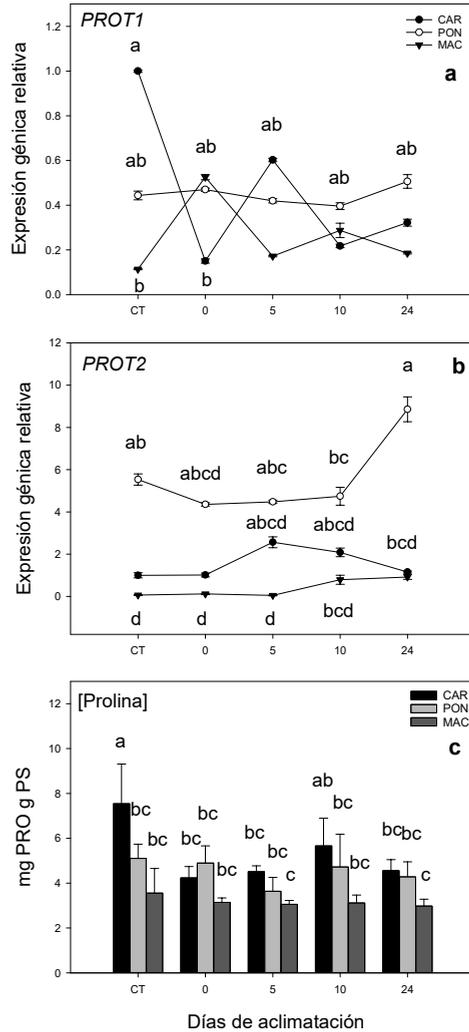


Figura 9. Expresión relativa de los genes putativos PROT1 (LOC18043556) y PROT2 (LOC18047579) en raíces. Plántulas de *P. trifoliata* (PON), citrange Carrizo (CAR) y *C. macrophylla* (MAC) de 2 meses se sometieron a 4 °C durante 5 días y posteriormente se llevaron a aclimatar durante 0, 5, 10 y 24 horas a una temperatura de 24/22 °C y un fotoperiodo de 16h luz /8h oscuridad. a y b) corresponden a la expresión de los genes putativos PROT1 y PROT2 en las raíces c) Cuantificación del aminoácido prolina en raíces. Los valores mostrados representan la media \pm DS entre 3 réplicas biológicas (n=3) para la cuantificación génica y 5 réplicas para la cuantificación de prolina (n=5) y 3 réplicas técnicas para ambos. Las letras indican el efecto del tratamiento a diferentes tiempos que se probó con un test LSD del ANOVA múltiple.

4. DISCUSIÓN

Como se ha indicado anteriormente, el objetivo es conocer la respuesta rápida a la baja temperatura en plántulas de patrones de cítricos, que se realizó mediante dos experimentos. En el primer experimento, las plantas se sometieron al estrés por baja temperatura a diferentes tiempos progresivos de 0, 4, 8, 24 y 56 horas, por lo que en este caso se deseaba ver la respuesta rápida de los patrones a bajas temperaturas. Sin embargo, en el segundo experimento del presente capítulo, todas las plantas se sometieron al mismo estrés durante 5 días y posteriormente se procedió a la retirada del estrés y toma de muestras a diferentes tiempos una vez pasado el estrés (aclimatación a situación control). En este caso, además de la respuesta rápida a bajas temperaturas, también se pudo ver cómo la planta se recupera y vuelve a su situación inicial, proporcionando así una mayor información que en el caso anterior.

Así pues, se cuantificaron los genes de respuesta rápida en ambos experimentos obteniendo resultados bastante coherentes entre experimentos (Figura 5 y Figura 7). En ambos experimentos se obtuvo una mayor expresión en el genotipo PON de los genes putativos *CAMTA3*, *CAMTA5* y *CBF1*. Por lo que, la selección previa de estos 3 genes de respuesta tanto en el caso del experimento 1 como en el experimento 2 discriminan a los genotipos tolerantes de los sensibles. Es más, en el experimento 2 incluso los clasifica por niveles de tolerancia, aunque esta apreciación puede que sea casual. Este resultado no significa que los únicos inductores del regulón CBF-dependiente en este caso hayan sido *CAMTA3* y *CAMTA5*. De hecho, como se ha indicado en la introducción, hay una gran batería de inductores de los COR y sólo algunos son los que se conocen que actúan por la ruta CBF-dependiente (Shi, Ding and Yang, 2018; Ding, Shi and Yang, 2019; Liu *et al.*, 2019).

En el caso del gen *ICE1*, se esperaba una gran inducción, ya que es el activador más directo y conocido en la bibliografía del regulón CBF (Chinnusamy *et al.*, 2003; Chinnusamy, Zhu and Zhu, 2007). En nuestro caso, la expresión en ambos experimentos no es clara, ya que en el genotipo sensible su expresión no cambió con el tiempo y en los genotipos tolerantes su expresión tendió a reprimirse. Este hecho puede ocurrir por dos razones. Una de ellas es que el gen putativo seleccionado como *ICE1* se haya atribuido a otro gen que no sea realmente *ICE1* o que en cítricos este factor de transcripción tenga una función diferente al que se conoce en otras especies, como *A. thaliana*. Y otro motivo por el que la expresión no se corresponda con la respuesta es debido a que la proteína que codifica para el gen *ICE1* sufre modificaciones post-traduccionales y su regulación se lleva a cabo a partir de otros factores. La función de la proteína ICE1 ocurre por un lado

por la fosforilación de las MPK3/6 reduciendo la estabilidad de ICE1. Esta fosforilación llevada a cabo por las MPKs, lleva a la proteína ICE1 al proteasoma (Li *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2017). Por otro lado, la proteína ICE1 también puede ser fosforilada por el factor de transcripción OST1, cuya fosforilación, en este caso, evita a la interacción con un “RING finger” gen1 de respuesta osmótica alta, HOS1 (por sus siglas en inglés) que añade moléculas de ubiquitina a ICE1 y lo envía al proteasoma para su degradación (Ishitani *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 2006). Por otro lado, hay otro factor que es SUMO E3 ligasa, SIZ1 (por sus siglas en inglés) que media la sumoilación de ICE1 en la Lisina 393 (Lys393) y de esta manera reduce la poliubiquitinación anterior llevada a cabo por HOS1 (Miura *et al.*, 2007).

El gen *CBF1* resultó tener una expresión alta tanto en el experimento 1 a las 4 h y a las 56 h, y en el experimento 2 después de 4 días de tratamiento de frío para los patrones tolerantes. La expresión del patrón MAC no cambió en ninguno de los experimentos. Así pues, se puede ver que el patrón de expresión de los genes CBF en cítricos tolerantes tiene lugar tanto a las horas de la inducción (respuesta rápida) y después de días (a largo término o aclimatación). Esto es debido a que los genes CBF están controlados por diferentes factores de transcripción que los mantienen activos en diferentes situaciones como se ha indicado en la introducción, como los genes CAMTA que son inductores de la respuesta más rápida motivada por la rigidificación de la membrana plasmática que implica una entrada de Ca^{+2} citosólico y activa los factores de transcripción CAMTA por un inductor aún desconocido (Polisensky and Braam, 1996; Tähtiharju *et al.*, 1997; Doherty *et al.*, 2009; Whalley *et al.*, 2011; Kidokoro *et al.*, 2017). Los genes CBF también están controlados por genes que intervienen en el mantenimiento del ciclo circadiano y por ende genes relacionados con la luz, como son algunos fitocromos (PhyB) (Franklin and Whitelam, 2007; Lee and Thomashow, 2012) o genes relacionados con la floración como es *SOC1* (Seo *et al.*, 2009).

El gen *COR413 IM1* en el patrón PON comenzó a expresarse después de 56 h de exposición a frío en el experimento 1, por lo que su expresión se entiende que tiene lugar dentro de la fase de aclimatación a baja temperatura. Sin embargo, en el experimento 2 el patrón PON comenzó a sintetizarlo sobre todo durante el período de aclimatación a temperaturas control después de 5 y 10 horas. El patrón de expresión no resultó tan claro como en los casos de *CAMTA3*, *CAMTA5* y *CBF1*, pero sí que resultó interesante. *COR413 IM1* forma parte de un grupo de genes de la familia COR (por sus siglas en inglés Cold regulated) que codifican para proteínas integrales de membrana con una función no muy clara. Se agrupan en dos grupos, las *COR413 TM/IM* (por membrana tilacoidal/ membrana interna del cloroplasto) y *COR413 PM* (por membrana plasmática) (Breton *et al.*, 2003). Una de las funciones que se ha sugerido en *A. thaliana* y *Physcomytrella*

patens es que COR413 IM1 pueda alterar la distribución de los metabolitos que intervienen en procesos fisiológicos a la acumulación de proteínas que intervienen en el metabolismo de los ácidos grasos, fructosa, almidón y sacarosa (Su *et al.*, 2018; Ruibal *et al.*, 2020). Este ajuste del metabolismo en situaciones de estrés se cree que actúa como transportador o interaccionando física o funcionalmente con otros transportadores metabólicos, regulando su actividad (Lundquist *et al.*, 2014). Así pues, el patrón de expresión génica del gen putativo *COR413 IM1* parece corresponder, en nuestro experimento, con la posible función génica que se le ha atribuido, siendo un gen que se expresa en la fase de aclimatación regulando procesos metabólicos, por lo que sería también de utilidad en nuestro protocolo de rastreo de posibles patrones tolerantes a bajas temperaturas.

Como se ha explicado en la introducción, los primeros estudios realizados en los años 90 en patrones de cítricos en busca de la tolerancia a frío se realizaron con la premisa de que la síntesis del aminoácido prolina era de vital importancia para dicha tolerancia. Por ese motivo decidimos realizar la cuantificación de la concentración y de la expresión relativa de los genes putativos más importantes de síntesis y transporte de prolina. La expresión de los genes putativos de síntesis de prolina (*P5CS1* y *dOAT*) no se correspondió con la concentración de prolina en hoja en el experimento 1. Esto no resulta raro, ya que la síntesis de los enzimas no es tan rápida como la inducción génica por lo que la subida de la concentración de prolina puede que se vea a tiempos más tardíos. En el caso de los genes que codifican para los transportadores de prolina, *PROT1* y *PROT2* no arrojaron resultados sólidos como para incluir dichos genes en nuestro programa de mejora, aunque sí que nos aportaron información sobre su función en los diferentes genotipos. El transportador *PROT2* tiene su principal función en la raíz, como se ha indicado previamente, así pues, parece que de una manera basal el transportador *PROT2* se encuentra más expresado en el genotipo PON que en CAR y MAC, además en presencia de la baja temperatura sufrió una leve inducción tanto en hojas como en raíces. Este resultado se ha visto también en diferentes especies y estreses abióticos con la aplicación de prolina en el riego, y esto hace que aumente la tolerancia al estrés (Khedr *et al.*, 2003; Kamran *et al.*, 2009; Aggarwal *et al.*, 2011; Ben Ahmed *et al.*, 2011; Kaushal *et al.*, 2011; Zhiming Yan *et al.*, 2011). Por tanto, que el transportador *PROT2* tenga una mayor expresión génica basal en PON nos hace pensar que puede que esté intentando captar prolina/betaína del medio (substrato) y nos da a entender que el aminoácido prolina probablemente esté realizando un papel importante en la tolerancia a bajas temperaturas en los cítricos que se emplean como patrones. Sin embargo, a pesar de esto, no hemos considerado los genes putativos de síntesis y transporte de prolina aptos para incluir en nuestro programa de cribado ya que no serían válidos para experimentos a tiempos cortos o menores o igual a 4 días.

5. CONCLUSIONES

1. El mejor experimento para el screening de patrones de cítricos tolerantes a bajas temperaturas fue con el método del experimento 2 de aclimatación, aplicando un estrés a 4 °C durante 5 días y con períodos de aclimatación de 0, 5, 10 y 24 horas.
2. Los genes que se seleccionaron como candidatos para realizar el screening de selección fueron los genes putativos de *CAMTA3*, *CAMTA5*, *CBF1* y *COR413IM1*.
3. A pesar de no obtener la inducción de los genes putativos de síntesis y transporte de prolina a tiempos cortos, no se descartó como posible osmolito importante en la respuesta a frío, dada la expresión basal en el patrón *P. trifoliata*, el transportador *PROT2*.

Estrés por frío a largo plazo

1. OBJETIVOS

1. Determinación de la respuesta fisiológica de los patrones *C. macrophylla* (sensible) y citrange Carrizo (tolerante) frente a estrés por bajas temperaturas a largo plazo.
2. Determinación de la activación de las rutas de síntesis y degradación de la ruta de prolina durante el período de estrés por bajas temperaturas a largo plazo.
3. Caracterización de la respuesta transcriptómica frente al estrés por bajas temperaturas a largo plazo e influencia planta-patrón.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Experimento 3

2.1.1 Material Vegetal y condiciones de crecimiento

Se obtuvieron plantas de vivero de 18 meses del patrón citrange Carrizo [*C. sinensis*(L.) Osbeck. x *P. trifoliata* (L.) Raf.] y *C. macrophylla* ambas injertadas con la variedad de naranjo 'Valencia Delta seedless'. Las plantas crecieron en macetas opacas de 4 L en substrato compuesto por perlita, fibra de coco, arena y perlita (40:25:25:10). Las plantas se regaron dos veces a la semana con la siguiente solución nutritiva (pH6) a media fuerza de solución Hoagland: 5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1.4 mM KNO_3 , 2 mM MgSO_4 , 0.6 mM H_3PO_4 , 20 μM Fe-EDDHA, 7.6 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.50 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 50 μM H_3BO_3 , 0.50 μM MoO_3 , 54 μM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Las plantas fueron aclimatadas durante 2 semanas antes de realizar los experimentos en el invernadero (26-28/16-18°C (día/noche), con un fotoperíodo de 16h/8h (luz/oscuridad y una humedad del 80%).

Se seleccionaron plantas acorde al tamaño y uniformidad y se separaron en seis grupos de seis plantas. Dos grupos de seis plantas tratadas con frío (un grupo para cada patrón) se crecieron en una Cámara de Ambiente Versátil, (MLR-350, Sanyo) con un rango de temperaturas entre 1 °C y 2 °C día y noche con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad (500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 400-700 nm). La humedad relativa se mantuvo al 80%. Tres de ellas se emplearon para el muestreo de material vegetal y las otras tres para las medidas fisiológicas a 1, 2, 4 y 6 semanas. En el caso de los controles, se emplearon dos grupos control sin tratamiento de frío (nueve plantas para cada patrón). Tres de las nueve plantas de cada genotipo se emplearon para el cálculo inicial de la biomasa y el cálculo del RGR % al principio del experimento y de las otras seis, tres de ellas se emplearon para el muestreo de material vegetal y las otras tres para las medidas fisiológicas a 1, 2, 4 y 6 semanas.

2.1.2 Cálculo de la tasa de crecimiento

Al inicio del ensayo (crecimiento inicial de la planta del grupo Control del experimento 3) y después de 6 semanas de tratamientos de las plantas del experimento 3, se eliminaron las plantas de las macetas, se limpiaron las raíces con agua destilada y se dividieron en hojas, tallos y raíces. El PF (peso en fresco) se obtuvo de pesar los órganos en fresco. Las muestras se secaron mediante liofilización (TelstarLyoAlfa6, Barcelona, Spain) durante 3 días hasta obtener un peso seco constante (PS).

2.1.3 Actividad fotosintética

La asimilación de la tasa neta de CO_2 (A_{CO_2} , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), tasa de transpiración (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentración de CO_2 subestomático (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) y la conductividad estomática (g_s , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) de una hoja fotosintéticamente activa se midió fuera de la cámara climática entre las 10 am y las 11.30 am en las plantas con el tratamiento de frío del experimento 3. En el caso de las plantas Control las medidas se realizaron bajo condiciones relativamente estables en días soleados. La radiación o luz fotosintéticamente activa (PAR) en la superficie de la hoja se ajustó a una densidad de flujo de fotones de $1,000 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Para realizar las medidas de tasa fotosintética se empleó la cámara de intercambio de gases (CIRAS-2, PP-systems, Hitchin, UK). El flujo laminar totalmente estanco se realizó con una autocubeta universal PLC 6 (U) en modelo de circuito cerrado de $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ con un vapor de agua de 1.7 Pa. La tasa de flujo de aire a través de la cubeta se fijó a 200 mL min^{-1} . Las medidas se realizaron semanalmente en dos hojas jóvenes completamente expandidas en las seis muestras de plantas o tres muestras de plantas en el experimento 3 y experimento 4 respectivamente. Los valores medios de las dos medidas se consideraron representativas de cada réplica biológica.

2.1.4 Componentes del potencial hídrico

Se realizaron medidas del potencial hídrico cada 2 semanas en dos hojas por cada réplica biológica en las plantas del experimento 3. Las hojas se mantuvieron en oscuridad durante 30 min en una bolsa de plástico opaca. A continuación, las medidas se realizaron a las 10.30 am. El potencial hídrico de la hoja (ψ_w , MPa) se midió en una cámara a presión Scholander (Soil-moisture Equipment Corp., Santa Bárbara, CA, USA), equipada con una lupa para poder observar el punto final. El potencial osmótico (ψ_π , MPa) se midió a partir de un osmómetro (Wescor, Logan, USA). Brevemente, se tomaron las muestras de hoja eliminando el pecíolo, se enrollaron sobre sí mismas y se introdujeron en un tubo de microcentrífuga de 0.5 mL con un agujero realizado en la base previamente. Se congelaron en N_2 líquido y se almacenaron a -80°C hasta el momento de realizar las medidas. El tubo de microcentrífuga de 0.5 mL con la hoja se introdujo en otro tubo de microcentrífuga de 1.25 mL a modo de recolector. La savia xilemática se obtuvo centrifugando las muestras a 14.000 rpm durante 5 min (modificado de Callister et al., 2006). El contenido en osmolitos (mmol kg^{-1}) se convirtió en MPa usando la ecuación de Van't Hoff.

$$PV = nRT$$

2.1.5 RWC% (Relative Water Component)

Se tomaron dos hojas de cada planta seleccionada del experimento 3 y se determinó su peso fresco (PF). Las hojas, por la parte del pecíolo, se introdujeron en un vaso en contacto con agua destilada durante 24 en oscuridad para que las hojas se hidratasen completamente. Las hojas se secaron con toallas de papel, y fueron repesadas para obtener el peso en turgencia (PT, 100%). Después de pesar, se secaron a 80°C durante 24 h para obtener el peso seco (PS, 0%). El contenido relativo de agua de las hojas (RWC) se determinó como $RWC\% = (PF - PS) \times (PT - PS)^{-1} \times 100$ de acuerdo con (Morgan, 1984). La media de las medidas de dos hojas se consideró como representativa de cada planta individual.

2.1.6 Medidas de fluorescencia

La fluorescencia en imagen (por sus siglas en inglés CFI) se midió al final del experimento 3 con un fluorímetro portátil (PAM-2100 Walz, Effeltrich, Germany). Las hojas se taparon previamente a las medidas durante 30 min. La fluorescencia mínima (oscuridad) F_o , se obtuvo después de excitar las hojas con un haz débil de luz emitida por diodo. El rendimiento de la fluorescencia máxima (F_m) se calculó como $F_m - F_o$. El resto de información sobre la CFI puede obtenerse de Calatayud *et al.*, 2013.

2.1.7 Cuantificación de clorofila en hoja

La concentración de clorofila en hoja ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS) se cuantificó a partir del protocolo de (Moran and Porath, 1980) en hojas del experimento 3. Se escogieron hojas jóvenes completamente expandidas de cada réplica biológica, se liofilizaron, se pulverizaron en un molino refrigerado (IKA A10, Staufen, Germany) y se almacenaron a -80 °C hasta que se realizó la cuantificación. El material liofilizado (500 mg) se incubó en 6 mL de N, N-dimetilformamida a 4°C durante 72 h y se centrifugó a 4,000 rpm a 4 °C durante 15 min (Eppendorf Centrifuge 5810R, AG, Hamburg, Germany). El sobrenadante se incubó 1 h en presencia de Na_2SO_4 y la absorbancia se midió a 664 y 647 nm en la misma muestra (Lambda 25, PerkinElmer, Shelton, CT, USA). Los cálculos realizados de clorofila a, b y clorofila total se calcularon según la fórmula de Moran, 1982.

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 12.64 \times A_{664} - 2.99 \times A_{647}$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 12.64 \times A_{664} - 0.299 \times A_{647}$$

$$\text{Clorofila total } (\mu\text{g mL}^{-1}) = Ca + Cb = 7.04 \times A_{664} - 20.27 \times A_{647}$$

2.1.8 Extracción y cuantificación de Prolina

La concentración de prolina libre en hojas se determinó acorde al protocolo descrito en (Hu, Delauney and Verma, 1992). Se tomaron las muestras del experimento 3,

se congelaron y posteriormente se liofilizaron. Posteriormente se pesaron 250 mg y se homogenizaron mediante Vórtex en 1.5 mL de ácido sulfosalicílico (3%) durante 1 min. Posteriormente se centrifugaron a 14.000 rpm por 5 min (Eppendorf Centrifuge 5810R, AG, Hamburg, Germany) y el sobrenadante se almacenó a 4 °C. Una alícuota (0.2 mL) se incubó con 0.5 mL de ácido sulfosalicílico (3%), 0.7 mL del reactivo ninhidrina (ninhidrina, ácido fosfórico 6 M, ácido acético 60%) y 0.6 mL de ácido acético glacial (99%) en un baño seco a 100 °C durante 1 h (Thermostatic Bath BD, Bunsen SA, Humanes, Spain). Las muestras se enfriaron en un baño con hielo durante 15 min y la absorbancia se midió a 520 nm (Lambda 25, PerkinElmer, Shelton, CT, USA).

2.1.9 Obtención de las secuencias de los genes putativos

Todos los genes putativos en cítricos fueron consultados en *A. thaliana*, y fueron chequeados en “The Arabidopsis Information Resource web” (TAIR) <https://www.arabidopsis.org/>. Se realizó un tBLASTn para *Citrus clementina* en la página “Database resources of the National Center for Biotechnology Information (NCBI)” <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (O’Leary *et al.*, 2016). De dicha búsqueda se obtuvieron también las siguientes tablas de oligonucleótidos específicos (Tabla 2a y 2b).

Tabla 2a. Oligonucleótidos obtenidos para la cuantificación de la expresión génica de los siguientes genes putativos llevados a cabo en el experimento 3. La anotación se muestra en formato proveniente del GeneBank y Phytozome.

| Nombre | GeneBank | Phytozome ^a | Oligos 5’ – 3’ |
|--------------|-------------|------------------------|--|
| <i>P5CS1</i> | LOC18044634 | Ciclev10030839 | FOR 5’ CCCTTGGGTGTTCTCTTGATTG 3’REV 5’ CTTGTGCAGAATTGCATTTGA 3’ |
| <i>P5CS2</i> | LOC18038188 | Ciclev10011176 | FOR 5’ ATGTGCGTGTCTATTGACCA 3’ REV 5’CCAAATCGTGCTCCATCACAGAA 3’ |
| <i>P5CR</i> | LOC18032970 | Ciclev10005607 | FOR 5’ TCTGCTGTAGGTGAGGCTGC 3’ REV 5’ CAAACAATTTCTCATCCGCTCGC 3’ |
| <i>PDH1</i> | LOC18039477 | Ciclev10011584 | FOR 5’ ATCTGCCAAGTCTCTGCCTC 3’ REV 5’ GCTTCCACGGGAGATTAATGA 3’ |
| <i>P5CDH</i> | LOC18045924 | Ciclev10019562 | FOR 5’ ATCACCTTGGACAGCAGAGC 3’ REV 5’ CCATATAGAGCGCACCCATCA 3’ |
| <i>dOAT</i> | LOC18051867 | Ciclev10015647 | FOR 5’ GAACCAATTC AAGGAGAGGCTG 3’ REV 5’ CGAACTTCTCCCAATCAGAGG 3’ |
| <i>UBC4</i> | ATUBC4 | Ciclev10009771 | FOR 5’ TGGACGCTTCAGTCTGTTTG 3’ REV 5’ TCGTCAATCACCCCTTCTTT 3’ |
| <i>ACTIN</i> | β-ACTIN | Ciclev10025866 | FOR 5’ CAGTGTGGATTGGAGGATCA 3’ REV 5’ TCGCCCTTTGAGATCCACAT 3’ |

^aLa anotación se muestra en formato proveniente del GeneBank y Phytozome, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> and <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>.

2.1.10 Aislamiento de RNA y cuantificación génica por RT-qPCR

Las muestras de hoja en el experimento 4 se recogieron, se introdujeron en N₂ líquido y se almacenaron a -80 °C. El RNA se extrajo a partir de 100 mg de tejido con el Kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) con el tampón RLT- β-mercaptoethanol (SigmaAldrich). La contaminación de DNA genómico se eliminó con el Kit RNase-Free DNase Set (Qiagen, CA, USA) a partir de digestión en columna, acorde a las instrucciones del fabricante. El RNA purificado (1 µg) se empleó para realizar la reacción de transcripción reversa con la enzima (SuperScript® III Reverse Transcriptase (RT) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) en un volumen total de 20 µl. El cDNA copia se diluyó 50 veces y se emplearon 2 µl como molde para la reacción de RT-qPCR en un volumen final de 20 µl. La reacción de RT-qPCR cuantitativa se realizó en un termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) empleando la polimerasa Ex Taq (TliRNase H plus) (Takara Europe, S.A.S, Saint Germain en Laye, FR) con el intercalante TB Greenpremix. El programa de PCR consistió en 10 min a 95 °C seguido de 40 ciclos de 15 seg a 95 °C, y 1 min a 60 °C. La especificidad de la reacción la otorgó la presencia de un solo pico en la curva de disociación y a través de estimaciones en el tamaño del producto amplificado que se comprobó a partir de una electroforesis de agarosa. Los transcritos de los genes *CiclevActin* y *CiclevUBC4*, amplificados con oligonucleótidos específicos (Tablas 2 y 3), se usaron como genes de referencia (Agüero *et al.*, 2014; Estornell *et al.*, 2016) y los cálculos de ANOVA simple y regresión lineal de los valores de CT para examinar la variación de nuestros genes de referencia se tomaron de Brunner *et al.*, 2004. El factor de normalización de los genes de referencia se calculó por el valor de la media geométrica de ambos genes (Brunner, Yakovlev and Strauss, 2004). La expresión relativa se midió por el procedimiento de curva estándar con cinco puntos de dilución (Pfaffl, 2001). Los resultados se realizaron con la media de las tres muestras biológicas independientes con tres réplicas técnicas de cada una de ellas.

2.1.11 Análisis estadísticos

Los datos del experimento 3 de RT-PCR, concentración de prolina, concentración de clorofilas y resultados fisiológicos resultaron de la media y desviación standard de tres muestras biológicas y tres réplicas técnicas por planta.

Los datos fueron analizados con un análisis de la varianza (ANOVA) usando el Statgraphics Centurion versión 16.1 (Statcal Graphics, Englewood Cliffs, NJ, USA). Se utilizó el estadístico ANOVA con el método LSD (diferencias mínimas de significancia) al $P < 0.05$.

2.2 Experimento 4

2.2.1 Material Vegetal y condiciones de crecimiento

Se obtuvieron plantas de vivero de 18 meses del patrón citrange Carrizo [*C. sinensis*(L.) Osbeck. x *P. trifoliata* (L.) Raf.] y *C. macrophylla* ambas injertadas con la variedad de naranjo 'Valencia Delta seedless'. Se seleccionaron las plantas acorde al tamaño y uniformidad y se separaron en seis grupos de tres plantas cada grupo. Un grupo de tres plantas tratadas con frío para cada tiempo 0 (Control), 15 y 30 (un grupo para cada patrón) y se crecieron en una Cámara de Ambiente Versátil, (MLR-350, Sanyo) con un rango de temperaturas entre 1 °C y 2 °C día y noche con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad (500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 400-700 nm). La humedad relativa se mantuvo al 80%. El grupo control, tiempo 0, (Control) se mantuvo en condiciones de invernadero.

2.2.2 Azúcares solubles totales y almidón

Los azúcares totales solubles y el almidón se midieron cada 15 días en hojas liofilizadas y pulverizadas (100 mg DW) del experimento 4. Los azúcares solubles y el almidón se analizaron a partir del método colorimétrico de (McCready *et al.*, 1950). Brevemente, las muestras se mezclaron con etanol caliente y se centrifugaron. El sobrenadante líquido contiene la parte de los azúcares y su pellet contiene el almidón. Para la determinación de los azúcares y el almidón, se añadió a las muestras una solución de ácido-antrona y las muestras se colocaron en un baño con agua. Los resultados de la reacción se leyeron en un espectrofotómetro (Lambda 25, PerkinElmer, Shelton CT, USA) a 630 nm de longitud de onda.

2.2.3 Extracción y cuantificación de Prolina

La concentración de prolina libre en hojas se determinó acorde al protocolo descrito en (Hu, Delauney and Verma, 1992). Se tomaron las muestras del experimento 4, se congelaron y posteriormente se liofilizaron. Posteriormente se pesaron 250 mg y se homogenizaron mediante Vórtex en 1.5 mL de ácido sulfosalicílico (3%) durante 1 min. Posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm por 5 min (Eppendorf Centrifuge 5810R, AG, Hamburg, Germany) y el sobrenadante se almacenó a 4 °C. Una alícuota (0.2 mL) se incubó con 0.5 mL de ácido sulfosalicílico (3%), 0.7 mL del reactivo ninhidrina (ninhidrina, ácido fosfórico 6 M, ácido acético 60%) y 0.6 mL de ácido acético glacial (99%) en un baño seco a 100 °C durante 1 h (Thermostatic Bath BD, Bunsen SA, Humanes, Spain). Las muestras se enfriaron en un baño con hielo durante 15 min y la absorbancia se midió a 520 nm (Lambda 25, PerkinElmer, Shelton, CT, USA).

2.2.4 Metabolitos secundarios

Los metabolitos se cuantificaron a partir de 100 mg de hojas frescas pulverizadas con N₂. Se realizó una extracción diluyendo las muestras en 1.4 mL de metanol al 100% suplementado con 60 µL de estándar interno (0.2 mg ribitol en 1 mL de agua) y se mantuvieron en un baño durante 15 min a 70 °C (Roessner *et al.*, 2000). El extracto se centrifugó durante 10 min a 14,000 rpms. El sobrenadante se transfirió a un vial de cristal junto 750 µL de ChCl₃ y 1.5 mL de agua. Se llevó al vórtex la mezcla durante 15 seg y se centrifugó durante 15 min a 14,000 rpm. Se tomó una alícuota de 150 µL de metanol/agua de la fase del sobrenadante y se llevó al rotavapor durante 6-16 h.

Para la derivatización, los residuos secos se disolvieron en 40 µL de hidrocloruro de metoxiamina (20 mg/mL) en pirimidina y se incubó durante 90 min a 37 °C, seguido de la adición de 70 µL de MSTFA (de sus siglas en inglés N-metil-N-[trimetilsilil]trifluorocetamida) y 6 µL de la mezcla de tiempo de retención estándar (3.7% [p/p]).

2.2.5 Cuantificación de hormonas

El Ácido Jasmónico (JAs) y el Ácido Abscísico (ABA) se cuantificaron a partir del protocolo de Seo *et al.*, 2011 a partir de hojas liofilizadas y pulverizadas. La extracción y purificación se realizó en 100 mg de tejido liofilizado y se añadieron 10 volúmenes de MeOH al 80% y ácido acético al 1% como solvente de la extracción. Se añadieron los estándares internos y se extrajo a 4 °C una vez por 1 hora y a continuación otra vez por 10 min con el solvente de extracción. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se recogió el sobrenadante, se evaporó el MeOH, se recogieron los extractos en ácido acético diluido en agua y se aplicaron en un cartucho de columna Oasis HLB (fase reversa). Para la cuantificación del ABA y Jasmónico, se eluyó el residuo seco en acetonitrilo-1 al 5% y ácido acético al 1% y las hormonas se separaron mediante un automuestreador y un cromatógrafo en fase reversa UHPLC (columna de 2.6 µm Accucore RP-MS, de 50 mm altura x 2.1 mm de diámetro; ThermoFisher Scientific) con un gradiente de acetonitrilo del 5 al 50% con 0.05% de ácido acético a 400 µL/min durante 14 min.

Las hormonas se analizaron con un espectrómetro de masas Q-Extractive (detector Orbitrap; ThermoFisher Scientific) por un monitoreo de iones selectivo (SIM por sus siglas en inglés). Las concentraciones de hormonas en los extractos se determinaron mediante la interpolación de curvas de calibrado con los programas Xcalibur 4.0 y TraceFinder 4.1 SP1. El estándar interno para la cuantificación de las hormonas ABA y JAs fue la hormona marcada con deuterio (²H-ABA) y dhJA respectivamente.

2.2.6 Aislamiento de RNA

Las muestras de hoja en el experimento 4 se recogieron, se introdujeron en N₂ líquido y se almacenaron a -80 °C. El RNA se extrajo a partir de 100 mg de tejido con el Kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) con el tampón RLT- β-mercaptoethanol (SigmaAldrich). La contaminación de DNA genómico se eliminó con el Kit RNase-Free DNase Set (Qiagen, CA, USA) a partir de digestión en columna, acorde a las instrucciones del fabricante. El RNA purificado se empleó directamente para su secuenciación y para las RT-PCR. El RNA purificado (1 µg) fue empleado para realizar la reacción de transcripción reversa con la enzima (SuperScript® III Reverse Transcriptase (RT) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) en un volumen total de 20 µl. El cDNA copia se diluyó 50 veces y se emplearon 2 µl como molde para la reacción de RT-PCR en un volumen final de 20 µl. La reacción de RT-PCR cuantitativa se realizó en un termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) empleando la polimerasa Ex Taq (TliRNase H plus) (Takara Europe, S.A.S, Saint Germain en Laye, FR) con el intercalante TB Greenpremix. El programa de PCR consistió en 10 min a 95 ° seguido de 40 ciclos de 15 seg a 95 °C, y 1 min a 60 °C. La especificidad de la reacción la otorgó la presencia de un solo pico en la curva de disociación y a través de estimaciones en el tamaño del producto amplificado que se comprobó a partir de una electroforesis de agarosa. Los transcritos de los genes CiclevActin y CiclevUBC4, amplificados con oligonucleótidos específicos (Tabla 3), se usaron como genes de referencia (Agüero *et al.*, 2014; Estornell *et al.*, 2016) y los cálculos de ANOVA simple y regresión lineal de los valores de CT para examinar la variación de nuestros genes de referencia se tomaron de Brunner *et al.*, 2004. El factor de normalización de los genes de referencia se calculó por el valor de la media geométrica de ambos genes (Brunner, Yakovlev and Strauss, 2004). La expresión relativa se midió por el procedimiento de curva estándar con cinco puntos de dilución (Pfaffl, 2001). Los resultados se realizaron con la media de las tres muestras biológicas independientes con tres réplicas técnicas de cada una de ellas.

Tabla 3. Oligonucleótidos obtenidos para la cuantificación de la expresión génica de los siguientes genes putativos llevados a cabo en el experimento 4. La anotación se muestra en formato proveniente del GeneBank y Phytozome.

| Nombre | GeneBank | Phytozome ^a | Oligos 5' - 3' |
|----------------|-------------|------------------------|---|
| <i>DREB1D</i> | LOC18033409 | Ciclev10007068 | FOR 5' TGGGATGCCAGATTGTTG 3' REV 5' CCTCCACAATTAGACTGAGGTGGT 3' |
| <i>DREB1B</i> | LOC18049462 | Ciclev10021923 | FOR 5' AGACCTCGTGATGATGAACCTGA 3' REV 5' GTGTTTTCTTGCATCGTTTTCTGT 3' |
| <i>WCOR413</i> | LOC18035610 | Ciclev10029293 | FOR 5' TCTTCCAAGACATTTCCAG 3' REV 5' CAGCAAATAACAAGCGATGGCA 3' |
| <i>PDH1</i> | LOC18039477 | Ciclev10011584 | FOR 5' ATCTGCCAAGTCTCTGCCTC 3' REV 5' GCTTCCACGGGAGATTAATGA 3' |
| <i>P5CS1</i> | LOC18044634 | Ciclev10030839 | FOR 5' CCCTTGGGTGTTCTCTTGATTG 3' REV 5' CTTGTGCAGAATTGCATTGA 3' |
| <i>P5CDH</i> | LOC18045924 | Ciclev10019562 | FOR 5' ATCACCTTGGACAGCAGAGC 3' REV 5' CCATATAGAGCGCACCCATCA 3' |
| <i>NCED</i> | LOC18046011 | Ciclev10019364 | FOR 5' TGATGGCTACATTCTCGCTTTTGTGA 3' REV 5' GCTTATGAACGTCCCCTGGA 3' |
| <i>PP2C</i> | LOC18043434 | Ciclev10031682 | FOR 5' CTCTCGTGCTGTGCTCTG 3' REV 5' CGGCGGCTTCGATTCTAAG 3' |
| <i>UBC4</i> | ATUBC4 | Ciclev10009771 | FOR 5' TGGACGCTTCAGTCTGTTTG 3' REV 5' TCGTCAATCACCCCTTCTTT 3' |
| <i>ACTIN</i> | β-ACTIN | Ciclev10025866 | FOR 5' CAGTGTGGATTGGAGGATCA 3' REV 5' TCGCCCTTTGAGATCCACAT 3' |

^aLa anotación se muestra en formato proveniente del GeneBank y Phytozome, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> and <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>.

2.2.7 Análisis de la secuenciación de RNA

El análisis de secuenciación del RNA en las plantas del experimento 4 se realizó en hojas extraídas con el protocolo anteriormente indicado. Para la construcción de las librerías se empleó el RNA total. Se aisló la fracción Poli(A)+ de las fracciones de mRNA del RNA total y las librerías de cDNA se obtuvieron según las recomendaciones de Illumina. Brevemente, el RNA poli(A)+ se aisló gracias a la unión con oligos poli-T unidos a esferas magnéticas y se fragmentaron químicamente antes de llevar a cabo la reacción de la transcriptasa reversa para la generación de cDNA. Los fragmentos de cDNA sufrieron un proceso de reparación, la adición de una única base 'A' en el final 3' y la unión de los adaptadores. Finalmente, los productos se purificaron por PCR para crear el cDNA copia de doble cadena.

La calidad de las librerías se analizó con un Bioanalyzer 2100, ensayo de alta sensibilidad; la cantidad de librerías se determinó por PCR a tiempo real en un termociclador LightCycler 480 (Roche).

El 'pool' de librerías se secuenció por el método de secuenciación 'paired-end' (100×2) en un secuenciador Illumina HiSeq 2500.

2.2.8 Secuenciación del RNA y análisis de expresión

Los archivos fastq provenientes de la secuenciación del RNA se pre-procesaron con Trimmomatic 0.38 (Bolger, Lohse and Usadel, 2014), y las lecturas con una media de calidad inferior a 25 o más cortas de 36 bases se filtraron y se eliminaron se indica en el protocolo de OmicsBox suit. El transcriptoma que se obtuvo se usó como la referencia para el mapeo.

Los niveles de transcritos se estimaron de los datos provenientes del servicio de secuenciación (FASTQ) empleando el paquete del software RSEM usando el enfoque de maximización de expectativas (Li and Dewey, 2011), basada en un alineamiento de lectura rápida de gaps con Bowtie 2 (Langmead and Salzberg, 2012). Las secuencias de los transcritos se obtuvieron del NCBI '*Citrus clementina* Annotation Release 100' (GCF_000493195.1).

La cuantificación de las lecturas normalizadas se realizó con los valores recortados de las medias M (por sus siglas en inglés, TMM) por el método empleado por (Robinson and Oshlack, 2010) y el análisis de expresión diferencial se llevó a cabo con el paquete 3.28.0, de EdgeR empleando GLM (Quasi Likeli Hood F-Test) con un F-valor de 0.05 (Robinson, McCarthy and Smyth, 2009).

El enriquecimiento del conjunto de genes (por sus siglas en inglés Gene Set Enrichment análisis, GSEA) para el análisis de ontologías (por sus siglas en inglés Gene Ontology) de los DEGs se llevó a cabo usando el software FatiGO que emplea la prueba de exactitud de Fisher para los análisis estadísticos para la comparación entre 2 muestras.

Los datos crudos de la secuenciación del RNA están depositadas en el 'European Nucleotide Archive', ENA (EMBL-EBI) bajo el número de proyecto PR-JEB20758 (<https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB20758>) (Tabla 4).

Tabla 4. Códigos de las secuencias almacenadas en European Nucleotide Archive (ENA).

| Proyecto | Muestra | Experimento | Lecturas | ID taxón | Genotipo |
|------------|----------------|-------------|------------|----------|--|
| PRJEB20758 | SAMEA104103360 | ERX2054017 | ERR1994148 | 105581 | <i>Citrus sinensis</i> x <i>Citrus trifoliata</i> |
| PRJEB20758 | SAMEA104055727 | ERX2023420 | ERR1960516 | 105581 | <i>Citrus sinensis</i> x <i>Citrus trifoliata</i> |
| PRJEB20758 | SAMEA104055728 | ERX2023421 | ERR1960517 | 307630 | <i>Citrus macrophylla</i> |
| PRJEB20758 | SAMEA104055729 | ERX2023422 | ERR1960518 | 307630 | <i>Citrus macrophylla</i> |
| PRJEB20758 | SAMEA104103361 | ERX2054018 | ERR1994149 | 105581 | <i>Citrus sinensis</i> x <i>Citrus trifoliata</i> |
| PRJEB20758 | SAMEA104103362 | ERX2054019 | ERR1994150 | 105581 | <i>Citrus sinensis</i> x <i>Citrus trifoliata</i> |
| PRJEB20758 | SAMEA104103363 | ERX2054020 | ERR1994151 | 307630 | <i>Citrus macrophylla</i> |
| PRJEB20758 | SAMEA104103364 | ERX2054021 | ERR1994152 | 307630 | <i>Citrus macrophylla</i> |
| PRJEB20758 | SAMEA104055094 | ERX2022792 | ERR1959283 | 105581 | <i>Citrus sinensis</i> x <i>Citrus trifoliata</i> |
| PRJEB20758 | SAMEA104103365 | ERX2054022 | ERR1994153 | 105581 | <i>Citrus sinensis</i> x <i>Citrus trifoliata</i> |
| PRJEB20758 | SAMEA104103366 | ERX2054023 | ERR1994154 | 307630 | <i>Citrus macrophylla</i> |
| PRJEB20758 | SAMEA104055736 | ERX2023423 | ERR1960519 | 307630 | <i>Citrus macrophylla</i> |

2.2.9 Análisis estadísticos

Para los análisis hormonales, de azúcares solubles y almidón, metabolitos primarios, prolina y RT-PCR los resultados se realizaron con la media de las tres réplicas biológicas y 3 réplicas técnicas. Los datos de RNA-seq del experimento 4 se realizaron con dos réplicas biológicas para cada genotipo y tiempo (12 muestras).

Los datos fueron analizados con un análisis de la varianza (ANOVA) usando el Statgraphics Centurion versión 16.1 (Statistical Graphics, Englewood Cliffs, NJ, USA). Se utilizó el estadístico ANOVA con el método LSD (diferencias mínimas de significancia) al $P < 0.05$.

3. RESULTADOS

3.1 Experimento 3

3.1.1 Crecimiento vegetativo durante el ensayo a largo plazo de frío

El crecimiento de las plantas se detuvo por completo (Tablas 5 a-d) en condiciones de baja temperatura. Los órganos más lignificados como los tallos y las raíces (Tablas 5a y 5b), también disminuyeron el crecimiento afectando así al valor de peso seco comparando los diferentes tiempos de baja temperatura con las plantas control, aunque tanto el crecimiento del tallo como de la raíz no tuvieron diferencias estadísticas entre tratamientos. Sin embargo, el peso seco de las hojas y el cálculo global del peso seco de la planta completa sí que tuvieron resultados significativos estadísticamente. El crecimiento de las hojas fue el más afectado por el tratamiento por baja temperatura, disminuyendo un 20% su crecimiento en las plantas de citrange Carrizo (CAR de ahora en adelante) crecidas en cualquiera de los tiempos con respecto a las plantas que crecieron en el invernadero y un 14% en plantas de *C. macrophylla* (MAC de ahora en adelante) igualmente en cualquiera de los tiempos. Por lo que, para ambos patrones, el tiempo que se expusieron las plantas a la baja temperatura no influyó en el crecimiento de la planta ya que no hubo diferencias estadísticas entre los diferentes tiempos de exposición. Como es evidente, la planta no creció durante el tratamiento por baja temperatura confirmando que estaba sometida a un gran estrés que no resultó letal.

