



**Universidad  
Politécnica  
de Valencia**

Departamento de biotecnología

---

**Respuesta transcripcional al estrés hídrico en  
mandarino. Estudio genómico-funcional con  
micromatrices de cDNA**

**TESIS DOCTORAL**  
Jacinta Gimeno Romeu

**DIRECTORES**  
Dr. Ramón Serrano  
Dr. José Gadea

Valencia, 2007







## Índice de Contenidos

Índice de contenidos.....	I
Índice de tablas.....	IV
Abreviaturas.....	VI
Resumen.....	VIII
Resum.....	X
Summary.....	XII
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>1. Los cítricos.....</b>	<b>3</b>
1.1 Origen y fisiología de los cítricos.....	3
1.2 Importancia económica.....	4
<b>2. El agua en el mundo.....</b>	<b>5</b>
<b>3. Las plantas y la escasez de agua.....</b>	<b>7</b>
3.1. Las plantas frente a los estreses abióticos.....	7
3.2. La sequía: El estrés hídrico debido a la escasez de agua.....	8
3.3 La sequía y los cítricos.....	11
3.4 La mejora de la tolerancia a sequía.....	12
<b>4. Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos (CFGP).....</b>	<b>14</b>
4.1 Genómica funcional.....	14
4.2 Colecciones de ESTs y Micromatrices de cDNA en especies agronómicas.....	15
4.3 Proyecto de Genómica funcional de cítricos.....	18
4.4 Colección de ESTs y micromatriz de cDNA de cítricos. Situación actual.....	20
4.5 Subproyecto de Estrés Hídrico.....	21
<b>5. Micromatrices y estrés abiótico.....</b>	<b>22</b>
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
<b>1. Material vegetal.....</b>	<b>33</b>
<b>2. Diseño del experimento de aplicación del estrés.....</b>	<b>33</b>
<b>3. Extracción de RNA total y purificación de RNAm.....</b>	<b>33</b>
<b>4. Genotecas de cDNA sustraído.....</b>	<b>34</b>
4.1. Síntesis y preparación del cDNA para la sustracción.....	35
4.1.1. Síntesis de cDNA.....	35
4.1.2. Preparación del cDNA para la sustracción.....	37
4.2. Sustracción de cDNA.....	38
4.3. Clonaje en el vector y transformación.....	40
<b>5. Obtención y anotación de ESTs (Expressed Sequence Tag).....</b>	<b>40</b>
5.1. Obtención de ESTs.....	40
5.1.1. Purificación de los plásmidos.....	40
5.1.2. Secuenciación de los plásmidos purificados.....	41
5.2. Procesado, ensamblaje y anotación de las ESTs.....	42

<b>6. Experimento de Micromatrices.....</b>	<b>43</b>
6.1. Micromatriz de cDNA de primera generación del CFGP.....	43
6.2. Diseño del experimento de Micromatrices.....	43
6.3. Preparación de las sondas.....	44
6.4. Hibridación de las Micromatrices.....	44
6.5 Obtención de los datos de las Micromatrices.....	47
<b>7. RT-PCR semicuantitativa.....</b>	<b>48</b>
<b>8. Análisis de proteínas.....</b>	<b>49</b>
8.1 Extracción de proteína de muestras vegetales.....	49
8.2 Sobreexpresión y purificación de la proteína recombinante.....	50
8.3 Obtención y optimización de anticuerpos policlonales.....	51
8.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	52
8.5 Análisis Western blot.....	52
<b>9. Análisis del contenido de azúcares).....</b>	<b>53</b>
9.1 Extracción de azúcares de material vegetal.....	53
9.2 Detección de azúcares en muestras vegetales.....	53
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>57</b>
<b>1. Diseño experimental.....</b>	<b>57</b>
<b>2. Bibliotecas de cDNA.....</b>	<b>58</b>
2.1 Bibliotecas de estrés hídrico. Drought1 y Drought2).....	58
2.2 Clasificación funcional de los unigenes específicos de Drought 1 y Drought 2.....	59
2.3 Análisis comparativo entre ESTs procedentes de tejidos sometidos a sequía, salinidad y frío.....	67
<b>3. Estudio del transcriptoma de cítricos bajo condiciones de estrés hídrico con micromatrices de cDNA).....</b>	<b>69</b>
3.1 Identificación de genes de respuesta a estrés hídrico.....	69
3.2 Niveles de coincidencia entre la respuesta a estrés hídrico en hojas y raíces de cítricos.....	71
3.3 Patrones de expresión de los unigenes específicos de estrés hídrico.....	73
3.4 Clasificación funcional.....	76
3.4.1 Asignación de función.....	76
3.4.2 Análisis de la respuesta a estrés hídrico en cítricos.....	77
<b>4. Validación de los datos del experimento de micromatrices para unigenes seleccionados....</b>	<b>85</b>
<b>5. Desarrollo de estudios pormenorizados de algunos genes.....</b>	<b>88</b>
5.1 Miraculinas/Inhibidores de tripsinas.....	88
5.1.1. Introducción.....	88
5.1.2. Miraculinas de cítricos bajo condiciones de estrés hídrico.....	89
5.2 Dehidrina COR15.....	93
5.2.1 Introducción.....	93
5.2.2 Detección de la proteína COR15 en plantas sometidas a estrés hídrico.....	96
5.2.2.1 Obtención y caracterización del anticuerpo policlonal de la proteína recombinante CrCOR15.....	97
5.2.2.2 Niveles de proteína COR15 en hojas de plantas sometidas a estrés hídrico.....	99
5.3 Rafinosa Sintasa.....	100
5.3.1. Introducción.....	100
5.3.2 Detección de Rafinosa en cítricos.....	100
<b>V. DISCUSIÓN FINAL.....</b>	<b>105</b>

<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>113</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>117</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>141</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>147</b>



## Índice de Tablas

### Tablas presentes en el texto:

Tabla. 1. Unigenes específicos de la biblioteca Drought1 (Hojas).Clasificación funcional.....	61
Tabla. 2. Unigenes específicos de la biblioteca Drought2 (Raíz). Clasificación funcional.....	62

### Tablas presentes en el Anexo II:

Tabla. 3. Unigenes específicos de EH-hojas (Inducidos). ....	147
Tabla. 4. Unigenes específicos de EH-hojas (Reprimidos). ....	149
Tabla. 5. Unigenes específicos de EH-raíces (Inducidos). ....	150
Tabla. 6. Unigenes específicos de EH-raíces (Reprimidos). ....	152
Tabla. 7. Unigenes comunes de EH-ER hojas (Inducidos).....	153
Tabla. 8. Unigenes comunes de EH-ER hojas (Reprimidos).....	156
Tabla. 9. Unigenes comunes de EH-ER raíces (Inducidos).....	158
Tabla. 10. Unigenes comunes de EH-ER raíces (Reprimidos).....	159
Tabla. 11. Unigenes específicos de ER-hojas (Inducidos).....	160
Tabla. 12. Unigenes específicos de ER-hojas (Reprimidos).....	162
Tabla. 13. Unigenes específicos de ER-raíces (Inducidos).....	163
Tabla. 14. Unigenes específicos de ER-raíces (Reprimidos).....	164

### Tablas suplementarias (se adjuntan en un CD):

#### Bibliotecas de sustracción (Apartado 2.1 Resultados):

Tabla supl. 1. Unigenes de la biblioteca Drought 1	
Tabla supl. 2. Unigenes de la biblioteca Drought 2	

#### Microarray (Apartado 3.1 Resultados):

Tabla supl. 3. Unigenes específicos de EH-hojas (Inducidos)	
Tabla supl. 4. Unigenes específicos de EH-hojas (Reprimidos)	
Tabla supl. 5. Unigenes específicos de EH-raíces (Inducidos)	
Tabla supl. 6. Unigenes específicos de EH-raíces (Reprimidos)	
Tabla supl. 7. Unigenes comunes de EH-ER hojas (Inducidos)	
Tabla supl. 8. Unigenes comunes de EH-ER hojas (Reprimidos)	
Tabla supl. 9. Unigenes comunes de EH-ER raíces (Inducidos)	
Tabla supl. 10. Unigenes comunes de EH-ER raíces (Reprimidos)	
Tabla supl. 11. Unigenes específicos de ER-hojas (Inducidos)	
Tabla supl. 12. Unigenes específicos de ER-hojas (Reprimidos)	
Tabla supl. 13. Unigenes específicos de ER-raíces (Inducidos)	
Tabla supl. 14. Unigenes específicos de ER-raíces (Reprimidos)	

#### Comparación entre estreses (Apartado 2.3 Resultados):

Tabla supl. 15. Unigenes específicos de estrés por sequía	
Tabla supl. 16. Unigenes específicos de estrés salino	
Tabla supl. 17. Unigenes específicos de estrés por frío	
Tabla supl. 18. Unigenes comunes sequía-salinidad	
Tabla supl. 19. Unigenes comunes sequía-frío	
Tabla supl. 20. Unigenes comunes frío-salinidad	
Tabla supl. 21. Unigenes comunes sequía-salinidad-frío	

Comparación entre tejidos (Apartado 3.2 Resultados):

- Tabla supl. 22. Unigenes inducidos comunes hoja-raíz
- Tabla supl. 23. Unigenes reprimidos comunes hoja-raíz
- Tabla supl. 24. Unigenes inducidos específicos hoja
- Tabla supl. 25. Unigenes inducidos específicos raíz
- Tabla supl. 26. Unigenes reprimidos específicos hoja
- Tabla supl. 27. Unigenes reprimidos específicos raíz

## Abreviaturas

<b>ABA</b>	Ácido abscísico
<b>ACC</b>	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
<b>ALIMPO</b>	Asociación Interprofesional de limón y pomelo
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>C</b>	Experimento control
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Ion calcio
<b>CAPA</b>	Conselleria d' Agricultura, Pesca i Alimentació
<b>CBL</b>	Proteína similar a calcineurina B ( <i>calcineurin B-like protein</i> )
<b>CIPK<sub>s</sub></b>	Proteína kinasa interactuante con CBL ( <i>CBL Interacting Protein Kinases</i> )
<b>CDPK<sub>s</sub></b>	Proteína kinasa dependiente de calcio ( <i>calcium-dependent protein kinase</i> )
<b>cDNA</b>	DNA complementario
<b>CFGF</b>	Proyecto de genómica funcional de cítricos ( <i>Citrus Functional Genomics Project</i> )
<b>Cy</b>	Cianina
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DTT</b>	Ditriotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético
<b>EH</b>	Experimento de aplicación de estrés hídrico por trasplante
<b>ER</b>	Experimento control del trasplante o de rotura
<b>EST</b>	<i>Expressed Sequence Tag</i>
<b>FAO</b>	<i>Food and Agriculture Organization</i>
<b>HSP</b>	Proteína de respuesta a choque térmico ( <i>heat shock protein</i> )
<b>INM</b>	Instituto Nacional de Meteorología
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol-1,4,5-trifosfato
<b>IPTG</b>	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
<b>JA</b>	Ácido jasmínico
<b>LB</b>	Medio Luria-Bertani

<b>LEA</b>	Abundante en la embriogénesis tardía ( <i>late embryogenesis abundant</i> )
<b>MAPA</b>	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
<b>MAPK</b>	Proteína kinasa activada por mitógeno ( <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
<b>µg</b>	Microgramo
<b>mg</b>	Miligramo
<b>min</b>	Minuto
<b>MMA</b>	Ministerio de Medio Ambiente
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>NCED</b>	9-cis-epoxicarotenoide deshidrogenasa
<b>ONU</b>	Organización de Naciones Unidas
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>QTL</b>	<i>Quantitative trait loci</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>ROS</b>	Especies de oxígeno reactivo ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>RT-PCR</b>	Transcripción reversa acoplada a PCR
<b>Rubisco</b>	Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa
<b>s</b>	Segundo
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SSC</b>	Tampón salino de citrato sódico (Na <sub>3</sub> Citrato 0.15 M pH7, NaCl 1.5 M)
<b>TAIR</b>	<i>The Arabidopsis Information Resource</i>
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano

## Resumen

La citricultura es una de las ramas de la fruticultura de mayor producción a nivel mundial, siendo España el cuarto productor y primer país exportador mundial de cítricos para consumo en fresco (FAO, 2005). La obtención de nuevas variedades que se adapten a las exigencias de mercado y de cultivo es la clave para continuar siendo competitivos. La reducción de las precipitaciones en muchas zonas agrícolas provoca que el estrés hídrico sea uno de los estreses abióticos que más limita la producción de los cultivos, entre ellos los cítricos. Aunque son numerosos los estudios orientados a conocer mejor la respuesta de la planta ante el estrés hídrico a nivel molecular en especies modelo, son pocos los trabajos realizados en relación a la respuesta al estrés hídrico en cítricos. Este trabajo tiene como objetivo el desarrollo de herramientas que nos permitan conocer mejor la respuesta de los cítricos frente a este estrés que en un futuro puedan utilizarse para conseguir cítricos que sean capaces de aprovechar mejor el agua disponible en condiciones adversas, evitando las importantes pérdidas de cosecha.

El análisis global de la respuesta a estrés hídrico en cítricos se ha llevado a cabo a través de un estudio del transcriptoma de los cítricos sometidos a este estrés. Para ello se han utilizado dos abordajes, la generación de ESTs y la hibridación de micromatrices de cDNA, que han permitido identificar genes candidatos a estar implicados en la respuesta a estrés hídrico.

La generación de ESTs se ha realizado a partir de la secuenciación de un total de 2296 clones aislados de dos bibliotecas de cDNA sustraído, Drought1 y Drought2, construidas a partir de hojas y raíces de plantas sometidas a estrés hídrico respectivamente. Las ESTs obtenidas han pasado a formar parte de la colección del CFGP (Citrus Functional Genomics Project). Como resultado del estudio de los unigenes resultantes de las bibliotecas construidas con material sometido a estrés hídrico, en relación con el resto de unigenes de la colección (procedentes de bibliotecas construidas con diversos tejidos sometidos a diferentes estreses), se ha determinado que la respuesta a estrés hídrico en cítricos es mucho más específica en raíces que en hojas respecto a otros estreses y que al igual que sucede en otras especies, existe una parte de la respuesta común entre sequía, salinidad y frío y otra común entre cada par de dichos estreses.

La segunda de las estrategias utilizadas ha sido la hibridación de micromatrices de cDNA, para lo cual se ha utilizado la micromatriz de primera generación del CFGP que contiene unos 7000 unigenes. Los resultados de la comparación de los unigenes inducidos y reprimidos en hojas y raíces de plantas sometidas a estrés hídrico apuntan a que existe un alto grado de especificidad de tejido en la respuesta a dicho estrés en cítricos. Además, la obtención de niveles de transcrito a las 5, 10 y 24 horas tras la aplicación del estrés ha permitido identificar dos patrones de expresión durante este periodo. El primer grupo se han denominado de “respuesta rápida prolongada”, y está formado por unigenes que alcanzan sus valores máximos de inducción o represión a las 5 horas y los mantienen durante todo el periodo de estrés. El segundo, denominado de “respuesta rápida transitoria” está formado por unigenes que alcanzan los valores máximos de inducción o represión entre las 5 y 10 horas y experimentan una caída progresiva entre las 10 y las 24 horas.

La clasificación funcional de los unigenes específicos de estrés hídrico obtenidos a través de estas dos estrategias ha permitido tener una visión comprensiva de la regulación transcripcional de estos genes identificados como posibles candidatos a estar relacionados con la respuesta a estrés hídrico en cítricos. Esta clasificación se ha basado en diferentes categorías funcionales, las cuales han sido seleccionadas por su importancia en la respuesta a estrés hídrico en plantas, destacándose en ambos casos la presencia de un numeroso grupo de genes de función desconocida que podrían formar parte de rutas de respuesta todavía sin determinar.

Por último, dando los primeros pasos en la utilización de toda la información generada a partir de este análisis global del transcriptoma de los cítricos bajo condiciones de estrés hídrico, se han iniciado tres líneas de trabajo orientadas a conocer con más detalle la implicación de algunos genes en la respuesta a dicho estrés. Los genes seleccionados pertenecen a tres grupos diferentes de conocida importancia en la respuesta a estrés en otras especies: los inhibidores de proteasas, las proteínas LEA y los osmolitos.

## Resum

La citricultura és una de les branques de la fructicultura de major producció a nivell mundial, sent Espanya el quart productor i primer país exportador mundial de cítrics per a consum en fresc (FAO, 2005). L'obtenció de noves varietats que s'adaptin a les exigències de mercat i de cultiu és la clau per a continuar sent competitiu. La reducció de les precipitacions en moltes zones agrícoles provoca que l'èstres hídric siga un dels estressos abiòtics que més limita la producció dels cultius, entre ells els cítrics. Encara que són nombrosos els estudis orientats a conèixer millor la resposta de la planta davant de l'èstres hídric a nivell molecular en espècies model, són pocs els treballs realitzats en relació a la resposta a l'èstres hídric en cítrics. Este treball té com a objectiu el desenvolupament de ferramentes que ens permeten conèixer millor la resposta dels cítrics enfront d'este èstres que en un futur puguen utilitzar-se per a aconseguir cítrics que siguen capaços d'aprofitar millor l'aigua disponible en condicions adverses, evitant les importants pèrdues de collita.

L'anàlisi global de la resposta a èstres hídric en cítrics s'ha portat a terme a través d'un estudi del transcriptoma dels cítrics sotmesos a este èstres. Per a això s'han utilitzat dos abordatges, la generació d'ESTs i la hibridació de micromatrius de cDNA, que han permés identificar gens candidats a estar implicats en la resposta a èstres hídric.

La generació d'ESTs s'ha realitzat a partir de la seqüenciació d'un total de 2296 clons aïllats de dos biblioteques de cDNA sostret, Drought1 i Drought2, construïdes a partir de fulles i arrels de plantes sotmeses a èstres hídric respectivament. Les ESTs obtingudes han passat a formar part de la col·lecció del CFGP. Com resultat de l'estudi dels unigenes resultants de les biblioteques construïdes amb material sotmés a èstres hídric, en relació amb la resta d'unigenes de la col·lecció (procedents de biblioteques construïdes amb diversos teixits sotmesos a diferents estressos), s'ha determinat que la resposta a èstres hídric en cítrics és molt més específica en arrels que en fulles respecte a altres estressos i que igual que succeïx en altres espècies, hi ha una part de la resposta comuna entre sequera, salinitat i fred i una altra comuna entre cada parell de dits estressos.

La segona de les estratègies utilitzades ha sigut la hibridació de micromatrius de cDNA, per a això s'ha utilitzat la micromatriu de primera generació del CFGP que conté uns 7000 unigenes. Els resultats de la comparació dels unigenes induïts i reprimits en fulles i arrels de plantes sotmeses a èstres hídric apunten que hi ha un alt grau d'especificitat de teixit en la resposta a dit èstres en cítrics. A més, l'obtenció de nivells de transcrit a les 5, 10 i 24 hores després de l'aplicació de l'èstres ha permés identificar dos patrons d'expressió durant este període. El primer grup s'han denominat de "resposta ràpida prolongada", i està format per unigenes que aconseguixen els seus valors màxims d'inducció o repressió a les 5 hores i els mantenen durant tot el període d'èstres. El segon, denominat de "resposta ràpida transitòria" està format per unigenes que aconseguixen els valors màxims d'inducció o repressió entre les 5 i 10 hores i experimenten una caiguda progressiva entre les 10 i les 24 hores.

La classificació funcional dels unigenes específics d'èstres hídric obtinguts a través d'estes dos estratègies ha permés tindre una visió comprensiva de la regulació transcripcional d'estos gens identificats com a possibles candidats a estar relacionats amb la resposta a èstres hídric en cítrics. Esta classificació s'ha basat en diferents categories funcionals, les quals han sigut seleccionades per la seua importància en la resposta a èstres hídric en plantes, destacant-se en estos dos casos la presència d'un nombrós grup de gens de funció desconeguda que podrien formar part de rutes de resposta encara sense determinar.

Per últim, donant els primers passos en la utilització de tota la informació generada a partir d'esta anàlisi global del transcriptoma dels cítrics baix condicions d'èstres hídric, s'han iniciat tres línies de treball orientades a conèixer amb més detall la implicació d'alguns gens en la resposta a dit èstres. Els gens seleccionats pertanyen a tres grups diferents de coneguda importància en la resposta a èstres en altres espècies: els inhibidors de proteases, les proteïnes LEA i els osmolitos.



## Summary

Citriculture is one of the branches of fruit growing with greater production, being Spain the fourth producer and first world-wide exporting country of citrus for fresh consumption (FAO, 2005). To continue being competitive, obtaining new varieties adapted to market exigencies is mandatory. The reduction of precipitations in many agricultural zones makes drought one of the abiotic stresses that most limit crop production. Many molecular studies have been performed in model species to decipher the molecular response of plants to water stress. However, virtually nothing is known about this response in citrus plants.

The objective of this work is the development of genomic tools for citrus research, and use them to gain insight into the response of these plants to water stress, opening the way to the generation of new citrus varieties more adapted to low precipitations conditions.

A global transcriptomic analysis from citrus plants under water stress have been performed, using two approaches: ESTs generation and cDNA microarray hybridization. The work have allowed the identification of a plethora of candidates genes putatively involved in the response of citrus to this kind of stress.

EST generation has been performed by partial sequencing of 2296 clones isolated from two cDNA substraction libraries, generated from roots and leaves of water stressed plants. ESTs have been added to the Citrus Functional Genomics Project EST repository. The comparison of our ESTs with the rest of the repository, that included ESTs generated from many developmental stages and stress conditions, reveals that root response to water stress appears to be more specific that that of leaves. It is relevant to note also that, as in other plant species, a common response to cold, salinity and drought stress exists also in citrus.

Microarray experiments have been performed using the first generation cDNA microarray generated by the Citrus Functional Genomics Project. Transcriptomic profiling of root and leaves from water stress plants suggests an interesting component of tissue specificity in the response to the stress. Moreover, clustering of data from 5, 10 and 24 hours after stress initial reveals two distinct behaviors. The first one, named "early response cluster", included genes that are already induced or repressed 5h after application of the stress and that maintain this level of expression along the 24h treatment. The second one, named "early transient response cluster" included genes that are already induced or repressed 5h after application of the stress, but this level of expression decays to basal levels along the 24h treatment.

Functional classification of candidate genes obtained using both strategies has allowed a comprehensive overview of the transcriptional regulation of water stress response in citrus. It is remarkable the existence of a group of genes with unknown function, that could be part of stress response pathways without determining.

Finally, three gene families (proteinases inhibitors, LEA proteins and osmolite synthesis enzymes), have been selected for further studies, and the first steps towards the understanding of the role of these genes in the response of plants to water stress have been initiated.



## **I. INTRODUCCIÓN**



## I. INTRODUCCIÓN

### 1. Los cítricos

#### 1.1 Origen y fisiología de los cítricos

Desde el punto de vista botánico los cítricos son un grupo de especies que pertenecen a la familia de las *Rutaceas*, subfamilia *Aurantoideas* (Davies y Albrigo, 1999; Agustí, 2003). Tras una revisión de la clasificación (Swingle y Reece, 1967), la subfamilia *Aurantoideas* se dividió en dos tribus *Clauseneae* y *Citreae*, esta última a su vez se divide en tres subtribus, una de las cuales, la *Citrinae* contiene los tres géneros de cítricos cultivados: *Poncirus* (naranja trifoliado) que da frutos no comestibles y es empleado en algunos países como patrón, y *Fortunella* (Kumquat) y *Citrus*, especies de frutos comestibles. Todos ellos son árboles diploides ( $2n=18$ ), excepto *F. hindsii* que es tetraploide ( $2n=36$ ) Las especies del género *Citrus* son las más importantes desde el punto de vista agronómico. Según la clasificación de Swingle, 1967, este género está formado por 16 especies, pero según una clasificación posterior más amplia (Tanaka, 1977), en el género *Citrus* se incluyen 162 especies. Actualmente ambas clasificaciones son utilizadas, pero estudios recientes intentan realizar clasificaciones basadas en técnicas moleculares para detectar, caracterizar y evaluar la variedad genética de los cítricos (Corazza-Nunes et al., 2002; Campos et al., 2005; Ancillo et al., 2007).

El área general de origen de los cítricos se localiza en el suroeste de Asia en una zona que abarca desde Arabia Oriental, hacia el este, hasta Filipinas y desde la vertiente meridional del Himalaya hasta China meridional, Indochina, Tailandia, Malasia, Indonesia y Australia. Dentro de esta gran región su centro de origen parece localizarse al noreste de la India, norte de Birmania y suroeste de China. Actualmente su cultivo se extiende por la mayor parte de las regiones tropicales y subtropicales comprendidas entre las latitudes 44° N y 41° S (Davies y Albrigo, 1999; Moore, 2001; Agustí, 2003).

En España parece que el primer cítrico introducido fue el cidro (*Citrus medica* L.) en el siglo VII procedente de Italia. El naranja amargo (*Citrus aurantium* L.) y el limonero (*Citrus limon* (L.) Burm.f.) llegaron a la península a través de África y procedentes de Arabia, de manos de los árabes en el siglo XI. Estos además fueron los responsables de la difusión de los agrios en España, propagándolos en parques, jardines y calles de muchas ciudades. Del naranja dulce (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) se desconoce con exactitud cómo y cuándo fue introducido en España, pero ciertos indicios apuntan a que fue introducido por los genoveses a través de sus rutas comerciales con Oriente a mediados del siglo XV. El mandarino (*Citrus reticulata* Blanco) llegó a la península mucho más tarde. En 1845 se promovió la aclimatación de injertos en Valencia, pero no fue hasta 1856 cuando se iniciara su cultivo a partir de material vegetal importado a Castellón de la Plana desde Palermo, Niza y Génova, donde ya se conocía su cultivo. La historia del pomelo (*Citrus paradisi* Macf.), en cambio, es mucho más reciente. Las primeras plantas fueron importadas en 1910 desde Estados Unidos por la Estación Naranjera de Levante (Zaragoza, 1993; Agustí, 2003; Castañer, 2006). A partir de este momento se produce una sustitución de la gran variedad de cultivos hortícolas tradicionales a favor del cultivo de cítricos, produciéndose una transformación total del paisaje agrícola hasta convertirse en nuestros días en el cultivo de mayor producción y superficie en la Comunidad Valenciana.

Los cítricos son árboles de hoja perenne, la hoja es unifoliada y de nerviación reticulada, generalmente con espinas en las axilas, variables en tamaño y dureza. El sistema radicular es poco profundo. Las flores se organizan en inflorescencias uni o multiflorales, con o sin hojas. El fruto es una baya denominada hesperidio de forma variable. Esta baya está formada por un ovario simple de 8 a 10 carpelos soldados rodeados por una corteza resistente. La pulpa está formada por vesículas, que contienen el zumo, unidas por un filamento vascular a las paredes dorsales de los segmentos. La corteza contiene numerosas glándulas de aceites esenciales y su color varía desde amarillo-verdoso (limas, limones y pomelos) a naranja más o menos rojizo (naranjas y mandarinas). Sus semillas, cuando existen, son ovoides o redondeadas y contienen uno o más embriones (Loussert, 1992; Agustí, 2003). Tienen un sistema de reproducción complejo. Muchas especies presentan esterilidad total o parcial de polen y ovarios e inter y autocompatibilidad sexual, apomixis con embrionía nucelar, elevada heterozigosis y un prolongado periodo juvenil de entre 5 y 8 años.

Tienen gran capacidad de adaptación a climas muy diversos. A pesar de su origen subtropical, los cítricos pueden ser cultivados con éxito bajo climas muy calurosos y relativamente secos o en regiones de invierno poco frío. Toleran una amplia gama de suelos, pero prosperan en aquellos fértiles, bien drenados y ligeramente ácidos (pH 6-6,5). Las raíces necesitan una profundidad de 1-1,5 m. Sus necesidades hídricas están entre 7.500 y 12.000 m<sup>3</sup>/ha al año.

Como la mayoría de especies frutales, los árboles cultivados con interés comercial están formados de dos especies, el patrón y la variedad, injertadas una sobre la otra, aportando una las raíces y la otra la parte aérea, de forma que su combinación de como resultado las mejores características posibles para adaptarse al medio en el que esté cultivado. Al igual que otras especies vegetales cultivadas, los cítricos han pasado por procesos de domesticación y adaptación dirigidos de forma empírica por el hombre. Las principales especies modernas de cítricos no se encuentran en estado silvestre, pues son el resultado de mutaciones o hibridaciones espontáneas o fruto de programas de mejora.

## 1.2 Importancia económica

La citricultura se caracteriza por ser una de las ramas frutícolas de mayor producción a nivel mundial con una superficie cultivada total de 6,5 millones de hectáreas y una producción de algo más de 100 millones de toneladas (FAO, 2005)

El mercado cítrico elabora una serie de productos y subproductos de gran importancia para la alimentación humana (zumos, mermeladas) y animal (piensos) y para la industria farmacéutica de cosméticos y perfumes (aceites esenciales, cáscaras deshidratadas, etc), pero la mayor parte de la producción se destina al consumo de la fruta en fresco.

Según los datos estimados por la FAO para la campaña 2005 y tomando los cítricos en global (naranjas, limones, limas, tangerinas, mandarinas, clementinas, toronjas y pomelos), el principal productor es Brasil cuya producción es de más de 20 millones de toneladas (20.142.100), seguido por EEUU con una producción de casi 15 millones. El tercer lugar lo ocupa China con algo más de 10 millones seguido en cuarto y quinto lugar por España y México que producen 6 y 5 millones de toneladas, respectivamente.

La producción de cítricos está dominada por las naranjas que representan un 61%; le siguen en orden de importancia las mandarinas con un 23%, ocupando el tercer y cuarto lugar los limones (12%) y los pomelos (4%), respectivamente (FAO, 2004).

En lo referente al comercio internacional, las exportaciones mundiales de cítricos ascienden a casi 12 millones de toneladas según estimaciones de la FAO para

la campaña 2004. Esto significa que alrededor del 12% de la producción mundial se exporta, siendo los principales exportadores países como España, Sudáfrica y EEUU. El principal importador es Alemania con más de un millón de toneladas de cítricos frescos, seguido de Francia, La Federación de Rusia, Reino Unido y Países Bajos.

Según las cifras FAO del 2004, España produjo casi 5,8 millones de Tm. de cítricos en 290,400 Ha., siendo el primer exportador mundial de cítricos para su consumo en fresco con casi 3,5 millones de toneladas, ocupando el primer lugar como exportador de naranjas, mandarinas, limas y limones en el mundo y el séptimo lugar como exportador de toronjas y pomelos y dedicando la mayor parte de sus exportaciones a los mercados de Europa (Alemania y Francia) y EEUU.

La producción cítrica española se encuentra localizada en la Comunidad Valenciana, Andalucía, Murcia, Cataluña y Baleares. La zona de producción más importante es la Comunidad Valenciana, que aporta más del 65% de la producción total del país, seguida de Andalucía y Murcia que aportan un 20 y un 11% respectivamente (CAPA, 2004).

De los 5 millones de toneladas producidas en España, un 44% corresponde a naranjas dulces, un 41% a mandarinas y un 12% a limones (AILIMPO, 2004). Dentro de las mandarinas, al subgrupo de las Clementinas le corresponde el 86% de la producción, y de ellas el 42% a la variedad Clementino de Nules (MAPA, 2004; AILIMPO, 2004). Como se aprecia en los datos señalados, el cultivar Clementino de Nules es el más representativo de la industria cítrica española debido, principalmente, a su calidad y a la gran aceptación por parte de los consumidores.

## 2. El agua en el mundo

Los recursos hídricos mundiales deben responder a múltiples demandas: agua potable, higiene, producción de alimentos, energía y bienes industriales, y mantenimiento de los ecosistemas naturales. Sin embargo, los recursos hídricos globales son limitados y están mal distribuidos. A pesar de que el agua dulce es un recurso esencial, su distribución no es equitativa: mientras que el 70% de la superficie mundial está cubierta por agua, el 97.5% de ella es agua salada y del restante 2.5%, que es agua dulce, casi toda se encuentra congelada, en depósitos subterráneos o en otros lugares de difícil utilización. Por tanto, sólo un 0,26% de la masa total de agua del planeta es fácilmente aprovechable para los usos humanos. Aunque es un porcentaje algo reducido, debería ser suficiente para satisfacer las necesidades globales; pero su irregularidad tanto en el espacio como en el tiempo, así como la mala gestión de los recursos, su creciente demanda y la degradación de la calidad de los mismos, han hecho que el agua haya pasado rápidamente de ser considerada como bien público a valorarse como recurso escaso.

Durante la última década, la comunidad internacional ha tomado mayor conciencia de la necesidad de desarrollar prácticas sostenibles para la protección, gestión y el uso eficiente de los recursos hídricos. El clima, especialmente las precipitaciones y la temperatura, es el factor que más influye en los recursos hídricos. Además el aumento de la población mundial provoca que los recursos per cápita disponibles sean cada vez más restringidos, por lo que se hace necesaria una mayor productividad para poder compensar dicho crecimiento.

La mayor parte del agua de la que se alimentan las plantas procede de la lluvia, que humedece los suelos, sin embargo del 0,26% del agua destinada a consumo humano aproximadamente un 70% se utiliza para el riego. La irrigación desempeña un papel estratégico: suple el agua de lluvia en aquellos casos en que la humedad del suelo no resulta suficiente para satisfacer con seguridad las necesidades de los cultivos. La irrigación es especialmente importante en zonas vulnerables a la

variabilidad climática excesiva o donde la multiplicidad de cultivos requiere de una provisión de agua más allá del periodo de lluvias.

Los planes de irrigación a gran escala y subvencionados por el Estado, que en su día contribuyeron substancialmente al incremento de la producción agrícola, están intentando adaptarse al contexto actual ya que muchos sistemas se encuentran infraequipados para responder a los desafíos que implican una mayor escasez de agua. Es necesario producir más y mejores alimentos con menor cantidad de agua por unidad de producción (UNESCO, 2006; ONU, 2002)

En cuanto al problema de la escasez de agua en España basta con ver los datos del último año hidrometeorológico, que abarca desde el 1 de septiembre de 2004 hasta el 31 de agosto de 2005, que se considera el año más seco en España desde que se inició el cálculo de volúmenes de precipitación en 1947 (INM, 2005).

El agua tiene muchos usos, el 7% se destina al abastecimiento industrial, el 15% a consumo urbano y el 78% al riego agrícola. El motivo por el cual el regadío absorbe una proporción tan importante del agua es que la agricultura más rentable es la que se da en la España seca, y depende en gran medida de la disponibilidad de agua, siendo la técnica del riego por gravedad la más utilizada y la que gasta el 69,2% de esta agua (INE, 2003). Por tanto, el clima unido al mal uso, explican que España sea uno de los mayores consumidores de agua del mundo

Las políticas de gestión de los recursos hídricos en la península han estado dirigidas a la mayor obtención y mejor distribución del agua. Esto se ha conseguido con la realización, desde hace años, de un gran número de presas en nuestros ríos, lo cual nos convierte en el cuarto país del mundo con mayor número de grandes presas; también se han realizado transvases entre cuencas hidrológicas y la construcción de desalinizadoras. Las nuevas políticas también se están centrando en el tema del ahorro, ya que el agua se está convirtiendo en un bien escaso y por tanto se trata de aumentar la eficiencia en todos sus usos (MMA, 2004; MMA, 2000)

Desde el punto de vista agrícola las posibles soluciones pasan, por un lado, por la modernización de todos los sistemas de regadío y por otro, por la utilización de cultivos con pocas necesidades hídricas. En vistas a esta última posible solución numerosos proyectos de investigación a nivel mundial (Parry et al., 2005) están orientados a la obtención de variedades mejoradas que sean capaces de resistir mejor las condiciones adversas de falta de agua que la propia variedad sin mejorar. Entre ellas tenemos por ejemplo una nueva variedad de tomate en la que se ha sobreexpresado el factor de transcripción CBF1 el cual se une a la región del promotor denominada DRE/CTR presente en genes inducidos bajo estrés hídrico, frío y salinidad, promoviendo por tanto la expresión de genes que confieren tolerancia a estos estreses y permitiendo que la planta transformada produzca mayor número de frutos y más biomasa bajo condiciones de estrés hídrico que la planta sin mejorar (Hsieh et al., 2002). Otro ejemplo, es una variedad de maíz en la que se ha sobreexpresado el gen de la proteína NPK1, una MAPKKK (mitogen-activated protein kinase kinase kinase) de tabaco situada aguas arriba de la ruta de señalización del estrés oxidativo. Las plantas transgénicas de maíz muestran mayores ratios de tasa fotosintética lo que sugiere que NPK1 induce un mecanismo que protege la maquinaria fotosintética del daño producido por la deshidratación. El peso de los granos producidos por las plantas transgénicas bajo condiciones de sequía es similar al de los granos de las plantas no transgénicas bien regadas (Shou et al., 2004).

### 3. Las plantas y la escasez de agua

#### 3. 1. Las plantas frente a los estreses abióticos

Las plantas, creciendo en su ambiente natural, se encuentran sometidas a diversos estreses a lo largo de su desarrollo. En términos biológicos se entiende por estrés cualquier condición externa adversa que afecte al funcionamiento normal de la planta, inhibiendo su crecimiento, desarrollo y productividad. Los estreses pueden ser bióticos, si los provocan otros organismos, o abióticos, causados por variaciones desfavorables en las condiciones ambientales (Bray, 2000). Entre los estreses abióticos encontramos, la sequía, salinidad del suelo, hipoxia (falta de aporte de oxígeno en suelos encharcados y compactados), temperaturas extremas, exceso o escasez de radiación, rotura o daño mecánico, nivel inadecuado de nutrientes en el suelo y toxicidad por metales o por agentes contaminantes.

Los estreses abióticos y sus efectos en las plantas, tanto en su ambiente natural como agrícola, es un tema que está recibiendo cada vez más atención por el impacto potencial del cambio climático en las precipitaciones y las temperaturas extremas, salinización de las tierras de cultivo por la irrigación, y la necesidad global de mantener o incrementar la productividad de la agricultura ante un aumento imparable de la población mundial y de sus necesidades alimentarias. El estrés abiótico es la primera causa de pérdidas en los cultivos a nivel mundial, causando unas pérdidas de producción medias del 50% en la mayoría de cultivos. Los factores ambientales que someten a la planta a un déficit hídrico, como la sequía, la salinidad y temperaturas extremas, son los que limitan más la productividad. Entre ellos la sequía es uno de los grandes limitantes ambientales para la agricultura (Boyer, 1982).

Cuando las plantas experimentan un estrés ambiental, activan un amplio rango de sistemas de defensa para sobrevivir y mantener el crecimiento. Las respuestas de la planta dependen del genotipo y el estadio de desarrollo de la misma en el momento del estrés, de la duración y la severidad del estrés y de los factores ambientales que lo provoquen. En el campo una planta puede experimentar uno o varios estreses abióticos al mismo tiempo produciéndose respuestas diferentes y únicas ante cada situación. Al igual que las respuestas ante cada estrés abiótico son diferentes, las respuestas de la planta ante cualquier combinación de dos o más estreses también son únicas. En este último caso, se puede producir una respuesta resultado de la combinación de las respuestas de los estreses combinados o una respuesta completamente nueva (Mittler, 2006). Hay que tener en cuenta que existen estudios de transcriptómica que indican que la mayor parte de los transcritos expresados durante dos estreses por separado son específicos de la respuesta de la planta frente a cada uno de ellos, pero que por otro lado, una parte es común indicando que una parte de la ruta de señalización es compartida (Rossel et al., 2002; Cheong et al., 2002; Kreps et al., 2002)

La respuesta al estrés implica la activación de rutas de señalización a través de las cuales se produce la transducción de la señal de percepción del estrés hasta que se produce la respuesta al mismo (Zhu, 2002; Shinozaki et al., 2003; Seki et al., 2003). La percepción de la señal de estrés se produce a través de receptores en las membranas de las células. La transducción de la señal dentro de la célula se produce a través de mensajeros secundarios como el  $\text{Ca}^{2+}$ , ROS (*reactive oxygen species*), inositol-fosfatos y otros. Estos mensajeros secundarios modulan los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol. Esta alteración de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol es detectada por proteínas capaces de unirse al  $\text{Ca}^{2+}$ , sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  (calmodulina y similares), que interaccionan con otros reguladores (proteínas kinasas y fosfatasa) iniciando una cadena de fosforilaciones/defosforilaciones de los factores de transcripción que

controlan los genes de respuesta a estrés. Estos se pueden clasificar en dos clases: de respuesta rápida o tardía. Los primeros se inducen rápida y transitoriamente, mientras que los segundos son activados más despacio y su expresión es constante. Los genes de respuesta rápida codifican factores de transcripción que activan genes de respuesta tardía situados en pasos posteriores en las rutas de respuesta a estrés. Por último, en el paso final de la ruta se desencadena la respuesta fisiológica al estrés (Mahajan y Tuteja, 2005).

La resistencia a estreses bióticos depende en la mayoría de los casos de caracteres monogénicos, sin embargo, la compleja respuesta a estrés abiótico es multigénica, lo cual hace muy difícil su control y manipulación. Las estrategias de manipulación genética para obtener tolerancia a estreses abióticos (Wang et al., 2003), dependen de la expresión de uno o varios genes que están involucrados en rutas de señalización y regulación (Vinocur y Altman, 2005) o genes que codifican proteínas que confieren tolerancia a estrés (Wang et al., 2004) o enzimas presentes en rutas que conducen a la síntesis de metabolitos protectores (Rontein et al., 2002; Park et al., 2004). Los actuales esfuerzos para mejorar la tolerancia a estrés mediante transformación genética han dado importantes resultados pero los complejos mecanismos genéticos de la tolerancia a estrés abiótico hacen que la tarea continúe siendo difícil. Los avances en este campo de la tolerancia a estrés pasan por dos puntos clave: el primero es un mejor entendimiento de los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares involucrados en la respuesta y el segundo, el uso de una combinación entre la biotecnología, la mejora clásica y las técnicas de cultivo.

### **3.2. La sequía: El estrés hídrico debido a la escasez de agua.**

En vista de la progresiva reducción de las precipitaciones en muchas zonas agrícolas, la escasez de agua se ha convertido en uno de los estreses abióticos que más limita la producción de los cultivos a nivel mundial. Este es el caso de algunas regiones mediterráneas sujetas a intensas sequías. La exposición de las plantas a un ambiente con limitaciones de agua durante varios estadios de desarrollo parece activar múltiples cambios fisiológicos y bioquímicos (Araus, 2004).

Durante el estrés por sequía, el cierre de los estomas para evitar las pérdidas por transpiración es la primera respuesta de las plantas ante la falta de agua (Mansfield y Atkinson, 1990). El cierre de estomas se puede producir de forma pasiva como resultado de la evaporación del agua de las células guarda o de forma activa como consecuencia de flujos de iones regulados por ABA.

Como consecuencia de este cierre disminuye el CO<sub>2</sub> disponible en las hojas y se produce una reducción de la tasa fotosintética debido a la disminución de la actividad de la Rubisco. Una disminución en los niveles intracelulares de CO<sub>2</sub> da lugar a una sobre-reducción de los componentes de la cadena de transporte electrónico y esto genera ROS como superóxido, peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y radicales hidroxilo. Estos compuestos aunque son tóxicos para la planta y deben ser eliminados, pueden actuar como mensajeros secundarios en la transducción de la señal en la respuesta a estrés hídrico. Por ejemplo, se ha visto que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> actúa como señal para el cierre de estomas. La aplicación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno en *Vicia faba* induce un aumento del calcio en el citosol y del cierre de estomas (McAinsh et al., 1996). En *Arabidopsis* la aplicación de ABA a células guarda provoca un aumento de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que conlleva el cierre de estomas (Pei et al., 2000; Desikan et al., 2004).

En una situación en que el déficit hídrico sea muy intenso y prolongado la pérdida de agua provoca la marchitez de la planta. A nivel celular esto se traduce en una pérdida de turgencia de la membrana plasmática la cual se contrae por falta de agua en el interior de la célula. La falta de agua produce alteraciones en la fluidez y composición de la bicapa lipídica que reducen su capacidad de intercambio con el

exterior. El contenido celular se vuelve más concentrado incrementando la posibilidad de interacciones de las proteínas con otras moléculas, lo que provoca su desnaturalización (Hoekstra et al., 2001). El incremento de los solutos puede llegar a niveles tóxicos pudiendo afectar al correcto funcionamiento de algunas enzimas como por ejemplo las de la maquinaria fotosintética. Los niveles de transcrito de algunos antioxidantes como glutathion reductasa (GR) o ascorbato peroxidasa (APX) aumentan durante los periodos de déficit hídrico protegiendo la célula de la oxidación por ROS.

Otro de los procesos con los que la planta hace frente al déficit hídrico provocado por la sequía es el ajuste osmótico. En este proceso las plantas disminuyen su potencial osmótico celular con la acumulación de solutos en el citoplasma y esto ayuda al movimiento de agua hacia el interior de la célula aumentando su turgencia. Entre los solutos que acumula la célula están: prolina, glutamato, glicina-betaina, carnitina, manitol, sorbitol, glucosa, fructosa, sacarosa, oligosacaridos (galactinol, rafinosa y trehalosa) e iones inorgánicos como  $K^+$ . Además de mantener el ajuste osmótico, algunos de estos metabolitos también intervienen en la estabilización de proteínas, membranas celulares y macromoléculas evitando la alteración de su estructura y funciones o eliminando las moléculas ROS producidas durante la respuesta a la sequía. Por ejemplo, la rafinosa y el galactinol son azúcares que se sintetizan durante la sequía y que actúan más como osmoprotectores que en el ajuste osmótico (Taji et al., 2002). El manitol, funciona eliminando ROS y estabilizando la estructura macromolecular de las enzimas mediante la formación de puentes de hidrogeno durante el déficit hídrico. De esta forma se previene la formación de puentes de hidrogeno intramoleculares que pueden dañar de forma irreversible la estructura tridimensional de la proteína (Shen et al., 1997). La trehalosa actúa estabilizando membranas y macromoléculas y su sobreexpresión ayuda al mantenimiento de una elevada capacidad fotosintética debido a que protege al FOTOSISTEMA II (PSII) contra la foto-oxidación (Garg et al., 2002). La prolina es uno de los aminoácidos que más se acumulan como respuesta a distintos estreses y se ha comprobado que la sobreexpresión del gen correspondiente a la enzima P5CS (pirrolina-5-carboxilato sintasa) de la ruta de síntesis de prolina, produce un aumento de la concentración de esta y permite un mejor crecimiento bajo condiciones de sequía (Kishor et al., 1995).

La ruta de señalización de la respuesta de la planta frente a sequía, al igual que la del resto de estreses abióticos, es bastante compleja y muchos de los mecanismos involucrados en la misma son todavía desconocidos o están poco estudiados.

La percepción de la señal en la membrana plasmática conduce a la producción de mensajeros secundarios que inician la cascada de señalización en el interior de la misma. Ante el estrés osmótico producido por la falta de agua el  $Ca^{2+}$  es el primer candidato para funcionar como unión entre el estímulo y la respuesta a estrés celular. El  $Ca^{2+}$  se acumula en el citosol desde el exterior de la célula iniciando la ruta de señalización (Knight, 2000). Durante el estrés osmótico los fosfolípidos de la membrana forman un sistema dinámico que genera un gran número de moléculas donde por ejemplo la PLC (fosfolipasa C) cataliza la hidrólisis de  $PIP_2$  (Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato) a  $IP_3$  (Inositol 1, 4, 5-trifosfato) y DAG (Diacilglicerol), que actúan como mensajeros secundarios. El  $IP_3$  activa además la acumulación de  $Ca^{2+}$  en el citosol desde las vacuolas (Takahashi et al., 2001). Como fruto del estrés oxidativo que provoca la falta de agua se generan ROS que a pesar de ser tóxicas pueden actuar como mensajeros secundarios (Foyer y Noctor, 2003).

La transducción de la señal bajo estrés osmótico en plantas se produce a través de fosforilaciones catalizadas por proteínas kinasas. Su actividad fosforiladora puede estar modulada por el  $Ca^{2+}$ , bien directamente como en las *Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases [CDPK]*, o bien a través de una proteína que se activa al unirse al  $Ca^{2+}$  (calmodulina, *calcineurin B-like [CBL] sensor*) en las *CBL-interacting protein kinase [CIPK]*. Hay también rutas independientes del  $Ca^{2+}$ , como la cascada de las MAPKs, que esta formada por tres proteínas kinasas interrelacionadas: MAPKKK, MAPKK y

MAPK. En primer lugar la MAPKKK fosforilada y activada, fosforila y activa a MAPKK, que a su vez fosforila y activa a MAPK. La MAPK fosforila y activa compuestos específicos como factores de transcripción para inducir la respuesta celular (Boudsocq y Lauriere, 2005).

Entre las hormonas vegetales el ABA (ácido abscísico) juega un papel decisivo durante la sequía, siendo su acumulación el resultado tanto de la inducción de su síntesis como de la inhibición de su degradación, ya que el estrés osmótico regula distintos pasos de su ruta metabólica. Está implicado en dos procesos principales: el balance hídrico y la tolerancia celular a la deshidratación. Su papel en el balance hídrico lo desarrolla a través de la regulación de la apertura y cierre de estomas. La tolerancia a la deshidratación la realiza a través de la inducción de genes que codifican proteínas que protegen a la célula de la deshidratación.

La regulación de la expresión de los genes durante un periodo de deshidratación causado por sequía se produce al menos a través de cuatro rutas de señalización independientes, dos de ellas dependientes de ABA y dos independientes de ABA. En una de las dos rutas dependientes de ABA, el ABA induce la síntesis de factores de transcripción tipo MYB y MYC que interaccionen con las regiones de promotores conocidos como MYBR y MYBC de los genes inducibles por estrés hídrico. En la otra ruta dependiente de ABA, se produce una activación de los factores de transcripción, ABFs/AREB, por parte del ABA a nivel post-transcripcional a través de la fosforilación; estos factores de transcripción interaccionan con las regiones ABRE de los promotores de los genes inducibles por estrés hídrico. De las dos rutas independientes de ABA en una de ellas también se produce una inducción de la expresión de factores de transcripción, en este caso CBF4, que conduce a la expresión de los genes y en la otra se produce la activación del factor DREB. En ambos casos se inducen genes con regiones DRE/CTR en su promotor (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006). En cualquiera de las cuatro rutas anteriores, la sobreexpresión de los factores de transcripción y su posterior unión a los elementos reguladores situados en los promotores desencadena una respuesta múltiple, ya que provoca la expresión de un gran número de genes.

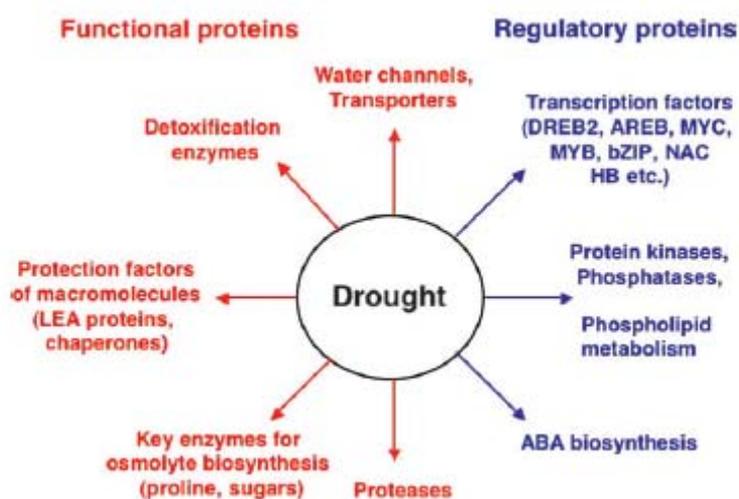


Figura 1. Funciones de los genes inducibles por sequía. Los productos de los genes se pueden clasificar en dos grupos. El primero está formado por proteínas que probablemente están implicadas en la tolerancia a estrés (proteínas funcionales) y el segundo grupo lo forman proteínas involucradas en la transducción de la señal y la expresión de los genes que participan en la respuesta a estrés (proteínas reguladoras) (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Los productos de los genes que se expresan tras la sequía se pueden dividir en dos grupos (Figura 1): uno formado por las proteínas que actúan en la protección de la célula ante el estrés y otro formado por las proteínas involucradas en la regulación de la señal de transducción y expresión de genes involucrados en la respuesta a estrés. Entre las proteínas que actúan en la tolerancia a estrés encontramos: acuaporinas (canales de agua involucrados en el movimiento de agua a través de la membrana), enzimas necesarias para la biosíntesis de osmolitos, enzimas detoxificantes (glutathion-S-transferasa, ascorbato peroxidasa, catalasa), proteínas protectoras que evitan la desnaturalización y degradación de proteínas celulares (inhibidores de proteasas, chaperonas, HSPs y proteínas LEA) y a su vez sistemas degradantes de proteínas desnaturalizadas (ubiquitinas y proteasas/proteininas), ferritina, ...etc. Entre las proteínas involucradas en la transducción de la señal y expresión de genes de respuesta al estrés están: proteínas kinasas y fosfatasa (MAPKKK, MAPKK, MAPK, CDPK, CIPK); factores de transcripción (MYB, MYC, ABFs/AREB); enzimas del metabolismo de los fosfolípidos (PLC, fosfolipasa C); moléculas de señalización (calmodulina); proteínas tipo 14-3-3...etc.

### 3.3 La sequía y los cítricos

Los cítricos son plantas de origen tropical y necesitan un ambiente húmedo tanto en el suelo como en la atmósfera. Sus necesidades hídricas se estiman entre 7.500 y 12.000 m<sup>3</sup>/ha al año, lo que equivale a una pluviometría anual de 750 y 1200 mm. Tan importante es la cantidad de lluvia como su distribución en el tiempo. El cambio climático que se está produciendo en las últimas décadas además de reducir las precipitaciones, las concentra en una época del año. En la zona mediterránea en particular, además de no alcanzarse los valores de precipitación necesarios, la lluvia no se distribuye a lo largo del tiempo, alternándose periodos muy secos con periodos de lluvias torrenciales. En España en particular, las precipitaciones medias del área peninsular para el año 2005 se estimaron en 491.4 mm. (INM, 2005). A esta deficiencia pluviométrica hay que añadir las temperaturas elevadas de los meses de verano y la débil humedad relativa del aire cuando soplan los vientos cálidos saharianos. Con tales condiciones, el cultivo comercial de cítricos no se puede concebir sin el apoyo del riego artificial, pero aún así los cítricos pueden verse con frecuencia sometidos a condiciones de déficit hídrico (Loussert, 1992; Agustí, 2003).

El estrés hídrico en los cítricos se manifiesta de varias maneras. Se inhibe el crecimiento vegetativo, observándose una disminución en el crecimiento de los brotes y en el desarrollo foliar y la disminución del perímetro del tronco (Ortuno et al., 2004).

En las hojas se produce un cierre de estomas, la curvatura de los bordes de la hoja hacia el haz y la defoliación parcial. Se reduce el potencial osmótico y la conductividad en los estomas pero no se produce un ajuste osmótico sino un ajuste elástico (incremento de la elasticidad de los tejidos) ante la falta de agua (Save et al., 1995; RuizSanchez et al., 1997). En condiciones muy severas de falta de agua se producen daños y marchitamiento en las hojas. Si tras un periodo de sequía se produce una rehidratación, parte de las hojas sufren abscisión (Tudela y PrimoMillo, 1992; GomezCadenas et al., 1996). Un estrés hídrico seguido de una rehidratación también promueve la floración (Krajewski y Rabe, 1995).

Por otro lado, también se ha comprobado que el estrés hídrico reduce la producción. Sus efectos más significativos se observan durante los estados fenológicos de floración y cuajado y desarrollo del fruto, en primavera y principios del verano (Nakajima et al., 1993; Ginestar y Castel, 1996). La aparición de estrés durante estos periodos provoca una fuerte reducción en el número de frutos debido a una fuerte caída de los mismos. El desarrollo del fruto también depende del aporte de

agua. El déficit hídrico puede llegar a inhibir la fotosíntesis en los cítricos, reduciendo el aporte de carbono al fruto y deteniendo de ese modo su crecimiento. A pesar de que el fruto no pierde su capacidad de sumidero de carbono, una vez superado el estrés, el retraso en el desarrollo es irrecuperable y el tamaño final del fruto se ve significativamente reducido (Blanke y Bower, 1991). La calidad también disminuye si se produce estrés hídrico durante la maduración de los frutos, ya que la acidez y el contenido en azúcares aumenta, y disminuye el contenido en zumo (Yakushiji et al., 1998; Hockema y Etxeberria, 2001). El espesor de la corteza también se ve afectado, reduciéndose la consistencia y turgencia de ésta, haciéndose más vulnerable a la manipulación.

Una de las formas más utilizadas para prevenir los daños ocasionados por la sequía ha sido la utilización como patrones o portainjertos, de especies resistentes, que permiten un mejor aprovechamiento del agua. Entre las especies más utilizadas por su resistencia a sequía están el Swingle Citrumelo CPB 4475, Mandarino común (*Citrus reticulata*), Naranja amarga (*Citrus aurantium*), *Citrus reshni* (Mandarino Cleopatra) y Citrange carrizo. Los portainjertos disponibles son muy escasos y por tanto la obtención de nuevos genotipos es uno de los objetivos de los programas de mejora. El mayor número de variedades cultivadas proviene de selección de mutaciones espontáneas que se producen con relativa frecuencia. En el caso de los patrones solo los citranges Troyer y Carrizo se obtuvieron en un programa de mejora; el resto de patrones usados son especies no mejoradas. La dificultad en la obtención de nuevos patrones radica, como ya se ha comentado anteriormente, en la compleja biología reproductiva de los cítricos en general y en particular en la apomixis que presentan la mayoría de especies. La apomixis dificulta la distinción entre individuos nucleares y zigóticos que nos permitiría conseguir una población homogénea de individuos patrón. Debido a todos estos problemas reproductivos existen pocos programas de mejora en el mundo y sus resultados son escasos.

En el campo de la mejora de la tolerancia a sequía los mecanismos de respuesta se están conociendo poco a poco a través de los progresivos estudios moleculares en cítricos y otras especies, y se están consiguiendo algunos resultados a través de la introducción en cítricos de genes involucrados en la respuesta a sequía. Algunos osmolitos como la prolina y la prolina betaina se acumulan en muchas especies de cítricos y actúan como osmoprotectores. La sobreexpresión en hojas de P5CS ( $\Delta$ 1-pirrolina-5-carboxilato sintasa), enzima de la ruta de biosíntesis de la prolina, permite un mayor ajuste osmótico y un aumento de la actividad fotosintética en Carrizo citrange (Nolte et al., 1997; Molinari et al., 2004). A partir de clones procedentes de bibliotecas de cDNA se han identificado varias dehidrasas (COR11, COR19, CuCOR19, COR15, CrCOR15, C-Lea5, cpDHN) en distintas especies de cítricos (*Poncirus trifoliata*, *Citrus unshiu*, *Citrus paradisi*, Fortune). Las dehidrasas son proteínas LEA (Late embryogenesis proteins) de grupo 2 y se ha detectado su sobreexpresión en varios tejidos de la planta bajo condiciones de sequía (Naot et al., 1995; Cai et al., 1995; Hara et al., 1999; Porat et al., 2002; Sanchez-Ballesta et al., 2004; Porat et al., 2004). Procedentes también de una biblioteca de cDNA se han identificado clones que codifican NCED en *Citrus sinensis*. Esta enzima regula un paso clave en la ruta de biosíntesis de ABA y se induce en hojas y frutos durante el estrés hídrico (Rodrigo et al., 2006).

### 3.4 La mejora de la tolerancia a sequía

El objetivo principal de un programa de tolerancia a sequía es asegurar que los cultivos consigan una utilización eficiente del agua disponible sin que esto afecte a la productividad. El reto es conseguir plantas que no solo sobrevivan al estrés sino que

crezcan bajo condiciones adversas con una producción razonable de biomasa, superando la relación negativa que existe entre los caracteres que confieren resistencia a sequía y los de productividad. En ocasiones el carácter mejorado permite a la planta la supervivencia durante un periodo de desarrollo que coincide con la sequía pero esto conlleva de igual modo a la pérdida de la cosecha (Mitra, 2001). Los rasgos a mejorar deben prevalecer a lo largo del periodo de cultivo y no afectar la expresión de otros caracteres (Chaves y Oliveira, 2004).

La obtención de plantas más tolerantes a la sequía se ha basado sobre todo en programas de mejora clásica y selección por marcadores moleculares. Se han caracterizado poblaciones segregantes de varias especies como maíz, sorgo, arroz, cebada y tomate lo que ha permitido la caracterización y mapeo de genes individuales y QTLs (*quantitative trait loci*) relacionados con la producción bajo sequía (Frova et al., 1999; Tuberosa et al., 2002; Lafitte et al., 2004; Lanceras et al., 2004) Los métodos tradicionales están limitados por la complejidad de la respuesta a estrés, la poca variabilidad genética de los caracteres involucrados en la productividad bajo condiciones de estrés y la falta de técnicas eficientes de selección.

Estos métodos han sido complementados o sustituidos por la manipulación genética de uno a varios genes involucrados en rutas de respuesta al estrés. La mayoría de los estudios se basaban en lo que se denomina una estrategia "gen a gen", en la que se procede a la introducción en la planta por ingeniería genética de uno a varios genes de las rutas bioquímicas o de señalización de la respuesta a estrés por sequía (Valliyodan y Nguyen, 2006; Umezawa et al., 2006). Muchos genes que responden a sequía han sido identificados y manipulados obteniendo variedades transgénicas resistentes a la sequía (Parry et al., 2005). Entre los genes más utilizados para realizar transformaciones genéticas están aquellos involucrados en la síntesis de osmolitos, detoxificación, chaperonas y proteínas protectoras (LEA, HSP), moléculas de señalización, factores de transcripción, transportadores (acuaporinas),...etc. Entre los numerosos trabajos realizados podemos encontrar plantas transformadas con genes de la ruta de biosíntesis de osmolitos como por ejemplo arroz transformado con *P5CS*, en el que se observa un mayor crecimiento de los brotes y las raíces respecto al control durante la sequía (Su y Wu, 2004), debido a la acumulación de prolina; o arroz transformado con *otsA* y *otsB*, dos genes de la ruta de síntesis de trehalosa de *E. coli* (Garg et al., 2002), en la que la acumulación de este azúcar conduce a una mayor tolerancia a sequía. También se han obtenido plantas transgénicas utilizando moléculas de señalización, como por ejemplo, tabaco transformado con *PvNCED*, gen de la ruta metabólica de ABA, en el que se observa un aumento de ABA y una disminución de la pérdida de agua por transpiración que permiten a la planta soportar mejor las condiciones de sequía (Qin y Zeevaart, 2002). Entre los ejemplos de moléculas protectoras encontramos arroz transformado con *HVA1*, un gen *LEA* de cebada que confiere resistencia a la sequía en arroz, probablemente por la protección de la membrana celular (Babu et al., 2004).

La mayoría de programas de mejora en especies cultivadas se plantean a partir de conocimientos adquiridos de una planta modelo o de otras especies. Los resultados en el propio cultivo no siempre han sido positivos, haciendo necesario utilizar los conocimientos adquiridos de la propia especie en las que van a ser aplicados. Muchas de las diferencias en el desarrollo y anatomía entre *Arabidopsis thaliana* y algunas plantas cultivadas también pueden llevar a diferencias en muchos mecanismos de tolerancia a estrés. Intercambiar conocimientos entre *Arabidopsis thaliana* y otras especies modelo y las especies cultivadas aunque en la mayoría de los casos es muy útil en ocasiones es imposible (Parry et al., 2005). Se hace necesario por tanto un mayor incremento de los programas de investigación centrados en las propias especies cultivadas y un mejor conocimiento de los mecanismos de respuesta a sequía.

Una nueva forma de abordar el problema ha sido posible a través de la genómica, en la que se plantea una visión de la respuesta a estrés a nivel de la planta

en general (Cushman y Bohnert, 2000). Las estrategias de genómica funcional relacionan observaciones fisiológicas y fenotípicas con información de transcripción y regulación transcripcional; comportamiento de las proteínas, rutas y complejos proteicos; la diversificación por adaptación evolutiva y caracteres fenotípicos mutados o manipulados (Bohnert et al., 2006).

El primer paso hacia la caracterización de la compleja respuesta a estrés abiótico ha sido el rápido descubrimiento de genes a partir de la secuenciación de genomas completos y la secuenciación parcial a gran escala de clones de bibliotecas de cDNA para obtener ESTs (*expressed sequence tags*), además de la utilización de plataformas para determinar patrones de expresión transcripcional (*arrays*), sofisticadas tecnologías para la localización de proteínas y sensores para detectar metabolitos. El procesamiento y análisis a través de herramientas bioinformáticas de la gran cantidad de datos que generan estas herramientas genómicas, ha permitido pasar de los simples datos a conocimiento de la respuesta de la planta en general.

La estrategia detrás de estos abordajes es que entre los genes inducidos por estrés estarán aquellos útiles para mejorar la tolerancia mediante ganancia de función obtenida por transformación.

## 4. Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos (CFGP)

### 4.1 Genómica funcional

El término "GENÓMICA" abarca la subdisciplina de la genética que se ocupa del mapeo, secuenciación y análisis de las funciones de genomas completos. Consiste en la caracterización molecular de genomas enteros y aporta información acerca de la secuencia y de la función de cada sector del genoma en diferentes situaciones de desarrollo y bajo diferentes condiciones ambientales, así como de los mecanismos implicados en la regulación de la expresión e interacción génica. Para ello, las herramientas que se utilizan para el análisis individual de genes o pequeñas regiones cromosómicas, se aplican al análisis global de genomas completos, estudiando en conjunto los miles de genes que constituyen el genoma de un organismo, así como las complicadas redes de interacciones que operan entre ellos. La información generada es enorme y es clave para la identificación y el aislamiento de genes de interés y permitirá interpretar, en términos moleculares, los procesos biológicos. Para ayudar en este proceso han surgido poderosas herramientas bioinformáticas que permiten almacenar e interpretar esta información.

La genómica se divide en dos grandes áreas:

- **Genómica estructural**, que se ocupa de la caracterización física de genomas enteros.
- **Genómica funcional**, que caracteriza el **transcriptoma**, que está constituido por el conjunto completo de transcritos, producidos por un organismo.

Desde 1995 se han secuenciado los genomas de más de 180 organismos (GNN, 2006) ([www.genomenewsnetwork.org](http://www.genomenewsnetwork.org)), entre los que se encuentran el genoma humano (McPherson et al., 2001; Venter et al., 2001), la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) (Adams et al., 2000) el del ratón (Waterston et al., 2002) y el de numerosos hongos, virus y bacterias, estando en marcha en estos momentos varios proyectos de secuenciación de los genomas de muchos otros organismos. Entre las especies vegetales, se ha logrado la secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) y del arroz (Yu et al., 2002; Goff et al., 2002), estando en marcha la secuenciación de otras especies de interés agronómico

como colza, soja, sorgo, maíz, trigo, cebada, avena, tomate, patata y *Populus trichocarpa* entre otras (NCBI, 2006; [www.ncbi.nlm.nih.gov/Genomes/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genomes/)). Pero además de la secuencia genómica también es importante conocer como la función de cada gene determina la estructura de un organismo y las funciones necesarias para su crecimiento, desarrollo, reproducción e interacción con el entorno para llegar al total conocimiento de los sistemas biológicos. Esta disciplina es lo que se ha venido a llamar genómica funcional, que esta permitiendo el estudio y caracterización simultánea y global de los distintos agentes celulares (genes, RNAs, proteínas, metabolitos, etc) y sus interacciones.

En estos momentos se están llevando a cabo numerosos estudios de genómica funcional tanto en las especies modelo, como *Arabidopsis thaliana* (<http://www.arabidopsis.org/portals/masc/index.jsp>) y arroz (Yuan et al., 2005), como en especies de interés agronómico como por ejemplo en patata (<http://www.usricegenome.org/tdb/potato/>), *Medicago truncatula* (<http://www.noble.org/medicago/>) soja (<http://soybeanomics.cropsci.uiuc.edu/>), tomate ([http://www.sgn.cornell.edu/about/tomato\\_project/](http://www.sgn.cornell.edu/about/tomato_project/)), maíz (<http://www.maizegdb.org/>) o trigo (<http://www.btny.purdue.edu/usda-ars/wheatgen/index.html>).

## 4.2 Colecciones de ESTs y Micromatrices de cDNA en especies agronómicas

### Dificultades de la secuenciación total de especies vegetales: Colecciones de ESTs.

Los genomas vegetales de las especies agronómicas son generalmente de gran tamaño. Mientras la planta modelo *Arabidopsis thaliana* tiene un genoma de tan solo 125 Mb, otras especies presentan genomas mucho mayores como los 2504 Mb de *Zea mays*, 1510 Mb de *Medicago Sativa* o 953,5 Mb de *Lycopersicon esculentum*. La mayoría del DNA responsable de este gran tamaño es DNA repetitivo (desde un 87% en cebolla hasta un 23% en tomate), que rinde poca información génica a la vez que complica el ensamblaje posterior de la secuencia. Además, en muchas plantas el genoma entero está duplicado. Los autopoliploides, como la alfalfa o la caña de azúcar, por ejemplo, contienen varios sets de cromosomas que pueden aparear y recombinan en muchas combinaciones, alcanzando un alto contenido en heterocigosis, y complicando el ensamblaje de la secuencia (Paterson, 2006).

La decisión de secuenciar un genoma de una especie agronómica es, por tanto, una decisión difícil, que intenta equilibrar el tamaño del genoma y el coste de secuenciación en tiempo y dinero, con el impacto social, económico y científico, la distancia filogenética con plantas previamente secuenciadas y la información relevante de estudios previos (mapas físicos, genéticos). El número de bases a secuenciar de las 70 especies cultivadas de las que se tiene una estimación supera los  $1.48 \times 10^{11}$  pb, 72 veces más de lo que hay actualmente en la base de datos del GenBank (Paterson, 2006). Además, el objetivo siguiente, conseguir determinar los niveles y patrones de polimorfismos a nivel de gen en cada especie, requeriría todavía un mayor esfuerzo de resecuenciación.

Estas complicaciones han favorecido en los últimos años estrategias de secuenciación reducida, que permitan obtener primero información sobre genes expresados, dejando la información de genoma completo para un paso posterior, en el cual los gastos de secuenciación sean menores o las dificultades tecnológicas hayan sido superadas. En esta dirección, la secuenciación en masa de ESTs (Expressed

Sequence Tags) ha alcanzado un gran auge como paso fácil y económico en la identificación de genes en muchos organismos.

Una **EST** es una pequeña secuencia de entre 200 a 500 nucleótidos que se obtiene de la secuenciación de uno o ambos extremos de un cDNA. Aislar mRNA es la clave para encontrar los genes que se están expresando en un momento determinado en un tejido. La estrategia consiste en sintetizar cDNA a partir de mRNA y secuenciar pequeños trozos de este cDNA que representan genes expresados en los tejidos utilizados para la construcción de las bibliotecas de las cuales se han obtenido. Estas secuencias parciales son utilizadas como información global de la fracción expresada del genoma de un organismo. Si tenemos la secuencia del genoma del organismo, cosa que pasa en pocas especies vegetales, la secuencia de la EST se puede utilizar para realizar mapas genómicos en los que se sitúa cada gen en el punto correspondiente del genoma. Por otro lado, por homología con las secuencias de genes conocidos se puede determinar a qué gen pertenecen o si nos encontramos ante un gen nuevo.

En los últimos años se están desarrollando proyectos de aislamiento y catalogación de ESTs para la práctica totalidad de las especies cultivadas, generalmente llevados a cabo por consorcios entre grupos de investigación con experiencia reconocida en cada especie en cuestión. Además, el NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ha creado una base de datos de ESTs, la dbEST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/>), para organizar, almacenar y permitir un fácil acceso a todas las secuencias de EST públicas que existen hasta el momento y cuyo número crece día a día. En dbEST se puede tener acceso a la información de ESTs de más de mil organismos (43.459.829 EST de unos 1300 organismos el 22 de junio del 2007).

### **Datos de expresión y mejora agronómica**

Los primeros estudios genómicos en muchos organismos se han realizado a través de la transcriptómica. Partiendo del supuesto de que el nivel de expresión de un gen se puede determinar por el número de transcritos de ese gen presentes en un tejido determinado, se han utilizado diversas técnicas para determinar niveles de transcrito. Entre las más utilizadas están las colecciones de ESTs y las micromatrices de cDNA.

Se han utilizado las colecciones de ESTs para obtener datos sobre la abundancia de cada gen en un determinado tejido o situación biológica. Cuanto más representado esté un gen en una colección de ESTs, es decir, cuantos más clones de dicho gen hayan sido aislados en el proceso de aislamiento al azar, más abundante será dicho transcrito en la situación biológica de estudio, y puede suponerse, que ese gen está involucrado en los procesos metabólicos que tienen lugar en el tejido en ese momento (Donson et al., 2002). Esta forma de estimar el nivel de expresión del gen es lo que se denomina "Northern virtual". También se podría realizar un "*Digital differential display*", donde comparando la frecuencia con la que aparecen las ESTs en diferentes bibliotecas se puede determinar la expresión diferencial de genes en varias muestras (Jongeneel, 2000). En plantas, por ejemplo, se ha realizado un experimento en arroz (Ewing et al., 1999) comparando 10 bibliotecas que contenían entre 1000 y 5000 ESTs donde se han identificado patrones de expresión significativos entre varios tejidos. La técnica del "Northern virtual" no se ha utilizado mucho en *Arabidopsis thaliana* porque las bibliotecas provienen de mezcla de tejidos, por otro lado el "*Digital differential display*" solo se puede usar en especies en las que se tiene una gran cantidad de ESTs de cada condición a comparar para que los resultados sean estadísticamente significativos.

Otra forma de determinar el nivel de expresión de un gen a través de los niveles de transcrito son las micromatrices de DNA. Las micromatrices de DNA están formadas por productos de PCR u oligos, procedentes de los clones de diferentes

bibliotecas, depositadas sobre una superficie sólida. Cada muestra representa físicamente a un gen de la colección de ESTs, pudiendo contener varias decenas de miles de genes representados. La micromatriz se hibrida con una muestra problema y los niveles de hibridación de la muestra en cada gen depositado determinan el nivel de transcrito de cada gen. Una colección de ESTs de una especie determinada puede utilizarse para la construcción de micromatrices que permiten determinar experimentalmente la expresión simultánea de miles de transcritos, generando en un único experimento datos funcionales sobre muchos genes, y permitiendo, de manera más precisa que en el northern virtual, la identificación de genes posiblemente implicados en un determinado estado biológico. La comunidad de *Arabidopsis* fue la primera que adoptó las micromatrices como herramienta para determinar expresión génica a gran escala. Actualmente, existen datos de expresión para prácticamente cada tejido y situación biológica en esta especie (TAIR, <http://www.arabidopsis.org/>). En los últimos años se han generado plataformas de micromatrices para muchas especies agronómicas como arroz (Akimoto-Tomiyama et al., 2003; Lan et al., 2004), cebada (Close et al., 2004), maíz (Fernandes et al., 2002; Wang et al., 2003), trigo (Clarke y Rahman, 2005), soja (Vodkin et al., 2004), cebada (Shen et al., 2005), patata (Ducreux et al., 2005), tomate (Baxter et al., 2005), pino (Watkinson et al., 2003) y chopo (Moreau et al., 2005), y numerosos datos de expresión están empezando a ser publicados. Al igual que para la generación de ESTs, estos proyectos se han organizado en consorcios nacionales o internacionales (<http://www.tigr.org/tdb/potato>; <http://www.barleybase.org>; <http://www.maizearray.org>; <http://www.ricearray.org>;) (Rensink y Buell, 2005).

Ambas estrategias, sobre todo el análisis transcriptómico a gran escala, están permitiendo la asignación de listas de genes cuya expresión está correlacionada con cada situación biológica o rasgo agronómico de interés, constituyendo por tanto una primera aproximación hacia la identificación de genes candidatos responsables de dichos rasgos agronómicos. La localización de estos genes en rutas metabólicas puede iluminar los procesos en los que están involucrados.

La identificación de genes candidatos de rasgos agronómicos está suponiendo un importante punto de apoyo en las estrategias de mejora. Dejando aparte la transformación genética, la selección asistida por marcadores moleculares ha sido la estrategia utilizada recientemente para la mejora genética de especies vegetales. En los últimos años, se han desarrollado miles de marcadores moleculares, fenotípicamente neutros, a partir de secuencias al azar, que no necesariamente provenían de zonas codificantes (RDMs, *random DNA markers*). Estos marcadores han sido utilizados con éxito para mapear genes de interés o ayudar en estrategias de mejora tradicional. Sin embargo, el ligamiento genético entre un marcador específico y el locus de interés puede romperse por recombinación genética. Esto limita el uso de este tipo de marcadores como herramientas de diagnóstico para rasgos agronómicos. La identificación de genes candidatos permite la búsqueda de marcadores moleculares en las secuencias correspondientes a dichos genes (GTMs, *gene target markers*) evitando de este modo que el ligamiento se pierda por recombinación. El conocimiento generado en proyectos de genómica funcional está permitiendo el desarrollo sistemático de marcadores funcionales (FM), derivados de sitios polimórficos en los genes putativamente responsables de rasgos agronómicos de interés (Andersen y Lubberstedt, 2003). En este aspecto, la redundancia de los proyectos de ESTs proporciona una herramienta muy útil en la identificación de secuencias polimórficas en dichos genes candidatos, aunque la secuenciación alélica de genes particulares se haya llevado a cabo de momento en sólo unos pocos casos (Osterberg et al., 2002).

En una aproximación directa, los genes identificados en análisis clásicos de transcriptómica pueden utilizarse para acelerar la identificación de QTLs, en lo que se ha llamado genética transcripcional (Jerome Salses, PAG XIV). Por otra parte, una nueva aproximación, llamada "genética genómica", combina el mapeo de QTLs con datos de expresión génica en poblaciones segregantes (Jansen y Nap, 2001). En esta

estrategia, cDNA de cada individuo se hibrida a una micromatriz y que contiene genes identificados previamente como correlacionados con el rasgo de interés, y se obtienen datos cuantitativos de expresión de cada gen. Estos niveles de expresión son tratados como rasgos cuantitativos y sometidos a análisis de QTLs. Para cada gen analizado, este análisis revela las regiones del genoma que influyen en su nivel de expresión, ayudando a la identificación de genes responsable de rasgos individuales.

En resumen, las colecciones de ESTs están confirmándose como una herramienta básica en especies agronómicas para la identificación de genes candidatos, responsables de rasgos de interés. La identificación de dichos genes proporciona el punto de partida para la mejora de dichos rasgos, bien mediante transformación genética, bien mediante mejora asistida por marcadores funcionales.

### 4.3 Proyecto de Genómica funcional de cítricos

La presente tesis doctoral forma parte del Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos (CFGP, <http://bioinfo.ibmcp.upv.es/>) desarrollado entre tres centros de investigación de la Comunidad Valenciana (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) de Valencia, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) e Instituto de Agroquímica y Tecnología Alimentaria (IATA)), pertenecientes a tres instituciones públicas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas o CSIC, Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación de la Comunidad Valenciana, y Universidad Politécnica de Valencia).

El proyecto es fruto de la larga tradición histórica que une Valencia con la producción de cítricos. La Comunidad Valenciana contribuyó en el año 2004 con un 65% a la producción total de España, que es el quinto productor y el primer exportador de cítricos para su consumo en fresco a nivel mundial. La amplia colección de variedades disponibles para la propagación en España ha permitido a los citricultores españoles mantener un liderazgo dentro de los mercados internacionales adaptando la producción a las exigencias del mercado en cada momento. La competencia en estos mercados aumenta año tras año y es necesario abordar programas de mejora para la obtención de nuevas variedades que se adapten a las nuevas exigencias de mercado y de cultivo.

La mejora en cítricos ha sido muy difícil y con escasos resultados en relación con otras especies debido a que, como ya se ha comentado anteriormente, tienen una compleja biología reproductiva. Muchas especies de cítricos son apomícticas y sus semillas producen embriones nucelares y zigóticos. Esto dificulta, por un lado, la obtención de una población homogénea para su utilización como patrones, y por otro, la obtención de progenies de origen híbrido donde seleccionar para caracteres deseados. Además, muchos genotipos de interés presentan esterilidad total o parcial en óvulos y/o polen, lo cual impide que puedan ser empleados como parentales en programas de mejora. También se presentan casos de autoincompatibilidad e incompatibilidad entre genotipos, y la elevada heterozigosis (Herrero et al., 1996) presente en la mayoría de las especies cultivadas, como el limón, naranja dulce y clementino, provoca una segregación muy amplia de fenotipos, en su mayoría indeseables. El periodo de juvenilidad es igualmente un factor limitante en la mejora de cítricos. Muchos genotipos presentan un periodo de juvenilidad muy largo, de forma que requieren entre 5 y 8 años para empezar a producir. Dado que la mayoría de los caracteres que se desean mejorar se refieren al fruto, en la mejora de variedades, o a la propagación por semilla, en el caso de la mejora de patrones, la larga juvenilidad limita el número de generaciones de plantas en los programas de mejora.

Los estudios de genómica funcional de cítricos pueden conducir al desarrollo de nuevas herramientas para la obtención de nuevas variedades (Mifflin, 2000).

Aunque en la actualidad ya se están llevando a cabo proyectos de genómica funcional de cítricos a gran escala (USA y Brasil), en el momento de iniciarse el proyecto CFGP en el 2001, en la base de datos del NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*) aparecían tan sólo unas 2000 secuencias de Citrus. La mayoría de estas secuencias (unas 1300) corresponden a ESTs de frutos del mandarino *Citrus unshiu* en estado de desarrollo, seguidas por unas 300 secuencias de flavedo y albedo del fruto del pomelo *Citrus x paradisi*, y por unas 200 secuencias de *Citrus sinensis*. De ahí la relevancia del presente Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos.

Por todo ello, el CFGP fue la primera aproximación genómica que se inició a gran escala a la problemática inherente al cultivo de los cítricos, y tiene como objetivo general desarrollar herramientas genómicas que ayuden a la mejora de las variedades de cítricos, prestando especial atención a los distintos aspectos relacionados con el proceso productivo y la calidad del fruto, como son: el desarrollo vegetativo, la floración, el cuajado y la maduración del fruto, la respuesta a estreses bióticos (hongos, virus y viroides) y abióticos (sequía, salinidad y suelos deficientes en hierro), y los procesos post-cosecha (almacenamiento en frío y ataque del fruto por hongos). Dichas herramientas están basadas en el estudio del transcriptoma de los cítricos, mediante la generación de colecciones complejas de ESTs, obtenidas a partir de bibliotecas de cDNA de distintos tejidos y estadios de desarrollo, así como de árboles sometidos a distintas condiciones de estreses bióticos y abióticos. Con estas colecciones de ESTs se han fabricado micromatrices de DNA que están siendo usadas para definir los patrones de expresión de diferentes variedades en distintos tejidos, estadios de desarrollo y/o como respuesta a diversos tratamientos de estrés biótico o abiótico. Se han construido también una serie de genotecas de DNA genómico que contribuirán a la caracterización de cDNAs de especial relevancia (completar secuencias, distribución de intrones, obtención de promotores) y servirán como punto de arranque para una eventual futura secuenciación del genoma completo de los cítricos. Además, en un futuro se desarrollarán o mejorarán diversas herramientas que servirán para la identificación de marcadores y QTLs, y contribuirán a determinar la función de genes. Dichas herramientas podrán ser utilizadas en los proyectos de mejora de las variedades cítricas y permitirán profundizar en la caracterización de las poblaciones segregantes y del Banco de Germoplasma de cítricos existentes, poblaciones que suponen un material vegetal imprescindible para el proyecto. Al mismo tiempo, se pretende desarrollar un sistema de transformación genética de clementino y vectores virales para cítricos para evaluar la función de los genes de mayor interés que se identifiquen en el proyecto.

Independientemente de estas aplicaciones prácticas inmediatas, la colección de datos sobre el transcriptoma de los cítricos asociado a distintos tejidos y diferentes circunstancias ambientales y de desarrollo, constituye una de las bases fundamentales, junto con la proteómica y la metabolómica, sobre la que en un futuro, y con la ayuda de métodos bioinformáticos existentes y de nuevo desarrollo, se ahondará en el conocimiento integrado y globalizado de los mecanismos celulares subyacentes al funcionamiento de la planta. El establecimiento de un tipo de aproximación como el planteado aquí puede hacer de los cítricos el primer frutal que se estudiará a este nivel, pudiendo constituir un sistema modelo para especies de frutales arbóreos perennes. En este sentido cabe destacar que los cítricos tienen un genoma equivalente a tan sólo 3-4 veces el genoma de *Arabidopsis*, lo que lo hace especialmente pequeño en contraste con otras especies que están siendo objeto de estudios genómicos como el pino, cuyo genoma es de 200 a 400 veces el genoma de *Arabidopsis*.

Para el presente Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos se ha elegido como principal material vegetal de estudio al mandarino clementino de Nules (*Citrus clementina* cv. Clemenules), elección que obedece a criterios de importancia económica. Las mandarinas clementinas son las variedades más representativas de la citricultura española por su calidad y aceptación por el consumidor, habiendo supuesto

el 50-60% de las nuevas plantaciones de cítricos en los últimos 10 años. De éstos, más de la mitad corresponden a la clementina de Nules. Dicha variedad estará injertada sobre el híbrido citrange Carrizo (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*), menos en los estudios de la respuesta a los estreses biótico y abiótico que se utilizaran otras variedades en función de su tolerancia o sensibilidad a los estreses concretos: mandarino Cleopatra (*Citrus reshni*) como portainjertos resistente en los estudios de estreses abióticos, y naranjo amargo (*Citrus aurantium*) como portainjertos resistente a diferentes estreses bióticos.

#### **4.4 Colección de ESTs y micromatriz de cDNA de cítricos. Situación actual.**

En el Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos (CFGP) se ha generado una colección de ESTs a partir de los clones procedentes de un total de 52 genotecas de cDNA. En aquellos organismos donde no se ha secuenciado el genoma completo, el análisis de una colección de ESTs puede ser una vía para obtener información sobre los genes, proteínas y rutas metabólicas de dicho organismo. Para que la colección de ESTs sea lo más representativa de todos los genes de un organismo, es fundamental que las genotecas se construyan a partir de un rango de tejidos lo más variado posible. Por lo tanto, con el fin de tener ampliamente representado el transcriptoma del género *Citrus*, se han construido 30 bibliotecas estándar, 6 genotecas de sustracción, 11 genotecas enriquecidas en clones de longitud completa y 5 genotecas enriquecidas en clones de longitud completa normalizadas, utilizando diferentes tejidos procedentes de varias especies de cítricos en diferentes estados de desarrollo y bajo diversas condiciones de estrés biótico y abiótico. Los tejidos y tratamientos aplicados a los mismos, se han seleccionado por su importancia dentro del cultivo de cítricos. En la figura 1 del anexo I, se pueden ver las diferentes bibliotecas del proyecto, la especie de *Citrus* y el tratamiento aplicado en cada caso.

El número total de clones obtenidos hasta el momento (Jul-07), a partir de las 52 bibliotecas del CFGP ha sido de 91.138, que tras su secuenciación han generado una colección de 85.965 ESTs. Tras realizar el ensamblaje de las ESTs se han obtenido 15.707 *singletons* y 11.844 *contigs*, lo que da un total de 27.551 posibles unigenes (Figura 2, Anexo I). Este número de unigenes puede estar sobreestimado debido a que por ejemplo, varios unigenes pueden provenir de *splicings* alternativos, dos ESTs de un mismo transcrito no ensamblen, la existencia de polimorfismos o errores de secuenciación. También puede estar subestimado cuando por ejemplo, no se han podido separar en contig diferentes miembros muy parecidos de una misma familia. El 78% de los unigenes tiene un tamaño entre 490 y 1200 bp (Figura 3, Anexo I) y un 97% están formados por menos de 9 ESTs (Figura 4, Anexo I). Los *contig* formados por un gran número de ESTs, aunque contribuyen a aumentar la redundancia de la colección pueden servir para la detección de polimorfismos (SNPs) que podrían ser utilizados como marcadores moleculares.

La redundancia de la colección se calculó como el porcentaje de ESTs que corresponden a unigenes ya obtenidos en la misma. Hasta el momento tenemos un 68% de redundancia, lo cual nos indica que de cada 100 ESTs generadas por el proyecto, 68 ya están presentes en la colección. Para cada biblioteca, la redundancia se calculó como el porcentaje de ESTs de la biblioteca que corresponde con unigenes ya obtenidos en el total de la colección. De las 52 bibliotecas, 39 tienen una redundancia por debajo del 30%, 6 tienen una redundancia entre 30-40% y 7 una redundancia mayor del 40%. Por tanto, aunque la redundancia total de la colección es muy elevada, hay algunas bibliotecas que todavía pueden aportar unigenes nuevos (Figura 2, Anexo I).

Los clones de la colección han sido utilizados para la construcción de micromatrices de cDNA. El número de clones presentes en la micromatriz de cDNA de cítricos se ha ido ampliando a medida que se han ido construyendo las bibliotecas y generando clones de ellas. Desde el inicio del proyecto se ha construido una primera micromatriz de 7000 unigenes, que es la que se utiliza en este trabajo y posteriormente se han construido nuevas versiones de 12000 y 22000 unigenes que son las que están siendo utilizadas actualmente. La micromatrices de cDNA de cítricos han sido utilizadas por los distintos grupos que forman parte del CFGP para realizar estudios de transcriptómica orientados a conocer la respuesta de los cítricos en relación a los distintos problemas que afectan a su cultivo.

#### 4.5 Subproyecto de Estrés Hídrico

Dentro del CFGP este trabajo/tesis se ha centrado en uno de los aspectos de mayor interés para el cultivo de cítricos: la respuesta frente a la sequía.

El cambio climático que se está experimentando en los últimos años hace que las precipitaciones sean cada vez más escasas y que se concentren en un periodo determinado del año, por lo que en muchas ocasiones el cultivo se encuentra bajo condiciones de déficit hídrico que requieren un aporte extra de agua de riego. Sin embargo el agua disponible para la agricultura, que supone un 78% del agua destinada al consumo humano, cada vez es más escasa ya que se está produciendo un gran incremento de la demanda por parte de la industria y el consumo en las ciudades. Lo cual nos lleva a la necesidad de desarrollar programas la mejora del aprovechamiento del agua.

La sequía es uno de los estreses abióticos que más afecta a los cultivos en general, suponiendo en la mayoría de los casos unas pérdidas de un 50% de la producción. Los cítricos presentan ciertas características que hacen que el riego sea imprescindible, como son una fuerte competencia entre el crecimiento vegetativo y el reproductivo, una gran área foliar con alta densidad de estomas, y un sistema radicular poco profundo y poco desarrollado. La carencia hídrica produce una disminución en el crecimiento de las hojas y alteraciones en la calidad de los frutos. Cuando el estrés hídrico se produce durante el periodo reproductivo, el desarrollo de la inflorescencia, la fertilización, y el cuajado y abscisión del fruto, pueden todos ellos verse afectados.

En vistas de la situación en torno a la sequía y los cítricos, parece interesante desarrollar herramientas que nos permitan conocer mejor la respuesta de los cítricos frente a este estrés que en un futuro se utilicen para conseguir cítricos que sean capaces de aprovechar mejor el agua disponible en condiciones adversas evitando las importantes pérdidas de cosecha. Además como se ha indicado anteriormente, son muy pocos los estudios realizados en relación al estudio de la tolerancia a estrés hídrico en cítricos.

Dentro del CFGP, el estudio de la respuesta a estrés hídrico ha consistido en un estudio del transcriptoma de los cítricos sometidos a este estrés. Para ello se ha planteado en primer lugar, la generación de ESTs, obteniéndolas a partir de genotecas de cDNA de distintos tejidos de plantas sometidas a estrés hídrico. Estas ESTs pasarán a formar parte de la colección total del proyecto. Por otro lado, con las micromatrices de cDNA generadas por el proyecto se intentarán definir patrones de expresión como respuesta al tratamiento de estrés hídrico.

El material vegetal a utilizar ha sido el mandarino clementino de Nules (*Citrus clementina* cv. Clemenules), al igual que en el resto del proyecto, injertado sobre el patrón mandarino Cleopatra (*Citrus reshni*), portainjertos resistente ante los estreses abióticos.

## 5. Micromatrices y estrés abiótico

La tecnología de las micromatrices permite determinar los niveles de transcrito de un grupo de genes o del total del genoma de un organismo. Entre los estudios realizados en plantas existen numerosos ejemplos de estudios realizados en plantas sometidas a diversos estreses abióticos que han revelado componentes nuevos de las rutas de respuesta a estrés. Los resultados son fruto de la aplicación de diferentes tratamientos de estrés, del uso de diferentes formatos de matriz, diferentes especies, diferentes tipos de tejido y tiempos de estrés, haciendo muy difícil una comparación directa entre estudios (Hazen et al., 2003). Sin embargo ha sido posible conocer algo mejor la respuesta de las plantas ante este tipo de estreses.

### Respuesta general y específica entre estreses

La forma en que las plantas responden ante un estrés abiótico tiene una componente específica y otra general que depende del tipo de estrés, de la especie y del grado de tolerancia de la planta. Los genes inducidos bajo un estrés no son, en muchos casos, específicos del mismo sino que pueden estar regulados bajo otras condiciones de estrés.

En plantas de cebada, los genes inducidos bajo condiciones de sequía y salinidad, presentan muy pocas similitudes (Ozturk et al., 2002). En *Arabidopsis* parece que la respuesta común entre estrés por sequía y salinidad es bastante mayor que en cebada y a su vez hay mayor *cross-talk* entre ellos que entre cualquiera de ellos y estrés por frío (Seki et al., 2002b). Los mismos resultados se observan en arroz (Rabhani et al., 2003) y en maíz (Zheng et al., 2006). Por el número de genes regulado bajo condiciones de estrés, parece que la sequía y la salinidad afectan más a *Arabidopsis* que el frío. Sin embargo, hay otros trabajos que apuntan a lo contrario, mostrando que la mayor parte de la respuesta es específica de cada uno de los estreses (Kreps et al., 2002). También se han detectado similitudes entre la respuesta transcripcional a estrés por rotura y la respuesta por frío y sequía en *Arabidopsis*. Cualquier rotura en la planta provoca deshidratación al igual que durante un estrés por frío y sequía, esto podría explicar la respuesta común entre rotura y estrés hídrico en plantas (Reymond et al., 2000; Cheong et al., 2002).

En los últimos años la generación masiva de experimentos de micromatrices con plantas de *Arabidopsis* ha llevado a la creación de bases de datos muy completas (AtGenExpress). Varios trabajos han utilizado estos datos para realizar una comparación del transcriptoma de *Arabidopsis* bajo diversos estreses bióticos, abióticos y químicos en un intento de determinar la parte de la respuesta a estrés que es común a cualquier estrés que afecte a la planta. Aunque se han obtenido grupos de genes que parecen formar parte de la respuesta general a estrés, la escasa coincidencia entre los trabajos no permite llegar a conclusiones claras sobre los genes de la respuesta general a estrés en *Arabidopsis* (Swindell, 2006; Ma y Bohnert, 2007).

Otro aspecto interesante de la respuesta es que se aprecian diferencias entre la respuesta de la planta ante cada estrés por separado y ante varios estreses aplicados de forma simultánea (Atienza et al., 2004). En tabaco (Rizhsky et al., 2002) y en *Arabidopsis* (Rizhsky et al., 2004) la aplicación de sequía y calor por separado, provoca una respuesta diferente a la que se produce cuando se aplican ambos estreses al mismo tiempo. La aplicación de múltiples estreses es más similar a las condiciones a las que se ven sometidos los cultivos en el campo que los tratamientos con un solo estrés. Si lo que se pretende es mejorar un cultivo se debería estudiar la respuesta ante combinaciones de diversos estreses.

### Respuesta transcripcional entre diversos tejidos y estadios de desarrollo

Además de las diferencias en la respuesta transcripcional debidas al tipo de estrés, la planta también presenta diferencias a nivel de tejido. Esto podría ser debido a que en muchos casos el estrés también es específico de tejido. Por ejemplo, las raíces perciben estreses abióticos generados en el suelo mientras que las temperaturas extremas son percibidas por la parte aérea.

La placenta y el endospermo de la semilla de maíz responden de forma diferente ante el estrés hídrico. En la placenta la mayoría de genes con niveles de transcrito modificados, están sobreexpresados y la mayoría están relacionados con la tolerancia a estrés, mientras que en el endospermo la mayoría están reprimidos y están relacionados con el crecimiento y división celular (Yu y Setter, 2003).

Con relación al tiempo también se observan diferencias en la respuesta de tejidos diferentes. En cebada, los genes inducidos en hojas a las 6 horas de estrés hídrico también lo están a las 10 horas. En raíces además de los genes inducidos a la 6 y 10 horas, hay un grupo que solo se induce a las 10 horas (Ozturk et al., 2002).

En *Arabidopsis*, los genes inducidos tras someter a las plantas a sequía, salinidad y frío, tanto específicos como comunes entre los tres estreses, no son iguales en hojas y raíces (Kreps et al., 2002).

El uso de cultivos celulares en lugar de partes ya desarrolladas de la planta para el estudio de la respuesta a estrés por sequía, salinidad y aplicación de ABA, indica que aunque la mayor parte de la respuesta es la misma en ambos casos, existen diferencias que pueden ser debidas a que en un caso se usan células simples y en el otro tenemos varios tipos de células ya diferenciadas (Takahashi et al., 2004).

También existen factores de transcripción específicos de tejido. En *Arabidopsis*, un estudio de 402 factores de transcripción muestra diferentes niveles de expresión en distintos órganos y niveles de desarrollo, indicando una especificidad en la respuesta. (Cheong et al., 2002).

### Respuesta en el tiempo

El tiempo es un factor crítico en la regulación de la transcripción. Una parte del genoma (aprox. 6%) de *Arabidopsis* presenta cambios circadianos y un 70% de estos genes están relacionados con rutas de respuesta a estrés (Harmer et al., 2000; Kreps et al., 2002). Por tanto, es crítico en un diseño experimental, incluir un control paralelo no estresado que permita determinar la influencia del momento del día en los niveles del transcriptoma. Bajo la aplicación de un estrés, la inducción de los genes a diferentes tiempos también se produce de forma independiente a los ciclos circadianos. Algunos genes son inducidos o reprimidos en determinado momento, tras la aplicación del estrés, y continúan a ese nivel mientras dure el estrés y otros se van induciendo o reprimiendo a distintos tiempos de estrés.

En arroz los genes inducidos en respuesta a estrés salino se agrupan en función del tiempo de máxima expresión dividiendo la respuesta en cuatro etapas. La primera, denominada etapa instantánea, esta formada por aquellos genes que se inducen durante los primeros 15 min. de aplicación del estrés. Una etapa de respuesta temprana, en la que los genes presentan un pico de inducción tras 1 hora de aplicación de estrés. Una etapa de recuperación temprana, en la que se observa una máxima inducción a la 3 y 6 horas de estrés. Y, por último, una etapa de compensación, que implica un retorno a los niveles iniciales antes del estrés, de los genes inducidos a las 24 horas. Este último periodo determina que las plantas sean capaces de resistir o mueran (Kawasaki et al., 2001). Otro punto interesante son las diferencias a lo largo del tiempo entre variedades sensibles y tolerantes. En arroz, la respuesta a estrés salino entre la variedad tolerante Pakkali y la sensible IR29, muestra que la variedad sensible tiene una respuesta similar a la tolerante pero

responde más despacio. En este caso parece una regulación de la transcripción más rápida puede ser responsable de la tolerancia a sal (Kawasaki et al., 2001).

La progresión de la respuesta a lo largo del tiempo también depende del tipo de estrés. En *Arabidopsis* las plantas sometidas a frío presentan dos patrones de expresión. Un grupo se induce a las 2 horas y va disminuyendo poco a poco con el tiempo y otro grupo va aumentando su inducción hasta alcanzar un máximo en 10 horas y después va disminuyendo lentamente. En sequía también aparecen dos grupos de genes con dos comportamientos diferentes. Uno presenta un pico de inducción a las 2 horas como en frío, pero el otro presenta un pico de inducción desde las 2 a las 10 horas (Seki et al., 2002b).

En *Arabidopsis* la respuesta común y específica parece también estar relacionada con el tiempo de estrés. Los genes comunes entre frío, salinidad y sequía en hojas y raíces, pasan de ser 118 a las 3 horas de estrés a 24 a las 27 horas. Esto nos indica que existe una primera respuesta común que con el tiempo se va haciendo más específica (Kreps et al., 2002).

### Respuesta entre especies

Las distintas formas de responder ante estreses abióticos puede ser una ayuda para conocer los mecanismos moleculares de la respuesta. Comparando los niveles de transcrito de plantas de *Arabidopsis* y *Thellungiella* sometidas a estrés salino, se observa que en *Thellungiella* se inducen muy pocos genes por estrés salino y que los genes inducidos en ambos casos son diferentes. Bajo condiciones de ausencia de estrés, muchos genes inducibles por estreses bióticos y abióticos en *Arabidopsis*, están constitutivamente expresados en *Thellungiella*. Estos resultados sugieren que *Thellungiella* es más tolerante porque sobreexpresa de forma constitutiva genes de respuesta a estrés. Esta especie no responde a estrés sino que ya está adaptada a ellos por la sobreexpresión de genes de los que ya se conoce que actúan en tolerancia a estrés y que son inducibles en *Arabidopsis* (Taji et al., 2004; Wong et al., 2006). Un precio a pagar por esta protección permanente es una menor velocidad de crecimiento en *Thellungiella*.

### Regulación de la respuesta

Los factores de transcripción involucrados en la respuesta a estrés son entre otros: DRE-related binding factors, leucine zipper DNA-binding proteins, putative zinc finger proteins, myb proteins, bZIP/HD-ZIPs y AP2/EREBP (Seki et al., 2002b; Chen et al., 2002b).

Mediante un estudio de los cambios en el transcriptoma durante periodos de tiempo muy cortos los factores de transcripción inducidos en los primeros momentos de la respuesta bajo diferentes estreses se pueden relacionar con genes inducidos en momentos posteriores de la respuesta. El estudio de la secuencia de los promotores de los genes indica que un gran número de ellos presentan elementos reguladores. Existen factores de transcripción que se activan bajo diferentes estreses, indicando que hay rutas de señalización que se solapan o se cruzan en puntos específicos.

En *Arabidopsis* se observa que bajo tratamiento de frío hay factores de transcripción del tipo AP2/EREBP, bZIP, Myb y zinc finger que son inducidos rápidamente tras la aplicación del estrés. Mientras tanto, los elementos reguladores ABRE y DRE a los que se unen AP2/EREBP y bZIP, aparecen en los promotores de un gran número de genes que se activan a tiempos más tardíos tras la aplicación del estrés. (Chen et al., 2002b). En otros estudios, los genes inducidos en *Arabidopsis* (Seki et al., 2002a; Seki et al., 2002b) y arroz (Rabbani et al., 2003) bajo condiciones de sequía, salinidad, frío y aplicación de ABA presentan en su mayoría elementos reguladores del tipo DRE, ABRE y CCGAC-core motif. Existe un gran número de

genes en los que no está presente ninguno de los motivos conocidos, lo cual indica que deben existir otros motivos reguladores de la respuesta a estrés.

Los factores de transcripción DREB1A y DREB2A se activan bajo condiciones de sequía e inducen genes que presentan motivos DRE en la secuencia de su promotor. Sin embargo, muchos genes inducidos por ambos factores de transcripción no son los mismos, lo cual indica que no todos los genes con las mismas secuencias reguladoras son controlados por los mismos factores de transcripción, cada uno de ellos controla una parte de la respuesta diferente (Sakuma et al., 2006).



## **II. OBJETIVOS**



## II. OBJETIVOS

El presente trabajo forma parte del Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos (CFGP), por tanto comparte con él los objetivos principales del proyecto, que son:

### **1) Desarrollar herramientas genómicas que ayuden a la mejora de las variedades de cítricos:**

a) Generación de una colección de ESTs representativa del genoma de los cítricos, mediante la construcción de bibliotecas de cDNA que cubran diferentes tejidos y estadios de desarrollo, así como diferentes condiciones de estrés abiótico y biótico.

b) Construcción de micromatrices de cDNA que permitan realizar estudios de análisis global de la expresión.

### **2) Análisis transcriptómico de los cítricos en situaciones relevantes para la citricultura**

---

Como parte del subproyecto de estrés hídrico, los objetivos específicos del presente trabajo son:

#### **1) Contribución al desarrollo de herramientas genómicas en cítricos**

#### **2) Estudio de la respuesta a estrés hídrico**

Para alcanzar estos objetivos se han planteado una serie de objetivos parciales:

#### **1. Generación de una colección de clones correspondientes a genes expresados en plantas sometidas a estrés hídrico.**

Para ello se pretende construir dos bibliotecas de cDNA sustraído, una de hojas y otra de raíces, de plantas sometidas a 5, 10 y 24 horas de estrés hídrico, y obtener a partir de ellas alrededor de 2000 clones que pasen a formar parte de la colección del CFGP. Los genes obtenidos de ambas bibliotecas son candidatos a participar en la respuesta a estrés hídrico en cítricos.

#### **2. Estudio del transcriptoma de cítricos bajo condiciones de estrés hídrico.**

El estudio se centrará en la respuesta inicial de los cítricos a estrés hídrico. Para ello, se pretende hibridar la micromatriz de cDNA de primera generación de cítricos con muestras de hojas y raíces de plantas sometidas a 5, 10 y 24 horas de estrés hídrico, con objeto de obtener genes implicados en esta respuesta.

#### **3. Profundizar en el estudio de genes relevantes para la defensa frente al estrés hídrico, seleccionados entre los obtenidos con las dos estrategias anteriores.**

Para llevar a cabo este objetivo se seleccionarán algunos genes entre los resultados del experimento de micromatrices o de las bibliotecas y se validará su expresión diferencial bajo condiciones de estrés hídrico, así como su implicación durante el estrés hídrico a niveles posteriores a la transcripción.



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. Material vegetal

El material vegetal utilizado para llevar a cabo los experimentos ha sido hojas y raíces procedentes de plántulas de dos años de edad formados por la variedad Clementino de Nules (*Citrus clementina* cv. *Clementina*) injertada sobre el patrón Mandarino Cleopatra (*Citrus reshni*). Se trata de plántulas procedentes del Banco de Germoplasma de IVIA (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias), libres de patógenos. Las plantas se sometieron a un periodo de aclimatación en el invernadero a una temperatura constante de 26°C, 16h de luz y una entre un 60 y 95% de humedad relativa (GomezCadenas et al., 1996).

#### 2. Diseño del experimento de aplicación del estrés

La aplicación del **estrés hídrico (EH)** se realizó transplantando las plantas desde las macetas con arena de sílice, donde habían sido bien regadas, a nuevas macetas con arena de sílice seca. Se tomaron muestras a las 5, 10 y 24 horas tras el trasplante, tanto de hojas como de raíces (Fig.2A).

El experimento **control del trasplante o de rotura (ER)**, se realizó transplantando las plantas desde macetas con arena de sílice húmeda a nuevas macetas también con arena de sílice húmeda. Las muestras se tomaron a las 5, 10 y 24 horas tras el trasplante, tanto de hojas como de raíces (Fig.2B) y al mismo tiempo que las muestras del experimento de estrés hídrico. Se ha supuesto que el mayor estrés que sufre la planta durante el trasplante es el debido a la rotura de las raíces.

Las muestras **control (C)** en ambos experimentos se tomaron de plantas en macetas con arena de sílice, bien regadas, pero sin transplantar (Fig.2C).

El experimento de estrés hídrico por **aplicación de polietilenglicol (PEG)** consistió en someter las plantas a estrés hídrico mediante la aplicación de 1l. por maceta de PEG (polietilenglicol) al 25%. Las muestras se tomaron a las 5, 10 y 24 horas tras la aplicación (Fig.2D).

Cada una de las plantas de las que se realizó el muestreo fue posteriormente desechada, de forma que cada muestra es independiente de las demás.

#### 3. Extracción de RNA total y purificación de RNAm

El aislamiento de RNA total de cítricos es a menudo complicado debido a la presencia de complejos metabolitos secundarios como polisacáridos y compuestos fenólicos. Se probaron varios de ellos en hojas y raíces de cítricos sin obtener buenos resultados. Finalmente el método elegido consistió en lo siguiente (Malmberg et al., 1985):

Se trituraron 500 mg. de material vegetal con nitrógeno líquido y se mezclaron con 1ml del tampón precalentado a 50°C que consiste en 0,5 ml TCES 1x (Tris 0.2 M, NaCl 0,2 M, EDTA 50mM, SDS 2%, pH8.0), 0,5 ml fenol ácido y 5 µl β-mercaptoetanol) 1 min. con el agitador automático "vortex". La mezcla se calentó 5 min. a 50°C y se centrifugó 10 min. a 2000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se le añadieron 0,8 ml de cloroformo-isoamílico (24:1). Se mezcló de nuevo con el agitador

automático y se centrifugó 10 min. a 2000 rpm. Se pasó la fase superior a un microtubo y se centrifugó de nuevo durante 15 min. a 12000 rpm. Al sobrenadante se le añadieron 0,35 ml. de CILi 12 M tratado con dietil pirocarbonato (DEPC) y se dejó precipitar toda la noche a -20°C. Se centrifugó 15 min. a 12000 rpm para recuperar el precipitado, el cual se lavó 3 veces con 1 ml de etanol al 70%. El RNA se secó y se resuspendió en 40 µl de H<sub>2</sub>O milli-Q.

La integridad del RNA total se comprobó por geles de agarosa al 1% y se cuantificó por espectrofotometría.

Para la purificación del RNA mensajero se ha utilizado el kit *QuickPrep micro mRNA Purification Kit* de GE Healthcare ([www.amershambiosciences.com](http://www.amershambiosciences.com)).

Este kit está diseñado para realizar un aislamiento rápido de mRNA a partir de pequeñas cantidades de células eucariotas o tejidos, sin la necesidad de realizar una extracción intermedia de RNA total. Sin embargo, la experiencia previa en el laboratorio nos ha demostrado que utilizando este kit con RNA total, en lugar de células o tejidos, se aumenta la eficacia del mismo. Por tanto, seguimos el protocolo propuesto por la casa comercial pero partimos directamente de RNA total. El mRNA se cuantificó por espectrofotometría.

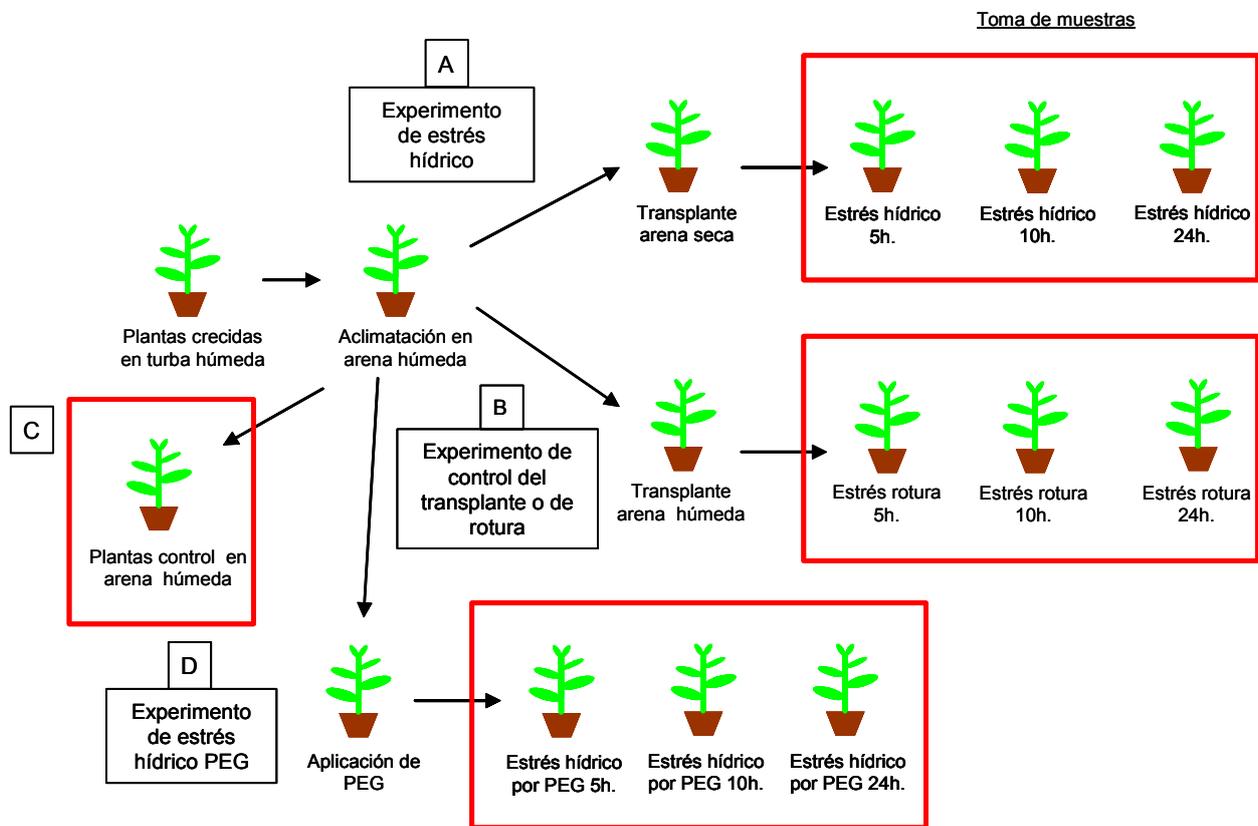


Figura 2. Diseño del experimento de aplicación del estrés. A. Aplicación del estrés hídrico mediante transplante de arena húmeda a arena húmeda. C. Plantas control sin transplantar y sin ser sometidas a estrés hídrico. D. Plantas sometidas a estrés hídrico por aplicación de PEG.

#### 4. Bibliotecas de cDNA sustraído

La hibridación sustractiva, es una técnica que permite comparar dos poblaciones de mRNA (procedentes de distintos organismos, tejidos o resultantes de

la aplicación de distintos tratamientos) y aislar aquellos que se expresan en una de las poblaciones pero no en la otra (Diatchenko et al., 1996).

El proceso consiste, en primer lugar, en retrotranscribir a cDNA las dos poblaciones de mRNA que se quieren estudiar. Se denomina *tester* al cDNA de la muestra de interés que contiene transcritos específicos (diferencialmente expresados), y *driver* al cDNA de referencia. En el siguiente paso se realiza una hibridación de los cDNAs *tester* y *driver* y las hebras que hibridan son eliminadas. El restante cDNA no hibridado representa los transcritos que se expresan en el *tester* pero no en el *driver*.

El kit utilizado para la sustracción ha sido **PCR-Select™ cDNA Substraction kit** de CLONTECH ([www.clontech.com](http://www.clontech.com)) basado en la amplificación selectiva de las secuencias diferencialmente expresadas. En la figura 3 se pueden ver los pasos principales del proceso de sustracción.

Se han realizado dos genotecas de cDNA sustraído. Para cada una de ellas se ha utilizado material vegetal procedente de hojas y raíces, respectivamente, y siguiendo el tratamiento de estrés hídrico (EH) descrito en el apartado 2 de Materiales y Métodos. El cDNA *tester* es el sintetizado a partir de mRNA procedente de plantas sometidas a estrés hídrico (EH) y el cDNA *driver* el sintetizado a partir de mRNA procedente de plantas control (ver Fig.2A y C).

#### 4.1. Síntesis y preparación del cDNA para la sustracción

El cDNA se sintetizó, por un lado, a partir de mRNA que provenía de una mezcla equitativa de material vegetal tomado de 3 a 5 plantas diferentes no sometidas a estrés hídrico, es decir, de plantas control. Este cDNA es el que denominamos cDNA *driver*. Por otro lado, se sintetizó cDNA a partir de una mezcla equitativa de mRNA procedente del RNA total extraído de una mezcla de material vegetal tomado de 3 a 5 plantas sometidas a estrés hídrico a 5, 10 y 24 horas, respectivamente (es decir, se mezcló el material de 12 plantas en total). Este cDNA es el que denominamos cDNA *tester* ya que contenía los transcritos que nos interesaba (Fig.4).

Para la síntesis de cDNA a partir de mRNA se ha utilizado el **SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit** de la empresa CLONTECH Laboratories Inc. ([www.clontech.com](http://www.clontech.com)). Además se han usado los kits **Advantage 2 PCR Kit** para la síntesis de la segunda hebra de cDNA, y **NucleoTrap® Purification Kit** para la purificación del cDNA tras la digestión con *Rsa* I, también de CLONTECH Laboratories Inc.

##### 4.1.1. Síntesis de cDNA

Para evitar la pérdida parcial de la secuencia durante la síntesis de cDNA se ha utilizado el kit **SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit** de la empresa CLONTECH Laboratories Inc. En este kit el proceso de síntesis de cDNA es el siguiente (Figura 5). Se usa un cebador oligo(dT) modificado, el cebador CDS III A, para la síntesis de la primera hebra. Cuando la RT llega al extremo 5' del mRNA, debido a su actividad transferasa terminal, añade a la cadena de cDNA unos nucleótidos adicionales, principalmente deoxicitidina. El oligonucleótido SMART II A, que contiene una secuencia oligo(dG) en el extremo 3', se empareja con la cadena de deoxicitidina y sirve como molde a la RT que continúa replicando a partir de la segunda hebra de cDNA (Chenchik et al., 1998). En los casos en que la RT para de transcribir antes de llegar al final del mRNA, la adición de nucleótidos de deoxicitidina es mucho menos eficiente que en el caso de híbridos de cDNA-mRNA de longitud completa, quedando

impedido el apareamiento por complementariedad de bases con el oligonucleótido SMART II A. Aquellos cDNA que poseen el sitio de anclaje del SMART II A en el extremo 3' y el CDS II A complementario al poly A<sup>+</sup>, en el extremo 5' podrán ser amplificados exponencialmente.



Figura 3. Esquema general del método de sustracción *PCR-Select™* (CLONTECH Laboratories, Inc.).