Tabla 5a. corresponde al peso seco (g) del tallo. Los pesos corresponden a los patrones citrange Carrizo (CAR) y *C. macrophylla* (MAC) injertados con 'Valencia Delta seedless' y crecidos a 1 °C de temperatura durante 0, 1, 2 y 6 semanas. Los valores mostrados representan la media \pm DS entre 3 réplicas biológicas (n=3). El efecto del tratamiento a diferentes tiempos se probó con un test LSD del ANOVA múltiple.

| Semanas frío | CAR | | MAC | |
|--------------|----------|---------|----------|----------|
| | PS tallo | ds | PS tallo | ds |
| 0 Control | 31.23 | 4.05 ab | 33.99 | 0.72 ab |
| 1 | 28.12 | 2.65 ab | 39.97 | 1.05 ab |
| 2 | 25.43 | 7.18 a | 34.52 | 1.79 ab |
| 6 | 32.51 | 6.41 b | 34.24 | 1.17 ab |
| 6 Control | 34.23 | 5.19 ab | 34.61 | 10.54 ab |

Tabla 5b. Peso seco (g) de la raíz. Los pesos corresponden a los patrones citrange Carrizo (CAR) y *C. macrophylla* (MAC) injertados con 'Valencia Delta seedless' y crecidos a 1 °C de temperatura durante 0, 1, 2 y 6 semanas. Los valores mostrados representan la media \pm DS entre 3 réplicas biológicas (n=3). El efecto del tratamiento a diferentes tiempos se probó con un test LSD del ANOVA múltiple.

| Semanas frío | CAR | | MAC | |
|--------------|---------|---------|---------|---------|
| | PS raíz | ds | PS raíz | ds |
| 0 Control | 36.19 | 1.49 a | 46.35 | 2.31 ab |
| 1 | 36.95 | 6.24 ab | 31.01 | 2.55 a |
| 2 | 40.91 | 8.60 b | 48.66 | 3.19 ab |
| 6 | 45.04 | 6.44 ab | 47.59 | 3.36 ab |
| 6 Control | 47.03 | 4.84 ab | 51.02 | 3.81 a |

Tabla 5c. Peso seco (g) de las hojas. Los pesos corresponden a los patrones citrange Carrizo (CAR) y *C. macrophylla* (MAC) injertados con 'Valencia Delta seedless' y crecidos a 1 °C de temperatura durante 0, 1, 2 y 6 semanas. Los valores mostrados representan la media \pm DS entre 3 réplicas biológicas (n=3). El efecto del tratamiento a diferentes tiempos se probó con un test LSD del ANOVA múltiple.

| Semanas frío | CAR | | MAC | |
|--------------|---------|----------|---------|----------|
| | PS hoja | ds | PS hoja | ds |
| 0 Control | 20.89 | 2.21 bcd | 17.66 | 1.60 cd |
| 1 | 24.57 | 3.26 abc | 20.48 | 2.93 bcd |
| 2 | 15.40 | 2.10 bcd | 21.23 | 1.21 bcd |
| 6 | 19.85 | 2.32 d | 17.04 | 2.55 cd |
| 6 Control | 31.29 | 2.50 a | 25.61 | 3.08 ab |

Tabla 5d. Peso seco (g) de la planta completa. Los pesos corresponden a los patrones citrange Carrizo (CAR) y *C. macrophylla* (MAC) injertados con 'Valencia Delta seedless' y crecidos a 1 °C de temperatura durante 0, 1, 2 y 6 semanas. Los valores mostrados representan la media \pm DS entre 3 réplicas biológicas (n=3). El efecto del tratamiento a diferentes tiempos se probó con un test LSD del ANOVA múltiple.

| Semanas frío | CAR | | MAC | |
|--------------|----------|---------|----------|---------|
| | PS TOTAL | ds | PS TOTAL | ds |
| 0 Control | 88.31 | 1.95 ab | 97.99 | 0.90 ab |
| 1 | 89.64 | 8.18 ab | 91.47 | 5.12 ab |
| 2 | 81.74 | 7.38 ab | 104.41 | 5.81 ab |
| 6 | 97.41 | 13.04 b | 98.87 | 0.36 ab |
| 6 Control | 112.54 | 13.35 a | 111.24 | 7.00 a |

3.1.2 Cuantificación de la fotosíntesis a largo plazo a bajas temperaturas

El estado fisiológico de la planta y con él la fotosíntesis, nos hizo intuir que el estrés que se estaba ejerciendo era muy fuerte. En la Figura 10a-d se muestran los diferentes indicadores usados para monitorear la fotosíntesis. En la Figura 10a se muestra la gran disminución en la fijación de CO_2 . Tan sólo después de una semana a baja temperatura la tasa neta fotosintética disminuyó a valores cercanos a $0 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. La Figura 10b muestra la conductividad estomática (gs), en este caso, la conductividad fue cayendo progresivamente hasta alcanzar unos valores cercanos a $0 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ después de 6 semanas de tratamiento. Dado el cierre estomático, la evapotranspiración (Figura 10c) también disminuyó progresivamente hasta que alcanzó valores de $0.4 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. En el caso de la concentración de CO_2 subestomático C_i (Figura 10c), la concentración de CO_2 aumentó hasta valores de $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$. En general, como se ha indicado anteriormente, hubo una represión muy fuerte del proceso de fotosíntesis sin mostrar diferencias significativas entre patrones a los diferentes tiempos de estrés. Este hecho también explica por qué el crecimiento se detuvo por completo.

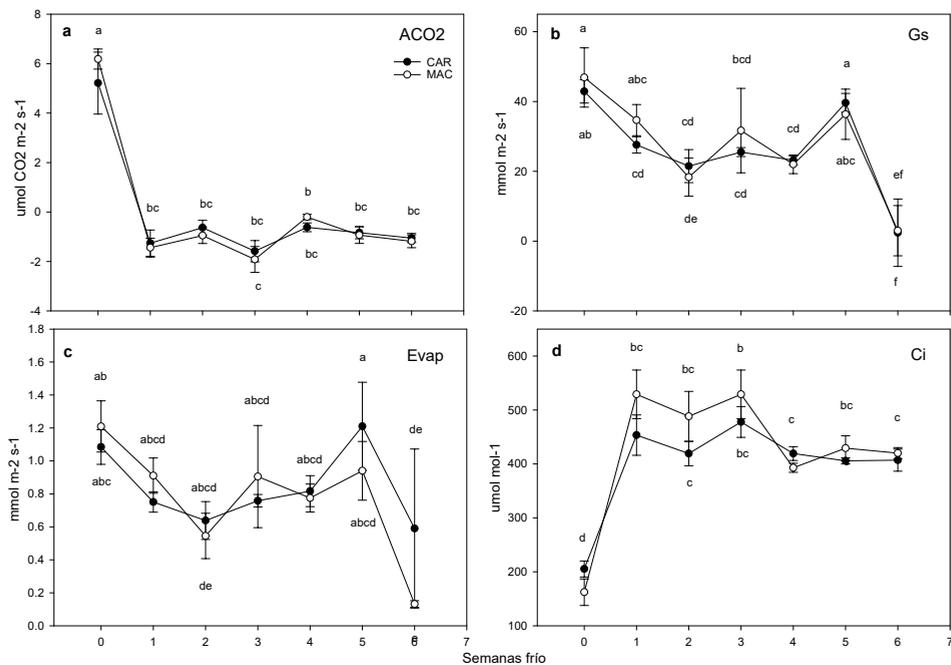


Figura 10. Medida de la actividad fotosintética. a) asimilación de la tasa neta de CO_2 (ACO_2 , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), b) conductividad estomática (gs, $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), c) tasa de transpiración (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), y d) concentración de CO_2 subestomático (C_i $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$). Las medidas corresponden a los patrones citrange Carrizo (CAR) y *C. macrophylla* (MAC) injertados con 'Valencia Delta seedless' y crecidos a 1°C de temperatura durante 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 semanas. Los valores mostrados representan la media \pm DS entre 3 réplicas biológicas ($n=3$) y 2 réplicas técnicas. El efecto del tratamiento a diferentes tiempos se probó con un test LSD del ANOVA múltiple.

3.1.3 Relaciones hídricas, potencial osmótico, potencial hídrico y RWC% a bajas temperaturas a largo plazo

Las medidas de potencial hídrico (ψ_w) resultaron contrarias a lo que realmente esperábamos a largo plazo. El potencial hídrico (Figura 11a) aumentó con el tiempo, por lo que ambos genotipos han detenido el transporte de agua apoplástico y no tendrían la necesidad de adquirirla del suelo. Esto resultó coherente con los resultados obtenidos anteriormente, donde la fijación de CO_2 , la conductividad estomática y la evapotranspiración estaban totalmente reprimidas, por lo que la planta disminuyó al máximo la necesidad de absorción de agua. Entre ambos genotipos se observó una diferencia intrínseca que hizo que ambos patrones tuvieran unos valores de potencial hídrico diferenciales estadísticamente desde el inicio del tratamiento y que mantuvieron durante el tratamiento con frío también. El potencial hídrico aumentó con el tiempo hasta llegar a la mitad de su valor en plantas control, por lo que consideramos que no hay diferencias significativas estadísticamente entre patrones.

El potencial osmótico (ψ_π) (Figura 11b) disminuyó con el tiempo en ambos patrones y pasó de valores de -1.4 MPa y -1.3 MPa en CAR y MAC respectivamente en las plantas control a -1.7 MPa y -1.8 MPa después de 6 semanas de tratamiento con frío. En ambos patrones tuvo lugar la síntesis de osmolitos aunque no se llegaron a detectar diferencias significativas entre patrones.

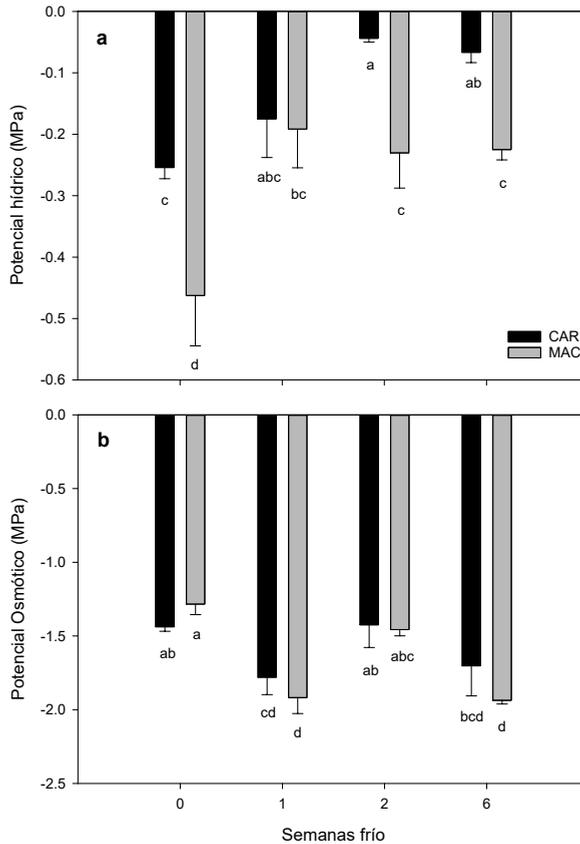


Figura 11. Medida del potencial hídrico. a) potencial hídrico (ψ_w , Mpa) y b) potencial osmótico (ψ_{π} , Mpa). Las medidas corresponden a los patrones citrange Carrizo (CAR) y *C. macrophylla* (MAC) injertados con 'Valencia Delta seedless' y crecidos a 1 °C de temperatura durante 0, 1, 2 y 6 semanas. Los valores mostrados representan la media \pm ds entre 3 réplicas biológicas (n=3) y 2 réplicas técnicas. El efecto del tratamiento a diferentes tiempos se probó con un test LSD con ANOVA múltiple.

Se cuantificó el porcentaje relativo de agua en hoja (por sus siglas en inglés RWC%) (Tabla 6). En ambos patrones el RWC% aumentó con el tiempo resultando estadísticamente significativo después de 6 semanas de tratamiento de baja temperatura y sin diferencias entre los patrones. Este resultado resultó coherente con lo previamente obtenido de la fisiología, tanto en fotosíntesis como en el potencial hídrico y es que parece que la planta no está translocando agua a larga distancia desde el suelo hacia las hojas.

Tabla 6. Medida del RWC% (% del contenido relativo de agua en hoja). Las medidas corresponden a los patrones citrange Carrizo (CAR) y *C. macrophylla* (MAC) injertados con 'Valencia Delta seedless' y crecidos a 1 °C de temperatura durante 0, 2 y 6 semanas. Los valores mostrados representan la media \pm DS entre 3 réplicas biológicas (n=3) y 2 réplicas técnicas. El efecto del tratamiento a diferentes tiempos se probó con un test LSD con ANOVA múltiple.

| Semanas frío | CAR | ds | MAC | ds |
|--------------|-------|---------|-------|---------|
| 0 | 93.62 | 0.05 b | 93.23 | 0.31 b |
| 2 | 97.61 | 0.46 ab | 97.75 | 0.26 a |
| 6 | 97.44 | 0.61 a | 97.71 | 0.30 ab |

3.1.4 Determinación de la fluorescencia de la clorofila durante bajas temperaturas a largo plazo

Se realizó un estudio de la fluorescencia de la clorofila en imagen (CFI) a partir de un fluorímetro PAM-2100 Walz (Figura 12a-d y Tabla 7). La Figura 12 muestra la representación de los valores Fv/Fm en imagen por colores y su correspondiente foto de la hoja. Se pone de manifiesto en las fotos (Figura 12a-d) que el tratamiento de frío no causó daños visibles en las hojas adultas totalmente desarrolladas. Sin embargo, en la representación que muestra el Fv/Fm por colores sí se aprecia el daño producido por la disminución de la temperatura como va transcurriendo con el tiempo. En la Tabla 7 se muestran los datos cuantitativos del Fv/Fm y donde se vio de nuevo la disminución de la eficacia máxima del fotosistema II (FSII). En este caso, el Fv/Fm del patrón MAC fue menor significativamente que el de CAR, 0.516 frente a 0.625 después de 6 semanas de tratamiento, por lo que el FSII de las plantas de MAC estaría más afectado por el proceso de fotoinhibición que las plantas CAR.

Tabla 7. Valores de Fv/Fm en unidades arbitrarias. Las medidas corresponden a los patrones citrange Carrizo (CAR) y *C. macrophylla* (MAC) injertados con 'Valencia Delta seedless' y crecidos a 1 °C de temperatura durante 0, 1, 2 y 6 semanas. Los valores mostrados representan la media \pm DS entre 3 réplicas biológicas (n=3) y 2 réplicas técnicas (dos hojas por replica biológica). El efecto del tratamiento a diferentes tiempos se probó con un test LSD con ANOVA múltiple.

| Semanas frío | CAR | ds | MAC | ds |
|--------------|-------|---------|-------|---------|
| 0 | 0.810 | 0.00 ab | 0.814 | 0.00 a |
| 1 | 0.701 | 0.03 bc | 0.668 | 0.01 c |
| 2 | 0.592 | 0.08 cd | 0.594 | 0.02 cd |
| 6 | 0.625 | 0.02 c | 0.516 | 0.05 d |

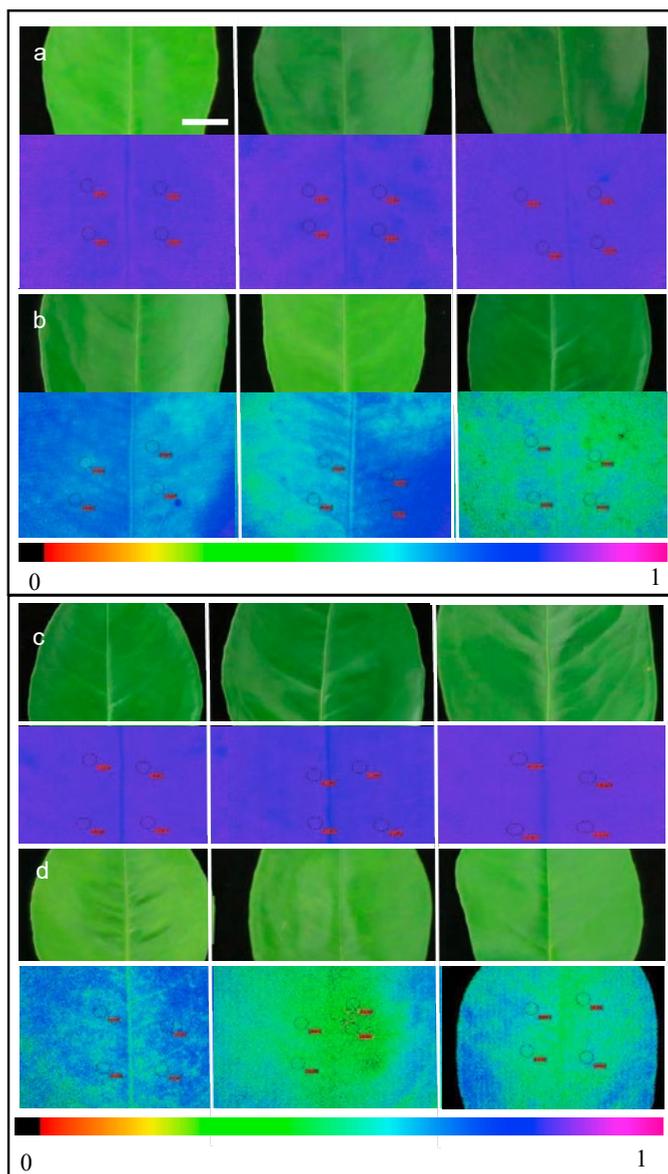


Figura 12. Fv/Fm e imagen de las hojas a) hojas de citrange Carrizo (CAR) en tratamiento control y b) hojas del patrón CAR después de 6 semanas de tratamiento, c) hojas de *C. macrophylla* (MAC) en tratamiento control y d) hojas de plantas MAC después de 6 semanas de tratamiento. La figura muestra las hojas de patrones CAR y MAC injertados con 'Valencia Delta seedless' y crecidos a 1 °C de temperatura durante 0 y 6 semanas. Los valores de Fv/Fm variaron entre 0 (color negro según escala) y 1 (color rosa). La barra blanca representa la escala de 1 cm sobre la figura.

Dado el presente resultado, decidimos realizar un análisis más exhaustivo del aparato fotosintético. Realizamos una cinética de la fluorescencia en el tiempo (Figura 13a-h) que mostró que en el patrón CAR (Figura 13a) el YII (porción de energía absorbida por la clorofila asociada al FSII en la actividad fotoquímica, es decir, electrones transportados) fue menor en tratamientos a 2 y 6 semanas de frío que en MAC (Figura 13e) donde los valores a baja temperatura eran similares que los valores control. Lo que significa que el patrón CAR está protegiendo más sus fotosistemas que el patrón MAC.

Los resultados del qP (Figuras 13b y 13f) muestran que en ambos genotipos el tratamiento a baja temperatura aumenta este valor con respecto a su control sin mostrar grandes diferencias al final de la prueba. La disipación de energía no-fotoquímica en forma de calor (NPQ) (Figura 13c y 13g) disminuyó en los dos genotipos con respecto a su control. Aunque, si comparamos entre los tiempos de exposición a la baja temperatura, las plantas de CAR a 6 semanas de tratamiento tuvieron una mayor disipación en forma de calor que las plantas MAC. Al igual que pasa con el NPQ, el qN (Figuras 13d y 13h) fue mayor en plantas CAR a 2 y 6 semanas de tratamiento al final de la cinética (5 minutos). En el caso de CAR en ambos casos (NPQ y qN) se ve que levemente estos valores son más altos como va alcanzando el final de la cinética, por lo cual se estaría protegiendo gracias a la emisión de energía en forma de calor.

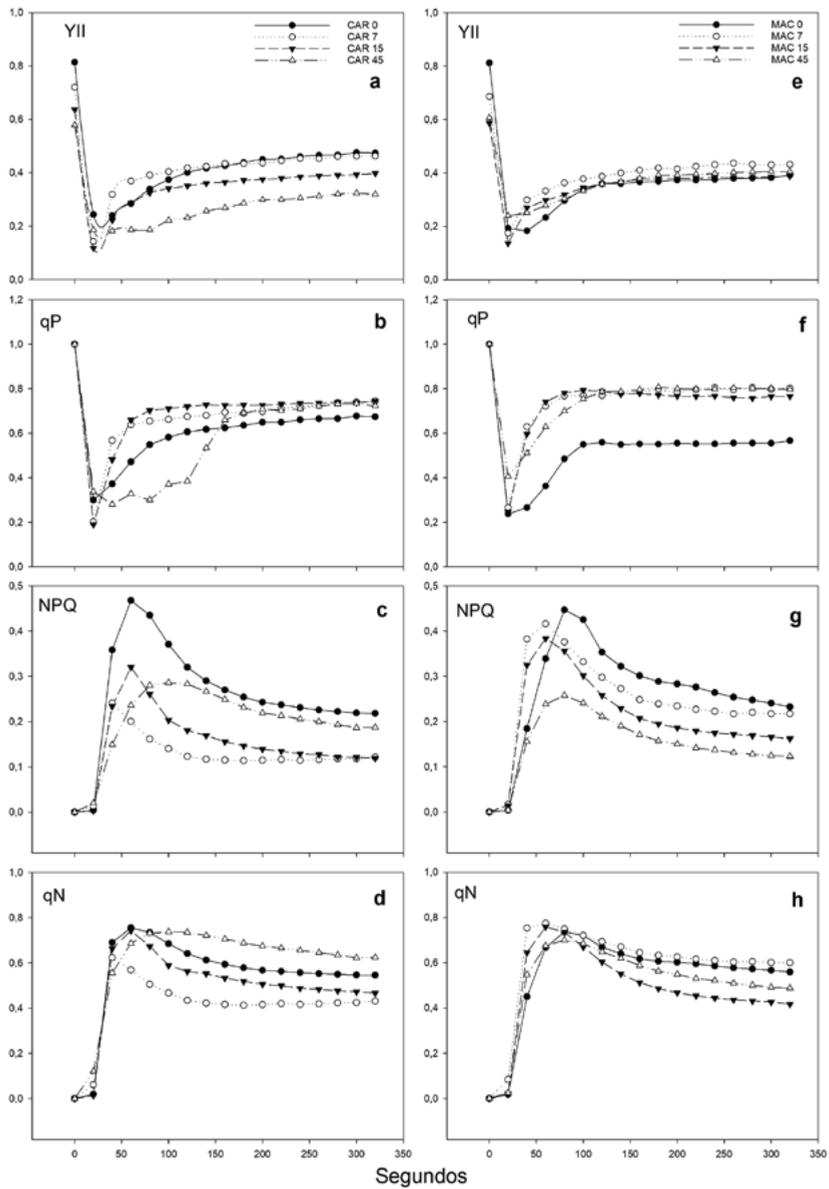


Figura 13. Efecto de la baja temperatura en los parámetros de CFI durante 350 segundos (5 minutos). a) y e) (YII) eficiencia de la quanta del PSII b) y f) (qP) disipación de energía fotoquímica, c) y g) (NPQ) disipación de energía no fotoquímica en forma de calor, d) y h) (qN) disipación de energía no fotoquímica. Las figuras de la a-d corresponden a los patrones citrange Carrizo (CAR) y las figuras de la e-h corresponden a las plantas de *C. macrophylla* (MAC), ambos injertados con 'Valencia Delta seedless' y crecidos a 1 °C de temperatura durante 0, 1, 2 y 6 semanas. Los valores mostrados representan la media entre 3 réplicas biológicas (n=3) y 2 réplicas técnicas (dos hojas). El efecto del tratamiento a diferentes tiempos se probó con un test LSD con ANOVA múltiple.

También se realizó la cuantificación de clorofilas que se incluyó dentro del apartado de fluorescencia ya que están estrechamente relacionadas. Las clorofilas (Tabla 8) tendieron a degradarse en ambos patrones. La CI a y b disminuyeron en el patrón CAR un 25% y 36% después de 6 semanas de tratamiento, sin embargo, en el patrón MAC la reducción fue tan sólo del 10% tanto de la CI a como de la CI b.

Tabla 8. Cuantificación de Clorofilas ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS). Las medidas de las CI a, CI b y CI TOTAL corresponden a los patrones citrange Carrizo (CAR) y *C. macrophylla* (MAC) injertados con 'Valencia Delta seedless' y crecidos a 1 °C de temperatura durante 0 y 6 semanas. Los valores mostrados representan la media \pm DS entre 3 réplicas biológicas (n=3) y 3 réplicas técnicas. El efecto del tratamiento a diferentes tiempos se probó con un test LSD con ANOVA múltiple.

| | Semanas | CI a | ds | CI b | ds | CI TOTAL | ds |
|-----|---------|-------|---------|--------|--------|----------|--------|
| CAR | 0 | 91.81 | 4.38 ab | 32.255 | 2.08 b | 124.07 | 6.03 a |
| | 6 | 69.32 | 4.60 b | 20.411 | 2.41 b | 89.73 | 6.29 b |
| MAC | 0 | 99.82 | 5.18 a | 37.91 | 2.36 a | 137.73 | 7.54 a |
| | 6 | 90.12 | 8.55 a | 35.19 | 4.13 b | 121.25 | 12.6 a |

3.1.5 Cuantificación de la concentración de prolina y los genes putativos de síntesis y degradación en frío a largo plazo

La concentración del aminoácido osmoprotector prolina se cuantificó en las hojas de CAR y MAC (Figura 14). La concentración de prolina fue significativamente mayor en plantas injertadas con CAR que en plantas MAC a las 2, 4 y 6 semanas de tratamiento. El aumento de la concentración de prolina máximo con el tratamiento de baja temperatura fue en el patrón CAR después de 4 semanas de frío y fue de unos 13 mg prolina por gramo de peso seco de hoja. El aumento de prolina fue de más del doble en CAR y además fue significativamente mayor con respecto a las plantas MAC a las 4 semanas de tratamiento.

Puesto que la concentración de prolina obtuvo un aumento significativo, decidimos profundizar más y realizar pruebas moleculares. Realizamos una cuantificación de la expresión de los genes que codifican para los enzimas de las rutas de síntesis y degradación de prolina. Previamente se realizó un árbol filogenético para confirmar los genes putativos escogidos para *Citrus clementina* (Figura 15). Para la enzima P5CS se obtuvieron dos posibles genes putativos, al igual que ocurre para otras especies vegetales, como son *A. thaliana*, *Medicago truncatula* y *Helianthus tuberosus*. Los resultados (Figura 15a) parecen indicar que la proteína que codifica para el gen LOC18038188 se parece a la proteína MtP5CS2 y el gen LOC18044634 se parece más a la proteína de HtP5CS1. Para confirmar que

el LOC18044634 sería el gen putativo de *P5CS1* y el LOC18038188 sería el gen putativo de *P5CS2*, aunque, para confirmar totalmente este resultado tendríamos que realizar más experimentos. En el caso de las proteínas P5CR, dOAT y P5CHD (Figura 15b-c y e) sólo se obtuvo un gen que codificó para dichas enzimas y que, además, tuvieron gran similitud con *Glycine max* en el caso de P5CR y *A. thaliana* para las enzimas dOAT y P5CDH. Para la enzima de degradación PDH (Figura 15d), sólo se obtuvo un gen que codificó para dicha proteína en *Citrus clementina* y que se asemejó en un gran porcentaje a las dos proteínas de *Helianthus tuberosus*.

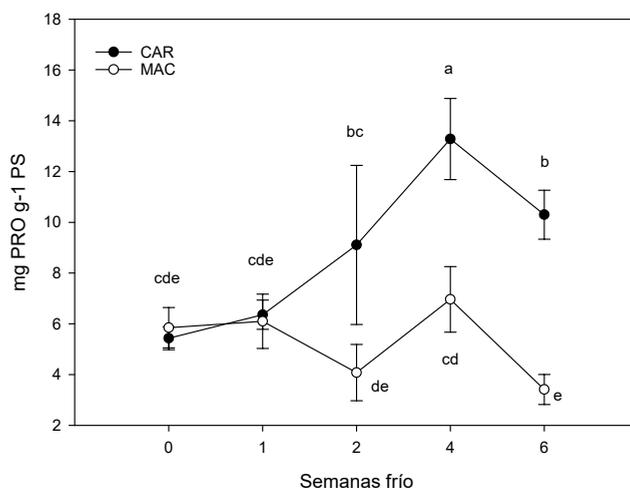


Figura 14. Efecto de la baja temperatura en la síntesis de Prolina (mg PROLINA g⁻¹ de peso seco). Se cuantificó la concentración del aminoácido prolina en hojas de la variedad 'Valencia Delta seedless' injertada sobre los patrones citrange Carrizo (CAR) y *C. macrophylla* (MAC). Se realizaron las medidas de la concentración a las 0, 1, 2, 4 y 6 semanas de tratamiento a 1 °C de temperatura. Los valores mostrados representan la media ± DS entre 3 réplicas biológicas (n=3) y 3 réplicas técnicas. El efecto del tratamiento a diferentes tiempos se probó con una prueba LSD con ANOVA múltiple.

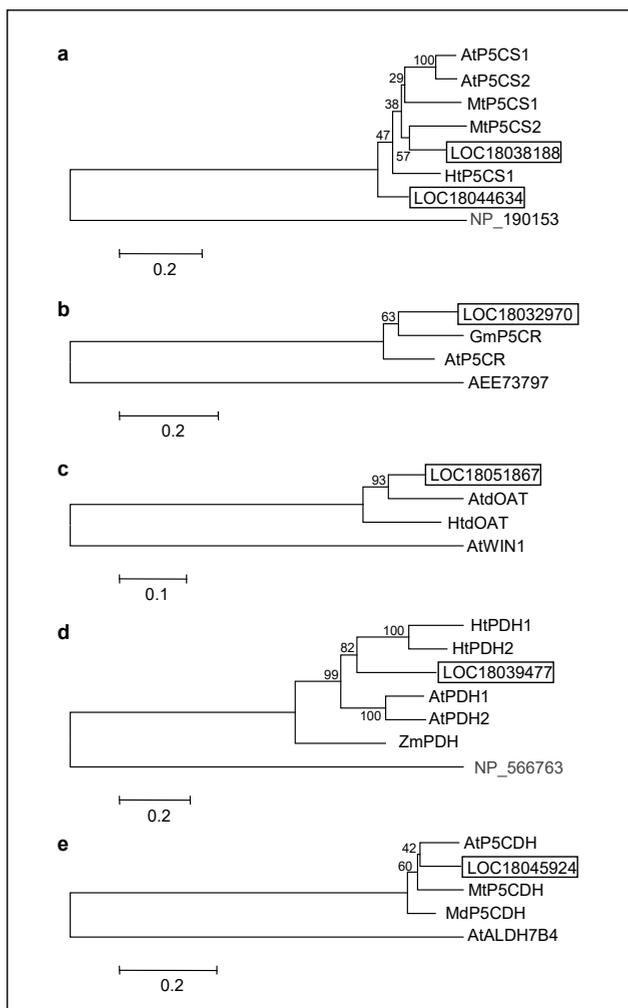


Figura 15. Árbol filogenético de los genes putativos de síntesis y degradación de prolina. Los árboles se construyeron empleando el método de Máxima Probabilidad (Maximum Likelihood) con un bootstrap de 1000 réplicas. Los números junto a los nodos representan los valores de bootstrap en porcentaje. La línea de la escala indica la longitud de la raíz que corresponde al número de sustituciones por posición de aminoácido. Los números de accesoión del GenBank fueron: a) *A. thaliana* AtP5CS1 (OAP10756), *A. thaliana* P5CS2 (OAP05097), *Medicago truncatula* MtP5CS1 (CAC82184), *Medicago truncatula* MtP5CS2 (AET87352), *Citrus clementina* CcP5CS2 (LOC18038188), *Helianthus tuberosus* HtP5CS1 (AHJ08569), *Citrus clementina* CcP5CS1 (LOC18044634), *A. thaliana* FMN-linked oxidoreductases superfamily protein (NP_190153); b) *Citrus clementina* CcP5CR (LOC18032970), *Glycine max* GmP5CR (NP_001235914), *A. thaliana* AtP5CR (OAO94594), *A. thaliana* 6-phosphogluconate dehydrogenase family protein (EE73797); c) *Citrus clementina* CcdOAT (LOC18051867), *A. thaliana* AtdOAT (AED95350), *Helianthus tuberosus* HtdOAT (AHJ08571), *A. thaliana* AtWIN1 (OAP16808); d) *Helianthus tuberosus* HtPDH1 (AHJ08572), *Helianthus tuberosus* HtPDH2 (AHJ08573), *Citrus clementina* CcPDH (LOC18039477), *A. thaliana* AtPDH1 (AEE77659), *A. thaliana* AtPDH2 (NP_198687), *Zea mays* ZmPDH (NP_001147577), *A. thaliana* uxin-responsive family protein (NP_566763); e) *A. thaliana* AtP5CDH (NP_568955), *Citrus clementina* CcP5CDH (LOC18045924), *Medicago truncatula* MtP5CDH (XP_003609016), *Malus domestica* MdP5CDH (ACL13549), *A. thaliana* AtALDH7B4 (NP_175812).

A continuación, se realizó la expresión génica de los genes putativos codificantes para las proteínas de síntesis (Figuras 16a-d) y los genes putativos de las proteínas que codifican para los genes de degradación (Figuras 16e y 16f). El gen *P5CS1* (Figura 16a) aumentó la expresión con el tiempo, lo que se correlacionó con el aumento de la concentración de prolina. A pesar de que el patrón CAR aumentó la expresión hasta 6 veces con respecto al control y el patrón MAC aumentó la expresión hasta 4 veces, la expresión del gen putativo *P5CS1* no resultó significativa, por lo que no se puede confirmar que hubiera diferencias entre CAR y MAC. La expresión del gen putativo *P5CS2* (Figura 16b) no obtuvo diferencias significativas a lo largo del experimento y tampoco arrojó diferencias entre patrones. El último gen de síntesis a partir de la ruta del glutamato, *P5CR* (Figura 16c), tampoco resultó significativa ni en el transcurso del experimento ni entre genotipos. El gen putativo de síntesis *dOAT* (Figura 16d) que sintetiza prolina a partir de la ruta de la ornitina, sí que aumentó 13.5 veces la expresión en el patrón CAR a 4 semanas de tratamiento mientras que MAC aumentó en 6.2 su expresión también después de 4 semanas de tratamiento. Los genes de degradación de prolina también se sobreexpresaron con el tratamiento a frío (Figuras 16e y 16f). El gen putativo para *P5CDH* (Figura 16e) aumentó su expresión mayoritariamente de manera significativa en el patrón CAR y aumentó la expresión significativamente más de 9 veces después de 4 semanas de tratamiento. El gen putativo para *PDH* (Figura 16f) no mostró diferencias entre patrones ni tampoco entre los tiempos.

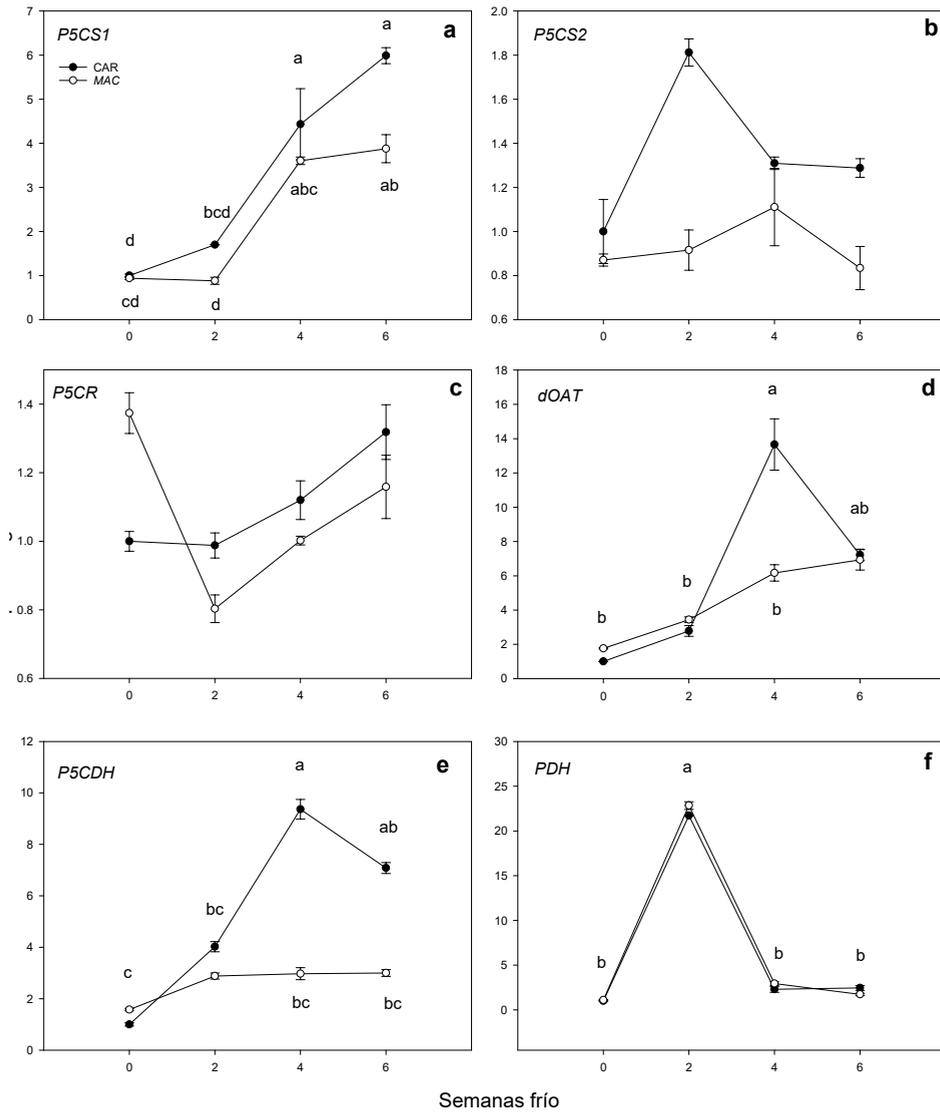


Figura 16. Cuantificación de la expresión génica relativa de los genes de la ruta de síntesis y degradación de prolina en hojas. La ruta de síntesis corresponde a los siguientes genes: a) putativo LOC18044634 (*P5CS1*), b) putativo LOC18038188 (*P5CS2*), c) gen putativo LOC18032970 (*P5CR*), d) putativo LOC18051867 (*dOAT*). Los genes de degradación: e) putativo LOC18045924 (*P5CDH*) y f) putativo LOC18039477 (*PDH*). La expresión génica corresponde a patrones CAR y MAC injertados con 'Valencia Delta seedless' y crecidos a 1 °C de temperatura durante 0, 2, 4 y 6 semanas. Los valores mostrados representan la media \pm DS entre 3 réplicas biológicas (n=3) y 3 réplicas técnicas. El efecto del tratamiento a diferentes tiempos se probó con una prueba LSD del ANOVA múltiple.

3.2 Experimento 4

3.2.1 Cuantificación de osmoprotectores: almidón, azúcares totales y prolina en respuesta a frío a largo plazo

Los azúcares solubles totales y el almidón se cuantificaron a partir de un método espectrofotométrico a 0, 7, 15 y 30 días de tratamiento a baja temperatura. En plantas injertadas con la variedad 'Valencia Delta seedless' sobre los patrones CAR, los azúcares solubles (Figura 17a) aumentaron el doble que en el patrón MAC después de 30 días a 1 °C respecto el control. Por el contrario, las plantas MAC mostraron un ligero incremento de los azúcares durante el tratamiento de frío, pero después de 30 días no se encontraron diferencia respecto a las medidas a tiempo 0.

El contenido de almidón mostró un incremento inicial en CAR a los 15 días, y fue siempre mayor en las plantas tratadas a baja temperatura que los controles (Figura 17b). Por otro lado, el contenido de almidón disminuyó ligeramente en el patrón MAC a 15 y 30 días de tratamiento de frío (Figura 17b).

Se cuantificó también la concentración de prolina libre a partir de un método espectrofotométrico a los 0, 1, 2, 4, 7, 15 y 30 días de la exposición para confirmar los resultados de experimentos anteriores. Como era de esperar, la concentración de prolina en hoja aumentó con las condiciones de frío, siendo en general mayor en CAR que en MAC, aunque fue significativamente mayor al final del experimento, con más del doble de incremento (Figura 17c).

Además, se realizó un perfil metabólico de algunos metabolitos primarios (Tabla 9). La cuantificación se realizó a tiempo inicial de 0 días y a 30 días de tratamiento de frío. Se observaron cambios en los azúcares reductores (ramniosa, trehalosa y glucosa) en ambos patrones a los 30 días, sin embargo, el incremento en CAR fue mayor que en MAC. Es reseñable el gran incremento en fructosa y trealosa, pero sobre todo en rafinosa donde en CAR aumentó de manera significativa 330 veces y en MAC 300 veces.

Para los aminoácidos proteicos como son la fenilalanina y la prolina y no proteicos como el GABA, después de los 30 días no hubo diferencias cuando se comparan ambos patrones (Tabla 9). Sin embargo, algunas diferencias se obtuvieron para el aminoácido prolina donde la concentración dos veces mayor en CAR que en MAC, confirmando el resultado previo obtenido por el método espectrofotométrico.

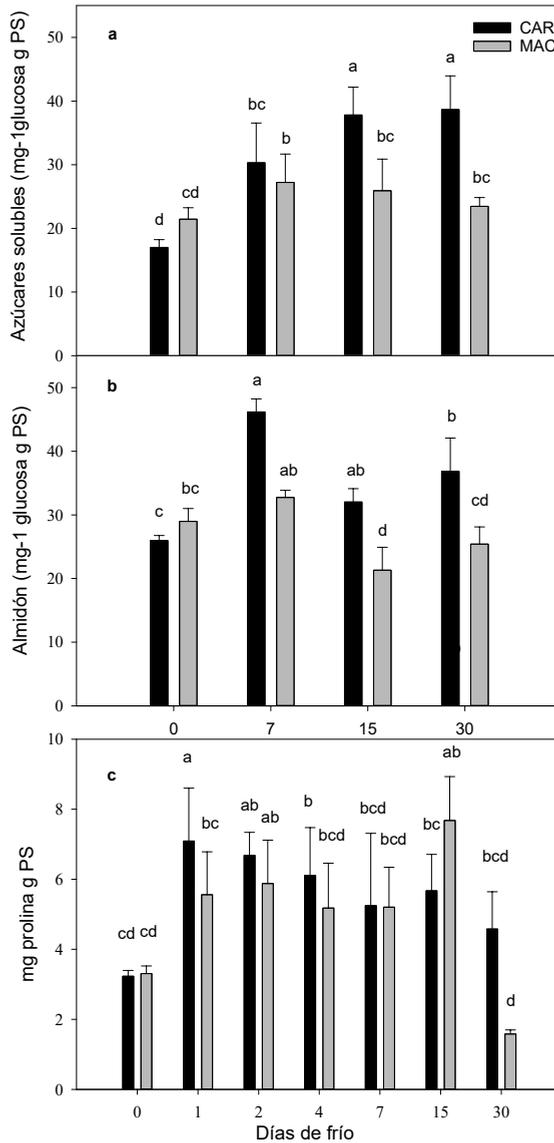


Figura 17. Cuantificación de osmolitos en hojas de la variedad 'Valencia Delta seedless' sobre citrange Carrizo (CAR) y *C. macrophylla* (MAC). Las plantas injertadas se sometieron a 1 °C durante 0, 15 y 30 días. a) Los azúcares solubles con muestreos a los 0, 7, 15 y 30 días. b) Concentración de almidón a los 0, 7, 15 y 30 días y c) Concentración de prolina a los 0, 1, 2, 4, 7, 15 y 30 días. Los valores son la media \pm DS de tres réplicas (n=3) y tres réplicas técnicas por casa muestra biológica. El efecto del tratamiento fue probado con ANOVA multivariante, las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) acorde con la prueba LSD.

Tabla 9. Cuantificación relativa de metabolitos primarios en hojas de citrange Carrizo (CAR) y *C. macrophylla* (MAC) injertadas sobre 'Valencia Delta seedless' a los 0 y 30 días de tratamiento. Los valores son la media \pm DS de tres réplicas biológicas (n=3) y tres réplicas técnicas por cada muestra biológica. El tratamiento fue testado con ANOVA multivariante, las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) acorde con el test LSD.

| | CAR | MAC | CAR | MAC | CAR | MAC |
|---------|------------------------|---------------------|------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
| | <i>Glucosa</i> | | <i>Fructosa</i> | | <i>Sacarosa</i> | |
| Control | 1 \pm 0.14 b | 1.11 \pm 0.05ab | 1 \pm 0.53 b | 1.07 \pm 0.32 b | 1 \pm 0.29 b | 0.60 \pm 0.11 b |
| Frío | 1.14 \pm 0.03 ab | 1.36 \pm 0.16a | 11.53 \pm 2.61 a | 8.86 \pm 1.54 a | 2.17 \pm 0.29 a | 1.92 \pm 0.09 a |
| | <i>Rafinosa</i> | | <i>Ramniosa</i> | | <i>Trehalosa</i> | |
| Control | 1 \pm 0.14 c | 0.62 \pm 0.08c | 1 \pm 0.03 bc | 0.87 \pm 0.03 c | 1 \pm 0.47bc | 0.69 \pm 0.05c |
| Frío | 336.6 \pm 16.77 a | 299.55 \pm 10.27b | 1.22 \pm 0.07 a | 1.13 \pm 0.01ab | 3.02 \pm 0.51 a | 2.33 \pm 0.56 ab |
| | <i>GABA</i> | | <i>Ácido succínico</i> | | <i>Ácido Fumárico</i> | |
| Control | 1 \pm 0.06 c | 1.17 \pm 0.17c | 1 \pm 0.12 ab | 0.75 \pm 0.03 b | 1 \pm 0.02 b | 1.14 \pm 0.04 b |
| Frío | 3.53 \pm 0.66 b | 6.09 \pm 0.39 a | 1.95 \pm 0.47 ab | 2.08 \pm 0.58 a | 1.18 \pm 0.08 b | 1.60 \pm 0.18 a |
| | <i>Ácido palmítico</i> | | <i>Ácido esteárico</i> | | <i>Glicerol</i> | |
| Control | 1 \pm 0.04 b | 1.30 \pm 0.07a | 1 \pm 0.051 b | 1.29 \pm 0.07 a | 1 \pm 0.09 | 1.21 \pm 0.06 a |
| Frío | 0.35 \pm 0.06 d | 0.65 \pm 0.04 c | 0.37 \pm 0.06 d | 0.67 \pm 0.04 c | 0.52 \pm 0.05 b | 0.68 \pm 0.05 b |
| | <i>Fenilalanina</i> | | <i>Prolina</i> | | | |
| Control | 1 \pm 0.50 ab | 1.52 \pm 0.49 a | 1 \pm 0.44 b | 0.92 \pm 0.09 b | | |
| Frío | 0.18 \pm 0.07 c | 0.56 \pm 0.38 ab | 3.11 \pm 1.74 a | 2.22 \pm 1.74 ab | | |

3.2.2 La hormona ABA se acumula significativamente en las raíces del patrón Carrizo

Se realizaron medidas de ABA y ácido jasmónico en hojas y raíces a 0, 15 y 30 días obteniendo resultados significativos entre órganos y patrones (Figura 18).

En las hojas, la concentración de ABA disminuyó en MAC de 90 ng g⁻¹ PS a los 0 días a 20 ng g⁻¹ PS a los 15 y 30 días, mientras que permaneció constante en CAR durante todo el experimento con una concentración alrededor de 60 ng g⁻¹ PS (Figura 18a). La concentración de ABA en raíces permaneció constante a unos niveles bajos 10 ng g⁻¹ PS en MAC, pero en CAR tuvo un aumento de 3 veces a los 30 días. La concentración de ABA en las raíces de CAR a los 30 días fue sorprendentemente alta (40 ng g⁻¹ PS), cuando se comparó en MAC (5 ng g⁻¹ PS), por lo que la concentración en CAR fue 8 veces superior que en MAC (Figura 18c).

La variación en la concentración de ácido jasmónico durante el tratamiento de frío se muestra en las Figuras 18b-d. La concentración de ácido jasmónico fue significativamente mayor en hojas de MAC, mientras que ambos patrones mostraron niveles similares en las raíces. Después de 15 días de tratamiento a 1 °C se produjo la disminución de la concentración de jasmónico en hojas y raíces de CAR y MAC. Después de 30 días de frío, la concentración de ácido jasmónico continúa disminuyendo en CAR, mientras que en MAC se aprecia que aumenta en ambos órganos, aunque sólo de manera significativa en las raíces.

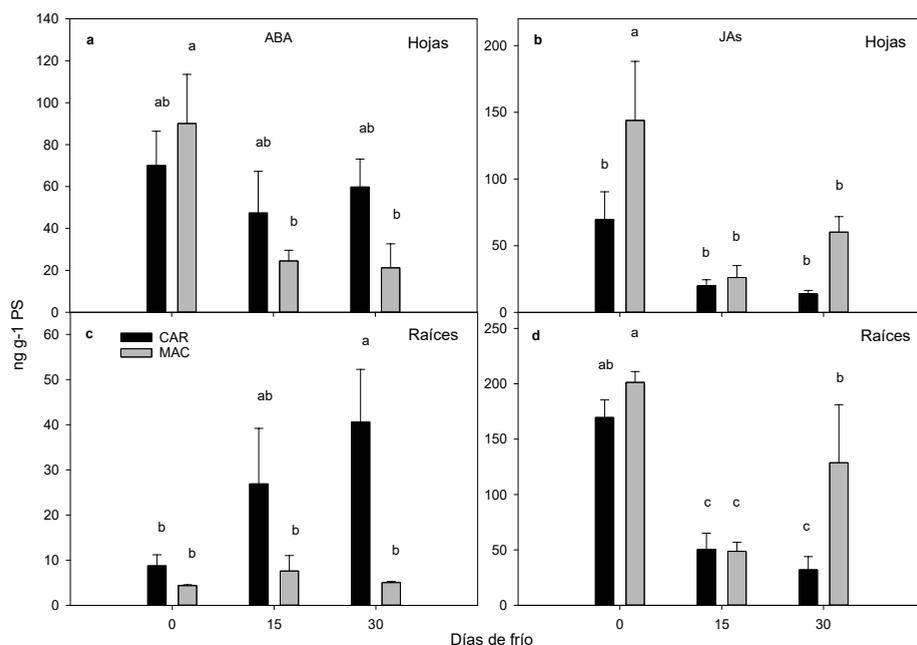


Figura 18. Cuantificación de ABA y Ácido Jasmónico en hojas y raíces de plantas de citrange Carrizo (CAR) y *C. macrophylla* (MAC) injertadas de 'Valencia Delta seedless' y crecidas a 1 °C y condiciones control durante 0, 15 y 30 días. a) y c) representa la cuantificación en hojas y raíces respectivamente y b) y d) la cuantificación de ácido jasmónico en hojas y raíces. Los valores son la media \pm DS de tres réplicas biológicas (n=3) y tres réplicas técnicas por muestra biológica. El tratamiento fue testado con ANOVA multivariante, las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) acorde con la prueba LSD.

3.2.3 Las plantas de *C. macrophylla* presentaron más daños bajo estrés por frío

Se analizaron también las plantas de CAR y MAC en busca de efectos fenotípicos causados por la disminución por baja temperatura a 1 °C durante 30 días.

Sin embargo, la parte aérea de 'Valencia Delta seedless' presentó daños en ambos patrones, las diferencias pueden observarse en los brotes más jóvenes, pero fueron más severos en las plantas injertadas con el patrón MAC donde los brotes jóvenes comenzaron a marchitarse (Figura 19a), mientras en CAR permaneció sin apenas daños (Figura 19b).

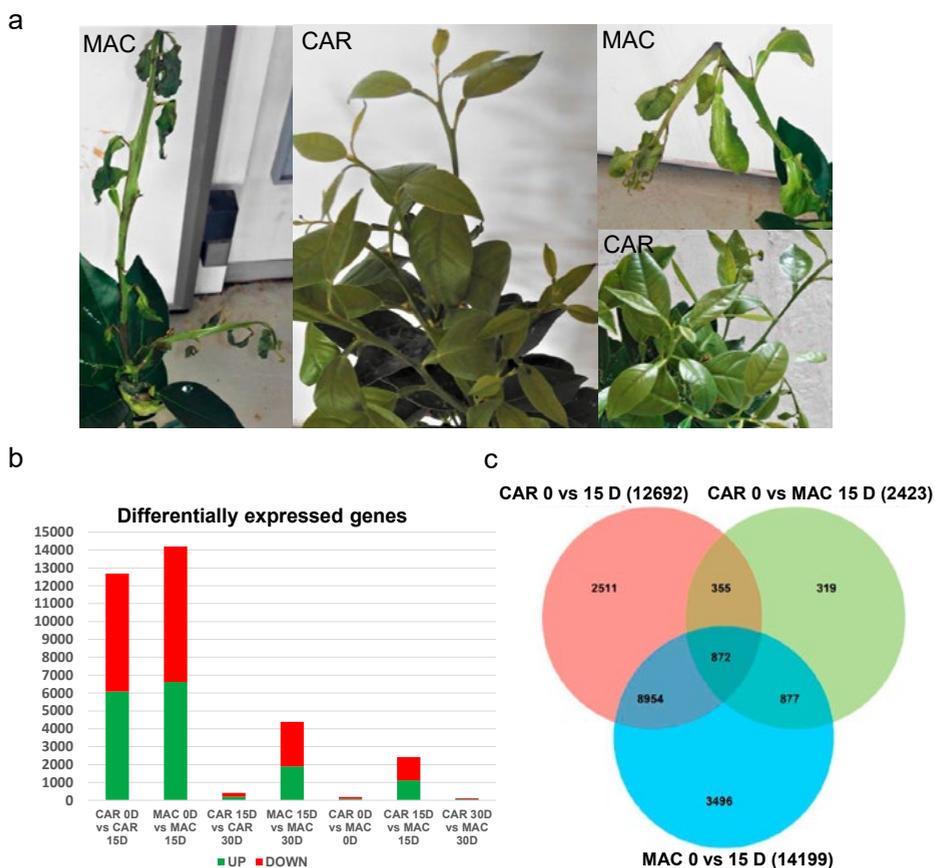


Figura 19. Daño fenotípico en plantas injertadas de la variedad 'Valencia Delta seedless' sobre citrange Carrizo (CAR) y *C. macrophylla* (MAC) y resumen del RNA-seq. a) muestra el patrón MAC injertado al final del experimento, a los 30 días de frío a 1 °C; b) muestra el patrón CAR injertado después de 30 días a 1 °C de tratamiento; c) comparación entre los análisis interespecie e intraespecie. El número de genes sobreexpresados fue representado por las barras de color verde y el número de genes que se reprimieron se representaron en color rojo; d) diagrama de Venn que representa los DEGs que son comunes en el estudio interespecie e intraespecie a los 15 días de tratamiento de frío.

3.2.4 Estudio transcriptómico y análisis de expresión diferencial

3.2.4.1 Visión general del RNA-Seq

El RNA-seq se llevó a cabo según se describe en la sección de procedimientos experimentales. 12 librerías “pair-end” se construyeron y secuenciaron con lecturas de 200 pares de bases. Después del control de calidad 152,2 millones de pares de lecturas se obtuvieron, con una media de 12,7 lecturas por muestra, contabilizando 30,6 Gb de secuencias listas para el análisis.

Como se ha detallado en la sección de material y métodos, las lecturas se mapearon frente a 36.454 transcritos del genoma de *C. clementina*. En general, más de 120 millones de lecturas (79%) mapearon frente los transcritos de referencia, con 77,8 millones de lecturas alineadas una vez y 42,2 millones de lecturas alineadas varias veces, mientras que 32,2 millones de lecturas no mapearon. La media del número de lecturas por muestra fue de 100 millones. La media del número de lecturas que mapearon por gen fue de 274,3 millones de lecturas.

3.2.4.2 La expresión diferencial entre Carrizo y *Macrophylla* es mayor a los 15 días de frío

Los genes expresados diferencialmente (de ahora en adelante DEGs, por sus siglas en inglés) entre Carrizo y *C. macrophylla* se examinaron utilizando el paquete EdgeR (Robinson and Oshlack, 2010), y los resultados fueron filtrados por el P-valor de FDR a <0.05 y un valor de fold change log 1.

Los análisis de expresión génica intraespecie se realizaron comparando muestras del mismo patrón después de 0, 15 y 30 días de tratamiento de frío, así pues, se compararon las muestras de CAR a los 15 y 30 días y las muestras de MAC a los 15 y 30 días respecto a sus respectivos controles a los 0 días de frío. El tratamiento de frío a los 15 días frente al tiempo 0 fue el que arrojó un mayor rendimiento en la obtención de DEGs en ambos patrones, 12.691 para CAR y 14.199 para MAC, comparado con los 409 y 4.391 obtenidos respectivamente cuando se comparó el día 30 con respecto al día 15. El número de transcritos sobreexpresados y reprimidos fue similar en todas las muestras (Figura 19c). Los resultados del RNA-seq se validaron por RT-PCR (Figura 20).

Con el fin de identificar los transcritos que intervienen en la tolerancia a CAR frente a la baja temperatura, se realizó una comparación interespecie entre patrones con las muestras recogidas los mismos días de tratamiento de frío, así pues, los transcritos de CAR a 0, 15 y 30 días se compararon con los respectivos de MAC a 0, 15 y 30 días. El número de DEGs fue mucho menor que en la estrategia anterior intraespecies, el mayor número de DEGs, 2.423, se obtuvo de la comparación de las muestras a 15 días de frío, mientras que los análisis de 0 y 30

días sólo mostraron 186 y 119 DEGs, respectivamente. El número de transcritos sobreexpresados y reprimidos fue similar en todas las muestras (Figura 19c).

Como el mayor número de DEGs se obtuvo del tratamiento a frío a los 15 días, centramos nuestros análisis en dicho tiempo, cuando la respuesta a baja temperatura a largo plazo parecía estar en el pico. La identificación de los DEGs obtenida con ambas aproximaciones a los 15 días se comparó (Figura 19d), y puede observarse un gran solapamiento. Así pues, 9.826 DEGs se encontraron en los análisis intraespecies entre MAC 0 y CAR 0 frente a MAC 15 y CAR 15, donde se contabilizaron un 77% y un 70% de todos los DEGs obtenidos. Igualmente, 2.104 DEGs de la comparación interespecies de MAC 15 frente a CAR 15 puede encontrarse en alguno de los estudios intraespecie, que representa el 87% de los DEGs identificados. Un grupo de transcritos de 872 (366 sobreexpresados y 506 reprimidos) se detectó en los 3 estudios de expresión génica realizados a los 15 días.

3.2.4.3 La anotación funcional de los DEGs revela las rutas principales asociadas a la respuesta a frío a largo plazo

La anotación funcional de los transcritos de *C. clementina* se realizó con el software BLAST2GO (Götz *et al.*, 2008), y se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento con el fin de identificar funciones sobre representadas entre los DEGs obtenidos en los análisis inter e intraespecies, que podrían estar relacionados con la respuesta a la baja temperatura. Con el fin de llevar a cabo el análisis de enriquecimiento funcional se empleó la herramienta FatiGO empleando la anotación funcional del set de DEGs obtenida de las comparaciones intra (0 vs 15D) e inter (CAR vs. MAC) y con el mínimo valor FDR que apareció sobre representado en al menos 2 de las 3 comparaciones (Tabla 10).

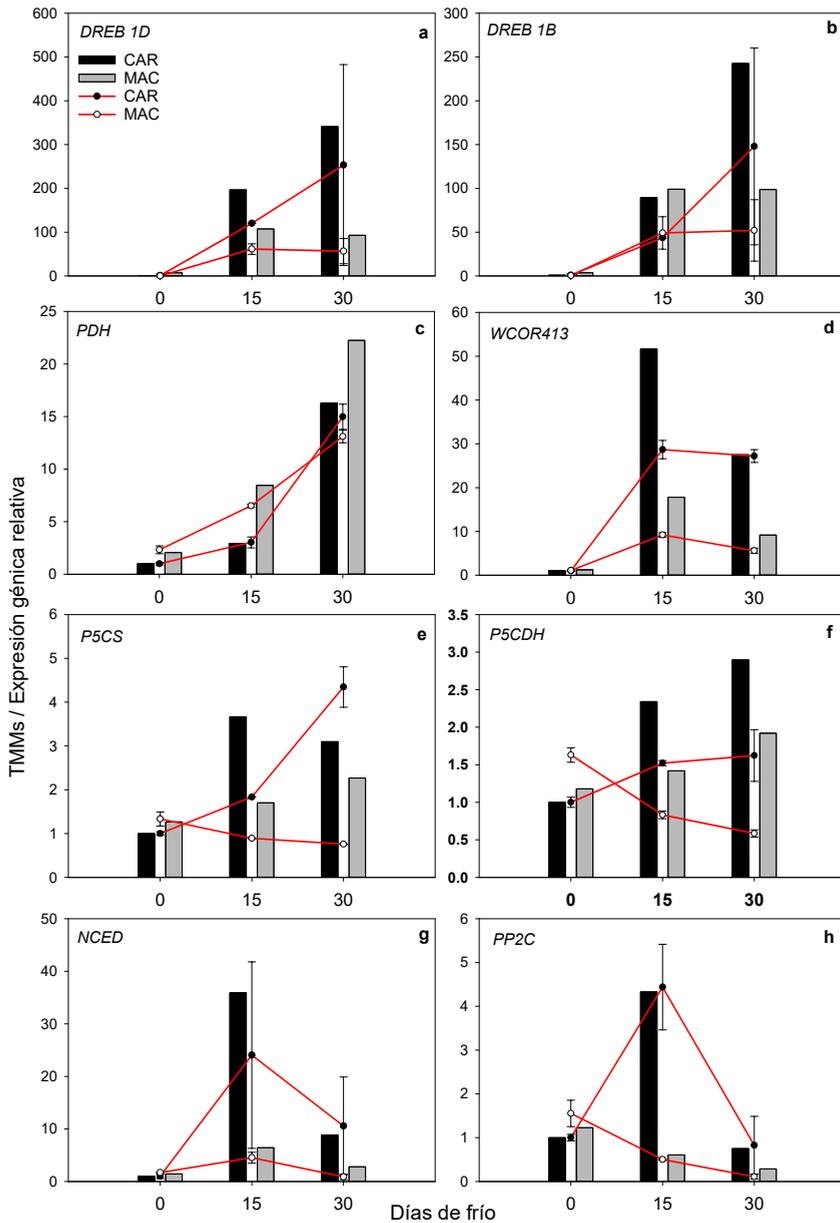


Figure 20. DEGs seleccionados para la validación del RNA-seq. Las barras representan los TMMs provenientes del análisis de RNA-seq y las líneas en rojo el nivel de expresión relativo proveniente de las RT-PCR. a) *DREB1D* (LOC18033409), b) *DREB1B* (LOC18049462), c) *PDH* (LOC18039477), d) *WCOR413* (LOC18035610), e) *P5CS* (LOC18044634), f) *P5CDH* (LOC18045924), g) *NCED* (LOC18046011) and h) *PP2C* (LOC18043434). Las muestras se midieron en hojas de la variedad 'Valencia Delta seedless' injertada sobre los patrones citrange Carrizo (CAR) y *C. macrophylla* (MAC) y tratadas a 1 °C de temperatura durante 15 y 30 días y en condiciones control (0 días). Los valores resultaron de la media \pm DS de tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas por muestra biológica (n=3).

Tabla 10. Los 40 términos GO más sobrerrepresentados de la categoría de proceso biológico a los 15 días de tratamiento de frío.

| N° GO | Nombre GO | FDR | | |
|------------|--|-------------|------------|------------|
| | | CARO-MAC0 D | CAR 0-15 D | MAC 0-15 D |
| GO:0009409 | Respuesta a frío | 6.14E-12 | | 5.04E-12 |
| GO:0009768 | Fotosíntesis, recolección de luz fotosistema i | | 4.98E-06 | 1.45E-06 |
| GO:0010200 | Respuesta a quitina | 1.90E-10 | 7.99E-05 | 5.24E-06 |
| GO:0006633 | Proceso biosíntesis de ácidos grasos | | 8.94E-04 | 2.54E-04 |
| GO:0009642 | Respuesta intensidad de luz | 9.02E-04 | | 3.59E-04 |
| GO:0080167 | Respuesta a karrikina | 1.92E-03 | 1.26E-06 | 1.75E-06 |
| GO:0018298 | Proteína de unión a cromóforo | | 2.57E-05 | 1.39E-03 |
| GO:0055081 | Homeostasis anión | | 1.28E-03 | 9.26E-04 |
| GO:0009744 | Respuesta a sacarosa | | 2.59E-03 | 9.90E-04 |
| GO:0009312 | Proceso de biosíntesis de oligosacáridos | | 2.08E-03 | 2.43E-03 |
| GO:0042754 | Regulación negativa del ciclo circadiano | 3.67E-03 | 2.20E-03 | |
| GO:0009753 | Respuesta a ácido jasmónico | | 6.28E-03 | 1.92E-03 |
| GO:0009751 | Respuesta a ácido salicílico | 4.55E-10 | | 8.26E-03 |
| GO:0009688 | Proceso biosintético de ácido abscísico | | 8.72E-03 | 4.88E-03 |
| GO:0006000 | Proceso metabólico de fructosa | | 1.41E-02 | 6.69E-03 |
| GO:0071483 | Respuesta celular a luz azul | 1.02E-02 | 1.46E-02 | |
| GO:0000302 | Respuesta a especies reactivas de oxígeno | | 2.87E-02 | 1.19E-04 |
| GO:0000413 | Isomerización peptidil-prolil | | 2.24E-02 | 6.44E-03 |
| GO:0009816 | Respuesta a defensa frente bacteria | | 2.75E-02 | 2.94E-03 |
| GO:0009734 | Ruta de señalización por activación a auxina | | 7.50E-05 | 3.06E-02 |
| GO:0042631 | Respuesta celular de privación de agua | 2.65E-05 | 4.53E-02 | 7.88E-04 |
| GO:0002832 | Regulación negativa respuesta a estímulo biótico | | 2.90E-02 | 2.35E-03 |
| GO:0019640 | Proceso catabólico, xilulosa 5-fosfato | | 1.05E-03 | 3.19E-02 |
| GO:0010109 | Regulación de la fotosíntesis | 1.43E-02 | | 2.00E-02 |
| GO:0010018 | Señalización de luz rojo-lejano | | 3.43E-02 | 3.02E-03 |
| GO:0031348 | Regulación negative de respuesta a defensa | | 1.44E-02 | 2.40E-02 |
| GO:0009658 | Organización del cloroplasto | 3.37E-02 | | 4.72E-03 |
| GO:0009729 | Detección de estímulos a brasinoesteroides | 1.91E-02 | 3.46E-02 | 8.26E-03 |
| GO:0006116 | Oxidación a nadh | | 2.76E-04 | 4.18E-02 |
| GO:0080148 | Regulación negativa privación de agua | 1.45E-02 | | 2.79E-02 |
| GO:0006006 | Proceso metabólico de la glucosa | | 1.76E-02 | 2.55E-02 |
| GO:0006062 | Proceso catabolismo sorbitol | | 1.54E-02 | 3.19E-02 |
| GO:0051164 | Proceso metabólico l-xilitol | | 1.54E-02 | 3.19E-02 |
| GO:2000038 | Regulación del complejo desarrollo del estroma | | 3.68E-02 | 1.21E-02 |

| | | | |
|------------|---|----------|----------|
| GO:0046890 | Proceso biosintético de regulación de lípidos | 1.74E-02 | 3.73E-02 |
| GO:0010207 | Ensamblaje del fotosistema ii | 1.54E-02 | 4.18E-02 |
| GO:0010114 | Respuesta a luz roja | 3.18E-02 | 3.03E-02 |
| GO:0015996 | Proceso catabolismo de clorofilas | 3.21E-02 | 3.03E-02 |
| GO:0007267 | Señalización célula-célula | 3.46E-02 | 3.79E-02 |
| GO:0008643 | Transporte de carbohidratos | 4.57E-02 | 2.75E-02 |

Las funciones biológicas más enriquecidas fueron “respuesta a frío”, con el resultado FDR más bajo. Otras anotaciones funcionales más sobrerrepresentadas fueron la movilización de azúcares, regulación por las hormonas ABA y JA o luz y ritmo circadiano.

Encontramos una abundancia de términos GO relacionada con la “ruta de metabolismo de los azúcares” (respuesta a sacarosa, procesos de biosíntesis de oligosacáridos, procesos metabólicos de fructosa, procesos de catabolismo de glucuronactato a xilulosa 5-fosfato, proceso de metabolismo de glucosa, proceso de metabolismo de fructosa, proceso de catabolismo de sorbitol, proceso metabólico de L-xilitol que se muestra en la Tabla 10. También resultaron importantes otros procesos como el de biosíntesis de oligosacáridos de la familia de la rafinosa presente en las comparaciones interspecies, o de catabolismo de la galactosa obtenido en las comparaciones CAR 0 vs CAR 15.

También se encontraron procesos relacionados con la respuesta a luz y reloj circadiano, procesos relacionados con la fotosíntesis, captación de luz por los fotosistemas, unión de proteína-cromóforo, regulación negativa del ritmo circadiano, ruta de señalización de la luz roja lejana, y la respuesta a luz roja.

Algunos procesos relacionados con la señalización hormonal también se encontraron: respuesta a JA, respuesta a ácido salicílico, procesos de biosíntesis de ABA, ruta de activación de señalización de auxinas, etc.

Resultados similares se obtuvieron cuando se analizó la base de datos de KEGG con el fin de determinar las rutas representadas entre los DEGs a los 15 días (Tabla 11). Claramente, el metabolismo de carbohidratos fue el más representado, con 512 loci que intervinieron, con las rutas del metabolismo de los azúcares reducidos como la sacarosa, galactosa o fructosa ofreciendo el mayor número de DEGs.

Tabla 11. Rutas KEGG más representadas de entre los DEGs a 15 días de tratamiento de frío a 1 °C.

| RUTAS KEGG | | Número Locis |
|-------------------------------------|---|--------------|
| Metabolismo de carbohidratos | Metabolismo del almidón y sacarosa | 72 |
| | Glicólisis / Gluconeogénesis | 69 |
| | Metabolismo de aminoácidos y nucleótidos | 69 |
| | Metabolismo de glutatión | 60 |
| | Metabolismo de piruvato | 39 |
| | Metabolismo de fructosa y manosa | 37 |
| | Metabolismo de galactosa | 35 |
| | Metabolismo de glioxilato y dicarboxilato | 33 |
| | Interconversión de pentosa y glucuronato | 32 |
| | Ciclo del citrato (Ciclo ATC) | 30 |
| | Metabolismo de ascorbato y aldarato | 30 |
| | Ruta de la pentosa de fosfato | 28 |
| | Metabolismo de inositol fosfato | 18 |
| | Metabolismo propanoato | 15 |
| | Metabolismo butanoato | 5 |
| TOTAL | 572 | |
| <hr/> | | |
| Adaptación medioambiental | Transducción de señales hormonales | 223 |
| | Ritmo circadiano | 40 |
| | TOTAL | 263 |
| <hr/> | | |
| Metabolismo de lípidos | Metabolismo de glicerofosfolípidos | 52 |
| | Degradación de fosfolípidos | 29 |
| | Metabolismo de glicerolípidos | 28 |
| | Metabolismo de ácido alfa-linoleico | 23 |
| | Biosíntesis de esteroides | 21 |
| | Metabolismo de ácidos grasos | 21 |
| | Metabolismo de éter-lípidos | 16 |
| | Biosíntesis de cutina, suberina y ceras | 11 |

| | | |
|---|--|------------|
| | Metabolismo de ácido araquidónico | 10 |
| | Metabolismo de ácido linoleico | 9 |
| | Biosíntesis de ácidos insaturados | 7 |
| | Síntesis y degradación de cuerpos cetónicos | 2 |
| | Metabolismo de esfingolípidos | 1 |
| | TOTAL | 230 |
| <hr/> | | |
| Biosíntesis de otros metabolitos secundarios | Biosíntesis de fenilpropanoides | 122 |
| | Biosíntesis de flavonoides | 40 |
| | Biosíntesis de carotenoides | 36 |
| | Biosíntesis de isoquinolina alcaloide | 13 |
| | Biosíntesis de flavanona y flavonol | 3 |
| | Biosíntesis de antocianos | 2 |
| | TOTAL | 216 |
| <hr/> | | |
| Metabolismo de aminoácidos | Metabolismo de cisteína y metionina | 51 |
| | Metabolismo de prolina y arginina | 35 |
| | Biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano | 32 |
| | Metabolismo de glicina, serina and treonina | 28 |
| | Degradación de valina, leucina e isoleucina | 27 |
| | Metabolismo de alanina, aspartato y glutamato | 23 |
| | Degradación de lisina | 12 |
| TOTAL | 129 | |
| <hr/> | | |

263 DEGs se obtuvieron relacionados con la adaptación al medio, especialmente con la transducción de señales hormonales y el ritmo circadiano, que juega un papel crucial en la respuesta a estrés por frío. De manera similar, las rutas del metabolismo de lípidos con 230 DEGs, biosíntesis de otros metabolitos secundarios con 216 DEGs, y el metabolismo de los aminoácidos con 129 genes ampliamente representados en el grupo de DEGs a los 15 días.

3.2.4.4 Ruta de regulación CBF

Nosotros identificamos 3 genes CBF/DREB like en el genoma de *C. clementina*, que codificaron para *DREB1B* (LOC18049462), *DREB1D* (LOC18033409), y *DREB2A* (LOC18043521), se encontraron sobreexpresados en muestras de CAR 15 y MAC 15 con respecto a CAR 0 y MAC 0 (Figuras 20 y 21a). Curiosamente, ambos Fold Change (de ahora en adelante FC por sus siglas en inglés Fold Change) y niveles de expresión normalizada fue en general mayor en muestras del patrón CAR que en el de MAC. Por ejemplo, para *DREB1D* el FC en MAC 0 vs MAC 15 fue 18 veces mayor que en CAR 0 vs CAR 15, y el nivel de expresión fue cercana a tres veces mayor que para MAC (Figura 20 y 21a).

Identificamos un ortólogo del gen *ICE1*, LOC18051975, que mostró una gran disminución en su expresión en ambas muestras MAC y CAR tal y como ocurría en el capítulo 1 (experimentos 1 y 2). La proteína *COP1*, que codifica para el gen LOC18050526, responsable de la degradación de *ICE1*, mostró una disminución estable en ambos patrones CAR y MAC durante el tratamiento de frío (Figura 21a). El gen *SIZ1*, LOC 18045500, que media la conjugación de grupos SUMO a *ICE1*, parece estar diferencialmente expresada en las comparaciones de intraespecie CAR 0 vs CAR 15 y MAC 0 vs MAC 15, y su expresión a 15 días de frío fue mayor en las muestras de CAR (Figura 21a).

El factor de transcripción *SOC1* relativo a cítricos y que actúa como regulador negativo de la respuesta a frío (LOC18046724), se encontró reprimido durante el tratamiento a baja temperatura, además de encontrar también el inductor *MYB15* (LOC18032541) de los genes CBF también con los niveles de expresión aumentados durante el mismo período de tiempo.

Los factores de transcripción que activan los genes COR por la ruta CBF-independiente se indujeron también en nuestras condiciones (Figura 21a), *ZAT10* (LOC18035015), *ZAT11* (LOC18039334) y *ZF* (LOC18056156), aparecen como diferencialmente expresados y mostraron un incremento en los niveles de expresión a lo largo de los días en presencia de frío. LOC18034062 y LOC18055900 que son los factores *ZAT12* y *HSFC1* mostraron un patrón de expresión similar a los factores anteriores (*ZAT10*, *ZAT11* y *ZF*), pero en este caso su nivel de expresión fue significativamente mayor en CAR que en el patrón MAC. A este grupo de genes pertenece la proteína *DEAR1A*, que codifica para el locus de cítricos LOC18036471, el cual su expresión disminuyó en MAC 0 vs MAC 15, que mostró unos niveles de expresión significativamente mayores que los transcritos en CAR 15 respecto a MAC15 (Figura 21a).

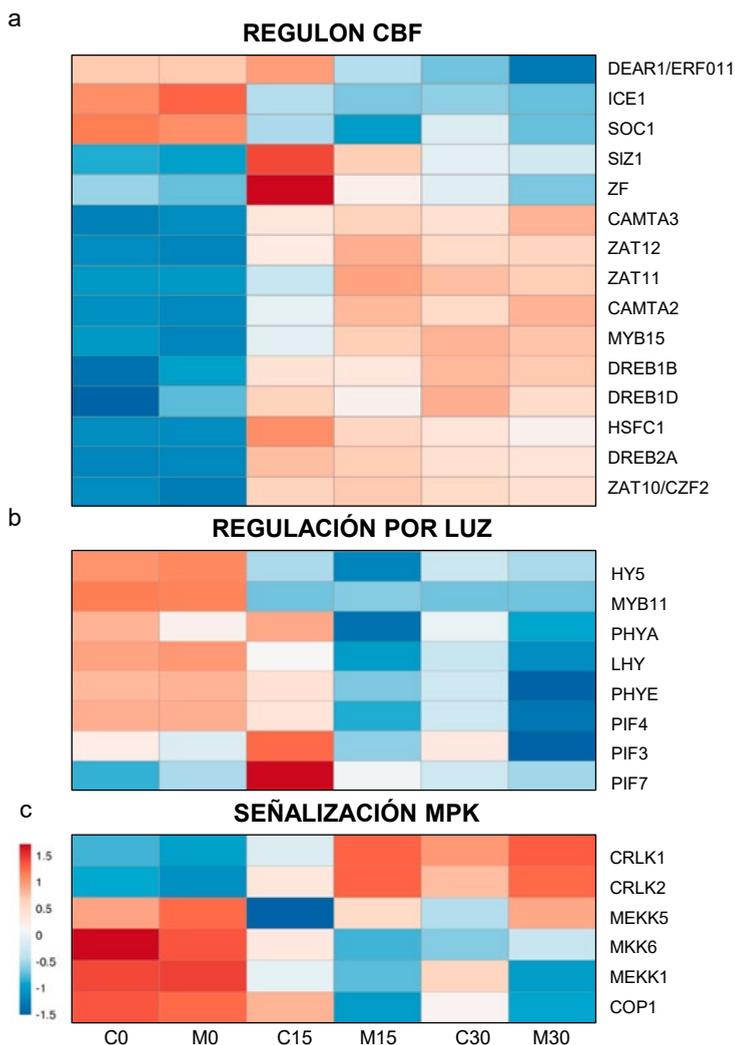


Figura 21. Mapa de calor que muestra la expresión génica (TMMs) en la respuesta a frío en plantas de la variedad 'Valencia Delta seedless' sobrecitrango Carrizo (C) y *C. macrophylla* (M) a 0, 15 y 30 días de frío. a) regulon CBF, b) genes relacionados con la luz c) genes de la cascada MAP quinasa.

3.2.4.5 Señalización por luz y ciclo circadiano

Los genes diferencialmente expresados (DEGs) incluyen algunos factores clave en la integración de la luz y ciclo circadiano con la respuesta a frío (Figura 21b). Se identificaron los ortólogos de cítricos del fitocromo A (LOC18035337) que

forma parte de la respuesta a frío y fue sobreexpresado sólo en plantas CAR 15 y el fitocromo B (LOC18033413), que tuvo un papel antagonista que se reprimió en todas las muestras a los 15 días de tratamiento. Otros miembros relevantes del sistema de regulación por luz diferencialmente expresados fueron los factores *PIF3* (LOC18034179), *PIF4* (LOC18043439) y *PIF7* (LOC18046731) con la disminución de los niveles de expresión. El gen en cítricos LHY (LOC18047565) se reprimió durante el tratamiento por frío. Sin embargo, la expresión fue siempre mayor en las muestras de CAR respecto a las de MAC. Por ejemplo, en las muestras de CAR15 con 4716 TMMs y en MAC15 1445 TMMs.

También se identificó el gen ortólogo HY5, LOC18054790, el cual mostró un ligero incremento de la expresión en las muestras de CAR15, mientras que en MAC15 se mantuvieron estables. Así pues, la cantidad de transcritos de HY5 fue 4 veces mayor en CAR15 que en MAC15. Al igual ocurrió a tiempo 30, donde en CAR30 la expresión fue 3 veces mayor que en MAC30.

3.2.4.6 Cascadas de señalización de calcio y MAP kinasas

Se encontraron también diferencialmente expresados genes que codificaron para proteínas kinasas activadas por mitógenos (Figura 21c) como *MEKK1* (LOC18040613), *MEKK5* (LOC112100736), y *MKK6* (LOC18056166), que disminuyeron la expresión en MAC 15 y CAR 15 con respecto a sus MAC 0 y CAR 0. También identificamos 2 ortólogos en cítricos de receptores regulados por calcio/calmodulina kinasa *CRLK1* y *CRLK2*, (LOC18054581 y LOC18039195), que mostraron un incremento de los niveles de expresión en muestras con 15 días de tratamiento en ambos patrones, pero significativamente mayor en el patrón CAR.

3.2.4.7 Metabolismo de los azúcares y aminoácidos

Acorde con los cambios observados en la acumulación de los azúcares solubles (Figura 17 y Tabla 8), se encontraron numerosos genes diferencialmente expresados relacionados con el metabolismo de los azúcares durante el tratamiento con frío. En el presente trabajo se muestran los resultados más importantes. La rafinosa fue el azúcar soluble que más incrementó con el tratamiento a bajas temperaturas (Tabla 8). Encontramos algunos genes putativos ortólogos que codificaron para galactinol sintasa (Figura 22a), *GOLS1* (LOC18044188), y *GOLS2* (LOC1804098, y LOC18031271) y la rafinosa sintasa, también conocida como la galactinol-sacarosa galactosil transferasa, *RFS1* (LOC18031328), *RFS2* (LOC18047580), *RFS5* (LOC18050892), y *RFS6* (LOC18055822). Estas enzimas resultan clave para la síntesis del azúcar rafinosa, y muestran un incremento en su patrón de expresión con un FC significativo de acuerdo con los resultados obtenidos en la cuantificación de azúcares (Tabla 8).

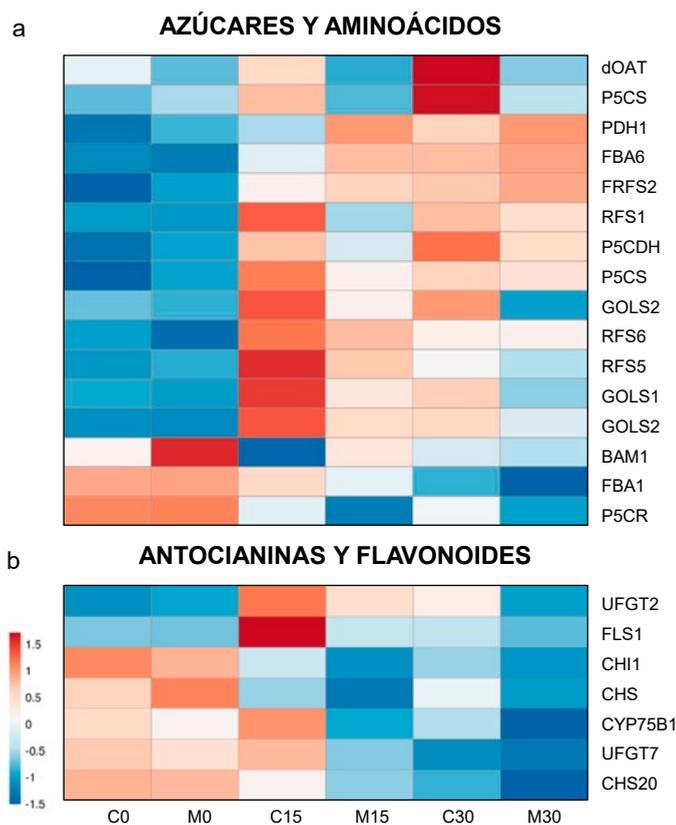


Figura 22. Mapa de calor de los DEGs (expresados en TMMs) correspondientes al metabolismo primario y secundario en plantas de la variedad 'Valencia Delta seedless' sobre citrange Carrizo (C) y *C. macrophylla* (M) a 0, 15 y 30 días de frío. a) genes relacionados con el metabolismo de los azúcares y aminoácidos y b) con la ruta de biosíntesis de flavonoides y antocianos.

Nuestros análisis también mostraron una acumulación de fructosa durante el tratamiento de frío (Tabla 8 y Figura 22a), y se encontraron dos posibles ortólogos para la enzima fructosa-1, 6-bisfosfatasa aldolasa (*FBA*), enzima clave en el metabolismo de los azúcares, pero también que interviene en la respuesta de estrés abiótico. Dos genes de cítricos *FBA* se encontraron diferencialmente expresados, el que se encuentra en el citosol (LOC18040008), y el cloroplástico (LOC18034756). El *FBA* cloroplástico mostró una expresión similar en ambos patrones CAR y MAC, mientras que el ortólogo citosólico resultó incrementado con unos FC de 3.15 y 5.02 en CAR 0 vs CAR 15 y MAC 0 vs MAC 15 respectivamente.

El gen *BAM1* (LOC 18048130) (Figura 22a) codifica para una β -amilasa que fue identificada previamente en *Poncitrus trifoliata* como *PtrBAM1*, y resultó también estar diferencialmente sobreexpresada, mostrando una reducción de expresión a los 15 días de frío en las muestras de CAR y MAC.

El cambio más significativo que se ha visto en la cuantificación de aminoácidos es el del aminoácido prolina, del cual, previamente en el Experimento 3 (Figura 16) se analizaron con mayor atención los patrones de expresión de los genes de síntesis y degradación. Como en anteriores capítulos, en el presente experimento 4 (Figura 22a) también se obtuvieron DEGs relacionados con la síntesis y degradación de la ruta del aminoácido prolina como se muestra en el mapa de calor (Figura 22a). El mapa de calor representó la expresión del ortólogo de *dOAT* (LOC18051867); *P5CS1* y *P5CS2* (LOC18038188 y LOC18044634); *PDH* (LOC18039477), *P5CR* (LOC18032970) y *P5CDH* (LOC18045924). *P5CS1*, *P5CS2*, *PDH* y *P5CDH* se sobreexpresaron de manera significativa en las plantas de CAR, sin embargo, no lo hicieron en las de MAC (Figura 22a).

3.2.4.8 Metabolismo de antocianos y flavonoides

Los genes putativos que correspondieron para los genes *FLS1* (LOC18037475) y *CIP75B1* (LOC18050323) aumentaron la expresión con respecto al tiempo 0 y además su expresión tanto a 15 como a 30 días de frío fue mayor en las plantas injertadas con el patrón CAR (Figura 22b). El resto de los genes, *UFGT7* (LOC18047244), *UFGT1* (LOC18032618) *CHS* (LOC18042808), *CHS2* (LOC18051925) y *CHI1* (LOC18044429) putativos que se muestran en el mapa de calor de la Figura 22b resultaron estar algo reprimidos o sin cambios de expresión de 0 a 15 y 30 días de tratamiento, aunque siempre fue mayor en el patrón CAR, lo que se podría correlacionar con una mayor activación de la ruta de síntesis de antocianinas (Figura 22b).

3.2.4.9 Regulación hormonal

El análisis se centró en las hormonas que mostraron diferencias relevantes en el tiempo 15 de tratamiento: giberelinas (GA) y brasinoesteroides (BRs) (Figura 23a), ácido jasmónico (JA) (Figura 23b) y ácido abscísico (ABA) (Figura 23c).

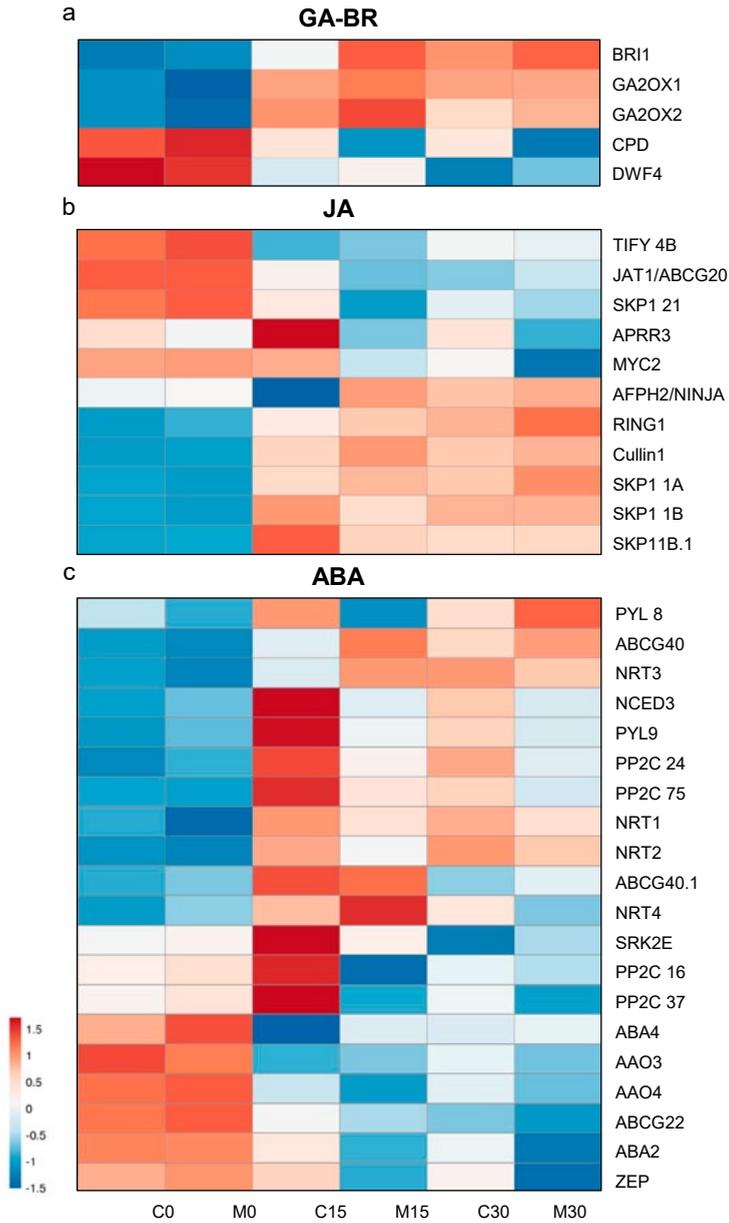


Figure 23. Mapa de calor de los DEGs del metabolismo de hormonas (expresados en TMMs) en plantas de la variedad 'Valencia Delta seedless' sobre citrange Carrizo (C) y *C. macrophylla* (M) en 0, 15 y 30 días de frío. a) genes relacionados con giberelinas y brasinoesteroides, b) genes relacionados con el ácido jasmónico y c) genes relacionados con el ácido abscísico.

La GA es una hormona que promueve el crecimiento por lo que, en presencia de estrés por frío, se produjo una reducción de los genes de síntesis de GA, que correlaciona con la supresión del crecimiento y el retraso de la floración. Esta posible reducción de la concentración de la hormona GA se logra a partir de la activación de la giberelerina 2-beta dioxigenasa (GA2Ox), para la que se encontraron dos locis *GA2Ox1* (LOC18050091) y la *GA2Ox2* (LOC18049951), que se sobreexpresó en CAR y MAC a los 15 días, con respecto a sus respectivos controles CAR 0 y MAC 0 (Figura 23a).

Los BRs también promueven el crecimiento, pero a diferencia de la GA, parece que controla positivamente la respuesta a frío. Se identificaron los ortólogos del gen CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS AND DWARFISM, *CPD* (LOC 18044077) y *DWF4* (LOC18037059), que resultó reprimirse de 0 a 15 días, sin embargo, los niveles de expresión se mantuvieron más altos en las muestras de CAR, especialmente *DQF4*. El gen BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 asociado al receptor proteína quinasa 1, *Brl1*, el receptor de BR se ha visto que promueve la aclimatación a frío y que el locus *Brl1*, LOC18041991, se encontró sobreexpresado a 15 días con respecto a los 0 días en CAR respecto a plantas de MAC (Figura 23a).

El JA es una hormona que puede participar en la priorización del crecimiento a la respuesta frente al estrés dando lugar al proceso de aclimatación. Diferentes genes que intervienen en la inactivación de los represores JAZ se mostraron sobreexpresados en MAC 15 y en CAR 15 (Figura 23b): *Cullin* (LOC18049048), *RING1* (LOC18047608) y 4 miembros de la familia *SKP1* (LOC18037411, LOC18041740, LOC18033735, and LOC18045891). Comparativamente, el transportador de JA *JAT1/ABCG20* (LOC18039803) apareció activado en las muestras a 15D. El represor de respuesta a jasmonatos *TIFY 4B* (LOC18047873) apareció reprimido en CAR15 y MAC15, mientras *AFPH2/NINJA* (LOC18055945), no mostró diferencias significativas entre 0 y 15 días, pero las muestras de CAR tuvieron un número significativamente menor de transcritos que los patrones MAC. Finalmente, el activador clave de JA, el factor de transcripción bHLH *MYC2* (LOC18047048), tuvo el nivel de expresión mayor en CAR, mientras que en MAC15 respecto a MAC0 se redujo la expresión (Figura 23b).

El ácido abscísico (ABA) se mostró como el regulador central de la señalización a baja temperatura, actuando como una señal transportadora a larga distancia con el fin de mediar la comunicación de raíz a hoja en condiciones de estrés. Encontramos algunos genes relacionados con la síntesis y transporte de ABA, como también los genes que codifican para los receptores de la hormona diferencialmente expresados en nuestras muestras (Figura 23c).

Estos genes que intervienen en la biosíntesis de ABA (Figura 23c), abscísico-aldehído oxidasa *AAO3* (LOC18033897, LOC18034272), zeaxantina epoxidasa *ZEP*

(LOC18036737), xantoxín deshidrogenasa *ABA2* (LOC18038883), y neoxantín sintasa *ABA4* (LOC18039410), aparecieron todas reprimidas en MAC15 y CAR15 respecto MAC0 y CAR0, y sólo la 9-cis-epoxicarotenoide-dioxigenasa *NCED3* (LOC18046011) incrementó su expresión en las muestras a 15 días (Figura 18 y Figura 23c).

Por otro lado, algunos genes con similitud significativa a los transportadores de ABA (Figura 23c) pertenecientes a las familias *NRT1/PTR* y *ABCG*, concretamente, *NRT1* (LOC18047775), *NRT2* (LOC180047776), *NRT3* (LOC18032684), *NRT4* (LOC180319230), *ABCG40* (LOC18035930, LOC18036075), se sobreexpresaron en las muestras a 15 días, con excepción de *ABCG22* (LOC18038312), que se reprimió claramente en las muestras de MAC y su expresión se mantuvo alta en plantas de CAR.

Se pudo observar un claro aumento de expresión en las muestras de CAR15 para los genes ortólogos de cítricos pertenecientes a la familia de receptores de ABA, *PYL* (*PYL8* / LOC18048127, *PYL9* / LOC18049819) así como para aquellos involucrados en la integración de señalización de ABA como la serina / treonina-quinasa *SRK2E* (LOC18035057) o miembros de la familia de la proteína fosfatasa 2 C, *PP2C 16* (LOC18037418), *PP2C 24* (LOC18034994), *PP2C 37* (LOC18043434) (Figura 23) y *PP2C 75* (LOC18033189). En este caso los valores de expresión normalizada fueron significativamente mayores en las muestras de CAR 15 con respecto a las de MAC 15.