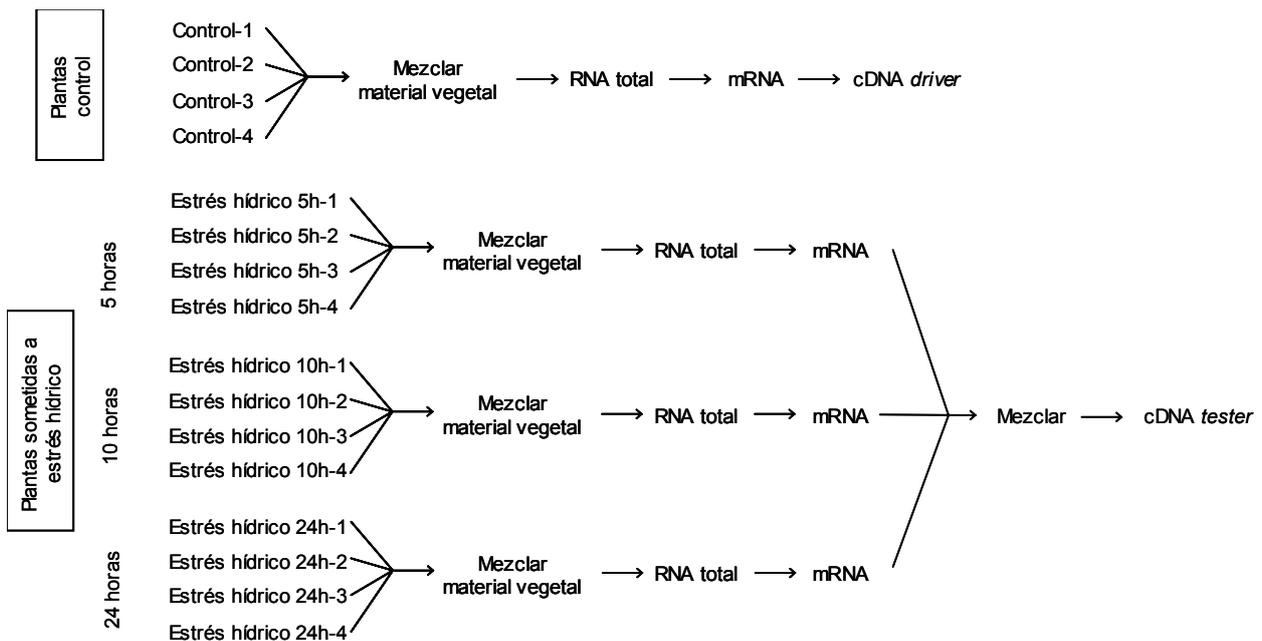


Figura 4. Síntesis de cDNA *tester* y *driver*

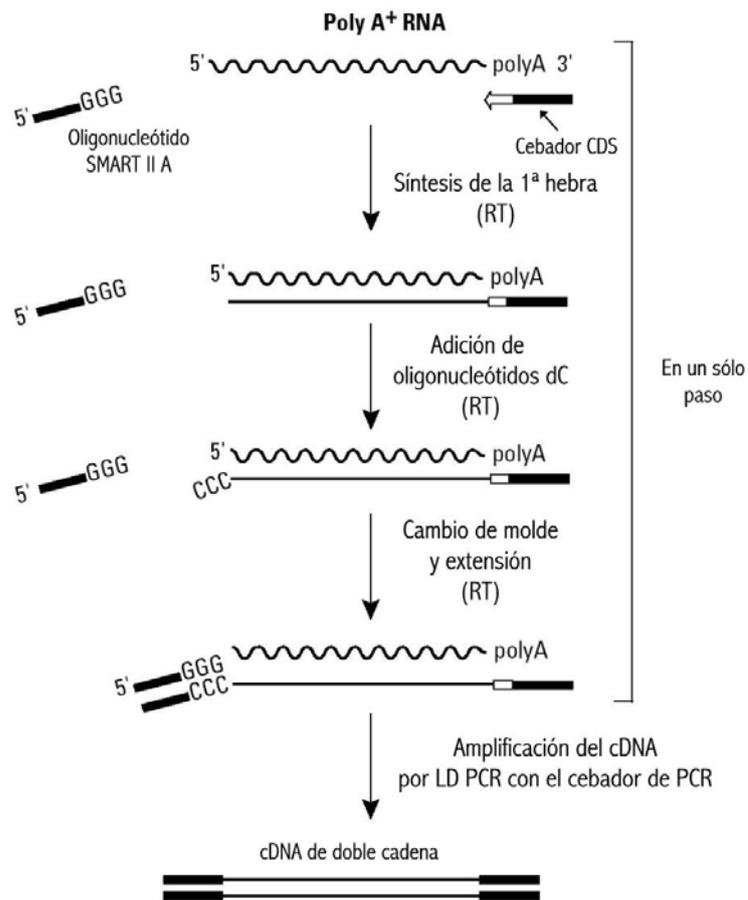


Figura 5. Esquema general de la tecnología *SMART* para la síntesis de cDNA (CLONTECH Laboratories, Inc.).

#### 4.1.2. Preparación del cDNA para la sustracción

El cDNA *tester* y *driver*, se purificó utilizando la columna cromatográfica **CHROMA-SPIN™-1000** de CLONTECH ([www.clontech.com](http://www.clontech.com)). Esta columna se usa para purificar el cDNA de pequeños contaminantes que son restos de las reacciones anteriores como sales, solventes, nucleótidos, enzimas, proteínas, polisacáridos u otros pequeños ácidos nucleicos. Además esta columna nos sirve para seleccionar los ácidos nucleicos por tamaño. La columna utilizada es capaz de dejar pasar cDNA > 1.000 bp y retener todas las demás moléculas menores.

Antes de realizar la sustracción propiamente dicha, cada una de las muestras de cDNA ya purificado (*tester* y *driver*) se digirieron utilizando la enzima *RsaI*. Con esta digestión obtenemos fragmentos de cDNA más cortos, que facilitan la sustracción, y con extremos romos.

Una vez concluida la digestión, se debe purificar el cDNA digerido usando un sistema de purificación de matriz de sílice. En este caso se ha utilizado el kit **NucleoTrap® Purification Kit** de la empresa CLONTECH ([www.clontech.com](http://www.clontech.com)). Este kit utiliza una matriz de bolitas de sílice capaces de unirse a los ácidos nucleicos y separarlos de otros contaminantes. Este cDNA purificado está preparado para ser usado en el primer paso de la sustracción, el ligamiento de los adaptadores.

## 4.2. Sustracción de cDNA

Una vez realizados estos pasos previos, comienza la sustracción propiamente dicha (Figura 7). En primer lugar, el cDNA *tester* se subdivide en dos porciones, y cada una de ellas se liga con un adaptador de cDNA diferente (adaptador 1 y 2R). Los extremos de los adaptadores no tienen un grupo fosfato, de forma que solo se pueden unir con los extremos 5' del cDNA. Ambos adaptadores contienen secuencias que van a permitir la unión de los cebadores de PCR una vez que los extremos de las moléculas de cDNA ligadas con los adaptadores hayan sido rellenadas.

A continuación se llevan a cabo dos hibridaciones. En la primera hibridación se añade un exceso de *driver* a cada una de las dos muestras de *tester* ligadas con su adaptador correspondiente. Una vez juntos el *tester* y el *driver*, se procede a la desnaturalización por calor de las muestras. De esta forma se pueden unir unas cadenas simples con otras por complementariedad de bases dando lugar a moléculas de los tipos A, B, C y D en cada muestra (Figura 6). Las moléculas que están diferencialmente expresadas pueden reanillarse con ellas mismas dando lugar a moléculas de tipo B. Este reanillado es más rápido para las moléculas más abundantes debido a que tienen una cinética de hibridación de segundo orden, y por tanto las concentraciones de moléculas muy abundantes y poco abundantes quedarán igualadas en forma de moléculas A. Después de esta hibridación tendremos las secuencias diferencialmente expresadas representadas por las moléculas de tipo A de cadena sencilla, y las secuencias que están presentes tanto en el *driver* como en el *tester* estarán representadas por las moléculas del tipo C, formadas por una hebra de cada uno de ellos.

En la segunda hibridación, las dos muestras procedentes de las dos primeras hibridaciones se juntan y se mezclan sin desnaturalizar, junto con *driver* desnaturalizado. En esta hibridación sólo las moléculas del tipo A de una y otra muestra, que representan secuencias diferencialmente expresadas en el *tester*, se unen para dar lugar a un nuevo tipo de moléculas, las del tipo E. Estas nuevas moléculas son cDNA *tester* de doble cadena y con diferentes extremos, que se corresponden con los adaptadores 1 y 2R. A continuación se utiliza una DNA polimerasa para rellenar los extremos de las moléculas, de forma que las moléculas de tipo E (secuencias diferencialmente expresadas en el *tester*) tienen diferentes sitios de unión para los cebadores de PCR en los extremos 5' y 3' (Figura 6).

A continuación todas las moléculas se someten a unos ciclos de PCR. Las moléculas de los tipos A y D no tienen sitios de unión para los cebadores de PCR, por tanto no son amplificadas. Al ser sus extremos complementarios, las moléculas del tipo B forman una estructura en anillo (Figura 7) que no permite la unión de los cebadores de PCR, y por ello tampoco este tipo de moléculas son amplificadas. Las moléculas de tipo C sólo tienen sitio de unión para un cebador, por lo que son amplificadas de forma lineal en lugar de exponencialmente. Sólo las moléculas de tipo E, que tienen dos adaptadores diferentes, se amplifican exponencialmente, dando lugar a una alta concentración de secuencias diferencialmente expresadas.

Después se lleva a cabo una segunda amplificación por PCR para reducir la proporción de contaminaciones por secuencias indeseadas y aumentar aún más la concentración de las secuencias diferencialmente expresadas. Una vez concluida esta última amplificación ya tenemos el cDNA preparado para la inserción en un vector por medio de clonaje T/A, y por tanto ya podemos construir la genoteca.

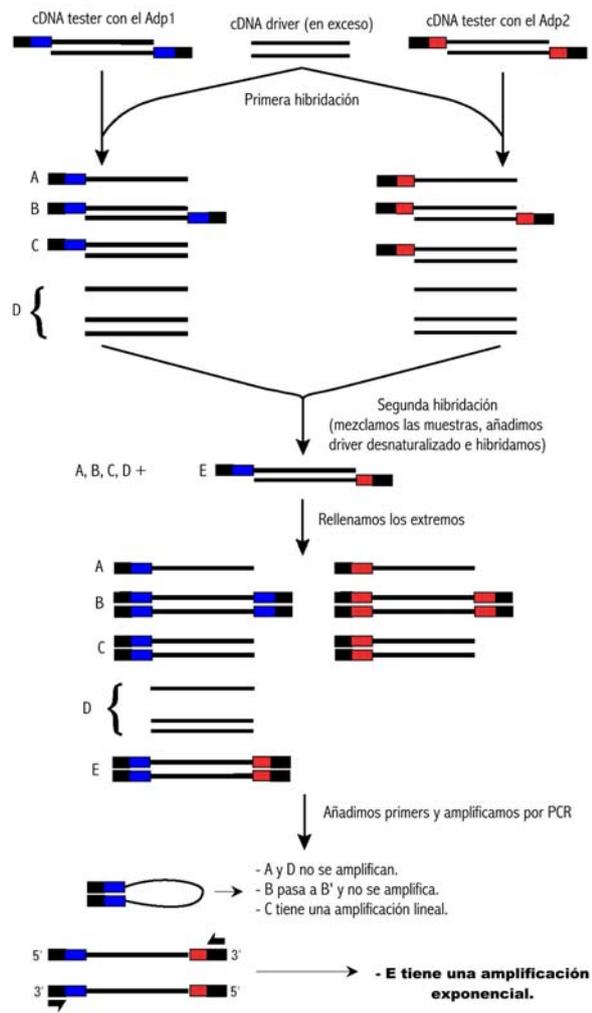


Figura 6. Diagrama esquemático del proceso de sustracción por el método *PCR-Select* (CLONTECH Laboratories, Inc.).

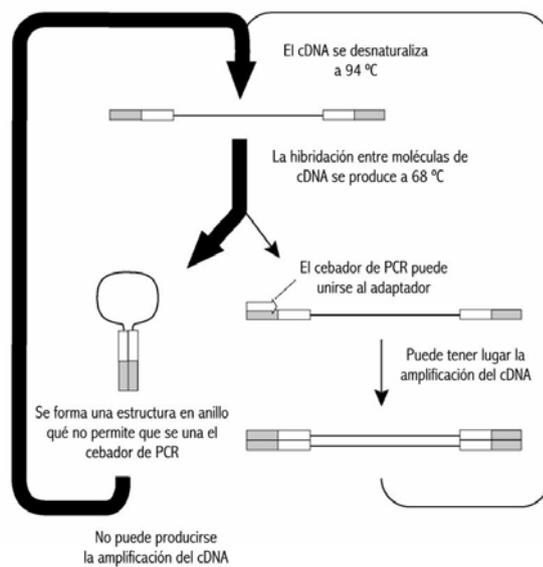


Figura 7. Proceso de supresión de PCR que tiene lugar durante la sustracción (CLONTECH Laboratories, Inc.).

### 4.3. Clonaje en el vector y transformación

Para llevar a cabo la clonación se ha elegido el **TA Cloning<sup>®</sup> Kit** de Invitrogen™ Life Technologies ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)). Este kit nos permite clonar directamente los productos de PCR en un vector de clonaje T/A.

El método de clonaje T/A aprovecha la actividad transferasa terminal de las polimerasas termoestables como la *Taq* polimerasa, que añade un único nucleótido de deoxiadenosina (A) en el extremo 3' de los productos de PCR (Clark, 1988; Mead *et al.*, 1991). Un vector de clonaje T/A, en su forma linearizada, tiene un residuo de deoxitimidina (T) en los extremos 3', de forma que permite el clonaje directo de los productos de PCR en el vector.

El vector de clonaje T/A que hemos elegido es el plásmido **pCR<sup>®</sup> 2.1** también de Invitrogen™ ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)). En la figura 8A podemos ver el mapa linearizado del vector.

El método consta principalmente de tres pasos (figura 8B). En primer lugar el cDNA amplificado producto de la PCR se une al vector. A continuación se transforman, con esta ligación, células competentes de *E. coli DH5αMCR*, y por último, se siembran en placas de LB con ampicilina (o kanamicina) y aprovechando el gen *LacZα*, se seleccionan las colonias de color blanco que son las que contienen el plásmido con el inserto.

## 5. Obtención y anotación de ESTs (Expressed Sequence Tag)

Las ESTs se han generado de las bibliotecas de cDNA sustraído (hojas y raíces), obtenidos según se describe en el apartado 4. Una ESTs es una secuencia obtenida tras la secuenciación parcial de un clon. Las ESTs obtenidas a partir de los dos genotecas de cDNA sustraído pasaran a formar parte de la colección de ESTs del CFGP.

### 5.1. Obtención de ESTs

Las ESTs se han obtenido a partir de los clones de ambas bibliotecas de cDNA sustraído. Para ello, se realizaron minipreparaciones para obtener plásmidos purificados, de los cuales fue secuenciado parcialmente el cDNA insertado.

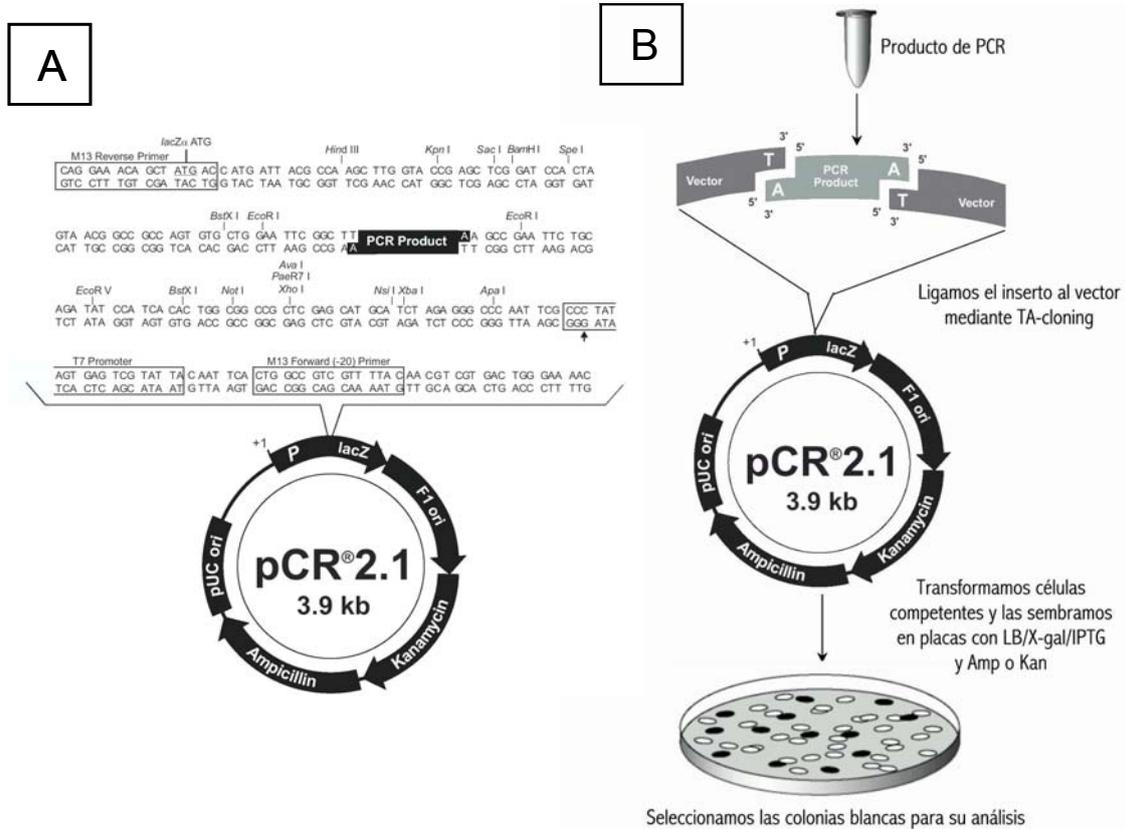
Las minipreparaciones se realizaron con el kit **PerfectPrep Plasmid 96 Vac, Direct Bind System** de Eppendorf ([www.eppendorf.com](http://www.eppendorf.com)), que permite realizar tanto el crecimiento de las bacterias como la purificación de los plásmidos en placas de 96 pocillos, haciendo que la obtención de gran número de plásmidos sea más rápida y sencilla.

#### 5.1.1. Purificación de los plásmidos

Se seleccionaron al azar, tras la transformación, las colonias de color blanco, que contienen los plásmidos con los insertos, y se crecieron en medio líquido en placas de 96 pocillos. Se guardó un glicerinado de cada una de las placas de cultivo (150 µl cultivo + 25 µl. glicerol 80%).

La extracción y purificación de DNA plasmídico se realizó con el kit citado anteriormente. Todo el proceso esta diseñado para el uso de un sistema de vacío y

pipetas multicanal con lo que, además de realizar *minipreps* a gran escala, obtenemos el DNA plasmídico muy concentrado y de alta pureza necesario para la secuenciación.



**Figura 8.** A. Mapa linealizado del vector pCR® 2.1 (Invitrogen). La secuencia del sitio de clonaje múltiple se muestra con un producto de PCR insertado por medio de clonaje T/A. Dos sitios de corte de *EcoRI* flanquean los lados del producto de PCR insertado. La flecha indica el lugar de inicio de la transcripción para la T7 RNA polimerasa. B. Esquema en tres pasos del método de clonaje en el vector y transformación de células competentes para la construcción de la biblioteca de cDNA sustraído.

### 5.1.2. Secuenciación de los plásmidos purificados

La secuenciación se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación de IBMCP a partir del extremo 5' de cada cDNA insertado en cada plásmido, usando el secuenciador automático de capilaridad ABI 3100 (Applied Biosystems, [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)) con *fluorescent dye terminator technology*. De esta forma se generaron los cromatogramas correspondientes a las carreras de secuenciación de cada clon.

## 5.2. Procesado, ensamblaje y anotación de las ESTs

Los cromatogramas proporcionados por el Servicio de Secuenciación del IBMCP fueron utilizados como producto de entrada en una secuencia encadenada de operaciones de ordenador o *pipeline*, para su procesamiento informático y para su introducción en la base de datos del proyecto CFGP. Para ello se utilizó el paquete informático EST2uni (<http://bioinf.comav.upv.es/est2uni>), consistente en una herramienta totalmente automatizada para el análisis de ESTs y para la creación de una base de datos de ESTs con una interfaz de minería de datos a través de internet. Dicha herramienta realiza de un modo totalmente automático los diferentes pasos para el preprocesado, ensamblaje (*clustering*) y anotación (tanto funcional como estructural) de un conjunto de ESTs, utilizando para ello el encadenamiento de diferentes herramientas estándar de uso extendido por la comunidad científica, tal y como se explica a continuación.

En cuanto al preprocesado de las ESTs, el objetivo es la generación de un conjunto de secuencias limpias de contaminantes y de alta calidad a partir de los cromatogramas proporcionados por el servicio de secuenciación. En primer lugar, las secuencias brutas y sus valores de calidad fueron obtenidos a partir de los cromatogramas de partida con el programa *Phred* (Ewing et al., 1998; Ewing y Green, 1998), utilizando los parámetros establecidos en dicho programa por defecto. La eliminación de las regiones de baja calidad o correspondientes a secuencias del vector utilizado se realizó con el programa *Lucy* (Chou y Holmes, 2001). La eliminación de secuencias correspondientes a vectores distintos del usado para la construcción de las genotecas (probablemente provenientes de contaminaciones) se realizó con *SeqClean* (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/software>), utilizando la base de datos de vectores UniVec del NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/UniVec.html>). La identificación y etiquetado de zonas de baja complejidad o con elementos repetitivos fueron realizados con los programas *SeqClean* (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/software>) y *RepeatMasker* (<http://www.repeatmasker.org>), respectivamente. Tras todo este proceso de limpieza, aquellas secuencias con menos de 100 bases fueron descartadas.

Las secuencias limpias obtenidas en el paso de preprocesado son entonces ensambladas para eliminar su redundancia, conseguir las secuencias consenso y obtener el conjunto definitivo de secuencias únicas o unigenes. Dicho paso fue realizado con el software *tgicl* (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/software>), utilizando los parámetros de agrupamiento ofrecidos por defecto en el programa. Las diferentes especies utilizadas en la obtención de la colección de ESTs no son genéticamente muy diferentes ya que muchas especies de cítricos cultivadas son fruto de la hibridación sexual de ancestros comunes. Por este motivo, se espera que la homología entre genes de diferentes especies sea muy alta y no se ha tenido en cuenta el origen de las ESTs para su ensamblaje y análisis.

En cuanto a la anotación estructural de los unigenes obtenidos, se identificaron los microsatélites (SSR) existentes en las secuencias, utilizando el programa *sputnik* (<http://espressosoftware.com/pages/sputnik.cgi>). Además, se identificaron putativos polimorfismos de nucleótido sencillo (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) en los unigenes formados por al menos cuatro ESTs, utilizando para ello los alineamientos de dichas ESTs para formar el unigen y anotando las posiciones discrepantes.

Por último, la anotación funcional de los unigenes se realizó utilizando diferentes herramientas. En primer lugar, se realizaron BLASTX contra la base de datos no redundante de proteínas uniref90 (<http://www.ebi.ac.uk/uniref/>), contra el conjunto completo de proteínas de *Arabidopsis* obtenido del TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*, <http://www.arabidopsis.org>), y contra una base de datos local construida con todas las secuencias públicas de cítricos obtenidas en el NCBI

(National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Se consideraron como significativas tan sólo aquellas similitudes con un valor de significancia (E-value) menor que  $1e^{-05}$ . De este modo, las secuencias de cítricos fueron anotadas con la descripción funcional de la proteína más similar existente en dichas bases de datos públicas. Se realizó también un análisis de identificación de motivos funcionales utilizando una búsqueda con HMMPFAM contra la base de datos pfam (Eddy, 1998) y se anotaron los unigenes con los motivos funcionales localizados en ellos. Además, los unigenes fueron también anotados utilizando la clasificación GO (*Gene Ontology; Consortium TGO*, 2000), para lo cual se utilizaron los resultados del análisis BLAST contra las proteínas de *Arabidopsis*, anotadas con los términos GO.

Toda la información generada en esta pipeline se encuentra almacenada en una base de datos MySQL (<http://www.mysql.com>), accesible a través de la página web del CFGP (<http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB>) mediante una interfaz web que permite realizar consultas complejas utilizando cualquier combinación de características de las secuencias y/o de los clones como criterio de búsqueda.

## 6. Experimento de Micromatrices

### 6.1. Micromatriz de cDNA de primera generación del CFGP

Los experimentos de micromatrices se realizaron utilizando la primera micromatriz de cDNA de cítricos generada por el Servicio de Genómica del IBMCP, construida como parte del CFGP (Forment et al., 2005). Esta micromatriz está formada por 12672 clones que corresponden a 6875 unigenes de cítricos. Los clones están impresos en soportes de cristal recubierto de aminosilano (**Ultra GAPS** de Corning).

Los clones provienen de 18 bibliotecas de cDNA construidas a partir de diferentes tejidos y diferentes especies de cítricos. La distribución de los clones según el tejido del que han sido aislados es de un 35% hojas, 15% flores, 19% raíces, 20% frutos y 11% flavedo. En cuanto a la especie, el 85% de los clones fueron aislados de bibliotecas de *Citrus Clementina*, mientras que un 15% se aisló de otras variedades y patrones.

### 6.2. Diseño del experimento de Micromatrices

En este trabajo los experimentos se han realizado siguiendo un diseño de referencia. Este diseño consiste en hibridar en una misma micromatriz una de las muestras objeto de estudio (muestra problema) y una muestra referencia.

En nuestro diseño, la muestra de referencia es una mezcla a partes iguales de RNA procedente de hojas y raíces de todas las plantas utilizadas en todos los experimentos: plantas control (C), plantas sometidas a estrés hídrico (EH) a las 5, 10 y 24 horas y plantas sometidas al experimento control del transplante o de rotura (ER) a la 5, 10 y 24 horas. La muestra problema es en cada caso, RNA procedente de cada una de las plantas, tanto de control, como de cada uno de los experimentos de estrés hídrico y de control o rotura, y tanto de hoja como de raíz. (Fig. 9). Se han realizado 4 réplicas biológicas de cada condición. (*ver descripción de la aplicación del estrés en apartado 2. Materiales y métodos*).

Se han planteado cuatro experimentos diferentes (Figura 10):

- A) Experimento de estrés hídrico de hojas de Clementino de Nules (*Citrus Clementina*)
- B) Experimento control del trasplante o de rotura de hojas de Clementino de Nules (*Citrus Clementina*)
- C) Experimento de estrés hídrico de raíces de Mandarino Cleopatra (*Citrus Reshni*)
- D) Experimento control del trasplante o de rotura de raíces de Mandarino Cleopatra (*Citrus Reshni*)

En cada uno de ellos se hibridó la referencia común contra 4 muestras control y contra 4 muestras de plantas sometidas a cada uno de los 3 tiempos de estrés estudiados, haciendo un total de 16 hibridaciones por experimento.

### 6.3. Preparación de las sondas

Para realizar el marcaje de las sondas se utilizó el método de marcaje indirecto. Este método consiste en la incorporación de 5-(3-aminoalil)-2'-deoxi-UTP (aa-dUTP) al cDNA de cadena simple que se sintetiza a partir de la hebra de mRNA por retrotranscripción. A esta reacción le sigue el acoplamiento de los fluoróforos a las cadenas de cDNA modificadas. Estos fluoróforos tienen incorporados grupos ésteres NHS que se pueden unir a los grupos amino-alil, completándose así el marcaje de la sonda. El protocolo de marcaje está basado en el propuesto en la página web de TIGR (The Institute for Genomics Research; <http://atarrays.tigr.org/PDF/Aminoallyl.pdf>).

En primer lugar, se realizó la síntesis de la cadena simple de cDNA a partir de 30 µg de RNA total, utilizando oligo-dT y la transcriptasa en reverso **Superscript II** de Invitrogen. La reacción tiene lugar a 42°C durante 3 horas y el cDNA se purifica con **Qiaquick column** de Qiagen, con las modificaciones indicadas en la página web de TIGR.

El acoplamiento de los fluoróforos se llevó a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad con **Cy3** o **Cy5 CyDye NHS-éster** de **Amersham Biosciences** y el cDNA marcado fue purificado con **Qiaquick column** de Qiagen. Para preparar las sondas de referencia se empleó el fluoróforo Cy3 y para preparar las sondas control o las muestras sometidas a algún tipo de estrés se empleó el fluoróforo Cy5.

La cuantificación de las muestras se realizó midiendo la absorbancia ( $\Delta_{260}$ ) en un espectrofotómetro NanoDrop-1000.

### 6.4. Hibridación de las Micromatrices

Las hibridaciones se llevaron a cabo de forma manual utilizando cámaras de hibridación (**Telechem Hybridization Chambers**) y el protocolo recomendado por Corning para hibridación de UltraGaps Coated Slides ([www.corning.com/lifesciences](http://www.corning.com/lifesciences)).

En primer lugar se llevó a cabo una prehibridación de los portas en una solución de SSC 3x, SDS al 0,1% y 0,1 mg/ml de BSA, durante 30 min. a 50°C, tras la cual se lavaron 15 s con agua destilada y 2 s con isopropanol.

La hibridación se realizó introduciendo los portas en las cámaras de hibridación, colocando sobre la zona impresa del cubreobjetos (lifterlip de Erie Scientific) e inyectando en el espacio que se forma entre ambos 100 µl de una

solución de SSC 3x, SDS al 0,1%, 0,1 mg/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado y las dos sondas (referencia y problema) previamente desnaturalizadas a 95°C durante 1 min. Las cámaras bien cerradas se sumergieron en un baño a 50°C durante toda la noche.

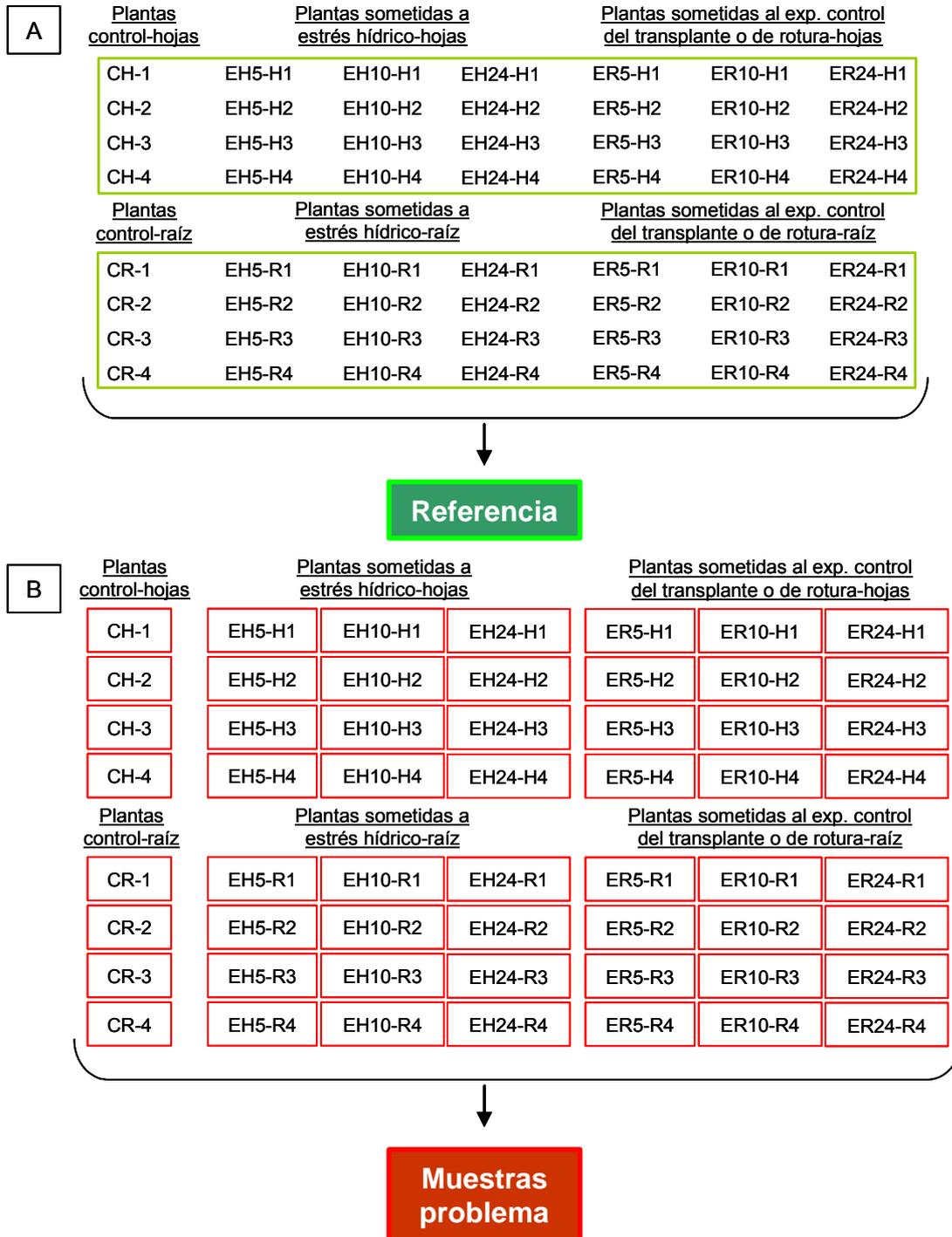
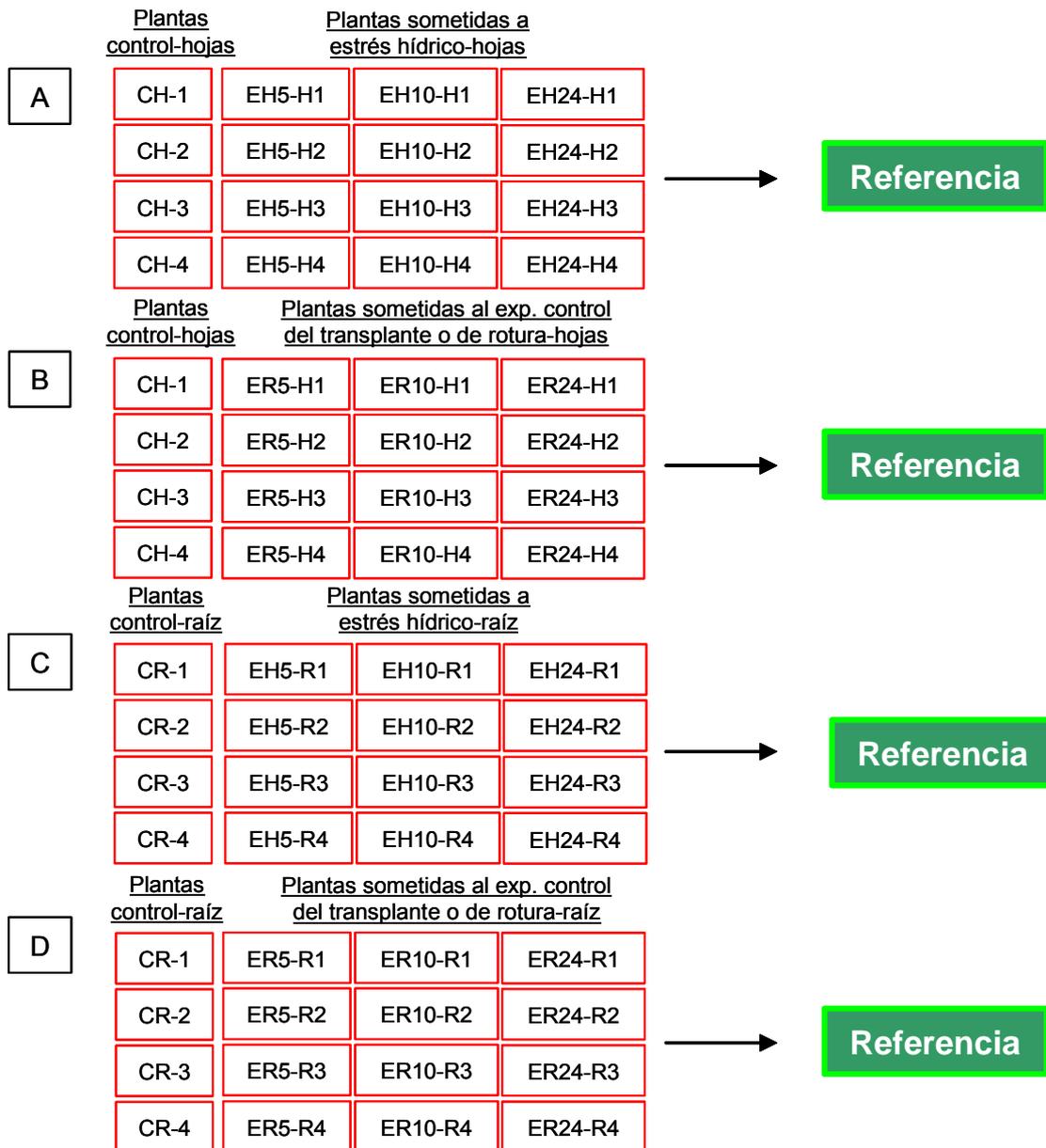


Figura 9. Muestras utilizadas en el experimento de micromatrices. A. Referencia: formada por una mezcla a partes iguales del RNA total procedente de todas las muestras. B. Muestras problema: formadas por el RNA total de cada una de las muestras (CH: hoja de plantas control; EH5-HY: plantas sometidas a estrés hídrico tiempo X, muestra de hoja número Y; ERX-HY: plantas sometidas al experimento control del transplante o de rotura tiempo X, muestra de hoja número Y; CR: raíz de plantas control; EH5-RY: plantas sometidas a estrés hídrico tiempo X, muestra de raíz número Y; ERX-RY: plantas sometidas al experimento control del transplante o de rotura tiempo X, muestra de raíz número Y).



**Figura 10. Diseño del experimento.** Cada una de las 56 muestras problema se hibrida junto con la referencia en una micromatriz diferente. **A.** Experimento de estrés hídrico de hojas de Clementino de Nules (*Citrus Clementina*). **B.** Experimento control del trasplante o de rotura de hojas de Clementino de Nules (*Citrus Clementina*). **C.** Experimento de estrés hídrico de raíces de Mandarino Cleopatra (*Citrus Reshni*). **D.** Experimento de control del trasplante o de rotura de raíces de Mandarino Cleopatra (*Citrus Reshni*). (CH: hoja de plantas control; EHx-Hy: plantas sometidas a estrés hídrico tiempo X, muestra de hoja número Y; ERx-Hy: plantas sometidas al experimento control del trasplante o de rotura tiempo X, muestra de hoja número Y; CR: raíz de plantas control; EHx-Ry: plantas sometidas a estrés hídrico tiempo X, muestra de raíz número Y; ERx-Ry: plantas sometidas al experimento control del trasplante o de rotura tiempo X, muestra de raíz número Y).

Después de la hibridación, los porta se sometieron a varios lavados que consistieron en un primer lavado con una solución compuesta de SSC 2x y SDS al 0,1%, 5 min. a 42°C y otros tres lavados a temperatura ambiente con una solución compuesta por SSC 0,1x y SDS al 0,1%, 10 min., con una solución de SSC0,1x, 5 min. y con SSC 0,001x, durante 30 s. Los porta se secaron por centrifugación en una centrifuga de mesa, 5 min. a 600 g.

## 6.5 Obtención de los datos de las Micromatrices

### Exploración y análisis de la imagen

Las micromatrices se escanearon utilizando un escáner GenePix 4000B (Molecular Devices, Sunnyvale, Calif.). Para cada micromatriz se captaron las imágenes de cada fluoróforo por separado, escaneando a 532-nm (Cy3) y 635-nm (Cy5), a una resolución de 10  $\mu\text{m}$  y una potencia de láser del 100%. Los voltajes de los tubos multiplicadores se ajustaron manualmente para minimizar el fondo y reducir el porcentaje de puntos con valores saturados. La fluorescencia de cada canal se ajustó variando el voltaje del tubo multiplicador de forma que el cociente entre la señal total de Cy3 y la señal total de Cy5 fuera 1. Las imágenes se guardaron como archivos TIFF multicanal.

El valor de intensidad de cada punto se cuantificó utilizando el software de análisis de imagen GenePix 4.1. (*Molecular Devices*). La extracción de los datos de cada punto se realizó usando una gradilla predefinida. Las gradillas fueron ajustadas por el método del círculo adaptable para asegurar un reconocimiento óptimo de los puntos, de forma que se localizó cada punto con un círculo adecuado a su tamaño y se midió la intensidad de fluorescencia dentro del círculo. Los puntos considerados de baja calidad, es decir, con partículas de polvo o con morfología irregular, con rayas o manchas del tampón, los puntos sin hibridación y puntos situados en áreas con elevado fondo local, se marcaron manualmente. Los puntos con valores de intensidad menores que dos veces el fondo local en los dos canales, fueron marcados y se unieron a los ya marcados manualmente como candidatos para ser eliminados para posteriores análisis. El valor de la intensidad de cada canal para cada punto y para el fondo local de cada punto se determinó como la mediana de la intensidad de los pixels dentro del círculo que abarca el punto y de los pixels alrededor del mismo, respectivamente. El valor de intensidad neto de cada punto se obtuvo como el cociente de las intensidades entre Cy3: Cy5 tras la sustracción de las respectivas intensidades del fondo local de cada canal.

Los cocientes de intensidad se transformaron en  $\log_2$  (logaritmo en base 2) y se normalizaron aplicando el método de regresión lineal local Lowess (Cleveland, 1981). Los archivos de GenePix 4.1. se importaron al software de análisis de micromatrices Acuity 3.1. Desde este momento todos los puntos marcados fueron eliminados y no se tuvieron en cuenta en posteriores análisis.

### Análisis de datos

Se utilizó el mismo proceso de análisis para todas las micromatrices. Cada experimento esta formado por 16 hibridaciones correspondientes a 4 réplicas biológicas del control y 4 replicas biológicas de cada uno de los 3 tiempos de estrés (ver apartado 6.2. Diseño del experimento), lo cual nos da un total de 16 datos de intensidad por clon. El análisis se inició con la aplicación de una serie de filtros a los datos de cada uno de los clones. Se eliminaron del análisis, aquellos clones que no tenían al menos un 60% de datos en cada experimento. El cálculo de los valores de expresión (inducción y represión) con respecto al tiempo 0 se realizó dividiendo los valores de intensidad de cada muestras por la media de los valores de las 4 replicas del tiempo 0.

Dado que el interés esta en identificar clones cuyo comportamiento supone una inducción o represión respecto al tiempo 0, se aplicó un filtro adicional por perfiles planos. En dicho filtro, fueron eliminados del análisis, todos aquellos clones cuyo nivel de inducción/represión no fuera mayor que 1,5 veces respecto al tiempo 0, en al menos tres de los puntos del tratamiento ( $\log_2 = 0,7$ ).

La identificación de clones diferencialmente expresados se realizó mediante la aplicación del test estadístico t-Test de Student. Previamente a la aplicación del test,

un análisis de agrupamiento génico (*SOM, Self-Organizing-Map*) permitió la identificación de perfiles de interés respecto al tiempo 0 que fueron utilizados para definir los dos grupos a comparar en cada test. A cada t-Test se le aplicó una corrección FDR (*False Discovery Rate, Benjamini-Hochberg*) (Benjamini y Hochberg, 1995) para corregir el error debido a las comparaciones múltiples, considerándose estadísticamente significativos aquellos clones con un valor de  $p$  (*p-value*) corregido  $<0,05$ . Por último, se realizó un agrupamiento génico de los genes estadísticamente significativos según su patrón de expresión.

Posteriormente se agruparon los clones estadísticamente significativos en unigenes. Los valores de expresión para cada unigen se obtuvieron como resultado de la media de las medias de los valores de expresión de cada una de las 4 réplicas biológicas para cada uno de los 3 tiempos de tratamiento.

## 7. RT-PCR semicuantitativa

La extracción de RNA total se realizó siguiendo el protocolo detallado en el apartado 3 de materiales y métodos. El RNA total se purificó de DNA genómico utilizando *RNeasy Mini Kit* y *RNase-Free DNase Set* (Qiagen), siguiendo el protocolo *RNeasy Mini Protocol for RNA Cleanup* de la casa comercial. Se comprobó que las muestras estaban libres de DNA genómico utilizando unos *primers* que amplificaban un intron del gen *CcGA20ox2* (GA20 oxidasa de Citrange carrizo) (*primers* cedidos amablemente por Dña. Laura Huerta del laboratorio del Dr. José Luis García Martínez).

La retrotranscripción se llevó a cabo a partir de 3  $\mu\text{g}$  de RNA usando el First-Strand cDNA Síntesis Kit (Amersham Biociences) siguiendo el protocolo del fabricante.

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  conteniendo 0,5 U *Netzyme DNA polymerase* (Need), tampón de reacción 1x, dNTPs 1 mM, 0,5  $\mu\text{M}$  de cada primer,  $\text{MgCl}_2$  0,2 mM y 0,5  $\mu\text{l}$  de cDNA obtenido según el kit.

El número de ciclos de la PCR fue de 24 a 38 dependiendo de la abundancia del transcrito en cada muestra (Rafinosa sintasa, 34 ciclos; Dehidrina *Cor15*, 24 ciclos en hojas y 26 en raíces; Pirrolina-5-carboxilato sintasa, 28 ciclos; ACC oxidasa, 28 ciclos; Acuaporina (aCL62Contig1) y Acuaporina (aCL58Contig4), 24 ciclos; Mir-3, 30 ciclos hojas y 28 ciclos raíces; Mir-A, 32 ciclos hojas y 30 ciclos raíz; Mir-B1, 30 ciclos en hojas y 34 ciclos en raíces; Mir-B2, 34 ciclos en hojas; Tubulina (aCL5534Contig1), 32 ciclos). Cada ciclo fue de 30s a 94°C, 30s a 60°C y 1min a 72°C, con 5 min. iniciales a 95°C y 5 min. finales a 72°C, antes y después de cada ronda de ciclos respectivamente.

Para el diseño de los *primers* se utilizó el programa Primer Express 2.0. (Applied Biosystems) (Figura 11). Utilizando la secuencia de cada uno de los unigenes seleccionados, se realizó una búsqueda mediante BLAST contra la base de datos *nr* (non redundant) del NCBI y contra la base de datos del proyecto de Genómica Funcional de Cítricos (CFGP), con el fin de descartar para el diseño de los *primers* zonas de la secuencia del unigen que estuvieran conservadas entre miembros de la misma familia, o bien cajas o motivos conservados entre diferentes familias génicas.

Para los unigenes aCL2181Contig1 (Rafinosa sintasa), aCL174Contig2 (PC5S), aCL58Contig4 (Acuaporina) y aCL62Contig1 (Acuaporina), no se encontró en la búsqueda en el CFGP ningún otro unigen con secuencia similar al seleccionado, por lo que se diseñaron los *primers* utilizando las secuencias de los propios unigenes. Los dos unigenes anotados como ACC oxidasa (aCL22Contig1 y aCL22Contig3) se ensamblaron y tras un *blast* no se encontró otro gen similar, utilizándose la secuencia del superunigen para el diseño de los *primers*.

Del experimento de micromatrices fueron seleccionados varios unigenes cuya anotación correspondía a *Cor15* (aCL6Contig21, aCL6Contig7, aCL6Contig16). La

búsqueda en el CFGP de unigenes homólogos a éstos (aCL6Contig 12, aCL6Contig15, aCL6Contig6), y el posterior alineamiento de todos ellos, reveló que todos los unigenes de la base de datos cuyo primer *hit* corresponde a *Cor15* tienen una elevada homología. En este caso, todos los unigenes fueron ensamblados en un superunigen, que extendió la secuencia consenso de *Cor15*, y fue esta secuencia consenso la que se utilizó para el diseño de los *primers*.

En el caso de las miraculinas, la búsqueda en el CFGP de unigenes homólogos a los seleccionados del experimento de micromatrices (aCL1Contig12, aCL297Contig2, aCL297Contig1, aCL1Contig19, aCL1Contig1, aCL1Contig13, aCL1Contig5, aCL1Contig33, aCL1Contig 11, aCL1Contig10) y el posterior alineamiento de todos ellos (aCL190Contig1, aCL190Contig2, aCL190Contig3, aCL190Contig4), reveló que existen al menos 6 superunigenes claramente diferentes cuyo primer *hit* corresponde al término “*miraculin*”. Los 6 superunigenes presentan entre ellos una alta homología de secuencia. En este caso, la selección de unigenes a partir de micromatrices de cDNA necesita un análisis posterior para discernir qué superunigenes están realmente inducidos por el estrés aplicado. Por ello, se diseñaron *primers* específicos para cada uno de los superunigenes, utilizando las secuencias consenso de cada uno de ellos (Figura 11).

Las reacciones de RT-PCR semicuantitativa se han realizado sobre muestras control (C), muestras sometidas al experimento de estrés hídrico (EH), muestras sometidas al experimento control o de rotura (ER) y muestras sometidas a estrés hídrico con aplicación de PEG (ver apartado 2 de Materiales y Métodos). En todos los casos se han utilizado sólo las muestras de las plantas sometidas a 5 horas. Se han utilizado tanto muestras de hoja como de raíz. Cada muestra consiste en una mezcla equimolecular del RNA de las 4 replicas biológicas.

Para cada una de las muestras se realizaron dos reacciones de PCR independientes. Los resultados de cada reacción de PCR se visualizaron corriendo 8 µl del producto de la reacción en un gel de agarosa al 1% (w/v). Para cada uno de los unigenes se comprobó que el fragmento amplificado coincidía con el tamaño de banda teórico estimado en el diseño de *primers*.

## 8. Análisis de proteínas

### 8.1 Extracción de proteína de muestras vegetales

La extracción de proteínas se realizó a partir de hojas y raíces de plantas sometidas a estrés hídrico (EH) según el protocolo de aplicación de estrés detallado en el apartado 2 de Materiales y Métodos. Tanto en hojas como en raíces se han utilizado muestras control, no sujetas a ningún estrés y muestras sometidas a 5, 10 y 24 horas de estrés hídrico (EH). Las muestras son el resultado de la mezcla a partes iguales (p/p) de cada una de las réplicas biológicas.

La extracción de proteína LEA de las muestras se realizó siguiendo un protocolo basado en la propiedad de ciertas proteínas a resistir a la desnaturalización térmica (Hara et al., 2001). Se molieron 200 mg de material vegetal con nitrógeno líquido y se extrajeron las proteínas con 0,4 ml del tampón PBS-DTT (10 mM de tampón de fosfato sódico (pH 7.0) con 0,15 M de NaCl y 5 mM de ditioneitol) a 4°C. El extracto se centrifugó a 10.000 xg durante 20 minutos a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se calentó a 85°C durante 10 minutos.

Unigen (código CFGP) o superunigen	Blast hit	Secuencia de los primer Forward (F) y Reverse (R)	Longitud del fragmento amplificado
aCL2181Contig1	Rafinosa sintasa	F 5'-CAACAGCTTATGGATGGGCA R 5'-TGAATAGCAACCATGTGGCC	800
aCL6Contig21/aCL6Contig7/aCL6Contig16/ aCL6Contig12/aCL6Contig15/aCL6Contig6	Cor15 dehidrina	F 5'-GGACAAGCACAAAGGGAGAGC R 5'-CACCTTGAGGAGACACCCCA	500
aCL174Contig2	P5CS (Pirrolina-5-carboxilato sintasa)	F 5'-AGTGGCTTTGCCATGGACAG R 5'-CCGAATGGCCAATGAAGCT	500
aCL22Contig1/aCL22Contig3	ACC oxidasa	F 5'-TCGACCATCAATGAAGTCCCA R 5'-TCCTTGGCCTGGAACCTGAG	600
aCL58Contig4	Acuaporina	F 5'-TGCCAACGTCGTAGCTCATG R 5'-ACAAAGTGACAGCGCCAC	600
aCL62Contig1	Acuaporina	F 5'-CTCCCTTCTACGAGGCATCCT R 5'-AATCCAGCAGCTCATGACGAT	600
aCL297Contig1, aCL297Contig2	Miraculina 1	F 5'-GGGAGTTAAAACCGGCGGT R 5'-AGGCAAAGGCAGATTTGCC	470
aCL1Contig19, aCL1Contig1	Miraculina 2	F 5'-CCCAGTCCTAGATGGCGCC R 5'-CGCGGTCATTGATATTGCTTC	540
aCL1Contig12	Miraculina 3	F 5'-AAGTCAAAAATGGCACTAGTGGT R 5'-ATGCCACGGAATCGATCG	630
aCL190Contig1, aCL190Contig2, aCL190Contig3, aCL190Contig4	Miraculina A	F 5'-CAGCAATTCGAGGAGCAGG R 5'-GCGCCATTAGTGAGAGCCA	430
aCL1Contig13, aCL1Contig33, aCL1Contig11, aCL1Contig5	Miraculina B-1	F 5'-TCAGTGTTGCTATCTGGACGTGAC R 5'-CGTTGATCTTTCTGTAGCGGG	320
aCL1Contig10	Miraculina B-2	F 5'-TCTGCTATCCAATGGGGAAAG R 5'-GGGATACAGCCAACAGTGAATT	560
aCL5534Contig1	Tubulina	F 5'-TTGTTTGAACAACCTTTTCGACG R 5'-AAAACGAGCACATGCAAACG	300

Figura 11. Primers utilizados en la RT-PCR semicuantitativa. El diseño de los primer se realizó a partir de las secuencia de cada unigen o de la secuencia del superunigen resultante del ensamblaje de varios unigenes, según el caso.

Las proteínas desnaturalizadas por calor se eliminaron centrifugando a 10.000 xg durante 15 minutos a 4°C. La cantidad de proteína presente en el sobrenadante fue cuantificada por el método de Bradford (Bradford, 1976). Se empleó el reactivo de Bradford (Biorad) para detectar por espectrofotometría a una absorbancia de 595, diversas cantidades de BSA (albúmina de suero bovino) y generar una curva patrón que nos permitió cuantificar la cantidad de proteína del extracto. Las muestras se guardaron a -80°C.

## 8.2 Sobreexpresión y purificación de la proteína recombinante

La proteína recombinante CrCOR15 se obtuvo a partir de la cepa M15 de *E. coli* que contenía el cDNA del gen *Crcor15* clonado en el vector pQE (Qiagen,), cedida amablemente por el Dr. Lorenzo Zacarías (Sanchez-Ballesta et al., 2004)

Para producir la proteína recombinante se inocularon 100 ml de medio LB, con ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml), con 1 ml de un cultivo saturado de bacterias que contenían el plásmido de expresión de la proteína recombinante CrCOR15. El cultivo se incubó a 37°C en agitación hasta que el cultivo alcanzó una A<sub>660</sub> de 0,5-0,6. La producción de proteína recombinante se indujo añadiendo IPTG

(Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido) al medio hasta una concentración final de 0,1 mM. Tras 3 horas de incubación, se centrifugó el cultivo a 5000 xg 10 min. a 4°C, se deshecho el sobrenadante y se resuspendieron las células en un tampón formado por 50 mM Tris HCl (pH 7.9) y 2 mM EDTA (pH 8.0). Se centrifugó de nuevo y se recogieron las células que se guardaron a -80°C.

Para purificar la proteína se aprovechó que al clonarla en el vector pQE se produce una fusión en el extremo C-terminal de una secuencia de 6 histidinas (His-tag sequence). Esta cola de histidinas permitió la purificación de la proteína recombinante, a partir de extractos crudos, en las columnas *His•Bind metal chelation resin* de Novagen. Las histidinas son capaces de pegarse a los iones Ni<sup>+</sup> presentes en la resina de la columna y de esta forma separar nuestra proteína del resto. El protocolo seguido ha sido el recomendado por la casa comercial.

La proteína fue recogida de la columna en varias fracciones de 150  $\mu$ l cada una. Estas fracciones fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) que posteriormente se tiñeron con solución *Coomassie Blue R* (metanol 50%, AcH 10% y *Coomassie Blue R* 0,05 % (p/v) para determinar en cuales estaba presente la proteína. Las fracciones con mayor cantidad de proteína se juntaron y se determinó su concentración por el método Bradford (Bradford, 1976) empleando el reactivo de *Bradford* (Biorad) y BSA (albúmina de suero bovina) como patrón.

### 8.3 Obtención y optimización de anticuerpos policlonales

La obtención de anticuerpos policlonales de CrCOR15 se realizó a partir de la proteína recombinante purificada. Se utilizaron dos conejos machos de la raza *New Zealand* de tres meses de edad. La inmunización se realizó por inyección subcutánea en la espalda del conejo. Fueron practicadas un total de 3 inyecciones por conejo. En la primera se inyectó una emulsión formada por 200  $\mu$ g de proteína purificada disuelta en 1 ml de PBS 10X (1,4 M ClNa, 27 mM ClK, 15 mM PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K, 81 mM PO<sub>4</sub>HNa<sub>2</sub> (pH 7.3)) y 1ml de FCA (*Freund's complete adjuvant*: aceite mineral con monooleato de mannida con bacterias inactivadas por calor) El resto de inyecciones se realizaron con una emulsión formada por 150  $\mu$ g de proteína purificada disuelta en 1 ml de PBS 10X y 1ml de FIA (*Freund's incomplete adjuvant*: FCA sin bacterias inactivadas por calor). La segunda dosis se inyectó a las tres semanas y la tercera a las cuatro semanas de la primera inyección.

Tras la última inyección se tomó una muestra de sangre (1 ml) para comprobar la respuesta de cada conejo en la generación de anticuerpos. La sangre se dejó coagular durante unas horas a temperatura ambiente y después se dejó toda la noche a 4°C para que se contrajera el coagulo. Después se retiró el coagulo y se utilizó el suero para comprobar la respuesta inmune del animal. Esta comprobación se realizó mediante un análisis western blot de la proteína purificada (0,1  $\mu$ g) y extractos de proteína de material vegetal (7  $\mu$ g), utilizando los sueros de ambos animales a dos diluciones diferentes (1:5000 y 1:1000).

Tras esta comprobación se sacrificaron los conejos y se recogió la sangre. Se dejó coagular y se retiró el coagulo, igual que anteriormente, y el suero se mezcló a partes iguales con Sulfato amónico 100 % saturado 4 M (pH 7,5). Se guardó a 4°C.

Los anticuerpos procedentes de cada uno de los conejos se denominaron Ac1-CrCOR15 y Ac2- CrCOR15.

La especificidad del anticuerpo se determinó mediante análisis western blot de la proteína purificada (0,05  $\mu$ g) y extractos de proteína de material vegetal (7  $\mu$ g). La unión del anticuerpo se realizó con dos membranas iguales, incubando una de ellas con el anticuerpo (1:5000) y la otra con el anticuerpo pre-incubado durante 1 hora a temperatura ambiente con 2  $\mu$ g/ml de proteína purificada. Con esta preincubación se

pretende favorecer la unión de todos los anticuerpos específicos de la proteína CrCOR15 presentes en el suero con la propia proteína, evitando que reaccionen con la proteína fijada en la membrana.

#### 8.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las proteínas fueron separadas según su tamaño mediante una electroforesis vertical en mini-geles desnaturalizantes de poliacrilamida/SDS al 12%, para la compactación de las muestras (Laemmli, 1970). El gel, de 1,5 mm de grosor, contaba de dos partes: una parte superior de aproximadamente 3 cm de altura en la que se cargan las muestras, y una parte inferior, que ocupa el resto del gel. La parte superior se compone de 125 mM Tris, 0,1% (p/v) SDS y 3,4% (v/v) acrilamida-bisacrilamida (1:19) y la parte inferior esta compuesta por 375 mM Tris, 0,1% (p/v) SDS, 10% glicerol y 12% acrilamida-bisacrilamida (1:19). La polimerización de los geles se realizó añadiendo 0,067% (v/v) de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina) y 0,05% (p/v) de APS (persulfato sódico). El tampón de carga fue LSB 5x (7,5% SDS, 0,1 M ditioeritritol, 10 mM EDTA, 30% sacarosa (p/v), 0,25 mg/ml azul de bromofenol, 0,3 M Tris (pH 6,8)).

La electroforesis se llevó a cabo verticalmente, con un tampón de electroforesis compuesto por 14,4 g/l de Glicina y 0,1% de SDS (p/v) y una corriente continua a una intensidad inicial de 50 volt., hasta que las muestras penetran en la parte inferior del gel, y de 100-120 volt. hasta que las muestras llegan al final del gel.

La visualización de las proteínas en el gel se realizó por tinción con la solución de colorante Coomassie Blue R (metanol 50%, AcH 10% y Coomassie Blue R 0,05% (p/v)). Los lavados para eliminar el exceso de colorante en el gel se realizaron con una solución al 10% de metanol y 10% de AcH.