3.2.4.10 Inhibición de la fotosíntesis, catabolismo de clorofilas y fluorescencia

Se observó un enriquecimiento de DEGs en funciones relacionadas con la fotosíntesis: “fotosíntesis, recolección de luz por el fotosistema I”, “respuesta a la intensidad de luz”, “regulación de la fotosíntesis”, “organización del cloroplasto”, “regulación del desarrollo del complejo estomático”, “ensamblaje del fotosistema II” y “proceso catabólico de clorofilas” (Tabla 9). Los DEGs que se consideraron más importantes y con un FC mayor se muestran en la Figura 24. El presente mapa de calor muestra cómo de manera general los genes relacionados con fotosíntesis y protección de los fotosistemas se encuentran reprimidos una vez se presentó el tratamiento de frío, pero resultaron estar no tan reprimido en Carrizo en términos generales durante el tratamiento a 15 días.

Como se mostró en los resultados fisiológicos, el tratamiento con baja temperatura inhibió completamente la fotosíntesis, transpiración, conductividad estomática y fijación de CO₂ de la misma manera en ambos patrones (Experimento 3, Figura 10), lo que estaría en consonancia con los resultados obtenidos en los análisis por RNA-seq donde la función “fotosíntesis, recolección de luz por el fotosistema I” fue de las más representadas tanto en el análisis intraespecies de CAR como en MAC. En la Figura 24, el mapa de calor representa los DEGs que

intervienen en el FSI y que fueron *FdC1* (LOC18033147), *PSAD2* (LOC18046879), *PSAE2* (LOC18049269), *PSAN* (LOC18041631) y *LHCb7* (LOC18055368). Otra de las funciones relacionadas con la fotosíntesis que también resultó enriquecida en el RNA-seq fue “regulación de la fotosíntesis” (Tabla 9) que presentó diferencias entre patrones, aunque en ambos genotipos la fotosíntesis se inhibió completamente.

FOTOSÍNTESIS

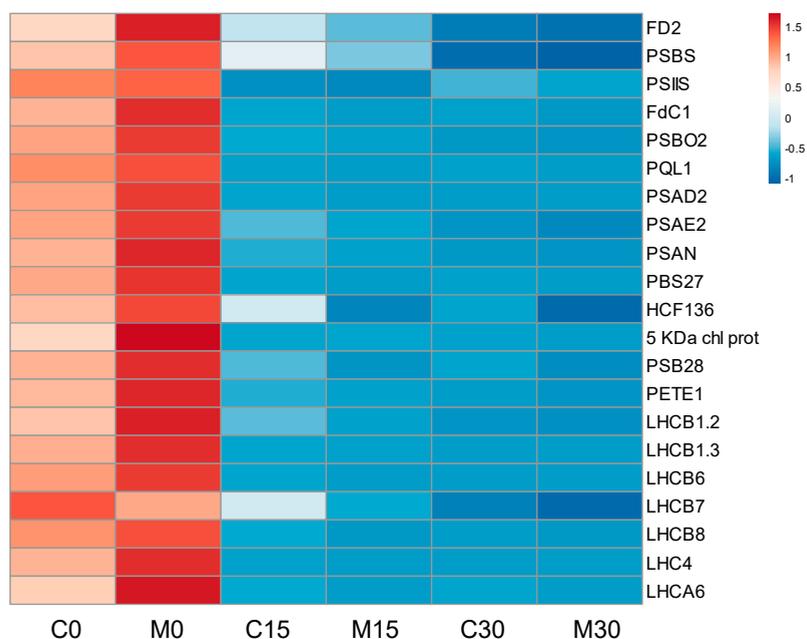


Figura 24. Mapa de calor que muestra la expresión génica (TMMs) de los DEGs relacionados con la fotosíntesis en plantas de la variedad ‘Valencia Delta seedless’ sobre citrange Carrizo (C) y *C. macrophylla* (M) a 0, 15 y 30 días de frío.

Las plantas injertadas con el patrón CAR sufrieron una mayor degradación de clorofilas que las plantas del patrón MAC como se mostró en la Tabla 7 del experimento 3. Además, lo confirma también el resultado de enriquecimiento de genes en las funciones “proceso de catabolismo de clorofilas” (Tabla 9) y en la “organización del cloroplasto” íntimamente relacionadas con el ensamblaje del PSII y su fotoprotección (Tabla 9) con un FDR significativo en las comparaciones entre CAR y MAC para 15 días (Tabla 9). Los DEGs relacionados (Figura 24) con estos procesos fueron *PSBS* o *CP22* (LOC18042569), *PSBO 2* (LOC18036420), *PSB27* (LOC18052634) y *PSB28* (LOC18054549).

3.2.4.11 Acuaporinas PIP y las relaciones hídricas

Se analizaron los resultados de los DEGs tanto en los dos experimentos intraespecie a 15 días de frío (CAR 0 vs. CAR 15 y MAC 0 vs. MAC 15) como en el experimento interespecie (CAR 15 vs. MAC 15) (Tabla 12) y se obtuvo que en la comparación CAR 0 vs. CAR 15, tres PIPs de las cuatro encontradas mostraban una expresión de represión; *PIP1-2* (LOC18048648), *PIP2-1* (LOC18035633) y *PIP2-8* (LOC18034159) y en cambio la *PIP1-2* (LOC18044530) se sobreexpresó 3 veces después de 15 días de tratamiento de frío. En el caso de las plantas MAC (MAC 0 vs. MAC 15) se obtuvieron ocho DEGs que codifican para ocho PIPs putativas de las nueve que se obtuvieron en la anotación de *Citrus clementina*. Además de obtener un mayor número de PIPs reprimidas en MAC se reprimieron con unos FC mucho más negativos (Tabla 12) que en el caso de las PIPs de las plantas CAR.

En el caso del experimento interespecie (CAR 15 vs. MAC 15) (Tabla 12) se obtuvieron cuatro genes putativos de las PIPs que fueron la *PIP2-1* (LOC18035633), *PIP 2-2* (LOC18039157), *PIP2-2* (LOC18039599) y la *PIP2-5* (LOC18043954), las cuales resultaron estar menos reprimidas en los patrones CAR respecto en MAC después de 15 días de tratamiento a bajas temperaturas. Además, las acuaporinas obtenidas resultaron corresponder a acuaporinas PIP del tipo PIP2.

Tabla 12. Muestra los DEGs de las proteínas PIP en los dos estudios intraespecie (CAR 0 vs. CAR 15 y MAC 0 vs. MAC 15) e interespecie (CAR vs. MAC). FC, es la tasa de cambio de expresión.

| GeneBank Alias | FC | Anotación |
|-------------------------|--------|----------------------------|
| CAR 0 vs. CAR 15 | | |
| LOC18044530 | 3,01 | probable acuaporina PIP1-2 |
| LOC18048648 | -9,07 | probable acuaporina PIP1-2 |
| LOC18035633 | -4,71 | acuaporina PIP2-1 |
| LOC18034159 | -10,85 | probable acuaporina PIP2-8 |
| MAC 0 vs. MAC 15 | | |
| LOC18039073 | -8,80 | probable acuaporina PIP1-2 |
| LOC18048648 | -22,85 | probable acuaporina PIP1-2 |
| LOC18045473 | -8,97 | acuaporina PIP1-5 |
| LOC18035633 | -15,21 | acuaporina PIP2-1 |
| LOC18039599 | -200,7 | acuaporina PIP2-2 |
| LOC18039157 | -10,16 | acuaporina PIP2-2 |
| LOC18043954 | -3,58 | probable acuaporina PIP2-5 |
| LOC18034159 | -14,80 | probable acuaporina PIP2-8 |

CAR 15 vs. MAC 15

| | | |
|-------------|-------|----------------------------|
| LOC18035633 | 2,99 | acuaporina PIP2-1 |
| LOC18039157 | 14,88 | acuaporina PIP2-2 |
| LOC18039599 | 83,10 | acuaporina PIP2-2 |
| LOC18043954 | 4,57 | probable acuaporina PIP2-5 |

En cítricos encontramos diez acuaporinas PIPs putativas, de las cuales tres (*PIP1-2*, LOC18044530; *PIP2-2*, LOC18039157; *PIP2-5*, LOC18043954) se analizó más detenidamente su expresión (Figura 25) ya que fueron las únicas que se sobreexpresaron a bajas temperaturas en el patrón CAR. El gen que codifica la acuaporina putativa *PIP1-2* aumentó su expresión a los 15 días (Figura 25a) tanto en plantas CAR como en MAC siendo el doble en plantas CAR que en plantas MAC. Después de 30 días de frío, la expresión disminuyó en ambos patrones.

La expresión del gen putativo *PIP2-2* aumentó en plantas de CAR a los 15 días de tratamiento en 2 veces respecto a su control, pero en este caso las plantas MAC disminuyeron 10 veces su expresión respecto a su control. Así pues, resultó un FC de 15 veces mayor en plantas CAR que en MAC (Figura 25b). Después de 30 días de tratamiento, en ambos casos la expresión disminuyó, aunque fue mayor en CAR 10 veces que en MAC.

La expresión del gen putativo *PIP2-5* aumentó el doble (Figura 25c) en plantas CAR a los 15 días, sin embargo, en plantas MAC disminuyó 3.5 veces. A los 15 días la acuaporina *PIP2-5* se sobreexpresó 15 veces más en CAR que en MAC. A los 30 días las expresiones disminuyeron en ambos casos, aunque la expresión de CAR fue casi 8 veces mayor que en MAC.

Así pues, obtuvimos que las tres acuaporinas (Figura 25) se expresaron más a los 15 días de tratamiento en las plantas de CAR que en MAC. Sin embargo, en el patrón MAC sólo se sobreexpresó el doble la *PIP1-2* a 15 días de frío.

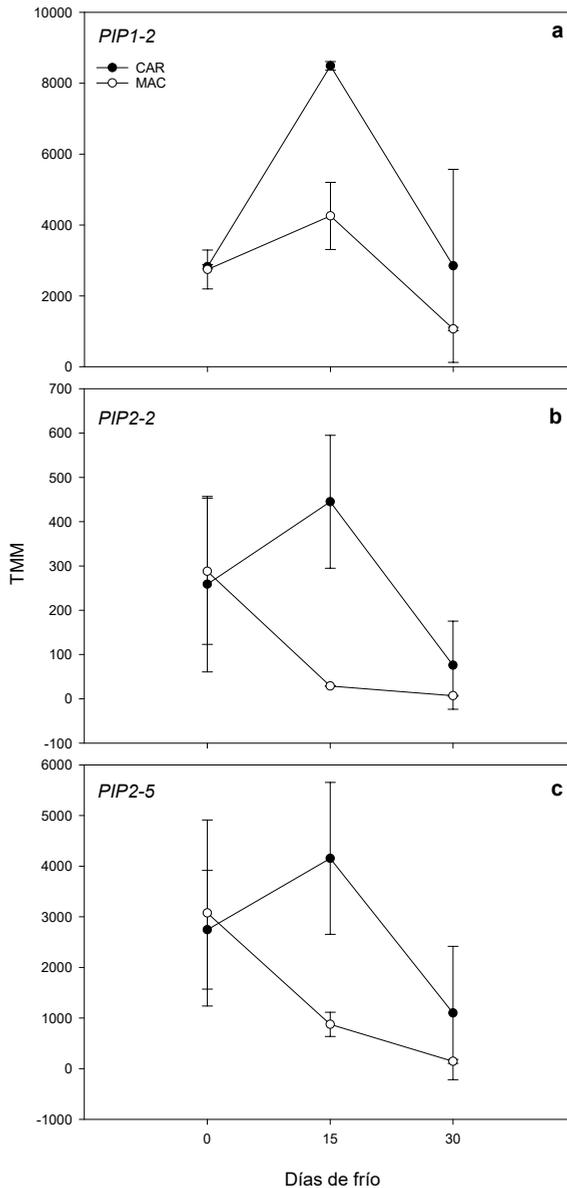


Figura 25. Expresión génica (TMMs) de los genes putativos PIPs sobreexpresados en CAR. Expresión TMM (Representation of trimmed mean of M-values) de las acuaporinas PIP en los patrones injertados citrange Carrizo (CAR) y *C. macrophylla* (MAC) sometidos 1 °C durante 0, 15 y 30 días. a) gen putativo de *PIP1-2* (LOC18044530), b) gene putativo de *PIP2-2* (LOC18039157) y c) gen putativo de *PIP2-5* (LOC18043954). Los valores son la media \pm DS.

4. DISCUSIÓN

4.1 Parámetros fisiológicos

4.1.1 Los datos fisiológicos y transcriptómicos muestran diferencias relevantes entre los genotipos de patrones sensible y tolerante

Nuestro análisis comparativo de los cambios fisiológicos y transcriptómicos que ocurrieron en hojas de la variedad 'Valencia Delta seedless' injertado en el genotipo de patrón sensible *Citrus macrophylla* (MAC) y genotipo tolerante citrange Carrizo (CAR) reveló unas marcadas diferencias entre ellos. Los datos indican una posible correlación entre los cambios en la acumulación de metabolitos, señalización hormonal, expresión génica causada por la baja temperatura, cambios en la fotosíntesis y parámetros hídricos que pueden explicar la resistencia y tolerancia de ambos patrones CAR y MAC.

El análisis funcional de los DEGs mostró que todos los procesos biológicos previamente descritos y la activación de las rutas por frío también funcionan en cítricos. Los procesos biológicos con el menor valor de FDR significativo fueron la "respuesta a frío", y otros términos relacionados con dicha respuesta y rutas metabólicas que incluyeron el "metabolismo de los azúcares", "regulón CBF", "respuesta a luz", "fotosíntesis" y rutas de "regulación hormonal", todas ellas adquieren un papel esencial en la regulación de la tolerancia a frío.

4.1.2 Fotosíntesis, fluorescencia y expresión génica

Como ha mostrado el experimento 3 donde se realizaron los análisis fisiológicos, el proceso de fotosíntesis se inhibió completamente. En ambos patrones la fijación de CO₂, la transpiración, la conductividad estomática, etc., en definitiva, el proceso de fotosíntesis resultó totalmente inhibido como ocurre en los casos de sequía o salinidad extremas. Pero nuestro interés fue más allá, ya que quisimos comprobar qué estaba ocurriendo en los fotosistemas y contrastar con el análisis de expresión nuestros resultados de fluorescencia de la clorofila.

En los resultados del análisis de fluorescencia de la clorofila se cuantificó el Fv/Fm, YII, qP, NPQ y qN donde se concluye que a pesar de que el patrón MAC está más afectado por el estrés por el exceso de irradiación que produce el estrés por frío en los fotosistemas (un menor ratio Fv/Fm), no se está protegiendo ante dicho estrés (un menor YII y mayores NPQ y qN) y esto podría llevar a causar más daño en los fotosistemas pudiendo llegar a ser irreversible.

Dicho esto, en el experimento 4 pudimos ver que las funciones génicas relacionadas con la fotosíntesis resultaban estar diferencialmente sobrerrepresentadas

en ambos patrones por lo que quisimos estudiar mejor cuáles eran los posibles DEGs que podrían estar causando este fenotipo en CAR con una mayor protección de sus fotosistemas. Así pues, entre los DEGs que se seleccionaron se encontraron algunos que podrían ser los causantes de dicho fenotipo. Uno de ellos fue el *PSBS* o *CP22*. A pesar de estar reprimido en ambos patrones con respecto al control, en el genotipo CAR permaneció más expresado diferencialmente que en MAC a tiempo 15. Se trata de una proteína que interviene en el qN, es decir, en la disipación de energía de manera segura en forma de calor (Correa-Galvis *et al.*, 2016). Además, este incremento en la habilidad para una mejor disipación de energía en forma de calor se ha relacionado con una mejora del rendimiento en los cultivos (Zhu *et al.*, 2004; Kromdijk *et al.*, 2016). Así pues, podría ser que en el caso de CAR este gen pudiera contribuir a la pequeña mejora que se observa en el qN.

Otro de los genes candidatos sería *PETE1* y corresponde a la plastocianina 1. La plastocianina actúa como sumidero de iones cobre en las células fotosintéticas (Ravet and Pilon, 2013), ya que la plastocianina es una de las mayores proteínas que unen cobre y que actúan como quelatos llevando a cabo el 50 % de los secuestros de iones cobre en el cloroplasto (Ramshaw *et al.*, 1973). Además, algunos estudios sugieren que la actividad de unión de cobre contribuye a la tolerancia de estrés abiótico en plantas aunque se desconoce aún el mecanismo (Cruz *et al.*, 2001; Pesaresi *et al.*, 2009).

Finalmente, dos genes que actúan al mismo nivel y que también estarían favoreciendo el proceso de fotoinhibición son las proteínas *PSB27* y *PSB28*. Como en el caso anterior, su expresión resultó estar reprimida en ambos patrones con respecto al control, pero permaneció significativamente mayor en plantas CAR a 15 días de tratamiento.

PSB27 en forma de dímero representa un intermediario del ciclo de reparación del FSII que surge previamente de la formación de monómeros después del fotodaño (Grasse *et al.*, 2011; Mabbitt, Wilbanks and Eaton-Rye, 2014). Los resultados del grupo de Nowaczyk *et al.* evidencian que *PSB27* es esencial para el buen mantenimiento del complejo FSII bajo estrés por baja temperatura y juega un papel auxiliar en el ciclo de vida del FSII después de su inactivación por el complejo de oxidación del agua (Grasse *et al.*, 2011). Además, el grupo de Aarts *et al.* han propuesto el gen que codifica para *PSB27* como un marcador QTL asociado a los cambios en el YII frente a la baja temperatura. Para ello, realizan un rastreo poblacional en *Arabidopsis* empleando la técnica de la fluorescencia de la clorofila correlacionando la disminución del YII con el aumento de la expresión en el gen *PSB27* (Prinzenberg *et al.*, 2020).

La función fisiológica en plantas de *PSB28* no está del todo esclarecida, aunque sí se sabe que en cianobacterias se asocia con la unión de la biosíntesis de

clorofilas y el ensamblaje del fotosistema (Mabbitt, Wilbanks and Eaton-Rye, 2014). Además, el grupo de Wada et al. (Sakata et al., 2013), ha sugerido que PSB28 es dispensable a cierto nivel de estrés donde el efecto de eliminar PSB28 comienza a ser aparente cuando la biogénesis del FSII comienza a estar comprometida. En plantas de arroz se sabe que el mutante *psb28* tiene un fenotipo verde pálido (Dobáková et al., 2009).

En términos generales, nos hace pensar que el patrón CAR tendría los fotosistemas más protegidos frente al exceso de irradiación causado por la parada de la fotosíntesis por diferentes estrategias. Además, de las proteínas que intervienen en el FSII y que hemos visto en el presente apartado, se ha visto anteriormente otros fotoprotectores que podrían estar actuando. Esta fotoprotección sería también por la síntesis de antocianos. En el experimento 4 se detectaron varios DEGs relacionados con la señalización y la activación de la ruta de síntesis de antocianos y que como se ha comentado anteriormente actuarían protegiendo la planta de la fotooxidación por detoxificación de ROS (Li, Castagnoli and Cheng, 2008; Ou et al., 2013; Liu et al., 2018). Algo similar ocurre con el azúcar soluble rafinosa que se encuentra significativamente aumentada en el patrón tolerante CAR y que se ha demostrado que estabiliza el FSII (Knaupp et al., 2011).

4.1.3 Potencial hídrico y PIPs

Como se muestra en las Tablas 4a-d del experimento 3 ambos patrones detuvieron su crecimiento vegetativo completamente con el fin de poder resistir mejor frente al estrés. El balance hídrico resultó en un principio algo contradictorio ya que según ocurre en otros cultivos, se esperaba una disminución en el potencial hídrico y por ende del RWC% y el cierre estomático, es decir, una respuesta fisiológica combinada de sequía y frío (Allen and Ort, 2001; Vernieri et al., 2001). Pero según los resultados, tanto las plantas CAR como MAC presentaron un aumento en el potencial hídrico siendo más negativo en MAC. El potencial osmótico tuvo una leve disminución siendo más negativo a los 30 días de frío en ambos genotipos y el RWC% permaneció como las plantas control. Como consecuencia la fotosíntesis se detuvo. Según nuestros resultados y como también ocurre en otros cultivos, hay parámetros que se pueden interpretar como si la planta estuviera sufriendo una sequía muy severa como son la fotosíntesis, conductividad estomática, transpiración y CO_2 interno (Vu and Yelenosky, 1993; Machado et al., 2013). Sin embargo, otros parámetros como el potencial hídrico, el RWC% e incluso el potencial osmótico se encuentran en valores de buen riego y crecimiento activo de la planta. En cítricos existen varios estudios en los que sucede algo similar, donde el potencial hídrico a bajas temperaturas y el RWC% no cambiaron en plantas de *C.sinensis* injertadas en citrange Carrizo (Vu and Yelenosky, 1987; Barkataky et al., 2013).

Al igual que ocurre en *Vitis vinifera*, con el tratamiento a temperaturas de 4, 0 y -4 °C el RWC% se vio poco afectado (Beheshti Rooy *et al.*, 2017). Lo que puede estar ocurriendo con respecto a las relaciones hídricas es que como se ha indicado en la introducción, las plantas son un sistema abierto el cual por las raíces incorporan el agua a la planta, lo transportan a los diferentes órganos y tejidos y, por las 3 rutas explicadas, la emplean para realizar sus funciones fisiológicas. En este caso puede que suceda que al detenerse la fotosíntesis y tenga lugar el cierre estomático, la planta detiene completamente el consumo de agua y, por tanto, no se ve en la necesidad de tomar agua del suelo. En condiciones de bajas temperaturas, el metabolismo de la planta, el crecimiento vegetativo (Figura 4a-d del experimento 3) y todas las reacciones celulares se detienen disminuyendo así totalmente el consumo hídrico. Además, se sabe que el 99.5% del agua que contiene la planta se pierde durante el proceso de transpiración por lo que, si esta se encuentra inhibida, además del proceso de fotosíntesis, la pérdida de agua resulta muy pequeña. De hecho, para fijar 1kg de carbono durante la fotosíntesis, las plantas transportan varios cientos de kilos de agua (Tyerman, Niemietz and Bramley, 2002).

Como se ha mencionado en la introducción, el transporte apoplástico de agua es de vital importancia para el mantenimiento de la turgencia celular. Así pues, este transporte tiene lugar principalmente gracias a las MIPs concretamente a las del tipo PIP. Como muestra la Tabla 11 del experimento 4, en general, la expresión de las PIPs disminuyó más en plantas de MAC que en CAR. En la Tabla 11 del experimento 4 (DEGs) se muestra cómo en MAC se reprimieron significativamente ocho de las nueve PIPs que encontramos anotadas en *Citrus clementina*. En CAR también se reprimieron, pero no de una manera tan evidente (Figura 25 y Tabla 11 del experimento 4). Incluso en CAR, tres acuaporinas se sobreexpresaron (*PIP1-2*, *PIP2-2* y *PIP2-5*) (Figura 11 del experimento 4). Las PIPs se han relacionado con la tolerancia a estreses abióticos como la sal, la sequía y las bajas temperaturas (Peng *et al.*, 2008; Li, 2018; Rahman *et al.*, 2020). A pesar de que se desconoce su mecanismo molecular, se sabe que las acuaporinas realizan un importante papel a nivel del transporte de agua celular. Como se ha mencionado anteriormente, el sistema de membranas celulares es el primer orgánulo el cual resulta afectado por la disminución de temperaturas en las plantas (Levitt, 1980; Uemura and Steponkus, 2003). Está bien establecido que la congelación de los tejidos provoca daños en la membrana dando lugar a la deshidratación (Steponkus, 1984; Uemura and Steponkus, 1994). Cuando la temperatura disminuye de 0 °C se inicia la formación de hielo en los espacios intercelulares debido en parte a que el espacio extracelular contiene un alto punto de congelación causado por una menor concentración de solutos que en el fluido intracelular (Jan, ul-Hussain

and Andrabi, 2009). Así pues, como el potencial químico del hielo es menor que el del agua líquida a la temperatura dada, la formación de hielo extracelular resulta en una caída del potencial hídrico fuera de la célula, por lo tanto, el movimiento del agua no congelada de dentro de la célula sale hacia el espacio intercelular. A 10 °C más del 90% del agua osmóticamente activa se mueve hacia fuera de las células y el potencial osmótico del fluido remanente que no está congelado suele alcanzar 5 osmolar (Jan, ul-Hussain and Andrabi, 2009). Así pues, y en términos generales, las plantas que sufren estrés por bajas temperaturas sufren también un estrés por deshidratación celular a pesar de la disponibilidad de agua en el suelo. En este sentido, se piensa que ciertas PIPs que se sobreexpresan a bajas temperaturas puedan estar actuando a nivel celular aumentando la permeabilidad de la membrana con el fin de reducir la deshidratación intracelular y el estrés mecánico (Tanghe *et al.*, 2002; Soveral *et al.*, 2006).

Al igual que ocurre en cítricos se encuentran muchos ejemplos donde la represión de las PIPs y sólo la sobreexpresión de otras PIPs dio lugar a una mayor tolerancia a bajas temperaturas. En plantas de banana donde se sobreexpresó *MusaPIP1-2* y *MusaPIP2-1* dieron lugar a un aumento en la tolerancia a sequía y frío (Sreedharan, Shekhawat and Ganapathi, 2013). En plantas de tabaco que sobreexpresaron *TaAQP7* (PIP2) igualmente mostraron un aumento de tolerancia a frío y sequía (C. Huang *et al.*, 2014). En *A. thaliana* *AtPIP1-4* y *AtPIP2-5* actúan conjuntamente para regular la respuesta y la aclimatación a bajas temperaturas (Rahman *et al.*, 2020).

Además de esto, en las plantas de MAC (Tabla 11 del experiment 4) donde se muestran los DEGs a 15 días con respecto a las plantas de CAR, se vio una disminución concretamente de los genes que codifican para las PIP2. Las PIP1 y las PIP2 tienen ciertas diferencias funcionales. Además de diferenciarse en que las PIP2 tienen un motivo diacídico en posición N-terminal, se ha visto que para que las acuaporinas PIP1 sean totalmente funcionales deben heteromerizarse con las acuaporinas PIP2. Este hecho lo demuestran estudios de análisis de interacción por FRET (Zelazny *et al.*, 2007) realizados con oocitos donde las proteínas de maíz *ZmPIP1-2* y *ZmPIP2-1* se ha visto que co-purifican juntas (Fetter *et al.*, 2004) y también en estudios realizados en *Beta vulgaris* donde se evidencia que PIP1 y PIP2 forman heterotetrámeros (Jozefkowicz *et al.*, 2013). Incluso existen estudios basados en modelos matemáticos a base de relaciones estequiométricas donde relacionan los ratio de los RNAs en fresa para *FaPIP1-1* y *FaPIP2-1* con un mutante *FaPIP2-1* (Yanef *et al.*, 2014). Así pues, esta co-expresión hace pensar que en plantas CAR se podrían estar expresando alguna de las combinaciones entre los PIP1 y los PIP2 (*PIP1-2*, *PIP2-1* y *PIP2-5*). Además, el hecho de que en MAC sólo esté sobreexpresada el *PIP1-2*, hace pensar que pueda tener un efecto muy

pequeño dado que PIP1 por sí sola tendría una actividad muy baja en la tolerancia a estrés por baja temperatura y por tanto el paso de agua a nivel apoplástico sería menor. Por otro lado, en plantas MAC la marcada disminución en las PIPs, además de la disminución del paso de agua dentro de la célula, puede que esté causando la pequeña disminución en el potencial hídrico con respecto a CAR.

Con todo esto, se considera que las acuaporinas tienen un papel importante en la aclimatación y la tolerancia al estrés por bajas temperaturas, que resultan ser dos fenómenos independientes. La tolerancia al estrés por frío involucra la prevención del daño por congelación de la membrana plasmática mientras que el proceso de aclimatación, que incrementa la tolerancia de las plantas al frío, minimiza que ocurran lesiones en la membrana plasmática. Así pues, todo nos sigue llevando a la idea de que el patrón MAC tarda más en llegar al proceso de aclimatación por lo que lo hace más vulnerable al estrés por bajas temperaturas. Aun así, más experimentos relacionados con las PIPs deberían realizarse para poder concluir estos resultados.

4.2 Datos transcriptómicos relacionados con la respuesta

4.2.1 Activación de la respuesta a frío a largo plazo

Muchos de los genes clave que intervienen en los diferentes mecanismos de respuesta a frío se detectaron diferencialmente expresados en las muestras a 15 días de frío. Además, se encontraron diferencias relevantes entre ambos patrones (Figura 26). En el patrón CAR, 1,2691 DEGs se encontraron en la comparación CAR0-CAR15, pero sólo 409 en la combinación CAR15-CAR30, y no se obtuvieron genes relevantes a la respuesta frente a frío. En la comparación MAC0-MAC15 se obtuvieron 14,199 DEGs, mientras que la combinación MAC15-MAC30 arrojó 4,391 y 10 veces más DEGs que los que se obtuvieron en el patrón CAR, que incluyeron algunos de los genes clave que intervienen en la respuesta a frío como son *SOC1*, *APP3* y *7*, *LHY*, *ZAT11*, *ABA1* y *ABA2*, *ABCG40*, *NRT4*, *PP2C24* y *PP2C75*, *TIFY 4B* o *MYC2*. Ninguno de estos genes de regulación mostró cambios de expresión de CAR15-CAR30. Estos resultados sugieren que, a 15 días de frío, las plantas injertadas con el patrón CAR estaban ya totalmente adaptadas a la exposición a bajas temperaturas, mientras que el patrón MAC continuó empleando energía para mantener el ajuste de la expresión de miles de genes con el fin de enfrentarse al estrés. Resultados similares se dieron en *Prunus persica*, donde las mayores diferencias en el transcriptoma se observaron en melocotoneros sensibles dañados y que tuvieron una gran diferencia con las variedades no sensibles en los patrones de expresión (Nilo-Poyanco *et al.*, 2019). En patata también se encontró

un perfil de expresión diferente entre cultivares cuando se comparó la dinámica de la respuesta a frío en el transcriptoma, sobre todo en los genes relacionados con el dulzor (X. Liu *et al.*, 2021).

Así pues, muchos de los genes clave en la regulación de la respuesta a frío en plantas se observaron en nuestros resultados de RNA-seq. Como se esperaba, genes que intervienen en la señalización de MAP kinasas, luz, fotosíntesis, CBF, y señalización de hormonas se obtuvieron diferencialmente expresados del día 0 de tratamiento de frío a día 15, lo que indica que las plantas respondieron al estrés en cuestión de poco tiempo. Estas rutas están siendo analizadas en varias especies, incluyendo *P. trifoliata* (Wang, Zhang and Liu, 2015), y nuestros resultados están en consonancia con estos estudios. Nosotros centramos nuestra discusión en la diferencia entre patrones CAR y MAC para dar explicación sobre el origen de la sensibilidad y la tolerancia en las especies de cítricos.

Las comparaciones intraespecies CAR0-CAR15 y MAC0-MAC15 evidencian que la mayoría de los genes que actúan promoviendo la adaptación al frío resultaron estar sobreexpresados, mientras que los que actúan como represores resultaron reprimidos en las muestras de 15 días vs. las de 0 días. Por otro lado, el análisis de expresión interespecie, MAC15-CAR15, mostró un número de genes relevante que actuaron promoviendo una mayor expresión en CAR15 vs. MAC15, y por el contrario los genes que reprimieron la adaptación a frío tuvieron una menor expresión. El balance de expresión favoreció a la aclimatación al frío en plantas tolerantes de CAR, mientras que disminuyó en los sensibles de MAC.

Hay muchas evidencias del crítico papel de los factores de transcripción CBF en la aclimatación a frío (Zhao *et al.*, 2016), por lo que, esperábamos encontrar los tres ortólogos de los genes CBF en cítricos, *DREB1B*, *DREB1D* y *DREB2A* que estuvieran sobreexpresados en todas las muestras a 15 días de frío. Sorprendentemente, el FC en los niveles de transcrito fueron mucho mayores en CAR15 que en muestras de MAC15. Se sabe que la sobreexpresión de los genes CBF incrementa el endurecimiento al frío en manzano (Wisniewski *et al.*, 2011), cebada (Jeknić *et al.*, 2014), patata (Pino *et al.*, 2008) y álamo (Benedict *et al.*, 2006). Estos resultados pueden coincidir con los nuestros ya que la sobreexpresión de los genes en CAR vs. MAC correlacionó con el endurecimiento y sensibilidad de cada patrón.

El factor de transcripción ICE1 regula la expresión de los genes CBF bajo condiciones de estrés por frío. Además se expresa constitutivamente en *Arabidopsis* y su sobreexpresión en plantas control incrementa la expresión del regulón CBF dando lugar a la mejora de la tolerancia a frío, como se ha explicado anteriormente. El gen que codifica para *ICE1* en cítricos se identificó como LOC18051975 y fue idéntico a *PtrbHLH* proveniente de *P. trifoliata* (Huang *et al.*, 2015). El patrón de expresión de *PtrbHLH* bajo condiciones de frío alcanzó un

máximo a las 48 h, con una caída a las 72 h. Sin embargo, no explicaría la reducción de expresión que se encuentra en muestras de 15 días vs. el control, que no se esperaban para este gen. Además, previas investigaciones en el capítulo 1 de la presente tesis se han llevado a cabo con dos posibles ortólogos del gen *ICE1* y ninguna expresión génica coincidió con lo esperado (datos no mostrados en la presente tesis). Existen varios motivos por los que puede que el patrón de expresión de *ICE1* no corresponda con lo esperado. Uno de los motivos es que su ventana de expresión sea muy corta y a tiempos muy tempranos, como se ha comentado anteriormente (Huang *et al.*, 2015). Y otro de los motivos es que *ICE1* está regulado a nivel de proteína y sus niveles de expresión están modulados por ubiquitinación, donde la lleva a la degradación, mientras que la modificación por sumoilación la estabiliza y la previene de la ubiquitinación (Xin and Browse, 1998; Dong *et al.*, 2006) (como se ha explicado en el capítulo 1). Es por lo que resultó interesante encontrar al gen *SIZ1* de cítricos, que codifica para la ligasa de grupos sumo E3 SUMO, que estaba sobreexpresado a los 15 días y 30 días y una vez más, su expresión fue mayor en las plantas de CAR15 que en las de MAC15. Los altos niveles de *SIZ1* podrían promover la estabilización de la proteína ICE1 que podría estar llevando a la sobreexpresión de los genes CBF en las plantas de CAR.

Los factores de expresión CAMTA (por sus siglas en inglés de calmodulin-binding transcription activator) son reguladores positivos de los CBFs (como se ha explicado anteriormente), donde CAMTA2 y CAMTA3, se sabe que se unen directamente al promotor de *CBF2* (Doherty *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2015). Una vez más, los genes de cítricos LOC 18034255 y LOC18031678, respectivamente, que codificaron para CAMTA2 y CAMTA3 fueron sobreexpresados en las muestras a 15 días, aunque, hubo diferencias de CAMTA 3 entre los patrones a CAR15 y MAC15, y el nivel de expresión para CAMTA2 fue mayor en MAC15. Es por ello por lo que estos factores no estuvieron relacionados con la diferencia de sensibilidad entre los patrones en estrés a largo plazo. Un motivo es porque, como se ha comentado previamente en la introducción y se ha visto en el capítulo 1, los factores de transcripción CAMTA están considerados como factores de respuesta por choque térmico a tiempos cortos de exposición (Kidokoro *et al.*, 2017).

La inducción de la expresión de los genes CBF puede verse afectada por la calidad de la luz, el ciclo circadiano y el fotoperiodo. Se sabe que el gen *LHY* (por sus siglas Long Elongated Hypocotyl) directamente se une a los promotores de los genes CBF y los regulan positivamente (Dong, Farré and Thomashow, 2011). En nuestro experimento, los niveles de expresión del gen putativo *LHY* (LOC18047565) fue siempre mucho mayor en las muestras de CAR vs. las de MAC y esto podría llevar a la sobreexpresión de los genes CBF en el genotipo CAR mejorando así su respuesta y su ventaja frente al genotipo MAC.

niveles de *PHYA* fueron significativamente mayores en el genotipo tolerante CAR, lo que podría favorecer el proceso de aclimatación. Por otro lado, la expresión de *PHYE* fue mayor en las muestras de MAC, lo cual, podría causar una fuerte represión en la aclimatación y contribuir en el fenotipo sensible de las plantas MAC.

Las cascadas de señalización de 3 tipos de kinasas MEKK, MKK y MPK (por sus siglas en inglés mitogen-activated protein kinase) juegan también un papel relevante en la adaptación al frío y actúan secuencialmente (Liu *et al.*, 2019). Las kinasas *MKK4/5-MPK3/6* promueven la degradación de ICE1 y la represión de los genes CBF. En nuestro estudio, el gen que codifica para *MKK5* (LOC112100736) estuvo reprimido y los niveles de las muestras MAC fueron al menos 2 veces superiores a los encontrados en los de CAR. Por ello, en plantas MAC, una mayor actividad de *MKK5* podría contribuir a la disminución de los niveles de ICE1 y con ello la represión de los CBFs, que estaría de nuevo de acuerdo con la sensibilidad del genotipo MAC.

La expresión del gen ortólogo a *HY5* (LOC18054790) también permaneció significativamente alta en los patrones CAR15. Este factor de transcripción bZIP es un factor de transcripción clave en la respuesta a frío ya que la regula positivamente dando lugar al proceso de aclimatación completo. *HY5* media algunas respuestas de la planta como son la biosíntesis de antocianos y las respuestas hormonales de ABA, GAs, CKs y auxinas (Lau and Deng, 2010; Catalá, Medina and Salinas, 2011). El papel de *HY5* en la aclimatación a bajas temperaturas es crucial, como muestra *A. thaliana*, que se ha visto que llega a controlar cerca del 10% de los genes inducibles por frío (Lee *et al.*, 2007). Nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de *HY5* podría aumentar el proceso de adaptación a frío en plantas de CAR, mientras que en MAC podría hacer más costosa dicha respuesta de adaptación.

Aguas abajo del factor de transcripción *HY5*, se encuentran los factores de transcripción *MYB11*, *MYB23* y *MYB111* regulados por luz y frío, y que inducen la síntesis de flavonoides incrementando así la aclimatación por bajas temperaturas (Stracke *et al.*, 2010; Pandey *et al.*, 2014; Bhatia *et al.*, 2018). Identificamos los ortólogos en cítricos de *MYB111* (LOC18031574), que fue sobreexpresado en muestras de CAR y que promovió la síntesis de antocianos y flavonoides. También identificamos algunos loci que intervienen en la biosíntesis de flavonoides y antocianos como son *UFGT1* (LOC18032618), *UFGT7* (LOC18047244), *CHS1* (LOC18042808), *CHS2* (LOC18051925), *CYP75B1* (LOC18050323), *FLS1* (LOC18037475) y *CHI* (LOC18044429) con un aumento significativo de la expresión en las muestras CAR15 y CAR30 vs. MAC15 y MAC30.

Los antocianos son compuestos fotoprotectores que protegen el aparato fotosintético por absorción de la luz UV visible y detoxifican de radicales libres

frente a diferentes estreses abióticos (Guo, Han and Wang, 2009; Liu *et al.*, 2018). Por ejemplo, como ocurre en la pera roja (cv. Anjou) y en hojas de pimiento moradas (cv. Huai Zi) ricas en antocianos y que muestran la estabilización del FSII y la capacidad de una mejor tolerancia a la fotooxidación comparado con los genotipos que no acumulan antocianos en sus tejidos (Li, Castagnoli and Cheng, 2008; Ou *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2018). Nuestros resultados indican que la biosíntesis de antocianos y flavonoides en plantas de CAR podrían reducir el daño por ROS, y esto podría ser otra posible causa de sensibilidad en plantas de MAC.

4.2.2 La acumulación de azúcares solubles fue mayor en carrizo y estos cambios correlacionan con la expresión génica

Muchos trabajos han demostrado la función que tienen los azúcares como sustancia osmótica, como estabilizadores de membrana e incluso podrían estar actuando como antioxidantes en respuestas a bajas temperaturas (Bolouri-Moghaddam *et al.*, 2010), como se ha explicado en la introducción. Los niveles de tolerancia a frío y la acumulación de los azúcares solubles como es la sacarosa, glucosa y fructosa funcionan en paralelo a los diferentes procesos de aclimatación al frío. Este escenario indica que la acumulación de azúcares es un componente fundamental en la tolerancia a estrés por bajas temperaturas (Badawi *et al.*, 2008).

Nuestros experimentos muestran un claro incremento en la concentración de azúcares solubles en las muestras de CAR que no fue tan evidente en el patrón MAC. La concentración de rafinosa incrementó 336 veces en las plantas de CAR y 299 veces en las plantas de MAC, que fue el mayor incremento detectado de entre todos los metabolitos primarios analizados. Se ha visto que los azúcares de la familia de la rafinosa se acumulan en presencia de diferentes estreses abióticos como la sequía y el frío (ElSayed, Rafudeen and Gollmack, 2014) y que los niveles de galactinol y rafinosa correlacionan con la tolerancia a salinidad (Shi *et al.*, 2003). En arroz también se ha visto que en presencia de frío a largo plazo, las concentraciones de rafinosa y galactinol incrementaron en gran medida (Saito and Yoshida, 2011).

El azúcar rafinosa se ha encontrado en cloroplasto (Schneider and Keller, 2009; Foyer and Shigeoka, 2011) y parece que juega un importante papel en la estabilización del FSII en *A. thaliana* bajo condiciones de estrés por congelación (Knaupp *et al.*, 2011). Se ha visto que la síntesis de rafinosa por sí sola no resulta suficiente para inducir la tolerancia o aclimatación a estrés por bajas temperaturas en *A. thaliana*, pero las plantas están más protegidas del daño oxidativo cuando la concentración de rafinosa aumenta (Nishizawa, Yabuta and Shigeoka, 2008). Este gran incremento en la concentración de rafinosa está de acuerdo con la sobreexpresión de las enzimas galactitol sintetasa y rafinosa sintetasa, en la medida

que incrementa la expresión génica y que además esta correlaciona con la alta concentración de rafinosa. Resultados similares se detectaron en arroz y *Arabidopsis*, donde aumentaron los niveles de transcritos de los genes relacionados con el galactinol y la síntesis de rafinosa previo a la acumulación de rafinosa (Foyer and Shigeoka, 2011; Saito and Yoshida, 2011). Por lo tanto, la gran acumulación de azúcares solubles, especialmente la rafinosa y fructosa podría incrementar la concentración hasta el proceso de adaptación en el patrón tolerante CAR mientras que en el patrón sensible MAC no aumentó tanto la concentración y podría verse más expuesto al daño.

La acumulación de azúcares solubles está normalmente acompañada de la degradación de almidón en muchas especies herbáceas como son la cebada o plantas leñosas como el lichi y el álamo (Thalman and Santelia, 2017). Sin embargo, en nuestro estudio, la concentración de almidón no disminuyó en las plantas de MAC e incluso aumentó algo en el patrón CAR, que se correlaciona con la represión de la expresión del gen β -amilasa (LOC18048130) que se encuentra en todas las muestras. Estos resultados contrastan con los resultados obtenidos en *P. trifoliata* donde se demostró que bajo estrés por frío la expresión del gen *PtrBAM3* fue mayor y dio lugar a la acumulación de maltosa y azúcares solubles (Peng *et al.*, 2014). Sin embargo, algunos estudios también han observado el aumento de almidón bajo estrés por frío. En tomate (*Solanum lycopersicum*), tanto en genotipos sensibles domesticados como en especies provenientes de altas latitudes y por ello más tolerantes al frío tiene lugar la acumulación de almidón de 4 a 5 veces (Venema, Posthumus and van Hasselt, 1999). Además, también en tomate, los niveles de azúcares y fotosíntesis no cambiaron en especies tolerantes, pero, si que incrementaron o disminuyeron en los susceptibles (Venema, Eekhof and van Hasselt, 2000). Del mismo modo, en estudios con *A. thaliana* en presencia de frío, no sólo aumentó el contenido de almidón, sino que, también aumentó la ruta de degradación dando lugar a la maltosa (Kaplan and Guy, 2004). Las razones de estas discordancias son desconocidas y la respuesta puede depender de las exactas condiciones, de los haplotipos empleados, etc. (Thalman and Santelia, 2017).

4.2.3 Regulación hormonal

Las hormonas funcionan como gobernadores de los eventos señalizadores en las respuestas de estrés por frío, desplegando efectos sinérgicos o antagónicos en la biosíntesis y señalización de otras hormonas que crean una red compleja de interacciones hormonales (Eremina, Rozhon and Poppenberger, 2016).

Un estudio transcriptómico en *Arabidopsis* ha mostrado que el frío y la luz puede inducir la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de ABA

para preparar las plantas para la aclimatación a frío (Eremina, Rozhon and Poppenberger, 2016). En tomate se ha propuesto un modelo en el que frente a bajas temperaturas, el nivel de *PHYA* aumenta y esto resulta en una sobreexpresión de *HY5* (Soitamo *et al.*, 2008). *HY5* promueve la biosíntesis de la hormona ABA y el catabolismo de GAs para la generación de un ratio bajo de GA/ABA capaz de parar el crecimiento y promover la tolerancia a frío (Wang *et al.*, 2019). La sobreexpresión del gen de cítricos que codifica para la enzima que cataboliza la GA₁, *GA2OX1* (LOC18050091) y *GA2OX2* (LOC18249951), sugiere una reducción de la concentración de GA₁ paralela a la detención del crecimiento de la planta y la adaptación al frío. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre las muestras de CAR y MAC.

El JA es una oxilipina cuyos niveles aumentan bajo estrés por frío en diferentes especies vegetales como son arroz y *Arabidopsis* y esto correlaciona con la alta expresión de genes de JAs (Baron, Schroeder and Stasolla, 2012; Du, Liu and Xiong, 2013). La sobreexpresión de los genes que intervienen en la señalización de JAs, como son *Cullin1 RING1*, la familia *SKP1.1* y *MYC2*, junto con la represión de *AFPH2/NINJA* y *TIFY 4B*, represores de la señalización de JA, sugieren un papel relevante del JA en la adaptación a frío en nuestro experimento. Sin embargo, los datos de expresión no se correlacionaron con los resultados de cuantificación en hojas y raíces, ya que la cantidad de JA observada en las muestras de CAR15 y MAC15 fue baja (Figuras 18 y 23). Más investigaciones deberían realizarse con el fin de encontrar la razón para la desacoplación de la expresión y la acumulación de JAs que está ocurriendo.