#### 8.5 Análisis *Western blot*

La inmunodetección de las proteínas se realizó en membranas de nitrocelulosa. Las proteínas separadas por tamaños mediante un SDS/PAGE se transfirieron horizontalmente a una membrana de nitrocelulosa (Millipore) (Towbin et al., 1979). La membrana y el gel de poliacrilamida se equilibraron en el tampón de transferencia (25 mM Tris-HCL, 14,4 g/l glicina, 0,02% (p/v) SDS, 20% (v/v) metanol), se pusieron en contacto y se realizó la transferencia de las proteínas mediante una electroforesis perpendicular al gel, en el propio tampón de transferencia, utilizando un sistema BIORAD. La electroforesis se llevó a cabo durante 90 min a 100 volt. y 4°C.

La transferencia de las proteínas a la membrana se visualizó mediante la tinción de la membrana con la solución Ponceau S (Ponceau S 0,1% (p/v), AcH 1%). El colorante se eliminó con varios lavados con H<sub>2</sub>O.

Seguidamente se procedió a la detección inmunológica de las proteínas fijadas a la membrana con anticuerpos específicos. Para reducir la unión inespecífica del anticuerpo a zonas de la membrana, esta se incubó durante 30 min. con solución de bloqueo formada por TBS (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCL, pH 7.6) al 1% de Tween 20 (v/v) y de leche en polvo desnatada al 2% (p/v). A continuación se incubó la membrana durante toda la noche a 4°C en la misma solución de bloqueo conteniendo el anticuerpo primario policlonal (según el caso se utilizó Ac1-CrCOR15 (dilución 1:1000 o 1:5000) o Ac2- CrCOR15 (dilución 1:1000)). Tras lavar la membrana varias veces con TBS 1x-Tween 20, se incubó durante 1 hora con solución de bloqueo conteniendo el anticuerpo secundario *Anti-Rabbit* (dilución 1:5000) conjugado a HRP

(Horseradish Peroxidase, Peroxidasa de rábano). Se volvió a lavar varias veces con TBS 1x-Tween 20 y se procedió a la detección del anticuerpo por quimioluminiscencia, utilizando en kit *ECL Plus Western Blotting Detection Reagents Kit* de Amersham, siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial. Se trata de un método no radiactivo para la detección de antígenos específicos conjugados a anticuerpos covalentemente unidos a HRP.

## 9. Análisis del contenido de azúcares

### 9.1 Extracción de azúcares de material vegetal

La extracción de azúcares se realizó en muestras de raíces de plantas control (C) y de plantas sometidas a 5, 10 y 24 horas de estrés hídrico (EH) según el protocolo de aplicación de estrés detallado en el apartado 2 de Materiales y Métodos. Las muestras son el resultado de la mezcla a partes iguales (p/p) de cada una de las 4 replicas biológicas de cada condición.

Se tomaron 200 mg de material vegetal, se trituraron en nitrógeno líquido y se homogeneizaron con 1 ml de agua milli-Q. A continuación se calentó la muestra a 95°C durante 10 min. y se centrifugó a 10.000 xg durante 5 min a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se pasó por cartuchos de fase sólida C18 (*Sep-Pak Cartridges C18*, Waters, Milford, Massachusetts, US). Los cartuchos C18 contienen cadenas hidrofóbicas de 18 carbonos unidas a silicatos cuya misión es retener todas las cadenas largas de celulosa, hemicelulosa, almidón, etc., para que solamente pasen a través del cartucho los monosacáridos y oligosacáridos. Antes de usarlos se hidrataron con agua milli-Q. Tras aplicar el sobrenadante al cartucho, se recogió el eluido, se añadieron 0,5 ml más de agua milli-Q y se recogió el resto del eluido. El extracto purificado se guardó a -20°C hasta su posterior utilización.

### 9.2 Detección de azúcares en muestras vegetales

El contenido de azúcares se determinó por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) utilizando un cromatógrafo Waters 515 HPLC y un detector electroquímico Waters 464. El sistema de HPLC estaba controlado por un PC con el software Millennium<sup>32</sup> de Waters.

La columna se equilibró con NaOH 30 mM y se eluyeron 20 µl de cada muestra temperatura ambiente con NaOH 30 mM a un flujo de 1 ml/min en un Waters 515. A continuación se detectaron con el detector electroquímico Waters 464 con los siguientes parámetros: 10 µA, E1 = 80 mV, T1 = 0.26 s, E2 = 570 mV, T2 = 0.26 s, E3 = 730 mV, T3 = 0.36 s.

La cuantificación de cada uno de estos azúcares en las muestras se realizó comparando el área de cada pico obtenido en las muestras con el área de los picos de las soluciones standard. La glucosa, fructosa y sacarosa standard utilizadas son de Merk, el galactinol y la rafinosa standard son de Fluka (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany). Estos compuestos standard se usaron disueltos en agua milli-Q.

Se midieron dos muestras de cada tiempo y se realizó una coinyección para verificar cada pico con el correspondiente compuesto.



## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Diseño experimental

Son varios los métodos experimentales utilizados para simular y evaluar la respuesta a estrés hídrico en plantas (Verslues et al., 2006). Los métodos de aplicación rápida y severa del estrés, los llamados “métodos de choque”, incluyen el trasplante de un sustrato húmedo a un sustrato seco, el arranque de las plantas de la maceta o el corte del tejido objeto de estudio seguido de un periodo de deshidratación dejándolas sobre un material inerte, y la aplicación de solutos como PEG o manitol al medio de cultivo. La aplicación más moderada del estrés hídrico se suele llevar a cabo mediante la cesación del riego. La mayor parte de los estudios transcriptómicos de la respuesta a la sequía se han realizado con muestras obtenidas de plantas sometidas a tratamientos de estrés severo y en periodos de tiempo cortos (horas) (Ozturk et al., 2002; Kreps et al., 2002; Seki et al., 2002b; Rabbani et al., 2003; Lan et al., 2004; Atienza et al., 2004; Rensink y Buell, 2005). Otro grupo de trabajos utiliza métodos de aplicación lenta de estrés hídrico y tiempos más largos de aplicación del estrés (días) (Rizhsky et al., 2002; Yu y Setter, 2003; Hazen et al., 2005; Wong et al., 2006). La comparación de los resultados obtenidos tras el uso de diferentes métodos de aplicación de estrés hídrico en *Arabidopsis* (Bray, 2004) y en cebada (Talamé et al., 2007) apunta a que existe una parte de la respuesta común a cualquier forma de aplicación del estrés, pero que otra parte de ella es dependiente del método utilizado. Los métodos de choque permiten conocer los mecanismos de respuesta de la planta durante una etapa de estrés severo, mientras que la aplicación de un periodo de estrés más prolongado podría ayudar a conocer los mecanismos de adaptación de la planta a la sequía a largo plazo.

Uno de los objetivos de este trabajo es el estudio de la respuesta inicial a estrés hídrico. Este periodo es muy importante ya que se ha observado que en organismos modelo, como levadura hay una respuesta rápida inicial que se pierde a tiempos largos y que es crucial para la adaptación al estrés hídrico (Proft y Struhl, 2004). Se ha utilizado un método de aplicación rápido y drástico del estrés hídrico que ha consistido en el trasplante de las plantas desde macetas con arena de sílice húmeda a macetas con arena de sílice seca. Aunque en algunas ocasiones se utiliza el arranque de la plantas como parte del método de aplicación de estrés hídrico, no se suele tener en cuenta que el daño ocasionado a las raíces puede influir en el estudio (Ozturk et al., 2002; Seki et al., 2002b). En los trabajos en los que inicialmente se utilizó el trasplante para la aplicación de estrés hídrico en cítricos (Tudela y PrimoMillo, 1992; GomezCadenas et al., 1996) se planteó la posibilidad de que este pudiera interferir en el proceso objeto de estudio (la abscisión de las hojas tras la rehidratación de plantas sometidas a un periodo de estrés hídrico) al introducir un factor de daño mecánico o rotura. Utilizando como control plantas trasplantadas de arena húmeda a arena húmeda se comprobó que las plantas trasplantadas no sufrían abscisión de las hojas por lo que se consideró que el método de aplicación de estrés hídrico por trasplante era adecuado para el estudio del proceso de abscisión.

Puesto que una parte de mecanismos moleculares de defensa de las plantas frente a estímulos bióticos y abióticos lo constituye una respuesta general a cualquier tipo de estrés, y dado que la combinación de dos o más tipos de estrés conlleva una serie de respuestas cruzadas, sinergismos y bloqueos de diferentes rutas de defensa, nos hemos planteado a la hora de la construcción de las bibliotecas considerar el estrés hídrico por trasplante como un todo, de manera que la genoteca contenga todos los genes implicados en la respuesta al estrés hídrico con este tipo de tratamiento. Sin embargo, para intentar evaluar hasta que punto el trasplante provoca

respuestas adicionales a las propiamente de estrés hídrico, y hasta que punto las respuestas se potencian o se atenúan, el estudio con micromatrices incluye un experimento adicional en el que las plantas son transplantadas en ausencia de estrés hídrico.

## 2. Bibliotecas de cDNA

### 2.1 Bibliotecas de estrés hídrico. Drought1 y Drought2

De las 52 bibliotecas del Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos en este trabajo se han construido las bibliotecas Drought1 y Drought2, que corresponden a hojas y raíces de plantas sometidas a estrés hídrico respectivamente. Se trata de dos bibliotecas de sustracción construidas a partir de material vegetal procedente de plantas sometidas a 5, 10 y 24 horas de estrés hídrico por trasplante (EH). La sustracción se realizó respecto a plantas control (C) (Fig. 2 A y C).

Entre las dos bibliotecas se han obtenido un total de 2.296 clones de los cuales 722 pertenecen a Drought1 y 1574 a Drought2. Tras su secuenciación se han obtenido 2008 ESTs, 607 de Drought1 y 1401 de Drought2. El ensamblaje de las 607 ESTs obtenidas de Drought1 con el resto de ESTs de la colección del proyecto de CFGP en la que están incluidas, dio como resultado 65 *singletons* y 245 *contigs*, lo cual hace un total de 310 unigenes (Tabla supl.1). El ensamblaje de las 1401 ESTs de Drought2 dio como resultado 470 *singletons* y 565 *contigs*, lo que hace un total de 1035 unigenes (Tabla supl. 2) (Figura 12).

	Drought 1 (Hoja)	Drought 2 (Raíz)
Clones	722	1574
ESTs	607	1401
Singletons	65	470
Contigs	245	565
Unigenes	310	1035
Unigenes específicos	71	515
Unigenes específicos sin anotación	47	243
Redundancia(%)	49	26
Novedad(%)	23	50

Figura 12. Clones de las bibliotecas Drought 1 y Drought 2.

Los parámetros “redundancia” y “novedad” nos han servido para valorar cada biblioteca. La redundancia se calculó como el porcentaje de ESTs de cada biblioteca que corresponden a unigenes ya obtenidos en el total de la colección. En el caso de Drought1 se ha obtenido una redundancia del 49% y en Drought2 del 26%. La redundancia de Drought2 se puede considerar todavía baja y podríamos seguir generando clones de la misma.

El otro parámetro a tener en cuenta es la novedad, que se define como el porcentaje de unigenes de cada biblioteca que ha sido obtenido únicamente en esa

biblioteca (unigenes específicos = *singletons* + *contigs* con miembros sólo de esa biblioteca). La novedad se puede considerar una estimación de la capacidad de cada biblioteca para aportar clones nuevos a la colección. Las dos bibliotecas construidas en este trabajo, Drought1 y Drought2 tienen una novedad del 23 y 50% respectivamente (Figura 12).

Teniendo en cuenta ambos parámetros, podemos decir que la alta redundancia y la baja novedad de Drought1 (49% y 23% respectivamente) nos indica que la mayoría de ESTs obtenidas en esta biblioteca forman parte de *contig* que están formados por ESTs aislados ya de otras bibliotecas. Por otro lado, la baja redundancia y alta novedad de Drought2 (26% y 50% respectivamente) nos indica que gran parte de las ESTs que se obtienen de esta biblioteca son *singletons* que pertenecen sólo a esta biblioteca. La biblioteca Drought1 se está saturando con sólo 607 ESTs, mientras que Drought2, con 1401, todavía es capaz de aportar clones nuevos a la colección.

La casi saturación de la biblioteca de hojas (Drought1), con tan solo 607 ESTs frente a la posibilidad de seguir obteniendo clones nuevos de la biblioteca de raíz (Drought2) podría deberse a que en la colección existe un mayor número de bibliotecas de hojas (16) que de raíces (11). Sin embargo, este no parece ser el motivo ya que no se observan elevados índices de saturación en otras bibliotecas de hojas y el número de ESTs aportado por el total de las bibliotecas de hoja y de raíz es aproximadamente el mismo (11.226 ESTs de hojas frente a 10.486 de raíz). Otra causa de esta diferencia entre las dos bibliotecas podría ser la diferencia entre la respuesta a estrés hídrico en ambos tejidos. La mayor parte de las bibliotecas de la colección han sido construidas con tejidos sometidos a distintos estreses bióticos y abióticos, por lo que la saturación de Drought1 podría indicar que parte de la respuesta a estrés hídrico en hojas está compartida con otros estreses, mientras que la de raíz es más específica. La escasez de agua en el suelo es detectada a través de las raíces por lo que los mecanismos desarrollados por la planta para afrontar este estrés podrían ser más específicos que los de hojas.

## 2.2 Clasificación funcional de los unigenes específicos de Drought1 y Drought2

Las ESTs pueden ser utilizadas para extraer información de los niveles de expresión de cada gen. La base de lo que ha venido a denominarse “Northern digital”, es la suposición de que el número de ESTs es proporcional a la abundancia de mRNA utilizado para la construcción de la biblioteca (Audic y Claverie, 1997). Muchas colecciones de ESTs se han generado a partir de bibliotecas no normalizadas por lo que pueden ser usadas para realizar este tipo de análisis. Sin embargo, en nuestro caso esto no ha sido posible ya que la sustracción incluye un paso de normalización que intenta igualar la abundancia de los cDNA diferencialmente expresados que codifican genes que se expresan frecuente e infrecuentemente, permitiendo que los cDNA de genes menos abundantes también sean identificados (Diatchenko et al., 1996; Mahalingam et al., 2003).

A pesar de que las ESTs obtenidas de las bibliotecas Drought1 y Drought2 no pueden ser utilizadas para determinar genes implicados en la respuesta a estrés hídrico a través de sus niveles de expresión, su comparación con el total de la colección ha permitido determinar que entre los 27551 unigenes del total de la colección existe un grupo formado por 71 unigenes de Drought1 y 515 unigenes de Drought2 que son unigenes específicos de cada una de estas dos bibliotecas (Figura 12). Entendemos por específicos, unigenes que han sido encontrados sólo en Drought1 y Drought2, con respecto a las 52 bibliotecas de la colección. Dentro de este

grupo de unigenes podrían encontrarse genes muy específicos de la respuesta a estrés hídrico, ya que ante una colección de bibliotecas donde gran número de ellas procede de tejidos sometidos a estreses bióticos y abióticos, estos unigenes únicamente aparecen en las construidas a partir de tejidos sometidos a estrés hídrico. Sin embargo, hay que destacar que el número podría ser mucho mayor ya que por ejemplo, un unigen que apareciera en una biblioteca construida con tejido vegetativo y también en una de estrés hídrico no sería clasificado como específicos de estrés hídrico.

La clasificación funcional de los unigenes específicos de Drought1 y Drought2 se ha realizado en base a la función de la proteína más similar de *Arabidopsis* obtenida tras un *BLASTX* contra el conjunto completo de proteínas de *Arabidopsis* obtenido del TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*, <http://www.arabidopsis.org>). Entre los genes de ambas bibliotecas existe un gran grupo que ya han sido relacionados con la respuesta a estrés hídrico mientras que de otros se desconoce su función en los mecanismos de respuesta a estrés. A continuación se destacan algunos de los genes de cada una de las bibliotecas.

### **Drought1 (Tabla 1)**

A continuación se destacan algunos de los unigenes específicos de la biblioteca Drought1 involucrados en procesos de respuesta a estrés hídrico.

Las poliaminas (espermidina, espermina, putrescina) y las enzimas de su ruta de síntesis, como la S-adenosil- metionina descarboxilasa (SAMDC) presente en Drought1 (aCL368Contig3, AT3G02470), se acumulan en plantas sometidas a varios estreses ambientales como temperaturas bajas y altas (Hummel et al., 2004), salinidad (Maiale et al., 2004) y estrés hídrico (Capell et al., 2004; Kasukabe et al., 2004; Ma et al., 2005). Las plantas con gran capacidad de síntesis de poliaminas resisten mejor a condiciones de sequía (Yang et al., 2007). La modulación de la ruta de síntesis en plantas transgénicas incrementa la tolerancia a estrés hídrico (Capell et al., 2004; Kasukabe et al., 2004). No se conoce con exactitud el mecanismo por el cual las poliaminas confieren tolerancia a sequía pero se cree que pueden unirse a los componentes de la membrana y estabilizarla bajo condiciones de estrés jugando un papel osmoprotector (Smith, 1985; Szegletes et al., 2000). También se ha observado cierta actividad antioxidante (Bouchereau et al., 1999; Liu et al., 2004).

Otro de los unigenes presente en la biblioteca Drought1 es la 1-deoxi-D-xilulosa 5-reductoisomerasa (DXR) (aC18007C06Rv\_c, AT5G62790), una enzima de la ruta DOXP/MEP (1-dioxi-D-xilulosa-5-fosfato/Metileritritol 4-fosfato) de biosíntesis de isopentenil difosfato (IPP) en el cloroplasto (Carretero-Paulet et al., 2002). El IPP es el precursor de la gran familia de los terpenos, algunos de los cuales se acumulan bajo condiciones de estrés hídrico (Munne-Bosch y Alegre, 2000; Bouvier et al., 2005).

La proteasa FtsH (aCL7717Contig1, AT1G06430) se encuentra localizada en la membrana de los tilacoides y se la relaciona con la degradación de proteínas no ensambladas en el cloroplasto (Ostersetzer, 1997) y con la degradación de la proteína D1 del centro de reacción del fotosistema II (PSII) durante su reparación tras la fotoinhibición (Lindahl, 2000; Bailey, 2002; Sakamoto, 2002). También se sitúa en el cloroplasto la proteína de unión a la clorofila a/b tipo ELIP (aC18017H11, aC18002D07, AT4G14690), involucrada en la fotoprotección. En periodos de estrés hídrico el cierre de estomas reduce la entrada de CO<sub>2</sub> dificultando que se disipe toda la energía absorbida por lo que los mecanismos que evitan o reparan el daño producido por un exceso en la absorción de luz en el aparato fotosintético se activan (Yang et al., 2006; Galmes et al., 2007).

También esta presente en esta biblioteca el gen *VND2* que codifica un factor de transcripción con dominio NAC. Estas proteínas constituyen una amplia familia de factores de transcripción específicos de plantas implicados en programas de desarrollo y respuesta a estreses bióticos y abióticos. La sobreexpresión de algunos miembros

de esta familia en *Arabidopsis* muestra un aumento en la tolerancia a sequía (Tran et al., 2004).

Cabe destacar 52 unigenes (Tabla supl. 1) que no tienen homología con ningún gen presente en las bases de datos o que su homólogo de *Arabidopsis* es de función desconocida. Entre este grupo de genes podrían estar nuevos genes de respuesta a estrés hídrico.

**Tabla 1. Unigenes específicos de Drought1 (Hoja). Clasificación funcional.**

Categoría Funcional	Código CFGP	Homólogo de <i>Arabidopsis</i>	
		Código	Función (nombre del gen)
<b>Metabolismo</b>			
	aCL368Contig3	AT3G02470.2	S-Adenosil metionina descarboxilasa (SAMDC)
	aCL9337Contig1	AT5G51260.1	Fosfatasa ácida
	aC18007C06Rv_c	AT5G62790.1	1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (DXR)
<b>Síntesis, plegamiento y degradación de proteínas</b>			
	aCL8595Contig1	AT1G74310.1	Proteína de choque térmico ( <i>HSP101</i> )
	aCL7817Contig1	AT4G17740.1	Proteasa de procesado del C-terminal
	aCL7717Contig1	AT1G06430.1	FtsH proteasa (FTSH8)
<b>Defensa antimicrobiana y antihervíboros</b>			
	aC18014E06Rv_c	AT5G12140.1	Inhibidor de proteasas de serina
<b>Factores de transcripción</b>			
	aC18017F08Rv_c	AT4G36160.1	Factor de transcripción con dominio NAC (nascent polypeptide-associated complex) ( <i>VND2</i> )
<b>Proteínas kinasas y fosfatasas</b>			
	aC18017F09Rv_c	AT3G01510.1	Subunidad beta de la proteína kinasa dependiente de 5'-AMP (AMPK)
<b>Transportadores</b>			
	aC18003A11Rv_c	AT1G73700.1	Proteína de la familia MATE
	aC18001E09Rv_c	AT3G13050.1	Transportador de azúcares
<b>Fotosíntesis</b>			
	aC18017H11Rv_c	AT4G14690.1	Proteína de unión a clorofila a/b tipo ELIP ( <i>ELIP2</i> )
	aC18002D07Rv_c	AT4G14690.1	Proteína de unión a clorofila a/b tipo ELIP ( <i>ELIP2</i> )
<b>Miscelanea</b>			
	aC18003F02Rv_c	AT2G01540.1	Proteína con dominio C2
	aC18010B05Rv_c	AT3G44880.1	Proteína con dominio Rieske (2Fe-2S) ( <i>ACD1</i> , accelerated cell death 1)
	aC18013F05Rv_c	AT4G36690.1	Factor auxiliar U2 snRNP (U2 small nuclear ribonucleoprotein), subunidad grande
	aC18017D10Rv_c	AT5G01300.1	Proteína de unión a fosfatidiletanolamina
	aC18017F12Rv_c	AT5G09820.1	Fibrilina PAP (plastid-lipid associated protein)
	aC18002E01Rv_c	AT5G63950.1	Helicasa tipo SNF2

**Drought2 (Tabla 2)**

La biblioteca Drought2 ha sido construida a partir de raíces de plantas sometidas a estrés hídrico. En ella encontramos un amplio grupo de unigenes codificantes de varias glicosil hidrolasas (carbohidrolasas) pertenecientes a las familias 1, 3, 17, 18, 28 y 77 (aC18012G12Rv\_c, AT5G20950; aC18011D12Rv\_c, AT3G62710; aC18004D03Rv\_c, AT3G18080; aC18020D10Rv\_c, AT1G02850; aC18022A08Rv\_c, AT5G16580; aC18019C05Rv\_c, AT3G57270; aC18009A05Rv\_c, AT4G19800; aC18008C05Rv\_c, AT3G57790; aC18025H08Rv\_c, AT2G40840). Las glicosil hidrolasas son el grupo más numeroso de proteínas de la pared celular y muchas de ellas están involucradas en la degradación de polisacáridos de la pared (Minic y Jouanin, 2006). Están presentes también, varios unigenes que codifican la proteína Citocromo P450 monooxigenasas (aCL5541Contig1, AT5G25130; aC18018E10Rv\_c, AT5G06900; aC18016A02Rv\_c, AT3G26180). Se ha comprobado que en *Arabidopsis* muchos miembros de esta extensa familia, entre los que se encuentran los tres presentes en Drought2, se inducen bajo diversas condiciones de estrés biótico y abiótico, incluido el estrés hídrico (Narusaka et al., 2004). Otro de los unigenes específicos de Drought2 es un unigen similar a la enzima bifuncional lisina-cetoglutarato reductasa/sacaropina deshidrogenasa (LKR/SDH) (aCL9153Contig1, AT4G33150) que actúa en la degradación de la lisina produciendo glutamato y acetil-CoA. El glutamato se considera el mayor precursor de metabolitos como prolina, arginina, poliaminas, etc que la planta suele acumular tras un periodo de estrés abiótico (Galili et al., 2001). También encontramos un grupo de enzimas que participan de forma general en numerosos procesos metabólicos de la célula como aldehído deshidrogenasa, hidrolasas, transferasas, oxidoreductasas y UDP-glucoronosil/UDP-glucosil transferasa que pueden estar participando en procesos de respuesta a estrés.

**Tabla 2. Unigenes específicos de la biblioteca Drought2 (Raíz). Clasificación funcional.**

Categoría Funcional	Código CFBP	Homólogo de <i>Arabidopsis</i> Código	Función (nombre del gen)
<b>Metabolismo</b>	aC18021F05Rv_c	AT3G52600.2	Invertasa
	aC18023F08Rv_c	AT1G22650.1	Invertasa
	aCL5541Contig1	AT5G25130.1	Citocromo P450
	aC18018E10Rv_c	AT5G06900.1	Citocromo P450
	aC18016A02Rv_c	AT3G26180.2	Citocromo P450
	aC18019A06Rv_c	AT1G20510.2	Coumarato CoA-ligasa
	aC18012D10Rv_c	AT1G44170.2	Aldehído deshidrogenasa ( <i>ALDH3H1</i> )
	aCL9325Contig1	AT1G70980.1	Asparaginil-tRNA sintasa
	aC18004C02Rv_c	AT1G78680.1	Gamma glutamil hidrolasa (AtGGH2)
	aC18012G12Rv_c	AT5G20950.2	Glicosil hidrolasa de la familia 3
	aC18011D12Rv_c	AT3G62710.1	Glicosil hidrolasa de la familia 3
	aC18004D03Rv_c	AT3G18080.1	Glicosil hidrolasa de la familia 1
	aC18020D10Rv_c	AT1G02850.1	Glicosil hidrolasa de la familia 1
	aC18022A08Rv_c	AT5G16580.1	Glicosil hidrolasa de la familia 1
	aC18019C05Rv_c	AT3G57270.1	Glicosil hidrolasa de la familia 17 ( <i>BG1</i> )
	aC18009A05Rv_c	AT4G19800.1	Glicosil hidrolasa de la familia 18
	aC18008C05Rv_c	AT3G57790.1	Glicosil hidrolasa de la familia 28
	aC18025H08Rv_c	AT2G40840.1	Glicosil hidrolasa de la familia 77
	aC18012B06Rv_c	AT2G40190.1	Glucosil transferasa 1
	aC18019G01Rv_c	AT1G67880.1	Glucosil transferasa 17
	aC18005G07Rv_c	AT2G31960.1	Glucosil transferasa 48
	aC18005F10Rv_c	AT1G08660.1	Glucosil transferasa 29
	aC18024G12Rv_c	AT4G17770.1	Glucosil transferasa 20
	aC18005G11Rv_c	AT5G02970.1	Hidrolasa
	aC18025C11Rv_c	AT2G23600.1	Hidrolasa
	aC18016B11Rv_c	AT3G56310.1	$\alpha$ -Galactosidasa

aC18009D04Rv_c	AT5G59530.1	Dioxigenasa dependiente del 2-Oxoglutarato similar a la proteína reguladora de la síntesis de etileno E8 de <i>Lycopersicon esculentum</i>
aC18012D12Rv_c	AT4G24000.1	Celulosa sintasa
aC18021E08Rv_c	AT5G44400.1	Reticulina oxidasa (con dominio de unión a FAD)
aCL9153Contig1	AT4G33150.2	Enzima bifuncional lisina-cetoglutarato/sacaropina deshidrogenasa ( <i>LKR/SDH</i> ).
aC18025E12Rv_c	AT2G36790.1	UDP-glucuronosil/UDP-glucosil transferasa
aC18018H12Rv_c	AT3G02100.1	UDP-glucuronosil/UDP-glucosil transferasa
aC18012H09Rv_c	AT1G22360.2	UDP-glucuronosil/UDP-glucosil transferasa
aC18023F07Rv_c	AT4G34240.1	Aldehído deshidrogenasa ( <i>ALDH3</i> )
aC18006E08Rv_c	AT1G43620.2	UDP-glucosa:esterol glucosil transferasa
aC18012G04Rv_c	AT2G34590.1	Transcetolasa
aCL7490Contig1	AT3G20020.1	Arginina N-metiltransferasa
aC18009B08Rv_c	AT3G48720.1	Transferasa
aC18024F04Rv_c	AT3G48720.1	Transferasa
aC18018B07Rv_c	AT2G23820.1	Fosfohidrolasa con dominio HD
aC18011E05Rv_c	AT5G40270.1	Fosfohidrolasa con dominio HD
aC18004A03Rv_c	AT3G10970.2	Haloácido dehalogenasa hidrolasa
aC18011E08Rv_c	AT5G10460.1	Haloácido dehalogenasa hidrolasa
aCL6554Contig1	AT5G20250.3	$\alpha$ -Galactosidasa alcalina
aC18016F02Rv_c	AT4G00240.1	Fosfolipasa (PLDBTA 2)
aC18022G12Rv_c	AT1G34200.1	Oxidoreductasa
aC18020G12Rv_c	AT3G04650.1	Oxidoreductasa
aC18024E07Rv_c	AT1G12780.1	UDP-glucosa epimerasa
aC18019D08Rv_c	AT1G12780.1	UDP-glucosa epimerasa
aC18004H01Rv_c	AT3G22370.1	Oxidasa alternativa mitocondrial 1a (AOX1A)
aC18015A03Rv_c	AT5G24530.1	Oxigenasa 2OG-Fe(II)
aC18022B11Rv_c	AT4G02780.1	Copail difosfato sintasa (GPS)
aCL5149Contig1	AT1G76290.1	Sintetasa y ligasa dependiente de AMP
aC18025A12Rv_c	AT1G69820.1	Gamma-glutamiltanspeptidasa (GGT)
aC18006H02Rv_c	AT1G31860.1	Proteína bifuncional de la biosíntesis de histidina (HISIE) fosforibosil-ATP pirofosfohidrolasa/fosforibosil-AMP ciclohidrolasa
aC18023C06Rv_c	AT4G34030.1	3-metilcrotonil-CoA carboxilasa 2 (MCCB)
aC18024D10Rv_c	AT1G76150.1	Deshidratasa maoc
aC18020F01Rv_c	AT2G28760.1	Porteína de la familia de las epimerasas/dehidratasas dependientes de NAD parecida a la decarboxilasa del ácido UDP-glucurónico Uxs1p de <i>Filobasidiella neoformans</i>
aC18006B01Rv_c	AT5G28840.1	Porteína de la familia de las epimerasas/dehidratasas dependientes de NAD parecida a la epimerasa de azúcar BimG de <i>Streptomyces verticillus</i>
aC18025H03Rv_c	AT5G10870.1	Chorimato mutasa (CM2)
aC18022D09Rv_c	AT3G29320.1	Glucan fosforilasa
aC18019B07Rv_c	AT5G13930.1	Chalcona sintasa
aC18016F11Rv_c	AT1G02400.1	Giberelina 2-oxidasa
aCL8541Contig1	AT3G27890.1	NAD(P)H:quinona reductasa
aC18015A06Rv_c	AT3G30841.1	Fosfoglicerato mutasa independiente de 2,3-difosfoglicerato
aC18016G02Rv_c	AT3G14270.1	Fosfatidilinositol-4-fosfato 5-kinasa
aC18015C09Rv_c	AT3G43220.1	Fosfoinositido fosfatasa
aC18005C06Rv_c	AT5G40290.1	Fosfohidrolasa dependiente de metal con dominio HD

#### Síntesis, plegamiento y degradación de proteínas

aC18024C08Rv_c	AT5G37290.1	Proteína con repeticiones armadillo/beta catenina
aCL8822Contig1	AT1G10560.1	Proteína con repeticiones armadillo/beta catenina
aC18019F08Rv_c	AT1G28210.1	Proteína de choque térmico (HSP) parecida a J1
aC18011H01Rv_c	AT3G08910.1	Proteína de choque térmico (HSP)
aC18005G06Rv_c	AT4G16660.1	Proteína de choque térmico ( <i>HSP70</i> )
aC18018D04Rv_c	AT2G02240.1	Proteína de la familia F-box
aC18019F03Rv_c	AT3G23990.1	Chaperonina ( <i>CPN60</i> )
aC18022E09Rv_c	AT2G19730.2	Proteína ribosomal L28 ( <i>RPL28C</i> ), subunidad 60S
aC18024A01Rv_c	AT1G25260.1	Proteína ácida ribosomal P0 (RPP0C), subunidad 60S
aC18019D02Rv_c	AT1G66670.1	Proteasa dependiente de ATP, subunidad proteolítica (ClpP3)
aCL8528Contig1	AT5G10770.1	Aspartil proteasa
aC18022A07Rv_c	AT1G09730.1	Ulp1 proteasa
aC18006A05Rv_c	AT2G24640.1	Ubiquitina hidrolasa carboxi-terminal
aC18019F10Rv_c	AT4G10570.1	Ubiquitina hidrolasa carboxi-terminal
aC18025D04Rv_c	AT3G61415.1	Ubiquitina ligasa <i>ASK21</i> ( <i>Arabidopsis</i> SKP1-like 21)
aC18019F05Rv_c	AT3G52590.1	UBQ1 (Ubiquitin extension protein 1) / Proteína ribosomal L40, subunidad 60S ( <i>RPL40B</i> )
aC18020B09Rv_c	AT1G50670.1	Cisteína proteasa OTU
aC18025B07Rv_c	AT5G56280.1	Signalosoma COP9 (CSN), subunidad 6
aC18011H09Rv_c	AT5G22860.2	Carboxipeptidasa de tipo serina S28
aC18008B05Rv_c	AT1G73300.1	Carboxipeptidasa de tipo serina SCPL2
aC18004B04Rv_c	AT3G17180.1	Carboxipeptidasa de tipo serina SCPL33
aC18021E12Rv_c	AT5G49030.2	Isoleucil-tRNA sintetasa
aC18024B09Rv_c	AT3G19380.1	Proteína con dominio U-box
aC18015F01Rv_c	AT3G11950.1	Preniltransferasa

## IV. Resultados y discusión

### Antioxidantes y detoxificantes

aC18011D05Rv_c	AT1G53680.1	Glutación S-transferasa
aC18020H12Rv_c	AT4G11600.1	Glutation peroxidasa 6 ( <i>ATGPX6</i> )
aC18019E01Rv_c	AT1G08570.1	Tioredoxina
aC18018B06Rv_c	AT1G08830.1	Superoxido dismutasa (CSD1)

### Proteínas LEA (Late embryogenesis abundant protein)

aC18012G10Rv_c	AT5G44310.1	Proteína LEA
aC18009E10Rv_c	AT3G53040.1	Proteína LEA del grupo 3

### Osmolitos

aCL6683Contig1	AT4G01970.1	Estaquiosa sintasa
aC18006G01Rv_c	AT4G01970.1	Estaquiosa sintasa
aCL4483Contig1	AT5G20250.1	Rafinosa sintasa
aC18008A07Rv_c	AT5G40390.1	Rafinosa sintasa
aC18018D03Rv_c	AT5G40390.1	Rafinosa sintasa

### Defensa antimicrobiana y antihervíboros

aC18020A06Rv_c	AT1G15890.1	Proteína de resistencia a enfermedades (clase CC-NBS-LRR)
aC18016E08Rv_c	AT1G59780.1	Proteína de resistencia a enfermedades (clase CC-NBS-LRR)
aC18025F01Rv_c	AT1G61300.1	Proteína de resistencia a enfermedades (clase NBS-LRR)
aC18011E12Rv_c	AT5G17680.1	Proteína de resistencia a enfermedades (clase TIR-NBS-LRR)
aC18009F02Rv_c	AT3G11080.1	Proteína de resistencia a enfermedades con dominios ricos en repeticiones de leucina
aC18008B06Rv_c	AT3G11080.1	Proteína de resistencia a enfermedades con dominios ricos en repeticiones de leucina
aC18016E06Rv_c	AT1G67560.1	Lipoxigenasa
aC18011C01Rv_c	AT5G43580.1	Inhibidor de proteasas
aCL9343Contig1	AT4G21960.1	Peroxidasa 42 ( <i>PER42</i> )
aC18008E05Rv_c	AT5G43570.1	Inhibidor de proteasas de serina

### Factores de transcripción

aC18020D12Rv_c	AT3G11440.1	Factor de transcripción de la familia myb ( <i>MYB65</i> )
aC18004B12Rv_c	AT4G21440.1	Factor de transcripción de la familia myb ( <i>MYB102</i> )
aCL8980Contig1	AT4G21440.1	Factor de transcripción de la familia myb ( <i>MYB102</i> )
aCL2843Contig1	AT3G30210.1	Factor de transcripción de la familia myb ( <i>MYB121</i> )
aC18020E06Rv_c	AT3G24310.1	Factor de transcripción de la familia myb
aC18025B08Rv_c	AT3G24310.1	Factor de transcripción de la familia myb
aC18021G10Rv_c	AT1G48000.1	Factor de transcripción de la familia myb
aC18009C01Rv_c	AT1G03190.2	Factor de transcripción de la familia myb
aC18022H12Rv_c	AT1G78280.1	Factor de transcripción con dominio jumonji ( <i>jmjC</i> )
aC18018F01Rv_c	AT3G27330.1	Proteína de la familia de dedos de zinc (C3HC4-type)
aC18009H04Rv_c	AT1G24580.1	Proteína de la familia de dedos de zinc (C3HC4-type)
aC18016G11Rv_c	AT1G62975.1	Proteína de la familia bHLH (basic helix-loop-helix) ( <i>bHLH125</i> )
aC18024C07Rv_c	AT5G28650.1	Factor de transcripción de la familia WRKY ( <i>WRKY3</i> )
aC18019C08Rv_c	AT5G18830.2	Proteína de unión al promotor squamosa ( <i>SLP7</i> )

### Proteínas kinasas y fosfatasa

aC18011E11Rv_c	AT1G09020.1	Proteína kinasa
aC18009B12Rv_c	AT1G35710.1	Proteína kinasa transmembrana rica en repeticiones de leucina
aC18019A04Rv_c	AT5G63710.1	Proteína kinasa transmembrana rica en repeticiones de leucina
aC18005E07Rv_c	AT3G22750.1	Proteína kinasa ( <i>ATMRK1</i> )
aC18020H01Rv_c	AT4G14780.1	Proteína kinasa ( <i>ATMRK1</i> )
aC18005B10Rv_c	AT1G16670.1	Serina/ treonina proteína kinasa
aC18004B10Rv_c	AT5G24010.1	Proteína kinasa
aC18023B10Rv_c	AT3G16030.1	Lectina proteína kinasa
aC18023G09Rv_c	AT5G35370.1	Lectina proteína kinasa
aC18022E10Rv_c	AT1G10940.2	Serina/ treonina proteína kinasa
aC18008C06Rv_c	AT1G10940.2	Serina/ treonina proteína kinasa
aC18012F07Rv_c	AT3G26020.2	Serina/ treonina proteína kinasa 2A ( <i>PP2A</i> )
aC18021B10Rv_c	AT4G21940.1	Proteína kinasa dependiente de calcio
aC18019F11Rv_c	AT3G25490.1	Proteína kinasa asociada a la pared 4
aC18005F07Rv_c	AT2G47920.1	Proteína intrerantante con kinasas
aC18025F05Rv_c	AT3G23310.1	Proteína kinasa
aC18008E04Rv_c	AT1G10210.2	Proteína kinasa ( <i>MPK1</i> )
aC18009G08Rv_c	AT3G21870.1	Proteína kinasa dependiente de ciclina ( <i>CDK</i> )
aC18009B07Rv_c	AT3G51370.2	Fosfatasa 2C ( <i>PP2C</i> )
aCL9046Contig1	AT3G51270.1	Serina/ treonina proteína kinasa precisa a RIO1
aC18009G03Rv_c	AT4G03080.1	Serina/ treonina fosfoesterasa con repeticiones kelch
aC18008G02Rv_c	AT1G07990.1	Proteína de la familia de proteínas que se asocian a SIT4 fosfatasa

**Transportadores**

aCL5587Contig1	AT2G48020.1	Transportador de azúcares
aCL854Contig1	AT2G35740.1	Transportador de azúcares
aC18015H11Rv_c	AT1G08920.3	Proteína de respuesta rápida a la deshidratación (ERD6)/Transportador de azúcares
aC18024B01Rv_c	AT4G00900.1	ATPasa transportadora de calcio ( <i>ECA2</i> )
aC18011G12Rv_c	AT3G22910.1	ATPasa transportadora de calcio ( <i>ACA13</i> )
aC18021G04Rv_c	AT4G29900.1	ATPasa transportadora de calcio ( <i>ACA10</i> )
aC18025A06Rv_c	AT5G57110.2	ATPasa transportadora de calcio ( <i>ACA8</i> )
aC18019G11Rv_c	AT2G07560.1	ATPasa 6 de la membrana plasmática ( <i>AHA6</i> )
aC18008E02Rv_c	AT1G33110.1	Proteína de la familia MATE
aC18012B12Rv_c	AT5G60780.1	Transportador transmembrana de nitrato ( <i>NRT2</i> )
aC18012B11Rv_c	AT1G67300.2	Transportador de hexosa
aC18005D05Rv_c	AT3G43790.2	Transportador de carbohidratos/portador de azúcar (ZIFL2, zinc induced facilitator-like 2)
aC18021E02Rv_c	AT1G30400.2	ATPasa transportadora de Glutation S-conjugado
aC18012A05Rv_c	AT4G39080.1	ATPasa transportadora de protones, subunidad VHA-a isoforma 3
aC18005A07Rv_c	AT1G47530.1	Poteína de la familia MATE sensible a la maduración
aC18021E03Rv_c	AT1G47530.1	Poteína de la familia MATE sensible a la maduración
aC18004G03Rv_c	AT5G26240.1	Canal de cloro (CLC-d)
aC18018E02Rv_c	AT4G01010.1	Canal de iones ( <i>ATCNGC13</i> )
aC18015B03Rv_c	AT1G15690.1	Pirofosfatasa bombeara de protones de la membrana vacuolar
aC18020A07Rv_c	AT3G14810.1	Proteína con un dominio de canal de iones tipo MS
aC18020E02Rv_c	AT5G58970.1	Proteína desacoplante ( <i>UCP2</i> )
aC18005H02Rv_c	AT2G17260.1	Canal de glutamato ( <i>GLR2</i> )

**Fotosíntesis**

aCL2189Contig2	AT5G05370.1	Proteína de unión a la ubiquinona de complejo ubiquinol citocromo C reductasa
----------------	-------------	---

**Miscelanea**

aC18016G07Rv_c	AT1G02690.1	Importina, subunidad alpha-2
aC18023B07Rv_c	AT1G76970.1	Proteína con dominio VHS y GAT (Transporte, aparato de golgi)
aC18011G08Rv_c	AT3G18820.1	RAB GTPasa (RAB7) (transporte vesicular)
aC18018H09Rv_c	AT2G21520.1	Transportador de fosfogliceraldehidos
aC18020D09Rv_c	AT5G28830.1	Proteína de unión a calcio con dominio EF
aC18006D07Rv_c	AT5G09410.1	Proteína de unión a calmodulina
aC18021C03Rv_c	AT2G43680.1	Proteína de unión a calmodulina
aC18022F06Rv_c	AT5G10230.1	Anexina 7 ( <i>ANN7</i> )
aC18005E02Rv_c	AT5G49430.1	Proteína con repeticiones WD-40 de la familia de la transducina
aC18019E12Rv_c	AT5G10940.1	Proteína con repeticiones WD-40 de la familia de la transducina
aC18019G05Rv_c	AT5G05570.1	Proteína con repeticiones WD-40 de la familia de la transducina
aC18018F03Rv_c	AT2G47410.1	Proteína con repeticiones WD-40 de la familia de la transducina
aC18019A01Rv_c	AT4G34280.1	Proteína con repeticiones WD-40 de la familia de la transducina
aC18018H10Rv_c	AT4G15820.1	Proteína de respuesta a daño mecánico
aC18011F08Rv_c	AT3G61170.1	Proteína que contiene repeticiones del motivo pentatricopeptido (PPR)
aC18015F08Rv_c	AT1G31790.1	Proteína que contiene repeticiones del motivo pentatricopeptido (PPR)
aC18023E01Rv_c	AT1G11290.1	Proteína que contiene repeticiones del motivo pentatricopeptido (PPR)
aC18025C05Rv_c	AT1G03560.1	Proteína que contiene repeticiones del motivo pentatricopeptido (PPR)
aC18016G10Rv_c	AT1G62670.1	Proteína que contiene repeticiones del motivo pentatricopeptido (PPR)
aC18021F06Rv_c	AT1G12970.1	Proteína de la familia con repeticiones ricas en leucina (LRR)
aC18015E05Rv_c	AT1G58190.1	Proteína de la familia con repeticiones ricas en leucina (LRR)
aC18004E10Rv_c	AT1G79650.2	Proteína de reparación de DNA ( <i>RAD23</i> )
aCL4250Contig1	AT2G34355.1	Nodulina con 14 dominios transmembrana
aC18022A12Rv_c	AT5G59210.1	Miosina
aC18019A12Rv_c	AT2G26210.1	Proteína con repeticiones de ankirina
aC18012E06Rv_c	AT2G45140.1	Proteína de membrana asociada a la vesícula (VAMP)
aC18011D06Rv_c	AT1G23240.1	Caleosina
aC18006F12Rv_c	AT4G14760.1	Proteína con repeticiones M
aC18023C01Rv_c	AT4G31900.1	Factor de reconstrucción de cromatina (CHD3)
aC18004B08Rv_c	AT2G37680.1	Componente de transducción de la señal específico del fitocromo A (PAT3)
aC18023A05Rv_c	AT3G54350.2	Proteína con dominio FHA
aC18011E09Rv_c	AT3G20270.2	Glicoproteína del suero de unión a lípidos
aC18018H11Rv_c	AT4G09150.1	Proteína 11 del complejo-T
aC18012B08Rv_c	AT3G17550.1	Factor de interacción con NLI (NIF) (fosfatasa??)
aC18016G09Rv_c	AT4G21980.1	Autofago 8a (APG8a) (component of autophagy conjugation pathway)
aC18020H10Rv_c	AT3G09560.1	Lipina
aC18015D11Rv_c	AT2G28540.1	Proteína con motivo RRM de reconocimiento de RNA
aC18016B10Rv_c	AT5G09880.1	Proteína con motivo RRM de reconocimiento de RNA
aC18025F02Rv_c	AT1G74820.1	Cupina
aC18016G04Rv_c	AT1G17470.1	Proteína de unión a GTP (DRG1)

## IV. Resultados y discusión

aC18020A11Rv_c	AT1G48050.1	Proteína Ku80
aC18016A04Rv_c	AT3G46960.1	ATP-helicasa parecida a HEN2 (HUA ENHANCER 2)
aC18023H12Rv_c	AT3G54280.1	Helicasa tipo SNF2
aC18020F09Rv_c	AT2G27110.3	FRS3 (FAR1-RELATED SEQUENCE 3) (far-red impaired responsive family protein)
aC18024E04Rv_c	AT3G58140.1	Fenilalanina-tRNA sintetasa, clase IIc
aC18009A10Rv_c	AT5G35200.1	Proteína con dominio similar a epsin en el extremo N-terminal (ENTH)
aC18008B09Rv_c	AT5G08630.1	Proteína con dominio DDT
aCL6827Contig1	AT5G20360.1	Proteína con dominio octicosapeptido/Phox/Bem1p (PB1)
aC18011D11Rv_c	AT2G02560.2	Homólogo de la proteína humana CAND1
aC18024B04Rv_c	AT4G37000.1	Acelerador de la muerte celular 2 (ACD2)
aC18015C02Rv_c	AT4G27700.1	Proteína con un dominio similar al de la rodanesa
aC18024D04Rv_c	AT2G43410.1	FPA, regulador de la floración
aC18024C11Rv_c	AT4G39660.1	Alanina:glicosilato aminotransferasa 2 (AGT2)
aC18022F11Rv_c	AT5G13200.1	Proteína de respuesta a ABA con dominio tipo GRAM
aC18018B05Rv_c	AT5G48600.1	Proteína SMC (structural maintenance of chromosomes) (ATSMC3)
aC18009H09Rv_c	AT2G27170.1	Cohesina (SMC3, TITAN7)
aC18019D04Rv_c	AT4G17030.1	Expansina
aC18023C10Rv_c	AT4G17030.1	Expansina
aC18025E03Rv_c	AT1G12470.1	Pep3/Vps18
aC18004D05Rv_c	AT2G40110.2	Proteína de la familia yippe
aC18025B06Rv_c	AT5G61020.2	ECT3 (evolutionary conserved C-terminal 3)
aC18016D06Rv_c	AT3G03120.1	Factor de ribosilación ADP. Miembro de la familia de ARF GTPasas.
aC18022C12Rv_c	AT2G33385.1	Proteína relacionada con la actina C2B (ARPC2B)
aC18004B07Rv_c	AT1G55760.1	Proteína con dominio BTB/POZ
aC18019H11Rv_c	AT3G63420.2	Proteína heterotrimerica unida a GTP, subunidad gamma (AGG1)
aC18015A06Rv_c	AT3G30841.1	Fosfoglicerato mutasa independiente de 2,3-difosfoglicerato
aC18015F07Rv_c	AT3G06520.1	Proteína con dominio agenet
aC18004C04Rv_c	AT5G47530.1	Proteína de respuesta a auxina
aC18020G11Rv_c	AT2G33410.1	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea (hnRNP)
aC18012E01Rv_c	AT5G27430.1	Peptidasa de señal de secreción
aC18004A06Rv_c	AT1G65660.1	Proteína de la familia de dedos de zinc (CCCH-type)
aC18025A11Rv_c	AT2G21150.1	Proteína de la familia XAP5
aCL3328Contig2	AT1G14210.1	Ribonucleasa T2
aC18024F09Rv_c	AT4G30330.1	Ribonucleoproteína nuclear pequeña E (snRNP-E)
aC18012F04Rv_c	AT4G38030.1	Liasa

Entre los numerosos genes que se encuentran dentro de esta biblioteca cabe destacar un gran número de genes implicados en la degradación de proteínas. Durante el periodo de estrés se producen alteraciones en su estructura (desnaturalización) que aumentan el número de ellas que no pueden realizar correctamente su función. Entre los genes involucrados en los procesos de degradación presentes en la *Drought2*, encontramos las ubiquitinas, proteínas de la familia F-box, proteasas y carboxipeptidasas. Por otro lado, la planta también activa mecanismos para que las proteínas mantengan o recuperen su conformación funcional a través de proteínas como las HSP (*heat shock proteins*) o las chaperonas (Wang et al., 2004).

Otro proceso importante que se produce tras un periodo de sequía es la acumulación de osmolitos. En este caso cabe destacar la presencia entre los unigenes de esta biblioteca de dos unigenes que codifican las enzimas de la ruta de síntesis de RFOs, la rafinosa sintasa y estaquiosa sintasa. En *Arabidopsis* se ha detectado la acumulación de los oligosacáridos rafinosa y galactinol, en plantas sometidas a estrés hídrico. La sobreexpresión de galactinol sintasa, otra enzima de la ruta de síntesis de RFOs, en plantas transgénicas de *Arabidopsis* incrementa los niveles de rafinosa y galactinol aumentando su tolerancia a estrés hídrico. Por todo ello se cree que estos compuestos podrían actuar como osmoprotectores además de estar involucrados en el ajuste osmótico (Taji et al., 2002).

Las respuestas a estrés están reguladas por múltiples rutas de señalización a través de las cuales se produce la transducción de la señal de respuesta. Entre los unigenes de *Drought 2* encontramos varios genes codificantes de ATPasa transportadoras de  $Ca^{2+}$ . El calcio actúa como una molécula señalizadora de forma que el aumento en los niveles de calcio en el citosol, provocado por señales externas induce varias respuestas fisiológicas. El mantenimiento de bajos niveles de calcio a través de la activación de las ATPasa transportadoras de  $Ca^{2+}$  permite que este

funcione como molécula señalizadora (Pittman et al., 1999; Chinnusamy et al., 2004). Formando parte también de las rutas de transducción de la señal tenemos los factores de transcripción y las proteínas kinasas y fosfatasa, dos grupos ampliamente representados entre los genes de la biblioteca Drought2. Destacando un grupo numeroso de factores de transcripción de la familia myb. Algunos miembros de esta familia han sido relacionados con la respuesta a estrés por sequía formando parte de la ruta de señalización dependiente de ABA (Urao et al., 1993; Abe et al., 2003; Denekamp y Smeekens, 2003; Boudsocq y Lauriere, 2005).

La membrana es uno de los puntos de la célula donde se detecta mayor actividad durante un periodo de estrés. El intercambio de todo tipo de compuestos a través de los transportadores de la membrana permite a la célula mantener las condiciones internas adecuadas para poder sobrevivir. En Drought 2 encontramos varios transportadores como las proteínas de la familia MATE y la ATPasa transportadora de glutatión S-conjugado. Estos dos transportadores permiten la expulsión de sustancias tóxicas para la célula. También esta presente entre los genes encontrados la Glutatión S-transferasa, que es la enzima que cataliza la reacción entre el glutatión y el sustrato que ha de ser eliminado (Marrs et al., 1995).

En este grupo de transportadores también están presentes varios transportadores de azúcar. Las raíces son un conocido sumidero de carbono sobretodo en las zonas de división celular y elongación, donde es conocida la activación de varios transportadores de azúcar (Williams et al., 2000). En condiciones de estrés hídrico las plantas aceleran el crecimiento de sus raíces hacia zonas mas profundas en busca de agua necesitando en estas zonas de la raíz un mayor aporte de energía. Los azúcares no son solo fuente de energía sino que juegan un papel importante como moléculas señalizadoras (Ronald, 2006). Hay evidencias de que factores bióticos y abióticos influyen en la expresión de ciertos transportadores de azucares (Delrot et al., 2000; Chaves y Oliveira, 2004)

Cabe destacar, al igual que ocurría en la biblioteca Drought1, que en la biblioteca Drought2 existen 268 unigenes (Tabla supl. 2) que no tienen homología con ningún gen presente en las bases de datos o que su homólogo de *Arabidopsis* es de función desconocida. Entre este grupo de genes podrían estar nuevos genes de respuesta a estrés hídrico.

### **2.3 Análisis comparativo entre ESTs procedentes de tejidos sometidos a sequía, salinidad y frío**

Estreses ambientales diferentes pueden producir efectos similares en la planta. La sequía, la salinidad y el frío son algunos de los estreses abióticos que más influyen en el crecimiento y productividad de los cultivos. A nivel fisiológico la respuesta de la planta frente a estos factores ambientales está relacionada, sobre todo porque en los tres casos un componente común de la respuesta es debido al estrés osmótico. Como consecuencia, a nivel molecular se produce cierto grado de solapamiento entre los genes involucrados en la respuesta a cada uno de ellos al activarse rutas similares de señalización (Wang et al., 2003; Seki et al., 2003). A través de estudios transcriptómicos se ha detectado que en cebada existe un pequeño grupo de genes que responden bajo condiciones de salinidad y sequía (Ozturk et al., 2002), mientras que en *Arabidopsis* parece que el nivel de coincidencia entre estos dos estreses es mayor que en cebada y a su vez hay más similitudes entre la respuesta entre ellos que entre cualquiera de ellos y el estrés por frío (Seki et al., 2002b). Los mismos resultados se observan en arroz (Rabbani et al., 2003) y en maíz (Zheng et al., 2006).

Un gran número de bibliotecas de la colección del CFGP han sido construidas a partir de plantas sometidas a diferentes estreses bióticos y abióticos. La

comparación de los unigenes procedentes de bibliotecas construidas a partir de plantas sometidas a sequía, salinidad y frío nos puede permitir establecer relaciones entre estos estreses. Por tanto, se han seleccionado tres grupos de bibliotecas construidas a partir de plantas sometidas a estos tres estreses y se ha realizado un estudio comparativo de los unigenes de cada grupo. Las bibliotecas seleccionadas para realizar este estudio han sido:

- Sequía: *Drought1* y *Drought2*, bibliotecas de sustracción de hojas y raíces de plantas sometidas a 5, 10 y 24h de estrés hídrico respectivamente

- Salinidad: *SaltLeaf1*, hojas de plantas sometidas estrés salino moderado. *SLH*, hojas de plantas sometidas a estrés salino prolongado.

- Frío: *FlavFr1*, flavedo de frutos almacenados a 2°C durante 7 y 24 días. *FlavFrSub1*, biblioteca de sustracción de flavedo de frutos almacenados a 2°C y 12°C durante 14 días. *PostharvC1*, flavedo de frutos almacenados a 2°C durante periodos cortos (2, 3.5, 4.5 y 24 horas), medios (9, 14 y 23 días) y largos (28, 42 y 56 días) de frío.

Teniendo presente que los unigenes provienen de clones seleccionados al azar, que los métodos utilizados para la construcción de las bibliotecas que forman parte de cada grupo de estrés son diferentes (sustracción/estándar), y que los tejidos utilizados son muy variados, no es posible establecer el grado de relación entre los tres estreses de forma similar al realizado en los estudios de transcriptómica a través de micromatrices en otras especies (Seki et al., 2002b; Rabbani et al., 2003; Zheng et al., 2006). Sin embargo, existe la posibilidad de detectar ciertos grupos de genes que pueden formar parte de la respuesta específica y común de los cítricos frente sequía, salinidad y frío (Figura 13).

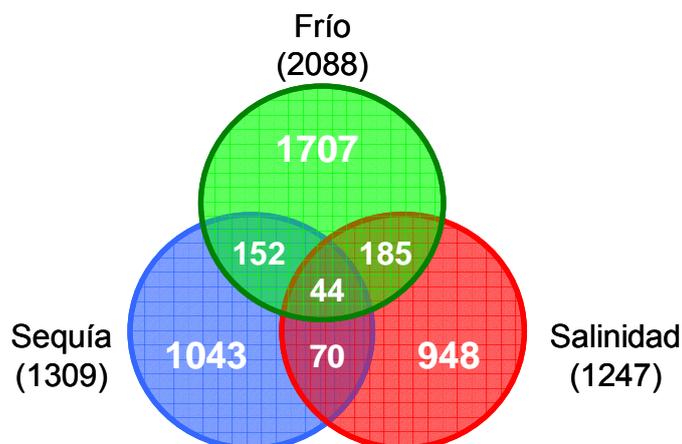


Figura 13. Distribución de los unigenes de los tres grupos de bibliotecas de sequía, salinidad y frío. Los unigenes de sequía provienen de las bibliotecas *Drought1* y *Drought2*, los de salinidad de *SaltLeaf1* y *SLH* y los de frío de *FlavFr1*, *FlavFrSub1* y *PostharvC1* (los unigenes presentes en dos o más bibliotecas del mismo grupo solo se han considerado una vez).

De los tres grupos de bibliotecas de sequía, salinidad y frío, el total de unigenes a comparar ha sido de 1309, 1247 y 2088, respectivamente. Fruto de la comparación entre ellos se ha obtenido un primer grupo de unigenes formado por 1043 unigenes del grupo de sequía, 948 del de salinidad y 1707 del de frío, que solo están presentes bajo estas condiciones de estrés (Tablas suplementarias 15, 16 y 17). Estos unigenes podrían formar parte de la respuesta específica de los cítricos a sequía, salinidad o frío, sin olvidar lo preliminar de esta afirmación, por lo expuesto anteriormente, y porque respecto al total de la colección podrían estar presentes también en otras bibliotecas no utilizadas en esta comparación.

Un segundo grupo lo forman unigenes comunes entre dos grupos de bibliotecas. Se han identificado 152 unigenes comunes entre sequía y frío, 70 entre sequía y salinidad y 185 entre frío y salinidad (Tablas suplementarias 18, 19 y 20). Estos unigenes podrían ser parte de la respuesta común entre cada par de estreses apuntando a que en cítricos, al igual que en otras especies, existe una parte de la respuesta común entre ellos. Por último, existe un grupo formado por 44 unigenes comunes a los tres grupos de bibliotecas (Tabla suplementaria 21) y que podrían formar parte de lo que ha venido a denominarse “respuesta general a estrés”, que incluye un grupo de genes que parecen activarse en la planta independientemente del tipo de estrés que la afecte. Este grupo de unigenes sería de especial interés en la identificación de rutas de señalización comunes entre estreses. En él se incluyen varios genes cuya inducción bajo condiciones de estrés abiótico es ya conocida entre los que podríamos destacar un unigen similar al gen *RD22* de *Arabidopsis* que forma parte de la ruta de respuesta a estrés dependiente de ABA ya que su inducción se produce bajo condiciones de estrés osmótico y ABA y en su promotor presenta una caja conservada que interacciona con los factores de transcripción tipo MYC y MYB que se inducen tras una acumulación de ABA (Abe, 1997, 2003). Otro de los genes que parecen ser comunes a los tres estreses comparados es el *RD26* que codifica un factor de transcripción tipo NAC (Fujita, 2004) que se induce bajo sequía, salinidad, ABA y JA y juega un papel importante en la mediación del cross-talk entre las rutas de señalización por ABA y JA durante las respuestas por sequía y por rotura.

### 3. Estudio del transcriptoma de cítricos bajo condiciones de estrés hídrico con micromatrices de cDNA

Con el fin de conocer la respuesta inicial al estrés hídrico en cítricos se ha planteado un experimento de micromatrices para el análisis del transcriptoma utilizando muestras de hojas y raíces de plantas sometidas a 5, 10 y 24 horas de estrés hídrico. Se ha optado por un método de aplicación rápida de estrés hídrico que ha consistido en el trasplante desde arena húmeda a arena seca (**EH**) (Gomez-Cadenas et al., 1998). Ante la posibilidad de que este método de aplicación de estrés hídrico pudiera introducir un factor adicional de estrés por la posible rotura de las raíces producida durante el trasplante, se ha realizado un experimento adicional que hemos denominado experimento control del trasplante o de rotura (**ER**), en el que las plantas también son transplantadas como las del experimento de estrés hídrico, pero en este caso se realiza el trasplante de arena húmeda a arena húmeda. Este experimento se ha utilizado para determinar genes no específicos de estrés hídrico cuya inducción o represión pudiera ser debida a cualquier otro factor distinto de éste, como por ejemplo, la rotura de las raíces debida al trasplante. En todos los experimentos se ha utilizado la micromatriz de primera generación de 12000 clones del CFGP que contiene aproximadamente 7000 unigenes diferentes.

#### 3.1 Identificación de genes de respuesta a estrés hídrico

Para identificar genes implicados en la respuesta a estrés hídrico se compararon los unigenes inducidos y reprimidos resultantes del experimento de micromatrices de estrés hídrico (**EH**) y del experimento control del trasplante o de rotura (**ER**). El resultado de esta comparación se ilustra en la figura 14 mediante diagramas de Venn. Entendemos por unigenes específicos de estrés hídrico, aquellos que bajo las condiciones de estrés hídrico aplicadas, sólo están respondiendo al

estímulo de estrés hídrico y no a cualquier otro factor controlado por el experimento control o de rotura. Es importante matizar que los genes definidos como específicos de EH en este trabajo, pueden estar regulados bajo otras condiciones de estrés no estimadas por nosotros, ya que no hay que olvidar el gran nivel de “cross talk” existente entre la respuesta a estreses bióticos y abióticos (Bohnert et al., 2006).

Tras la comparación de los resultados de los dos experimentos, se han obtenido en hojas, 571 unigenes específicos inducidos y 488 unigenes específicos reprimidos durante el estrés hídrico (Fig. 14A). En raíces, se han obtenido 287 unigenes específicos inducidos y 89 reprimidos (Fig. 14B). (Tablas suplementarias 3, 4, 5 y 6).

La comparación de los unigenes resultantes de ambos experimentos (EH y ER) también nos ha permitido conocer la existencia de un grupo de genes comunes entre ellos. En el caso de hojas existen 245 unigenes comunes inducidos y 268 unigenes comunes reprimidos (Fig. 14A). En raíces aparecen 141 unigenes comunes inducidos y 51 unigenes comunes reprimidos (Fig.14B) (Tablas suplementarias 7, 8, 9 y 10).

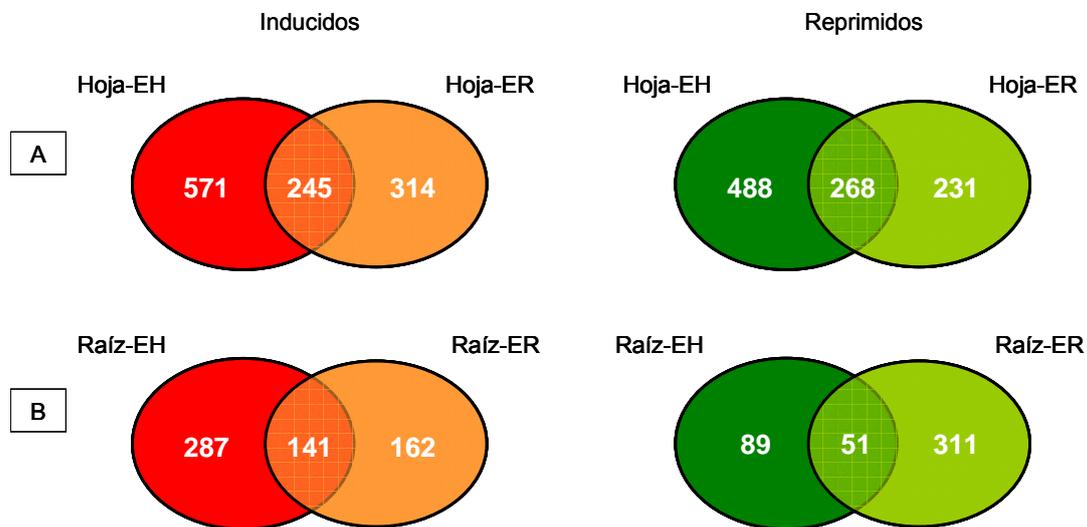


Figura 14. Diagramas de Venn mostrando la distribución de los unigenes inducidos y reprimidos en base a los resultados del experimento de micromatrices. A. Distribución de unigenes inducidos y reprimidos en hojas. B. Distribución de unigenes inducidos y reprimidos en raíces. EH. Experimento de estrés hídrico. ER. Experimento control del transplante o de rotura.

El tercer grupo que se obtiene tras la comparación es el grupo de unigenes específico del experimento control del transplante o de rotura (ER). En este grupo encontramos 314 unigenes inducidos y 231 unigenes reprimidos en hojas (Fig.14A) y 162 unigenes inducidos y 311 reprimidos en raíces (Fig. 14B) (Tablas suplementarias 11, 12, 13 y 14).

Como ya se ha comentado anteriormente, los primeros trabajos que utilizaron el transplante para la aplicación de estrés hídrico en cítricos estudiaban el proceso de abscisión de las hojas tras la rehidratación de plantas sometidas a un periodo de estrés hídrico. En estos casos se descartó la influencia del transplante en el experimento al comprobarse que plantas transplantadas de arena húmeda a arena húmeda no sufrían abscisión (Tudela y PrimoMillo, 1992; GomezCadenas et al., 1996).

En un estudio comparativo de varios trabajos sobre el transcriptoma de plantas sometidas a estrés hídrico se ha visto que una parte de los resultados obtenidos es debida al método utilizado para aplicar el estrés hídrico (Bray, 2004). En nuestro caso

el uso de plantas transplantadas de arena húmeda a arena húmeda nos ha permitido determinar que existe una clara influencia del trasplante en los resultados obtenidos del experimento de estrés hídrico. Siendo nuestro principal objetivo la identificación de genes específicos de la respuesta de estrés hídrico en cítricos, la presencia de un grupo de unigenes comunes entre los resultados del experimento de estrés hídrico (EH) y los del experimento de trasplante (ER) indica que una parte de los unigenes que se obtienen del experimento EH responden tanto al estrés hídrico por trasplante como al trasplante únicamente. Este grupo de **unigenes comunes** podría estar formado por unigenes de respuesta general a estrés, que responden a estrés hídrico, a la combinación de estrés hídrico y trasplante, a estrés por trasplante y a cualquier otro factor que esté sufriendo la planta en ese momento (Bohnert et al., 2006; Swindell, 2006).

Como el diseño del experimento implica que las plantas sometidas a estrés hídrico también han sufrido el mismo estrés por trasplante que las plantas que únicamente han sufrido dicho trasplante, el hecho de encontrar **unigenes específicos del experimento de trasplante** implica que, de algún modo, el estrés hídrico añadido puede estar bloqueando o atenuando inducciones y represiones de esos unigenes en las plantas del experimento EH. Esto parece indicar una interacción entre ambos estreses, de forma que genes que ante un estrés por trasplante se inducirían o reprimirían, no lo hacen o lo hacen en menor medida si ese estrés por trasplante conlleva un estrés hídrico adicional. Esta interacción entre estreses se ha observado por ejemplo, en tabaco y *Arabidopsis* donde las respuestas a sequía y calor aplicados por separado, sólo coinciden en parte con la respuesta a la aplicación conjunta de ambos estreses (Rizhsky et al., 2002; Rizhsky et al., 2004).

Por último, el grupo de unigenes **específicos del experimento de EH** podría estar formado por unigenes que responden al estrés hídrico o a la combinación de estrés hídrico y trasplante. Por lo tanto estos unigenes son solo potencialmente específicos de estrés hídrico y sería conveniente la validación de su inducción o represión utilizando otros métodos distintos de aplicación del estrés hídrico, antes de proceder a la realización de otros estudios encaminados a conocer su relación con dicho estrés

### 3.2 Niveles de coincidencia entre la respuesta a estrés hídrico en hojas y raíces de cítricos

La respuesta que se produce en cada tejido ante un estrés determinado parece tener ciertos niveles de especificidad ya que éstos están compuestos por diversos tipos de células especializadas y además cada parte de la planta se ve expuesta de forma diferente a cada estrés por lo que es lógico esperar que la respuesta presente diferencias. Por ejemplo, las raíces perciben los estreses abióticos que se generan en el suelo, como sequía y salinidad, mientras que las temperaturas extremas son percibidas más directamente por la parte aérea.

En distintas especies como maíz, cebada, arroz o *Arabidopsis* se ha observado que la respuesta a estrés hídrico muestra diferencias entre tejidos. En la semilla de maíz por ejemplo, la placenta presenta un gran número de transcritos inducidos, estando la mayoría de ellos relacionados con la tolerancia a estrés hídrico, mientras que en el endospermo la mayoría están reprimidos y están relacionados con el crecimiento y la división celular (Yu y Setter, 2003). En arroz sometido a condiciones de estrés hídrico la mayor parte de los genes inducidos y reprimidos en brotes, hojas y panícula son específicos de cada uno de estos tejidos (Zhou et al., 2007).

En este trabajo hemos comparado el grado de coincidencia de los unigenes que responden a estrés hídrico en hojas y raíces de cítricos (Tablas suplementarias

22, 23, 24, 25, 26 y 27). Del total de las inducciones que se producen en ambos tejidos (858 unigenes), el 88% no presenta coincidencias entre hojas y raíces mientras que las represiones (577 unigenes) son específicas en un 99%. En el diagrama de Venn (Figura 15) se puede ver que solo un pequeño grupo de 6 unigenes se reprime tanto en hojas como en raíces mientras que entre los unigenes inducidos en ambos tejidos existe una coincidencia de 100 unigenes (Tablas suplementarias 22 y 23). Al igual que se observa en arroz el solapamiento entre los unigenes que se reprimen durante el periodo de estrés hídrico es mucho menor que entre los que se inducen, apuntando a que muchas de las rutas que se inactivan durante este estrés son más específicas de cada tejido que las que se activan. El grupo de 6 unigenes reprimidos lo forman unigenes similares a: Alcohol deshidrogenasa (aCL4152Contig1, AT5G06060), proteína con dominio SAP (aCL321Contig1, AT4G39680), factor de transcripción de la familia AP2/ERF (RAP2.2) (aCL89Contig1, AT1G53910) y tres unigenes que codifican genes de función desconocida (aCL7038Contig1, aCL4000Contig1, aCL292Contig1).

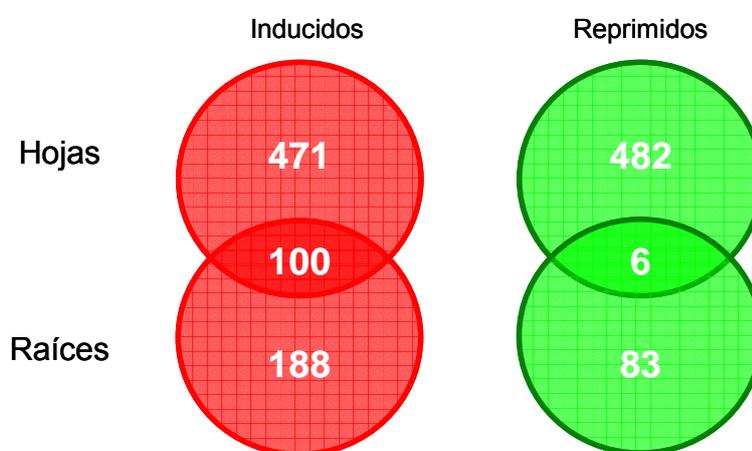


Figura 15. Comparación de los unigenes específicos de hojas y raíces de cítricos sometidos a estrés hídrico. En rojo se muestran los unigenes inducidos y en verde los reprimidos en hojas y raíces respectivamente.

Entre los unigenes inducidos comunes entre hojas y raíces encontramos por ejemplo, unigenes que codifican la enzima bifuncional lisina-cetoglutarato reductasa/sacaropina deshidrogenasa (LKR/SDH) (aCL1563Contig1, AT4G33150), la Ferritina (*ATFER14*) (aCL859Contig1, AT3G11050) y varios transportadores como el transportador de aminoácidos *AAP4* (aCL1103Contig1, AT5G63850), un transportador de tipo ABC (aCL387Contig3, AT1G66950), la proteína hidrofóbica *RCI2A* (aCL734Contig2, AT2G38905) y el transportador vacuolar de malato *AtDtT* (aCL5Contig3, AT5G47560). También se encuentran en este grupo varios unigenes relacionados con las rutas de transducción de la señal como factores de transcripción y kinasas. Entre los primeros cabe destacar, un factor de transcripción de la familia NAC (aCL943Contig1, AT1G01720), la proteína homeobox *BLH1* (aCL157Contig1, AT2G35940), el factor de transcripción tipo MADS box, *SEP1* (aCL176Contig1, AT5g15800) y dos factores de transcripción tipo bZIP (aCL3553Contig1, AT1G45249; aCL4015B01SK\_c, AT2G21230). Entre las kinasas podemos destacar un unigen similar a la proteína *CTR1* (aCL3951Contig1, AT5G03730) y la proteína quinasa dependiente de  $Ca^{2+}$ , *CIPK9* (aCL2906Contig2, AT1G01140). También se incluyen en este grupo de unigenes comunes entre ambos tejidos 53 unigenes de función desconocida.

### 3.3 Patrones de expresión de los unigenes específicos de estrés hídrico

El estudio de la respuesta a estrés hídrico se ha realizado durante las primeras 24 horas tras la aplicación del estrés, tomándose datos de expresión a las 5, 10 y 24 horas. Los unigenes considerados como específicos de estrés hídrico se agruparon según sus patrones de expresión a lo largo de este periodo.

Tanto en hojas como en raíces y tanto en el grupo de unigenes inducidos como en el de reprimidos se presentan dos patrones de expresión diferentes. Por un lado, hay un grupo de unigenes que alcanzan su mayor valor de inducción o represión a las 5 horas y mantienen más o menos constantes estos valores a lo largo del periodo de estudio. Por otro lado, aparece otro grupo de unigenes que alcanza sus picos de inducción o represión a las 5 y 10 horas y que experimenta una caída a las 24 horas. Hay que destacar que la mayor parte de los unigenes han alcanzado sus máximos de inducción y represión a las 5 horas por lo que sería necesario plantear tratamientos a tiempos más cortos para determinar el momento exacto en el que la planta empieza a responder al estrés.

En hojas, del total de 571 unigenes específicos inducidos, 409 presentan valores de expresión similares a lo largo del periodo de aplicación del estrés (Fig.16A-2) mientras que 162 presentan sus máximos valores de expresión a las 5 y 10 horas de aplicación del estrés y sufren una caída muy pronunciada a las 24 horas (Fig.16A-1). Los 488 unigenes reprimidos también pueden dividirse en estos dos mismos patrones de expresión, dando como resultado 276 unigenes que mantienen los valores de expresión similares a lo largo del periodo de estrés (Fig.16B-2) y 212 unigenes que se mantienen a 5 y 10 horas y aumentan su expresión a las 24 horas (Fig.16B-1).

En raíces, de los 287 unigenes específicos inducidos, 249 presentan valores de expresión similares a lo largo del periodo de aplicación del estrés (Fig.17A-2) y 38 presentan sus máximos valores de expresión a las 5 y 10 horas de aplicación del estrés y sufren una caída muy pronunciada a las 24 horas (Fig.17A-1). Entre los 89 unigenes reprimidos podemos observar que 81 presentan unos valores de expresión similares a lo largo del periodo de estrés (Fig.17B-2), mientras que en este caso solo 8 unigenes sufren un aumento elevado de sus valores de expresión a las 24 horas (Fig.17B-1).

En otras especies como *Arabidopsis* o arroz también se han podido identificar grupos de genes con comportamientos diferentes a lo largo del periodo de aplicación del estrés. En arroz la agrupación de los genes en función de su nivel de expresión tras un periodo de 15 min. a 24 horas de estrés salino, ha permitido dividir la respuesta en cuatro etapas que forman la etapa instantánea (pico de inducción a los 15 min.), la etapa temprana (pico de inducción a 1 hora), etapa de recuperación temprana (periodo de inducción entre 3 y 6 horas) y etapa de compensación (pico a las 24 horas) (Kawasaki et al., 2001). En *Arabidopsis* la aplicación de estrés hídrico entre 1 y 24 horas permitió identificar dos patrones de expresión uno que presenta un pico de inducción a las 2 horas y luego decrece y otro con un periodo de máxima inducción entre 2 y 10 horas seguido de una caída gradual de los niveles de inducción (Seki et al., 2002b).

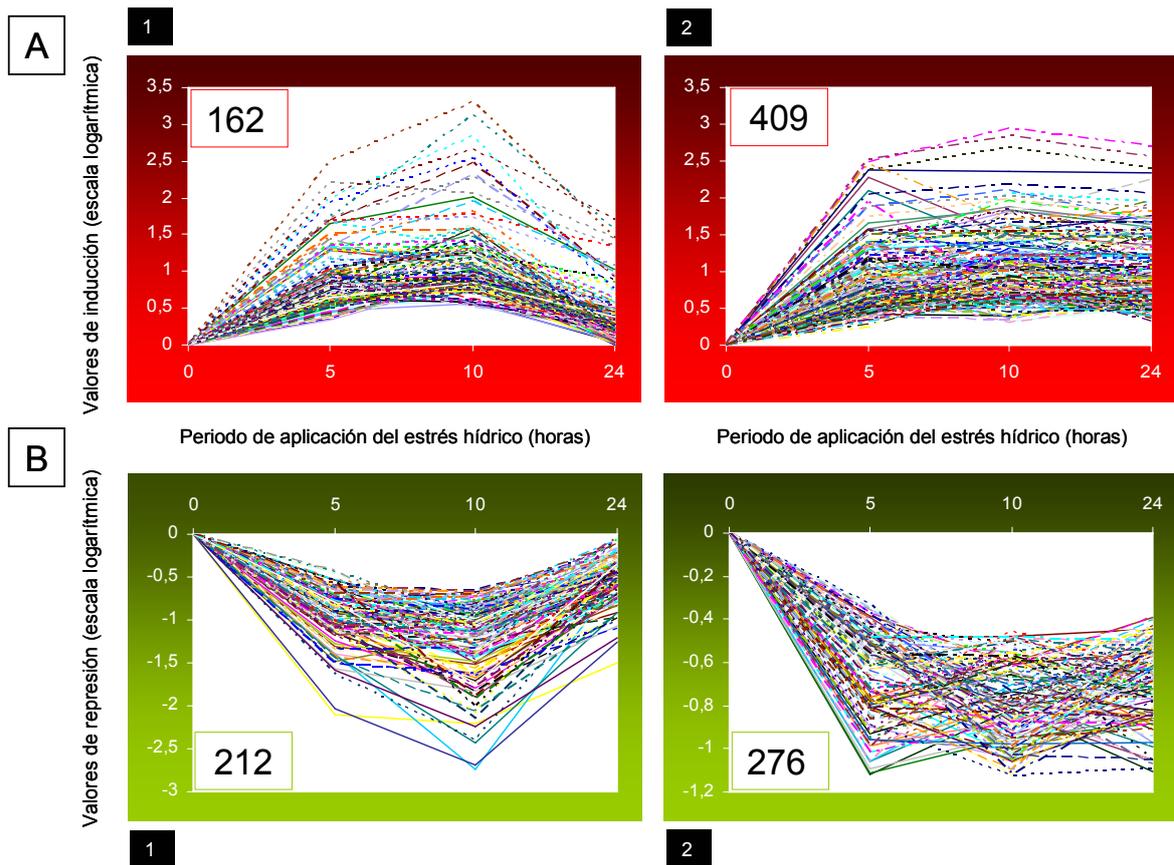


Figura 16. Patrones de expresión unigenes de hoja. A1. Unigenes inducidos con valores máximos de inducción a las 5 y 10 horas de estrés hídrico. A2. Unigenes inducidos con valores de inducción constantes a lo largo del periodo de estrés. B1. Unigenes reprimidos con valores mínimos de represión a las 5 y 10 horas de estrés hídrico. B2. Unigenes reprimidos con valores de represión constantes a lo largo del periodo de estrés. Valores en escala logarítmica.

En vista de los patrones de expresión que se presentan como resultado de la aplicación de estrés hídrico durante 24 horas en cítricos, parece existir un grupo de unigenes que formaría parte de lo que podemos llamar “respuesta rápida prolongada”, en el que estarían incluidos los unigenes que alcanzan su mayor valor de inducción o represión a las 5 horas y mantienen más o menos constantes estos valores a lo largo del periodo de aplicación del estrés. Este tipo de respuesta podría ser similar a la del grupo de genes de *Arabidopsis* que muestra una inducción entre las 2 y 10 horas seguido de una caída muy lenta de la actividad (Seki et al., 2002b). Este grupo incluye genes cuya inducción constante en el tiempo tanto en hojas como en raíces permite a la planta tolerar el estrés hídrico durante el periodo de duración del mismo como ejemplo podríamos citar: genes que codifican enzimas de la ruta de síntesis de distintos osmolitos como la P5CS ( $\Delta$  1-pirrolina-5-carboxilato sintasa), enzima de la ruta de síntesis de la prolina (aCL174Contig2, AT2G39800) y la Rafinosa sintasa (aCL2181Contig1, At5G40390), enzima de la ruta de síntesis de los RFOs (*raffinose family oligosaccharides*); transportadores de sustancias tóxicas para la célula como transportadores tipo ABC (aCL862Contig1, AT3G21090) y MATE (aCL18003A11, AT1G73700); antioxidantes como Glutation-S-transferasa (aCL110Contig2, AT1G10360) o proteínas de choque térmico (aCL186Contig2, AT5G12030).

Por otro lado, el grupo de unigenes que alcanza sus picos de inducción o represión a las 5 y 10 horas y que experimenta una caída a las 24 horas podrían formar parte de lo que llamaríamos “respuesta rápida transitoria”. Este grupo

equivaldría al grupo de genes que muestra un pico a las 2 horas en Arabidopsis seguido de una caída rápida de la actividad (Seki et al., 2002b). En este grupo podrían estar incluidos genes que permiten a la planta protegerse del estrés durante el periodo inicial o que están involucrados en rutas de transducción de la señal de respuesta a estrés hídrico. Entre las 5 y 10 horas podrían activarse o desactivarse una serie de rutas de señalización que experimentarían una pérdida progresiva de sensibilidad dando paso a la activación de otros genes involucrados en mecanismos de defensa. Entre los genes involucrados en rutas de señalización que aparecen en este grupo se podrían destacar proteínas kinasas (aCL3690Contig 1, AT2G16250), proteínas kinasas interactuantes con CBL (*calcineurin B-like protein*) (aCL2906Contig2, AT1G01140) o representantes de distintas familias de factores de transcripción como por ejemplo, factores de transcripción de tipo NAC (aCL728Contig2, AT3G04070), de la familia bZIP (aCL3546Contig1, AT3G62420) y proteínas homeobox BLH4 (aCL157Contig1, AT2g35940).

Los genes reprimidos que presentan tanto respuesta rápida prolongada como respuesta rápida transitoria podrían pertenecer a rutas metabólicas o procesos celulares cuya actividad disminuye durante el periodo de estrés, en el cual la planta reorganiza sus recursos hacia funciones más defensivas.

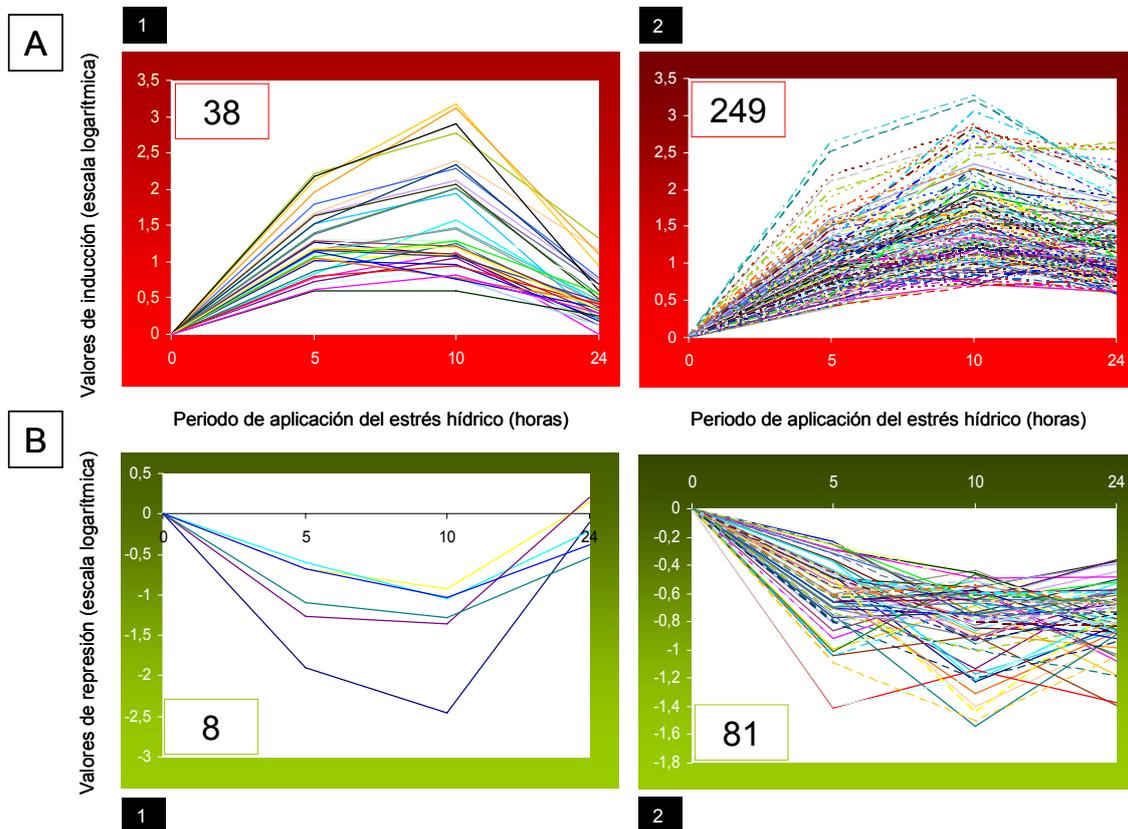


Figura 17. Patrones de expresión unigenes de raíz. A1. Unigenes inducidos con valores máximos de inducción a las 5 y 10 horas de estrés hídrico. A2. Unigenes inducidos con valores de inducción constantes a lo largo del periodo de estrés. B1. Unigenes reprimidos con valores mínimos de represión a las 5 y 10 horas de estrés hídrico. B2. Unigenes reprimidos con valores de represión constantes a lo largo del periodo de estrés. Valores en escala logarítmica.

### 3.4 Clasificación funcional

#### 3.4.1 Asignación de función

La posible función de cada uno de los unigenes se asignó en base a la función de la proteína mas similar (e-value  $< 10^{-5}$ ) tras un *BLASTX* contra la base de datos no redundante de proteínas uniref90 (<http://www.ebi.ac.uk/uniref/>), contra el conjunto completo de proteínas de *Arabidopsis* obtenido del TAIR (*The Arabidopsis Information Resourde*, <http://www.arabidopsis.org>), y contra una base de datos local construida con todas las secuencias públicas de cítricos obtenidas en el NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

En la figura 18 se puede ver el resultado de la asignación de función de los unigenes específicos de estrés hídrico. Entre los cuatro grupos de unigenes (hoja inducidos, hoja reprimidos, raíz inducidos y raíz reprimidos) aparecen tres categorías diferentes. En primer lugar encontramos un grupo de ellos que por motivos técnicos no ha podido obtenerse su secuencia y que por tanto no se les ha asignado ninguna función (384 unigenes en total). Sin embargo, la mayor parte de los unigenes han sido secuenciados y entre ellos podemos encontrar dos grupos, uno que presenta homología con genes de las bases de datos públicas (858 unigenes) y otro sin ninguna homología (193 unigenes).

Los unigenes sin homología representan genes nuevos y de función desconocida entre los cuales se podrían encontrar genes involucrados en nuevas rutas de respuesta a estrés hídrico o genes específicos de cítricos. La posible función asignada a los unigenes con homología con otros genes ya conocidos nos puede ayudar a conocer como está respondiendo la planta de cítricos frente al estrés hídrico.

<b>Hoja inducidos</b> 571 unigenes		
con secuencia	401	67 sin anotación
		334 con anotación
sin secuencia	170	
<b>Hoja reprimidos</b> 488 unigenes		
con secuencia	374	80 sin anotación
		294 con anotación
sin secuencia	114	
<b>Raíz inducidos</b> 287 unigenes		
con secuencia	202	30 sin anotación
		172 con anotación
sin secuencia	85	
<b>Raíz reprimidos</b> 89 unigenes		
con secuencia	74	16 sin anotación
		58 con anotación
sin secuencia	15	

Figura 18. Unigenes específicos de estrés hídrico con y sin anotación funcional.

### 3.4.2 Análisis de la respuesta a estrés hídrico en cítricos

Una de las ventajas del estudio de la expresión global es que puede proporcionar una visión comprensiva de la regulación transcripcional de los genes involucrados en todos los aspectos de la fisiología de las plantas.

Con el fin de conocer mejor el mecanismo de respuesta de los cítricos ante el estrés hídrico, se ha realizado una clasificación funcional de los unigenes específicos del experimento de estrés hídrico (**EH**), de los unigenes comunes entre el experimento de estrés hídrico y el experimento control o de rotura (**ER-EH**) y de los unigenes específicos del experimento control o de rotura (**ER**), cuyo factor de inducción o represión es mayor de 1,5 en alguno de los tres tiempos del experimento.

La clasificación funcional se ha realizado en base a la función de la proteína de *Arabidopsis* más similar de cada unigen ( $e\text{-value} < 10^{-5}$ ). Los unigenes se han agrupado en 13 categorías funcionales: Metabolismo, Síntesis, plegamiento y degradación de proteínas, Antioxidantes y detoxificantes, Proteínas LEA (Late embryogenesis abundant proteins), Osmolitos, Defensa antimicrobiana y antiherbívoros, Factores de transcripción, Proteínas kinasas y fosfatasa, Transportadores, Fotosíntesis, Miscelánea, Proteínas sin anotación funcional y Proteínas sin homólogo de *Arabidopsis*. Estas categorías han sido seleccionadas por su importancia en la respuesta a estrés de las plantas. Además se ha realizado una búsqueda en la base de datos *Genevestigator response review* del TAIR con el fin de determinar la respuesta de cada gen frente a estreses abióticos en *Arabidopsis* (Tablas de la 3 a la 14, Anexo II).

Ha de tenerse en cuenta que la micromatriz utilizada solo contiene alrededor de 7000 unigenes (aproximadamente la cuarta parte de los genes de cítricos) y que por tanto los resultados obtenidos solo muestran una parte de la respuesta frente al estrés.

#### Metabolismo

Entre los **unigenes específicos del experimento de EH** cabe destacar la inducción en hojas y raíces de un unigen que codifica una Beta-caroteno hidroxilasa (CHY1) (aCL35Contig1, AT4G25700; factores de inducción de 7 y 4 respectivamente; Tablas 3 y 5, Anexo II). Esta enzima forma parte de la ruta de síntesis de carotenoides (xantofilas), catalizando la conversión de beta-caroteno en zeaxantina (Davison et al., 2002). Los carotenos realizan diversas funciones en la célula como proteger contra la fotooxidación, captar la energía luminosa en la fotosíntesis, ser precursores de vitamina A y hormonas y actuar como pigmentos. En momentos de estrés hídrico se ha detectado la acumulación de carotenoides tanto en hojas como en raíces en diversas especies (Audran et al., 1998; Audran et al., 2001; North et al., 2005). Parece ser que en hojas están involucrados en la fotoprotección evitando el estrés oxidativo, mientras que en raíces se les asocia a la producción de ABA (Parry y Horgan, 1992; Borel et al., 2001).

Otro de los unigenes específicos de EH es un unigen que codifica la enzima bifuncional lisina-cetoglutarato reductasa/sacaropina deshidrogenasa (LKR/SDH) (aCL1563Contig1, AT4G33150; Tablas 3 y 5, Anexo II) inducido tanto en hojas como en raíces con unos factores de inducción de 16 y 9,9 respectivamente. Esta enzima actúa en la degradación de la lisina produciendo glutamato y acetil-CoA. La inducción de este gen se ha detectado bajo condiciones de estrés biótico y abiótico (Deleu et al., 1999; Moulin et al., 2000). Durante un periodo de estrés abiótico la planta suele acumular un gran número de metabolitos como prolina, arginina, poliaminas, etc y se cree que incrementar la degradación de lisina tiene como finalidad aumentar la producción de glutamato que es el mayor precursor de la síntesis de estos metabolitos (Galili et al., 2001). Según los datos obtenidos de Genevestigator este gen se induce

en *Arabidopsis* tras la aplicación de ABA y bajo condiciones de estrés osmótico y salinidad.

En raíces aparece inducido el gen Glicosil hidrolasa de la familia 3 (Beta xilosidasa (BLY1)) (aCL271Contig1, AT5G49360; factor de inducción de 4,4; Tabla 5, Anexo II). Esta enzima esta involucrada en la degradación de los polisacáridos de la pared celular (Minic y Jouanin, 2006). Esta enzima podría debilitar la pared celular para permitir crecimiento con menor turgencia.

Entre los **unigenes reprimidos específicos del experimento de EH** (Tabla 4 y 6, Anexo II) encontramos un grupo que codifica enzimas que participan de forma general en numerosos procesos metabólicos de la célula. En hojas se reprimen los genes de la alcohol deshidrogenasa (aCL4763Contig1, AT1G22440; factor de represión 3,4), hidrolasa (aC18005G11Rv\_c, AT5G02970; factor de represión 3,2), monooxigenasa (*MO2*) (aC02019G07, AT4G38540; factor de represión 3,7), dioxigenasa (aC18009D04Rv\_c, AT5G59530, factor de represión 5), ATP sintasa (ATPQ) (aCL1019Contig1, AT3G52300; factor de represión 3,8)), aldo-ceto reductasa (aCL2708, AT1G06690, factor de represión 3,3) y en raíces encontramos la N-metiltransferasa (*NMT1*) (aCL1819Contig1, AT3G18000; factor de represión 2,5). La represión de todas estas enzimas puede reflejar la reducción de la actividad celular durante el estrés hídrico.

Otros ejemplos de unigenes reprimidos en hojas de plantas sometidas a estrés hídrico son: dos unigenes que codifican Flavonol sintasa (*FLS1*) (aCL336Contig1, AT5G08640, factor de represión 3) y Flavonol 3'-O-metiltransferasa (*ATOMT1*) (aCL38Contig6, AT5G54160, factor de represión 3,3), dos genes codificantes de enzimas de la ruta de síntesis de flavonoides; Geranilgeranil reductasa (aCL655Contig1, AT1G74470, factor de represión 3,3) enzima relacionada con la síntesis de fitol, compuesto que forma parte de la cadena hidrofóbica de las clorofilas y que les permite su interacción con las membranas plasmáticas y el gen de la proteína PDX1.1 (aCL409Contig1, AT2G38230, factor de represión 6,5) que forma parte del complejo glutamina aminotransferasa involucrado en la biosíntesis de vitamina B6 cuya inducción se ha detectado bajo estrés abiótico (Densiow et al., 2007).

Las desaturasas intervienen en la ruta de síntesis de ácidos grasos, componente esencial de las membranas, siendo responsables de la formación enlaces dobles que aumentan el nivel de insaturación de estos. La fluidez de la membrana depende del nivel de instauración de los ácidos grasos (Mikami y Murata, 2003). En algunos estudios se han detectado altos niveles de ácidos grasos insaturados en plantas sometidas a estrés hídrico lo que implicaría un aumento de la rigidez de la membrana (Sgherri et al., 1996; Repellin et al., 1997). En nuestros resultados se han detectado genes codificantes de desaturasas cada una expresada bajo una condición diferente. La desaturasa de ácidos grasos (FAD2) (aCL578Contig1, AT3G12120) se induce en hojas en los experimentos de EH y ER con unos factores de inducción de 7 y 2 respectivamente (Tabla 7, Anexo II). La desaturasa 6 (FAD6) (aCL1Contig2, AT4G30950) se reprime en hojas en los experimentos de EH y ER con unos factores de represión de 2,3 y 3,7 respectivamente (Tabla 8, Anexo II). La desaturasa 8 (FAD8) (aCL5Contig18, AT5G05580, factor de represión 4,2) se reprime en hojas solo bajo condiciones de estrés hídrico (Tabla 4, Anexo II). Se ha comprobado que la sobreexpresión de FAD8 y FAD3 en tabaco aumenta los niveles de ácidos grasos insaturados e incrementa la tolerancia a estrés hídrico (Zhang et al., 2005).

Entre el grupo de **unigenes comunes entre ambos experimentos (EH-ER)** y que podrían formar parte de una respuesta más general a estrés por parte de los cítricos encontramos varios unigenes codificantes de Citocromo P450 monooxigenasa, uno de ellos, *CYP71B35*, esta inducido en hojas (aCL1767Contig2, AT3G26310), otro, *CYP71B20*, en raíces (aC18016A02, AT3G26180) y un tercero, *CYP98A3*, reprimido en hojas (aCL627Contig1, AT2G40890). Estas enzimas están implicadas en la

biosíntesis de gran variedad de compuestos hidrofóbicos como ácidos grasos, esteroides, fenilpropanoides, terpenos, etc y en la detoxificación oxidativa de algunos herbicidas. Se ha comprobado que diversos miembros de esta extensa familia muestran comportamientos diferentes ante diversas condiciones de estrés. En concreto, *CYP71B35*, *CYP71B20* y *CYP98A3* se inducen bajo diferentes condiciones de estrés biótico y abiótico en *Arabidopsis*, formando parte de la respuesta general a estrés (Narusaka et al., 2004). Sin embargo en cítricos, *CYP98A3*, aunque parece formar parte de la respuesta general, se encuentra reprimido.

En hojas, dos unigenes codificantes de S-adenosil-L-metionina:carboxil metiltransferasa (SAMT) (aCL32Contig1, AT5G66430 (*ATBSMT1*); aCL32Contig2, AT3G11480) se expresan de forma conjunta en el experimento de estrés hídrico y en el experimento control o rotura con unos factores de inducción de 49 y 30 en EH y de 64 y 67 en ER (Tabla 7, Anexo II). Esta enzima cataliza la reacción de metilación de ácido benzoico (BA) y ácido salicílico (SA) produciendo metil benzoato (MeSA) y metil silicilato (MeSA). La emisión de estos compuestos volátiles forman parte de la respuesta defensiva de la planta y se ha detectado su emisión y la inducción de SAMT tras la mordedura de insectos, daño mecánico y la aplicación de compuestos relacionados con la señal de rotura como jasmonato (Chen et al., 2003; Xu et al., 2006).

En raíces, entre los unigenes inducidos bajo condiciones de EH y ER se ha encontrado un unigen que codifica la Arginina decarboxilasa 2 (ADC2) (aCL1233Contig1, AT4G34710), con un factor de inducción de 3 en EH y de 2,8 en ER (Tabla 9, Anexo II). Esta enzima forma parte de la ruta de síntesis de poliaminas catalizando la formación de putrescina a partir de arginina. Tanto la putrescina como la ADC se acumulan bajo condiciones de estrés en plantas. Las poliaminas están relacionadas con procesos de división y diferenciación celular y de crecimiento y desarrollo de la planta en condiciones normales, pero en condiciones de estrés su unión con otras moléculas evita que estas se degraden y pierdan su conformación (Kuznetsov et al., 2006). Este gen ha sido considerado como parte de la respuesta general a estrés tras comprobarse su inducción bajo diversas condiciones de estrés biótico y abiótico en un estudio de los perfiles de expresión de los transcritos relacionados con estrés en *Arabidopsis* (Bohnert et al., 2006). Formando parte también de los unigenes inducidos en raíces bajo condiciones de EH y ER se ha encontrado un unigen que codifica la Lacasa 5 (LAC5) (aCL1401Contig1, AT2G40370). La mayoría de los miembros de esta familia se expresa en raíces y la inducción de algunos de ellos se produce bajo condiciones de salinidad y estrés hídrico y se les asocia con la síntesis de lignina (Cai et al., 2006).

El etileno parece formar parte de la respuesta general a estrés en cítricos. Los genes de las dos enzimas de la ruta de síntesis de etileno ACC sintasa y ACC oxidasa forman parte del grupo de unigenes que se inducen bajo ambas condiciones de estrés (EH y ER). El de ACC sintasa se induce en raíces y el de ACC oxidasa en hojas. Parece que el ACC se está acumulando en las raíces y que la síntesis de etileno se está produciendo en las hojas. Es conocida la acumulación de ACC en raíces durante periodos de sequía en cítricos y que se transforma en etileno en las hojas durante la rehidratación provocando la abscisión (GomezCadenas et al., 1996).

### **Síntesis, plegamiento y degradación de proteínas:**

Durante periodos de estrés se produce la pérdida de la estructura de proteínas, de manera que no pueden realizar correctamente su función y la célula activa diversos mecanismos para restablecer su síntesis y su estructura o acelerar su degradación en caso de no poder renaturalizarse.

Muchas de las familias génicas que aparecen en los resultados de la micromatriz bajo esta categoría funcional tienen representantes tanto entre los

unigenes específicos del experimento de EH, entre los específicos del experimento de ER (Tablas de la 3 a la 6 y de la 11 a la 14, Anexo II) y entre los comunes entre EH y ER (Tablas de la 7 a la 10, Anexo II) y están tanto inducidos como reprimidos en ambos tejidos. Parece que existe un proceso de remodelación de la actividad de los ribosomas (proteínas ribosomales), de las chaperonas (proteínas de choque térmico (HSPs), peptidil-propil cis-trans isomerasa (ciclofilina), disulfuro isomerasa) y del proceso de degradación de proteínas (F-box, poliubiquitina, asparaginil endopeptidasa).

Solo existen algunos unigenes que están presentes en solo una de las condiciones de estrés estudiadas.

Entre el grupo de genes que responden solo al experimento de EH, en raíces aparece, con un factor de inducción de 10, el gen de una proteína con repeticiones armadillo/beta catenina (aCL2844, AT1G23030) involucrada en el proceso de ubiquitinación siendo parte del complejo enzimático E2. En hojas tenemos el gen de una ubiquitin proteasa (*UBP25*) (aCL5265Contig1, AT3G14400) con un factor de represión de 2,8 que también esta implicada en el proceso de ubiquitinación separando la ubiquitina de la proteína antes de ser degradada.

Entre el grupo de genes que se inducen tanto en EH como en ER, en hojas aparecen inducidos los genes de la caboxipeptidasa A (aC04011F08SK\_c, AT5G42320) y la subtilasa (aCL1305Contig2, AT4G10530), dos proteasas involucradas en la degradación de proteínas. Y en raíces los genes de la ubiquitina 5 (*UBQ5*) (aCL462Contig1, AT3G62250) y la culina 2 (*CUL2*) (aCL4Contig33, AT1G02980) involucradas ambas en el proceso de ubiquitinación de proteínas. La culina forma parte de los complejos enzimáticos SCF que une ubiquitinas a las proteínas que van a ser degradadas. Este grupo de genes podría considerarse de respuesta general a estrés.

#### **Antioxidantes y detoxificantes**

En esta categoría funcional se sitúan todos aquellos genes que codifican proteínas involucrados en eliminar todo tipo de compuestos tóxicos para la célula como, superóxido, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, iones metálicos, herbicidas, ..etc.

Hay una parte de los unigenes de esta categoría funcional que pertenecen a grandes familias génicas (L-ascorbato peroxidasa y glutation S-transferasa) de las que encontramos representantes en todas las condiciones estudiadas indicando que cada miembro de la familia desarrolla un tipo de comportamiento.

Entre los unigenes que solo están presentes en plantas sometidas a estrés hídrico, encontramos en hojas el gen de la Ferritina (*ATFER14*) (aCL859Contig1, AT3G11050) con un factor de inducción de 14 (Tabla 3, Anexo II). Se trata de una proteína que secuestra el hierro intracelular evitando el daño oxidativo producido por los radicales hidroxilo generados de la reacción Fenton. Este gen también se encuentra inducido en *Arabidopsis* bajo estrés osmótico (dato del Genevestigator). En raíces, aparece inducido con un factor de 3,9 el gen de la Glutation peroxidasa 3 (*ATGPX3*) (aCL74Contig3, AT2G43350) (Tabla 5, Anexo II), la cual pertenece a una familia formada por siete genes denominados *AtGPX1-AtGPX7*, muchos de los cuales se inducen bajo diferentes estreses abióticos. En concreto, los siete genes muestran un aumento de sus niveles de transcrito tras la aplicación de estrés osmótico en *Arabidopsis* (Milla et al., 2003). Se trata de enzimas que protegen a la célula contra el estrés oxidativo producido por moléculas ROS.

### **LEA (Late embryogenesis abundant protein)**

Las LEA son un grupo de proteínas muy heterogéneo cuya característica común es que se acumulan principalmente en los estadios tardíos del desarrollo embrionario (fase de desecación de la semilla), en respuesta a bajas temperaturas, aplicación de ABA o cualquier factor ambiental que lleve asociado un proceso de deshidratación, como por ejemplo el estrés hídrico, la salinidad o congelación (Close, 1996).

Son numerosos los trabajos que relacionan las LEA con la respuesta de la planta ante el déficit hídrico (Ingram y Bartels, 1996; Koag et al., 2003). Estas proteínas tienen un papel protector interactuando con las proteínas y ayudando a mantener su estructura.

En el experimento de micromatrices se ha detectado una clara influencia del estrés hídrico sobre el comportamiento de los genes de las proteínas LEA. Entre los unigenes inducidos específicos del experimento de EH (Tabla 3, Anexo II) encontramos los genes de una LEA del grupo 1 (aCL2660Contig1, AT5G06760) inducida 4 veces en hojas (Tabla 3, Anexo II) y de una LEA del grupo 2 (*LTI45/ERD10*) (aCL53Contig3, AT1G20450) inducida tanto en hojas como en raíces, con un factor de inducción de 3 (Tablas 3 y 5, Anexo II). Ambos genes se inducen también en *Arabidopsis* tras la aplicación de ABA y bajo condiciones de estrés osmótico y salinidad (datos del *Genevestigator*). En raíces también tenemos un grupo de genes muy numeroso que codifica proteínas similares a LEA del grupo 3 (aCL9Contig1, 6, 19, 20, 21 y 23, AT1G02820) inducidas en EH entre 4,7 y 8,3 veces (Tabla 4, Anexo II). Además, entre los unigenes comunes a los experimentos de EH y ER encontramos el gen de otra LEA del grupo 2 (aCL6Contig7 y 16, AT1G54410) que está inducida en EH y ER pero se puede apreciar que las inducciones bajo condiciones de EH son mucho mayores que en ER. En hojas son entorno a 6 en EH frente a 2,4 en ER y en raíces son de 11 frente a 4 (Tablas 7 y 9, Anexo II).

Ningún miembro de esta familia se encuentra reprimido bajo condiciones de estrés hídrico ni en hojas ni en raíces.

### **Osmolitos**

La acumulación de solutos u osmolitos durante periodos de estrés osmótico ayuda a la planta a conseguir el ajuste osmótico y mantener la turgencia de la célula, además de actuar como protectores de macromoléculas (Hoekstra et al., 2001; Ramanjulu y Bartels, 2002). Son numerosos los estudios que relacionan la acumulación de diferentes compuestos con un aumento de la tolerancia a sequía (Garg et al., 2002; Chen et al., 2002b).

Según los resultados del experimento de micromatrices de EH, parece que dos osmolitos pueden estar acumulándose en cítricos durante un periodo de sequía, la raffinosa y la prolina.

Existen numerosos trabajos en los que se ha observado una relación directa entre la acumulación de prolina y el aumento de la tolerancia a sequía en plantas (Kishor et al., 1995; Hong et al., 2000; Nayyar, 2003). En cítricos se ha observado la acumulación de prolina y prolina betaina, dos solutos que actúan como osmoprotectores bajo condiciones de estrés hídrico. La sobreexpresión en hojas de  $\Delta$  1-pirrolina-5-carboxilato sintasa (P5CS), enzima de la ruta de síntesis de la prolina permite un aumento de la actividad fotosintética y el ajuste osmótico en Carrizo citrange (Nolte et al., 1997; Molinari et al., 2004). En los resultados de nuestro experimento se ha detectado el gen de la  $\Delta$  1-pirrolina-5-carboxilato sintasa (P5CS) (aCL174Contig2, AT2G39800; factor de inducción de 3,4; Tabla 3, Anexo II), entre los unigenes específicos de sequía inducidos en hojas, lo que parece indicar, que la

acumulación de prolina podría estar jugando un papel importante en la respuesta a sequía en cítricos.

Los RFOs (*raffinose family oligosaccharides*) son otro grupo de compuestos cuya acumulación se ha observado bajo condiciones de estrés hídrico. Un gen que codifica la galactinol sintasa, una enzima clave de la ruta de síntesis de los RFOs, mejora la tolerancia a estrés hídrico en plantas transgénicas de *Arabidopsis* aumentando los niveles de rafinosa y galactinol (Taji et al., 2002). Según los resultados de nuestro experimento de micromatrices se ha detectado la inducción del gen de la rafinosa sintasa (aCL2181Contig1, At5G40390; factor de inducción 2,6; Tabla 5, Anexo II), enzima de la ruta de síntesis de los RFOs entre el grupo de unigenes inducidos por EH en raíces. Esto podría indicar la acumulación de compuestos de esta familia bajo condiciones de estrés hídrico en cítricos.

#### **Defensa antimicrobiana y antiherbívoros**

Dentro de esta categoría funcional se engloban aquellos genes altamente relacionados con la defensa contra patógenos en plantas. Sin embargo algunos de ellos también han sido detectados en trabajos de estudio de la respuesta a estrés abiótico.

No se ha determinado una respuesta clara de los genes pertenecientes a esta categoría respecto a estrés hídrico. La mayoría de familias génicas (Inhibidores de proteasas, LTP, proteínas PR,..) están presentes tanto en el grupo de unigenes específicos del experimento de EH como entre los unigenes comunes a los experimentos de EH y ER. Además algunos miembros de la misma familia aparecen tanto inducidos como reprimidos.

Sin embargo, cabe destacar algunos de ellos como los inhibidores de proteasas, que han sido ampliamente relacionados con la defensa de las plantas, ya que actúan frente a las proteasas de insectos, hongos y nematodos. En algunas ocasiones se ha detectado su inducción tanto bajo condiciones de estrés abiótico como el estrés hídrico (Downing et al., 1992; Huang et al., 2007). Durante los periodos de estrés la actividad de los inhibidores de proteasas se considera como un mecanismo regulador del proceso de proteólisis (Ryan, 1989; Callis, 1995).

Los LTP (*Lipid transfer proteins*), también son proteínas relacionadas con la defensa contra patógenos en plantas, donde están involucrados en el aumento de la deposición de cutina en la cutícula de la epidermis durante la infección del patógeno y en situaciones de estrés hídrico puede estar relacionadas con la prevención de la deshidratación (Kader, 1996; Cameron et al., 2006).

#### **Factores de transcripción**

Entre los genes de factores de transcripción inducidos solo bajo condiciones de EH encontramos representantes de las familias de factores de transcripción MYB (Urao et al., 1993), bZIP (Choi et al., 2000; Uno et al., 2000) y NAC (Fujita et al., 2004; Hu et al., 2006), relacionados con la ruta de transducción de la señal de estrés hídrico dependiente de ABA.

Entre los unigenes inducidos en hojas bajo condiciones de estrés hídrico encontramos un miembro de la familia myb (aC20006B02SK\_c, AT3G46130), con un factor de inducción de 5 y dos miembros de la familia bZIP con un factor de inducción de 2 (aCL3546Contig1, AT3G62420; aCL7631Contig1, AT2G41070) (Tabla 3, Anexo II). Los miembros de la familia NAC se encuentran tanto en hojas (aCL1571Contig1 y 2, AT1G52880, factores de inducción 5 y 3; aCL943Contig1, AT1G01720, (ATAF1), factor de inducción 3) como en raíces (aCL728Contig2, AT3G04070, factor de inducción 3) (Tablas 3 y 5, Anexo II). En hojas hay que destacar el unigen similar a

*ATAF1*, que también se induce bajo condiciones de estrés hídrico en *Arabidopsis* (Lu et al., 2007).

Otros ejemplos de factores de transcripción inducidos bajo condiciones de estrés hídrico en hojas de cítricos son los codificantes de la proteína homeobox (*BLH1*) (aCL157Contig1, AT2G35940, factor de inducción 3) y del factor de transcripción tipo MADS box (*SEP1*) (aCL176Contig1, AT5G15800, factor de inducción 3) y en raíces, el gen de la proteína de cremallera de leucina HB-4 (aCL228Contig1, AT2G44910, factor de inducción 2,3) y el del factor de transcripción que se une a la caja CCAAT (*Hap5*) (aC01008E03, AT1G54830, factor de inducción 2,6).

La mayor parte de los genes de factores de transcripción comentados se han encontrado como inducidos en *Arabidopsis* tras la aplicación de ABA y bajo condiciones de estrés osmótico y salinidad (datos del *Genevestigator*)

### **Kinasas y fosfatasa**

La transducción de la señal en condiciones de estrés entre la membrana celular y el núcleo se realiza a través de cadenas de reacciones de fosforilación catalizadas por proteínas kinasas. Las MAPKKK, MAPKK y MAPK, constituyen una cascada de MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) interrelacionadas. Los cambios en la fosforilación de estas proteínas bajo procesos de estrés hídrico sugieren que la fosforilación reversible de las proteínas es un proceso regulador (Jonak et al., 2002; Nakagami et al., 2005).

Entre los unigenes específicos del experimento de EH inducidos en hojas y raíces tenemos el gen homólogo al de la proteína CTR1 (aCL3951Contig1, AT5G03730, factores de inducción de 3 y 6). CTR1 es una proteína kinasa MAPKKK del tipo Raf y es un componente central de la ruta de señalización de etileno actuando después del receptor en *Arabidopsis* (Kieber et al., 1993; Huang et al., 2003).

Otro unigen específico de EH inducido en hojas es el de la CIPK9 (aCL2906Contig2, AT1G01140, factor de inducción 3,4), proteína interactuante con CBLs (*calcineurin B-like calcium sensor proteins*). Se trata de una proteína kinasa dependiente de  $Ca^{2+}$ . El  $Ca^{2+}$  actúa como mensajero en las rutas de señalización de respuesta a estrés en plantas. Se une a las CBLs y estas interactúan y regulan un grupo de proteínas kinasas llamado CIPKs (CBL-interacting protein kinases). La CIPK9 se induce en *Arabidopsis* bajo condiciones de estrés salino y sequía y bajo aplicación de ABA (Gong et al., 2004).

### **Transportadores**

Las células son capaces de extraer del citoplasma un gran número de compuestos tóxicos, xenobióticos o endógenos (fenólicos, flavonoides y fitoalexinas), hacia el exterior o al interior de la vacuolas. Entre los unigenes específicos del experimento de EH encontramos algunos similares a los de proteínas de *Arabidopsis* transportadoras de sustancias tóxicas para la célula. Entre ellas esta una proteína de la familia de transportadores MATE (aC1003A11Rv\_c, AT1G73700) que esta inducida en hojas con un factor de inducción de 3 y dos proteínas de la familia de transportadores ABC, una de ellas inducida solo en hoja (aCL862Contig1, AT3G21090, factor de inducción de 3,7) y la otra en hojas y raíces (PDR11) (aCL387Contig3, AT1G66950, factor de inducción 3,4 y 2,5).

Otro de los genes de transportadores presente entre los unigenes específicos del experimento de EH es un unigen similar al del transportador de malato del tonoplasto *AtDT* (aCL5Contig3, AT5G47560). Este unigen esta inducido tanto en hojas y como en raíces (factores de inducción de 3,7 y 6,6). El malato participa en gran número de procesos metabólicos y para mantener constante su concentración en el

citosol la célula lo almacena principalmente en la vacuola. Durante su síntesis, el malato genera protones y durante su degradación libera  $\text{OH}^-$  por lo que se cree que está involucrado en el mantenimiento del pH del citosol. Se ha observado que el transportador vacuolar de malato AtMDT es capaz de transportar malato al interior de la vacuola y que la acidificación del citosol estimula la expresión de este gen por lo que se cree que su actividad es clave para el mantenimiento del pH del citosol (Hurth et al., 2005; Martinoia et al., 2007).

Se han encontrado dos unigenes similares al de la proteína hidrofóbica RCI2A (*Race cold inducible 2A*) de *Arabidopsis* entre los resultados del experimento de micromatrices. Se trata de un gen que se induce bajo condiciones de frío, salinidad, estrés hídrico y aplicación de ABA (Nylander et al., 2001; Medina et al., 2001). Expresado en levadura protege contra la entrada de  $\text{Na}^+$  (Navarre y Goffeau, 2000). Uno de los unigenes similares a RCI2A es específico de EH (aCL734Contig2, AT2G38905), estando presente en hojas y raíces con unos factores de inducción de 3,4 y 7,4, respectivamente. El otro unigen similar a RCI2A (aCL231Contig2, AT2G38905) se encuentra entre los unigenes comunes a EH y ER y se induce tanto en hojas como en raíces. Lo mismo sucede con los genes de dos transportadores de calcio, el antiportador de  $\text{Ca}^{2+}$  CAX2 (aCL4055Contig1, AT3G13320), y la ATPasa transportadora de  $\text{Ca}^{2+}$  ACA8 (aCLContig5, AT5G57110) que se inducen en los experimentos de EH y ER tanto en hojas como en raíces. Estos unigenes podrían formar parte de una respuesta más general a estrés.

Entre el grupo de unigenes reprimidos hay que destacar los de las acuaporinas, proteínas involucradas en el paso de agua a través de las membranas. Entre los unigenes reprimidos en raíces específicos de EH, encontramos un unigen similar al de la acuaporina de la membrana plasmática PIP2;1 (aCL165Contig1, AT3G53420) y otro similar al de la acuaporina vacuolar TIP1;2 (aCL62Contig1, AT3G26520) con unos factores de represión de 5,5 y 2,6 respectivamente. Estos dos unigenes también se reprimen en hojas pero en este caso la represión se produce tanto en el experimento de EH como en el de ER, por lo que su represión en hojas parecer ser una respuesta general a estrés. La hibridación de una micromatriz que contiene todos los miembros de la familia de las acuaporinas de *Arabidopsis* ha permitido determinar que los niveles de transcrito de la mayor parte de ellas, entre las que se encuentran PIP2;1 y TIP1;2, disminuyen durante el estrés hídrico (Alexandersson et al., 2005).