El ABA es una hormona que actúa como regulador central en la señalización de estrés por frío con un papel emergente en la ruta dependiente de CBF. En algunas especies, los niveles altos de ABA que correlacionaron con el incremento en la biosíntesis de ABA en presencia de frío, desplegaron así una respuesta alterada a la resistencia frente a frío en mutantes para genes relacionados con la síntesis de ABA (Eremina, Rozhon and Poppenberger, 2016). La hormona ABA actúa como señalizador a larga distancia que media la comunicación de raíz a hoja bajo condiciones de estrés (Gomez-Cadenas *et al.*, 1996; Saito and Yoshida, 2011). En nuestro estudio, algunos de los genes que intervienen en la ruta de síntesis y transporte de ABA, que codifican para sus receptores, se expresaron diferencialmente. Los genes que intervienen en la biosíntesis de ABA se reprimieron en MAC15 y CAR15 comparado con MAC0 y CAR. Trabajos previos indican que el estrés por frío en *Arabidopsis* modifica la biosíntesis de ABA y su catabolismo, y esto afecta su transporte y homeostasis (Baron, Schroeder and Stasolla, 2012). La represión de los genes que intervienen en la biosíntesis de ABA en muestras de MAC15 se correlaciona con la disminución en la concentración de ABA en hojas de

MAC. Sin embargo, la concentración de ABA permaneció constante en muestras de CAR15 a pesar de la represión en los genes de biosíntesis de ABA. Una posible explicación podría ser por el aumento en la concentración de ABA en las raíces, donde fue significativamente mayor en los patrones CAR a 15 y 30 días de frío que en los patrones MAC, que no hubo incremento. Los resultados de la cuantificación de ABA están de acuerdo con los patrones de expresión de los transcritos: se detectó además la sobreexpresión en CAR15 de algunos transportadores de ABA en cítricos de las familias NRT1/PR y de la familia ABCG. Además, la expresión de los genes que codificaron para los receptores de ABA de la familia PYL, y también genes de la ruta de señalización como SRK2 E kinasa o la fosfatasa PP2C, claramente más expresados en CAR15 que en MAC15 con altos niveles de expresión normalizada (TMMs). Concretamente tuvo lugar la expresión diferencial de dos receptores, PYL8 y PYL9. Se ha visto en arroz que la sobreexpresión del receptor PYL9 aumenta la tolerancia a estrés por frío (Tian *et al.*, 2015), además de mostrar tolerancia a diferentes estreses abióticos en especies como manzano y tabaco (Huang, 2015; Yang *et al.*, 2022). PYL8 también se relaciona con la señalización de estrés por sequía y salinidad en diferentes cultivos (Lim Chae Woo Baek Woonhee, 2013; H. Y. Lee *et al.*, 2015; Du *et al.*, 2021; Garcia-Maquilon *et al.*, 2021), además se sabe que PYL8 juega un papel no redundante en la señalización del ABA en la raíz y que el aumento de la concentración de ABA aumenta la estabilización y acumulación del receptor PYL8 (Garcia-Maquilon *et al.*, 2021). Estos datos sugieren que la gran cantidad de concentración de ABA producida en las raíces podría estar siendo transportada a la parte aérea de la planta por los transportadores diferencialmente expresados (como ABCG40 y ABCG22) y que ello consiga que la concentración permanezca constante y promueva la señalización de la respuesta a ABA en las plantas de CAR durante los 30 días de tratamiento. Esto no estaría pasando en plantas de *Macrophylla* porque no se observó un incremento en la concentración de ABA. Así pues, la falta de señalización por parte del ABA podría llevar al patrón MAC a mostrar un fenotipo sensible.

Estos datos sugieren que la diferente sensibilidad a bajas temperaturas mostrada por la variedad de naranjo dulce sea transferida por el patrón con el que ha sido injertado. La influencia en la biología de los patrones a diferentes variedades en ciertos aspectos está bien establecida. Los aspectos moleculares de la señalización de raíz a hoja y/o hoja a raíz están comenzando a conocerse, y están mostrando cómo el injerto puede desencadenar una diferente respuesta entre variedad y patrón (Kumari *et al.*, 2015; Rasool *et al.*, 2020). El injerto es una técnica que está extendida y que permite mejorar los rendimientos, calidad y resiliencia frente a estreses abióticos y bióticos (Warschefsky *et al.*, 2016). El uso de los patrones tolerantes a diferentes estreses abióticos, como son sequía, salinidad,

aumento o disminución de temperatura, etc., se está volviendo indispensable en esta era del cambio climático (Nimbolkar, Shiva and Rai, 2016; Vives-Peris *et al.*, 2020). En otros cultivos como berenjena, tomate y pepino, los patrones tolerantes también están mostrando que son de gran utilidad para la mejora de estrés frente a bajas temperaturas (Gao *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Suchoff *et al.*, 2018).

En cítricos, el patrón citrange Carrizo tetrahaploide aumenta de manera natural la tolerancia a estrés por bajas temperaturas de la clementina común, *C. clementina*, y parece que esta habilidad del patrón Carrizo para promover la tolerancia a baja temperatura no depende de la especie con la que se injerta como se muestra en nuestros experimentos con naranjo dulce *C. sinensis* (Oustric *et al.*, 2017).

En otro estudio, se evaluó la expresión de genes de shock por frío y genes de aclimatación a frío por RT-PCR en plantas injertadas con la mandarina Satsuma (*Citrus unshiu* Mack. (Marc.)). *P. trifoliata*, uno de los parentales de citrange Carrizo, fue empleado como patrón. El patrón de Poncirus mostró un cambio en la expresión génica en la variedad *C. unshiu* y un mayor cambio de expresión durante el estrés por frío frente a otras especies, esto estaría de acuerdo con los resultados que hemos obtenido en nuestro análisis del transcriptoma completo (Huang, Si and Dane, 2011).

4.2.4 Acumulación de prolina

La acumulación de prolina libre como respuesta de la planta frente a estreses abióticos está siendo repetidamente observada en otros estudios, como se ha explicado en la introducción y en el capítulo 1, y esta síntesis de prolina tiene una relación directa con la tolerancia a estrés de las plantas (Singh, Sharma and Sengar, 2017). En ambos experimentos vemos de nuevo el aumento del aminoácido prolina como en casos anteriores, aunque de manera algo discreta. Ocurrió un aumento de la concentración de hasta 2 veces en ambos experimentos 3 y 4 en las plantas de CAR tolerantes. Igualmente, los genes que intervienen en la síntesis de prolina, como son *P5CS1* y *P5CS2*, *P5CR* y *dOAT* en ambos experimentos se realizó la cuantificación génica además del RNA-seq. En ambos experimentos 3 y 4 el aumento de la expresión de los genes de prolina fue mayor en CAR que en MAC durante los tiempos más largos. Además, los resultados de RNA-seq estuvieron en consonancia con los ensayos de expresión por RT-PCR ya que ambos genes que codificaron para *P5CS*, *P5CR* y *dOAT* se obtuvieron como DEGs en CAR15 vs. MAC15. Respecto a los resultados de los genes de degradación sucedió algo similar, también aumentaron en ambos experimentos 3 y 4 y en el capítulo 1 en frío a corto plazo, además, en el RNA-seq se obtuvieron como DEGs en el experimento interespecie. Además, no es sorprendente que, a pesar de la inducción de los genes de síntesis, sobre todo en el genotipo CAR, la concentración de

prolina sólo se incrementa entre 2 y 3 veces. Una de las razones es por la gran inducción de los dos genes de degradación. En estrés por sequía, la activación del gen *PDH* ocurre durante la rehidratación y en presencia de prolina (Hayat *et al.*, 2012). Al igual que el gen *PDH*, el gen *P5CDH* también se activa por una alta concentración de prolina en el medio en las hojas (Hayat *et al.*, 2012).

La evaluación de los niveles de prolina durante la aclimatación a bajas temperaturas de algunas especies de cítricos muestra unos niveles de acumulación de entre 3 y 6 veces mayor en plantas que estuvieron aclimatadas que en plantas que no lo estuvieron. Además, existe una correlación entre la supervivencia a estrés por frío de algunas plantas y el aumento de la concentración de prolina y que les permite tolerar mejor el daño por congelación (Kushad and Yelenosky, 1987b). Estudios más recientes de tolerancia a bajas temperaturas en garbanzo y *Pinus halepensis* comparando genotipos tolerantes y resistentes mostraron que la prolina incrementa en hojas expuestas al frío en ambas especies durante el tratamiento (Saghfi and Eivazi, 2014; Taïbi *et al.*, 2018).

Por ello, se evidenció una acumulación del contenido total de azúcares solubles y prolina en plantas de CAR, donde también pudo contribuir a protegerlas frente al daño por frío.

5. CONCLUSIONES

1. La expresión de los genes *CP22*, *PSB27* y *PSB28* podrían ser los responsables de la mayor protección de los fotosistemas del patrón CAR frente al exceso de irradiación causado por la parada de la fotosíntesis. Lo que le podría conferir una mayor recuperación de la actividad fotosintética del FSII.
2. Las acuaporinas resultaron tener una pequeña contribución en las relaciones hídricas del patrón tolerante CAR promoviendo un mayor paso de agua a nivel apoplástico repercutiendo en el potencial hídrico y en una menor deshidratación.
3. La inducción de los genes de respuesta a baja temperatura tuvo lugar a partir de la ruta dependiente e independiente de CBF en ambos patrones, aunque en mayor medida en el patrón CAR.
4. Estos resultados sugieren que, a 15 días de frío, las plantas injertadas con el patrón CAR estaban ya totalmente aclimatadas a la exposición a bajas temperaturas, mientras que el patrón MAC continuaba luchando por mantener el ajuste de la expresión de miles de genes con el fin de enfrentarse al estrés.
5. El estrés por exceso de irradiación podría estar activando a HY5 en mayor medida en el patrón CAR, lo que podría estar activando la ruta de síntesis de antocianos dando lugar a una mejor aclimatación..
6. El aminoácido prolina, el azúcar rafinosa y los antocianos podrían estar actuando como protectores de los fotosistemas y antioxidantes de mayor manera en las plantas injertadas con el patrón CAR.
7. La mayor síntesis y concentración de hormona ABA en las raíces del patrón CAR junto con una mayor expresión génica en CAR de los genes transportadores de la familia *ABCG40* y *ABCG22* sugieren una conexión entre patrón-variedad que estaría promoviendo una mayor señalización de la respuesta a ABA aportando una mejora en su respuesta frente a bajas temperaturas.
8. Todo ello sugiere que la tolerancia a bajas temperaturas en los cítricos es un carácter transmisible de patrón a variedad y que además sería un carácter cuantitativo en el que estarían implicados muchos genes ejerciendo pequeños efectos aditivos.

Efecto del patrón en la variedad pigmentada Tarocco Rosso

1. OBJETIVOS

1. Evaluar los efectos del patrón en la calidad del fruto de la variedad Tarocco Rosso.
2. Efecto del patrón en la concentración, ruta biosintética y activación de la ruta de antocianos y flavonoides en fruto de la variedad de Tarocco Rosso.
3. Efecto del patrón en tratamientos postcosecha a bajas temperaturas.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento

2.1.1 Experimento 5

Se emplearon árboles adultos de la estación experimental de patrones que se encuentra en la Cooperativa Anecoop en Museros de 17 años de edad reinjertados en el año 2016 con la variedad pigmentada Tarocco Rosso sobre los patrones citrange Carrizo [*C. sinensis*(L.) Osbeck. x *P. trifoliata* (L.) Raf.] y *C. macrophylla*. El plan de abonado fue el siguiente: nitrato de amonio (33%) 2 kh por árbol⁻¹, fosfato monoamónico 0.5 kg por árbol⁻¹, nitrato potásico 0.7 kg por árbol y quelato de hierro 20 kg por árbol cada año. Se tomaron los registros de temperaturas máximas y mínimas de la estación experimental (Figura 27). Se realizó la recolección de la fruta acorde a la época establecida de recolección para el 2020, el día 17 de enero de 2020. Posteriormente se llevaron a cabo los tratamientos postcosecha en una cámara frigorífica a dos temperaturas 1 °C y 9 °C y 4 tratamientos de exposición al frío, 20 días y 20 días más 7 días a temperatura ambiente y 40 días y 40 días más 7 días a temperatura ambiente. Una vez realizada la recogida de los frutos, se distribuyeron 5 frutos por cada árbol (n=3 muestras biológicas) en los diferentes tratamientos térmicos postcosecha (1 °C y 9 °C) y para cada tiempo (20 días, 20 días más 7 días de aclimatación, 40 días y 40 días más 7 de aclimatación).

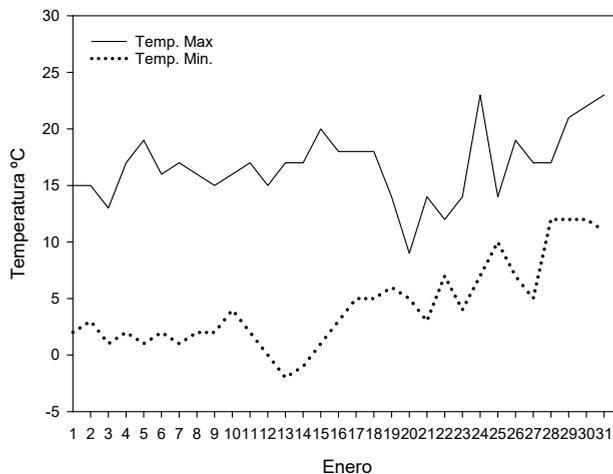


Figura 27. Registro de temperaturas del mes de enero de 2020 en la Masía del Doctor en Museros.

2.1.2 Determinación de la calidad de fruto

El color del zumo y de la corteza (interno y externo) se realizó con un colorímetro (colorímetro Minolta model CR-300, Minolta Co.Ltd, Osaka, Japan) basado en (Morales *et al.*, 2020). El color de la fruta se realizó sobre 5 frutos por muestra biológica (n=3). Ya que el color del fruto no es homogéneo, se realizaron dos medidas una en la zona oscura y otra en la zona clara a lo largo de la parte ecuatorial del fruto. A continuación, se extrajo el zumo de un lote de 5 frutos de 3 árboles (n=3) a partir de un exprimidor (Lomi, Model 4, Lorenzo Miguel, S.L., Madrid, España). Se determinó el color interno de los zumos y los valores de los parámetros “L”, “a” y “b” del colorímetro se calcularon para cada fruto y se expresaron por el Índice de Color de Cítricos (por sus siglas en inglés CCI=1000a/Lb) (Jimenez-Cuesta, Cuquerella and Martínez-Javaga, 1981; Morales *et al.*, 2020).

La titulación de la acidez (por sus siglas en inglés TA) se determinó por titulación con una solución de NaOH empleando fenolftaleína como indicador de pH y expresado como g de ácido cítrico por 100 mL de zumo. Los sólidos solubles totales (por sus siglas en inglés TSS) se midieron con un refractómetro digital (Atago PR-1, Atago Co., Ltd, Tokyo, Japan) y los datos se expresaron en °Brix. El índice de madurez (por sus siglas en inglés MI) se calculó del ratio TSS/TA.

2.1.3 Asilamiento de RNA y cuantificación de la expresión génica por RT-qPCR

Las muestras de pulpa se obtuvieron de un ‘pool’ de 5 frutos por muestra biológica (n=3), se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron a -80 °C. El RNA total se aisló de 1g de tejido de pulpa con un protocolo de extracción manual. Primero se trituraron las muestras con N₂ líquido y mortero y se añadió un “Tampón de extracción 1” que contiene 200mM de Tris:HCL pH 8, 400 mM de NaCl, 20 mM EDTA pH 8, 2% de Sarkosyl, 1% de PVP-40 y 1% de β-mercaptoethanol y 1:24:1 de fenol:cloroformo:alcohol isoamil, se homogenizó y se introdujo a 65 °C durante 15 min. A continuación, se centrifugó a 4.500 rpm durante 20 min a 4 °C y se obtuvo la fase acuosa (sobrenadante) a un nuevo tubo. Dicha fase se volvió a extraer con cloroformo:isoamil (1:1) y se volvió a centrifugar a 4.500 rpm durante 20 min a 4 °C. El pellet obtenido se lavó con etanol 70%. A continuación, se resuspendió el pellet con un “Tampón de extracción 2” que contiene 10 mM Tris:HCl pH8, 5 mM EDTA y 0.1% Sarkosyl y se introdujo a 65 °C durante 15 min. El pellet obtenido de dicho homogenizado se lavó con etanol y se precipitó con LiCl 12 M durante toda la noche a 5 °C. Al día siguiente, el pellet se lavó y se precipitó con AcNa 3 M pH 6. El DNA genómico contaminante se eliminó a partir de una digestión realizada con un Kit de RNAsa (Qiagen, CA, USA) en columna, acorde con las directrices del fabricante.

El RNA purificado (1 µg) fue empleado para realizar la reacción de transcripción reversa con la enzima SuperScript III (Takara Europe, S.A.S, Saint Germain en Laye, FR) en un volumen total de 20 µl. El cDNA copia se diluyó 50 veces y se emplearon 2 µl como molde para la reacción de RT-PCR en un volumen final de 20 µl. La reacción de RT-PCR cuantitativa se realizó en un termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) empleando la polimerasa Ex Taq (TliRNase H plus) (Takara Europe, S.A.S, Saint Germain en Laye, FR) con el intercalante TB Greenpremix. El programa de PCR consistió en 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 seg a 95 °C, y 1 min a 60 °C. La especificidad de la reacción la otorgó la presencia de un solo pico en la curva de disociación y a través de estimaciones en el tamaño del producto amplificado que se comprobó a partir de una electroforesis de agarosa. Los transcritos de los genes *CiclevActin* y *CiclevUBC4*, amplificados con oligonucleótidos específicos, se usaron como genes de referencia (Tabla 13) (Agüero *et al.*, 2014; Estornell *et al.*, 2016) y los cálculos de ANOVA simple y regresión lineal de los valores de CT para examinar la variación de nuestros genes de referencia se tomaron de Brunner *et al.*, 2004. El factor de normalización de los genes de referencia se calculó por el valor de la media geométrica de ambos genes (Brunner, Yakovlev and Strauss, 2004). La expresión relativa se midió por el procedimiento de curva estándar con cinco puntos de dilución (Pfaffl, 2001). Los resultados se realizaron con la media de las tres muestras biológicas independientes con tres réplicas técnicas de cada una de ellas.

Tabla 13. Secuencias de los oligonucleótidos empleados.

| Nombre | GeneBank | Phytozome ^a | Oligos 5' – 3' |
|---------------|-------------|------------------------|---|
| <i>CHI</i> | LOC18044429 | Ciclev10032749 | FOR 5' CCAGTCTCATAACTGCACTCTCG 3' REV 5' GGTGAGAAGAGCAAATGTAGCG 3' |
| <i>CHS</i> | LOC18051925 | Ciclev10015535 | FOR 5' CAGGATCACAAAGAGCGAGC 3' REV 5' GTGATGGAGCCATGTAAGCG 3' |
| <i>DFR</i> | LOC18042712 | Ciclev10001757 | FOR 5' TTGTTTGAGCATCCTAACGC 3' REV 5' GGCTGTACTTGAACCTAAATCCC 3' |
| <i>FLS</i> | LOC18037475 | Ciclev10026028 | FOR 5' CTTTAAGGACGACCGTTGGATC 3' REV 5' ACGGCTTTGTACTTGCCAT 3' |
| <i>ROS1</i> | LOC18039990 | Ciclev10010892 | FOR 5' TGTCCCAGGGAGTGGTTATG 3' REV 5' CACACACACATATCCTCTCCAGAAG 3' |
| <i>PAP1</i> | LOC18039527 | Ciclev10013455 | FOR 5' GGGAAGAACAGCGAACGATG 3' REV 5' GTGGATTGTTTGCCGAGATTGT 3' |
| <i>TTG1</i> | LOC18032473 | Ciclev10005375 | FOR 5' ATATCAGGTCGCCAACATTGC 3' REV 5' GACACAAGCTCTATGCCTCTC 3' |
| <i>βGLU13</i> | LOC18044658 | Ciclev10031209 | FOR 5' AACCATCTTCTGTTCTCCGA 3' REV 5' CGACCAGGCAAAGTAACCTTT 3' |

| | | | |
|----------------|-------|----------------|--|
| <i>ATUBC4</i> | UBC4 | Ciclev10009771 | FOR 5' TGGACGCTTCAGTCTGTTTG 3' REV 5' TCGTCAATCACCCCTTCTTT 3' |
| <i>β-ACTIN</i> | ACTIN | Ciclev10025866 | FOR 5' CAGTGTGGATTGGAGGATCA 3' REV 5' TCGCCCTTTGAGATCCACAT 3' |

^a Este código se refiere al nombre del transcrito que está disponible en la base de datos del Consorcio Internacional del Genoma de cítricos y GeneBank (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html> y <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>).

2.1.4 Cuantificación de polifenoles

Se extrajo el zumo de un lote de 5 frutos por árbol procedentes de 3 árboles (n=3) de cada patrón, variedad y tratamiento. A partir de un exprimidor (Lomi, Model 4, Lorenzo Miguel, S.L., Madrid, España). Debido al alto contenido de azúcar presente en las muestras, que podría interferir con la columna de HPLC, las muestras se cargaron en un cartucho C18 Sep-Pak, previamente acondicionado con 5 mL de metanol, 5 mL de agua pura y luego con 0.01 mol/l de HCl. El cartucho se lavó con 5 mL de agua pura y luego se eluyó con metanol acidificado (0.1 g/L HCl). Las fracciones recolectadas se almacenaron a -20 °C hasta su uso posterior.

El protocolo se llevó a cabo según (Genskowsky *et al.*, 2016). Se inyectó un volumen de 20 µL de cada muestra en un HPLC Hewlett-Packard serie 1200 (Woldbronn, Alemania) equipado con un detector de matriz de diodos UV-visible (DAD) y una columna C18 (Mediterranea sea₈ de 25 × 0.4 cm de 5 µm) de Teknokroma (Barcelona, España). Los cromatogramas se registraron a 280, 360 y 520 nm. Los compuestos fenólicos se analizaron, en soluciones estándar y muestras usando un gradiente de elución a 1 mL min⁻¹ con el siguiente programa de gradientes, comenzando con 95 % A, 75 % A a los 20 min, 50 % A a los 40 min, 20 % A a los 50 min y 20% A a los 60 min. Las fases móviles estaban compuestas por ácido fórmico en agua (4.5:95.5, v/v) como disolvente A y acetonitrilo como disolvente B. La identificación de los compuestos no antocianicos se realizó comparando los espectros de absorción UV y los tiempos de retención de cada compuesto con los estándares puros inyectados en las mismas condiciones. Los compuestos se cuantificaron a través de curvas de calibración de compuestos patrón (patrones de ácidos fenólicos: ácido clorogénico y ácido ferúlico; patrones de flavonoides: hesperidina, didimina, hesperidina y narirutina) de Extrasynthese (Genay, Francia). Los estándares de ácido fenólico se disolvieron en metanol a diferentes concentraciones entre 10 y 200 µg mL⁻¹; Los estándares de flavonoides se disolvieron en metanol a diferentes concentraciones entre 1 y 250 µg mL⁻¹. Se logró una alta linealidad (r²>0.995) para cada curva estándar para cada compuesto. La cuantificación de las antocianinas se llevó a cabo con base en curvas lineales de estándares auténticos. Para la cuantificación de los derivados de delfinidina

se utilizó una calibración de delfinidina-3-glucósido (concentración entre 1 y 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$), mientras que la calibración de cianidina 3-glucósido (concentración entre 1 y 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) se utilizó para los derivados de cianidina.

2.1.5 Análisis estadísticos

Los resultados mostrados se obtuvieron de la media de 3 réplicas biológicas que constaban de un pull de 5 frutos por árbol para cada tratamiento. Para los análisis de RT-PCR se emplearon 3 réplicas técnicas para cada muestra biológica ($n=3$). Los resultados se procesaron con un análisis de la varianza (ANOVA de una vía) utilizando Statgraphics Centurion, 16.1 y a los que previamente se probaron con un análisis de normalidad y homogeneidad. Cuando el ANOVA obtuvo un efecto estadístico, las medias se sometieron por separado a una prueba LSD (mínima diferencia significativa por sus siglas en inglés).

3. RESULTADOS

3.1 Determinación de la calidad de la fruta

Puesto que la coloración de la fruta es muy importante en este tipo de cítricos y concretamente en el mercado en fresco, se llevaron a cabo los siguientes análisis. La Tabla 13 muestra los parámetros de calidad del zumo y la coloración de la piel el día de la recogida de muestras. La diferente coloración de la piel fue estadísticamente significativa entre patrones, de modo que los frutos provenientes de árboles con patrón MAC resultaron más rojizos que los frutos provenientes de árboles con patrón CAR. Sin embargo, sí se observa que el color del zumo, fue sobre 6 veces más rojo el obtenido de los patrones CAR que el de los patrones MAC. Por tanto, el color externo de la piel no se correspondió con la coloración interna de los frutos.

La cantidad total de sólidos solubles (por sus siglas en inglés TSS) también se cuantificó y fue ligeramente mayor en el zumo de las muestras provenientes de CAR que las de MAC y fue de 11.68 ° Brix y 10.98 ° Brix respectivamente. La acidez (TA) se expresó en g de ácido cítrico / 100 mL y no obtuvo diferencias entre patrones. Finalmente, se determinó el índice de madurez (que se trata del ratio TSS/TA) y no se obtuvieron diferencias significativas entre los zumos, resultando los valores 8.25 para el patrón CAR y 7.58 del zumo proveniente del patrón MAC. Los parámetros de calidad del zumo indicaron que la fruta proveniente de ambos patrones fue óptima para la comercialización y además tuvieron un estado de madurez similar.

Tabla 14. Determinación de la calidad del fruto el día de la recogida de muestras, 17 de Enero de 2020. Se determinó el color de la piel y el zumo, los azúcares solubles totales (TSS) del zumo en grados °Brix, la acidez titulable (TA) expresada en g de ácido cítrico/100 mL y el índice de madurez del ratio TSS/TA. Los zumos se obtuvieron de naranjas sanguinas de la variedad Tarocco Rosso injertadas sobre los patrones Carrizo (CAR) y *C. macrophylla* (MAC) recogidos el 17 de enero de 2020. El P-valor representado en la tabla proviene de un test estadístico ANOVA de una vía con la prueba de la mínima significancia (LSD, $p \leq 0.05$).

| Patrón | Color Piel | p-valor |
|--------|------------|---------|
| CAR | 15.47 | 0.002 |
| MAC | 19.07 | |

| Patrón | Color Zumo | p-valor |
|--------|------------|---------|
| CAR | 21.54 | 0.000 |
| MAC | 3.60 | |

| Patrón | TSS (° Brix) | p-valor |
|--------|--------------|---------|
| CAR | 11.68 | 0.004 |
| MAC | 10.90 | |

| Patrón | Acidez (TA) | p-valor |
|--------|-------------|---------|
| CAR | 1.42 | 0.723 |
| MAC | 1.45 | |

| Patrón | IM | p-valor |
|--------|------|---------|
| CAR | 8.25 | 0.172 |
| MAC | 7.58 | |

Con el fin de mostrar unos resultados más visuales, en la Figura 28 se muestra una imagen de los frutos de los que se obtuvieron las anteriores muestras. Esta Figura 28 confirmó los resultados obtenidos en los parámetros de calidad del zumo de la Tabla 14 ya que claramente se observó una mayor coloración en la pulpa de los frutos injertados con el patrón CAR que los de MAC.



Figura 28. Imagen de los frutos de Tarocco Rosso el día de la recogida de muestras, 17 de enero de 2020. a y b) corresponde con las naranjas Tarocco Rosso injertadas sobre el patrón citrange Carrizo (CAR) y c), d) corresponde con naranjas Tarocco Rosso injertadas sobre el patrón *C. macrophylla* (MAC). Las muestras pertenecen al día 17 de enero de 2020 en que se tomaron las muestras en la estación experimental de Museros en la “Masía del Doctor”, Anecoop.

3.2 Antocianinas, flavanonas y ácidos hidroxycinnámicos contenidos en los frutos

Se sabe que las naranjas sanguinas son ricas en antocianinas y flavonoides y que esta es la razón por la que muestran dicha coloración. Como se ha visto previamente, la determinación de polifenoles resulta importante en las naranjas pigmentadas ya que son beneficiosas para la salud por sus efectos antioxidantes. Por ello, la importancia de la determinación del contenido de polifenoles más importantes en las muestras injertadas con diferentes patrones para comprobar sus diferencias (Figura 3). La hesperidina, narirutina y didimina son flavanonas que provienen de la flavanona naringenina. La hesperidina resultó la flavanona mayoritaria en ambas muestras de CAR y MAC. Los cambios con mayor significancia fueron a 9 °C durante los tratamientos a 40 días y 40+7 días donde el patrón MAC disminuyó más su contenido en hesperidina comparado con el patrón CAR. La segunda flavanona con mayor contenido fue la narirutina. En general, como en el caso anterior con la hesperidina, el contenido fue ligeramente mayor en el patrón CAR durante el tratamiento a 9 °C, concretamente, a 40 días de tratamiento postcosecha. La didimina resultó ser la flavanona minoritaria y al igual que las anteriores flavanonas, se obtuvieron mayores diferencias de concentración en el tratamiento a 9 °C. El aumento de la hesperidina resultó importante ya que es el precursor del ácido clorogénico y el ácido ferúlico. La cuantificación de ácido clorogénico no obtuvo cambios reseñables. Sin embargo, la concentración de ácido ferúlico resultó mayor en el patrón CAR en ambas temperaturas y fue algo mayor en el tratamiento a 9 °C de conservación.

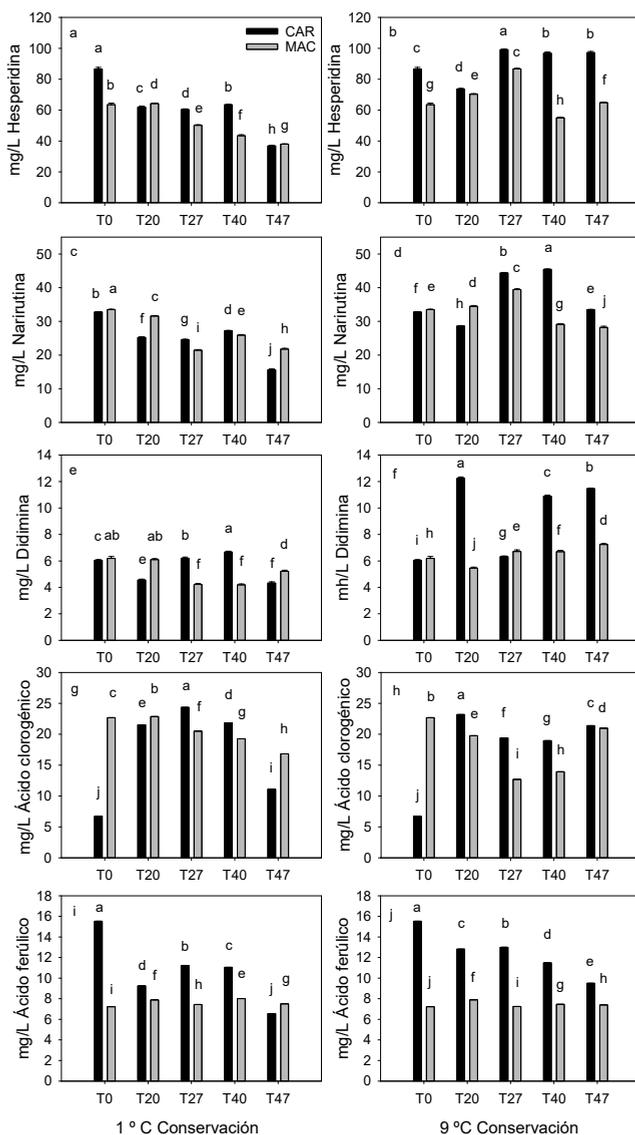


Figura 29. Cuantificación de la concentración de flavanonas y ácidos hidroxycinnámicos en mg/L. a) concentración de hesperidina en mg/L a 1 °C de conservación, b) concentración de hesperidina en mg/L a 9 °C de conservación, c) concentración de narirutina en mg/L a 1 °C de conservación, d) concentración de narirutina en mg/L a 9 °C de conservación, e) concentración de didimina en mg/L a 1 °C de conservación, f) concentración de didimina en mg/L a 9 °C de conservación, g) concentración de ácido clorogénico en mg/L a 1 °C de conservación, h) concentración de ácido clorogénico en mg/L a 9 °C de conservación, i) concentración de ácido ferúlico en mg/L a 1 °C de conservación, j) concentración de ácido ferúlico en mg/L a 9 °C de conservación. Las cuantificaciones se realizaron en frutos de Tarocco Rosso injertados en los patrones citrange Carrizo (CAR) y *C. macrophylla* (MAC). Las muestras se recogieron el 17 de enero del 2020 del campo experimental de patrones en Museros de la “Masía del Doctor” perteneciente a la Cooperativa Anecoop. Los valores resultaron de la media y desviación de tres réplicas biológicas (n=3) y cinco réplicas técnicas por muestra biológica. El efecto del tratamiento se probó con un test ANOVA de una vía y con un test LSD.

A continuación, se realizó la cuantificación de los antocianos (Figura 29a-h) cuya concentración se conoce que es mayor en cítricos. En general, la concentración de los cuatro antocianos cuantificados en el presente trabajo obtuvieron una mayor concentración en los frutos provenientes del patrón CAR tanto a nivel basal como después de los dos tratamientos térmicos, como previamente indicaron los parámetros de calidad del zumo. Además, los frutos expuestos al tratamiento postcosecha de 9 °C que estuvieron injertados sobre el patrón CAR, obtuvieron una mayor inducción de los cuatro antocianos, sobre todo, después de estar 40 días de tratamiento térmico.

Así pues, se observó que los tratamientos postcosecha afectaron de diferente manera en el contenido de flavonoides, ácidos cinámicos y antocianos dependiendo no sólo del tratamiento térmico, sino que también se vio influenciado por el patrón del que provenía.

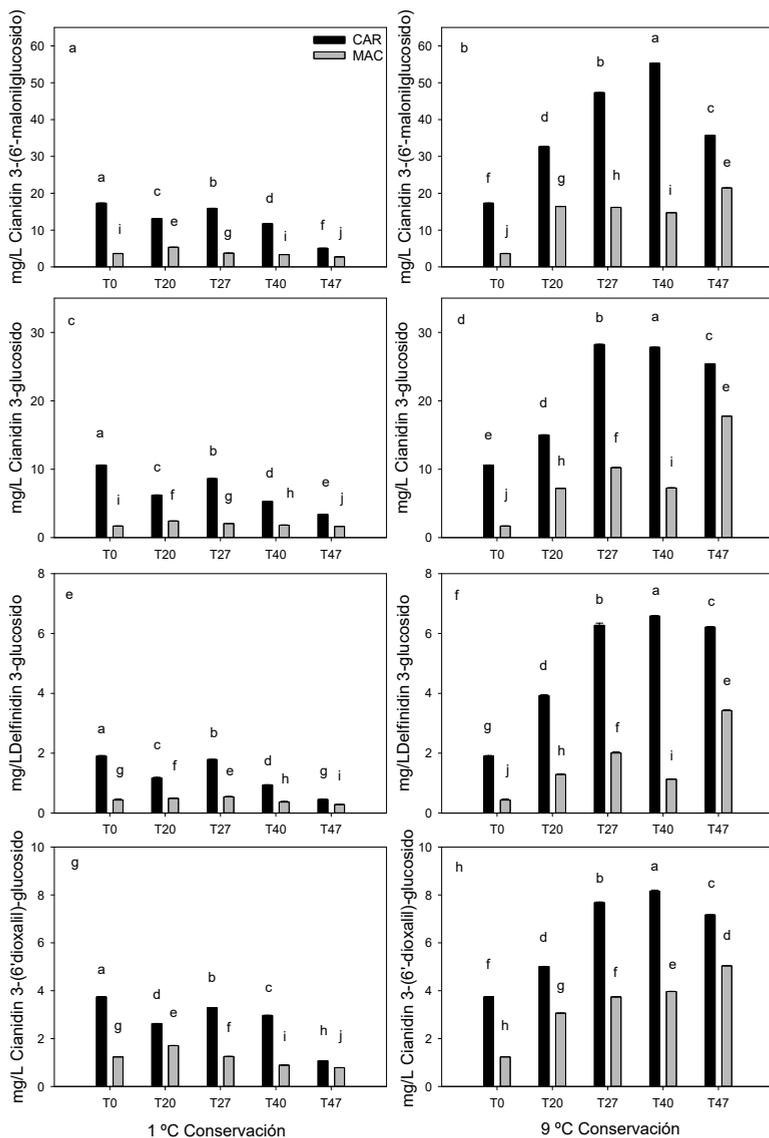


Figura 30. Cuantificación de la concentración de antocianinas en mg/L. a) concentración de cianidin 3-(6'-malonilglucósido) en mg/L a 1 °C de conservación, b) concentración de cianidin 3-(6'-malonilglucósido) en mg/L a 9 °C de conservación, c) concentración de cianidin 3-glucósido en mg/L a 1 °C de conservación, d) concentración de cianidin 3-glucósido en mg/L a 9 °C de conservación, e) concentración de delfinidin 3-glucósido en mg/L a 1 °C de conservación, f) concentración de delfinidin 3-glucósido en mg/L a 9 °C de conservación, g) concentración de cianidin 3-(6'-dioxalil)-glucósido en mg/L a 1 °C de conservación, h) concentración de cianidin 3-(6'-dioxalil)-glucósido en mg/L a 9 °C de conservación. Las cuantificaciones se realizaron en frutos de Tarocco Rosso injertados en los patrones citrange Carrizo (CAR) y *C. macrophylla* (MAC). Las muestras se recogieron el 17 de enero del 2020 del campo experimental de patrones en Museros de la “Masía del Doctor” perteneciente a la Cooperativa Anecoop. Los valores resultaron de la media y desviación de tres réplicas biológicas (n=3) y cinco réplicas técnicas por muestra biológica. El efecto del tratamiento se probó con un test ANOVA de una vía y con un test LSD.

3.3 Cuantificación transcriptómica de la ruta de biosíntesis de antocianos y regulación

Con el fin de conocer mejor la regulación y la ruta de biosíntesis de antocianos en cítricos decidimos realizar la cuantificación de la expresión génica de genes que se conocen que intervienen en la regulación de la ruta de biosíntesis de antocianos y también de los genes que codifican los enzimas que intervienen en la ruta.

Los genes que se seleccionaron de los enzimas de la ruta de biosíntesis fueron los mostrados en la Figura 31a-h. Como se ha indicado en la introducción, el gen que codifica para el enzima *FLS* es un enzima intermediario en la ruta de flavonoides pero que resulta de un desvío de la ruta de síntesis de antocianos. Así pues, su expresión tendría que estar correlacionada con la concentración de flavonoides (Figura 29a-f). Durante el tratamiento a 1 °C de postcosecha no se obtuvieron grandes diferencias entre patrones y tiempos de tratamiento. Sin embargo, a 9 °C se vio una inducción a los 20 días de casi el doble de expresión génica en el patrón CAR respecto al MAC, lo que podría correlacionar con la mayor concentración de hesperidina, narirutina y didimina a los 40 días de tratamiento en el patrón CAR.

Los genes que codificaron para los enzimas *CHS* y *CHI* (Figura 31c-f), se encuentran al inicio de la ruta de biosíntesis de antocianos por lo que, indirectamente, también estarían relacionados, como se ha comentado antes, con el flujo de síntesis de intermediarios como los flavonoides. Así pues, en el tratamiento a 1 °C no se observaron grandes diferencias en la expresión génica para el gen *CHS* (Figura 31c y 31d). Sin embargo, a los 20 días de tratamiento a 9 °C hubo un aumento 3 veces mayor en la expresión de *CHS* del genotipo CAR que en la de MAC que, además, correlacionó con la mayor concentración de los cuatro antocianos cuantificados en la Figura 30.

El gen que codificó para el enzima *CHI* (Figura 31e y 31f) no tuvo diferencias significativas durante el tratamiento a 1 °C entre patrones. Así pues, sí que hubo una gran expresión a nivel basal a tiempo 0 en el genotipo MAC 4 veces superior que en el patrón CAR. Además, se observó también una gran inducción a los 20+7 días en el patrón MAC. Del perfil de expresión de los frutos provenientes del patrón MAC se podría interpretar que, en presencia de un frío extremo, 1 °C, los niveles de *CHI* podrían verse reprimidos respecto a la situación basal. Por otro lado, la situación basal del patrón MAC a 1 °C para *CHI* no resulta del todo clara ya que no estaría reflejada en la concentración de antocianos. Durante el tratamiento a 9 °C, la expresión del gen *CHI* si correlacionó respecto a la concentración de los antocianos cuantificados, excepto en el caso de MAC a tiempo 0, como ocurría en el tratamiento anterior. La expresión de *CHI* a 20 días fue mayor

unas 7.5 veces en CAR que en MAC. A tiempo 40 días de exposición la expresión también permaneció alta en CAR con respecto a los 40 días de MAC, pero no fue estadísticamente significativa.

Finalmente, la expresión del último gen que se cuantificó de la ruta de biosíntesis fue el *DFR* que es de los últimos enzimas de la ruta de biosíntesis (Figura 31g y 31h). El tratamiento a 1 °C no arrojó resultados significativos, lo que resultó estar en consonancia con la expresión génica de los genes anteriores y con los resultados de la concentración de antocianos, flavonoides y ácidos cinámicos. Sin embargo, los resultados del tratamiento postcosecha a 9 °C sí volvieron a mostrar una fuerte inducción a los 20 días de tratamiento en el patrón CAR comparado con el patrón MAC. El patrón CAR aumentó cerca de 6 veces su expresión con respecto a su tiempo 0 de tratamiento y el patrón MAC aumentó 2.5 veces con respecto a su control. Así pues, el patrón CAR se expresó cerca de 2.5 veces más que MAC a los 20 días. Estos resultados, de nuevo, correlacionaron con la concentración de los cuatro antocianos cuantificados.

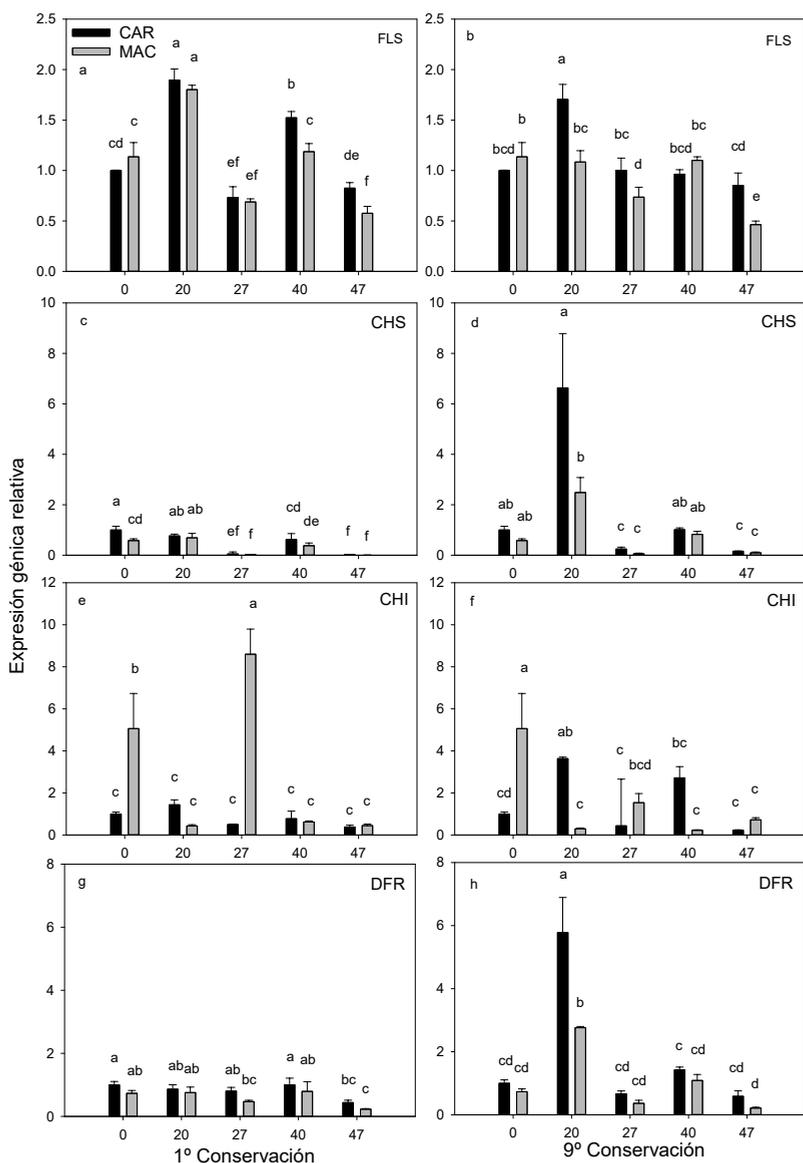


Figura 31. Cuantificación de la expresión génica relativa de los genes de biosíntesis de antocianos y flavonoides. a y b) expresión del gen FLS (LOC18037475) a 1 °C y 9 °C de conservación respectivamente, c y d) expresión del gen CHS (LOC18051925) a 1 °C y 9 °C de conservación respectivamente, e y f) expresión del gen CHI (LOC18044429) a 1 °C y 9 °C de conservación respectivamente, g y h) expresión del gen DFR (LOC18042712) a 1 °C y 9 °C de conservación respectivamente. La expresión génica se cuantificó en pulpa de un pull de frutos de Tarocco Rosso injertados en los patrones citrange Carrizo (CAR) y *C. macrophylla* (MAC). Las muestras se recogieron el 17 de enero del 2020 del campo experimental de patrones en Museros de la “Masía del Doctor” perteneciente a la Cooperativa Anecoop. Los valores resultaron de la media y desviación de tres réplicas biológicas (n=3) y tres réplicas técnicas por muestra biológica. El efecto del tratamiento se probó con un test ANOVA de una vía y con un test LSD.

Se realizó una selección de genes que controlan la activación y represión de la ruta de antocianos y se cuantificó su expresión génica (Figura 32a-h). La expresión del gen *PAP1* (Figuras 32a y 32b) durante el tratamiento a 1°C en general no correlacionó con el patrón de activación de los genes de biosíntesis. Además, tampoco correlacionaron con los cambios en la concentración de antocianos, flavonoides ni ácidos cinámicos. Durante el tratamiento a 9 °C la expresión del gen *PAP1* correlacionó con los genes que codificaron para los enzimas de síntesis de antocianos (*CHS*, *CHI* y *DFR*) y flavonoides (*FLS*) ya que a 20 días hubo una inducción significativa 2.5 veces mayor para *CAR* que para *MAC*. Así pues, también correlacionó con el aumento de concentración de antocianos.

ROS1 actúa como un supresor del silenciamiento génico catalizando la desmetilación del DNA de las citosinas en posición 5' (Roldan-Arjona and Ariza, 2000; Gong *et al.*, 2002). Se ha visto tanto en tabaco como en *Arabidopsis* que *ROS1* provee la regulación de genes que codifican para los enzimas de biosíntesis de flavonoides en estrés por salinidad, por lo que también nos interesó conocer su expresión génica (Bharti *et al.*, 2015). En ese caso, el gen putativo de *ROS1* que se seleccionó (Figura 32c y 3d) no mostró una correlación con la activación de los enzimas involucrados en la síntesis de antocianos.