### **Fotosíntesis**

El déficit hídrico puede limitar la fotosíntesis a través de la reducción de la entrada de  $\text{CO}_2$  por el cierre de estomas o por la alteración de otros procesos metabólicos (Lawson et al., 2003). La energía luminosa no puede ser usada productivamente debido a la inhibición de la asimilación de  $\text{CO}_2$  siendo la planta capaz de reprimir la expresión de genes asociados con el proceso fotosintético para reducir la energía luminosa absorbida y evitar la diferencia entre la energía luminosa absorbida y su utilización (Reddy et al., 2004).

En cítricos la mayor parte de la respuesta asociada al proceso fotosintético se observa en hojas, detectándose la represión de numerosos unigenes relacionados con la fotosíntesis entre los unigenes comunes a los experimentos de EH y ER (Tabla 8, Anexo II). Parece ser que la reducción del proceso fotosintético aunque se produce bajo condiciones de estrés hídrico no es específica de este estrés sino que forma parte de una respuesta de la planta ante el estrés en general.

Entre los unigenes reprimidos en hojas comunes a EH y ER, encontramos unigenes relacionados con la Rubisco (Ribulosa bifosfato carboxilasa), como el gen de la Rubisco activasa (aCLContig1, 2 y 3, AT2G39730) y genes de las subunidades pequeñas 1B y 3B de la Rubisco (aCL43Contig4, AT5G38430; aCL43Contig2 y 3, AT5G38410). La pérdida de la actividad de la rubisco se ha detectado en varias plantas bajo condiciones de estrés hídrico (Parry et al., 2002; Chaitanya et al., 2003).

Otro grupo de genes que también se encuentran reprimidos tanto en el experimento de EH como en el de ER, son los relacionados con la captación de la energía luminosa como los genes de las subunidades W y X del Fotosistema II (aCL1139Contig1, AT2G30570; aC07004F12SK\_c, AT2G06520), de las subunidades N, G, H, D, y K del Fotosistema I (aCL1971Contig1, AT5G64040; aCL223Contig1, AT1G55670; aCL2388Contig2, AT1G52230; aCL2579Contig2, AT4G02770; aCL2714, AT1G30380), del citocromo Cy b<sub>6</sub>f ( aCL42Contig1, AT2G26500), de la plastocianina (aCL756Contig1, AT1G76100) y de la ferredoxina (aCL6164Contig1, AT4G14890) (Tabla 8, Anexo II).

### **Proteínas sin anotación funcional y proteínas sin homólogo de *Arabidopsis***

Entre los unigenes específicos del experimento de estrés hídrico, los unigenes específicos del experimento control o rotura y los unigenes comunes a ambos experimentos, hay un grupo de unigenes de función desconocida ya sea porque no tienen homología con ningún gen de la bases de datos públicas o porque la proteína mas similar de *Arabidopsis* no tiene función.

En concreto entre los unigenes específicos del experimento de estrés hídrico encontramos un grupo de unigenes cuyo valor de inducción o represión es >1,5 y que serían posibles candidatos a ser genes nuevos de respuesta a estrés hídrico o genes específicos de respuesta a estrés hídrico en cítricos (58 unigenes en total, Tablas suplementarias de la 3 a la 6).

## **4. Validación de los datos del experimento de micromatrices para unigenes seleccionados**

Entre los unigenes inducidos y reprimidos específicos del experimento de estrés hídrico (EH) (Figura 19) se seleccionaron 6 unigenes para ser validados por RT-PCR semicuantitativa. La selección de estos candidatos se basó en su implicación en la respuesta al estrés hídrico en otras especies vegetales, planteándose la posibilidad de que sean objeto de futuros estudios.

Las reacciones de RT-PCR semicuantitativa se han realizado sobre muestras control (C), muestras sometidas al experimento de estrés hídrico (EH), muestras sometidas al experimento control o de rotura (ER) y muestras sometidas a estrés hídrico con aplicación de PEG (ver apartado 2 de Materiales y Métodos). En todos los casos se han utilizado sólo las muestras de las plantas sometidas a 5 horas, ya que como se ha visto anteriormente (apartado 3.3 resultados), a este tiempo ya se ha alcanzado la mayor parte de la inducción o represión del transcrito en la mayoría de los unigenes. Se han utilizado tanto muestras de hoja como de raíz.

Los resultados de la RT-PCR se pueden ver en la figura 19 junto con los valores obtenidos en el experimento de micromatrices para cada uno de los unigenes. En todos los casos las tendencias de inducción y represión observadas en el experimento de micromatrices se han podido confirmar por los niveles de transcrito detectados en la RT-PCR. Además, en algunos de ellos, se ha ampliado la información obtenida en las micromatrices sobre su comportamiento.

El unigen **aCL2181Contig1**, que codifica una **Rafinosa sintasa**, en el experimento de micromatrices aparece inducida en raíces de plantas sometidas a EH. La RT-PCR ha confirmado que durante el EH se produce una acumulación del transcrito a niveles muy superiores que en las raíces de plantas control (C) y plantas sometidas

a transplante (ER). Además la RT-PCR nos ha revelado que también se produce una acumulación del transcrito en hojas bajo EH aunque esta acumulación no es tan significativa como en raíces ya que los niveles de acumulación son solo ligeramente superiores a los de hojas de plantas control y sometidas a transplante (ER).

El unigen **aCL174Contig2**, que codifica una **P5CS (1-pirrolina-5-carboxilato sintasa)**, aparece inducida en hojas de plantas sometidas a EH en el experimento de micromatrices. Esto se ve confirmado por la RT, tras la detección de una gran acumulación de transcrito en hojas de plantas sometidas a EH respecto a las hojas de plantas control (C) y sometidas a transplante (ER). Además se ha detectado por RT el mismo comportamiento en raíces.

Los unigenes **aCL6Contig21**, **aCL6Contig7** y **aCL6Contig16** que codifican una **dehidrina COR15** y los unigenes **aCL22Contig1** y **aCL22Contig3** que codifican una **ACCOxidasa**, aparecen como inducidas tanto en hojas como en raíces en el experimento de micromatrices.

La dehidrina COR15 aparece inducida en hojas y raíces de plantas sometidas a EH y plantas transplantadas (ER) en el experimento de micromatrices, siendo los valores de inducción mayores en EH en ambos tejidos. Esta tendencia se ha detectado claramente en la RT-PCR, donde en hojas de plantas sometidas a EH aparece un claro aumento de la acumulación del transcrito respecto a las muestras control y ER. En raíces también se produce un aumento en la acumulación del transcrito en EH respecto a las muestras control, pero aparece a su vez una acumulación de transcrito en ER, aunque menor que en EH.

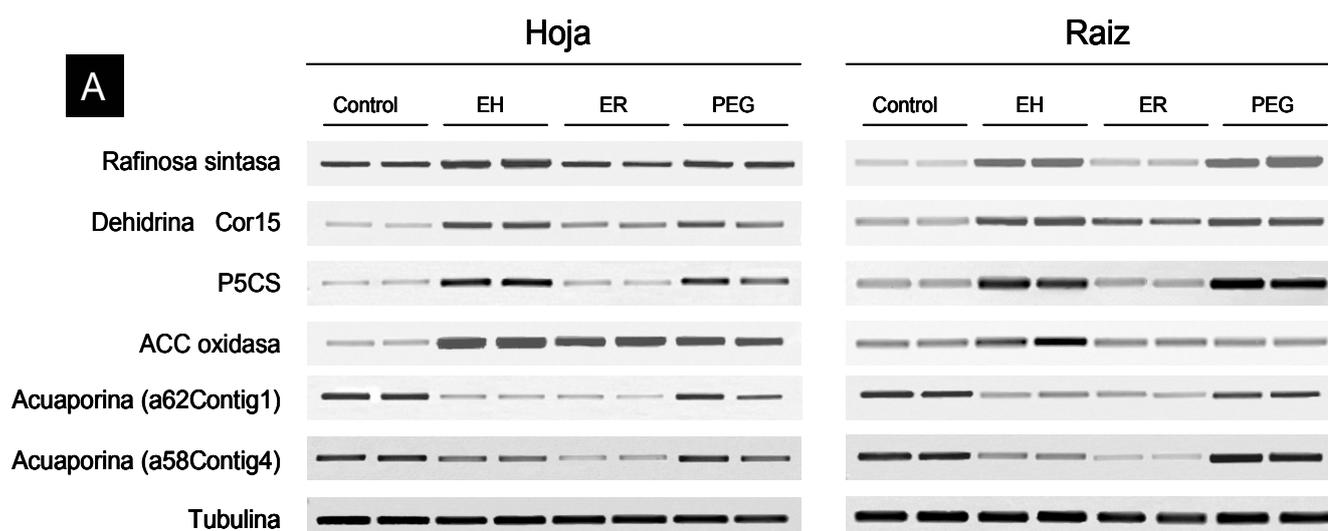
En ACCOxidasa sucede lo contrario. La gran acumulación de transcrito se produce en las raíces de plantas sometidas a EH, mientras que en las hojas hay una acumulación tanto en EH como en ER, siendo la de ER ligeramente menor.

Por último tenemos dos unigenes similares a dos **Acuaporinas** diferentes (**aCL58Contig4** y **aCL62Contig1**) que aparecieron como reprimidos en el experimento de micromatrices en hojas y raíces de plantas sometidas a EH y ER. En la RT podemos ver claramente que los niveles de transcrito en las plantas control son mucho mayores que las sometidas a EH y ER en ambos tejidos para los dos genes.

Además de la confirmación de los resultados del experimento de micromatrices, la RT-PCR nos ha permitido apreciar la existencia de diferentes comportamientos ante las diferentes condiciones de estrés.

Como ya se ha indicado anteriormente, el experimento de aplicación del estrés hídrico se ha realizado transplantando las plantas desde arena húmeda a arena seca y se plantea la posibilidad de que este transplante este influyendo en la respuesta a estrés propiamente dicha. Debido a esta posible influencia, se ha realizado un experimento control o de rotura (ER) en el que las plantas son transplantadas de arena húmeda a arena húmeda y en el que se puede apreciar la respuesta de cada gen frente cualquier factor (distinto del estrés hídrico) que esté afectando a la planta en este momento, principalmente el transplante. De forma complementaria, se ha realizado un experimento de estrés hídrico aplicando PEG. El sometimiento a estrés hídrico mediante la aplicación de solutos permite evitar el transplante de la planta y eliminar este factor del estudio.

Si observamos los resultados de la RT-PCR podemos ver que hay genes que presentan una inducción en EH y en PEG, mientras que los niveles de transcrito se mantienen más bajos e iguales, en control y ER. En estos casos podríamos decir que la acumulación de transcrito que observamos en las muestras sometidas a EH es realmente debida a la influencia del EH y no a la rotura que se produce en el transplante ya que la acumulación de transcrito se produce tras la aplicación de estrés hídrico por dos métodos diferentes, EH y PEG. Esto sucede en casos como los genes de Rafinosa sintasa y P5CS, tanto en hojas como en raíces.

**B**

Unigen (código CFGP) o superunigen	Blast hit	EH-Hojas	Control-Hojas	EH-Raíz	Control-Raíz
aCL2181Contig1	Rafinosa sintasa	-	-	2,4	-
aCL6Contig21, aCL6Contig7, aCL6Contig16	Cor15 dehidrina	5	1,7	5,2	2,7
aCL174Contig2	P5CS (Pirrolina-5-carboxilato sintasa)	2,4	-	-	-
aCL22Contig1, aCL22Contig3	ACC oxidasa	2,2	2	2,1	-
aCL62Contig1	Acuaporina	2,6	2,6	2,3	-
aCL58Contig4	Acuaporina	1,5	3	-	-

Figura 19. RT-PCR semicuantitativa sobre 6 unigenes seleccionados de los resultados del experimento de micromatrices. A. Resultados de la RT-PCR en hojas y raíces para muestras control(C) y muestras sometidas a 5 horas de estrés hídrico (EH), estrés por rotura (ER) y estrés por aplicación de PEG (PEG), en cada uno de los unigenes seleccionados. El número de ciclos de cada unigen fue: Rafinosa sintasa (34 ciclos), dehidrina Cor15 (24 ciclos en hojas y 26 en raíces), Pirrolina-5-carboxilato sintasa (28 ciclos), ACC oxidasa (28 ciclos), Acuaporina (aCL62Contig1) y Acuaporina (aCL58Contig4) (24 ciclos). La tubulina (32 ciclos) fue utilizada para comprobar el uso de la misma cantidad de cDNA en todas las reacciones.

Las amplificaciones se llevaron a cabo por duplicado a partir del cDNA sintetizado de una mezcla equimolecular de RNA total de 4 replicas biológicas de cada condición. Los resultados de cada reacción de PCR se visualizaron corriendo 8µl del producto de la reacción en un gel de agarosa al 1% (w/v).

B. Valores de los ratios de la micromatriz. En rojo se muestran los valores de inducción y en verde los de represión. Las líneas indican que el unigen no ha superado el t-test para un valor de p-value < 0,05.

En otros casos aunque los niveles de transcrito son altos en EH y PEG respecto al control, en ER aparece un pequeño aumento de la acumulación del transcrito pero siempre sin llegar a los niveles del EH y PEG. En estos casos se podría considerar que estos genes no responden exclusivamente a EH, aunque bajo este estrés sufren una gran inducción. Esto sucede en casos como los genes de COR15 en hojas y raíces y el de ACCoxidasa en hojas.

Otro caso sería el de los genes que presentan alto nivel de transcrito en EH pero que los niveles en ER, PEG y control se mantienen iguales aunque en menor grado. Al no confirmarse la inducción de EH con el experimento de PEG podríamos decir que no se trata de un gen inducido exclusivamente por EH y que su inducción es fruto de la interacción del estrés hídrico y el transplante. Este podría ser el caso del gen de la ACC oxidasa en raíces. Debido a la aparición de casos como este se plantea la

necesidad de realizar experimentos de EH que no incluyan el transplante el cual nos puede llevar a falsos positivos.

Por último tenemos los genes de las Acuaporinas. Estos genes muestran unos niveles de transcrito en EH y ER mucho mas bajos que en control y PEG. El igual nivel de transcrito en control y PEG parece indicar que son genes que no están realmente influidos por el estrés hídrico, mientras que la disminución del transcrito en EH y ER se podría deber a la influencia del transplante en ambos casos. Seria otro caso de falso positivo donde la represión no es debida al estrés hídrico.

## 5. Desarrollo de estudios pormenorizados de algunos genes

Las micromatrices nos han dado la oportunidad de realizar una primera aproximación hacia el conocimiento de la respuesta al estrés hídrico en cítricos. A partir de este conocimiento, los posteriores trabajos consistirán en el paso de una visión general a una visión particular de la respuesta a estrés, iniciando así el estudio pormenorizado de algunos genes. Entre los unigenes obtenidos tras el experimento de micromatrices se han seleccionado tres genes correspondientes a Miraculina, Dehidrina COR15 y Rafinosa sintasa, para iniciar el estudio detallado de su relación con la respuesta ante el estrés hídrico.

### 5.1 Miraculinas/Inhibidores de tripsinas

#### 5.1.1. Introducción

La Miraculina es una proteína modificadora del sabor presente en las bayas de un arbusto del oeste de África denominado *Richadella dulcifera*, cuyo nombre común es *Miracle fruit plant* (Kurihara y Beidler M.L., 1968). Esta sustancia no es dulce por si misma pero la lengua humana una vez expuesta a ella, percibe los sabores ácidos como dulces. Se trata de una glicoproteína de 220 aminoácidos que no tiene homología con otras proteínas dulces como taumatina y monelina, pero que sin embargo, tiene homología con los inhibidores de tripsina tipo Kunitz (Subgrupo de inhibidores de serin-proteasas) que se han encontrado originariamente en soja. Su cDNA ha sido clonado y secuenciado (Theerasilp et al., 1989; Masuda et al., 1995).

Un cDNA con homología con el de la miraculina de *Richadella* apareció en un estudio de nematodos en tomate donde se detectó una gran inducción del gen denominado LeMir (*Lycopersicum esculentum miraculin*) en los ápices de las raíces tras una infección con nematodos (Brenner et al., 1998).

Existen numerosos cDNA en las bases de datos, que presentan una secuencia similar a la miraculina de *Richadella* y se les ha denominado "miraculin-like protein (MLP) genes". En ellos también esta presente en el extremo N-terminal, la caja conservada característica de la familia de los inhibidores de tripsina de soja tipo Kunitz (L/I/V/M)-X-D-X-(E/D/N/T/Y)-(D/G)-(R/K/H/D/E/N/Q)-X-(L/I/V/M)-(X)<sub>5</sub>-Y-X-(L/I/V/M) (Laskowski y Kato, 1980). Por tanto se les podría denominar "miraculin-like legume Kunitz trypsin inhibitor proteins" (Shatters et al., 2004).

En el caso de los cítricos, encontramos en las bases de datos públicas 5 cDNA con similitud de secuencia con la miraculina original: miraculin-like protein (*Citrus paradisi*) (AAG38517); miraculin-like protein 2 (*Citrus paradisi*) (AAG38518); miraculin-like protein 3 (*Citrus paradisi*) (AAG38519); miraculin-like protein (*Citrus jambhiri*) (BAE79510); miraculin-like protein 2 (*Citrus jambhiri*) (BAE79511).

Los tres cDNA de *Citrus paradisi*, *lkiL-1*, *lkiL-2* y *lkiL-3*, se han obtenido de una biblioteca construida a partir de flavedo de frutos inmaduros. Se han detectado altos niveles de transcrito de *lkiL-1* y *lkiL-2* en flavedo de frutos inmaduros, hojas jóvenes y hojas desarrolladas. En hojas sometidas a rotura por daño mecánico o por mordedura de insecto, los niveles de transcrito disminuyen respecto a los controles (Shatters et al., 2004). Los dos cDNAs de *Citrus jambhiri*, *RlemMLP1* y *RlemMLP2*, se han obtenido a partir de una biblioteca de hojas de plantas inoculadas con el hongo *Alternaria alternata* (Gomi et al., 2003). Un estudio más detallado de ambos genes (Tsukuda et al., 2006), determinó la acumulación del transcrito en frutos pero no en hojas de plantas no infectadas. Tras inocular las hojas con esporas de dos cepas de *A. alternata* no patogénicas el hongo indujo la expresión de ambos genes en hojas. También se observó inducción tras daño mecánico en hojas. Además se demostró que *RlemMLP1* y *RlemMLP2* tienen actividad de inhibidor de proteasas, siendo esta la primera evidencia de que los productos de los genes denominados MPL tienen actividad de inhibidores de proteasas. En el caso de *RlemMLP2* además tiene una actividad antifúngica. Estas dos funciones sugieren que están involucradas en la defensa de las plantas.

Son numerosos los estudios de inhibidores de proteasas en plantas que apuntan a que juegan un papel importante en la defensa contra insectos fitófagos inhibiendo la digestión con tripsina de los alimentos. (Christeller et al., 1992; Johnston et al., 1995; De Leo et al., 2001; Macedo et al., 2003). Sin embargo, la principal función de los inhibidores de proteasas en plantas es regular la proteólisis de la célula inhibiendo las proteasas endógenas (Ryan, 1989). Se considera que la actividad de las proteasas es un mecanismo regulador (Callis, 1995). La degradación y reciclado de proteínas, que depende de los niveles de enzimas proteolíticas, es parte esencial de la respuesta de la planta ante estreses ambientales (Ingram y Bartels, 1996; El Maarouf et al., 1999). Es sabido que durante procesos senescentes se produce un incremento de la actividad proteolítica (Huffaker, 1990). La sequía puede producir senescencia y la activación coordinada de proteasas e inhibidores de proteasas puede jugar un papel importante en el control de la proteólisis permitiendo la movilización selectiva de proteínas durante este periodo (Harrak et al., 2001; Chen et al., 2002a; Guo y Gan, 2005). Hay algunos ejemplos de inhibidores de proteasas tipo Kunitz inducidos bajo condiciones de estrés hídrico como son el aumento del transcrito de un inhibidor de proteasas tipo Kunitz en hojas de plantas de *Brassica napus* sometidas a estrés hídrico (Downing et al., 1992) y la inducción en patata de otro inhibidor de proteasas por aplicación de ABA y durante un periodo de sequía. En arroz la sobreexpresión del inhibidor de proteasas *OCPI1* mejora el crecimiento de las plantas durante un periodo de sequía (Huang et al., 2007).

### 5.1.2. Miraculinas de cítricos bajo condiciones de estrés hídrico

#### Estudio de secuencia de las miraculinas de cítricos

En el experimento de micromatrices se observó la presencia de distintos unigenes (aCL1Contig12, aCL297Contig1, aCL297Contig2, aCL1Contig19, aCL1Contig1, aCL1Contig13, aCL1Contig5, aCL1Contig33, aCL1Contig11, aCL1Contig10) cuya anotación funcional correspondía con una de las tres miraculinas de pomelo (*Citrus paradisi*) existentes en las bases de datos públicas: miraculin-like protein (*Citrus paradisi*) (AF283532), miraculin-like protein 2 (*Citrus paradisi*) (AF283533) y miraculin-like protein 3 (*Citrus paradisi*) (AF283534).

Tras la búsqueda de unigenes con anotación funcional “miraculina” en la base de datos del CFGP, se encontró un grupo de homólogos a los seleccionados del

experimento de micromatrices. El posterior alineamiento de todos ellos, nos reveló la existencia de 6 superunigenes que presentan una elevada homología de secuencia (Figura 20). Apoyados en la presencia del motivo conservado característico de los inhibidores de tripsina de soja (Subgrupo de los inhibidores de serín-proteasas) y en la homología con la miraculina de *Richadella dulcifera* que presentan los inhibidores de tripsina de cítricos, estos superunigenes se denominaron: CcMLP1, CcMLP2, CcMLP3, CcMLP4, CcMLP5 y CcMLP6 (Citrus Clementina miraculin like protein). Tras realizar un alineamiento con el programa ClustalW (Thompson et al., 1994) con otras miraculinas de cítricos, se comprobó que la secuencia de los superunigenes denominados CcMLP1, CcMLP2 y CcMLP3 presenta una homología a nivel de aminoácido de un 100% con las tres miraculinas de pomelo, IkiL-1, IkiL-2 y IkiL-3, respectivamente. El superunigen CcMLP1 presenta a su vez una homología del 97% con la secuencia de aminoácidos de RLemMLP1, de *Citrus jambhiri*. (Tsukuda et al., 2006). CcMLP5 y CcMLP6 presentan una homología de 98 y 87%, respectivamente, con la secuencia de RLemMLP2 de *Citrus jambhiri*. (Tsukuda et al., 2006). La secuencia del superunigen CcMLP4 solo presenta una homología del 54% con la secuencia de RLemMLP2 de *Citrus jambhiri*. Parece que CcMLP4 y CcMLP6 son dos miraculinas de cítricos nuevas que al igual que el resto de miraculinas, forman parte de los inhibidores de tripsina tipo Kunitz incluidos dentro de la familia de los inhibidores de serín-proteasas (Figura 21).

#### Expresión de las miraculinas de cítricos

Debido al gran parecido entre las secuencias de todas las miraculinas y a la utilización de una micromatriz de cDNA, se planteó la hipótesis de que se podría estar produciendo hibridación cruzada. Por tanto, los resultados que se observan no corresponden a cada uno de los unigenes sino a una mezcla de ellos. Existen evidencias de que hay inhibidores de proteasas con muchas isoformas y que cada una de ellas tiene una función (Mosolov et al., 2001; Krishnan, 2001)

Para determinar qué miraculinas estaban interviniendo en el proceso de estrés hídrico se realizó una RT-PCR semicuantitativa de cada una de ellas, utilizando *primers* específicos. Al igual que el resto de unigenes sujetos a RT-PCR, en este caso también se han utilizado muestras control (C), muestras sometidas al experimento de estrés hídrico (EH), muestras sometidas al experimento control del transplante o de rotura (ER) y muestras sometidas a estrés hídrico con aplicación de PEG (ver apartado 2 de Materiales y Métodos). En todos los casos se han utilizado sólo las muestras de las plantas sometidas a 5 horas, ya que como se ha visto anteriormente (apartado 3.3 resultados), a este tiempo ya se ha alcanzado la mayor parte de la inducción o represión del transcrito en la mayoría de los unigenes. Se han utilizado tanto muestras de hoja como de raíz.

Del experimento de micromatrices puede concluirse que al menos algunas miraculinas se inducen en hojas de plantas sometidas a estrés hídrico (EH) y plantas sometidas al experimento control del transplante o de rotura (ER), mientras que en raíces se produce una inducción en plantas sometida a estrés hídrico (EH) y una represión en plantas sometidas a ER.

Como resultado de la RT-PCR (Figura 22), podemos ver como las diferentes miraculinas presentan diferentes comportamientos. Las miraculinas CcMLP1 y CcMLP2 no se han podido detectar bajo ninguna de las condiciones estudiadas. En CcMLP3 se produce un aumento del transcrito tanto en hojas como en raíces de plantas sometidas a estrés hídrico (EH) y estrés por transplante (ER), pero no se observa transcrito en plantas sometidas a estrés por aplicación de PEG, lo que nos indica que la inducción que se aprecia en EH y ER es debida a la influencia del transplante en ambos casos.

cCMLP1	MKTSLVTTLS	FLILALATKP	---QLGASES	EHLLDVYGNQ	VDSSTRYYIV		
cCMLP2	MKTSLITTTLS	FLILTLATQP	--LLGISSNS	EPVLDIIGNK	VKSTLEYKLI		
cCMLP3	MKTSFVVKLS	FLILALATKA	--QLGTS-ES	EHVLDVYGNK	VESNLEYKIL		
cCMLP4	MSTPFVTAIS	FLLLTFFATKP	----LVGLA	DELVDVNGNK	VEASRDYYIV		
cCMLP5	MKISLATTTLS	FLILALASNS	LLVLGTSSVP	EHLLDVNGNK	VESTLQYYIV		
cCMLP6	MKTLLATILS	FLILALASCP	LLVLGTSSVP	EHLLDVNGNK	VESTLOYHIV		
cCMLP1	SALWGVTGG	GISADKGNK	QCPTDVIQLS	PKDKRGKNLG	LLPYDNSTIV		
cCMLP2	PVLGD---AG	GFSTHLGTNG	QCPLDVIQLS	SPSERGDNLK	LLPYDNYKIV		
cCMLP3	EVKNGT--SG	GFSIHGGTSG	ECPLDVVQLS	SPTERDHYVR	LLPFDNSTVV		
cCMLP4	SAIRGAG-GG	GLTLFRGRNE	LCPLDVVQLS	SDSERGTRLR	FSMYDKTSII		
cCMLP5	SAIWGAG-GG	GVSLHGGRNG	YCPLDVIQLP	SDMQNGIELT	LSPYNNSTIV		
cCMLP6	SAIWGAG-GG	GVSLHGGRNG	YCPLDVIQLP	SAIQWGKKLI	LSPYDNSTIV		
cCMLP1	RESTNIKKLF	SRVSS-LQQC	NKDSLWKVDN	DNASLGKQFI	TIG--EG---		
cCMLP2	KVSTDVNLRF	PVKVS-VKPC	NEEPLWKVDS	YDDPL----I	VTGGSEGHPG		
cCMLP3	RESTDNLN--	-----	-IEPVWTVGN	YNDSLKWFEL	TTGGIIGHPG		
cCMLP4	NEDVDLNVRF	STETR----C	NEPTVWRVDS	YDPSRGKWF I	TTGGVEGNPG		
cCMLP5	RESTDNLNRF	SVLLSGRDYC	NEQPLWKVDN	YDASGKWF I	TTGGLDGHPG		
cCMLP6	RESTDNLNRF	VGLLSGSKQC	NELPLWKVDN	YDASSGRWF I	TTGGLDGHPG		
cCMLP1	-KTCQNEFFKL	EKVS----AS	IFDMKIALDI	PCLYKIVHCS	TLVNGSCDTL		
cCMLP2	AETLLNWFKI	EKAGNFSYGG	VYNIVHCPSV	-CLS-----	-----CPRR		
cCMLP3	AKTLLNWFKL	EKVS----VS	IYNLVHCPSV	-CDS-----	-----CVKL		
cCMLP4	AQTLKNWFKF	ERIG--RDRA	TYKIVHCPSV	-CES-----	-----CVSL		
cCMLP5	AETLLNWFKL	EKIG--NFPG	TYKIVHCPSV	-CES-----	-----CVKL		
cCMLP6	AETLLNWFKL	EKT---NLPG	AYKIVHCPSV	-CES-----	-----CVKL		
cCMLP1	CKDVGV-SNV	DGVQRLVVVD	DNDQPNLPLP	VVLFPADSGR	SMLFPSL---	-----	232
cCMLP2	CNKIGV-STK	DGVRRLLVG	DHE---PALN	VLFPPSEESS	RLQAANAIS	RFEEAAEAISMTA	236
cCMLP3	CNKVGI-FYV	DGVRRLVLVR	DDD---QPLR	VVLFPPAPNPS	R-----	-----SSM--	205
cCMLP4	CNDVG--SN	DHARRLALTN	G-----RALA	VVLPVGNERS	ASCAS-----	-----	213
cCMLP5	CNNVGR-SFE	DGVRRLVLVR	DDE---PAFP	VVLIPTERS	TSV-----	-----	223
cCMLP6	CSSVGRSFE	DGVRRLVLVR	DDE---PAFP	VVLIPTERS	TSV-----	-----	223

Figura 20. Secuencia de aminoácidos de los 6 superunigenes de miraculina, CcMPL1, CcMPL2, CcMPL3, CcMPL4, CcMPL5 y CcMPL6 (*Citrus Clementina miraculin like protein*). La caja conservada característica de la familia de los inhibidores de tripsina de soja (*(L/I/V/M)-X-D-X-(E/D/N/T/Y)-(D/G)-(R/K/H/D/E/N/Q)-X-(L/I/V/M)-(X)<sub>5</sub>-Y-X-(L/I/V/M)*) se encuentra enmarcada con un cuadro rojo.

Esto mismo sucede con CcMPL5 y CcMPL6 en hojas, donde los niveles de transcrito en EH y ER aumentan pero este aumento es mucho menor en PEG. También se presenta el mismo caso en CcMPL5 en raíces, donde CcMPL6 no ha podido ser detectada.

En CcMPL4 se produce un aumento del transcrito en hojas de plantas tratadas con PEG, sin embargo no se detecta en hojas de plantas sometidas a estrés hídrico (EH) y plantas sometidas al experimento control del transplante o de rotura (ER). Por tanto, el bajo nivel de transcrito en estos casos puede deberse a la influencia del transplante. En raíces, CcMPL4 sufre un aumento del transcrito en plantas sometidas a PEG y EH, pero no en plantas sometidas a ER. Esto nos indica que en raíces no se produce una influencia del transplante sobre la expresión de este gen como sucede en hojas.

A la vista de estos resultados podemos decir que de las cinco miraculinas la única específica de estrés hídrico es CcMPL4 tanto en hojas como en raíces. Los niveles de transcrito detectados en CcMPL3, CcMPL5 y CcMPL6 parecen estar influidos por la rotura producida durante el transplante. Los datos obtenidos en la

micromatriz son el fruto de la hibridación cruzada de CcMLP3, CcMLP4, CcMLP5 y CcMLP6. Estos resultados, unidos al estudio de secuencia realizado en el apartado anterior, apuntan a que CcMLP4 se presenta como una nueva miraculina de cítricos involucrada en la respuesta a estrés hídrico.

Los estudios realizados con miraculinas en cítricos se han llevado a cabo para determinar su relación con la defensa de la planta contra estreses bióticos (Shatters et al., 2004; Tsukuda et al., 2006). Según nuestros resultados podemos ver que puede producirse el aumento de los niveles de transcrito de algunas de ellas bajo condiciones de estrés abiótico, no solo en rotura, que se podría relacionar con la propia rotura que sufre la planta ante un estrés biótico sino también bajo condiciones de estrés hídrico.

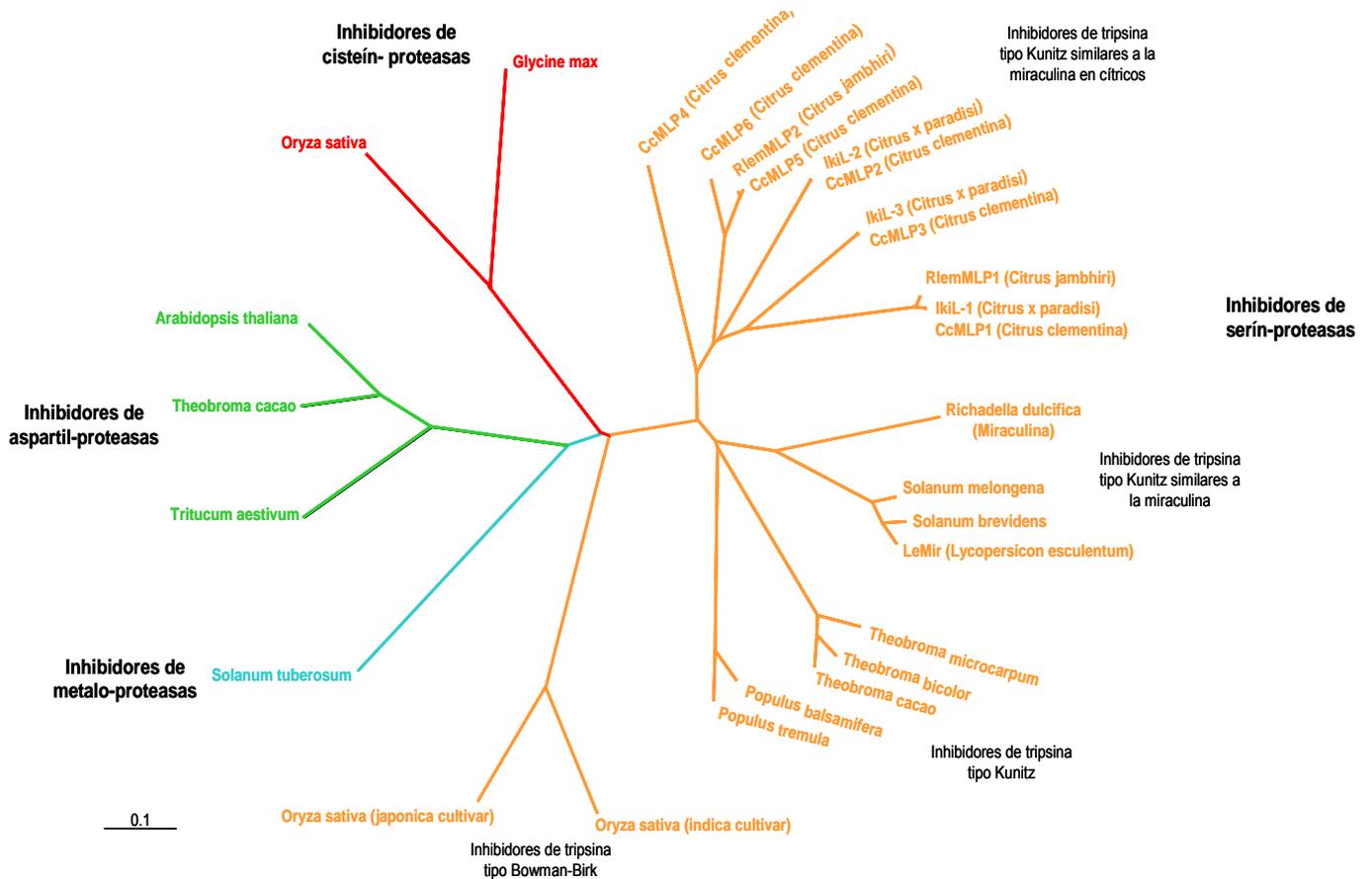


Figura 21. Árbol filogenético para situar las miraculinas de cítricos. Albol filogenético entre secuencias representantes de las cuatro familias de inhibidores de proteasas y las secuencias de las miraculinas de cítricos. En el árbol se puede apreciar que las miraculinas se encuentran entre los inhibidores de tripsina tipo Kunitz que forman parte de la familia de los inhibidores de serín-proteasas. El árbol está formado por las siguientes secuencias: Inhibidores de cisteín-proteasas (*Oryza sativa*, AAA33903; *Glycine max*, BAA19608); Inhibidores de aspartil-proteasas (*Arabidopsis thaliana*, AAC49730; *Theobroma cacao*, CAC86004; *Triticum aestivum*, BAE20414); Inhibidores de metalo-proteasas (*Solanum tuberosum*, CAC48227); Inhibidores de serín-proteasas: Subfamilia de inhibidores de tripsina, A) tipo Bowman-Birk (*Oryza sativa*, japonica cultivar, BAB52866; *Oryza sativa*, indica cultivar, CAB88209), B.1) tipo Kunitz (*Theobroma microcarpum*, AAV41234; *Theobroma bicolor*, AAV41233; *Theobroma cacao*, CAA39860; *Populus balsamifera*, AAQ84217; *Populus tremula*, CAI77802), B.2) tipo Kunitz similares a la miraculina (*Richadella dulcifica* (miraculina), BAA07603; *Lycopersicon esculentum* (LeMir), AAC63057; *Solanum melongena*, BAA82843; *Solanum brevidens*, AAQ96377), B.2) tipo Kunitz similares a la miraculina en cítricos (*Citrus Clementina*, CcMLP1, CcMLP2, CcMLP3, CcMLP4, CcMLP5 y CcMLP6; *Citrus x paradisi*, IkiL-1 (AAG38517), IkiL-2 (AAG38518) y IkiL-3 (AAG38519); *Citrus jambhiri*, RlemMLP1 (BAE79510) y RlemMLP2 (BAE79511)). Las secuencias de las proteínas se alinearon con el programa Clustal y el árbol se ha construido utilizando el programa TreeView.

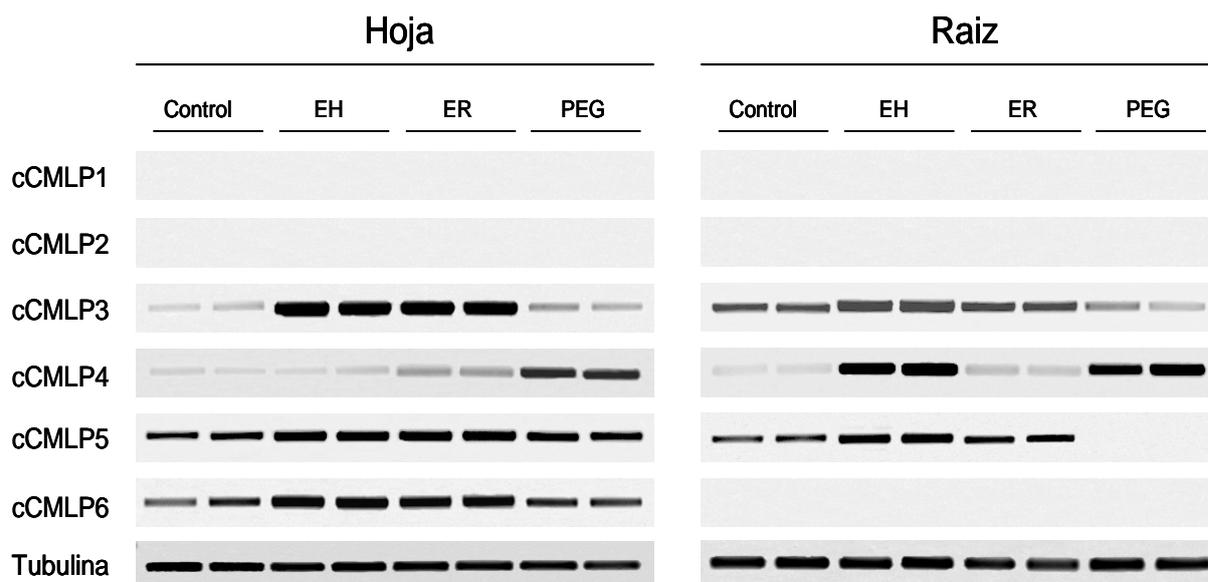


Figura 22. RT-PCR semicuantitativa sobre 6 superunigenes homólogos a miraculina. Se comprobó el nivel de transcrito de los 6 superunigenes de miraculinas seleccionados de los resultados del experimento de micromatrices. Se utilizaron muestras control(C) y muestras sometidas a 5 horas de diferentes estreses, estrés hídrico (EH), estrés por rotura (ER) y estrés por aplicación de PEG (PEG). Las muestras son de hojas y raíces. El número de ciclos de cada unigen fue: cMMLP3 (30 ciclos hojas y 28 ciclos raíces), cMMLP4 (32 ciclos hojas y 30 ciclos raíz), cMMLP5 (30 ciclos en hojas y 34 ciclos en raíces) y cMMLP6 (34 ciclos en hojas). La tubulina (32 ciclos) fue utilizada para comprobar el uso de la misma cantidad de cDNA en todas las reacciones. Las amplificaciones se llevaron a cabo por duplicado a partir del cDNA sintetizado de una mezcla equimolecular del RNA total de 4 replicas biológicas de cada condición.

## 5.2 Dehidrina COR15

### 5.2.1 Introducción

#### Características generales

Se denominan dehidrinas a un subgrupo de las proteínas LEA (late embryogenesis abundant) conocidas como LEA-D11 o LEA tipo 2 (Dure, 1993). Las primeras proteínas LEA se identificaron en estudios sobre el desarrollo del cotiledón de algodón. Es un grupo formado por 18 familias de proteínas con diferentes propiedades y funciones (Hughes y Galau, 1989; Dure, 1993).

Aunque las proteínas LEA sean un grupo muy heterogéneo a nivel de proteína, una característica común en la mayoría de ellas es que se acumulan principalmente durante los estadios tardíos del desarrollo embrionario (fases de desecación de la semilla), en respuesta a bajas temperaturas, aplicación de ABA o cualquier factor ambiental que lleve asociado un proceso de deshidratación, como por ejemplo estrés hídrico, salinidad o congelación (Close, 1996).

Se suelen localizar en el núcleo y el citoplasma y presentan una serie de rasgos comunes como una extrema hidrofiliidad, solubilidad y estabilidad a altas temperaturas y la presencia de una serie de secuencias muy conservadas. Además

son proteínas presentes en un gran rango de organismos fotosintéticos, como angiospermas, gimnospermas, helechos, algas y bacterias (cianobacterias).

##### Características a nivel de secuencia

La primera secuencia publicada de una dehidrina fue la RAB21 de arroz (Mundy y Chua, 1988). Su rango de tamaños se encuentra entre 9 y 200 KDa. Su principal característica es una secuencia conservada de 15 aa rica en lisina (EKKGIMDKIKEKLP) y a la cual se le denomina segmento K. Esta secuencia forma una hélice  $\alpha$  anfipática (Segrest et al., 1990; Dure, 1993). Se cree que uno de los papeles que puede tener el segmento K es la interacción hidrofóbica con proteínas parcialmente desnaturalizadas o con membranas. Esta secuencia está altamente conservada tanto en plantas superiores como inferiores y su número puede variar de 1 a 11 copias. Muchas dehidrinas también contienen una región rica en residuos de serina que se denomina segmento S. Se ha demostrado que esta región es fosforilable (Villard et al., 1990; Godoy et al., 1994; Goday et al., 1994) y que esta fosforilación está relacionada con localización nuclear. Otra secuencia conservada es (V/T)DEYGNP, denominada segmento Y, que se encuentra cerca del amino terminal. La mayoría de estos genes existen en muchas copias.

Su clasificación se basa en la presencia y distribución de estas secuencias conservadas (YSK) y otras secuencias menos conservadas (segmento  $\Phi$ ) que se distribuyen y repiten entre las mismas. Usando la nomenclatura YSK, las dehidrinas se dividen en cinco tipos (Close, 1996):  $Y_nSK_2$ ,  $K_n$ ,  $K_nS$ ,  $SK_n$  y  $Y_2K_n$ .

##### Función de las dehidrinas

Aunque los estudios son numerosos, las funciones de las dehidrinas no están del todo claras. Por sus características estructurales, se cree que se pueden unir a moléculas intracelulares, especialmente membranas y macromoléculas nucleares y citoplasmáticas, principalmente por interacción hidrofóbica, actuando como estabilizadores estructurales con propiedades de chaperona (Close, 1997). Hay evidencias de su papel protector frente al daño producido por el déficit hídrico (Koag et al., 2003) aumentando la estabilidad de las proteínas previniendo su coagulación durante estreses ambientales y manteniendo el agua en las células deshidratadas (Ingram y Bartels, 1996).

En muchas de ellas se ha detectado actividad anticongelante, como en las dehidrinas de *Prunus*, tras observar la formación de cristales de hielo en solución (Wisniewski et al., 1999). Algunas dehidrinas poseen actividad crioprotectora para enzimas sensibles al frío, como las dehidrinas de *Spinacia oleracea* (Kazuoka y Oeda, 1994), *P.persica* (Wisniewski et al., 1999) y trigo (Houde et al., 1995). De todas formas no se puede decir que la actividad crioprotectora y anticongelante sean las principales funciones ya que estos genes se inducen por otros estreses además del frío.

##### Dehidrinas de cítricos

Los estudios sobre dehidrinas se centraron en un principio en plantas herbáceas pero recientemente se han realizado estudios en plantas leñosas como por ejemplo, *Prunus persica* (Arora y Wisniewski, 1994; Wisniewski et al., 2006), *Malus domestica* (Wisniewski et al., 1996), *Populus species* (Pelah et al., 1997), *Salix caprea* (Sauter et al., 1999), *Betula pubescens* (Rinne et al., 1998), *Vaccinium species* (Muthalif y Rowland, 1994) y *Rhododendron species* (Lim et al., 1999; Arora y Lim, 2005).

Las primeras dehidrinas en cítricos, **COR11** (11.4kDa; 106aa) y **COR19** (19.8kDa; 179aa), se encontraron en *Poncirus trifoliata* (Cai et al., 1995). Estos genes se obtuvieron en un estudio sobre los procesos de tolerancia a la congelación a partir

de la exposición de la planta a un periodo de bajas temperaturas, lo que se denomina aclimatación, (COR, cold-regulated genes), siendo los primeros genes, inducidos por frío, caracterizados en este género. En otro estudio también relacionado con la resistencia al frío (Hara et al., 1999), se consiguió aislar y caracterizar el gen COR19 en *Citrus unshiu* Marcov., denominándose **CuCOR19** (18.9kDa; 171aa).

Hay un momento donde la resistencia al frío es muy importante, el periodo poscosecha. En este sentido, se encontró **COR15** (15.1kDa; 137aa) en *Citrus paradisi* (Porat et al., 2002), en estudios que se centran en el fruto y en como ciertos tratamientos pueden mejorar la tolerancia de los frutos al frío durante el proceso de conservación, ya que en muchas ocasiones el frío necesario para conservar provoca daños (Porat et al., 2000a; Porat et al., 2000b). Otra nueva dehidrina con una gran homología con la de pomelo, **CrCOR15** (15,2kDa; 138aa), se ha encontrado en mandarina Fortune (*Citrus clementina* Hort. Ex Tanaka x *Citrus reticulata* Blanco) implicado en la adquisición de tolerancia al frío del fruto (Sanchez-Ballesta et al., 2004).

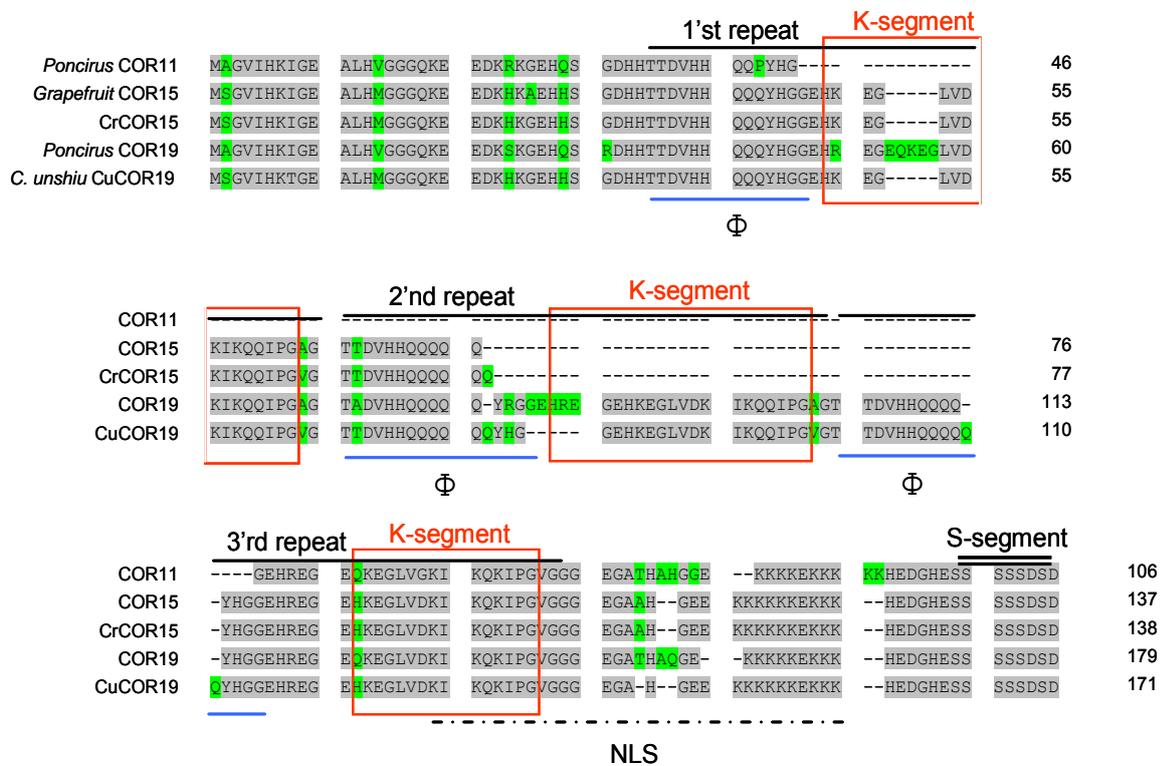


Figura 25. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las dehidras COR de cítricos. COR11 y COR19 (*Poncirus trifoliata*), CuCOR19 (*Citrus unshiu* Marcov.), COR15 (*Citrus paradisi*) y CrCOR15 (*Citrus clementina* Hort. Ex Tanaka x *Citrus reticulata* Blanco). Los aminoácidos idénticos están sombreados y los aminoácidos diferentes están en verde. El segmento conservado K está enmarcado en rojo. Con una línea negra se indican las repeticiones en tandem, con una doble línea negra la posición del segmento S, con una línea discontinua negra el NLS y con una línea azul el segmento  $\Phi$ .

Estas cinco dehidras encontradas hasta ahora en cítricos tienen una gran homología a nivel de proteína. Según la clasificación de las dehidras (Close, 1996), se encuentran dentro del grupo  $K_nS$ . Si observamos su alineamiento (Fig.25) podemos distinguir tres tipos según el número de segmentos K. La proteína COR11 es KS, las COR15 y CrCOR15 son  $K_2S$  y las COR19 y CuCOR19 son  $K_3S$ . Estas dehidras de cítricos pertenecen a una subfamilia que se caracteriza por un segmento K inusual, que es más parecido al de gimnospermas que al de angiospermas, una secuencia

conservada S que se encuentra en el C-terminal y una secuencia similar a la NLS (*nuclear localization signal*), KIKQKIPGVGGGEA.....KMKKKEKMK (Dingwall y Laskey, 1991), presente en las proteínas nucleares de numerosos organismos (como tabaco, levadura, maíz). La presencia de esta secuencia podría indicar que estas proteínas pueden ser transportadas dentro del núcleo.

Recientemente se ha determinado un nuevo tipo de dehidrina (SK<sub>2</sub>) con un segmento K parecido a angiospermas. Se ha aislado el gen *csDHN* de naranja "Navel" (*Citrus sinensis*) y su homólogo en *Citrus paradisi*, *cpDHN* (Porat et al., 2004). Esto es una evidencia de que los cítricos contienen diferentes tipos de dehidrinas, unas con el segmento K de angiospermas y otras con el de gimnospermas.

#### Expresión de las dehidrinas de Cítricos

El análisis de los patrones de expresión de las dehidrinas en distintas especies de cítricos, tanto en tejidos vegetativos como reproductivos, se ha centrado sobretodo en el estudio de su expresión bajo condiciones de frío. Los niveles de transcrito de *COR11*, *COR19* y *CuCOR19* aumentan en hojas (Cai et al., 1995; Hara et al., 1999) y los de *COR15* y *CrCOR15* en flavedo (Porat et al., 2002; Sanchez-Ballesta et al., 2004) bajo condiciones de frío.

También se han determinado los niveles de transcrito bajo otras condiciones de estrés. En hojas, los genes *COR11* y *COR19*, no sufren ninguna inducción bajo condiciones de salinidad y estrés hídrico y en *CrCOR15* se detecta un aumento progresivo de los niveles de transcrito durante el periodo de aplicación del estrés hídrico.

A nivel proteico se han realizado estudios con la proteína CuCOR19 (Hara et al., 2001), observándose que aunque en hojas se produce una acumulación de transcrito bajo aplicación de ABA, NaCl y sobretodo bajo condiciones de frío, la proteína solo se acumula bajo condiciones de frío.

#### **5.2.2 Detección de la proteína COR15 en plantas sometidas a estrés hídrico**

Según el experimento de micromatrices este gen está inducido en hojas y raíces de plantas sometidas a estrés hídrico (EH) respecto a plantas control. Esta tendencia se ha confirmado mediante una RT-PCR semicuantitativa (Fig.21) además de detectarse un aumento en los niveles de transcrito en hojas y raíces de plantas sometidas a estrés hídrico por aplicación de PEG respecto a plantas control. Por tanto estamos ante un gen cuyos niveles de mRNA aumentan cuando la planta esta sometida a estrés hídrico (EH y PEG).

Tras estos resultados en la micromatriz y la RT-PCR, se procedió a determinar si el comportamiento frente al estrés hídrico observado a nivel de transcrito se correspondía con el de expresión a nivel proteico.

La secuencia de la zona codificante del gen *CrCOR15* tiene una identidad de un 98% a nivel de secuencia de nucleótidos y de aminoácidos, con la secuencia del superunigen formado por la secuencia de todos los unigenes cuya anotación es COR15 en la base de datos del CFGP. Por tanto, cabe esperar que los anticuerpos contra CrCOR15 sean capaces de detectar la COR15 presente en nuestras muestras.

### 5.2.2.1 Obtención y caracterización del anticuerpo policlonal de la proteína recombinante CrCOR15

La proteína purificada CrCOR15 (Sanchez-Ballesta et al., 2004) se utilizó para obtener anticuerpos policlonales en dos conejos de raza New Zealand (Materiales y métodos). Tras la inyección de varias dosis de proteína en cada uno de los conejos, se determinó la existencia de respuesta inmunológica del animal frente a la proteína mediante un análisis *Western blot* utilizando el suero de cada uno de los animales frente a la propia proteína purificada y frente a extractos proteicos de muestras de hojas de plantas sometidas a 10 horas de estrés hídrico (EH) (Fig. 26). Ambos antisueros (Ac1-CrCOR15 y Ac2- CrCOR15) a una dilución 1:1000, son capaces de detectar proteínas de varios pesos moleculares presentes en la muestra de proteína purificada y en el extracto de proteína de hojas de plantas sometidas a estrés hídrico (EH). Las bandas de mayor intensidad se pueden ver entorno a 18 kDa con lo cual parece que el anticuerpo reacciona con una proteína de igual peso molecular que la que buscamos. Dicha proteína tiene alrededor de 18 kDa ya que la proteína original CrCOR15 tiene un peso molecular de 15,5 kDa pero en el vector de clonaje se añadió 12 aminoácidos a la proteína recombinante, entre los cuales están 6 histidinas. Entre los dos anticuerpos seleccionamos Ac1-CrCOR15 para estudios posteriores ya que parece que es el que tiene menos interacciones inespecíficas con proteínas de peso molecular diferente al deseado.

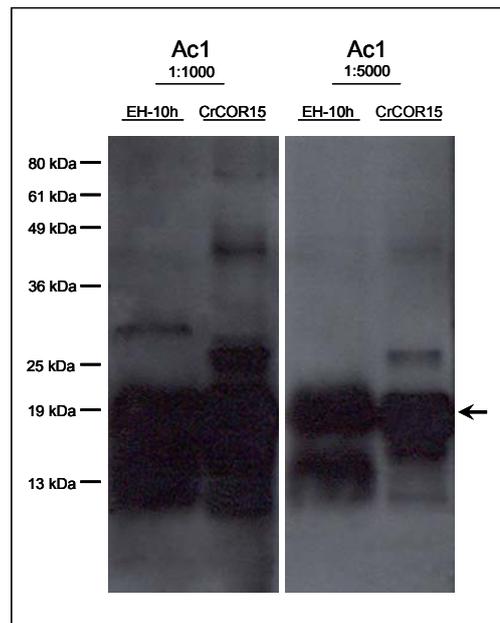


Figura 26. Respuesta inmunológica a la proteína CrCOR15. Análisis *Western-blot* utilizando el anticuerpo Ac1 a una dilución 1:1000 y 1:5000. En el primer carril se cargaron 7  $\mu$ g de extracto de proteína de una muestra de hoja de plantas sometida a 10 horas de estrés hídrico (EH) y en el segundo 0,1  $\mu$ g de proteína CrCOR15 purificada. La flecha indica la detección de proteínas de igual peso molecular que la proteína COR15.

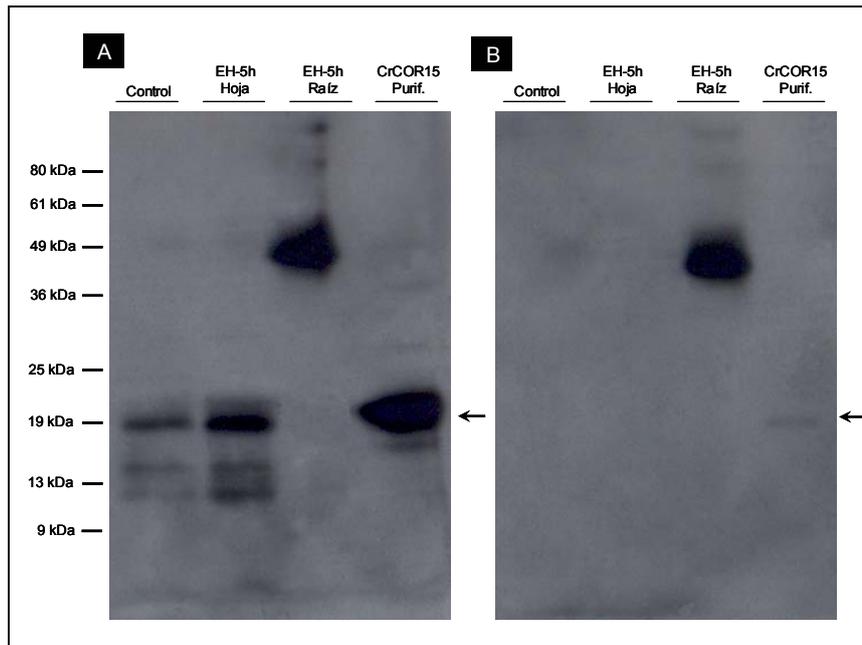


Figura 27. Especificidad del anticuerpo Ac1-CrCOR15. A. Análisis *Western-blot* de muestras de hojas de plantas control (Control), de hojas y raíces de plantas sometidas a 5 horas de estrés hídrico (EH-5h Hoja y EH-5h Raíz) y de proteína CrCOR15 purificada, utilizando el anticuerpo Ac1-CrCOR15. B. Análisis *Western-blot* de muestras de hojas de plantas control (Control), de hojas y raíces de plantas sometidas a 5 horas de estrés hídrico (EH-5h Hoja y EH-5h Raíz) y de proteína CrCOR15 purificada, utilizando el antisuero Ac1-CrCOR15 preincubado con proteína CrCOR15 purificada. La flecha indica la detección de la proteína COR15.

También se realizó una prueba para optimizar la dilución del anticuerpo Ac1-CrCOR15. En la figura 26 podemos ver que a una dilución 1:5000 la unión inespecífica disminuye.

Por último, se hizo un análisis *Western* para la determinación de la especificidad del antisuero. Se utilizaron dos membranas iguales con la muestra de proteína purificada, dos muestras de extracto de proteínas una de hojas y otra de raíces de plantas control y otra de hojas sometidas a 5 horas de estrés hídrico (EH). Durante la realización del *Western*, una de las membranas fue incubada con el antisuero y la otra con el antisuero pre-incubado con la proteína CrCOR15 purificada (Ver protocolo). Como se puede ver en la figura 27A, el antisuero es capaz de detectar la proteína de 18 kDa en la muestra de proteína purificada y en los extractos vegetales. Sin embargo, cuando utilizamos el antisuero pre-incubado con la proteína CrCOR15 recombinante, el antisuero solo es capaz de detectar una proteína de unos 40 kDa que aparece en la muestra de raíz, como vemos en la figura 27B. Este resultado nos indica que la proteína que se detecta a 18 kDa corresponde a la proteína CrCOR15 y que nuestro antisuero es capaz de detectarla pero que el antisuero reacciona actefactualmente con otras proteínas especialmente con una de 40 kDa presente en raíces.

Por tanto, debido a la buena respuesta inmunológica y a su especificidad, se determinó que Ac1-CrCOR15 (dilución 1:5000) era el más adecuado para realizar el análisis *Western* para la detección de la proteína CrCOR15.

### 5.2.2.2 Niveles de proteína COR15 en hojas de plantas sometidas a estrés hídrico

La presencia de la proteína COR15 en hojas y raíces de plantas sometidas a estrés hídrico (EH) se determinó mediante un análisis Western-blot utilizando el anticuerpo policlonal Ac1-CrCOR15.

Como se puede ver en la figura 28 en las muestras de hoja (muestras control y muestras sometidas a estrés hídrico) se aprecia la presencia de la proteína COR15, observándose un aumento progresivo de la cantidad acumulada de proteína a medida que va transcurriendo el tiempo de estrés. Sin embargo, en raíces no se ha podido detectar la proteína COR15, apreciándose una hibridación inespecífica del antisuero Ac1-CrCOR15 a una proteína de unos 40 kDa.

Del pequeño grupo formado por las dehidrininas tipo  $K_nS$  de cítricos (*COR11*, *COR19*, *CUCOR19*, *COR15* y *CRCOR15*) solo tres de ellas han sido estudiadas bajo condiciones de estrés hídrico. En el caso de *COR11* y *COR19*, no se detectó aumento en el nivel de transcrito en hojas, mientras que en *CrCOR15* los niveles de transcrito aumentan progresivamente durante el periodo de estrés hídrico.

La dehidrina objeto de estudio posee una homología del 98% con *CrCOR15* y se induce bajo condiciones de estrés hídrico tanto en hojas como en raíces manteniendo constante los niveles de transcrito a lo largo del tiempo. Sin embargo, *CrCOR15* experimenta un aumento progresivo de los niveles de transcrito en hojas a lo largo del periodo de estrés. A nivel proteico se produce una acumulación progresiva de la proteína en hojas durante el estrés, mientras que no se ha detectado en raíces. Esto demuestra que los estudios de inducción de genes deben completarse con estudios de inducción de proteica ya que no siempre existe correlación. *CuCOR19* también se estudio bajo condiciones de estrés hídrico pero no se detectó acumulación de proteína.

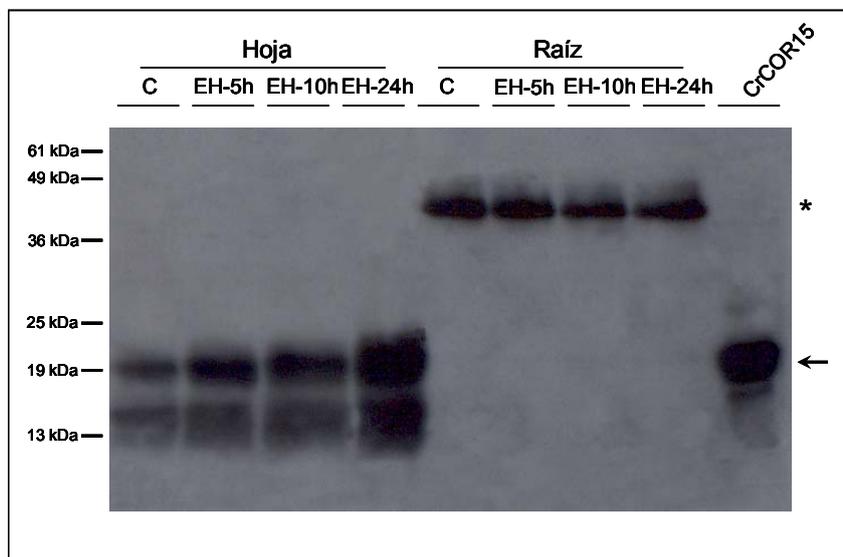


Figura 28. Detección de los niveles de proteína COR15. Análisis *Western-blot* de hojas y raíces de plantas sometidas a 5, 10 y 24 horas de estrés hídrico (EH) y plantas control (C). Se utilizaron 7  $\mu$ g de extracto de proteína de cada muestra y 0,05  $\mu$ g de proteína purificada. La membrana se incubó con una dilución 1:5000 (v/v) del anticuerpo Ac1-CrCOR15.

Se comprobó que la cantidad de proteína cargada de cada muestra en cada pocillo era la misma midiendo la proteína por el método Bradford como se describe en materiales y métodos.

La flecha indica la detección de la proteína COR15 y el asterisco la hibridación inespecífica con otras proteínas. La banda superior que se observa en cada una de las muestras de hoja podría ser debida a producto de degradación

## 5.3 Rafinosa Sintasa

### 5.3.1. Introducción

Los solutos compatibles u osmolitos, son un pequeño grupo de compuestos orgánicos (manitol, prolina, fructosa, glicinabetaina, betaina, trealosa, inositol, sorbitol.....) muy solubles, que no interfieren con el metabolismo celular y que muchas plantas acumulan en respuesta a los estreses abióticos que provocan una deshidratación celular.

En general, se cree que la acumulación de osmolitos aumenta el potencial osmótico lo cual provoca la entrada de agua en las células ayudando a mantener la turgencia. Además algunos osmolitos poseen propiedades especiales que les permiten ayudar a mantener la integridad de las membranas y prevenir la desnaturalización de las proteínas (Ingram y Bartels, 1996; Bohnert y Jensen, 1996; Hare et al., 1998).

Esta teoría de que la acumulación de osmolitos juega un papel importante en la tolerancia a estrés se ha visto reforzada al demostrarse, en muchos casos, que se activan las enzimas involucrados en la ruta de síntesis o degradación del osmolito o que los niveles de transcrito de estas enzimas aumentan tras la aplicación del estrés. Además, muchas plantas transformadas que sobreexpresan alguna de estas enzimas presentan tolerancia a estrés (Tarczynski et al., 1993; Thomas et al., 1995; Nanjo et al., 1999; Hmida-Sayari et al., 2005).

Entre los diversos compuestos que pueden actuar como osmolitos, se encuentran los oligosacáridos de la familia de la rafinosa o RFOs (Raffinose family oligosaccharides), como el galactinol, la rafinosa y la estaquiosa. Estos compuestos además de ser utilizados por algunas plantas para el transporte y almacenaje de carbono, son solutos compatibles que protegen contra estreses abióticos (Bachmann et al., 1994; Haritatos et al., 1996; Cunningham et al., 2003; Zuther et al., 2004; Hannah et al., 2006). Se acumulan durante el desarrollo de las semillas y se cree que juegan un papel importante en la tolerancia a la desecación (Saravitz et al., 1987; Castillo et al., 1990; Brenac et al., 1997).

En *Arabidopsis* se ha detectado una acumulación de rafinosa y galactinol durante diferentes estreses abióticos (estrés hídrico, salinidad y frío) en tejido vegetativo por lo que se cree que estos compuestos pueden estar relacionados con la tolerancia a estos estreses. Además, la sobreexpresión de galactinol sintasa conlleva a un aumento de los niveles de galactinol y rafinosa y confiere a las plantas un aumentando la resistencia a estrés hídrico (Taji et al., 2002).

En cítricos el ajuste osmótico se produce de una forma muy eficiente siendo conocida la relación de iones inorgánicos y solutos compatibles en este proceso (Maas, 1993; Gomez-Cadenas et al., 1998; Arbona et al., 2005). Sobre todo se han realizado varios estudios sobre el papel de la prolina como osmolito en cítricos (Mademba-Sy et al., 2003; Molinari et al., 2004). En el caso de los oligosacáridos de la familia de la rafinosa o RFOs no se ha determinado su posible implicación en procesos de resistencia a estrés en cítricos.

### 5.3.2 Detección de Rafinosa en cítricos

Tanto los resultados del experimento de micromatrices como la posterior RT-PCR, muestran un aumento de los niveles de transcrito de la rafinosa sintasa en **raíces** de plantas sometidas a estrés hídrico. Esta enzima cataliza el segundo paso de la ruta de biosíntesis de RFOs (Figura 29) por tanto, la presencia de esta enzima

inducida nos lleva a pensar que en cítricos también puede estar activada esta ruta y que se podrían estar acumulando compuestos de esta ruta y actuado como osmolitos.

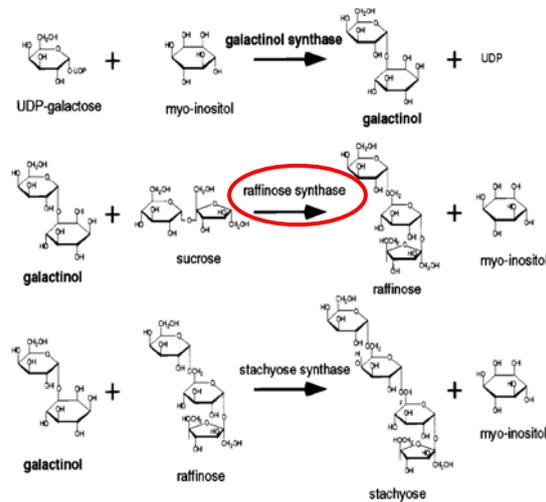


Figura 29. Ruta metabólica de los RFOs (Raffinose family oligosaccharides). Los compuestos de esta ruta se sintetizan a partir de la glucosa a la que el galactinol transfiere una serie de galactosas. La producción de los trisacáridos rafinosa y estaquiosa está catalizada por la rafinosa sintasa y la estaquiosa sintasa. El galactinol se forma a partir de UDP-galactosa y mio-inositol mediado por la galactinol sintasa que se considera la enzima reguladora de esta ruta.

Con el fin de comprobar si el aumento del transcrito de la Rafinosa sintasa va asociado a la acumulación de carbohidratos (RFOs) durante el estrés hídrico, se han determinado los niveles de estaquiosa, rafinosa, galactinol, glucosa, fructosa y sacarosa en extractos de proteína de muestras de raíces de plantas control y plantas sometidas a 5, 10 y 24 horas de estrés hídrico (Fig. 30 y 31).

En los resultados del HPLC se puede ver los picos correspondientes al galactinol, glucosa, fructosa, sacarosa y como en las muestras sometidas a estrés aparece un nuevo pico que corresponde con la rafinosa (Figura 31).

Como se puede apreciar, el contenido de glucosa y fructosa disminuye a lo largo del periodo de estrés hídrico respecto al control mientras que el nivel de sacarosa aumenta dos veces respecto al control a las 5 horas y recupera los niveles del control a las 10 horas. En cuanto a los RFOs, se han podido detectar el galactinol y la rafinosa. El galactinol dobla su concentración en las muestras sometidas a estrés hídrico con respecto al control, mientras que la rafinosa pasa de niveles no detectables en las muestras control a una concentración entorno a los 200  $\mu\text{g/g}$  en las muestras estresadas.

Comparando estos resultados con los obtenidos por Taji et al. (2002) podemos destacar que mientras en *Arabidopsis* el contenido en galactinol es nulo los primeros 7 días de estrés hídrico y que alcanza alrededor de los 130  $\mu\text{g/g}$  a los 14 días, en cítricos, el galactinol está presente ya en las muestras control (no sujetas a estrés hídrico) en 850  $\mu\text{g/g}$  peso fresco y pasa a 1771  $\mu\text{g/g}$  en las muestras sometidas a estrés hídrico tan solo en 5 horas.

La rafinosa en *Arabidopsis* también empieza a aumentar a partir de los 7 días de estrés, alcanzando aproximadamente los 200  $\mu\text{g/g}$  peso fresco a los 14 días. En cítricos no se ha podido detectar en las muestras control pero en tan solo 5 horas llega a más de 200  $\mu\text{g/g}$  peso fresco.

Por tanto tenemos dos puntos a destacar: A) En cítricos en tan solo 5 horas ya podemos apreciar la acumulación de galactinol y rafinosa; es una acumulación mucho

#### IV. Resultados y discusión

mas rápida que en *Arabidopsis*. B) El galactinol ya se encuentra presente en las muestras de cítricos no sometidas a estrés hídrico al contrario que en *Arabidopsis*. C) en ambos casos no ha sido posible detectar estaquiosa.

La acumulación de rafinosa durante el estrés hídrico en cítricos podría estar relacionada con procesos de tolerancia.

Contenido en azúcar (µg/g peso fresco)	<u>Control</u>	<u>5 horas</u>	<u>10 horas</u>
Glucosa	676	569	433
Fructosa	763	271	276
Sacarosa	1780	3990	1890
Galactinol	855	1771	1639
Rafinosa	ND	247	198

Figura 30. Contenido de los diferentes azúcares en µg por g de peso seco. Los niveles de rafinosa a las 24 horas no pudieron ser determinados por el método utilizado. Tampoco se pudo determinar los niveles de estaquiosa en ninguna de las muestras. Los resultados son la media de las cantidades obtenidas en dos muestras de cada tiempo que difieren menos del 10%.

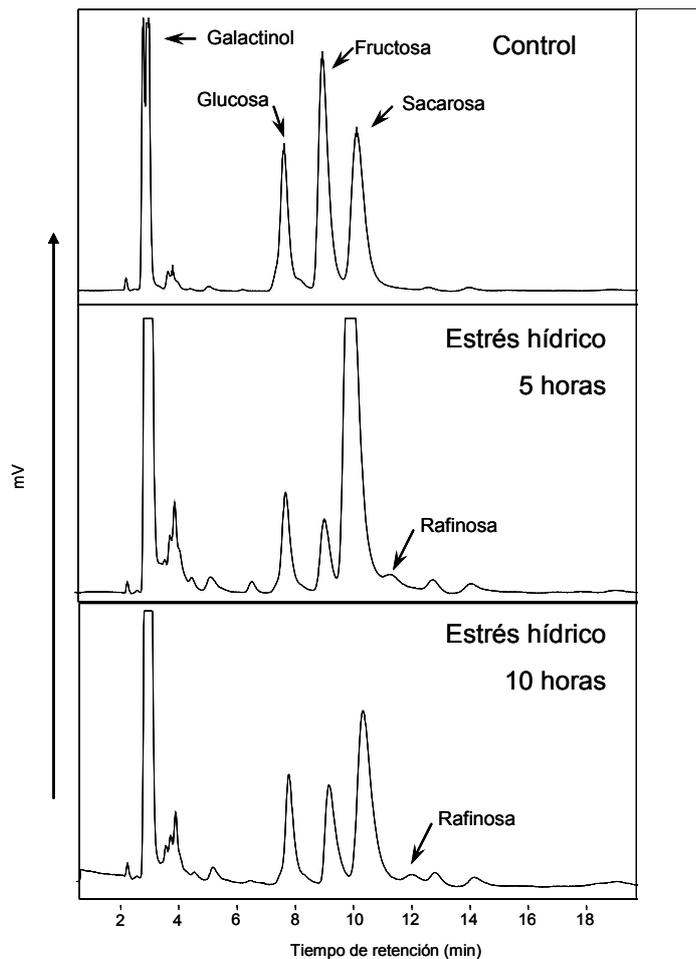


Figura 31. Perfiles de HPLC de la glucosa, sucrosa, fructosa, galactinol y rafinosa, antes del estrés (A) y a las 5 y 10 horas del estrés (B, C).

## **V. DISCUSIÓN FINAL**



## V. DISCUSIÓN FINAL

La sequía se presenta como uno de los mayores problemas de la agricultura a nivel mundial ya que la reducción de las precipitaciones en muchas zonas agrícolas provoca que el estrés hídrico sea uno de los estreses abióticos que más limita la producción de los cultivos. Esto provoca que en la mayoría de los casos sea necesario riego artificial y el uso de plantas más resistentes a la sequía. Las consecuencias de estas condiciones adversas las sufre, entre otros, el cultivo de cítricos. La obtención de nuevas variedades que se adapten a las exigencias de mercado y de cultivo es la clave para que las explotaciones agrícolas sigan siendo competitivas, sin embargo, la mejora en cítricos ha sido muy difícil y con escasos resultados debido a su compleja biología reproductiva.

En vistas de la situación en torno a la sequía y los cítricos y a los pocos estudios realizados en relación a la tolerancia a estrés hídrico en esta especie, parece que un mejor conocimiento de su respuesta frente a este estrés es imprescindible para conseguir en un futuro nuevas variedades de cítricos que sean capaces de aprovechar mejor el agua disponible, evitando de este modo las importantes pérdidas de cosecha. El estudio del transcriptoma de los cítricos a través de la utilización de dos estrategias paralelas y complementarias: la generación de ESTs y la hibridación de micromatrices de cDNA, ha permitido la catalogación de genes candidatos a estar implicados en la respuesta de los cítricos a estrés hídrico así como la determinación de ciertas características de la regulación de la respuesta a dicho estrés. Todos los datos obtenidos se presentan como la base de futuros trabajos más detallados sobre la implicación de los diferentes genes en la respuesta a estrés hídrico en cítricos.

Por otro lado, el método de aplicación de estrés hídrico elegido, consistente en el trasplante de las plantas desde el sustrato húmedo al seco (GomezCadenas, 1996), ha resultado útil para producir estrés hídrico de forma rápida y permitir el estudio de la respuesta inicial a dicho estrés. Sin embargo, la realización de un experimento control del trasplante (ER) ha permitido determinar que existe una clara influencia del método de aplicación de estrés hídrico en los resultados obtenidos, ya que una parte de los genes inducidos o reprimidos durante el experimento de estrés hídrico (EH) lo son también en el experimento de ER (apartado 3.1. Resultados). Estos resultados coinciden con un estudio realizado en *Arabidopsis* donde la comparación de varios trabajos sobre el transcriptoma de plantas sometidas a estrés hídrico revela que una parte de los resultados es debida al método utilizado para aplicar el estrés (Bray, 2004).

Son varios los aspectos de la respuesta a estrés hídrico en cítricos que se han podido determinar a través de la generación masiva de ESTs y la hibridación de micromatrices de cDNA.

La incorporación a la colección del CFGP de las ESTs generadas a partir de los clones aislados de las dos bibliotecas de sustracción construidas con muestras de hojas y raíces de plantas sometidas a estrés hídrico (Drought1 y Drought2), ha permitido determinar algunos aspectos de la respuesta ante la sequía en cítricos (apartado 2. Resultados).

La respuesta transcripcional de la planta ante cualquier estrés presenta en muchos casos diferencias a nivel de tejido las cuales se deben en su mayor parte a que cada tejido percibe el estrés de forma diferente (Yu y Setter, 2003; Oztuk, 2002; Takahashi, 2004). En este aspecto, los resultados obtenidos parecen indicar que la respuesta de los cítricos ante un periodo de estrés hídrico es mucho más específica en

raíces que en hojas. Ante una colección de ESTs en la que aproximadamente el mismo número de ellas procede de bibliotecas de uno de estos dos tejidos y que la mayor parte de las bibliotecas han sido construidas con tejidos sometidos a distintos estreses bióticos y abióticos, la casi saturación de la biblioteca de hojas de plantas sometidas a estrés hídrico con solo 607 ESTs frente al bajo nivel de saturación de la biblioteca de raíz, de la que ya se han obtenido 1401 ESTs (Figura 12), parece deberse a que la respuesta a estrés hídrico en raíces de cítricos es mucho más específica que la de hoja, la cual parece presentar similitudes con la respuesta ante otros estreses.

Otro aspecto a tener en cuenta es la respuesta transcripcional de la planta ante diversos estreses. La sequía, la salinidad y el frío son algunos de los estreses abióticos que más influyen en el crecimiento y productividad de los cultivos. La respuesta fisiológica de la planta ante estos factores ambientales está relacionada, sobre todo porque comparten el componente de la respuesta que se debe al estrés osmótico. Esto se traduce en un cierto nivel de solapamiento entre los genes involucrados en la respuesta a cada uno de ellos al activarse rutas similares de señalización (Wang, 2003; Seki, 2003, Zheng, 2006). En cítricos, al igual que se ha determinado en otras especies, existe una parte de la respuesta común entre sequía, salinidad y frío y otra común entre cada par de dichos estreses. La comparación de los unigenes procedentes de bibliotecas de la colección del CFGP, construidas a partir de plantas sometidas a sequía, salinidad y frío ha permitido establecer relaciones entre estos estreses, identificándose grupos de genes que pueden formar parte de la respuesta específica y común de los cítricos frente a cada uno de ellos (Figura 13). Cabe destacar el grupo de unigenes comunes a los tres estreses y que podrían formar parte de lo que se denomina “respuesta general a estrés”, que incluye un grupo de genes que parecen activarse en la planta independientemente del tipo de estrés que la afecte y que sería de especial interés en la identificación de rutas de señalización comunes entre estreses. En este grupo se incluyen varios genes cuya inducción simultánea bajo diversas condiciones de estrés abiótico es ya conocida en *Arabidopsis* y entre los que podemos destacar los unigenes similares a los genes *RD22* y *RD26* (Abe, 1997, 2003; Fujita, 2004).

La segunda de las estrategias utilizada para el estudio del transcriptoma de cítricos ha sido la hibridación de la micromatriz de primera generación del CFGP que contiene aproximadamente 7000 unigenes (apartado 3. Resultados).

La comparación de los unigenes inducidos y reprimidos, en hojas y raíces de plantas sometidas a estrés hídrico apunta a que existe una escasa coincidencia entre las rutas activadas y las rutas desactivadas durante la respuesta a estrés hídrico entre ambos tejidos, lo cual parece indicar que existe un alto grado de la especificidad de tejido en la respuesta a estrés hídrico. Hay que destacar que el solapamiento entre los unigenes que se reprimen durante el periodo de estrés hídrico es mucho menor que entre los que se inducen, apuntando a que muchas de las rutas que se inactivan durante este estrés son más específicas de cada tejido que las que se activan (Figura 15). Estos resultados, unidos a la gran especificidad de la respuesta en raíces respecto a otros estreses observada a través de la colección de ESTs, parecen indicar que existe un alto grado de especificidad de la respuesta a estrés hídrico entre estos dos tejidos en cítricos.

El estudio de la fase inicial de respuesta a estrés se ha centrado en las primeras 24 horas. La obtención de datos de expresión a las 5, 10 y 24 horas tras la aplicación del estrés hídrico ha permitido determinar que los unigenes que responden a estrés hídrico en cítricos durante este periodo siguen dos tipos de comportamiento (Figura 16 y 17). Tanto los unigenes inducidos como los reprimidos de hoja y raíz presentan los mismos patrones de expresión. Un primer grupo de unigenes formaría parte de lo que llamaríamos “respuesta rápida prolongada”, y en el se incluirían los

unigenes que alcanzan sus valores máximos de inducción o represión a las 5 horas y los mantienen durante todo el periodo de estrés. El segundo grupo se ha denominado de “respuesta rápida transitoria”, y está formado por unigenes que alcanzan los valores máximos de inducción o represión entre las 5 y las 10 horas y experimentan una caída progresiva entre los 10 y las 24 horas. En vista de estos patrones de expresión se observa que a las 5 horas la mayoría de unigenes ya han alcanzado sus máximos valores de inducción o represión por lo que la enorme rapidez de la respuesta a estrés hídrico en cítricos hace necesario su estudio a tiempos más cortos. La respuesta rápida prolongada incluye genes cuya inducción constante en el tiempo tanto en hojas como en raíces permite a la planta tolerar el estrés hídrico durante el periodo de duración del mismo mientras que bajo la respuesta rápida transitoria se incluyen genes que permiten a la planta protegerse del estrés durante el periodo inicial o que están involucrados en rutas de transducción de la señal de respuesta a estrés hídrico. Los genes reprimidos que presentan tanto respuesta rápida prolongada como respuesta rápida transitoria, podrían pertenecer a rutas metabólicas o procesos celulares cuya actividad disminuye durante el periodo de estrés, en el cual la planta reorganiza sus recursos hacia funciones más defensivas.

El uso conjunto de dos estrategias diferentes, la generación masiva de ESTs y la hibridación de micromatrices de cDNA, ha permitido la catalogación de genes candidatos a estar involucrados en la respuesta a estrés hídrico en cítricos.

Por un lado, los genes identificados a partir de las dos bibliotecas de sustracción normalizadas (Drought1 y Drought2), son genes cuyos transcritos son más abundantes en plantas sometidas a estrés hídrico respecto a plantas no estresadas, sin importar el grado de abundancia ya que el paso de normalización iguala sus concentraciones. Esto ha permitido la identificación de genes inducibles durante el proceso de estrés (los genes cuya actividad se reprime durante el estrés no son identificados con esta estrategia), con igual posibilidad de identificar genes muy inducibles y poco inducibles, y muy abundantes y poco abundantes. La comparación de las ESTs aisladas de estas bibliotecas con el resto de las 91.000 ESTs del proyecto ha permitido obtener una estimación adicional de la especificidad de la inducción de dichos genes para el estrés hídrico con respecto a otros estreses. Esto nos ha llevado a identificar genes inducibles por estrés hídrico que también han sido inducidos o están expresados en otros contextos biológicos, y otros genes cuya transcripción, con la información de que disponemos, no se detecta más que cuando las plantas son sometidas a estrés hídrico.

Por otro lado, las micromatrices de cDNA han permitido identificar genes cuyos niveles de transcrito aumentan o disminuyen significativamente en las plantas sometidas a estrés hídrico respecto a las plantas control. Los transcritos de los genes identificados de esta manera son bastante abundantes, ya que la señal obtenida en genes poco expresados no habría superado el filtro de intensidad aplicado. Además, los genes identificados con esta estrategia están bastante inducidos o reprimidos, ya que se han aplicado criterios de selección basados en su inducción o represión respecto al control. Otra característica de los genes identificados a través de la micromatriz es que no solo se han identificado a partir de las bibliotecas de sustracción construidas con este fin, sino también a partir de los clones aislados de otras bibliotecas, cuyo comportamiento frente a estrés hídrico se ha podido determinar mediante el experimento de micromatrices. Además, la micromatriz permite la identificación de genes cuya expresión se reduce ante el tratamiento de estrés (genes reprimidos), lo cual no es posible conseguir a través de las ESTs de las bibliotecas de sustracción. La realización de un experimento control del transplante ha permitido distinguir entre los genes de respuesta a estrés hídrico y aquellos que pueden estar influidos por cualquier otro factor distinto de este como es la rotura debida al transplante.

La clasificación funcional de los unigenes considerados como específicos de estrés hídrico a partir de las bibliotecas Drought1 y Drought2 (apartado 2.2. Resultados) y a partir del experimento de micromatrices de cDNA (apartado 3.4.2. Resultados), ha permitido tener una visión comprensiva de la regulación transcripcional de estos genes, identificados como posibles candidatos a estar relacionados con la respuesta a estrés hídrico en cítricos.

A partir de los genes identificados cabe destacar una serie de procesos que parecen formar parte de la respuesta a estrés hídrico en cítricos. Entre los que se producen tanto en hojas como en raíces cabe destacar la utilización de lisina, cuya degradación podría estar potenciada por la inducción del gen que codifica la enzima LKR/SDH. La degradación de lisina produce glutamato que es el mayor precursor de la síntesis de metabolitos como la prolina, arginina y poliaminas que suelen acumularse bajo condiciones de estrés abiótico (Galili et al., 2001). Otro proceso que también comparten ambos tejidos es la síntesis de xantofilas ya que se ha detectado la inducción del gen que codifica la enzima CHY1 que forma parte de la ruta de síntesis de estos compuestos. Parece ser que en hojas están involucrados en la fotoprotección evitando el estrés oxidativo, mientras que en raíces se les asocia a la producción de ABA (Parry y Horgan, 1992; Borel et al., 2001).

El etileno parece estar relacionado en la respuesta a estrés en cítricos, estando implicados en su síntesis hojas como raíces. La inducción de la ACC sintasa en raíces y la de ACC oxidasa en hojas, dos enzimas de la ruta de síntesis de etileno, indican que la síntesis de ACC, precursor del etileno, se está produciendo en las raíces, mientras que la síntesis del etileno se produce en las hojas. Otro dato que apunta a la posible implicación del etileno en la respuesta a estrés hídrico es la inducción tanto en hojas como en raíces de un gen homólogo al de la proteína quinasa CTR1, componente central de la ruta de señalización del etileno actuando después del receptor en *Arabidopsis* (Kieber et al., 1993; Huang et al., 2003).

En hojas la inducción de la enzima desaturasa de ácidos grasos FAD2 apunta a que se puede estar produciendo un aumento del nivel de insaturación de las membranas lo que implica un aumento de la rigidez de las mismas. Se ha comprobado que la sobreexpresión de FAD8 y FAD3 en tabaco aumenta los niveles de ácidos grasos insaturados e incrementa la tolerancia a estrés hídrico (Zhang et al. 2005). Relacionado también con las membranas, se ha detectado la inducción en hojas y raíces, de un gen homólogo al de la proteína hidrofóbica RC12A. En levadura, se ha determinado que protege contra la entrada de Na<sup>+</sup> evitando la despolarización de la membrana (Navarre y Goffeau, 2000).

La pérdida de la estructura de las proteínas que se produce en situaciones de estrés, parece evitarse a través de la actividad protectora de las proteínas LEA. Se ha detectado la inducción de genes que codifican proteínas LEA de los grupos 1, 2 y 3 tanto en hojas como en raíces.

Por último, uno de los conocidos procesos que se activan en la planta ante situaciones de estrés hídrico es la acumulación de osmolitos. En el caso de los cítricos parece que se produce una acumulación de prolina en hojas y de rafinosa en raíces ya que se ha detectado la inducción de los genes que codifican la P5CS y la rafinosa sintasa, enzimas de la ruta de síntesis de cada uno de estos dos osmolitos respectivamente.

Hay que destacar la identificación de un numeroso grupo de genes de función desconocida tanto en hojas como en raíces que podrían ser genes nuevos de respuesta a estrés hídrico o genes específicos de respuesta a estrés hídrico en cítricos.

La información transcripcional de la respuesta a estrés hídrico obtenida a través de las bibliotecas de sustracción Drought1 y Drought2 y del experimento de micromatrices de cDNA ha proporcionado una considerable ampliación de los

conocimientos sobre la respuesta a estrés hídrico en cítricos y abre las puertas al inicio de múltiples trabajos que permitan conocer con detalle la implicación de cada uno de los genes en la respuesta a dicho estrés. En este sentido, la parte final de esta tesis ha pretendido, a partir de la información obtenida, iniciar tres líneas de trabajo orientadas a determinar la implicación en la respuesta a estrés hídrico de genes pertenecientes a tres grupos diferentes de conocida importancia en la respuesta a estrés en otras especies: los inhibidores de proteasas, las proteínas LEA y los osmolitos.



## **VI. CONCLUSIONES**



## VI. CONCLUSIONES

- Se han obtenido 2008 ESTs procedentes de dos bibliotecas de sustracción construidas a partir de hojas y raíces de plantas sometidas a estrés hídrico. Dichas ESTs han contribuido a crear una colección de 85965 ESTs de cítricos y a la construcción de una micromatriz de 20k en el seno del proyecto de CFGP. 586 de ellas, solo han sido aisladas de estas bibliotecas.

- La incorporación a la colección de ESTs del CFGP de las ESTs generadas a partir de estas dos bibliotecas ha permitido determinar que la respuesta a estrés hídrico en cítricos es, en relación a otros estreses, mucho más específica en raíces que en hojas.

- Se ha utilizado una micromatriz de cDNA que contiene 7000 unigenes de cítricos, para abordar el estudio del transcriptoma de plantas sometidas a estrés hídrico durante la etapa inicial de respuesta a estrés. Este experimento ha permitido detectar en hojas 571 unigenes cuya expresión aumenta durante el periodo de estrés y 488 cuya expresión disminuye. En raíces la expresión aumenta en 287 unigenes mientras que disminuye en 89 de ellos.

- Los patrones de expresión de estos genes durante el periodo de estrés aplicado indican que existe un grupo cuyos niveles de inducción o represión se mantienen constantes durante el periodo de estrés, mientras que un segundo grupo presentan expresión transitoria recuperando en los momentos finales del periodo de estrés los niveles de transcrito iniciales.

- La comparación de los genes inducidos y reprimidos, en hojas y raíces de plantas sometidas a estrés hídrico apunta a que existe una escasa coincidencia entre las rutas activadas y las rutas desactivadas durante la respuesta a dicho estrés entre ambos tejidos, lo cual parece indicar que existe un alto grado de especificidad de tejido en relación a dicha respuesta.

- La clasificación funcional de los unigenes obtenidos de las bibliotecas de sustracción y del experimento de micromatrices ha permitido identificar genes candidatos a estar implicados en la respuesta a estrés hídrico. Destaca un grupo formado por genes sin homología podrían formar parte de genes nuevos de respuesta a estrés hídrico en cítricos.

- A partir de la información obtenida del experimento de micromatrices se ha iniciado un estudio mas profundo de la implicación de algunos genes en la respuesta a estrés hídrico en cítricos. Las conclusiones obtenidas en este apartado son:

- Existen en cítricos varios inhibidores de tripsina tipo kunitz del grupo de las miraculinas, de los cuales, CcMLPB1 y CcMLPA no habían sido identificados hasta la fecha. Se ha identificado CcMLPA como la única de las miraculinas estudiadas que se induce bajo condiciones de estrés hídrico tanto en hojas como en raíces. Por tanto, parece que los inhibidores de tripsina no están únicamente relacionados con la defensa contra insectos, sino que también pueden formar parte de la respuesta a estrés abiótico, contribuyendo a la regulación proteolítica.

- Aunque el transcrito del gen similar a *CcCOR15*, que codifica una proteína LEA del grupo 2, se acumula tanto en hojas como en raíces de plantas sometidas a estrés hídrico, la proteína sólo se acumula en las hojas de dichas plantas, de forma

progresiva a lo largo de del periodo estudiado, lo que parece indicar que este gen está sometido a control post-transcripcional.

- El aumento de los niveles de transcrito del gen de la rafinosa sintasa, acompañado de un incremento de los niveles de rafinosa y galactinol en raíces de plantas sometidas a estrés hídrico parece indicar que estos dos oligosacáridos podrían estar actuando como osmolitos en la respuesta a estrés hídrico en cítricos.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



## VII. BIBLIOGRAGÍA

### Referencias electrónicas:

ONU/WWAP (2006) Naciones Unidas/Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos. 2º Informe de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos en el Mundo: El agua, una responsabilidad compartida. [www.unesco.org/water/wwap/index\\_es.shtml](http://www.unesco.org/water/wwap/index_es.shtml)

ONU (2002) Organización de Naciones Unidas. Agua: cuestión de vida o muerte. Año internacional del agua dulce 2003. Departamento de Información Pública de las Naciones Unidas, DPI/2293B-Diciembre 2002. [www.un.org](http://www.un.org)

INE (2003) Instituto Nacional de Estadística. Estadísticas medioambientales sobre el agua. <http://www.ine.es/inebase/index.html>

MMA (2000) Ministerio de Medio Ambiente. Libro blanco del agua. [www.mma.es](http://www.mma.es)

MMA (2004) Ministerio de Medio Ambiente. Programa A.G.U.A. actuaciones para la Gestión y Utilización del Agua. [www.mma.es](http://www.mma.es)

INM (2005) Instituto Nacional de Meteorología. Ministerio de Medio Ambiente. [www.inm.es](http://www.inm.es)

FAO-FAOSTAT (2004-2005). Food and Agriculture Organization Statistical Database <http://www.faostat.fao.org>

MAPA (2004). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. <http://www.mapa.es>

CAPA (2004). Conselleria d' Agricultura, Pesca i Alimentació <http://www.agricultura.gva.es>

AILIMPO (2004). Asociación Interprofesional de limón y pomelo. <http://www.ailimpo.com>

### Bibliografía

Abe, H., T. Urao, T. Ito, M. Seki, K. Shinozaki, and K. Yamaguchi-Shinozaki, 2003, Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling: Plant Cell, v. 15, no. 1, p. 63-78.

Adams, M. D. et al., 2000, The genome sequence of Drosophila melanogaster: Science, v. 287, no. 5461, p. 2185-2195.

Agustí, M., 2003, Citricultura: Madrid, Ediciones Mundi-Prensa.

Akimoto-Tomiya, C. et al., 2003, Rice gene expression in response to N-acetylchitoooligosaccharide elicitor: comprehensive analysis by DNA microarray with randomly selected ESTs: Plant Molecular Biology, v. 52, no. 3, p. 537-551.

Alexandersson, E., L. Fraysse, S. Sjøvall-Larsen, S. Gustavsson, M. Fellert, M. Karlsson, U. Johanson, and P. Kjellbom, 2005, Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins: *Plant Molecular Biology*, v. 59, no. 3, p. 469-484.

Ancillo, G., J. Gadea, J. Forment, J. Guerri, and L. Navarro, 2007, Class prediction of closely related plant varieties using gene expression profiling: *Journal of Experimental Botany*, v. 58, no. 8, p. 1927-1933.

Andersen, J. R., and T. Lubberstedt, 2003, Functional markers in plants: *Trends in Plant Science*, v. 8, no. 11, p. 554-560.

Arabidopsis Genome Initiative, 2000, Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*: *Nature*, v. 408, no. 6814, p. 796-815.

Araus, J. L., 2004, The problems of sustainable water use in the Mediterranean and research requirements agriculture: *Annals of Applied Biology*, v. 144, no. 3, p. 259-272.

Arbona, V., A. J. Marco, D. J. Iglesias, M. F. Lopez-Climent, M. Talon, and A. Gomez-Cadenas, 2005, Carbohydrate depletion in roots and leaves of salt-stressed potted *Citrus clementina* L: *Plant Growth Regulation*, v. 46, no. 2, p. 153-160.

Arora, R., and C. C. Lim, 2005, A 27 kDa *Rhododendron* protein is associated with constitutive freezing tolerance and is related to the ABA/water deficit stress-inducible family of proteins: *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, v. 80, no. 2, p. 171-176.

Arora, R., and M. E. Wisniewski, 1994, Cold-Acclimation in Genetically Related (Sibling) Deciduous and Evergreen Peach (*Prunus-Persica* [L] Batsch) .2. A 60-Kilodalton Bark Protein in Cold-Acclimated Tissues of Peach Is Heat-Stable and Related to the Dehydrin Family of Proteins: *Plant Physiology*, v. 105, no. 1, p. 95-101.

Atienza, S. G., P. Faccioli, G. Perrotta, G. Dalfino, W. Zschiesche, K. Humbeck, A. M. Stanca, and L. Cattivelli, 2004, Large scale analysis of transcripts abundance in barley subjected to several single and combined abiotic stress conditions: *Plant Science*, v. 167, no. 6, p. 1359-1365.

Audic, S., and J. M. Claverie, 1997, The significance of digital gene expression profiles: *Genome Research*, v. 7, no. 10, p. 986-995.

Audran, C., C. Borel, A. Frey, B. Sotta, C. Meyer, T. Simonneau, and A. Marion-Poll, 1998, Expression studies of the zeaxanthin epoxidase gene in *Nicotiana plumbaginifolia*: *Plant Physiology*, v. 118, no. 3, p. 1021-1028.

Audran, C., S. Liotenberg, M. Gonneau, H. North, A. Frey, K. Tap-Waksman, N. Vartanian, and A. Marion-Poll, 2001, Localisation and expression of zeaxanthin epoxidase mRNA in *Arabidopsis* in response to drought stress and during seed development: *Australian Journal of Plant Physiology*, v. 28, no. 12, p. 1161-1173.

Babu, R. C., J. X. Zhang, A. Blum, T. H. D. Ho, R. Wu, and H. T. Nguyen, 2004, HVA1, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection: *Plant Science*, v. 166, no. 4, p. 855-862.

Bachmann, M., P. Matile, and F. Keller, 1994, Metabolism of the Raffinose Family Oligosaccharides in Leaves of *Ajuga-Reptans* I - Cold-Acclimation, Translocation, and

- Sink to Source Transition - Discovery of Chain Elongation Enzyme: *Plant Physiology*, v. 105, no. 4, p. 1335-1345.
- Baxter, C. J., M. Sabar, W. P. Quick, and L. J. Sweetlove, 2005, Comparison of changes in fruit gene expression in tomato introgression lines provides evidence of genome-wide transcriptional changes and reveals links to mapped QTLs and described traits: *Journal of Experimental Botany*, v. 56, no. 416, p. 1591-1604.
- Benjamini, Y., and Y. Hochberg, 1995, Controlling the False Discovery Rate - A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing: *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological*, v. 57, no. 1, p. 289-300.
- Blanke, M. M., and J. P. Bower, 1991, Small Fruit Problem in Citrus Trees: *Trees-Structure and Function*, v. 5, no. 4, p. 239-243.
- Bohnert, H. J., Q. Q. Gong, P. H. Li, and S. S. Ma, 2006, Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms - getting genomics going: *Current Opinion in Plant Biology*, v. 9, no. 2, p. 180-188.
- Bohnert, H. J., and R. G. Jensen, 1996, Strategies for engineering water-stress tolerance in plants: *Trends in Biotechnology*, v. 14, no. 3, p. 89-97.
- Borel, C., C. Audran, A. Frey, A. Marion-Poll, F. Tardieu, and T. Simonneau, 2001, *N-plumbaginifolia* zeaxanthin epoxidase transgenic lines have unaltered baseline ABA accumulations in roots and xylem sap, but contrasting sensitivities of ABA accumulation to water deficit: *Journal of Experimental Botany*, v. 52, p. 427-434.
- Bouchereau, A., A. Aziz, F. Larher, and J. Martin-Tanguy, 1999, Polyamines and environmental challenges: recent development: *Plant Science*, v. 140, no. 2, p. 103-125.
- Boudsocq, M., and C. Lauriere, 2005, Osmotic signaling in plants. Multiple pathways mediated by emerging kinase families: *Plant Physiology*, v. 138, no. 3, p. 1185-1194.
- Bouvier, F., A. Rahier, and B. Camara, 2005, Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids: *Progress in Lipid Research*, v. 44, no. 6, p. 357-429.
- Boyer, J. S., 1982, Plant Productivity and Environment: *Science*, v. 218, no. 4571, p. 443-448.
- Bradford, M. M., 1976, Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding: *Analytical Biochemistry*, v. 72, no. 1-2, p. 248-254.
- Bray, E. A., 2000, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*: American Society of Plant Physiologists.
- Bray, E. A., 2004, Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: *Journal of Experimental Botany*, v. 55, no. 407, p. 2331-2341.
- Brenac, P., M. Horbowicz, S. M. Downer, A. M. Dickerman, M. E. Smith, and R. L. Obendorf, 1997, Raffinose accumulation related to desiccation tolerance during maize (*Zea mays* L) seed development and maturation: *Journal of Plant Physiology*, v. 150, no. 4, p. 481-488.

Brenner, E. D., K. N. Lambert, I. Kaloshian, and V. M. Williamson, 1998, Characterization of LeMir, a root-knot nematode-induced gene in tomato with an encoded product secreted from the root: *Plant Physiology*, v. 118, no. 1, p. 237-247.

Cai, Q. Y., G. A. Moore, and C. L. Guy, 1995, An Unusual Group-2 Lea Gene Family in Citrus Responsive to Low-Temperature: *Plant Molecular Biology*, v. 29, no. 1, p. 11-23.

Cai, X. N., E. J. Davis, J. Ballif, M. X. Liang, E. Bushman, V. Haroldsen, J. Torabinejad, and Y. J. Wu, 2006, Mutant identification and characterization of the laccase gene family in Arabidopsis: *Journal of Experimental Botany*, v. 57, no. 11, p. 2563-2569.

Callis, J., 1995, Regulation of Protein-Degradation: *Plant Cell*, v. 7, no. 7, p. 845-857.

Cameron, K. D., M. A. Teece, and L. B. Smart, 2006, Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco: *Plant Physiology*, v. 140, no. 1, p. 176-183.

Campos, E. T., M. A. G. Espinosa, M. L. Warburton, A. S. Varela, and A. V. Monter, 2005, Characterization of mandarin (*Citrus* spp.) using morphological and AFLP markers: *Interciencia*, v. 30, no. 11, p. 687-693.

Capell, T., L. Bassie, and P. Christou, 2004, Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, no. 26, p. 9909-9914.

Carretero-Paulet, L., I. Ahumada, N. Cunillera, M. Rodriguez-Concepcion, A. Ferrer, A. Boronat, and N. Campos, 2002, Expression and molecular analysis of the Arabidopsis DXR gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway: *Plant Physiology*, v. 129, no. 4, p. 1581-1591.

Castañer, M. A., 2006, Castañer, M. A. Producción de Agrios: Madrid, Ediciones Mundi-Prensa.

Castillo, E. M., B. O. Delumen, P. S. Reyes, and H. Z. Delumen, 1990, Raffinose Synthase and Galactinol Synthase in Developing Seeds and Leaves of Legumes: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 38, no. 2, p. 351-355.

Chaitanya, K. V., P. P. Jatur, D. Sundar, and A. R. Reddy, 2003, Water stress effects on photosynthesis in different mulberry cultivars: *Plant Growth Regulation*, v. 40, no. 1, p. 75-80.

Chaves, M. M., and M. M. Oliveira, 2004, Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture: *Journal of Experimental Botany*, v. 55, no. 407, p. 2365-2384.

Chen, F., J. C. D'Auria, D. Tholl, J. R. Ross, J. Gershenzon, J. P. Noel, and E. Pichersky, 2003, An Arabidopsis thaliana gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense: *Plant Journal*, v. 36, no. 5, p. 577-588.

Chen, G. H., L. T. Huang, M. N. Yap, R. H. Lee, Y. J. Huang, M. C. Cheng, and S. C. G. Chen, 2002a, Molecular characterization of a senescence-associated gene encoding cysteine proteinase and its gene expression during leaf senescence in sweet potato: *Plant and Cell Physiology*, v. 43, no. 9, p. 984-991.

- Chen, W. Q. et al., 2002b, Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses: *Plant Cell*, v. 14, no. 3, p. 559-574.
- Cheong, Y. H., H. S. Chang, R. Gupta, X. Wang, T. Zhu, and S. Luan, 2002, Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in Arabidopsis: *Plant Physiology*, v. 129, no. 2, p. 661-677.
- Chinnusamy, V., K. Schumaker, and J. K. Zhu, 2004, Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants: *Journal of Experimental Botany*, v. 55, no. 395, p. 225-236.
- Choi, H. I., J. H. Hong, J. O. Ha, J. Y. Kang, and S. Y. Kim, 2000, ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors: *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, no. 3, p. 1723-1730.
- Chou, H. H., and M. H. Holmes, 2001, DNA sequence quality trimming and vector removal: *Bioinformatics*, v. 17, no. 12, p. 1093-1104.
- Christeller, J. T., W. A. Laing, N. P. Markwick, and E. P. J. Burgess, 1992, Midgut Protease Activities in 12 Phytophagous Lepidopteran Larvae - Dietary and Protease Inhibitor Interactions: *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 22, no. 7, p. 735-746.
- Clarke, B., and S. Rahman, 2005, A microarray analysis of wheat grain hardness: *Theoretical and Applied Genetics*, v. 110, no. 7, p. 1259-1267.
- Cleveland, W. S., 1981, Lowess - A Program for Smoothing Scatterplots by Robust Locally Weighted Regression: *American Statistician*, v. 35, no. 1, p. 54.
- Close, T. J., 1996, Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins: *Physiologia Plantarum*, v. 97, no. 4, p. 795-803.
- Close, T. J., 1997, Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature: *Physiologia Plantarum*, v. 100, no. 2, p. 291-296.
- Close, T. J. et al., 2004, A new resource for cereal genomics: 22K barley GeneChip comes of age: *Plant Physiology*, v. 134, no. 3, p. 960-968.
- Corazza-Nunes, M. J., M. A. Machado, W. M. C. Nunes, M. Cristofani, and M. L. P. N. Targon, 2002, Assessment of genetic variability in grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) and pummelos (*C-maxima* (Burm.) Merr.) using RAPD and SSR markers: *Euphytica*, v. 126, no. 2, p. 169-176.
- Cunningham, S. M., P. Nadeau, Y. Castonguay, S. Laberge, and J. J. Volenec, 2003, Raffinose and stachyose accumulation, galactinol synthase expression, and winter injury of contrasting alfalfa germplasms: *Crop Science*, v. 43, no. 2, p. 562-570.
- Cushman, J. C., and H. J. Bohnert, 2000, Genomic approaches to plant stress tolerance: *Current Opinion in Plant Biology*, v. 3, no. 2, p. 117-124.
- Davies, F. S., and L. G. Albrigo, 1999, Cítricos: Zaragoza, Ediciones ACRIBIA, S. A..

- Davison, P. A., C. N. Hunter, and P. Horton, 2002, Overexpression of beta-carotene hydroxylase enhances stress tolerance in Arabidopsis: *Nature*, v. 418, no. 6894, p. 203-206.
- De Leo, F., M. Bonade-Bottino, L. R. Ceci, R. Gallerani, and L. Jouanin, 2001, Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests: *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 31, no. 6-7, p. 593-602.
- Deleu, C., M. Coustaut, M. F. Niogret, and F. Larher, 1999, Three new osmotic stress-regulated cDNAs identified by differential display polymerase chain reaction in rapeseed leaf discs: *Plant Cell and Environment*, v. 22, no. 8, p. 979-988.
- Delrot, S., R. Atanassova, and L. Maurousset, 2000, Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters: *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, v. 1465, no. 1-2, p. 281-306.
- Denekamp, M., and S. C. Smeeckens, 2003, Integration of wounding and osmotic stress signals determines the expression of the AtMYB102 transcription factor gene: *Plant Physiology*, v. 132, no. 3, p. 1415-1423.
- Densiow, S. A., E. E. Rueschhoff, and M. E. Daub, 2007, Regulation of the Arabidopsis thaliana vitamin B-6 biosynthesis genes by abiotic stress: *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 45, no. 2, p. 152-161.
- Desikan, R., M. K. Cheung, J. Bright, D. Henson, J. T. Hancock, and S. J. Neill, 2004, ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells: *Journal of Experimental Botany*, v. 55, no. 395, p. 205-212.
- Diatchenko, L. et al., 1996, Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, no. 12, p. 6025-6030.
- Dingwall, C., and R. A. Laskey, 1991, Nuclear Targeting Sequences - A Consensus: *Trends in Biochemical Sciences*, v. 16, no. 12, p. 478-481.
- Donson, J., Y. W. Fang, G. Espiritu-Santo, W. M. Xing, A. Salazar, S. Miyamoto, V. Armendarez, and W. Volkmuth, 2002, Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling: *Plant Molecular Biology*, v. 48, no. 1-2, p. 75-97.
- Downing, W. L., F. Mauxion, M. O. Fauvarque, M. P. Reviron, D. Devienne, N. Vartanian, and J. Giraudat, 1992, A Brassica-Napus Transcript Encoding A Protein Related to the Kunitz Protease Inhibitor Family Accumulates Upon Water-Stress in Leaves, Not in Seeds: *Plant Journal*, v. 2, no. 5, p. 685-693.
- Ducieux, L. J. M., W. L. Morris, P. E. Hedley, T. Shepherd, H. V. Davies, S. Millam, and M. A. Taylor, 2005, Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of beta-carotene and lutein: *Journal of Experimental Botany*, v. 56, no. 409, p. 81-89.
- Dure, L., 1993, Structural motifs in LEA proteins of higher plants, in TJ Close and EA Bray eds., *Response of Plants to Cellular Dehydration During Environmental Stress*: Rockville, American Society of Plant Physiologists.
- Eddy, S. R., 1998, Profile hidden Markov models: *Bioinformatics*, v. 14, no. 9, p. 755-763.

- El Maarouf, H., Y. Zuily-Fodil, M. Gareil, A. Arcy-Lameta, and A. T. Pham-Thi, 1999, Enzymatic activity and gene expression under water stress of phospholipase D in two cultivars of *Vigna unguiculata* L.Walp. differing in drought tolerance: *Plant Molecular Biology*, v. 39, no. 6, p. 1257-1265.
- Ewing, B., and P. Green, 1998, Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities: *Genome Research*, v. 8, no. 3, p. 186-194.
- Ewing, B., L. Hillier, M. C. Wendl, and P. Green, 1998, Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment: *Genome Research*, v. 8, no. 3, p. 175-185.
- Ewing, R. M., A. Ben Kahla, O. Poirot, F. Lopez, S. Audic, and J. M. Claverie, 1999, Large-scale statistical analyses of rice ESTs reveal correlated patterns of gene expression: *Genome Research*, v. 9, no. 10, p. 950-959.
- Fernandes, J., V. Brendel, X. W. Gai, S. Lal, V. L. Chandler, P. Elumalai, D. W. Galbraith, E. A. Pierson, and V. Walbot, 2002, Comparison of RNA expression profiles based on maize expressed sequence tag frequency analysis and micro-array hybridization: *Plant Physiology*, v. 128, no. 3, p. 896-910.
- Forment, J. et al., 2005, Development of a citrus genome-wide EST collection and cDNA microarray as resources for genomic studies: *Plant Molecular Biology*, v. 57, no. 3, p. 375-391.
- Foyer, C. H., and G. Noctor, 2003, Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria: *Physiologia Plantarum*, v. 119, no. 3, p. 355-364.
- Frova, C., P. Krajewski, N. di Fonzo, M. Villa, and M. Sari-Gorla, 1999, Genetic analysis of drought tolerance in maize by molecular markers I. Yield components: *Theoretical and Applied Genetics*, v. 99, no. 1-2, p. 280-288.
- Fujita, M., Y. Fujita, K. Maruyama, M. Seki, K. Hiratsu, M. Ohme-Takagi, L. S. P. Tran, K. Yamaguchi-Shinozaki, and K. Shinozaki, 2004, A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway: *Plant Journal*, v. 39, no. 6, p. 863-876.
- Galili, G., G. L. Tang, X. H. Zhu, and B. Gakiere, 2001, Lysine catabolism: a stress and development super-regulated metabolic pathway: *Current Opinion in Plant Biology*, v. 4, no. 3, p. 261-266.
- Galmes, J., H. Medrano, and J. Flexas, 2007, Photosynthesis and photoinhibition in response to drought in a pubescent (var. minor) and a glabrous (var. palau) variety of *Digitalis minor*: *Environmental and Experimental Botany*, v. 60, no. 1, p. 105-111.
- Garg, A. K., J. K. Kim, T. G. Owens, A. P. Ranwala, Y. Do Choi, L. V. Kochian, and R. J. Wu, 2002, Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, no. 25, p. 15898-15903.
- Ginestar, C., and J. R. Castel, 1996, Responses of young clementine citrus trees to water stress during different phenological periods: *Journal of Horticultural Science*, v. 71, no. 4, p. 551-559.

Goday, A., A. B. Jensen, F. A. Culianezmacia, M. M. Alba, M. Figueras, J. Serratosa, M. Torrent, and M. Pages, 1994, The Maize Abscisic Acid-Responsive Protein Rab17 Is Located in the Nucleus and Interacts with Nuclear-Localization Signals: *Plant Cell*, v. 6, no. 3, p. 351-360.

Godoy, J. A., R. Lunar, S. Torresschumann, J. Moreno, R. M. Rodrigo, and J. A. Pintororo, 1994, Expression, Tissue Distribution and Subcellular-Localization of Dehydrin Tas14 in Salt-Stressed Tomato Plants: *Plant Molecular Biology*, v. 26, no. 6, p. 1921-1934.

Goff, S. A. et al., 2002, A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp japonica): *Science*, v. 296, no. 5565, p. 92-100.

Gomez-Cadenas, A., F. R. Tadeo, E. Primo-Millo, and M. Talon, 1998, Involvement of abscisic acid and ethylene in the responses of citrus seedlings to salt shock: *Physiologia Plantarum*, v. 103, no. 4, p. 475-484.

GomezCadenas, A., F. R. Tadeo, M. Talon, and E. PrimoMillo, 1996, Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of cleopatra mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots: *Plant Physiology*, v. 112, no. 1, p. 401-408.

Gomi, K., H. Yamamoto, and K. Akimitsu, 2003, Epoxide hydrolase: a mRNA induced by the fungal pathogen *Alternaria alternata* on rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush): *Plant Molecular Biology*, v. 53, no. 1, p. 189-199.

Gong, D. M., Y. Guo, K. S. Schumaker, and J. K. Zhu, 2004, The SOS3 family of calcium sensors and SOS2 family of protein kinases in arabidopsis: *Plant Physiology*, v. 134, no. 3, p. 919-926.

Guo, Y. F., and S. S. Gan, 2005, Guo, Y. F., and S. S. Gan Leaf senescence: Signals, execution, and regulation.

Hannah, M. A., E. Zuther, K. Buchel, and A. G. Heyer, 2006, Transport and metabolism of raffinose family oligosaccharides in transgenic potato: *Journal of Experimental Botany*, v. 57, no. 14, p. 3801-3811.

Hara, M., S. Terashima, and T. Kuboi, 2001, Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from Citrus unshiu: *Journal of Plant Physiology*, v. 158, no. 10, p. 1333-1339.

Hara, M., Y. Wakasugi, Y. Ikoma, M. Yano, K. Ogawa, and T. Kuboi, 1999, cDNA sequence and expression of a cold-responsive gene in Citrus unshiu: *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 63, no. 2, p. 433-437.

Hare, P. D., W. A. Cress, and J. Van Staden, 1998, Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress: *Plant Cell and Environment*, v. 21, no. 6, p. 535-553.

Haritatos, E., F. Keller, and R. Turgeon, 1996, Raffinose oligosaccharide concentrations measured in individual cell and tissue types in *Cucumis melo* L leaves: Implications for phloem loading: *Planta*, v. 198, no. 4, p. 614-622.

Harmer, S. L., L. B. Hogenesch, M. Straume, H. S. Chang, B. Han, T. Zhu, X. Wang, J. A. Kreps, and S. A. Kay, 2000, Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock: *Science*, v. 290, no. 5499, p. 2110-2113.

Harrak, H., S. Azelmat, E. N. Baker, and Z. Tabaeizadeh, 2001, Isolation and characterization of a gene encoding a drought-induced cysteine protease in tomato (*Lycopersicon esculentum*): *Genome*, v. 44, no. 3, p. 368-374.

Hazen, S. P. et al., 2005, Expression profiling of rice segregating for drought tolerance QTLs using a rice genome array: *Functional and Integrative Genomics*, v. 5, no. 2, p. 104-116.

Hazen, S. P., Y. Wu, and J. A. Kreps, 2003, Gene expression profiling of plant responses to abiotic stress: *Functional and Integrative Genomics*, v. 3, p. 105-111.