El gen que codificó para *β GLU13* (Figura 32e y 32f) tampoco mostró un patrón de inducción en los momentos esperados de degradación de antocianos para 1 y 9 °C.

El gen putativo para *TTG1*, que se encarga de la regulación de los protoantocianos, activando el gen de síntesis *FLS*, tampoco mostró una correlación (Figura 32g y 32h) con ninguna expresión génica aquí cuantificada.

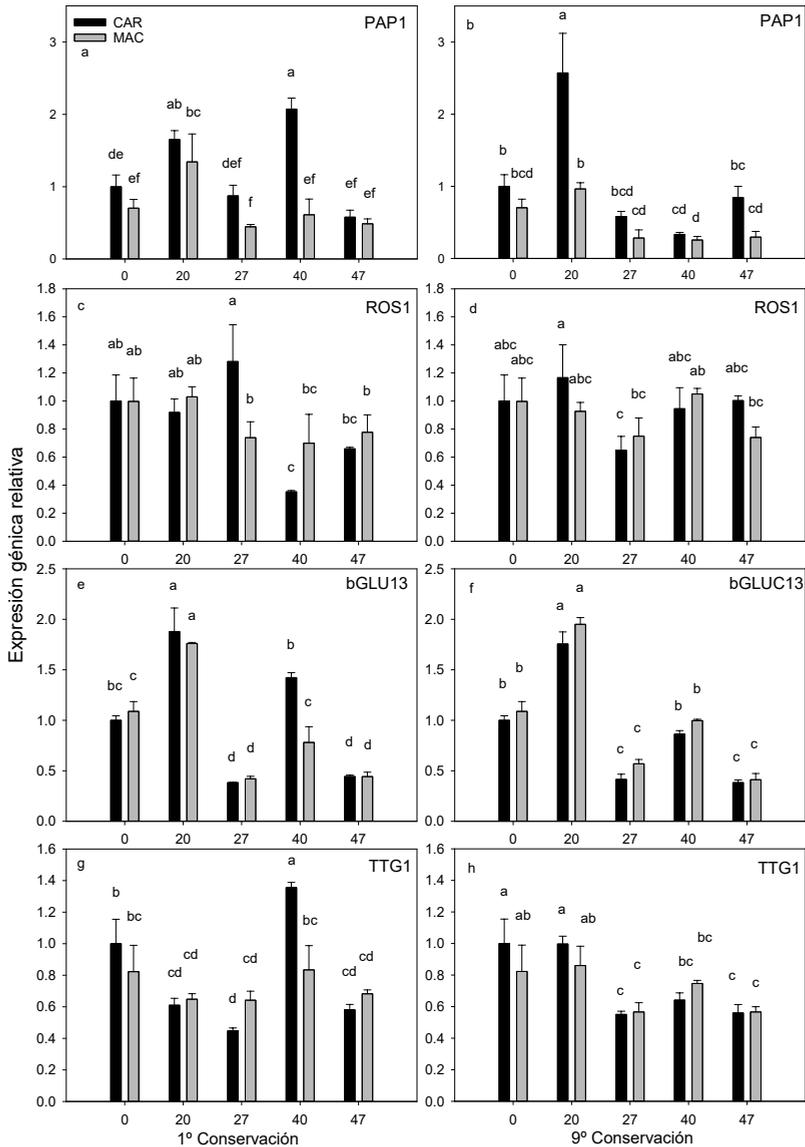


Figura 32. Cuantificación de la expresión génica relativa de los genes reguladores de los enzimas de biosíntesis de antocianos y flavonoides. a y b) expresión del gen PAP1 (LOC18039527) a 1 °C y 9 °C de conservación respectivamente, c y d) expresión del gen ROS1 (LOC18039990) a 1 °C y 9 °C de conservación respectivamente, e y f) expresión del gen β GLU13 (LOC18044658) a 1 °C y 9 °C de conservación respectivamente y g y h) expresión del gen TTG1 (LOC18032473) a 1 °C y 9 °C de conservación respectivamente. La expresión génica se cuantificó en pulpa de un pull de frutos de Tarocco Rosso injertados en los patrones citrange Carrizo (CAR) y *C. macrophylla* (MAC). Las muestras se recogieron el 17 de enero del 2020 del campo experimental de patrones en Museros de la “Masía del Doctor” perteneciente a la Cooperativa Anecoop. Los valores resultaron de la media y desviación de tres réplicas biológicas (n=3) y tres réplicas técnicas por muestra biológica. El efecto del tratamiento se probó con un test ANOVA de una vía y con un test LSD.

4. DISCUSIÓN

Se sabe que en cítricos los patrones tienen la capacidad de otorgar ciertos caracteres de interés a la variedad que porta (Martínez-Cuenca, Quiñones and Forner-Giner, 2016; Martínez-Cuenca, Primo-Capella and Forner-Giner, 2017, 2021; Morales *et al.*, 2020), pero es muy complejo llegar a conocer la señal que transmite el patrón con el fin de inducir dichas diferencias. En previos trabajos (Morales *et al.*, 2020) y en el presente trabajo se intenta esclarecer la capacidad de inducción de la biosíntesis de antocianos de una variedad pigmentada dependiendo del patrón con el que está injertado.

Se tomaron las muestras de los frutos de Tarocco Rosso en su correcto momento de recolección, como mostraron los datos de calidad. El índice de madurez es un dato de relevancia, ya que la concentración de antocianos en fruto depende también del estado de madurez en el que se encuentra. Así pues, ambos patrones obtuvieron un índice de madurez muy similar para su correcta comercialización y por tanto comparables entre sí.

Las flavanonas son un tipo de flavonoides que se encuentran en una alta concentración en los cítricos. La flavanona mayoritaria fue la hesperidina, luego la narirutina y finalmente la didimina tal y como ocurre en otros trabajos (Barreca *et al.*, 2014; Cebadera-Miranda *et al.*, 2019; Morales *et al.*, 2020). Su ruta de biosíntesis comparte algunos pasos con la biosíntesis de antocianos, como se ha comentado anteriormente, por ello también resultan de interés. Los análisis en la concentración de flavanonas no arrojaron unas grandes diferencias entre patrones, aunque hubo una pequeña correlación en la inducción del gen *FLS* a los 20 días y un aumento en la concentración de hesperidina, didimina y narirutina a tiempo 40 en CAR. En general, la inducción génica de los enzimas de biosíntesis y degradación de rutas metabólicas no se reflejan en la concentración del soluto que sintetizan de manera inmediata ya que han de tener lugar antes otros procesos, como la traducción de proteínas. Así pues, es posible que estemos observando el inicio de inducción del gen *FLS* pero que realmente el aumento de la concentración de flavonoides lo estemos observando a los 40 y 40+7 días de tratamiento. Algo similar de lo que ocurre con las flavanonas sucede con los ácidos hidroxicinnámicos. Derivan de la ruta general de los fenilpropanoides que es el paso siguiente de los azúcares individuales en la ruta de las antocianinas (Rapisarda *et al.*, 1998; Morales *et al.*, 2020) y por ello es importante realizar su cuantificación. Se cuantificó el ácido clorogénico y el ácido ferúlico obteniendo diferencias basales entre fenotipos. El ácido clorogénico es un poderoso antioxidante y resulta interesante en este tipo de cultivos (Cao, Sofic and Prior, 1996;

Stommel and Whitaker, 2003; Hanson *et al.*, 2006; Lucía Valerga *et al.*, 2017). Así pues, aunque los frutos de MAC tuvieron un contenido mayor de ácido clorogénico de forma basal, con los tratamientos a bajas temperaturas la concentración se igualó entre patrones. El ácido ferúlico también es un poderoso antioxidante (Walters, Heasman and Hughes, 1997; Paiva *et al.*, 2013), por lo que resulta de interés. En este caso, el patrón CAR de manera basal consigue una concentración mayor de ácido ferúlico que va disminuyendo con el tratamiento a frío. Así pues, en general el patrón CAR parece que tiene la capacidad de otorgar a la fruta un mayor contenido en antioxidantes que el patrón MAC.

Las antocianinas fueron los compuestos donde se obtuvieron mayores diferencias entre patrones, tratamientos de baja temperatura y tiempos de exposición. Según los resultados, el tratamiento a 9 °C fue el tratamiento que mayor concentración de antocianos indujo en los frutos en general, confirmando previos resultados obtenidos (Rapisarda, Bellomo and Intelisano, 2001; Morales *et al.*, 2020). Concretamente, los frutos de Tarocco provenientes del injerto con el patrón tolerante CAR a bajas temperaturas fue capaz de inducir una mayor respuesta génica también de los genes de la ruta de biosíntesis de antocianos, concretamente, de los genes *FLS*, *DFR*, *CHS* y *CHI* sobre todo a 20 días de exposición y consecuentemente una mayor concentración de las cuatro antocianinas obtenidas. Dicha inducción génica de genes de biosíntesis en frutos de variedades pigmentadas se había observado previamente (Lo Piero *et al.*, 2005; Cotroneo *et al.*, 2006; Crifò *et al.*, 2011; Lo Piero, 2015), pero, no se conocía que el patrón podría transmitir al fruto la capacidad de producir una inducción y por consiguiente un mayor contenido en antocianos una vez realizada la cosecha.

Con la cuantificación génica del gen putativo β GLU13 se pretendía también cuantificar la degradación de antocianos durante los tiempos de aclimatación 20+7 y 40+7 según previos resultados obtenidos en otros cultivos como es en naranja pigmentada Siciliana donde se aisló la enzima (EC 3.2.1.21) y se correlacionó con la degradación de antocianos (Barbagallo *et al.*, 2007). Esta enzima (EC 3.2.1.21) también se empleó en el hongo *Bjerkandera adusta* donde también se le otorgó una función en la degradación de antocianos (Behrens *et al.*, 2018). Sin embargo, en nuestro caso la expresión génica del gen aquí seleccionado en base a lo anterior nombrado, obtuvo como gen putativo β GLU13, pero no obtuvimos los resultados esperados. Hay que señalar, que la familia génica de las β -glucosidasas es muy amplia y puede que en cítricos la función principal de degradación de antocianos la esté llevando a cabo otra glucosidasa aquí no contemplada.

La inducción de los genes de síntesis de antocianos se correlacionó con la sobreexpresión del factor de transcripción putativo de *PAP1*, caracterizado como activador de la ruta de síntesis de antocianos y flavonoides en otras especies

como son *A. thaliana* (Borevitz *et al.*, 2000; Tohge *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2016), tomate (Zuluaga *et al.*, 2008) y tabaco (Zhou *et al.*, 2008; Mitsunami *et al.*, 2014). Por lo que, en cítricos parece que el factor de transcripción *PAP1* podría estar involucrado en la activación de la ruta de síntesis de antocianos y flavonoides. Para poder confirmar esto, más experimentos deberían de llevarse a cabo.

5. CONCLUSIONES

1. Los frutos de Tarocco Rosso cultivados con el patrón citrange Carrizo tolerante a bajas temperaturas obtuvieron una mayor habilidad para la síntesis de ácido ferúlico y ácido clorogénico, dos potentes antioxidantes de interés comercial.
2. Los frutos de Tarocco Rosso cultivados con el patrón citrange Carrizo tolerante a bajas temperaturas obtuvieron una mayor concentración de cianidin 3-(6'-malonilglucósido), cianidin 3-glucósido, delphinidín 3-glucósido y cianidin 3-(6'-dioxalil)-glucósido, antocianinas causantes de la deseada coloración en zumo de naranjas pigmentadas gracias al aumento de expresión de los genes de biosíntesis de antocianinas y flavonoides FLS, DFR, CHS y CHI.
3. El tratamiento de postcosecha a 9 °C fue el tratamiento que mayor inducción produjo en la ruta de síntesis de antocianinas.
4. La activación de la ruta de antocianinas correlacionó con la activación del factor de transcripción putativo *PAP1*, por lo que se podría proponer como un posible inductor de la ruta de antocianinas en cítricos.
5. La elección de un patrón tolerante a bajas temperaturas, como es el caso de citrange Carrizo, podría potenciar las cualidades deseadas de coloración y por ende de concentración de antocianos en los frutos de la variedad pigmentada Tarocco Rosso.

Discusión General

El estrés por baja temperatura es uno de los estreses abióticos que más pérdidas producen al año en cítricos. Actualmente, el cambio climático está afectando los patrones meteorológicos y están dando lugar a constantes olas de frío y de calor. Estos cambios climáticos hacen que los cultivos tradicionalmente autóctonos de una zona de cultivo cambien también su localización. Por ello, la importancia de los programas de mejora. El objetivo principal de los programas de mejora vegetal es encontrar solución a problemas como el planteado en la presente tesis. Para ello es importante saber abordar el estrés al que nos enfrentamos y conocer cómo afecta a nuestro cultivo, en este caso, los patrones de cítricos.

En la presente tesis, se realizaron experimentos a corto y largo plazo empleando materiales vegetales que tradicionalmente se saben que son tolerantes/sensibles a las bajas temperaturas y se realizó una caracterización fisiológica, molecular y metabolómica con el fin de ver las diferencias entre materiales vegetales. Gracias a los resultados encontrados en la presente tesis, se puede implementar un programa de mejora para el rastreo de nuevo material vegetal potencialmente tolerante a bajas temperaturas con un abordaje a diferentes niveles:

1. Un primer cribado a tiempos cortos de los genes de respuesta más rápida gracias a la cuantificación de la expresión génica de *CAMTA3*, *CAMTA5*, *COR413 IM1* y *CBF1*.
2. Un segundo cribado con planta injertada y tiempo a largo plazo donde se confirme una respuesta del metabolismo con el aumento en prolina y azúcares totales, concretamente, en rafinosa y trealosa, medidas de la fluorescencia de la clorofila *Fv/Fm*, *NPQ* y *YII*, como parámetros fisiológicos, confirmación de la respuesta central *CBF* por la cuantificación génica de *CBF1*, y cuantificación de la expresión de los genes de la ruta de síntesis de antocianos (*CHS* y *DFR*) y transportadores de ABA (*ABCG22* y *ABCG40*).
3. Confirmación de los genotipos tolerantes con el comportamiento agronómico en árboles adultos.

La sensibilidad/tolerancia frente a estrés por baja temperatura, como cualquier otro tipo de estrés abiótico, resulta de la combinación de genes que contribuyen a este carácter de tolerancia. La tolerancia frente al estrés abiótico afecta a un gran número de genes, por lo que, en muchas ocasiones resulta muy tedioso llegar a lograr encontrar la base molecular de la sensibilidad/tolerancia al estrés. En la presente tesis hemos conseguido detectar ciertos caracteres que pensamos que contribuyen en gran medida a la tolerancia al estrés por bajas temperaturas en patrones de cítricos, de los cuales, algunos ya se conocían previamente. Además, en cítricos, se cuenta con el hándicap de contar con la interacción patrón/variedad, por lo que se entiende que el factor o factores de tolerancia que el patrón transmite a la variedad cumpla con ciertas premisas. Debe de ser una molécula pequeña, que se pueda transportar y consiga pasar la unión entre el patrón y la variedad.

Ya se conocía previamente que la síntesis de osmolitos tiene una gran importancia en los estreses abióticos. Así pues, en el caso de la tolerancia a frío vimos que la prolina, trealosa y sobre todo también la rafinosa, cumplen un importante papel en la tolerancia a estrés por frío en patrones de cítricos. Además, los osmolitos, resultado del metabolismo primario, cumplen con las premisas señaladas anteriormente, son moléculas pequeñas y fácilmente transportables. El aminoácido prolina ya se demostró en los experimentos de George Yelenosky que tenía una gran implicación en la sensibilidad/tolerancia al estrés por frío en los años 1980-1990 (Yelenosky, 1979, 1985, 1991; Kushad and Yelenosky, 1987a; Vu and Yelenosky, 1992). En los experimentos de los capítulos 1 y 2 se muestra que efectivamente es un osmolito que resulta importante en cítricos, pero no conocemos exactamente su implicación en los patrones de cítricos. Sí es cierto que en el capítulo 1 el transportador PROT2 se encuentra más expresado en raíces de *P. trifoliata* que en los genotipos Carrizo y *C. macrophylla* de manera basal, por lo que la planta podría estar intentando captar prolina del medio con el fin de introducirla en la planta con el fin de aumentar sus niveles de prolina independientemente de la que sintetice por sí misma (Ashraf and Foolad, 2007; Hayat *et al.*, 2012; de Carvalho *et al.*, 2013; Vives-Peris, Gómez-Cadenas and Pérez-Clemente, 2017; Mohammadrezakhani *et al.*, 2019b). Esto nos da a entender que el aminoácido prolina pueda tener un importante papel en los cítricos, quizás no como osmolito, pero con otras funciones previamente atribuidas como detoxificador de ROS y estabilizador de membranas (Arbona and Gómez-Cadenas, 2008).

La rafinosa y la trealosa también resultaron dos osmolitos importantes en la sensibilidad/tolerancia a estrés por frío en los patrones de cítricos. Este hecho también se conocía previamente en otras especies como álamo (L. Liu *et al.*, 2021), pepino (Gu *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2021) o tomate (Liu *et al.*, 2020).

El estudio transcriptómico que se realizó en la presente tesis es el primer estudio de RNA-seq de estrés por bajas temperaturas realizado en cítricos injertados. Varios son los estudios transcriptómicos publicados en cítricos en estrés por bajas temperaturas con genotipos como *P. trifoliata* (Peng *et al.*, 2012; Wang, Zhang and Liu, 2015), pero sin tener en cuenta el efecto del patrón sobre la variedad. Este estudio nos ha permitido conocer la interacción entre el patrón y la variedad. Así pues, el presente estudio confirmó las diferencias previamente observadas en otros experimentos que realizamos, como es la respuesta central a frío por el “core” de genes CBF o respuesta dependiente de CBF y la inducción de la ruta de síntesis de prolina. Además, a pesar de la parada total de los parámetros fisiológicos que se mostraron en el experimento 3, en el capítulo 2, gracias a la técnica de la fluorescencia de la clorofila junto con los resultados transcriptómicos llegamos a poder corroborar que los fotosistemas y su protección también son un robusto indicador fisiológico de tolerancia/sensibilidad al estrés por bajas temperaturas y además con carácter transmisible de patrón a variedad. En este sentido, la activación de la ruta de antocianos y flavonoides nos causó un gran interés ya que estos metabolitos secundarios actúan a diferentes niveles como antioxidantes actuando como detoxificadores de ROS y protegiendo los fotosistemas (Chalker-Scott, 2002; Rapisarda *et al.*, 2008; Guo, Han and Wang, 2009; Ou *et al.*, 2013).

Por otro lado, esta técnica del RNA-seq también nos permitió ver más allá de las relaciones hídricas que no arrojaron diferencias significativas. El transcriptoma nos permitió observar las importantes diferencias que sufren las acuaporinas *PIP1-2*, *PIP2-2* y *PIP2-5* que se encuentran sobreexpresadas en el patrón CAR y su implicación en la tolerancia/sensibilidad y a poder intuir que, a nivel intracelular, pueda haber diferencias importantes en el contenido de agua activa (Jozefkowicz *et al.*, 2013; Yaneff *et al.*, 2014; Rahman *et al.*, 2020), aunque para demostrarlo hagan falta realizar más experimentos.

El RNA-seq junto con la cuantificación de hormonas, como el ABA, nos permitió comprobar las diferencias de un importante mecanismo de transporte y comunicación raíz/hoja entre patrón/variedad que previamente ya se había observado (Else *et al.*, 2001; Rodríguez-Gamir *et al.*, 2011; Arbona *et al.*, 2017; González-Guzmán, Gómez-Cadenas and Arbona, 2021). Este hecho convierte a los transportadores de ABA, *ABCG40* y *ABCG22* como serios candidatos en la interacción entre patrón/variedad en el estrés por frío en los cítricos y que, por su puesto, hemos tenido en cuenta en nuestro programa de mejora de patrones.

El experimento realizado de conservación a baja temperatura de fruto en la variedad pigmentada con Tarocco Rosso, nos permitió confirmar la importancia de la ruta de los antocianos en la tolerancia/sensibilidad y que, además, es

transmisible a fruto. Más experimentos para confirmarlo serían necesarios, pero podemos pensar que los patrones tolerantes a bajas temperaturas serían mejores para el cultivo de las naranjas pigmentadas.

Como perspectivas futuras, reseñar la importancia de poder llegar a detectar la molécula que controla todas o parte de estas respuestas que se han detectado en la presente tesis doctoral y que resultan de la interacción entre patrón/variedad ya que el estrés por frío como se ha dicho anteriormente es un carácter multigénico. Estas moléculas estarían a un nivel de control por encima del que nos ofrece un análisis de RNA-seq. Una de las posibilidades que en los últimos años está adquiriendo un gran interés es el control de la transcripción a partir de microRNAs. Son moléculas pequeñas y que además pueden viajar a través de la planta y controlar la expresión de genes muy dispares (Megha, Basu and Kav, 2018; Anwar and Kim, 2020). Se conocen un gran número de microRNAs para diferentes estreses abióticos y también concretamente para el estrés por bajas temperaturas. Los microRNAs son una clase de moléculas de RNA de simple cadena no codificante de 18 a 24 nucleótidos de longitud (Megha, Basu and Kav, 2018; Anwar and Kim, 2020) y que controlan la expresión génica a nivel post-transcripcional por lo que podrían ser unas moléculas clave en la interacción patrón/variedad. Algunos ejemplos de microRNAs que intervienen en la sensibilidad/tolerancia a bajas temperaturas en otras especies son miR396, miR397 o el miR319 en arroz, trigo, tomate y *Arabidopsis* (Liu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016; Q. Liu *et al.*, 2017; Abla *et al.*, 2019). En cítricos también hay varios estudios realizados en *P. trifoliata* donde se detectaron genes diana para 24 miRNAs conservados sensibles al frío. Entre los genes “target” se encontraron factores de transcripción de las familias MYB, NAC, ARF, SCL8, F-box y NFY que coincidieron, según la bibliografía, con la expresión de los miRNA160 y miRNA169 (Zhang, Li and Liu, 2014).

Conclusiones Generales

1. Se ha conseguido obtener un método de rastreo rápido de potenciales patrones tolerantes a estrés por bajas temperaturas a partir de genes de respuesta rápida como son *CAMTA3*, *CAMTA5*, *COR413 IM1* y *CBF1*.
2. A partir de la técnica de RNA-seq se ha obtenido información de la respuesta a largo plazo o aclimatación a baja temperatura de patrones injertados que nos permitirá continuar con nuestro programa de mejora gracias a la selección de genes candidatos (*CBF1*, *CHS*, *CHI*, *ABCG22* y *ABCG40*).
3. Los estudios realizados a largo plazo nos han permitido conocer los parámetros fisiológicos (Fv/Fm, NPQ y YII) y bioquímicos (azúcares totales, rafinosa, trehalosa y prolina) a tener en cuenta para una segunda fase de rastreo en el programa de mejora.
4. El estudio de la respuesta transcriptómica a largo plazo nos ha permitido conocer más sobre el mecanismo de tolerancia de los genotipos *C. macrophylla* y citrange Carrizo y que, dicha tolerancia se transmite del patrón a la variedad afectando así a la coloración en los frutos de Tarocco Rosso.
5. Uno de los mecanismos de tolerancia de citrange Carrizo podría estar centrado en una mayor señalización del ABA dando lugar a una mayor activación de los genes de respuesta y por tanto una mejor aclimatación de la variedad a la baja temperatura.

Bibliografía

- Aatifa, R., Sheikh, M., Bhat, K.M., Hassan, G.I., Baba, T.R., Alyemeni, M.N., Alsahli, A.A., El-Serehy, H.A., Paray, B.A. and Ahmad, P. (2020) 'Mechanisms Underlying Graft Union Formation and Rootstock Scion Interaction in Horticultural Plants', *Frontiers in Plant Science*, 11, p. 1778.
- Abla, M., Sun, H., Li, Z., Wei, C., Gao, F., Zhou, Y. and Feng, J. (2019) 'Identification of miRNAs and Their Response to Cold Stress in *Astragalus Membranaceus*', *Biomolecules*, 9(5), p. 182. doi: 10.3390/biom9050182.
- Abouzari, A., Solouki, M., Golein, B., Fakheri, B.A. and Sabouri, A. (2020) 'The change trend in physiological traits of 110 citrus accessions in response to cold stress', *Bangladesh Journal of Botany*, 49(2), pp. 375–385. doi:10.3329/bjb.v49i2.49319.
- Abouzari, A., Solouki, M., Golein, B., Fakheri, B.A., Sabouri, A. and Dadras, A.R. (2020) 'Screening of molecular markers associated to cold tolerance- related traits in Citrus', *Scientia Horticulturae*, 263, p. 109145. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109145>.
- Adam, S. and Murthy, S. (2014) 'Effect of Cold Stress on Photosynthesis of Plants and Possible Protection Mechanisms', in *Approaches to Plant Stress and their Management*. Springer India, pp. 219–226.
- Afzal, Z., Howton, T.C., Sun, Y. and Mukhtar, M.S. (2016) 'The Roles of Aquaporins in Plant Stress Responses', *Journal of developmental biology*, 4(1), p. 9. doi:10.3390/jdb4010009.
- Agarwal, M., Hao, Y., Kapoor, A., Dong, C.H., Fujii, H., Zheng, X. and Zhu, J.K. (2006) 'A R2R3 Type MYB Transcription Factor Is Involved in the Cold Regulation of CBF Genes and in Acquired Freezing Tolerance', *Journal of Biological Chemistry*, 281(49), pp. 37636–37645.
- Aggarwal, M., Sharma, S., Kaur, N., Pathania, D., Bhandhari, K., Kaushal, N., Kaur, R., Singh, K., Srivastava, A. and Nayyar, H. (2011) 'Exogenous Proline Application Reduces Phytotoxic Effects of Selenium by Minimising Oxidative stress and Improves Growth in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Seedlings', *Biological Trace Element Research*, 140(3), pp. 354–367. doi:10.1007/s12011-010-8699-9.
- Agüero, J., Vives, M., Velázquez, K., Pina, J.A., Navarro, L., Moreno, P. and Guerri, J. (2014)

- 'Effectiveness of gene silencing induced by viral vectors based on Citrus leaf blotch virus is different in *Nicotiana benthamiana* and citrus plants'; *Virology*, 460–461, pp. 154–164. doi:10.1016/J.VIROL.2014.04.017.
- Allen, D.J. and Ort, D.R. (2001)** 'Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants'; *Trends in Plant Science*, 6(1), pp. 36–42. doi:10.1016/S1360-1385(00)01808-2.
- Anderson, J.M., Chow, W.S. and Park, Y.I. (1995)** 'The grand design of photosynthesis: Acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues'; *Photosynthesis Research*, 46(1), pp. 129–139. doi:10.1007/BF00020423.
- Anwar-Hossain, M., Hoque, M.A., Burritt, D.J. and Fujita, M. (2014)** 'Chapter 16 - Proline Protects Plants Against Abiotic Oxidative Stress: Biochemical and Molecular Mechanisms', in. San Diego: Academic Press, pp. 477–522. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00016-2.
- Anwar, A. and Kim, J.K. (2020)** 'Transgenic Breeding Approaches for Improving Abiotic Stress Tolerance: Recent Progress and Future Perspectives'; *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), p. 2695. doi:10.3390/ijms21082695.
- Arbona, V. and Gómez-Cadenas, A. (2008)** 'Hormonal Modulation of Citrus Responses to Flooding'; *Journal of Plant Growth Regulation*, 27(3), p. 241. doi:10.1007/s00344-008-9051-x.
- Arbona, V., Zandalinas, S.I., Manzi, M., González-Guzmán, M., Rodríguez, P.L. and Gómez-Cadenas, A. (2017)** 'Depletion of abscisic acid levels in roots of flooded Carrizo citrange (*P. trifoliata* L. Raf. × *Citrus sinensis* L. Osb.) plants is a stress-specific response associated to the differential expression of PYR/PYL/RCAR receptors'; *Plant Molecular Biology*, 93(6), pp. 623–640. doi:10.1007/s11103-017-0587-7.
- Aro, E.M., Virgin, I. and Andersson, B. (1993)** 'Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover'; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1143(2), pp. 113–134. doi:https://doi.org/10.1016/0005-2728(93)90134-2.
- Ashraf, M. and Foolad, M.R. (2007)** 'Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance'; *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), pp. 206–216. doi:https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.006.
- Attaway, J.A. (1997)** *A History of Florida Citrus Freezes*. Florida Science Source.
- Badawi, M., Reddy, Y.V., Agharbaoui, Z., Tominaga, Y., Danyluk, J., Sarhan, F. and Houde, M. (2008)** 'Structure and Functional Analysis of Wheat ICE (Inducer of CBF Expression) Genes'; *Plant and Cell Physiology*, 49(8), pp. 1237–1249. doi:10.1093/pcp/pcn100.
- Baker, N.R. (1996)** 'Photoinhibition of Photosynthesis', in Jennings, R.C., Zucchelli, G., Ghetti, F., and Colombetti, G. (eds) *Light as an Energy Source and Information Carrier in Plant Physiology*. Boston, MA: Springer US, pp. 89–97. doi:10.1007/978-1-4613-0409-8_7.
- Barbagallo, R.N., Palmeri, R., Fabiano, S., Rapisarda, P. and Spagna, G. (2007)** 'Characteristic of β -glucosidase from Sicilian blood oranges in relation to anthocyanin degradation'; *Enzyme and Microbial Technology*, 41(5), pp. 570–575. doi:https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.05.006.
- Barkatky, S., Ebel, R.C., Morgan, K.T. and Dansereau, K. (2013)** 'Water Relations of Well-watered Citrus Exposed to Cold-acclimating Temperatures'; *HortScience horts*, 48(10), pp. 1309–1312. doi:10.21273/HORTSCI.48.10.1309.
- Baron, K.N., Schroeder, D.F. and Stasolla, C. (2012)** 'Transcriptional response of abscisic acid (ABA) metabolism and transport to cold and heat stress applied at the reproductive stage of development in *A. thaliana*'; *Plant Science*, 188–189, pp. 48–59. doi:https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.03.001.
- Barreca, D., Bellocco, E., Leuzzi, U. and Gattuso, G. (2014)** 'First evidence of C- and O-glycosyl flavone in blood orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) juice and their influence on antioxidant properties'; *Food Chemistry*, 149, pp. 244–252. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.096.
- Baudry, A., Caboche, M. and Lepiniec, L. (2006)** 'TT8 controls its own expression in a feedback regulation involving TTG1 and homologous MYB and bHLH factors, allowing a strong and cell-specific accumulation of flavonoids in *A. thaliana*'; *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 46(5), pp. 768–779. doi:10.1111/j.1365-313x.2006.02733.x.

- Baudry, A., Heim, M.A., Dubreucq, B., Caboche, M., Weisshaar, B. and Lepiniec, L. (2004)** 'TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *A. thaliana*', *The Plant Journal*, 39(3), pp. 366–380. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02138.x>.
- Beheshti Rooy, S.S., Hosseini Salekdeh, G., Ghabooli, M., Gholami, M. and Karimi, R. (2017)** 'Cold-induced physiological and biochemical responses of three grapevine cultivars differing in cold tolerance', *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(12), p. 264. doi:10.1007/s11738-017-2561-z.
- Behrens, C.J., Krahe, N.K., Linke, D. and Berger, R.G. (2018)** 'BadGluc, a β -glucosidase from *Bjerkandera adusta* with anthocyanase properties', *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41(9), pp. 1391–1401. doi:10.1007/s00449-018-1966-4.
- Ben-Ahmed, C., Magdich, S., Ben-Rouina, B., Sensoy, S., Boukhris, M. and Ben-Abdullah, F. (2011)** 'Exogenous proline effects on water relations and ions contents in leaves and roots of young olive', *Amino Acids*, 40(2), pp. 565–573. doi:10.1007/s00726-010-0677-1.
- Benedict, C., Skinner, J.S., Meng, R., Chang, Y., Bhalarao, R., Huner, N.P.A., Finn, C.E., Chen, T.H.H. and Hurry, V. (2006)** 'The CBF1-dependent low temperature signalling pathway, regulon and increase in freeze tolerance are conserved in *Populus* spp', *Plant, Cell and Environment*, 29(7), pp. 1259–1272. doi:10.1111/j.1365-3040.2006.01505.x.
- Berry, J. and Bjorkman, O. (1980)** 'Photosynthetic Response and Adaptation to Temperature in Higher Plants', *Annual Review of Plant Physiology*, 31(1), pp. 491–543. doi:10.1146/annurev.pp.31.060180.002423.
- Bharti, P., Mahajan, M., Vishwakarma, A.K., Bhardwaj, J. and Yadav, S.K. (2015)** 'AtROS1 overexpression provides evidence for epigenetic regulation of genes encoding enzymes of flavonoid biosynthesis and antioxidant pathways during salt stress in transgenic tobacco', *Journal of Experimental Botany*, 66(19), pp. 5959–5969. doi:10.1093/jxb/erv304.
- Bhatia, C., Pandey, A., Gaddam, S.R., Hoecker, U. and Trivedi, P.K. (2018)** 'Low Temperature-Enhanced Flavonol Synthesis Requires Light-Associated Regulatory Components in *A. thaliana*', *Plant and Cell Physiology*, 59(10), pp. 2099–2112. doi:10.1093/pcp/pcy132.
- Bolger, A.M., Lohse, M. and Usadel, B. (2014)** 'Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data', *Bioinformatics*, 30(15), pp. 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
- Bolouri-Moghaddam, M.R., Le-Roy, K., Xiang, L., Rolland, F. and Van den Ende, W. (2010)** 'Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells', *The FEBS Journal*, 277(9), pp. 2022–2037. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07633.x>.
- Borevitz, J.O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R.A. and Lamb, C. (2000)** 'Activation Tagging Identifies a Conserved MYB Regulator of Phenylpropanoid Biosynthesis', *The Plant Cell*, 12(12), pp. 2383–2393. doi:10.1105/tpc.12.12.2383.
- Boudsocq, M., Droillard, M.J., Barbier-Brygoo, H. and Laurière, C. (2007)** 'Different phosphorylation mechanisms are involved in the activation of sucrose non-fermenting 1 related protein kinases 2 by osmotic stresses and abscisic acid', *Plant Molecular Biology*, 63(4), pp. 491–503. doi:10.1007/s11103-006-9103-1.
- Bray, E.A. (1997)** 'Plant responses to water deficit', *Trends in Plant Science*, 2(2), pp. 48–54. doi:10.1016/S1360-1385(97)82562-9.
- Breton, G., Danyluk, J., Charron, J.B.F. and Sarhan, F. (2003)** 'Expression profiling and bioinformatic analyses of a novel stress-regulated multispanning transmembrane protein family from cereals and *Arabidopsis*', *Plant physiology*, 132(1), pp. 64–74. doi:10.1104/pp.102.015255.
- Brunner, A.M., Yakovlev, I.A. and Strauss, S.H. (2004)** 'Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies', *BMC plant biology*, 4, p. 14. doi:10.1186/1471-2229-4-14.
- Cai, J., Zeng, F., Zheng, S., Huang, X., Zhang, J., Zhang, P. and Fei, P. (2020)** 'Preparation of Lipid-Soluble Bilberry Anthocyanins through Acylation with Cinnamic Acids and their Antioxidation Activities', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(28), pp. 7467–7473. doi:10.1021/acs.jafc.0c01912.
- Calatayud, Á., San-Bautista, A., Pascual, B., Maroto, J.V. and López-Galarza, S. (2013)** 'Use of chlorophyll fluorescence imaging as diagnostic technique to predict compatibility in melon graft', *Scientia Horticulturae*, 149, pp. 13–18. doi:10.1016/j.scienta.2012.04.019.

- Callister, A.N., Arndt, S.K. and Adams, M.A. (2006)** 'Comparison of four methods for measuring osmotic potential of tree leaves'; *Physiologia Plantarum*, 127(3), pp. 383–392. doi:10.1111/j.1399-3054.2006.00652.x.
- Cambra-Álvarez, M. and Gorris-Grancha, M. (2004)** 'La tristeza de los cítricos en España y otros países mediterráneos'; *Vida Rural*, pp. 44–49.
- Cao, G., Sofic, E. and Prior, R.L. (1996)** 'Antioxidant Capacity of Tea and Common Vegetables'; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(11), pp. 3426–3431. doi:10.1021/jf9602535.
- de Carvalho, K., de Campos, M.K.F., Domingues, D.S., Pereira, L.F.P. and Vieira, L.G.E. (2013)** 'The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic Swingle citrumelo'; *Molecular Biology Reports*, 40(4), pp. 3269–3279. doi:10.1007/s11033-012-2402-5.
- Catalá, R., Medina, J. and Salinas, J. (2011)** 'Integration of low temperature and light signaling during cold acclimation response in Arabidopsis'; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(39), pp. 16475–80. doi:10.1073/pnas.1107161108.
- Catalá, R., Santos, E., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Martínez-Zapater, J.M. and Salinas, J. (2003)** 'Mutations in the Ca²⁺/H⁺ Transporter CAX1 Increase CBF/DREB1 Expression and the Cold-Acclimation Response in Arabidopsis'; *The Plant Cell*, 15(12), pp. 2940–2951. doi:10.1105/tpc.015248.
- Cebadera-Miranda, L., Domínguez, L., Dias, M.I., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., Igual, M., Martínez-Navarrete, N., Fernández-Ruiz, V., Morales, P. and Cámara, M. (2019)** 'Sanguinello and Tarocco (Citrus sinensis [L.] Osbeck): Bioactive compounds and colour appearance of blood oranges'; *Food Chemistry*, 270, pp. 395–402. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.094.
- Chae, L.W., Baek, W., Sang-Wook, H. and Sung, C.L. (2013)** 'Arabidopsis PYL8 Plays an Important Role for ABA Signaling and Drought Stress Responses'; *Plant Pathol J*, 29(4), pp. 471–476. doi:10.5423/PPJ.NT.07.2013.0071.
- Chalker-Scott, L. (2002)** 'Do anthocyanins function as osmoregulators in leaf tissues?'; *Advances in Botanical Research*, 37, pp. 103–127. doi:10.1016/S0065-2296(02)37046-0.
- Champ, K.I., Febres, V.J. and Moore, G.A. (2007)** 'The role of CBF transcriptional activators in two Citrus species (Poncirus and Citrus) with contrasting levels of freezing tolerance'; *Physiologia Plantarum*, 129(3), pp. 529–541. doi:10.1111/j.1399-3054.2006.00826.x.
- Chater, C., Kamisugi, Y., Movahedi, M., Fleming, A., Cuming, A.C., Gray, J.E. and Beerling, D.J. (2011)** 'Regulatory mechanism controlling stomatal behavior conserved across 400 million years of land plant evolution'; *Current biology : CB*, 21(12), pp. 1025–1029. doi:10.1016/j.cub.2011.04.032.
- Chaumont, F., Barrieu, F., Wojcik, E., Chrispeels, M.J. and Jung, R. (2001)** 'Aquaporins Constitute a Large and Highly Divergent Protein Family in Maize'; *Plant Physiology*, 125(3), p. 1206. doi:10.1104/pp.125.3.1206.
- Chen, C.C., Liang, C.S., Kao, A.L. and Yang, C.C. (2010)** 'HHP1, a novel signalling component in the cross-talk between the cold and osmotic signalling pathways in Arabidopsis'; *Journal of experimental botany*. 2010/06/21, 61(12), pp. 3305–3320. doi:10.1093/jxb/erq162.
- Chen, T.H.H. and Murata, N. (2008)** 'Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants'; *Trends in Plant Science*, 13(9), pp. 499–505. doi:https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.06.007.
- Chica, E.J. and Albrigo, L.G. (2013)** 'Expression of Flower Promoting Genes in Sweet Orange during Floral Inductive Water Deficits'; *Journal of the American Society for Horticultural Science J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 138(2), pp. 88–94. doi:10.21273/JASHS.138.2.88.
- Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B. h., Hong, X., Agarwal, M. and Zhu, J.K. (2003)** 'ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis'; 17(8), pp. 1043–1054. doi:10.1101/gad.1077503.
- Chinnusamy, V., Zhu, J.K.J. and Zhu, J.K.J. (2007)** 'Cold stress regulation of gene expression in plants'; *Trends in Plant Science*, 12(10), pp. 444–451. doi:10.1016/j.tplants.2007.07.002.
- Cohen, J., Jones, J., Furtado, J. and Tziperman, E. (2013)** 'Warm Arctic, Cold Continents: A Common Pattern Related to Arctic Sea Ice Melt, Snow Advance, and Extreme Winter

- Weather', *Oceanography*, 26(4). doi:10.5670/oceanog.2013.70.
- Cominelli, E., Gusmaroli, G., Allegra, D., Galbiati, M., Wade, H.K., Jenkins, G.I. and Tonelli, C. (2008)** 'Expression analysis of anthocyanin regulatory genes in response to different light qualities in *A. thaliana*', *Journal of Plant Physiology*, 165(8), pp. 886–894. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.06.010>.
- Correa-Galvis, V., Poschmann, G., Melzer, M., Stühler, K. and Jahns, P. (2016)** 'PsbS interactions involved in the activation of energy dissipation in Arabidopsis', *Nature Plants*, 2(2), p. 15225. doi:10.1038/nplants.2015.225.
- Cotroneo, P.S., Russo, M.P., Ciuni, M., Recupero, G.R. and Lo Piero, A.R. (2006)** 'Quantitative Real-time Reverse Transcriptase-PCR Profiling of Anthocyanin Biosynthetic Genes during Orange Fruit Ripening', *Journal of the American Society for Horticultural Science* *jashs*, 131(4), pp. 537–543. doi:10.21273/JASHS.131.4.537.
- Crifo, T., Puglisi, I., Petrone, G., Recupero, G.R. and Lo Piero, A.R. (2011)** 'Expression analysis in response to low temperature stress in blood oranges: Implication of the flavonoid biosynthetic pathway', *Gene*, 476(1), pp. 1–9. doi:<https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.02.005>.
- Cruz, J.A., Salbilla, B.A., Kanazawa, A. and Kramer, D.M. (2001)** 'Inhibition of plastocyanin to P(700)(+) electron transfer in *Chlamydomonas reinhardtii* by hyperosmotic stress', *Plant physiology*, 127(3), pp. 1167–1179.
- Davenport, T.L. (1990)** 'Citrus Flowering', in Janick, J. (ed.) *Horticultural Reviews*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 349–408.
- Davies, F.S. and Albrigo, L.G. (1994)** *Citrus*. Wallingford: CAB INTERNATIONAL.
- Demmig-Adams, B., Cohu, C.M., Muller, O. and Adams, W.W. (2012)** 'Modulation of photosynthetic energy conversion efficiency in nature: from seconds to seasons', *Photosynthesis Research*, 113(1), pp. 75–88. doi:10.1007/s1120-012-9761-6.
- Ding, Y., Jia, Y., Shi, Y., Zhang, X., Song, C., Gong, Z. and Yang, S. (2018)** 'OST1-mediated BTF3L phosphorylation positively regulates CBFs during plant cold responses', *The EMBO Journal*, 37(8), p. e98228. doi:10.15252/embj.201798228.
- Ding, Y., Li, H., Zhang, X., Xie, Q., Gong, Z. and Yang, S. (2015)** 'OST1 Kinase Modulates Freezing Tolerance by Enhancing ICE1 Stability in Arabidopsis', *Developmental Cell*, 32(3), pp. 278–289. doi:<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.12.023>.
- Ding, Y., Shi, Y. and Yang, S. (2019)** 'Advances and challenges in uncovering cold tolerance regulatory mechanisms in plants', *New Phytologist*, 222(4), pp. 1690–1704. doi:<https://doi.org/10.1111/nph.15696>.
- Dobáková, M., Sobotka, R., Tichý, M. and Komenda, J. (2009)** 'Psb28 Protein Is Involved in the Biogenesis of the Photosystem II Inner Antenna CP47 (PsbB) in the Cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803', *Plant Physiology*, 149(2), pp. 1076–1086. doi:10.1104/pp.108.130039.
- Doherty, C.J., Buskirk, H.A. Van, Myers, S.J. and Thomashow, M.F. (2009)** 'Roles for Arabidopsis CAMTA Transcription Factors in Cold-Regulated Gene Expression and Freezing Tolerance', *The Plant Cell*, 21(3), pp. 972–984. doi:10.1105/tpc.108.063958.
- Dong, C.H., Agarwal, M., Zhang, Y., Xie, Q. and Zhu, J.K. (2006)** 'The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(21), pp. 8281–8286. doi:10.1073/pnas.0602874103.
- Dong, M.A., Farré, E.M. and Thomashow, M.F. (2011)** 'CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 and LATE ELONGATED HYPOCOTYL regulate expression of the C-REPEAT BINDING FACTOR (CBF) pathway in Arabidopsis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(17), pp. 7241–7246. doi:10.1073/PNAS.1103741108.
- Du, H., Liu, H. and Xiong, L. (2013)** 'Endogenous auxin and jasmonic acid levels are differentially modulated by abiotic stresses in rice', *Frontiers in plant science*, 4, p. 397. doi:10.3389/fpls.2013.00397.
- Du, X., Yu, R., Shi, C., Wang, Y., Meng, R., Shi, W., Jin, M., Wei, X. and Sun, T. (2021)** 'Comparative transcriptomics reveals osmotic and ionic stress key genes contributing to the difference in the salinity tolerance of two pak choi cultivars', *Environmental and Experimental Botany*, 191, p. 104621. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104621>.
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C. and Lepiniec, L. (2010)** 'MYB transcription factors in Arabidopsis', *Trends in Plant Science*, 15(10),

- pp. 573–581. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.06.005>.
- ElSayed, A.I., Rafudeen, M.S. and Gollack, D. (2014)** 'Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress', *Plant Biology*, 16(1), pp. 1–8. doi:10.1111/plb.12053.
- Else, M.A., Coupland, D., Dutton, L. and Jackson, M.B. (2001)** 'Decreased root hydraulic conductivity reduces leaf water potential, initiates stomatal closure and slows leaf expansion in flooded plants of castor oil (*Ricinus communis*) despite diminished delivery of ABA from the roots to shoots in xylem sap', *Physiologia Plantarum*, 111(1), pp. 46–54. doi:<https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1110107.x>.
- Eremina, M., Rozhon, W. and Poppenberger, B. (2016)** 'Hormonal control of cold stress responses in plants', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(4), pp. 797–810. doi:10.1007/s00018-015-2089-6.
- Estornell, L.H., Gómez, M.D., Pérez-Amador, M.A., Talón, M. and Tadeo, F.R. (2016)** 'Secondary abscission zones: understanding the molecular mechanisms triggering stylar abscission in citrus', *Acta Horticulturae*, (1119), pp. 65–72. doi:10.17660/ActaHortic.2016.1119.9.
- Fetter, K., Van Wilder, V., Moshelion, M. and Chaumont, F. (2004)** 'Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity', *The Plant cell*. 2003/12/11, 16(1), pp. 215–228. doi:10.1105/tpc.017194.
- Finkelstein, R. (2013)** 'Abscisic Acid synthesis and response', *The arabidopsis book*, 11, pp. e0166–e0166. doi:10.1199/tab.0166.
- Finkelstein, R.R. and Gibson, S.I. (2002)** 'ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd?', *Current Opinion in Plant Biology*, 5(1), pp. 26–32. doi:[https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(01\)00225-4](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(01)00225-4).
- Flexas, J., Bota, J., Escalona, J.M., Sampol, B. and Medrano, H. (2002)** 'Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations', *Functional Plant Biology*, 29(4), pp. 461–471. Available at: <https://doi.org/10.1071/PP01119>.
- Forner-Giner, M., Alcaide, A., Primo-Millo, E. and Forner, J. (2003)** 'Performance of "Navelina" orange on 14 rootstocks in Northern Valencia (Spain)', *Scientia Horticulturae*, 98(3), pp. 223–232. doi:10.1016/S0304-4238(02)00227-3.
- Forner-Giner, M.A., Llosá, M.J., Carrasco, J.L., Perez-Amador, M.A., Navarro, L. and Ancillo, G. (2009)** 'Differential gene expression analysis provides new insights into the molecular basis of iron deficiency stress response in the citrus rootstock *P. trifoliata* (L.) Raf.', *Journal of Experimental Botany*, 61(2), pp. 483–490. doi:10.1093/jxb/erp328.
- Forner-Giner, M.A., Rodriguez-Gamir, J., Martinez-Alcantara, B., Quiñones, A., Iglesias, D.J., Primo-Millo, E. and Forner, J. (2014)** 'Performance of Navel orange trees grafted onto two new dwarfing rootstocks (Forner-Alcaide 517 and Forner-Alcaide 418)', *Scientia Horticulturae*, 179, pp. 376–387. doi:10.1016/J.SCIEN.2014.07.032.
- Forner, J.B., Forner-Giner, M.A. and Alcaide, A. (2003)** 'Forner-Alcaide 5 and Forner-Alcaide 13: Two New Citrus Rootstocks Released in Spain', *HortScience HortSci*, 38(4), pp. 629–630. doi:10.21273/HORTSCI.38.4.629.
- Forrest, K.L. and Bhawe, M. (2007)** 'Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: a complex gene family with major impacts on plant phenotype', *Functional & Integrative Genomics*, 7(4), p. 263. doi:10.1007/s10142-007-0049-4.
- Foyer, C.H. and Shigeoka, S. (2011)** 'Understanding Oxidative Stress and Antioxidant Functions to Enhance Photosynthesis', *Plant Physiology*, 155(1), p. 93. doi:10.1104/pp.110.166181.
- Franklin, K.A., Praekelt, U., Stoddart, W.M., Billingham, O.E., Halliday, K.J. and Whitelam, G.C. (2003)** 'Phytochromes B, D, and E Act Redundantly to Control Multiple Physiological Responses in Arabidopsis', *Plant Physiology*, 131(3), p. 1340. doi:10.1104/pp.102.015487.
- Franklin, K.A. and Whitelam, G.C. (2007)** 'Light-quality regulation of freezing tolerance in *A. thaliana*', *Nature Genetics*, 39(11), pp. 1410–1413. doi:10.1038/ng.2007.3.
- Gao, Q.H., Xu, K., Wang, X.F. and Wu, Y. (2008)** 'Effect of grafting on cold tolerance in eggplant seedlings', *Acta Horticulturae*, (771), pp. 167–174. doi:10.17660/ActaHortic.2008.771.25.
- Garcia-Maquilon, I., Coego, A., Lozano-Juste, J., Messerer, M., de Ollas, C., Julian,**

- J., Ruiz-Partida, R., Pizzio, G., Belda-Palazón, B., Gomez-Cadenas, A., Mayer, K.F.X., Geiger, D., Alquraishi, S.A., Alrefaei, A.F., Ache, P., Hedrich, R. and Rodriguez, P.L. (2021) 'PYL8 ABA receptors of Phoenix dactylifera play a crucial role in response to abiotic stress and are stabilized by ABA', *Journal of Experimental Botany*, 72(2), pp. 757–774. doi:10.1093/jxb/eraa476.
- Geng, J., Wei, T., Wang, Y., Huang, X. and Liu, J.H. (2019) 'Overexpression of PtrbHLH, a basic helix-loop-helix transcription factor from *P. trifoliata*, confers enhanced cold tolerance in pummelo (*Citrus grandis*) by modulation of H₂O₂ level via regulating a CAT gene', *Tree Physiology*, 39(12), pp. 2045–2054. doi:10.1093/treephys/tpz081.
- Genskowsky, E., Puente, L.A., Pérez-Álvarez, J.A., Fernández-López, J., Muñoz, L.A. and Viuda-Martos, M. (2016) 'Determination of polyphenolic profile, antioxidant activity and antibacterial properties of maqui [*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz] a Chilean blackberry', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(12), pp. 4235–4242. doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.7628>.
- Gomez-Cadenas, A., Tadeo, F.R., Talon, M. and Primo-Millo, E. (1996) 'Leaf Abscission Induced by Ethylene in Water-Stressed Intact Seedlings of Cleopatra Mandarin Requires Previous Abscisic Acid Accumulation in Roots', *Plant Physiology*, 112(1), pp. 401–408. doi:10.1104/pp.112.1.401.
- Gong, Z., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R., Roldán-Arjona, T., David, L. and Zhu, J.-K. (2002) 'ROS1, a Repressor of Transcriptional Gene Silencing in Arabidopsis, Encodes a DNA Glycosylase/Lyase', *Cell*, 111(6), pp. 803–814. doi:10.1016/S0092-8674(02)01133-9.
- González-Guzmán, M., Gómez-Cadenas, A. and Arbona, V. (2021) 'Abscisic Acid as an Emerging Modulator of the Responses of Plants to Low Oxygen Conditions', *Frontiers in Plant Science*, 12, p. 755.
- González-Mas, M.C., Llosa, M.J., Quijano, A. and Forner-Giner, M.A. (2009) 'Rootstock Effects on Leaf Photosynthesis in "Navelina" Trees Grown in Calcareous Soil', *HortScience horts*, 44(2), pp. 280–283. doi:10.21273/HORTSCI.44.2.280.
- Goodstein, D.M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R.D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N. and Rokhsar, D.S. (2012) 'Phytozome: a comparative platform for green plant genomics', *Nucleic acids research*, (Database issue), pp. D1178–D1186. doi:10.1093/nar/gkr944.
- Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Williams, T.D., Nagaraj, S.H., Nueda, M.J., Robles, M., Talón, M., Dopazo, J. and Conesa, A. (2008) 'High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite', *Nucleic Acids Research*, 36(10), pp. 3420–3435. doi:10.1093/nar/gkn176.
- Grallath, S., Weimar, T., Meyer, A., Gummy, C., Suter-Grotemeyer, M., Neuhaus, J.-M. and Rentsch, D. (2005) 'The AtProT Family. Compatible Solute Transporters with Similar Substrate Specificity But Differential Expression Patterns', *Plant Physiology*, 137(1), p. 117. doi:10.1104/pp.104.055079.
- Grasse, N., Mamedov, F., Becker, K., Styring, S., Rögner, M. and Nowaczyk, M.M. (2011) 'Role of Novel Dimeric Photosystem II (PSII)-Psb27 Protein Complex in PSII Repair*', *Journal of Biological Chemistry*, 286(34), pp. 29548–29555. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.238394>.
- Gray, G.R., Chauvin, L.P., Sarhan, F. and Huner, N.P.A. (1997) 'Cold Acclimation and Freezing Tolerance (A Complex Interaction of Light and Temperature)', *Plant Physiology*, 114(2), p. 467. doi:10.1104/pp.114.2.467.
- Gu, H., Lu, M., Zhang, Z., Xu, J., Cao, W. and Miao, M. (2018) 'Metabolic process of raffinose family oligosaccharides during cold stress and recovery in cucumber leaves', *Journal of Plant Physiology*, 224–225, pp. 112–120. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.03.012>.
- Guo, J., Han, W. and Wang, M.-H. (2009) 'Ultraviolet and environmental stresses involved in the induction and regulation of anthocyanin biosynthesis: A review', *African Journal of Biotechnology*, 725, pp. 4966–4972.
- Guo, Y., Halfter, U., Ishitani, M. and Zhu, J.K. (2001) 'Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance', *The Plant cell*, 13(6), pp. 1383–1400. doi:10.1105/tpc.13.6.1383.
- Gupta, A.B. and Sankaramakrishnan, R. (2009) 'Genome-wide analysis of major intrinsic proteins in the tree plant *Populus trichocarpa*: characterization of XIP subfamily of aquaporins from evolutionary perspective', *BMC plant biology*, 9, p. 134. doi:10.1186/1471-2229-9-134.

- Gururani, M.A., Venkatesh, J. and Tran, L.S.P. (2015)** 'Regulation of Photosynthesis during Abiotic Stress-Induced Photoinhibition', *Molecular Plant*, 8(9), pp. 1304–1320. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.05.005>.
- Hanson, P.M., Yang, R.Y., Tsou, S.C.S., Ledesma, D., Engle, L. and Lee, T.C. (2006)** 'Diversity in eggplant (*Solanum melongena*) for superoxide scavenging activity, total phenolics, and ascorbic acid', *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6), pp. 594–600. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.03.001>.
- Hara, M., Terashima, S., Fukaya, T. and Kuboi, T. (2003)** 'Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco', *Planta*, 217(2), pp. 290–298. doi:10.1007/s00425-003-0986-7.
- Hare, P.D. and Cress, W.A. (1997)** 'Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants', *Plant Growth Regulation*, 21(2), pp. 79–102. doi:10.1023/A:1005703923347.
- Hare, P.D., Cress, W.A. and Van Staden, J. (1998)** 'Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress', *Plant, Cell & Environment*, 21(6), pp. 535–553. doi:10.1046/j.1365-3040.1998.00309.x.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M.N., Wani, A.S., Pichtel, J. and Ahmad, A. (2012)** 'Role of proline under changing environments', *Plant Signaling & Behavior*, 7(11), pp. 1456–1466. doi:10.4161/psb.21949.
- He, L.G., Jiang, Y.C., Wang, H.L., Xu, M. and Sun, Z.H. (2016)** 'Expression and regulation of a cold-responsive gene, *CsCBF* in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck under low temperature, high salinity and abscisic acid', *Acta Horticulturae* [Preprint], (1135). doi:10.17660/ActaHortic.2016.1135.5.
- He, L.G., Wang, H.L., Liu, D.C., Zhao, Y.J., Xu, M., Zhu, M., Wei, G.Q. and Sun, Z.H. (2012)** 'Isolation and expression of a cold-responsive gene *PtCBF* in *P. trifoliata* and isolation of citrus *CBF* promoters', *Biologia Plantarum*, 56(3), pp. 484–492. doi:10.1007/s10535-012-0059-5.
- He, Z., Zhao, T., Yin, Z., Liu, J., Cheng, Y. and Xu, J. (2020)** 'The phytochrome-interacting transcription factor *CsPIF8* contributes to cold tolerance in citrus by regulating superoxide dismutase expression', *Plant Science*, 298, p. 110584. doi:<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110584>.
- Herrmann, H.A., Schwartz, J.M. and Johnson, G.N. (2019)** 'Metabolic acclimation—a key to enhancing photosynthesis in changing environments?', *Journal of Experimental Botany*, 70(12), pp. 3043–3056. doi:10.1093/jxb/erz157.
- Hikosaka, K., Ishikawa, K., Borjigidai, A., Muller, O. and Onoda, Y. (2006)** 'Temperature acclimation of photosynthesis: mechanisms involved in the changes in temperature dependence of photosynthetic rate', *Journal of Experimental Botany*, 57(2), pp. 291–302. doi:10.1093/jxb/erj049.
- Ho, C.H., Lin, S.H., Hu, H.C. and Tsay, Y.F. (2009)** 'CHL1 Functions as a Nitrate Sensor in Plants', *Cell*, 138(6), pp. 1184–1194. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.004>.
- Hu, C.A., Delauney, A.J. and Verma, D.P. (1992)** 'A bifunctional enzyme (delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(19), pp. 9354–9358. doi:10.1073/pnas.89.19.9354.
- Hu, Y., Jiang, L., Wang, F. and Yu, D. (2013)** 'Jasmonate Regulates the INDUCER OF CBF EXPRESSION-C-REPEAT BINDING FACTOR/DRE BINDING FACTOR1 Cascade and Freezing Tolerance in Arabidopsis', *The Plant Cell*, 25(8), p. 2907. doi:10.1105/tpc.113.112631.
- Hua, Y., Huang, L., Li qun, R., Gui you, L., Guo rong, S. and Guo ping, P. (2013)** 'Effects of exogenous ABA on antioxidant enzymes in detached citrus leaves treated by rapid freezing', *African Journal of Biotechnology*, 10(48), pp. 9779–9785. doi:10.5897/AJB11.537.
- Huang, C., Zhou, S., Hu, W., Deng, X., Wei, S., Yang, G. and He, G. (2014)** 'The Wheat Aquaporin Gene *TaAQP7* Confers Tolerance to Cold Stress in Transgenic Tobacco', *Zeitschrift für Naturforschung C*, 69(3–4), pp. 142–148. doi:10.5560/znc.2013-0079.
- Huang, D., Yuan, Y., Tang, Z., Huang, Y., Kang, C., Deng, X. and Xu, Q. (2019)** 'Retrotransposon promoter of *Ruby1* controls both light- and cold-induced accumulation of anthocyanins in blood orange', *Plant, Cell & Environment*, 42(11), pp. 3092–3104. doi:<https://doi.org/10.1111/pce.13609>.
- Huang, J. (2015)** 'Cloning and expression pattern analysis of ABA receptor genes *NTPYR1*

- and NtPYL9 in nicotiana tabacum', *Tobacco Science and Technology*, 48(7), pp. 1–8. doi:10.16135/j.issn1002-0861.20150701.
- Huang, X.S., Wang, W., Zhang, Q. and Liu, J.H. (2013)** 'A basic helix-loop-helix transcription factor, PtrbHLH, of *P. trifoliata* confers cold tolerance and modulates peroxidase-mediated scavenging of hydrogen peroxide', *Plant Physiology*, 162(2), p. 1178. doi:10.1104/pp.112.210740.
- Huang, X.S., Zhang, Qinghua, Zhu, D., Fu, X., Wang, M., Zhang, Qian, Moriguchi, T. and Liu, J.H. (2015)** 'ICE1 of *P. trifoliata* functions in cold tolerance by modulating polyamine levels through interacting with arginine decarboxylase', *Journal of Experimental Botany*, 66(11), pp. 3259–3274. doi:10.1093/jxb/erv138.
- Huang, Y., Li, C.Y., Qi, Y., Park, S. and Gibson, S.I. (2014)** 'SIS8, a putative mitogen-activated protein kinase kinase kinase, regulates sugar-resistant seedling development in Arabidopsis', *The Plant Journal*, 77(4), pp. 577–588. doi:10.1111/tpj.12404.
- Huang, Y., Si, Y. and Dane, F. (2011)** 'Impact of grafting on cold responsive gene expression in Satsuma mandarin (Citrus unshiu)', *Euphytica*, 177(1), pp. 25–32. doi:10.1007/s10681-010-0243-7.
- Hüner, N.P.A., Bode, R., Dahal, K., Hollis, L., Rosso, D., Krol, M. and Ivanov, A.G. (2012)** 'Chloroplast redox imbalance governs phenotypic plasticity: the "grand design of photosynthesis" revisited', *Frontiers in plant science*, 3, p. 255. doi:10.3389/fpls.2012.00255.
- Hüner, N.P.A., Dahal, K., Bode, R., Kurepin, L. V and Ivanov, A.G. (2016)** 'Photosynthetic acclimation, vernalization, crop productivity and "the grand design of photosynthesis"', *Journal of Plant Physiology*, 203, pp. 29–43. doi:https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.04.006.
- Hwang, J.U., Yim, S., Do, T.H.T., Kang, J. and Lee, Y. (2018)** 'A. thaliana Raf22 protein kinase maintains growth capacity during postgerminative growth arrest under stress', *Plant, Cell & Environment*, 41(7), pp. 1565–1578. doi:10.1111/pce.13199.
- Iba, K. (2002)** 'Acclimative response to temperature stress in higher plants: Approaches of Gene Engineering for Temperature Tolerance', *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), pp. 225–245. doi:10.1146/annurev.arplant.53.100201160729.
- Inch, S., Stover, E., Driggers, R. and Lee, R.F. (2014)** 'Freeze Response of Citrus and Citrus-related Genotypes in a Florida Field Planting', *HortScience horts*, 49(8), pp. 1010–1016. doi:10.21273/HORTSCI.49.8.1010.
- Ishitani, M., Xiong, L., Lee, H., Stevenson, B. and Zhu, J.K. (1998)** 'HOS1, a Genetic Locus Involved in Cold-Responsive Gene Expression in Arabidopsis', *The Plant Cell*, 10(7), p. 1151. doi:10.1105/tpc.10.7.1151.
- Jan, N., ul-Hussain, M. and Andrabji, K.I. (2009)** 'Cold resistance in plants: A mystery unresolved', *Electronic Journal of Biotechnology*, 12(3), pp. 14–15. doi:10.4067/S0717-34582009000300014.
- Janda, T., Szalai, G., Leskó, K., Yordanova, R., Apostol, S. and Popova, L.P. (2007)** 'Factors contributing to enhanced freezing tolerance in wheat during frost hardening in the light', *Phytochemistry*, 68(12), pp. 1674–1682. doi:https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.04.012.
- Jeknić, Z., Pillman, K.A., Dhillon, T., Skinner, J.S., Veisz, O., Cuesta-Marcos, A., Hayes, P.M., Jacobs, A.K., Chen, T.H.H. and Stockinger, E.J. (2014)** 'Hv-CBF2A overexpression in barley accelerates COR gene transcript accumulation and acquisition of freezing tolerance during cold acclimation', *Plant Molecular Biology*, 84(1), pp. 67–82. doi:10.1007/s11103-013-0119-z.
- Jiang, J., Hou, R., Yang, N., Li, L., Deng, J., Qin, G. and Ding, D. (2021)** 'Physiological and TMT-labeled proteomic analyses reveal important roles of sugar and secondary metabolism in Citrus junos under cold stress', *Journal of Proteomics*, 237, p. 104145. doi:https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104145.
- Jimenez-Cuesta, M., Cuquerella, J. and Martínez-Javaga, J.M. (1981)** 'Determination of a color index for citrus fruit degreening', *Proceedings of the International Society of Citriculture*, 2, pp. 750–753.
- Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., Sjövall, S., Fraysse, L., Weig, A.R. and Kjellbom, P. (2001)** 'The Complete Set of Genes Encoding Major Intrinsic Proteins in Arabidopsis Provides a Framework for a New Nomenclature for Major Intrinsic Proteins in Plants', *Plant*

- Physiology*, 126(4), p. 1358. doi:10.1104/pp.126.4.1358.
- Joublan, J.P. and Cordero, N. (2002)** 'Comportamiento de algunos cítricos sobre diferentes portainjertos, en su tercera temporada de crecimiento, Quillón VIII Región, Chile', *Agricultura Técnica*, 62(3), pp. 469–479. doi:10.4067/S0365-28072002000300012.
- Jozefkowicz, C., Rosi, P., Sigaut, L., Soto, G., Pietrasanta, L.I., Amodeo, G. and Alleva, K. (2013)** 'Loop A Is Critical for the Functional Interaction of Two Beta vulgaris PIP Aquaporins', *PLoS ONE*. Edited by D. Fotiadis, 8(3), p. e57993. doi:10.1371/journal.pone.0057993.
- Kamran, M., Shahbaz, M., Ashraf, M. and Akram, N.A. (2009)** 'Alleviation of drought-induced adverse effects in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) using proline as a pre-sowing seed treatment', *Pakistan Journal of Botany*, 41(2), pp. 621–632.
- Kaplan, F. and Guy, C.L. (2004)** 'beta-Amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock', *Plant physiology*. 2004/07/09, 135(3), pp. 1674–1684. doi:10.1104/pp.104.040808.
- Kaur, G. and Asthir, B. (2015)** 'Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance', *Biologia Plantarum*, 59(4), pp. 609–619. doi:10.1007/s10535-015-0549-3.
- Kaushal, N., Gupta, K., Bhandhari, K., Kumar, S., Thakur, P. and Nayyar, H. (2011)** 'Proline induces heat tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) plants by protecting vital enzymes of carbon and antioxidative metabolism', *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 17(3), p. 203. doi:10.1007/s12298-011-0078-2.
- Khedr, A.H.A., Abbas, M.A., Wahid, A.A.A., Quick, W.P. and Abogadallah, G.M. (2003)** 'Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress', *Journal of Experimental Botany*, 54(392), pp. 2553–2562. doi:10.1093/jxb/erg277.
- Kidokoro, S., Yoneda, K., Takasaki, H., Takahashi, F., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017)** 'Different Cold-Signaling Pathways Function in the Responses to Rapid and Gradual Decreases in Temperature', *The Plant cell*. 2017/03/28, 29(4), pp. 760–774. doi:10.1105/tpc.16.00669.
- Kim, S.H., Kim, H.S., Bahk, S., An, J., Yoo, Y., Kim, J.Y. and Chung, W.S. (2017)** 'Phosphorylation of the transcriptional repressor MYB15 by mitogen-activated protein kinase 6 is required for freezing tolerance in *Arabidopsis*', *Nucleic Acids Research*, 45(11), pp. 6613–6627. doi:10.1093/nar/gkx417.
- Kim, Y.S., Lee, M., Lee, J.H., Lee, H.J. and Park, C.M. (2015)** 'The unified ICE-CBF pathway provides a transcriptional feedback control of freezing tolerance during cold acclimation in *Arabidopsis*', *Plant Molecular Biology*, 89(1), pp. 187–201. doi:10.1007/s11103-015-0365-3.
- Kishor, P.B.K., Sangam, S., Amrutha, R.N., Laxmi, P.S., Naidu, K.R., Rao, K.R.S.S., Rao, S., Reddy, K.J., Theriappan, P. and Sreenivasulu, N. (2005)** 'Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance', *Current Science*, 88(3), pp. 424–438. Available at: <http://www.jstor.org/stable/24110209>.
- Knaupp, M., Mishra, K.B., Nedbal, L. and Heyer, A.G. (2011)** 'Evidence for a role of raffinose in stabilizing photosystem II during freeze-thaw cycles', *Planta*, 234(3), pp. 477–486. doi:10.1007/s00425-011-1413-0.
- Knight, H. (1999)** 'Calcium Signaling during Abiotic Stress in Plants', in *International Review of Cytology*. Academic Press, pp. 269–324.
- Knight, M.R. and Knight, H. (2012)** 'Low-temperature perception leading to gene expression and cold tolerance in higher plants', *New Phytologist*, 195(4), pp. 737–751. doi:10.1111/j.1469-8137.2012.04239.x.
- Kodra, E., Steinhäuser, K. and Ganguly, A.R. (2011)** 'Persisting cold extremes under 21st-century warming scenarios', *Geophysical Research Letters*, 38(8), p. L08705. doi:10.1029/2011GL047103.
- Kosová, K., Prášil, I.T., Vítámvás, P., Dobrev, P., Motyka, V., Floková, K., Novák, O., Turečková, V., Rolčík, J., Pešek, B., Trávníčková, A., Gaudinová, A., Galiba, G., Janda, T., Vlasáková, E., Prášilová, P. and Vanková, R. (2012)** 'Complex phytohormone responses during the cold acclimation of two wheat cultivars differing in cold tolerance, winter Samanta and spring Sandra', *Journal of Plant Physiology*, 169(6), pp. 567–576. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.12.013>.

- Kriedemann, P.E. and Barrs, H.D. (1981) 'Chapter 5 - Citrus orchards'; in Kozlowski, T.T. (ed.) *Woody Plant Communities*. Academic Press, pp. 325–417. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-424156-5.50011-1>.
- Kromdijk, J., Glowacka, K., Leonelli, L., Gabilly, S.T., Iwai, M., Niyogi, K.K. and Long, S.P. (2016) 'Improving photosynthesis and crop productivity by accelerating recovery from photoprotection', *Science*, 354(6314), p. 857. doi:10.1126/science.aai8878.
- Kudoh, H. and Sonoike, K. (2002) 'Irreversible damage to photosystem I by chilling in the light: cause of the degradation of chlorophyll after returning to normal growth temperature', *Planta*, 215(4), pp. 541–548. doi:10.1007/s00425-002-0790-9.
- Kumari, A., Kumar, J., Kumar, A., Chaudhury, A. and Singh, S.P. (2015) 'Grafting triggers differential responses between scion and rootstock', *PLoS one*, 10(4), pp. e0124438–e0124438. doi:10.1371/journal.pone.0124438.
- Kushad, M.M. and Yelenosky, G. (1987a) 'Evaluation of Polyamine and Proline Levels during Low Temperature Acclimation of Citrus', *Plant Physiology*, 84(3), pp. 692–695. Available at: <http://www.jstor.org/stable/4270698>.
- Kushad, M.M. and Yelenosky, G. (1987b) 'Evaluation of Polyamine and Proline Levels during Low Temperature Acclimation of Citrus 1', *Plant Physiology*, 84(3), pp. 692–695.
- Labate, C.A. and Leegood, R.C. (1988) 'Limitation of photosynthesis by changes in temperature', *Planta*, 173(4), pp. 519–527. doi:10.1007/BF00958965.
- Langmead, B. and Salzberg, S.L. (2012) 'Fast gapped-read alignment with Bowtie 2', *Nature Methods*, 9(4), pp. 357–359. doi:10.1038/nmeth.1923.
- Lau, O.S. and Deng, X.W. (2010) 'Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones', *Current Opinion in Plant Biology*, 13(5), pp. 571–577. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.07.001>.
- Lee, C.M. and Thomashow, M.F. (2012) 'Photoperiodic regulation of the C-repeat binding factor (CBF) cold acclimation pathway and freezing tolerance in *A. thaliana*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(37), p. 15054. doi:10.1073/pnas.1211295109.
- Lee, H.G. and Seo, P.J. (2015) 'The MYB96–HHP module integrates cold and abscisic acid signaling to activate the CBF–COR pathway in Arabidopsis', *The Plant Journal*, 82(6), pp. 962–977. doi:10.1111/tpj.12866.
- Lee, H.Y., Jang, G., Um, T., Kim, J.K., Lee, J.S. and Do Choi, Y. (2015) 'The soluble ABA receptor PYL8 regulates drought resistance by controlling ABA signaling in Arabidopsis', *Plant Biotechnology Reports*, 9(5), pp. 319–330. doi:10.1007/s11816-015-0366-3.
- Lee, J., He, K., Stolc, V., Lee, H., Figueroa, P., Gao, Y., Tongprasit, W., Zhao, H., Lee, I. and Deng, X.W. (2007) 'Analysis of Transcription Factor HY5 Genomic Binding Sites Revealed Its Hierarchical Role in Light Regulation of Development', *The Plant Cell*, 19(3), p. 731. doi:10.1105/tpc.106.047688.
- Lee, S.J., Lee, M.H., Kim, J.I. and Kim, S.Y. (2015) 'Arabidopsis Putative MAP Kinase Kinases Raf10 and Raf11 are Positive Regulators of Seed Dormancy and ABA Response', *Plant and Cell Physiology*, 56(1), pp. 84–97. doi:10.1093/pcp/pcu148.
- Lee, W.J., Jeong, C.Y., Kwon, J., Van Kien, V., Lee, D., Hong, S.W. and Lee, H. (2016) 'Drastic anthocyanin increase in response to PAP1 overexpression in fls1 knockout mutant confers enhanced osmotic stress tolerance in *A. thaliana*', *Plant Cell Reports*, 35(11), pp. 2369–2379. doi:10.1007/s00299-016-2040-9.
- Levitt, J. (1980) *Responses of Plants to Environmental Stresses: Chilling, freezing, and high temperature stresses*. Academic Press.
- Li, B. and Dewey, C.N. (2011) 'RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome', *BMC Bioinformatics*, 12(1), p. 323. doi:10.1186/1471-2105-12-323.
- Li, H., Ding, Y., Shi, Y., Zhang, X., Zhang, S., Gong, Z. and Yang, S. (2017) 'MPK3- and MPK6-Mediated ICE1 Phosphorylation Negatively Regulates ICE1 Stability and Freezing Tolerance in Arabidopsis', *Developmental Cell*, 43(5), pp. 630–642.e4. doi:<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.09.025>.
- Li, J., Tian, H., Li, X., Meng, J.J. and He, Q.W. (2008) 'Higher Chilling-Tolerance of Grafted-Cucumber Seedling Leaves upon Exposure to Chilling Stress', *Agricultural Sciences in China*, 7(5), pp. 570–576. doi:[https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(08\)60054-1](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(08)60054-1).
- Li, P., Castagnoli, S. and Cheng, L. (2008) 'Red "Anjou" pear has a higher photoprotective

- capacity than green "Anjou"; *Physiologia Plantarum*, 134(3), pp. 486–498. doi:10.1111/j.1399-3054.2008.01155.x.
- Li, P.H. (2018)** *Advances in Plant Cold Hardiness*. Edited by P.H. Li and L. Christersson. CRC Press. doi:10.1201/9781351069526.
- Lin-Wang, K.U.I., Micheletti, D., Palmer, J., Volz, R., Lozano, L., Epley, R., Hellens, R.P., Chagnè, D., Rowan, D.D., Troggo, M., Iglesias, I. and Allan, A.C. (2011)** 'High temperature reduces apple fruit colour via modulation of the anthocyanin regulatory complex', *Plant, Cell & Environment*, 34(7), pp. 1176–1190. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02316.x>.
- Lin, H., Yang, Y., Quan, R., Mendoza, I., Wu, Y., Du, W., Zhao, S., Schumaker, K.S., Pardo, J.M. and Guo, Y. (2009)** 'Phosphorylation of SOS3-LIKE CALCIUM BINDING PROTEIN8 by SOS2 Protein Kinase Stabilizes Their Protein Complex and Regulates Salt Tolerance in Arabidopsis', *The Plant Cell*, 21(5), p. 1607. doi:10.1105/tpc.109.066217.
- Liu, D.C., He, L.G., Wang, H.L., Xu, M. and Sun, Z.H. (2010)** 'Molecular cloning, characterization and expression analysis of PtrHOS1, a novel gene of cold responses from trifoliolate orange [*P. trifoliata* (L.) Raf.]', *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(2), pp. 271–279. doi:10.1007/s11738-009-0404-2.
- Liu, J., Feng, L., Li, J. and He, Z. (2015)** 'Genetic and epigenetic control of plant heat responses', *Frontiers in Plant Science*, 6, p. 267.
- Liu, L., Wu, X., Sun, W., Yu, X., Demura, T., Li, D. and Zhuge, Q. (2021)** 'Galactinol synthase confers salt-stress tolerance by regulating the synthesis of galactinol and raffinose family oligosaccharides in poplar', *Industrial Crops and Products*, 165, p. 113432. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113432>.
- Liu, Q., Yan, S., Yang, T., Zhang, S., Chen, Y.Q. and Liu, B. (2017)** 'Small RNAs in regulating temperature stress response in plants', *Journal of Integrative Plant Biology*, 59(11), pp. 774–791. doi:<https://doi.org/10.1111/jipb.12571>.
- Liu, X., Chen, L., Shi, W., Xu, X., Li, Z., Liu, T., He, Q., Xie, C., Nie, B. and Song, B. (2021)** 'Comparative transcriptome reveals distinct starch-sugar interconversion patterns in potato genotypes contrasting for cold-induced sweetening capacity', *Food Chemistry*, 334, p. 127550. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127550>.
- Liu, Y. (2012)** 'Roles of mitogen-activated protein kinase cascades in ABA signaling', *Plant Cell Reports*, 31(1), pp. 1–12. doi:10.1007/s00299-011-1130-y.
- Liu, Y., Dang, P., Liu, L. and He, C. (2019)** 'Cold acclimation by the CBF-COR pathway in a changing climate: Lessons from *A. thaliana*', *Plant cell reports*. 2019/01/16, 38(5), pp. 511–519. doi:10.1007/s00299-019-02376-3.
- Liu, Y. and He, C. (2017)** 'A review of redox signaling and the control of MAP kinase pathway in plants', *Redox biology*. 2016/12/09, 11, pp. 192–204. doi:10.1016/j.redox.2016.12.009.
- Liu, Y., Tikunov, Y., Schouten, R.E., Marcelis, L.F.M., Visser, R.G.F. and Bovy, A. (2018)** 'Anthocyanin Biosynthesis and Degradation Mechanisms in Solanaceous Vegetables: A Review', *Frontiers in chemistry*, 6, p. 52. doi:10.3389/fchem.2018.00052.
- Liu, Y., Wang, L., Zhang, J., Yu, B., Wang, J. and Wang, D. (2017)** 'The MYB transcription factor StMYBA1 from potato requires light to activate anthocyanin biosynthesis in transgenic tobacco', *Journal of Plant Biology*, 60(1), pp. 93–101. doi:10.1007/s12374-016-0199-9.
- Liu, Y.D., Zhang, L., Meng, S. Da, Liu, Y.F., Zhao, X.O., Pang, C.P., Zhang, H.D., Xu, T., He, Y., Qi, M.F. and Li, T. Iai (2020)** 'Expression of galactinol synthase from *Ammopiptanthus nanus* in tomato improves tolerance to cold stress', *Journal of Experimental Botany*, 71(1), pp. 435–449. doi:10.1093/jxb/erz450.
- Lundquist, P.K., Rosar, C., Bräutigam, A. and Weber, A.P.M. (2014)** 'Plastid Signals and the Bundle Sheath: Mesophyll Development in Reticulate Mutants', *Molecular Plant*, 7(1), pp. 14–29. doi:<https://doi.org/10.1093/mp/ss133>.
- Lynch, D. V and Steponkus, P.L. (1987)** 'Plasma Membrane Lipid Alterations Associated with Cold Acclimation of Winter Rye Seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma)', *Plant physiology*, 83(4), pp. 761–767. doi:10.1104/pp.83.4.761.
- Ma, Q.J., Sun, M.H., Lu, J., Kang, H., You, C.X. and Hao, Y.J. (2019)** 'An apple sucrose transporter MdSUT2.2 is a phosphorylation target for protein kinase MdCIPK22 in response to drought', *Plant Biotechnology Journal*, 17(3), pp. 625–637. doi:10.1111/pbi.13003.
- Ma, S., Lv, J., Li, X., Ji, T., Zhang, Z. and Gao, L. (2021)** 'Galactinol synthase gene 4

- (CsGolS4) increases cold and drought tolerance in *Cucumis sativus* L. by inducing RFO accumulation and ROS scavenging', *Environmental and Experimental Botany*, 185, p. 104406. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104406>.
- Mabbitt, P.D., Wilbanks, S.M. and Eaton-Rye, J.J. (2014)** 'Structure and function of the hydrophilic Photosystem II assembly proteins: Psb27, Psb28 and Ycf48', *Plant Physiology and Biochemistry*, 81, pp. 96–107. doi:<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.02.013>.
- Machado, D.F.S.P., Ribeiro, R.V., Silveira, J.A.G. da, Filho, M., Rodrigues, J. and Machado, E.C. (2013)** 'Rootstocks induce contrasting photosynthetic responses of orange plants to low night temperature without affecting the antioxidant metabolism', *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 25(1), pp. 26–35. doi:[10.1590/S2197-00252013000100004](https://doi.org/10.1590/S2197-00252013000100004).
- Maibam, P., Nawkar, G.M., Park, J.H., Sahi, V.P., Lee, S.Y. and Kang, C.H. (2013)** 'The influence of light quality, circadian rhythm, and photoperiod on the CBF-mediated freezing tolerance', *International journal of molecular sciences*, 14(6), pp. 11527–11543. doi:[10.3390/ijms140611527](https://doi.org/10.3390/ijms140611527).
- Majláth, I., Szalai, G., Soós, V., Sebestyén, E., Balázs, E., Vanková, R., Dobrev, P.I., Tari, I., Tandori, J. and Janda, T. (2012)** 'Effect of light on the gene expression and hormonal status of winter and spring wheat plants during cold hardening', *Physiologia Plantarum*, 145(2), pp. 296–314. doi:[10.1111/j.1399-3054.2012.01579.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01579.x).
- Martínez-Cuenca, M.-R., Primo-Capella, A. and Forner-Giner, M.A. (2021)** 'Screening of "King" mandarin (*Citrus nobilis* Lour) × *P. trifoliata* ((L.) Raf.) hybrids as salt stress-tolerant citrus rootstocks', *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 62(3), pp. 337–351. doi:[10.1007/s13580-020-00291-1](https://doi.org/10.1007/s13580-020-00291-1).
- Martínez-Cuenca, M.-R., Quiñones, A., Primo-Millo, E. and Forner-Giner, M.Á. (2015)** 'Flooding Impairs Fe Uptake and Distribution in Citrus Due to the Strong Down-Regulation of Genes Involved in Strategy I Responses to Fe Deficiency in Roots', *PLoS ONE*, 10(4), pp. e0123644-. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123644>.
- Martínez-Cuenca, M.R., Iglesias, D.J., Forner-Giner, M.A., Primo-Millo, E. and Legaz, F. (2013)** 'The effect of sodium bicarbonate on plant performance and iron acquisition system of FA-5 (Forner-Alcaide 5) citrus seedlings', *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(9), pp. 2833–2845. doi:[10.1007/s11738-013-1317-7](https://doi.org/10.1007/s11738-013-1317-7).
- Martínez-Cuenca, M.R., Primo-Capella, A. and Forner-Giner, M.A. (2017)** 'Tolerance Response Mechanisms to Iron Deficiency Stress in Citrus Plants', in *Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective, Volume 2*. Cham: Springer International Publishing, pp. 201–239. doi:[10.1007/978-3-319-42183-4_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-42183-4_9).
- Martínez-Cuenca, M.R., Quiñones, A. and Forner-Giner, M.Á. (2016)** 'Screening of "King" mandarin (*Citrus nobilis* Lour) × *P. trifoliata* ((L.) Raf.) hybrids as citrus rootstocks tolerant to iron chlorosis', *Scientia Horticulturae*, 198, pp. 61–69. doi:[10.1016/j.SCIENTA.2015.10.038](https://doi.org/10.1016/j.SCIENTA.2015.10.038).
- Maruyama, K., Urano, K., Yoshiwara, K., Morishita, Y., Sakurai, N., Suzuki, H., Kojima, M., Sakakibara, H., Shibata, D., Saito, K., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014)** 'Integrated Analysis of the Effects of Cold and Dehydration on Rice Metabolites, Phytohormones, and Gene Transcripts', *Plant Physiology*, 164(4), p. 1759. doi:[10.1104/pp.113.231720](https://doi.org/10.1104/pp.113.231720).
- Maul, P., McCollum, G.T., Popp, M., Guy, C.L. and Porat, R.O.N. (2008)** 'Transcriptome profiling of grapefruit flavedo following exposure to low temperature and conditioning treatments uncovers principal molecular components involved in chilling tolerance and susceptibility', *Plant, Cell & Environment*, 31(6), pp. 752–768. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01793.x>.
- Maurel, C., Boursiac, Y., Luu, D.T., Santoni, V., Shahzad, Z. and Verdoucq, L. (2015)** 'Aquaporins in Plants', *Physiological Reviews*, 95(4), pp. 1321–1358. doi:[10.1152/physrev.00008.2015](https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2015).
- McCready, R.M., Guggolz, J., Silveira, V. and Owens, H.S. (1950)** 'Determination of Starch and Amylose in Vegetables', *Analytical Chemistry*, 22(9), pp. 1156–1158. doi:[10.1021/ac60045a016](https://doi.org/10.1021/ac60045a016).
- Megha, S., Basu, U. and Kav, N.N. V (2018)** 'Regulation of low temperature stress in plants by microRNAs', *Plant, Cell & Environment*, 41(1), pp. 1–15. doi:<https://doi.org/10.1111/pce.12956>.
- Mehlmer, N., Wurzinger, B., Stael, S., Hofmann-Rodrigues, D., Csaszar, E., Pfister, B.,**

- Bayer, R. and Teige, M. (2010)** 'The Ca²⁺-dependent protein kinase CPK3 is required for MAPK-independent salt-stress acclimation in Arabidopsis', *The Plant Journal: for cell and molecular biology*, 2010/05/20, 63(3), pp. 484–498. doi:10.1111/j.1365-3113.2010.04257.x.
- Melgoza, F.J., Kusakabe, A., Nelson, S.D. and Melgar, J.C. (2014)** 'Exogenous Applications of Abscisic Acid Increase Freeze Tolerance in Citrus Trees', *International Journal of Fruit Science*, 14(4), pp. 376–387. doi:10.1080/15538362.2014.899138.
- Meng, S., Dane, F., Si, Y., Ebel, R. and Zhang, C. (2008)** 'Gene expression analysis of cold treated versus cold acclimated *P. trifoliata*', *Euphytica*, 164(1), p. 209. doi:10.1007/s10681-008-9708-3.
- Mitsunami, T., Nishihara, M., Galis, I., Alamgir, K.M., Hojo, Y., Fujita, K., Sasaki, N., Nemoto, K., Sawasaki, T. and Arimura, G. (2014)** 'Overexpression of the PAP1 Transcription Factor Reveals a Complex Regulation of Flavonoid and Phenylpropanoid Metabolism in *Nicotiana tabacum* Plants Attacked by *Spodoptera litura*', *PLOS ONE*, 9(9), pp. e108849-.
- Miura, K., Jin, J.B., Lee, J., Yoo, C.Y., Stirm, V., Miura, T., Ashworth, E.N., Bressan, R.A., Yun, D.J. and Hasegawa, P.M. (2007)** 'SIZ1-Mediated Sumoylation of ICE1 Controls CBF3/DREB1A Expression and Freezing Tolerance in Arabidopsis', *The Plant Cell*, 19(4), pp. 1403–1414. doi:10.1105/tpc.106.048397.
- Mohammadian, M.A., Mobrafi, Z. and Sajedi, R.H. (2011)** 'Bioactive compounds and antioxidant capacities in the flavedo tissue of two citrus cultivars under low temperature', *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23(3), pp. 203–208. doi:10.1590/S1677-04202011000300004.
- Mohammadrezakhani, S., Hajilou, J., Rezaejad, F. and Zaare-Nahandi, F. (2019)** 'Assessment of exogenous application of proline on antioxidant compounds in three *Citrus* species under low temperature stress', *Journal of Plant Interactions*, 14(1), pp. 347–358. doi:10.1080/17429145.2019.1629033.
- Morales, J., Bermejo, A., Navarro, P., Forner-Giner, M.Á. and Salvador, A. (2020)** 'Rootstock effect on fruit quality, anthocyanins, sugars, hydroxycinnamic acids and flavanones content during the harvest of blood oranges "Moro" and "Tarocco Rosso" grown in Spain', *Food Chemistry*, 342, p. 128305. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128305.
- Moran, R. (1982)** 'Formulae for Determination of Chlorophyllous Pigments Extracted with N,N-Dimethylformamide', *Plant Physiology*, 69(6), pp. 1376–1381. doi:10.1104/pp.69.6.1376.
- Moran, R. and Porath, D. (1980)** 'Chlorophyll Determination in Intact Tissues Using N,N-Dimethylformamide', *Plant Physiology*, 65(3), pp. 478–479.
- Morgan, J.M. (1984)** 'Osmoregulation and Water Stress in Higher Plants', *Annual Review of Plant Physiology*, 35(1), pp. 299–319. doi:10.1146/annurev.pp.35.060184.001503.
- Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y. and Allakhverdiev, S.I. (2007)** 'Photoinhibition of photosystem II under environmental stress', *Biochimica et biophysica acta*, 1767(6), pp. 414–421. doi:10.1016/j.bbabi.2006.11.019.
- Nakashima, K., Ito, Y. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009)** 'Transcriptional Regulatory Networks in Response to Abiotic Stresses in Arabidopsis and Grasses', *Plant Physiology*, 149(1), p. 88. doi:10.1104/pp.108.129791.
- Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2014)** 'The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat', *Frontiers in plant science*, 5, p. 170. doi:10.3389/fpls.2014.00170.
- Nesbitt, M.L., Ebel, R.C., Findley, D., Wilkins, B., Woods, F. and Himelrick, D. (2002)** 'Assays to Assess Freeze Injury of Satsuma Mandarin', *HortScience*, 37(6), pp. 871–877.
- Nesi, N., Debeaujon, I., Jond, C., Pelletier, G., Caboche, M. and Lepiniec, L. (2000)** 'The TT8 Gene Encodes a Basic Helix-Loop-Helix Domain Protein Required for Expression of DFR and BAN Genes in Arabidopsis Siliques', *The Plant Cell*, 12(10), pp. 1863–1878. doi:10.1105/tpc.12.10.1863.
- Nguyen, Q.T.C., Lee, S.J., Choi, S.W., Na, Y.J., Song, M.R., Hoang, Q.T.N., Sim, S.Y., Kim, M.S., Kim, J. II, Soh, M.S. and Kim, S.Y. (2019)** 'Arabidopsis Raf-Like Kinase Raf10 Is a Regulatory Component of Core ABA Signaling', *Molecules and cells*, 42(9), pp. 646–660. doi:10.14348/molcells.2019.0173.