Herrero, R., M. J. Asins, E. A. Carbonell, and L. Navarro, 1996, Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae .1. Intraspecies and intragenus genetic variability: *Theoretical and Applied Genetics*, v. 92, no. 5, p. 599-609.

Hmida-Sayari, A., R. Gargouri-Bouزيد, A. Bidani, L. Jaoua, A. Savoure, and S. Jaoua, 2005, Overexpression of Delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants: *Plant Science*, v. 169, no. 4, p. 746-752.

Hockema, B. R., and E. Etxeberria, 2001, Metabolic contributors to drought-enhanced accumulation of sugars and acids in oranges: *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 126, no. 5, p. 599-605.

Hoekstra, F. A., E. A. Golovina, and J. Buitink, 2001, Mechanisms of plant desiccation tolerance: *Trends in Plant Science*, v. 6, no. 9, p. 431-438.

Hong, Z. L., K. Lakkineni, Z. M. Zhang, and D. P. S. Verma, 2000, Removal of feedback inhibition of Delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress: *Plant Physiology*, v. 122, no. 4, p. 1129-1136.

Houde, M., C. Daniel, M. Lachapelle, F. Allard, S. Laliberte, and F. Sarhan, 1995, Immunolocalization of Freezing-Tolerance-Associated Proteins in the Cytoplasm and Nucleoplasm of Wheat Crown Tissues: *Plant Journal*, v. 8, no. 4, p. 583-593.

Hsieh, T. H., J. T. Lee, Y. Y. Charng, and M. T. Chan, 2002, Tomato plants ectopically expressing Arabidopsis CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress: *Plant Physiology*, v. 130, no. 2, p. 618-626.

Hu, H. H., M. Q. Dai, J. L. Yao, B. Z. Xiao, X. H. Li, Q. F. Zhang, and L. Z. Xiong, 2006, Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, no. 35, p. 12987-12992.

Huang, Y., B. Xiao, and L. Xiong, 2007, Characterization of a stress responsive proteinase inhibitor gene with positive effect in improving drought resistance in rice: *Planta*, v. 226, no. 1, p. 73-85.

Huang, Y. F., H. Li, C. E. Hutchison, J. Laskey, and J. J. Kieber, 2003, Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in Arabidopsis: *Plant Journal*, v. 33, no. 2, p. 221-233.

Huffaker, R. C., 1990, Proteolytic Activity During Senescence of Plants: *New Phytologist*, v. 116, no. 2, p. 199-231.

Hughes, D. W., and G. A. Galau, 1989, Temporally Modular Gene-Expression During Cotyledon Development: *Genes & Development*, v. 3, no. 3, p. 358-369.

Hummel, I., A. El Amrani, G. Gouesbet, F. Hennion, and I. Couee, 2004, Involvement of polyamines in the interacting effects of low temperature and mineral supply on *Pringlea antiscorbutica* (Kerguelen cabbage) seedlings: *Journal of Experimental Botany*, v. 55, no. 399, p. 1125-1134.

Hurth, M. A., S. J. Suh, T. Kretzschmar, T. Geis, M. Bregante, F. Gambale, E. Martinoia, and H. E. Neuhaus, 2005, Impaired pH homeostasis in *Arabidopsis* lacking the vacuolar dicarboxylate transporter and analysis of carboxylic acid transport across the tonoplast: *Plant Physiology*, v. 137, no. 3, p. 901-910.

Ingram, J., and D. Bartels, 1996, The molecular basis of dehydration tolerance in plants: *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 47, p. 377-403.

Jansen, R. C., and J. P. Nap, 2001, Genetical genomics: the added value from segregation: *Trends in Genetics*, v. 17, no. 7, p. 388-391.

Johnston, K. A., M. J. Lee, G. Brough, V. A. Hilder, A. M. R. Gatehouse, and J. A. Gatehouse, 1995, Protease Activities in the Larval Midgut of *Heliothis virescens* - Evidence for Trypsin and Chymotrypsin-Like Enzymes: *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 25, no. 3, p. 375-383.

Jonak, C., L. Okresz, L. Bogre, and H. Hirt, 2002, Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling: *Current Opinion in Plant Biology*, v. 5, no. 5, p. 415-424.

Jongeneel, C. V., 2000, Searching the expressed sequence tag (EST) databases: Panning for genes: *Briefings in Bioinformatics*, v. 1, no. 1, p. 76-92.

Kader, J. C., 1996, Lipid-transfer proteins in plants: *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 47, p. 627-654.

Kasukabe, Y., L. He, K. Nada, S. Misawa, I. Ihara, and S. Tachibana, 2004, Overexpression of Spermidine Synthase Enhances Tolerance to Multiple Environmental Stresses and Up-Regulates the Expression of Various Stress-Regulated Genes in Transgenic *Arabidopsis thaliana*: *Plant and Cell Physiology*, v. 45, no. 6, p. 712-722.

Kawasaki, S., C. Borchert, M. Deyholos, H. Wang, S. Brazille, K. Kawai, D. Galbraith, and H. J. Bohnert, 2001, Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice: *Plant Cell*, v. 13, no. 4, p. 889-905.

Kazuoka, T., and K. Oeda, 1994, Purification and Characterization of Cor85-Oligomeric Complex from Cold-Acclimated Spinach: *Plant and Cell Physiology*, v. 35, no. 4, p. 601-611.

Kieber, J. J., M. Rothenberg, G. Roman, K. A. Feldmann, and J. R. Ecker, 1993, Ctr1, A Negative Regulator of the Ethylene Response Pathway in *Arabidopsis*, Encodes A Member of the Raf Family of Protein-Kinases: *Cell*, v. 72, no. 3, p. 427-441.

Kishor, P. B. K., Z. L. Hong, G. H. Miao, C. A. A. Hu, and D. P. S. Verma, 1995, Overexpression of Delta-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Increases Proline

Production and Confers Osmotolerance in Transgenic Plants: *Plant Physiology*, v. 108, no. 4, p. 1387-1394.

Knight, H., 2000, Calcium signaling during abiotic stress in plants.

Koag, M. C., R. D. Fenton, S. Wilkens, and T. J. Close, 2003, The binding of maize DHN1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity: *Plant Physiology*, v. 131, no. 1, p. 309-316.

Krajewski, A. J., and E. Rabe, 1995, Citrus Flowering - A Critical-Evaluation: *Journal of Horticultural Science*, v. 70, no. 3, p. 357-374.

Kreps, J. A., Y. J. Wu, H. S. Chang, T. Zhu, X. Wang, and J. F. Harper, 2002, Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress: *Plant Physiology*, v. 130, no. 4, p. 2129-2141.

Krishnan, H. B., 2001, Characterization of a soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] mutant with reduced levels of Kunitz trypsin inhibitor: *Plant Science*, v. 160, no. 5, p. 979-986.

Kurihara, K., and Beidler M.L., 1968, Taste-Modifying Protein from Miracle fruit: *Science*, v. 20, p. 1241-1243.

Kuznetsov, V. V., N. L. Radyukina, and N. I. Shevyakova, 2006, Polyamines and stress: Biological role, metabolism, and regulation: *Russian Journal of Plant Physiology*, v. 53, no. 5, p. 583-604.

Laemmli, U. K., 1970, Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4: *Nature*, v. 227, no. 5259, p. 680-&.

Lafitte, H. R., A. H. Price, and B. Courtois, 2004, Yield response to water deficit in an upland rice mapping population: associations among traits and genetic markers: *Theoretical and Applied Genetics*, v. 109, no. 6, p. 1237-1246.

Lan, L. F. et al., 2004, Monitoring of gene expression profiles and isolation of candidate genes involved in pollination and fertilization in rice (*Oryza sativa* L.) with a 10K cDNA microarray: *Plant Molecular Biology*, v. 54, no. 4, p. 471-487.

Lanceras, J. C., G. Pantuwan, B. Jongdee, and T. Toojinda, 2004, Quantitative trait loci associated with drought tolerance at reproductive stage in rice: *Plant Physiology*, v. 135, no. 1, p. 384-399.

Laskowski, M., and I. Kato, 1980, Protein Inhibitors of Proteinases: *Annual Review of Biochemistry*, v. 49, p. 593-626.

Lawson, T., K. Oxborough, J. I. L. Morison, and N. R. Baker, 2003, The responses of guard and mesophyll cell photosynthesis to CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, light, and water stress in a range of species are similar: *Journal of Experimental Botany*, v. 54, no. 388, p. 1743-1752.

Lim, C. C., S. L. Krebs, and R. Arora, 1999, A 25-kDa dehydrin associated with genotype- and age-dependent leaf freezing-tolerance in *Rhododendron*: a genetic marker for cold hardiness?: *Theoretical and Applied Genetics*, v. 99, no. 5, p. 912-920.

Liu, H. P., B. H. Dong, Y. Y. Zhang, Z. P. Liu, and Y. L. Liu, 2004, Relationship between osmotic stress and the levels of free, conjugated and bound polyamines in leaves of wheat seedlings: *Plant Science*, v. 166, no. 5, p. 1261-1267.

Loussert, R., 1992, Los Agrios: Madrid, Ediciones Mundi-Prensa.

Lu, P. L., N. Z. Chen, R. An, Z. Su, B. S. Qi, F. Ren, J. Chen, and X. C. Wang, 2007, A novel drought-inducible gene, ATAF1, encodes a NAC family protein that negatively regulates the expression of stress-responsive genes in Arabidopsis: *Plant Molecular Biology*, v. 63, no. 2, p. 289-305.

Ma, R., M. Zhang, B. Li, G. Du, J. Wang, and J. Chen, 2005, The effects of exogenous Ca<sup>2+</sup> on endogenous polyamine levels and drought-resistant traits of spring wheat grown under and conditions: *Journal of Arid Environments*, v. 63, no. 1, p. 177-190.

Ma, S., and H. J. Bohnert, 2007, Integration of Arabidopsis thaliana stress-related transcript profiles, promoter structures and cell-specific expression: *Genome Biology*, v. 8, no. 4, p. R49.

Maas, E. V., 1993, Salinity and Citriculture: *Tree Physiology*, v. 12, no. 2, p. 195-216.

Macedo, M. L. R., M. D. M. Freire, E. C. Cabrini, M. H. Toyama, J. C. Novello, and S. Marangoni, 2003, A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effect on the survival of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera : Pyralidae): *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, v. 1621, no. 2, p. 170-182.

Mademba-Sy, F., A. Bouchereau, and F. R. Larher, 2003, Proline accumulation in cultivated citrus and its relationship with salt tolerance: *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, v. 78, no. 5, p. 617-623.

Mahajan, S., and N. Tuteja, 2005, Cold, salinity and drought stresses: An overview: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 444, no. 2, p. 139-158.

Mahalingam, R., A. Gomez-Buitrago, N. Eckardt, N. Shah, A. Guevara-Garcia, P. Day, R. Raina, and N. V. Fedoroff, 2003, Characterizing the stress/defense transcriptome of Arabidopsis: *Genome Biology*, v. 4, no. 3.

Maiale, S., D. H. Sanchez, A. Guirado, A. Vidal, and O. A. Ruiz, 2004, Spermine accumulation under salt stress: *Journal of Plant Physiology*, v. 161, no. 1, p. 35-42.

Malmberg, R., J. W. Messing, and I. M. Sussex, 1985, Malmberg, R., J. W. Messing, and I. M. Sussex *Molecular Biology of Plants: a laboratory course manual.*: Cold Spring Harbor, N.

Mansfield, T. J., and C. J. Atkinson, 1990, Stomatal behaviour in water stressed plants, in RG Alscher and JR Cumming eds., *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms*: New York, Wiley-Liss, p. 241-264.

Marrs, K. A., M. R. Alfenito, A. M. Lloyd, and V. Walbot, 1995, A Glutathione-S-Transferase Involved in Vacuolar Transfer Encoded by the Maize Gene Bronze-2: *Nature*, v. 375, no. 6530, p. 397-400.

Martinoia, E., M. Maeshima, and H. E. Neuhaus, 2007, Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism: *Journal of Experimental Botany*, v. 58, no. 1, p. 83-102.

Masuda, Y., S. Nirasawa, K. Nakaya, and Y. Kurihara, 1995, Cloning and Sequencing of A Cdna-Encoding A Taste-Modifying Protein, Miraculin: *Gene*, v. 161, no. 2, p. 175-177.

- McAinsh, M. R., H. Clayton, T. A. Mansfield, and A. M. Hetherington, 1996, Changes in stomatal behavior and guard cell cytosolic free calcium in response to oxidative stress: *Plant Physiology*, v. 111, no. 4, p. 1031-1042.
- McPherson, J. D. et al., 2001, A physical map of the human genome: *Nature*, v. 409, no. 6822, p. 934-941.
- Medina, J., R. Catala, and J. Salinas, 2001, Developmental and stress regulation of RCI2A and RCI2B, two cold-inducible genes of arabidopsis encoding highly conserved hydrophobic proteins: *Plant Physiology*, v. 125, no. 4, p. 1655-1666.
- Mifflin, B., 2000, Crop improvement in the 21st century: *Journal of Experimental Botany*, v. 51, no. 342, p. 1-8.
- Mikami, K., and N. Murata, 2003, Membrane fluidity and the perception of environmental signals in cyanobacteria and plants: *Progress in Lipid Research*, v. 42, no. 6, p. 527-543.
- Milla, M. A. R., A. Maurer, A. R. Huete, and J. P. Gustafson, 2003, Glutathione peroxidase genes in Arabidopsis are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways: *Plant Journal*, v. 36, no. 5, p. 602-615.
- Minic, Z., and L. Jouanin, 2006, Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation: *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 44, no. 7-9, p. 435-449.
- Mitra, J., 2001, Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants: *Current Science*, v. 80, no. 6, p. 758-763.
- Mittler, R., 2006, Abiotic stress, the field environment and stress combination: *Trends in Plant Science*, v. 11, no. 1, p. 15-19.
- Molinari, H. B. C., C. J. Marur, J. C. Bessalho, A. K. Kobayashi, M. Pileggi, R. P. Leite, L. F. P. Pereira, and L. G. E. Vieira, 2004, Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline: *Plant Science*, v. 167, no. 6, p. 1375-1381.
- Moore, G. A., 2001, Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers: *Trends in Genetics*, v. 17, no. 9, p. 536-540.
- Moreau, C., N. Aksenov, M. G. Lorenzo, B. Segerman, C. Funk, P. Nilsson, S. Jansson, and H. Tuominen, 2005, A genomic approach to investigate developmental cell death in woody tissues of Populus trees: *Genome Biology*, v. 6, no. 4.
- Mosolov, V. V., L. I. Grigor'eva, and T. A. Valueva, 2001, Plant proteinase inhibitors as multifunctional proteins (review): *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 37, no. 6, p. 545-551.
- Moulin, M., C. Deleu, and F. Larher, 2000, L-Lysine catabolism is osmo-regulated at the level of lysine-ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase in rapeseed leaf discs: *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 38, no. 7-8, p. 577-585.
- Mundy, J., and N. H. Chua, 1988, Abscisic-Acid and Water-Stress Induce the Expression of A Novel Rice Gene: *Embo Journal*, v. 7, no. 8, p. 2279-2286.

Munne-Bosch, S., and L. Alegre, 2000, Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants: *Planta*, v. 210, no. 6, p. 925-931.

Muthalif, M. M., and L. J. Rowland, 1994, Identification of Dehydrin-Like Proteins Responsive to Chilling in Floral Buds of Blueberry (*Vaccinium*, Section *Cyanococcus*): *Plant Physiology*, v. 104, no. 4, p. 1439-1447.

Nakagami, H., A. Pitzschke, and H. Hirt, 2005, Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling: *Trends in Plant Science*, v. 10, no. 7, p. 339-346.

Nakajima, Y., S. Susanto, and K. Hasegawa, 1993, Influence of Water-Stress in Autumn on Flower Induction and Fruiting in Young Pomelo Trees (*Citrus-Grandis* (L) Osbeck): *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, v. 62, no. 1, p. 15-20.

Nanjo, T., M. Kobayashi, Y. Yoshiba, Y. Kakubari, K. Yamaguchi-Shinozaki, and K. Shinozaki, 1999, Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*: *Febs Letters*, v. 461, no. 3, p. 205-210.

Naot, D., G. BenHayyim, Y. Eshdat, and D. Holland, 1995, Drought, Heat and Salt Stress Induce the Expression of A Citrus Homolog of An Atypical Late-Embryogenesis Lea5 Gene: *Plant Molecular Biology*, v. 27, no. 3, p. 619-622.

Narusaka, Y., M. Narusaka, M. Seki, T. Umezawa, J. Ishida, M. Nakajima, A. Enju, and K. Shinozaki, 2004, Crosstalk in the responses to abiotic and biotic stresses in *Arabidopsis*: Analysis of gene expression in cytochrome P450 gene superfamily by cDNA microarray: *Plant Molecular Biology*, v. 55, no. 3, p. 327-342.

Navarre, C., and A. Goffeau, 2000, Membrane hyperpolarization and salt sensitivity induced by deletion of PMP3, a highly conserved small protein of yeast plasma membrane: *Embo Journal*, v. 19, no. 11, p. 2515-2524.

Nayyar, H., 2003, Accumulation of osmolytes and osmotic adjustment in water-stressed wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) as affected by calcium and its antagonists: *Environmental and Experimental Botany*, v. 50, no. 3, p. 253-264.

Nolte, K. D., A. D. Hanson, and D. A. Gage, 1997, Proline accumulation and methylation to proline betaine in Citrus: Implications for genetic engineering of stress resistance: *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 122, no. 1, p. 8-13.

North, H. M., A. Frey, J. P. Boutin, B. Sotta, and A. Marion-Poll, 2005, Analysis of xanthophyll cycle gene expression during the adaptation of *Arabidopsis* to excess light and drought stress: Changes in RNA steady-state levels do not contribute to short-term responses: *Plant Science*, v. 169, no. 1, p. 115-124.

Nylander, M., P. Heino, E. Helenius, E. T. Palva, H. Ronne, and B. V. Welin, 2001, The low-temperature- and salt-induced RCI2A gene of *Arabidopsis* complements the sodium sensitivity caused by a deletion of the homologous yeast gene SNA1: *Plant Molecular Biology*, v. 45, no. 3, p. 341-352.

Ortuno, M. F., J. J. Alarcon, E. Nicolas, and A. Torrecillas, 2004, Interpreting trunk diameter changes in young lemon trees under deficit irrigation: *Plant Science*, v. 167, no. 2, p. 275-280.

Osterberg, M. K., O. Shavorskaya, M. Lascoux, and U. Lagercrantz, 2002, Naturally occurring indel variation in the *Brassica nigra* COL1 gene is associated with variation in flowering time: *Genetics*, v. 161, no. 1, p. 299-306.

Ozturk, Z. N., V. Talame, M. Deyholos, C. B. Michalowski, D. W. Galbraith, N. Gozukirmizi, R. Tuberosa, and H. J. Bohnert, 2002, Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley: *Plant Molecular Biology*, v. 48, no. 5, p. 551-573.

Park, E. J., Z. Jeknic, A. Sakamoto, J. DeNoma, R. Yuwansiri, N. Murata, and T. H. H. Chen, 2004, Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in tomato protects seeds, plants, and flowers from chilling damage: *Plant Journal*, v. 40, no. 4, p. 474-487.

Parry, A. D., and R. Horgan, 1992, Abscisic-Acid Biosynthesis in Roots .1. the Identification of Potential Abscisic-Acid Precursors, and Other Carotenoids: *Planta*, v. 187, no. 2, p. 185-191.

Parry, M. A. J., P. J. Andralojc, S. Khan, P. J. Lea, and A. J. Keys, 2002, Rubisco activity: Effects of drought stress: *Annals of Botany*, v. 89, p. 833-839.

Parry, M. A. J., J. Flexas, and H. Medrano, 2005, Prospects for crop production under drought: research priorities and future directions: *Annals of Applied Biology*, v. 147, no. 3, p. 211-226.

Paterson, A. H., 2006, Leafing through the genomes of our major crop plants: strategies for capturing unique information: *Nature Reviews Genetics*, v. 7, no. 3, p. 174-184.

Pei, Z. M., Y. Murata, G. Benning, S. Thomine, B. Klusener, G. J. Allen, E. Grill, and J. I. Schroeder, 2000, Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells: *Nature*, v. 406, no. 6797, p. 731-734.

Pelah, D., W. X. Wang, A. Altman, O. Shoseyov, and D. Bartels, 1997, Differential accumulation of water stress-related proteins, sucrose synthase and soluble sugars in *Populus* species that differ in their water stress response: *Physiologia Plantarum*, v. 99, no. 1, p. 153-159.

Pittman, J. K., R. F. Mills, C. D. O'Connor, and L. E. Williams, 1999, Two additional type IIA Ca<sup>2+</sup>-ATPases are expressed in *Arabidopsis thaliana*: evidence that type IIA sub-groups exist: *Gene*, v. 236, no. 1, p. 137-147.

Porat, R., K. Pasentsis, D. Rozentzvieg, D. Gerasopoulos, V. Falara, A. Samach, S. Lurie, and A. K. Kanellis, 2004, Isolation of a dehydrin cDNA from orange and grapefruit citrus fruit that is specifically induced by the combination of heat followed by chilling temperatures: *Physiologia Plantarum*, v. 120, no. 2, p. 256-264.

Porat, R., D. Pavoncello, S. Lurie, and T. G. Mccollum, 2002, Identification of a grapefruit cDNA belonging to a unique class of citrus dehydrins and characterization of its expression patterns under temperature stress conditions: *Physiologia Plantarum*, v. 115, no. 4, p. 598-603.

Porat, R., D. Pavoncello, J. Peretz, S. Ben-Yehoshua, and S. Lurie, 2000a, Effects of various heat treatments on the induction of cold tolerance and on the postharvest qualities of 'Star Ruby' grapefruit: *Postharvest Biology and Technology*, v. 18, no. 2, p. 159-165.

Porat, R. et al., 2000b, Induction of resistance to *Penicillium digitatum* and chilling injury in 'Star Ruby' grapefruit by a short hot-water rinse and brushing treatment: *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, v. 75, no. 4, p. 428-432.

Proft, M., and K. Struhl, 2004, MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction: *Cell*, v. 118, no. 3, p. 351-361.

Qin, X. Q., and J. A. D. Zeevaart, 2002, Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana plumbaginifolia* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance: *Plant Physiology*, v. 128, no. 2, p. 544-551.

Rabbani, M. A. et al., 2003, Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA get-blot analyses: *Plant Physiology*, v. 133, no. 4, p. 1755-1767.

Ramanjulu, S., and D. Bartels, 2002, Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants: *Plant Cell and Environment*, v. 25, no. 2, p. 141-151.

Reddy, A. R., K. V. Chaitanya, and M. Vivekanandan, 2004, Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants: *Journal of Plant Physiology*, v. 161, no. 11, p. 1189-1202.

Rensink, W. A., and C. R. Buell, 2005, Microarray expression profiling resources for plant genomics: *Trends in Plant Science*, v. 10, no. 12, p. 603-609.

Repellin, A., A. T. P. Thi, A. Tashakoré, Y. Sahrah, C. Daniel, and Y. ZuilyFodil, 1997, Leaf membrane lipids and drought tolerance in young coconut palms (*Cocos nucifera* L): *European Journal of Agronomy*, v. 6, no. 1-2, p. 25-33.

Reymond, P., H. Weber, M. Damond, and E. E. Farmer, 2000, Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*: *Plant Cell*, v. 12, no. 5, p. 707-719.

Rinne, P., A. Welling, and P. Kaikuranta, 1998, Onset of freezing tolerance in birch (*Betula pubescens* Ehrh.) involves LEA proteins and osmoregulation and is impaired in an ABA-deficient genotype: *Plant Cell and Environment*, v. 21, no. 6, p. 601-611.

Rizhsky, L., H. J. Liang, and R. Mittler, 2002, The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco: *Plant Physiology*, v. 130, no. 3, p. 1143-1151.

Rizhsky, L., H. J. Liang, J. Shuman, V. Shulaev, S. Davletova, and R. Mittler, 2004, When Defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress: *Plant Physiology*, v. 134, no. 4, p. 1683-1696.

Rodrigo, M. J., B. Alquezar, and L. Zacarias, 2006, Cloning and characterization of two 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck): *Journal of Experimental Botany*, v. 57, no. 3, p. 633-643.

Rontein, D., G. Basset, and A. D. Hanson, 2002, Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants: *Metabolic Engineering*, v. 4, no. 1, p. 49-56.

Rossel, J. B., I. W. Wilson, and B. J. Pogson, 2002, Global changes in gene expression in response to high light in *Arabidopsis*: *Plant Physiology*, v. 130, no. 3, p. 1109-1120.

RuizSanchez, M. C., R. Domingo, R. Save, C. Biel, and A. Torrecillas, 1997, Effects of water stress and rewatering on leaf water relations of lemon plants: *Biologia Plantarum*, v. 39, no. 4, p. 623-631.

Ryan, C. A., 1989, Proteinase-Inhibitor Gene Families - Strategies for Transformation to Improve Plant Defenses Against Herbivores: *Bioessays*, v. 10, no. 1, p. 20-24.

Sakuma, Y., K. Maruyama, Y. Osakabe, F. Qin, M. Seki, K. Shinozaki, and K. Yamaguchi-Shinozaki, 2006, Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression: *Plant Cell*, v. 18, no. 5, p. 1292-1309.

Sanchez-Ballesta, M. T., M. J. Rodrigo, M. T. Lafuente, A. Granell, and L. Zacarias, 2004, Dehydrin from citrus, which confers in vitro dehydration and freezing protection activity, is constitutive and highly expressed in the flavedo of fruit but responsive to cold and water stress in leaves: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, no. 7, p. 1950-1957.

Saravitz, D. M., D. M. Pharr, and T. E. Carter, 1987, Galactinol Synthase Activity and Soluble Sugars in Developing Seeds of 4 Soybean Genotypes: *Plant Physiology*, v. 83, no. 1, p. 185-189.

Sauter, J. J., S. Westphal, and M. Wisniewski, 1999, Immunological identification of dehydrin-related proteins in the wood of five species of *Populus* and in *Salix caprea* L.: *Journal of Plant Physiology*, v. 154, no. 5-6, p. 781-788.

Save, R., C. Biel, R. Domingo, M. C. RuizSanchez, and A. Torrecillas, 1995, Some Physiological and Morphological-Characteristics of Citrus Plants for Drought Resistance: *Plant Science*, v. 110, no. 2, p. 167-172.

Segrest, J. P., H. Deloof, J. G. Dohlman, C. G. Brouillette, and G. M. Anantharamaiah, 1990, Amphipathic Helix Motif - Classes and Properties: *Proteins-Structure Function and Genetics*, v. 8, no. 2, p. 103-117.

Seki, M. et al., 2002a, Monitoring the expression pattern of around 7000 Arabidopsis genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray: *Functional and integrative genomics*, v. 2, p. 282-291.

Seki, M., A. Kamei, K. Yamaguchi-Shinozaki, and K. Shinozaki, 2003, Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection: *Current Opinion in Biotechnology*, v. 14, no. 2, p. 194-199.

Seki, M. et al., 2002b, Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray: *Plant Journal*, v. 31, no. 3, p. 279-292.

Sgherri, C. L. M., C. Pinzino, and F. Navarilzo, 1996, Sunflower seedlings subjected to increasing stress by water deficit: Changes in O-2(center dot-) production related to the composition of thylakoid membranes: *Physiologia Plantarum*, v. 96, no. 3, p. 446-452.

Shatters, R. G., M. G. Bausher, W. B. Hunter, J. X. Chaparro, P. M. Dang, R. P. Niedz, R. T. Mayer, T. G. McCollum, and X. Sinisterra, 2004, Putative protease inhibitor gene discovery and transcript profiling during fruit development and leaf damage in grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.): *Gene*, v. 326, p. 77-86.

Shen, B., R. G. Jensen, and H. J. Bohnert, 1997, Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals: *Plant Physiology*, v. 115, no. 2, p. 527-532.

Shen, L. H., J. Gong, R. A. Caldo, D. Nettleton, D. Cook, R. P. Wise, and J. A. Dickerson, 2005, BarleyBase - an expression profiling database for plant genomics: *Nucleic Acids Research*, v. 33, p. D614-D618.

Shinozaki, K., and K. Yamaguchi-Shinozaki, 2007, Gene networks involved in drought stress response and tolerance: *Journal of Experimental Botany*, v. 58, no. 2, p. 221-227.

Shinozaki, K., K. Yamaguchi-Shinozaki, and M. Seki, 2003, Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses: *Current Opinion in Plant Biology*, v. 6, no. 5, p. 410-417.

Shou, H. X., P. Bordallo, and K. Wang, 2004, Expression of the Nicotiana protein kinase (NPK1) enhanced drought tolerance in transgenic maize: *Journal of Experimental Botany*, v. 55, no. 399, p. 1013-1019.

Smith, T. A., 1985, Polyamines: *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 36, p. 117-143.

Su, J., and R. Wu, 2004, Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis: *Plant Science*, v. 166, no. 4, p. 941-948.

Swindell, W. R., 2006, The association among gene expression responses to nine abiotic stress treatments in *Arabidopsis thaliana*: *Genetics*, v. 174, no. 4, p. 1811-1824.

Swingle, W. T., and P. C. Reece, 1967, The botany of citrus and its wild relatives: *The Citrus Industry*, Vol.I (Reuther, W. et al. eds), p. 190-430.

Szegletes, Z., L. Erdei, I. Tari, and L. Cseuz, 2000, Accumulation of osmoprotectants in wheat cultivars of different drought tolerance: *Cereal Research Communications*, v. 28, no. 4, p. 403-410.

Taji, T., C. Ohsumi, S. Iuchi, M. Seki, M. Kasuga, M. Kobayashi, K. Yamaguchi-Shinozaki, and K. Shinozaki, 2002, Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*: *Plant Journal*, v. 29, no. 4, p. 417-426.

Taji, T. et al., 2004, Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis*-related halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarray: *Plant Physiology*, v. 135, no. 3, p. 1697-1709.

Takahashi, S., T. Katagiri, T. Hirayama, K. Yamaguchi-Shinozaki, and K. Shinozaki, 2001, Hyperosmotic stress induces a rapid and transient increase in inositol 1,4,5-trisphosphate independent of abscisic acid in *Arabidopsis* cell culture: *Plant and Cell Physiology*, v. 42, no. 2, p. 214-222.

Takahashi, S. et al., 2004, Monitoring the expression profiles of genes induced by hyperosmotic, high salinity, and oxidative stress and abscisic acid treatment in *Arabidopsis* cell culture using a full-length cDNA microarray: *Plant Molecular Biology*, v. 56, no. 1, p. 29-55.

- Talame, V., N. Z. Ozturk, H. J. Bohnert, and R. Tuberosa, 2007, Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis: *Journal of Experimental Botany*, v. 58, no. 2, p. 229-240.
- Tanaka, T., 1977, Fundamental discussion of citrus classification: *Stud Citrol*, v. 14, p. 1-6.
- Tarczynski, M. C., R. G. Jensen, and H. J. Bohnert, 1993, Stress Protection of Transgenic Tobacco by Production of the Osmolyte Mannitol: *Science*, v. 259, no. 5094, p. 508-510.
- Theerasilp, S., H. Hitotsuya, S. Nakajo, K. Nakaya, Y. Nakamura, and Y. Kurihara, 1989, Complete Amino-Acid Sequence and Structure Characterization of the Taste-Modifying Protein, Miraculin: *Journal of Biological Chemistry*, v. 264, no. 12, p. 6655-6659.
- Thomas, J. C., M. Sepahi, B. Arendall, and H. J. Bohnert, 1995, Enhancement of Seed-Germination in High Salinity by Engineering Mannitol Expression in *Arabidopsis-Thaliana*: *Plant Cell and Environment*, v. 18, no. 7, p. 801-806.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson, 1994, Clustal-W - Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice: *Nucleic Acids Research*, v. 22, no. 22, p. 4673-4680.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, 1979, Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets - Procedure and Some Applications: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 76, no. 9, p. 4350-4354.
- Tran, L. S. P. et al., 2004, Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter: *Plant Cell*, v. 16, no. 9, p. 2481-2498.
- Tsukuda, S., K. Gomi, H. Yamamoto, and K. Akimitsu, 2006, Characterization of cDNAs encoding two distinct miraculin-like proteins and stress-related modulation of the corresponding mRNAs in Citrus jambhiri Lush: *Plant Molecular Biology*, v. 60, no. 1, p. 125-136.
- Tuberosa, R., S. Salvi, M. C. Sanguineti, P. Landi, M. MacCafferri, and S. Conti, 2002, Mapping QTLs regulating morpho-physiological traits and yield: Case studies, shortcomings and perspectives in drought-stressed maize: *Annals of Botany*, v. 89, p. 941-963.
- Tudela, D., and E. PrimoMillo, 1992, 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Transported from Roots to Shoots Promotes Leaf Abscission in Cleopatra Mandarin (Citrus-Reshni Hort Ex Tan) Seedlings Rehydrated After Water-Stress: *Plant Physiology*, v. 100, no. 1, p. 131-137.
- Umezawa, T., M. Fujita, Y. Fujita, K. Yamaguchi-Shinozaki, and K. Shinozaki, 2006, Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future: *Current Opinion in Biotechnology*, v. 17, no. 2, p. 113-122.

Uno, Y., T. Furihata, H. Abe, R. Yoshida, K. Shinozaki, and K. Yamaguchi-Shinozaki, 2000, Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, no. 21, p. 11632-11637.

Urao, T., K. Yamaguchi-Shinozaki, S. Urao, and K. Shinozaki, 1993, An Arabidopsis Myb Homolog Is Induced by Dehydration Stress and Its Gene-Product Binds to the Conserved Myb Recognition Sequence: *Plant Cell*, v. 5, no. 11, p. 1529-1539.

Valliyodan, B., and H. T. Nguyen, 2006, Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants: *Current Opinion in Plant Biology*, v. 9, no. 2, p. 189-195.

Venter, J. C. et al., 2001, The sequence of the human genome: *Science*, v. 291, no. 5507, p. 1304-1351.

Verslues, P. E., M. Agarwal, S. Katiyar-Agarwal, J. H. Zhu, and J. K. Zhu, 2006, Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status: *Plant Journal*, v. 45, no. 4, p. 523-539.

Villardell, J., A. Goday, M. A. Freire, M. Torrent, M. C. Martinez, J. M. Torne, and M. Pages, 1990, Gene Sequence, Developmental Expression, and Protein-Phosphorylation of Rab-17 in Maize: *Plant Molecular Biology*, v. 14, no. 3, p. 423-432.

Vinocur, B., and A. Altman, 2005, Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations: *Current Opinion in Biotechnology*, v. 16, no. 2, p. 123-132.

Vodkin, L. O. et al., 2004, Microarrays for global expression constructed with a low redundancy set of 27,500 sequenced cDNAs representing an array of developmental stages and physiological conditions of the soybean plant: *Bmc Genomics*, v. 5.

Wang, W. X., B. Vinocur, and A. Altman, 2003, Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance: *Planta*, v. 218, no. 1, p. 1-14.

Wang, W. X., B. Vinocur, O. Shoseyov, and A. Altman, 2004, Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response: *Trends in Plant Science*, v. 9, no. 5, p. 244-252.

Waterston, R. H. et al., 2002, Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome: *Nature*, v. 420, no. 6915, p. 520-562.

Watkinson, J. I. et al., 2003, Photosynthetic acclimation is reflected in specific patterns of gene expression in drought-stressed loblolly pine: *Plant Physiology*, v. 133, no. 4, p. 1702-1716.

Williams, L. E., R. Lemoine, and N. Sauer, 2000, Sugar transporters in higher plants - A diversity of roles and complex regulation: *Trends in Plant Science*, v. 5, no. 7, p. 283-290.

Wisniewski, M., T. J. Close, T. Artlip, and R. Arora, 1996, Seasonal patterns of dehydrins and 70-kDa heat-shock proteins in bark tissues of eight species of woody plants: *Physiologia Plantarum*, v. 96, no. 3, p. 496-505.

- Wisniewski, M., R. Webb, R. Balsamo, T. J. Close, X. M. Yu, and M. Griffith, 1999, Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: A dehydrin from peach (*Prunus persica*): *Physiologia Plantarum*, v. 105, no. 4, p. 600-608.
- Wisniewski, M. E., C. L. Bassett, J. Renaut, R. Farrell, T. Tworkoskii, and T. S. Artlip, 2006, Differential regulation of two dehydrin genes from peach (*Prunus persica*) by photoperiod, low temperature and water deficit: *Tree Physiology*, v. 26, no. 5, p. 575-584.
- Wong, C. E. et al., 2006, Transcriptional profiling implicates novel interactions between abiotic stress and hormonal responses in *Thellungiella*, a close relative of *Arabidopsis*: *Plant Physiology*, v. 140, no. 4, p. 1437-1450.
- Xu, R. R., F. M. Song, and Z. Zheng, 2006, OsBISAMT1, a gene encoding S-adenosyl-L-methionine : saticylic acid carboxyl methyltransferase, is differentially expressed in rice defense responses: *Molecular Biology Reports*, v. 33, no. 3, p. 223-231.
- Yakushiji, H., K. Morinaga, and H. Nonami, 1998, Sugar accumulation and partitioning in Satsuma mandarin tree tissues and fruit in response to drought stress: *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 123, no. 4, p. 719-726.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., and K. Shinozaki, 2006, Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses: *Annual Review of Plant Biology*, v. 57, p. 781-803.
- Yang, J., J. Zhang, K. Liu, Z. Wang, and L. Liu, 2007, Involvement of polyamines in the drought resistance of rice: *Journal of Experimental Botany*, v. 58, no. 6, p. 1545-1555.
- Yang, X. H., X. Y. Chen, Q. Y. Ge, B. Li, Y. P. Tong, A. M. Zhang, Z. S. Li, T. Y. Kuang, and C. M. Lu, 2006, Tolerance of photosynthesis to photoinhibition, high temperature and drought stress in flag leaves of wheat: A comparison between a hybridization line and its parents grown under field conditions: *Plant Science*, v. 171, no. 3, p. 389-397.
- Yu, J. et al., 2002, A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp *indica*): *Science*, v. 296, no. 5565, p. 79-92.
- Yu, L. X., and T. L. Setter, 2003, Comparative transcriptional profiling of placenta and endosperm in developing maize kernels in response to water deficit: *Plant Physiology*, v. 131, no. 2, p. 568-582.
- Yuan, Q. P. et al., 2005, The institute for genomic research Osa1 rice genome annotation database: *Plant Physiology*, v. 138, no. 1, p. 17-26.
- Zaragoza, S., 1993, *Pasado y presente de la citricultura española*: Valencia, Generalitat Valenciana, Conselleria D'Agricultura, Pesca y Alimentació.
- Zhang, M., R. Barg, M. G. Yin, Y. Gueta-Dahan, A. Leikin-Frenkel, Y. Salts, S. Shabtai, and G. Ben-Hayyim, 2005, Modulated fatty acid desaturation via overexpression of two distinct omega-3 desaturases differentially alters tolerance to various abiotic stresses in transgenic tobacco cells and plants: *Plant Journal*, v. 44, no. 3, p. 361-371.
- Zheng, J., J. F. Zhao, J. P. Zhang, J. J. Fu, M. Y. Gou, Z. G. Dong, W. Hou, Q. S. Huang, and G. Y. Wang, 2006, Comparative expression profiles of maize genes from a water stress-specific cDNA macroarray in response to high-salinity, cold or abscisic acid: *Plant Science*, v. 170, no. 6, p. 1125-1132.

Zhou, J. L. et al., 2007, Global genome expression analysis of rice in response to drought and high-salinity stresses in shoot, flag leaf, and panicle: *Plant Molecular Biology*, v. 63, no. 5, p. 591-608.

Zhu, J. K., 2002, Salt and drought stress signal transduction in plants: *Annual Review of Plant Biology*, v. 53, p. 247-273.

Zuther, E., K. Buchel, M. Hundertmark, M. Stitt, D. K. Hinch, and A. G. Heyer, 2004, The role of raffinose in the cold acclimation response of *Arabidopsis thaliana*: *Febs Letters*, v. 576, no. 1-2, p. 169-173.

**Anexo I**



Biblioteca	Especie	Tejido/Estado fisiológico/Estrés aplicado
AbioticL1	Clemenules	Hojas de plantas sometidas a diferentes estreses abióticos (estrés hídrico, rehidratación, estrés salino, clorosis férrica)
AbioticR1	Cleopatra	Raíces de plantas sometidas a diferentes estreses abióticos (estrés hídrico, rehidratación, estrés salino, clorosis férrica)
AbsAOv1	Clemenules	Zona de abscisión A de ovarios tratados con etileno
AbsCFruit1	Navelina	Zona de abscisión C y tejidos de alrededor
AbsCOv1	Clemenules	Zona de abscisión C y tejidos de alrededor con tratamiento de ovarios con etileno
AbsDev	Clemenules	Zona de abscisión laminar y tejidos de alrededor de hoja
AbsLeaSub1	Clemenules	Zona laminar de abscisión de hojas de plantas sometidas a estrés hídrico y rehidratación
BiotPhyR1	Aurantium	Raíces inoculadas con zoosporas de Phytophthora citrophthora
CEVdCidro1	Cidro Etrog	Hojas infectadas con el viroide Citrus exocartis (CEVd)
CTVClemen1	Clemenules	Brotos infectados con el virus Citrus tristeza (CTV)
CTVLeafMc1	Macrophylla	Hojas infectadas con el virus Citrus tristeza (CTV)
CTVMacrop1	Macrophylla	Hojas infectadas con el virus Citrus tristeza (CTV)
DevOvary1	Clemenules	Ovarios
DroRLeaf1	Clemenules	Hojas de plantas sometidas a estrés hídrico y rehidratación
Drought1	Clemenules	Hojas de plantas sometidas a 5, 10 y 24 horas de estrés hídrico
Drought2	Clemenules	Raíces de plantas sometidas a 5, 10 y 24 horas de estrés hídrico
EHR	Clemenules	Raíces de plantas sometidas a estrés hídrico y rehidratación
ExocortL1	Cidro Etrog	Hojas infectadas con el viroide Citrus exocartis (CEVd)
FerrChloL1	Clemenules	Hojas de plantas sometidas a carencia de hierro durante un año
FerrChloR1	Clemenules	Raíces de plantas sometidas a carencia de hierro durante un año
FlavCurFr1	Fortune	Flavado de frutos maduros sometidos 37°C y almacenados a 1°C
FlavCurFrS	Fortune	Flavado de frutos maduros sometidos 37°C y almacenados a 1,5°C
FlavFr1	Clemenules	Flavado de frutos almacenados a 2°C
FlavFrSub1	Fortune	Flavado de frutos almacenados a 2°C y 12°C
FlavRip1	Clemenules	Flavado de frutos maduros
FlavSen1	Clemenules	Flavado de frutos senescentes
HSVdMacro1	Macrophylla	Hojas de plantas infectadas con el viroide HSVd
IF1	Clemenules	Flores a diferentes estados de desarrollo
IVIA1	Clemenules	Mezcla compleja de tejidos
KCl_Salt1	Cleopatra	Raíces de plantas sometidas a estrés salino y deficiencia de sal
NTLeaf1	Clemenules	Hojas
OF1	Clemenules	Ovarios senescentes y frutos de 5 semanas tratados con GA3
OF2	Clemenules	Ovarios y frutos de 1 y 5 semanas tratados con GA3
PhIFruit1	Clemenules	Frutos en desarrollo
PhIL_IIV1	Clemenules	Vesículas de jugo del fruto
PhyRootCh1	Cleopatra	Raíces infectadas con Phytophthora citrophthora
PhyRootSr1	Aurantium	Raíces infectadas con Phytophthora citrophthora
PhyRootSw1	Navelina	Raíces infectadas con Phytophthora citrophthora
PostharvC1	Clemenules	Flavado de frutos almacenamiento a 2°C
PostharveN	Clemenules	Flavado y albedo de frutos almacenados a 2°C e infectados con Penicillium digitatum
PostharvP1	Clemenules	Rind (flavado + albedo) de frutos infectados con Penicillium digitatum
RindPdIg24	Clemenules	Rind (flavado + albedo) de frutos maduros infectados con Penicillium digitatum y almacenados a 20°C
RindPdIgS	Navelina	Rind (flavado + albedo) de frutos maduros infectados con Penicillium digitatum y almacenados a 20°C
Roots1	Carrizo Citrange	Raíces de plantas tratadas con Paclobutrazol (inhibidor de la síntesis de giberelinas) o auxina (Acido Indol-butirico)
RVDevelop1	Clemenules	Hojas, flores, ovarios y meristemos apicales
RVDevelopN	Clemenules	Hojas, flores, ovarios y meristemos apicales
SaltLeaf1	Clemenules	Hojas de plantas sometidas a estrés salino
SLH	Navelina	Hojas de plantas sometidas a prolongado estrés salino
StrClemenN	Clemenules	Hojas y brotes de plantas sometida a varios estreses (estrés hídrico, estrés hídrico y rehidratación, estrés salino, estrés salino prolongado, carencia de hierro e infección con CTV)
StrCleopN	Cleopatra	Raíces de plantas sometida a varios estreses (estrés hídrico, estrés hídrico y rehidratación, estrés salino, estrés salino prolongado, carencia de hierro e infección con Phytophthora citrophthora)
TF	Clemenules	Flavado y jugo de frutos
Veg1	Clemenules	Hojas, brotes y entrenudos tras la aplicación de GA3 y Paclobutrazol (PCB)

Figura 1. Bibliotecas del CFGP. Nomenclatura, especie y material vegetal utilizado en cada una de las 52 bibliotecas de la colección del CFGP.

Biblioteca	Clones	ESTs	Singletons	Contigs	Unigenes	Redundancia (%)	Unigenes específicos	Novedad (%)
AbioticL1	960	831	125	498	623	25	139	22
AbioticR1	960	903	157	531	688	24	168	24
AbsAOv1	1183	1116	230	523	753	33	248	33
AbsCFruit1	866	814	230	438	668	18	254	38
AbsCOv1	1091	1021	229	504	733	28	252	34
AbsDev	956	924	220	523	743	20	242	33
AbsLeaSub1	768	704	78	244	322	54	112	35
BiotPhyR1	960	919	364	401	765	17	407	53
CEVdCidro1	480	465	111	220	331	29	152	46
CTVClemen1	480	453	62	327	389	14	63	16
CTVLeafMc1	1219	967	20	85	105	89	59	56
CTVMacrop1	480	447	133	214	347	22	147	42
DevOvary1	384	296	27	192	219	26	29	13
DroRLeaf1	576	560	136	365	501	11	141	28
Drought1	722	607	65	245	310	49	71	23
Drought2	1574	1401	470	565	1035	26	515	50
EHR	850	842	54	239	293	65	94	32
ExocortL1	672	637	242	341	583	8	253	43
FerrChloL1	864	558	78	344	422	24	83	20
FerrChloR1	1056	807	161	478	639	21	170	27
FlavCurFr1	1152	1106	260	697	957	13	263	27
FlavCurFRS	75	75	36	37	73	3	37	51
FlavFr1	2361	2067	352	976	1328	36	387	29
FlavFrSub1	824	584	70	160	230	61	89	39
FlavRip1	322	305	58	209	267	12	59	22
FlavSen1	225	213	44	150	194	9	45	23
HSVdMacro1	480	406	116	209	325	20	128	39
IF1	2421	2316	443	1165	1608	31	556	35
IVA1	41460	40484	5598	7233	12831	68	8980	70
KCl_Salt1	1053	1034	225	625	850	18	248	29
NTLeaf1	359	319	61	189	250	22	65	26
OF1	168	161	46	110	156	3	47	30
OF2	1739	1408	417	784	1201	15	434	36
PhIFruit1	576	555	120	348	468	16	127	27
PhIL_IIV1	1038	1004	8	163	171	83	38	22
PhyRootCl1	864	835	172	523	695	17	178	26
PhyRootSr1	959	876	488	342	830	5	495	60
PhyRootSw1	1886	1780	965	630	1595	10	1008	63
PostharvC1	960	917	134	582	716	22	137	19
PostharvN	928	891	176	561	737	17	185	25
PostharvP1	1056	1008	161	640	801	21	169	21
RindPdIg24	1152	1118	264	674	938	16	278	30
RindPdIgS	330	295	37	147	184	38	50	27
Roots1	176	175	37	104	141	19	40	28
RVDevelop1	960	759	60	451	511	33	65	13
RVDevelopN	960	823	182	543	725	12	192	26
SaltLeaf1	738	665	77	367	444	33	85	19
SLH	1048	1040	255	593	848	18	289	34
StrClemenN	960	866	186	567	753	13	203	27
StrCleopN	960	914	246	594	840	8	254	30
TF	4037	3966	781	2083	2864	28	819	29
Veg1	1771	1689	427	971	1398	17	439	31
<b>Total</b>	<b>91138</b>	<b>85965</b>	<b>15707</b>	<b>11844</b>	<b>27551</b>	<b>68</b>	<b>19988</b>	

Figura 2. Desglose de los clones de las bibliotecas de la colección del CFGP. Redundancia =  $(1 - (\text{Unigenes}/\text{ESTs})) \times 100$ . Novedad =  $(\text{unigenes específicos}/\text{Unigenes}) \times 100$ .

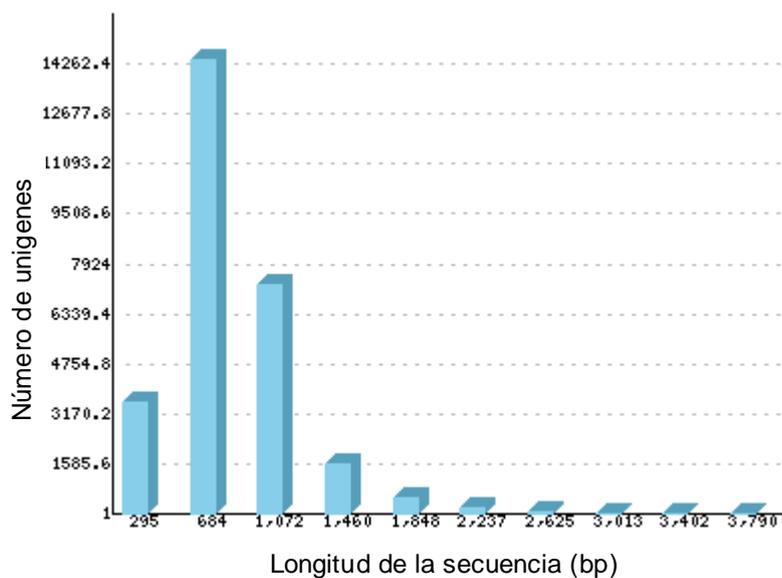


Figura 3. Longitud de los unigenes de la colección del CFGP. El 78% de los unigenes tiene una longitud entre 490 y 1265 bp.

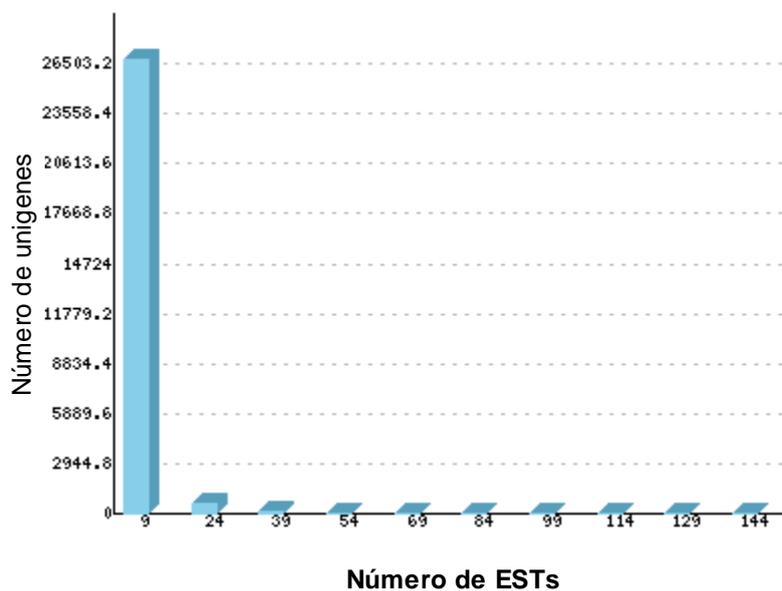


Figura 4. Número de ESTs por unigen de la colección del CFGP. El 97% de unigenes de la colección esta formado de 1 a 16 ESTs.



**Anexo II**



Tabla 3. Unigenes específicos de EH-Hojas (Inducidos).

## Homólogo de Arabidopsis

Categoría Funcional	Código CFGP	Máximo factor de inducción	Código	Función (nombre del gen) y regulación	Inducción <sup>1</sup> (Factor entre paréntesis)
<b>Metabolismo</b>					
	aCL1563Contig1	16	AT4G33150.2	Enzima bifuncional lisina-cetoglutarato/sacaropina deshidrogenasa ( <i>LKR/SDH</i> ).	ABA (5.6), estrés osmótico (19) y salinidad (4.7)
	aCL2322Contig1	4,5	AT1G62660.1	Invertasa	MJ (2.5) y estrés osmótico (2.3)
	aCL35Contig1	7	AT4G25700.1	Beta-caroteno hidroxilasa ( <i>CHY1</i> )	
	aCL119Contig1	16	AT2G23620.1	Esterasa	
	aCL119Contig5	14	AT2G23620.1	Esterasa	
	aCL3711Contig1	3	AT2G02400.1	Cinamoil CoA reductasa	
	aCL98Contig2	3,7	AT3G49110.1	Peroxidasa 33 de clase III ( <i>PRX33</i> )	
<b>Síntesis, plegamiento y degradación de proteínas</b>					
	aCL2091Contig1	2,8	AT4G02733.1	Proteína de la familia F-box	
	aCL1208Contig1	2,8	AT1G55060.1	Poliubiquitina ( <i>UBQ12</i> )	ABA (2.2) y ACC (3)
	aCL186Contig1	3	AT1G53540.1	Proteína de choque térmico (HSP) de clase I (17.6 kDa)	Sequía (2), estrés osmótico (19), salinidad (7) y daño mecánico (4)
	aCL186Contig2	2,8	AT5G12030.1	Proteína de choque térmico (HSP) de clase II (17.7 kDa)	Estrés osmótico (13), salinidad (7.5) y daño mecánico (4.8)
	aCL1495Contig1	4	AT4G00100.1	Proteína ribosomal S13 ( <i>RPS13A</i> ), subunidad 40S	
	aC08002D11SK_c	4,5	AT2G47570.1	Proteína ribosomal L18 ( <i>RPL18A</i> ), subunidad 60S	
<b>Antioxidantes</b>					
	aCL5500Contig1	3	AT3G09640.2	L-ascorbato peroxidasa ( <i>APX1</i> )	ABA (7.3), estrés osmótico (14) y salinidad (10)
	aCL859Contig1	14	AT3G11050.1	Ferritina parecida a la ferritina de <i>Vigna unguiculata</i>	Estrés osmótico (2.5)
	aCL110Contig2	3,7	AT1G10360.1	Glutatió S-transferasa ( <i>GST29</i> ) parecida a glutatió S-transferasa de tabaco	
<b>Proteínas LEA (Late embryogenesis abundant protein)</b>					
	aCL2660Contig1	4	AT5G06760.1	Proteína LEA grupo 1	ABA (78), estrés osmótico (383) y salinidad (208)
	aCL6Contig21	7,4	AT1G54410.1	Dehidrina. Proteína LEA grupo 2	
	aCL53Contig3	3	AT1G20450.2	Dehidrina ( <i>LTI45/ERD10</i> ). Proteína LEA grupo 2	ABA (4.5), estrés osmótico (8) y salinidad (6)
<b>Osmolitos</b>					
	aCL174Contig2	3,4	AT2G39800.1	$\Delta$ 1-Pirrolina-5-carboxilato sintasa (P5CS)	ABA (6), estrés osmótico (5) y salinidad (4)
<b>Defensa antimicrobiana y antiherbívoros</b>					
	aCL1Contig18	9,8	AT3G04720.1	Proteína antifúngica PR4	Estrés osmótico (4)
	aCL1Contig14	8	AT3G04720.1	Proteína antifúngica PR4	Estrés osmótico (4)
	aCL7483Contig1	3	AT3G04720.1	Proteína antifúngica PR4	Estrés osmótico (4)
	aCL5537Contig1	7	AT1G61070.1	Defensina (PDF 2.4)	
	aCL4Contig13	7	AT3G51590.1	Proteína de transferencia de lípidos ( <i>LTP12</i> )	
	aCL856Contig1	5,6	AT3G12500.1	Endoquitinasa básica (PR3)	ABA (2), estrés osmótico (4) y salinidad (2)
	aCL168Contig3	4	AT4G26830.1	Quitinasa	
	aC04017A07SK_c	9	AT3G57270.1	Endo-1,3-beta glucanasa	

## Anexo II

aCL3319Contig1	3	AT2G43620.1	Quitinasa parecida a la endoquitinasa básica CHB4 de <i>Brassica napus</i>	Sequía (2), estrés osmótico (10), salinidad (9) y daño mecánico (2)
aCL76Contig1	4,5	AT5G24620.1	Taumatina. Proteína antifúngica PR5 (heveina)	
aCL10Contig4	2,8	AT1G02360.1	Quitinasa parecida a quitinasa de <i>Petroselinum crispum</i>	
aCL3959Contig1	3,3	AT1G32280.1	Inhibidor de proteasas/proteína de transferencia de lípidos (LTP)	
<b>Factores de transcripción</b>				
aC20006B02SK_c	5	AT3G46130.1	Factor de transcripción de la familia myb ( <i>MYB48</i> )	
aCL1571Contig1	5	AT1G52880.1	Factores de transcripción de la familia de Proteínas NAM (no apical meristem) con dominio NAC (nascent polypeptide-associated complex)	ABA (2)
aCL157Contig2	3	AT1G52880.1	Factores de transcripción de la familia de proteínas NAM (no apical meristem) con dominio NAC (nascent polypeptide-associated complex)	ABA (2)
aCL943Contig1	3	AT1G01720.1	Factores de transcripción de la familia de proteínas NAM (no apical meristem) con dominio NAC (nascent polypeptide-associated complex)	ABA (6), estrés osmótico (4) y salinidad (7.7)
aCL198Contig1	3,7	AT2G01150.1	Proteína de la familia de dedos de zinc (C3HC4-type RING finger)	
aCL157Contig1	3	AT2G35940.3	Proteína homeobox BLH4	ABA (3), estrés osmótico (3) y salinidad (2)
aCL176Contig1	3	AT5G15800.1	Proteína de desarrollo (SEPALLATA1/AGL2). Factor de transcripción tipo MADS box	
aCL3546Contig1	2	AT3G62420.1	Factor de transcripción de la familia bZIP parecido al factor de regulación 6 de <i>Petroselinum crispum</i>	Salinidad (2.7)
aCL7631Contig1	2	AT2G41070.2	Factor de transcripción de la familia bZIP (BZIP12)	ACC (2), y MJ (2)
<b>Proteínas kinasas y fosfatasas</b>				
aCL2906Contig2	3,4	AT1G01140.1	Proteína quinasa CIPK9 interactuante con proteínas CBL	Estrés osmótico (2.5) y salinidad (2.3)
aCL3951Contig1	3	AT5G03730.1	Serina/ treonina proteína quinasa ( <i>CTR1</i> )	
aCL7419Contig1	3,7	AT2G28060.1	Proteína quinasa parecida a la proteína GAL83 de <i>Solanum tuberosum</i>	
<b>Transportadores</b>				
aC18003A11Rv_c	3,7	AT1G73700.1	Proteína de la familia MATE	
aCL387Contig3	3,4	AT1G66950.1	Proteína de la familia de transportadores ABC parecida a <i>PDR5</i> de <i>Spirodela polyrhiza</i>	
aCL734Contig2	3,4	AT2G38905.1	Proteína hidrofóbica parecida a RCI2A	ABA (3), estrés osmótico (2.4) y salinidad (2.7)