- Nilo-Poyanco, R., Vizoso, P., Sanhueza, D., Balic, I., Meneses, C., Orellana, A. and Campos-Vargas, R. (2019) 'A Prunus persica genome-wide RNA-seq approach uncovers major differences in the transcriptome among chilling injury sensitive and non-sensitive varieties', *Physiologia Plantarum*, 166(3), pp. 772–793. doi:<https://doi.org/10.1111/pp1.12831>.
- Nimbolkar, P.K., Shiva, B. and Rai, A.K. (2016) 'Rootstock breeding for abiotic stress tolerance in fruit crops', *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 9, pp. 375–380.
- Nishikawa, F. (2013) 'Regulation of Floral Induction in Citrus', *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 82(4), pp. 283–292. doi:10.2503/jjshs.182.283.
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I. and Murata, N. (2006) 'A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1757(7), pp. 742–749. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.05.013>.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y. and Shigeoka, S. (2008) 'Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage', *Plant physiology*, 2008/05/23, 147(3), pp. 1251–1263. doi:10.1104/pp.108.122465.
- van Nocker, S. and Ludwig, P. (2003) 'The WD-repeat protein superfamily in Arabidopsis: conservation and divergence in structure and function', *BMC Genomics*, 4(1), p. 50. doi:10.1186/1471-2164-4-50.
- Nordby, H.E. and Yelenosky, G. (1985) 'Change in citrus leaf lipids during freeze-thaw stress', *Phytochemistry*, 24(8), pp. 1675–1679. doi:[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82533-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82533-9).
- Núñez, J., Muedra, C. and Aupí, V. (2006) 'La gran ola de frío de febrero de 1956 en la España mediterránea', *Divulga Meteo*, pp. 267–278.
- O'Leary, N.A. and Al, E. (2016) 'Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation', *Nucleic Acids Research*, 44(D1), pp. D733–D745. doi:10.1093/nar/gkv1189.
- Olsen, M, K., Sliemstad, R., Lea, U.S., Brede, C., Lovdal, T., Ruoff, P., Verheul, M. and Catherine, L. (2009) 'Temperature and nitrogen effects on regulators and products of the flavonoid pathway: experimental and kinetic model studies', *Plant, Cell & Environment*, 32(3), pp. 286–299. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01920.x>.
- Ou, L., Zhang, Z., Dai, X. and Zou, X. (2013) 'Photooxidation Tolerance Characters of a New Purple Pepper', *PLOS ONE*, 8(5), pp. e63593-. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063593>.
- Oustric, J., Morillon, R., Luro, F., Herbette, S., Lourkisti, R., Giannettini, J., Berti, L. and Santini, J. (2017) 'Tetraploid Carrizo citrange rootstock (Citrus sinensis Osb.xP. trifoliata L. Raf.) enhances natural chilling stress tolerance of common clementine (Citrus clementina Hort. ex Tan)', *Journal of Plant Physiology*, 214, pp. 108–115. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.04.014>.
- Ouyang, Z.G., Mi, L.F., Duan, H.H., Hu, W., Chen, J.M., Peng, T. and Zhong, B.L. (2019) 'Differential expressions of citrus CAMTAs during fruit development and responses to abiotic stresses', *Biologia plantarum*, 63(1), pp. 354–364. doi:10.32615/bp.2019.041.
- Paiva, L.B., Goldbeck, R., dos Santos, W.D. and Squina, F.M. (2013) 'Ferulic acid and derivatives: molecules with potential application in the pharmaceutical field', *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(3), pp. 395–411. doi:10.1590/S1984-82502013000300002.
- Pandey, A., Misra, P., Bhamhani, S., Bhatia, C. and Trivedi, P.K. (2014) 'Expression of Arabidopsis MYB transcription factor, AtMYB111, in tobacco requires light to modulate flavonol content', *Scientific Reports*, 4(1), p. 5018. doi:10.1038/srep05018.
- Park, S., Lee, C.M., Doherty, C.J., Gilmour, S.J., Kim, Y. and Thomashow, M.F. (2015) 'Regulation of the Arabidopsis CBF regulon by a complex low-temperature regulatory network', *The Plant Journal*, 82(2), pp. 193–207. doi:10.1111/tpj.12796.
- Park, W., Scheffler, B.E., Bauer, P.J. and Campbell, B.T. (2012) 'Genome-wide identification of differentially expressed genes under water deficit stress in upland cotton (Gossypium hirsutum L.)', *BMC Plant Biology*, 12(1), p. 90. doi:10.1186/1471-2229-12-90.
- de Pascual-Teresa, S. and Sanchez-Ballesta, M.T. (2008) 'Anthocyanins: from plant to health', *Phytochemistry Reviews*, 7(2), pp. 281–299. doi:10.1007/s11101-007-9074-0.

- Paul, M.J., Driscoll, S.P. and Lawlor, D.W. (1992) 'Sink-Regulation of Photosynthesis in Relation to Temperature in Sunflower and Rape', *Journal of Experimental Botany*, 43(2), pp. 147–153. doi:10.1093/jxb/43.2.147.
- de Paula-Santos-Martins, C., Pedrosa, A.M., Du, D., Gonçalves, L.P., Yu, Q., Gmitter, F.G. and Costa, M.G.C. (2015) 'Genome-Wide Characterization and Expression Analysis of Major Intrinsic Proteins during Abiotic and Biotic Stresses in Sweet Orange (*Citrus sinensis* L. Osb.)', *PLOS ONE*, 10(9). doi:10.1371/journal.pone.0138786.
- Peng, T., Zhu, X., Duan, N. and Liu, J.H. (2014) 'PtrBAM1, a β -amylase-coding gene of *P. trifoliata*, is a CBF regulon member with function in cold tolerance by modulating soluble sugar levels', *Plant, Cell & Environment*, 37(12), pp. 2754–2767. doi:10.1111/pce.12384.
- Peng, T., Zhu, X.F., Fan, Q.J., Sun, P.P. and Liu, J.H. (2012) 'Identification and characterization of low temperature stress responsive genes in *P. trifoliata* by suppression subtractive hybridization', *Gene*, 492(1), pp. 220–228. doi:https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.10.025.
- Peng, Y., Arora, R., Li, G., Wang, X. and Fessehaie, A. (2008) 'Rhododendron catawbiense plasma membrane intrinsic proteins are aquaporins, and their over-expression compromises constitutive freezing tolerance and cold acclimation ability of transgenic Arabidopsis plants', *Plant, Cell & Environment*, 31(9), pp. 1275–1289. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01840.x.
- Perotti, V.E., Moreno, A.S., Tripodi, K.E.J., Meier, G., Bello, F., Cocco, M., Vázquez, D., Anderson, C. and Podestá, F.E. (2015) 'Proteomic and metabolomic profiling of Valencia orange fruit after natural frost exposure', *Physiologia Plantarum*, 153(3), pp. 337–354. doi:https://doi.org/10.1111/ppl.12259.
- Pesaresi, P., Scharfenberg, M., Weigel, M., Granlund, I., Schröder, W.P., Finazzi, G., Rappaport, F., Masiero, S., Furini, A., Jahns, P. and Leister, D. (2009) 'Mutants, Overexpressors, and Interactors of Arabidopsis Plastocyanin Isoforms: Revised Roles of Plastocyanin in Photosynthetic Electron Flow and Thylakoid Redox State', *Molecular Plant*, 2(2), pp. 236–248. doi:https://doi.org/10.1093/mp/ssn041.
- Petroni, K. and Tonelli, C. (2011) 'Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs', *Plant Science*, 181(3), pp. 219–229. doi:https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.05.009.
- Pfaffl, M.W. (2001) 'A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR', *Nucleic Acids Research*, 29(9), pp. e45–e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45.
- Lo Piero, A.R. (2015) 'The State of the Art in Biosynthesis of Anthocyanins and Its Regulation in Pigmented Sweet Oranges [(*Citrus sinensis*) L. Osbeck]', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(16), pp. 4031–4041. doi:10.1021/acs.jafc.5b01123.
- Lo Piero, A.R., Puglisi, I. and Petrone, G. (2006) 'Gene Isolation, Analysis of Expression, and in Vitro Synthesis of Glutathione S-Transferase from Orange Fruit [*Citrus sinensis* L. (Osbeck)]', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(24), pp. 9227–9233. doi:10.1021/jf0616816.
- Lo Piero, A.R., Puglisi, I., Rapisarda, P. and Petrone, G. (2005) 'Anthocyanins Accumulation and Related Gene Expression in Red Orange Fruit Induced by Low Temperature Storage', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), pp. 9083–9088. doi:10.1021/jf051609s.
- Pino, M.T., Skinner, J.S., Jeknic, Z., Hayes, P.M., Soeldner, A.H., Thomashow, M.F. and Chen, T.H.H. (2008) 'Ectopic AtCBF1 over-expression enhances freezing tolerance and induces cold acclimation-associated physiological modifications in potato', *Plant, Cell & Environment*, 31(4), pp. 393–406.
- Polisensky, D.H. and Braam, J. (1996) 'Cold-Shock Regulation of the Arabidopsis TCH Genes and the Effects of Modulating Intracellular Calcium Levels', *Plant Physiology*, 111(4), p. 1271. doi:10.1104/pp.111.4.1271.
- Powles, S.B. (1984) 'Photoinhibition of Photosynthesis Induced by Visible Light', *Annual Review of Plant Physiology*, 35(1), pp. 15–44. doi:10.1146/annurev.pp.35.060184.000311.
- Primo-Capella, A., Martínez-Cuenca, M.R., Gil-Muñoz, F. and Forner-Giner, M.A. (2021) 'Physiological characterization and proline route genes quantification under long-term cold stress in Carrizo citrange', *Scientia Horticulturae*, 276. doi:10.1016/j.scienta.2020.109744.

- Prinzenberg, A.E., Campos-Dominguez, L., Kruijer, W., Harbinson, J. and Aarts, M.G.M. (2020) 'Natural variation of photosynthetic efficiency in *A. thaliana* accessions under low temperature conditions', *Plant, Cell & Environment*, 43(8), pp. 2000–2013. doi:<https://doi.org/10.1111/pce.13811>.
- Puche, F. (2006) 'La helada de 1956, banco de pruebas contra el olvido de Valencia', Las Provincias, 12 November.
- Puhakainen, T., Li, C., Boije-Malm, M., Kangasjärvi, J., Heino, P. and Palva, E.T. (2004) 'Short-Day Potentiation of Low Temperature-Induced Gene Expression of a C-Repeat-Binding Factor-Controlled Gene during Cold Acclimation in Silver Birch', *Plant Physiology*, 136(4), p. 4299. doi:10.1104/pp.104.047258.
- Rahman, A., Kawamura, Y., Maeshima, M., Rahman, A. and Uemura, M. (2020) 'Plasma Membrane Aquaporin Members PIPs Act in Concert to Regulate Cold Acclimation and Freezing Tolerance Responses in *A. thaliana*', *Plant and Cell Physiology*, 61(4), pp. 787–802. doi:10.1093/pcp/pcaa005.
- Rai, A.N. and Penna, S. (2013) 'Molecular evolution of plant P5CS gene involved in proline biosynthesis', *Molecular Biology Reports*, 40(11), pp. 6429–6435. doi:10.1007/s11033-013-2757-2.
- Ramshaw, J.A.M., Brown, R.H., Scawen, M.D. and Boulter, D. (1973) 'Higher plant plastocyanin', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 303(2), pp. 269–273. doi:[https://doi.org/10.1016/0005-2795\(73\)90357-7](https://doi.org/10.1016/0005-2795(73)90357-7).
- Rapisarda, P., Bellomo, S.E. and Intelisano, S. (2001) 'Storage Temperature Effects on Blood Orange Fruit Quality', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), pp. 3230–3235. doi:10.1021/jf010032l.
- Rapisarda, P., Bianco, M.L., Pannuzzo, P. and Timpanaro, N. (2008) 'Effect of cold storage on vitamin C, phenolics and antioxidant activity of five orange genotypes [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]', *Postharvest Biology and Technology*, 49(3), pp. 348–354. doi:<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.02.002>.
- Rapisarda, P., Carollo, G., Fallico, B., Tomaselli, F. and Maccarone, E. (1998) 'Hydroxycinnamic Acids as Markers of Italian Blood Orange Juices', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(2), pp. 464–470. doi:10.1021/jf9603700.
- Rapisarda, P. and Giuffrida, A. (1992) 'Anthocyanins level in Italian blood oranges', *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 3, p. 1133.
- Ravet, K. and Pilon, M. (2013) 'Copper and iron homeostasis in plants: the challenges of oxidative stress', *Antioxidants & redox signaling*. 2013/01/23, 19(9), pp. 919–932. doi:10.1089/ars.2012.5084.
- Reddy, P.S., Rao, T., Sharma, K.K. and Vadez, V. (2015) 'Genome-wide identification and characterization of the aquaporin gene family in *Sorghum bicolor* (L.)', *Plant Gene*, 1, pp. 18–28. doi:<https://doi.org/10.1016/j.plgene.2014.12.002>.
- Rentsch, D., Hirner, B., Schmelzer, E. and Frommer, W.B. (1996) 'Salt stress-induced proline transporters and salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease-targeting mutant.', *The Plant Cell*, 8(8), p. 1437. doi:10.1105/tpc.8.8.1437.
- Reuscher, S., Akiyama, M., Mori, C., Aoki, K., Shibata, D. and Shiratake, K. (2013) 'Genome-Wide Identification and Expression Analysis of Aquaporins in Tomato', *PLoS ONE*. Edited by D. Boudko, 8(11), p. e79052. doi:10.1371/journal.pone.0079052.
- Rey, F., Rodrigo, M.J., Diretto, G. and Zacarías, L. (2021) 'Effect of fruit shading and cold storage on tocopherol biosynthesis and its involvement in the susceptibility of Star Ruby grapefruit to chilling injury', *Food Chemistry: Molecular Sciences* [Preprint]. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fochms.2021.100037>.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J. and Smyth, G.K. (2009) 'edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data', *Bioinformatics*, 26(1), pp. 139–140. doi:10.1093/bioinformatics/btp616.
- Robinson, M.D. and Oshlack, A. (2010) 'A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data', *Genome Biology*, 11(3), p. R25. doi:10.1186/gb-2010-11-3-r25.
- Rodríguez-Gamir, J., Ancillo, G., González-Mas, M.C., Primo-Millo, E., Iglesias, D.J. and Forner-Giner, M.A. (2011) 'Root signalling and modulation of stomatal closure in flooded citrus seedlings', *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(6), pp. 636–645. doi:<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.03.003>.

- Roessner, U., Wagner, C., Kopka, J., Trethewey, R.N. and Willmitzer, L. (2000)** 'Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography–mass spectrometry', *The Plant Journal*, 23(1), pp. 131–142. doi:10.1046/j.1365-313x.2000.00774.x.
- Roldan-Arjona, T. and Ariza, R. (2000)** *DNA demethylation. Madame Curie Bioscience Database*. TX.
- Rook, F., Hadingham, S.A., Li, Y. and Bevan, M.W. (2006)** 'Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression', *Plant, Cell & Environment*, 29(3), pp. 426–434. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01477.x>.
- Rosenzweig, C., Iglesius, A., Yang, X.B., Epstein, P. and Chivian, E. (2001)** 'Climate change and extreme weather events - Implications for food production, plant diseases, and pests', *NASA Publications* [Preprint].
- Rowan, D.D., Cao, M., Lin-Wang, K., Cooney, J.M., Jensen, D.J., Austin, P.T., Hunt, M.B., Norling, C., Hellens, R.P., Schaffer, R.J. and Allan, A.C. (2009)** 'Environmental regulation of leaf colour in red 35S:PAP1 *A. thaliana*', *New Phytologist*, 182(1), pp. 102–115. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02737.x>.
- Ruibal, C., Castro, A., Fleitas, A.L., Quezada, J., Quero, G. and Vidal, S. (2020)** 'A Chloroplast COR413 Protein From *Physcomitrella patens* Is Required for Growth Regulation Under High Light and ABA Responses', *Frontiers in Plant Science*, 11, p. 845.
- Sage, R. and Kubien, D. (2007)** 'The temperature response of C3 and C4 photosynthesis', *Plant, Cell & Environment*, 30(9), pp. 1086–1106. doi:10.1111/j.1365-3040.2007.01682.x.
- Saghfi, S. and Eivazi, A.R. (2014)** 'Effects of cold stress on proline and soluble carbohydrates in two chickpea cultivars.', *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(2), pp. 591–595.
- Şahin-Çevik, M. and Moore, G.A. (2006)** 'Identification and expression analysis of cold-regulated genes from the cold-hardy Citrus relative *P. trifoliata* (L.) Raf.', *Plant Molecular Biology*, 62(1–2), pp. 83–97. doi:10.1007/s11103-006-9005-2.
- Saibi, W., Feki, K., Yacoubi, I. and Brini, F. (2015)** 'Bridging Between Proline Structure, Functions, Metabolism, and Involvement in Organism Physiology', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(8), pp. 2107–2119. doi:10.1007/s12010-015-1713-0.
- Saito, M. and Yoshida, M. (2011)** 'Expression analysis of the gene family associated with raffinose accumulation in rice seedlings under cold stress', *Journal of Plant Physiology*, 168(18), pp. 2268–2271. doi:10.1016/J.JPLPH.2011.07.002.
- Sakai, A. and Larcher, W. (2012)** *Frost Survival of Plants: Responses and Adaptation to Freezing Stress*. Springer Science & Business Media.
- Sakata, S., Mizusawa, N., Kubota-Kawai, H., Sakurai, I. and Wada, H. (2013)** 'Psb28 is involved in recovery of photosystem II at high temperature in *Synechocystis* sp. PCC 6803', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827(1), pp. 50–59. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2012.10.004>.
- Sakurai, J., Ishikawa, F., Yamaguchi, T., Uemura, M. and Maeshima, M. (2005)** 'Identification of 33 Rice Aquaporin Genes and Analysis of Their Expression and Function', *Plant and Cell Physiology*, 46(9), pp. 1568–1577. doi:10.1093/pcp/pci172.
- Sanchez-Ballesta, M.T., Lafuente, M.T., Zacarias, L. and Granell, A. (2000)** 'Involvement of phenylalanine ammonia-lyase in the response of Fortune mandarin fruits to cold temperature', *Physiologia Plantarum*, 108(4), pp. 382–389. doi:<https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.t01-1-100407.x>.
- Saruhashi, M., Kumar Ghosh, T., Arai, K., Ishizaki, Y., Hagiwara, K., Komatsu, K., Shiwa, Y., Izumikawa, K., Yoshikawa, H., Umezawa, T., Sakata, Y. and Takezawa, D. (2015)** 'Plant Raf-like kinase integrates abscisic acid and hyperosmotic stress signaling upstream of SNF1-related protein kinase2', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(46), p. E6388. doi:10.1073/pnas.1511238112.
- Schneider, T. and Keller, F. (2009)** 'Raffinose in Chloroplasts is Synthesized in the Cytosol and Transported across the Chloroplast Envelope', *Plant and Cell Physiology*, 50(12), pp. 2174–2182. doi:10.1093/pcp/pcp151.
- Seo, E., Lee, H., Jeon, J., Park, H., Kim, J., Noh, Y.S. and Lee, I. (2009)** 'Crosstalk between cold response and flowering in Arabidopsis is mediated through the flowering-time gene SOC1 and its upstream negative regulator FLC', *The Plant cell*. 2009/10/13, 21(10), pp. 3185–3197. doi:10.1105/tpc.108.063883.

- Seo, M., Jikumaru, Y. and Kamiya, Y. (2011) 'Profiling of Hormones and Related Metabolites in Seed Dormancy and Germination Studies', in Kermode, A.R. (ed.) *Seed Dormancy: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 99–111. doi:10.1007/978-1-61779-231-1_7.
- Sharkey, T.D. (1985) 'Photosynthesis in intact leaves of C3 plants: Physics, physiology and rate limitations', *The Botanical Review*, 51(1), pp. 53–105. doi:10.1007/BF02861058.
- Shi, J., Wang, H., Wu, Y., Hazebroek, J., Meeley, R.B. and Ertl, D.S. (2003) 'The maize low-phytic acid mutant lpa2 is caused by mutation in an inositol phosphate kinase gene', *Plant physiology*, 131(2), pp. 507–515. doi:10.1104/pp.014258.
- Shi, M.Z. and Xie, D.Y. (2014) 'Biosynthesis and metabolic engineering of anthocyanins in *A. thaliana*', *Recent patents on biotechnology*, 8(1), pp. 47–60. doi:10.2174/1872208307666131218123538.
- Shi, Y., Ding, Y. and Yang, S. (2018) 'Molecular Regulation of CBF Signaling in Cold Acclimation', *Trends in Plant Science*, 23(7), pp. 623–637. doi:https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.04.002.
- Shi, Y., Huang, J., Sun, T., Wang, X., Zhu, C., Ai, Y. and Gu, H. (2017) 'The precise regulation of different COR genes by individual CBF transcription factors in *A. thaliana*', *Journal of Integrative Plant Biology*, 59(2), pp. 118–133. doi:10.1111/jipb.12515.
- Shin, J., Park, E. and Choi, G. (2007) 'PIF3 regulates anthocyanin biosynthesis in an HY5-dependent manner with both factors directly binding anthocyanin biosynthetic gene promoters in Arabidopsis', *The Plant Journal*, 49(6), pp. 981–994. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.03021.x.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (1996) 'Molecular responses to drought and cold stress', *Current Opinion in Biotechnology*, 7(2), pp. 161–167. doi:10.1016/S0958-1669(96)80007-3.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000) 'Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways', *Current Opinion in Plant Biology*, 3(3), pp. 217–223. doi:https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)80068-0.
- Shinozawa, A., Otake, R., Takezawa, D., Umezawa, T., Komatsu, K., Tanaka, K., Amagai, A., Ishikawa, S., Hara, Y., Kamisugi, Y., Cuming, A.C., Hori, K., Ohta, H., Takahashi, F., Shinozaki, K., Hayashi, T., Taji, T. and Sakata, Y. (2019) 'SnRK2 protein kinases represent an ancient system in plants for adaptation to a terrestrial environment', *Communications Biology*, 2(1), p. 30. doi:10.1038/s42003-019-0281-1.
- Sicilia, A., Scialò, E., Puglisi, I. and Lo Piero, A.R. (2020) 'Anthocyanin Biosynthesis and DNA Methylation Dynamics in Sweet Orange Fruit [*Citrus sinensis* L. (Osbeck)] under Cold Stress', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(26), pp. 7024–7031. doi:10.1021/acs.jafc.0c02360.
- Siddiqui, K.S. and Cavicchioli, R. (2006) 'Cold-Adapted Enzymes', *Annual Review of Biochemistry*, 75(1), pp. 403–433. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142723.
- Singh, A., Sharma, M.K. and Sengar, R.S. (2017) 'Osmolytes: Proline metabolism in plants as sensors of abiotic stress', *Journal of Applied and Natural Science*, 9(4), pp. 2079–2092. doi:10.31018/jans.v9i4.1492.
- Soitamo, A.J., Piippo, M., Allahverdiyeva, Y., Battchikova, N. and Aro, E.M. (2008) 'Light has a specific role in modulating Arabidopsis gene expression at low temperature', 8(1), p. 13. doi:10.1186/1471-2229-8-13.
- Soler, J. and Soler, G. (2018) *Cítricos: Variedades y técnicas de cultivo*. Barcelona: Aedos.
- Soveral, G., Veiga, A., Loureiro-Dias, M.C., Tanghe, A., Van Dijck, P. and Moura, T.F. (2006) 'Water channels are important for osmotic adjustments of yeast cells at low temperature', *Microbiology*, 152(5), pp. 1515–1521. doi:10.1099/mic.0.28679-0.
- Sreedharan, S., Shekhawat, U.K.S. and Ganapathi, T.R. (2013) 'Transgenic banana plants overexpressing a native plasma membrane aquaporin *MusaPIP1;2* display high tolerance levels to different abiotic stresses', *Plant Biotechnology Journal*, 11(8), pp. 942–952.
- Steponkus, P.L. (1984) 'Role of the Plasma Membrane in Freezing Injury and Cold Acclimation', *Annual Review of Plant Physiology*, 35(1), pp. 543–584. doi:10.1146/annurev.pp.35.060184.002551.
- Steponkus, P.L. and Webb, M.S. (1992) 'Freeze-Induced Dehydration and Membrane Destabilization in Plants', in *Water and Life*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 338–362.

- Stevenson, S.R., Kamisugi, Y., Trinh, C.H., Schmutz, J., Jenkins, J.W., Grimwood, J., Muchero, W., Tuskan, G.A., Rensing, S.A., Lang, D., Reski, R., Melkonian, M., Rothfels, C.J., Li, F.-W., Larsson, A., Wong, G.K.-S., Edwards, T.A. and Cuming, A.C. (2016) 'Genetic Analysis of *Physcomitrella patens* Identifies ABSCISIC ACID NON-RESPONSIVE, a Regulator of ABA Responses Unique to Basal Land Plants and Required for Desiccation Tolerance', *The Plant Cell*, 28(6), p. 1310. doi:10.1105/tpc.16.00091.
- Stommel, J. and Whitaker, B. (2003) 'Phenolic Acid Content and Composition of Eggplant Fruit in a Germplasm Core Subset', *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128, pp. 704–710. doi:10.21273/JASHS.128.5.0704.
- Stracke, R., Favory, J.J., Gruber, H., Bartelniewoehner, L., Bartels, S., Binkert, M., Funk, M., Weisshaar, B. and Ulm, R. (2010) 'The Arabidopsis bZIP transcription factor HY5 regulates expression of the PFG1/MYB12 gene in response to light and ultraviolet-B radiation', *Plant, Cell & Environment*, 33(1), pp. 88–103. doi:10.1111/j.1365-3040.2009.02061.x.
- Stracke, R., Ishihara, H., Huep, G., Barsch, A., Mehrtens, F., Niehaus, K. and Weisshaar, B. (2007) 'Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *A. thaliana* seedling', *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 2007/04/05, 50(4), pp. 660–677. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03078.x.
- Strand, Å., Hurry, V., Gustafsson, P. and Gardeström, P. (1997) 'Development of *A. thaliana* leaves at low temperatures releases the suppression of photosynthesis and photosynthetic gene expression despite the accumulation of soluble carbohydrates', *The Plant Journal*, 12(3), pp. 605–614. doi:10.1046/j.1365-313X.1997.00583.x.
- Strand, A., Hurry, V., Henkes, S., Huner, N., Gustafsson, P., Gardeström, P. and Stitt, M. (1999) 'Acclimation of Arabidopsis leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway', *Plant physiology*, 119(4), pp. 1387–1398. doi:10.1104/pp.119.4.1387.
- Su, C., Chen, K., Ding, Q., Mou, Y., Yang, R., Zhao, M., Ma, B., Xu, Z., Ma, Y., Pan, Y., Chen, M. and Xi, Y. (2018) 'Proteomic Analysis of the Function of a Novel Cold-Regulated Multispanning Transmembrane Protein COR413-PM1 in Arabidopsis', *International journal of molecular sciences*, 19(9), p. 2572. doi:10.3390/ijms19092572.
- Suchoff, D.H., Perkins-Veazie, P., Sederoff, H.W., Schultheis, J.R., Kleinhenz, M.D., Louws, F.J. and Gunter, C.C. (2018) 'Grafting the indeterminate tomato cultivar moneymaker onto multifort rootstock improves cold tolerance', *HortScience*, 53(11), pp. 1610–1617. doi:10.21273/HORTSCI13311-18.
- Szabados, L. and Savouré, A. (2010) 'Proline: a multifunctional amino acid', *Trends in Plant Science*, 15(2), pp. 89–97. doi:10.1016/j.tplants.2009.11.009.
- Szalai, G., Pap, M. and Janda, T. (2009) 'Light-induced frost tolerance differs in winter and spring wheat plants', *Journal of Plant Physiology*, 166(16), pp. 1826–1831. doi:https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.04.016.
- Tähtiharju, S., Sangwan, V., Monroy, A.F., Dhindsa, R.S. and Borg, M. (1997) 'The induction of kin genes in cold-acclimating *A. thaliana*. Evidence of a role for calcium', *Planta*, 203(4), pp. 442–447. doi:10.1007/s004250050212.
- Taïbi, K., Del Campo, A.D., Vilagrosa, A., Bellés, J.M., López-Gresa, M.P., López-Nicolás, J.M. and Mulet, J.M. (2018) 'Distinctive physiological and molecular responses to cold stress among cold-tolerant and cold-sensitive *Pinus halepensis* seed sources', *BMC plant biology*, 18(1), p. 236. doi:10.1186/s12870-018-1464-5.
- Tanghe, A., Van Dijck, P., Dumortier, F., Teunissen, A., Hohmann, S. and Thevelein, J.M. (2002) 'Aquaporin Expression Correlates with Freeze Tolerance in Baker's Yeast, and Overexpression Improves Freeze Tolerance in Industrial Strains', *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), p. 5981. doi:10.1128/AEM.68.12.5981-5989.2002.
- Thalman, M. and Santelia, D. (2017) 'Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress', *New Phytologist*, 214(3), pp. 943–951.
- Thomashow, M.F. (1998) 'Role of Cold-Responsive Genes in Plant Freezing

- Tolerance', *Plant Physiology*, 118(1), pp. 1–8. doi:10.1104/pp.118.1.1.
- Thomashow, M.F. (1999)** 'Plant cold acclimation: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms', *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), pp. 571–599. doi:10.1146/annurev.arplant.50.1.571.
- Thomashow, M.F. (2010)** 'Molecular Basis of Plant Cold Acclimation: Insights Gained from Studying the CBF Cold Response Pathway', *Plant Physiology*, 154(2), pp. 571–577. doi:10.1104/pp.110.161794.
- Tian, X., Wang, Z., Li, X., Lv, T., Liu, H., Wang, L., Niu, H. and Bu, Q. (2015)** 'Characterization and Functional Analysis of Pyrabactin Resistance-Like Abscisic Acid Receptor Family in Rice', *Rice (New York, N.Y.)*. 2015/09/11, 8(1), p. 28. doi:10.1186/s12284-015-0061-6.
- Tikkanen, M. and Grebe, S. (2018)** 'Switching off photoprotection of photosystem I – a novel tool for gradual PSI photoinhibition', *Physiologia Plantarum*, 162(2), pp. 156–161. doi:10.1111/pp.12618.
- Tohge, T., Nishiyama, Y., Hirai, M.Y., Yano, M., Nakajima, J., Awazuha, M., Inoue, E., Takahashi, H., Goodenowe, D.B., Kitayama, M., Noji, M., Yamazaki, M. and Saito, K. (2005)** 'Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of Arabidopsis plants over-expressing an MYB transcription factor', *The Plant Journal*, 42(2), pp. 218–235. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02371.x>.
- Trouet, V., Babst, F. and Meko, M. (2018)** 'Recent enhanced high-summer North Atlantic Jet variability emerges from three-century context', *Nature Communications*, 9(1), p. 180. doi:10.1038/s41467-017-02699-3.
- Turner, N.C. (1988)** 'Measurement of plant water status by the pressure chamber technique', *Irrigation Science*, 9(4), pp. 289–308. doi:10.1007/BF00296704.
- Tyerman, S.D., Niemietz, C.M. and Bramley, H. (2002)** 'Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles', *Plant, Cell & Environment*, 25(2), pp. 173–194. doi:<https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00791.x>.
- Uemura, M., Joseph, R.A. and Steponkus, P.L. (1995)** 'Cold Acclimation of *A. thaliana* (Effect on Plasma Membrane Lipid Composition and Freeze-Induced Lesions)', *Plant Physiology*, 109(1), p. 15. doi:10.1104/pp.109.1.15.
- Uemura, M. and Steponkus, P.L. (1994)** 'A Contrast of the Plasma Membrane Lipid Composition of Oat and Rye Leaves in Relation to Freezing Tolerance', *Plant physiology*, 104(2), pp. 479–496. doi:10.1104/pp.104.2.479.
- Uemura, M. and Steponkus, P.L. (2003)** 'Modification of the intracellular sugar content alters the incidence of freeze-induced membrane lesions of protoplasts isolated from *A. thaliana* leaves', *Plant, Cell & Environment*, 26(7), pp. 1083–1096. doi:10.1046/j.1365-3040.2003.01033.x.
- Umezawa, T., Sugiyama, N., Takahashi, F., Anderson, J.C., Ishihama, Y., Peck, S.C. and Shinozaki, K. (2013)** 'Genetics and Phosphoproteomics Reveal a Protein Phosphorylation Network in the Abscisic Acid Signaling Pathway in *A. thaliana*', *Science Signaling*, 6(270), p. 58. doi:10.1126/scisignal.2003509.
- Valerga, L., Darré, M., Zaro, M.J., Lemoine, M.L. and Concellón, A. (2017)** 'Ácido clorogénico en pulpa de berenjena violeta proveniente de plantas con distinta edad', in *Universidad Nacional de La Plata*.
- Venema, J.H., Eekhof, M. and van Hasselt, P.R. (2000)** 'Analysis of Low-temperature Tolerance of a Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Cybrid with Chloroplasts from a more Chilling-tolerant *L. hirsutum* Accession', *Annals of Botany*, 85(6), pp. 799–807. doi:<https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1142>.
- Venema, J.H., Posthumus, F. and van Hasselt, P.R. (1999)** 'Impact of Suboptimal Temperature on Growth, Photosynthesis, Leaf Pigments and Carbohydrates of Domestic and High-altitude Wild *Lycopersicon* Species', *Journal of Plant Physiology*, 155(6), pp. 711–718. doi:[https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(99\)80087-X](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(99)80087-X).
- Verbruggen, N. and Hermans, C. (2008)** 'Proline accumulation in plants: a review', *Amino Acids*, 35(4), pp. 753–759. doi:10.1007/s00726-008-0061-6.
- Vernieri, P., Lenzi, A., Figaro, M., Tognoni, F. and Pardossi, A. (2001)** 'How the roots contribute to the ability of *Phaseolus vulgaris* L. to cope with chilling-induced water stress', *Journal of Experimental Botany*, 52(364), pp. 2199–2206. doi:10.1093/jexbot/52.364.2199.
- Verslues, P.E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S. and Zhu, J.K.J. (2006)** 'Methods and concepts in quantifying resistance to

- drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status; *The Plant Journal*, 45(4), pp. 523–539. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02593.x.
- Verslues, P.E. and Bray, E.A. (2006)** 'Role of abscisic acid (ABA) and *A. thaliana* ABA-insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation', *Journal of Experimental Botany*, 57(1), pp. 201–212. doi:10.1093/jxb/erj026.
- Verslues, P.E. and Sharma, S. (2010)** 'Proline Metabolism and Its Implications for Plant-Environment Interaction', *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 8. doi:10.1199/tab.0140.
- Vierling, E. and Kimpel, J.A. (1992)** 'Plant responses to environmental stress', *Current Opinion in Biotechnology*, 3(2), pp. 164–170. doi:10.1016/0958-1669(92)90147-B.
- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R.K., Kumar, V., Verma, R., Upadhyay, R.G., Pandey, M. and Sharma, S. (2017)** 'Abscisic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects', *Frontiers in Plant Science*, 8, p. 161.
- Vives-Peris, V., Gómez-Cadenas, A. and Pérez-Clemente, R.M. (2017)** 'Citrus plants exude proline and phytohormones under abiotic stress conditions', *Plant Cell Reports*, 36(12), pp. 1971–1984. doi:10.1007/s00299-017-2214-0.
- Vives-Peris, V., López-Climent, M.F., Pérez-Clemente, R.M. and Gómez-Cadenas, A. (2020)** 'Root Involvement in Plant Responses to Adverse Environmental Conditions', *Agronomy*, 10(7). doi:10.3390/agronomy10070942.
- Vu, J.C. V and Yelenosky, G. (1987)** 'Photosynthetic characteristics in leaves of "Valencia" orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) grown under high and low temperature regimes', *Environmental and Experimental Botany*, 27(3), pp. 279–287. doi:https://doi.org/10.1016/0098-8472(87)90037-2.
- Vu, J.C. V and Yelenosky, G. (1992)** 'Photosynthetic responses of rough lemon and sour orange to soil flooding, chilling, and short-term temperature fluctuations during growth', *Environmental and Experimental Botany*, 32(4), pp. 471–477. doi:10.1016/0098-8472(92)90060-F.
- Vu, J.C. V and Yelenosky, G. (1993)** 'Photosynthesis and freeze tolerance comparisons of the newly released "ambersweet" hybrid with "valencia" orange', *Environmental and Experimental Botany*, 33(3), pp. 391–395. doi:10.1016/0098-8472(93)90041-D.
- Walters, M.T., Heasman, A.P. and Hughes, P.S. (1997)** 'Comparison of (+)—Catechin and Ferulic Acid as Natural Antioxidants and Their Impact on Beer Flavor Stability. Part 1: Forced-Aging', *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 55(2), pp. 83–89. doi:10.1094/ASBCJ-55-0083.
- Wang, F., Guo, Z., Li, H., Wang, M., Onac, E., Zhou, J., Xia, X., Shi, K., Yu, J. and Zhou, Y. (2016)** 'Phytochrome A and B Function Antagonistically to Regulate Cold Tolerance via Abscisic Acid-Dependent Jasmonate Signaling', *Plant Physiology*, 170(1), p. 459. doi:10.1104/pp.15.01171.
- Wang, F., Zhang, L., Chen, X., Wu, X., Xiang, X., Zhou, J., Xia, X., Shi, K., Yu, J., Foyer, C.H. and Zhou, Y. (2019)** 'SIHY5 Integrates Temperature, Light, and Hormone Signaling to Balance Plant Growth and Cold Tolerance', *Plant Physiology*, 179(2), p. 749. doi:10.1104/pp.18.01140.
- Wang, M., Zhang, X. and Liu, J.H. (2015)** 'Deep sequencing-based characterization of transcriptome of trifoliolate orange (*P. trifoliata* (L.) Raf.) in response to cold stress', *BMC Genomics*, 16(1), p. 555. doi:10.1186/s12864-015-1629-7.
- Wang, P., Xue, L., Batelli, G., Lee, S., Hou, Y.J., Van-Oosten, M.J., Zhang, H., Tao, W.A. and Zhu, J.K. (2013)** 'Quantitative phosphoproteomics identifies SnRK2 protein kinase substrates and reveals the effectors of abscisic acid action', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(27), p. 11205. doi:10.1073/pnas.1308974110.
- Wang, W., Vinocur, B. and Altman, A. (2003)** 'Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance', *Planta*, 218(1), pp. 1–14. doi:10.1007/s00425-003-1105-5.
- Warschefsky, E.J., Klein, L.L., Frank, M.H., Chitwood, D.H., Londo, J.P., von Wettberg, E.J.B. and Miller, A.J. (2016)** 'Rootstocks: Diversity, Domestication, and Impacts on Shoot Phenotypes', *Trends in Plant Science*, 21(5), pp. 418–437. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138515002885>.

- Whalley, H.J., Sargeant, A.W., Steele, J.F.C., Lacoere, T., Lamb, R., Saunders, N.J., Knight, H. and Knight, M.R. (2011) 'Transcriptomic Analysis Reveals Calcium Regulation of Specific Promoter Motifs in Arabidopsis', *The Plant Cell*, 23(11), p. 4079. doi:10.1105/tpc.111.090480.
- Wisniewski, M., Norelli, J., Bassett, C., Artlip, T. and Macarasin, D. (2011) 'Ectopic expression of a novel peach (*Prunus persica*) CBF transcription factor in apple (*Malus × domestica*) results in short-day induced dormancy and increased cold hardiness', *Planta*, 233(5), pp. 971–983. doi:10.1007/s00425-011-1358-3.
- Xian, L., Sun, P., Hu, S., Wu, J. and Liu, J.H. (2014) 'Molecular cloning and characterization of CrNCED1, a gene encoding 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase in Citrus reshni, with functions in tolerance to multiple abiotic stresses', *Planta*, 239(1), pp. 61–77. doi:10.1007/s00425-013-1963-4.
- Xin, Z. and Browse, J. (1998) 'Esimo1 Mutants of Arabidopsis are Constitutively Freezing-Tolerant', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(13), pp. 7799–7804.
- Yamane, T., Jeong, S., Goto-Yamamoto, N., Koshita, Y. and Kobayashi, S. (2006) 'Effects of Temperature on Anthocyanin Biosynthesis in Grape Berry Skins', *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, pp. 54–59.
- Yamori, W., Hikosaka, K. and Way, D.A. (2014) 'Temperature response of photosynthesis in C3, C4, and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation', *Photosynthesis Research*, 119(1), pp. 101–117. doi:10.1007/s11120-013-9874-6.
- Yamori, W., Noguchi, K., Hanba, Y.T. and Terashima, I. (2006) 'Effects of Internal Conductance on the Temperature Dependence of the Photosynthetic Rate in Spinach Leaves from Contrasting Growth Temperatures', *Plant and Cell Physiology*, 47(8), pp. 1069–1080. doi:10.1093/pcp/pcj077.
- Yamori, W., Noguchi, K., Hikosaka, K. and Terashima, I. (2010) 'Phenotypic Plasticity in Photosynthetic Temperature Acclimation among Crop Species with Different Cold Tolerances', *Plant Physiology*, 152(1), p. 388. doi:10.1104/pp.109.145862.
- Yamori, W., Noguchi, K., Kashino, Y. and Terashima, I. (2008) 'The Role of Electron Transport in Determining the Temperature Dependence of the Photosynthetic Rate in Spinach Leaves Grown at Contrasting Temperatures', *Plant and Cell Physiology*, 49(4), pp. 583–591. doi:10.1093/pcp/pcn030.
- Yamori, W., Noguchi, K. and Terashima, I. (2005) 'Temperature acclimation of photosynthesis in spinach leaves: analyses of photosynthetic components and temperature dependencies of photosynthetic partial reactions', *Plant, Cell & Environment*, 28(4), pp. 536–547. doi:10.1111/j.1365-3040.2004.01299.x.
- Yanef, A., Sigaut, L., Marquez, M., Alleva, K., Pietrasanta, L.I. and Amodeo, G. (2014) 'Heteromerization of PIP aquaporins affects their intrinsic permeability', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), pp. 231–236. doi:10.1073/PNAS.1316537111.
- Yang, J., Wang, M., Zhou, S., Xu, B., Chen, P., Ma, F. and Mao, K. (2022) 'The ABA receptor gene MdPYL9 confers tolerance to drought stress in transgenic apple (*Malus domestica*)', *Environmental and Experimental Botany*, 194, p. 104695. doi:https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104695.
- Yang, L., Ye, J., Guo, W.D., Wang, C.C. and Hu, H.T. (2012) 'Differences in cold tolerance and expression of two fatty acid desaturase genes in the leaves between fingered citron and its dwarf mutant', *Trees*, 26(4), pp. 1193–1201. doi:10.1007/s00468-012-0695-6.
- Yang, T., Chaudhuri, S., Yang, L., Du, L. and Poovaiah, B.W. (2010) 'A calcium/calmodulin-regulated member of the receptor-like kinase family confers cold tolerance in plants', *The Journal of biological chemistry*. 2009/12/21, 285(10), pp. 7119–7126. doi:10.1074/jbc.M109.035659.
- Yano, R., Nakamura, M., Yoneyama, T. and Nishida, I. (2005) 'Starch-Related α -Glucan/Water Dikinase Is Involved in the Cold-Induced Development of Freezing Tolerance in Arabidopsis', *Plant Physiology*, 138(2), pp. 837–846. doi:10.1104/pp.104.056374.
- Yelenosky, G. (1979) 'Accumulation of Free Proline in Citrus Leaves during Cold Hardening of Young Trees in Controlled Temperature Regimes', *Plant physiology*, 64(3), pp. 425–427. doi:10.1104/pp.64.3.425.
- Yelenosky, G. (1985) 'Cold Hardiness in Citrus', in Janick, J. (ed.) *Horticultural Reviews*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 201–238. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118060735.ch5/summary>.

- Yelenosky, G. (1991)** 'Apparent Nucleation and Freezing in Various Parts of Young Citrus Trees during Controlled Freezes', *HortScience*, 26(5), pp. 576–579. Available at: <http://hortsci.ashspublications.org/content/26/5/576>.
- Zelazny, E., Borst, J.W., Muylaert, M., Batoko, H., Hemminga, M.A. and Chaumont, F. (2007)** 'FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007/07/16, 104(30), pp. 12359–12364. doi:10.1073/pnas.0701180104.
- Zhang, D.Y., Ali, Z., Wang, C.B., Xu, L., Yi, J.X., Xu, Z.L., Liu, X.Q., He, X.L., Huang, Y.H., Khan, I.A., Trethowan, R.M. and Ma, H.X. (2013)** 'Genome-wide sequence characterization and expression analysis of major intrinsic proteins in soybean (*Glycine max* L.)', *PloS one*. 2013/02/20, 8(2), pp. e56312–e56312. doi:10.1371/journal.pone.0056312.
- Zhang, J.R., Tolchard, J., Bathany, K., Langlois d'Estaintot, B. and Chaudiere, J. (2018)** 'Production of 3,4-cis- and 3,4-trans-Leucocyanidin and Their Distinct MS/MS Fragmentation Patterns', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(1), pp. 351–358. doi:10.1021/acs.jafc.7b04380.
- Zhang, X., Wang, W., Wang, M., Zhang, H.Y. and Liu, J.H. (2016)** 'The miR396b of *P. trifoliata* Functions in Cold Tolerance by Regulating ACC Oxidase Gene Expression and Modulating Ethylene–Polyamine Homeostasis', *Plant and Cell Physiology*, 57(9), pp. 1865–1878. doi:10.1093/pcp/pcw108.
- Zhang, X.N., Li, X. and Liu, J.H. (2014)** 'Identification of Conserved and Novel Cold-Responsive MicroRNAs in Trifoliolate Orange (*P. trifoliata* (L.) Raf.) Using High-Throughput Sequencing', *Plant Molecular Biology Reporter*, 32(2), pp. 328–341. doi:10.1007/s11105-013-0649-1.
- Zhao, C., Wang, P., Si, T., Hsu, C.C., Wang, L., Zayed, O., Yu, Z., Zhu, Y., Dong, J., Tao, W.A. and Zhu, J.K. (2017)** 'MAP Kinase Cascades Regulate the Cold Response by Modulating ICE1 Protein Stability', 43(5), pp. 618–629. e5. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29056551>.
- Zhao, C., Zhang, Z., Xie, S., Si, T., Li, Y. and Zhu, J.K. (2016)** 'Mutational Evidence for the Critical Role of CBF Transcription Factors in Cold Acclimation in Arabidopsis', *Plant Physiology*, 171(4), p. 2744. doi:10.1104/pp.16.00533.
- Zhao, J. and Dixon, R.A. (2009)** 'MATE transporters facilitate vacuolar uptake of epicatechin 3'-O-glucoside for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula* and Arabidopsis', *The Plant Cell*. 2009/08/14, 21(8), pp. 2323–2340. doi:10.1105/tpc.109.067819.
- Zhiming Yan, Z., Guo, S., Shu, S., Sun, J. and Tezuka, T. (2011)** 'Effects of proline on photosynthesis, root reactive oxygen species (ROS) metabolism in two melon cultivars (*Cucumis melo* L.) under NaCl stress', *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, 10(80), pp. 18381–18390. doi:10.5897/AJB11.1073.
- Zhou, L.L., Zeng, H.N., Shi, M.Z. and Xie, D.Y. (2008)** 'Development of tobacco callus cultures over expressing Arabidopsis PAP1/MYB75 transcription factor and characterization of anthocyanin biosynthesis', *Planta*, 229(1), p. 37. doi:10.1007/s00425-008-0809-y.
- Zhu, X., Ort, D.R., Whitmarsh, J. and Long, S.P. (2004)** 'The slow reversibility of photosystem II thermal energy dissipation on transfer from high to low light may cause large losses in carbon gain by crop canopies: a theoretical analysis', *Journal of Experimental Botany*, 55(400), pp. 1167–1175. doi:10.1093/jxb/erh141.
- Zuluaga, D.L., Gonzali, S., Loreti, E., Pucciariello, C., Degl'Innocenti, E., Guidi, L., Alpi, A. and Perata, P. (2008)** '*A. thaliana* MYB75/PAP1 transcription factor induces anthocyanin production in transgenic tomato plants', *Functional Plant Biology*, 35(7), pp. 606–618. Available at: <https://doi.org/10.1071/FP08021>.

Amparo Primo Capella

Programa de Doctorado en Recursos
y Tecnologías Agrícolas



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA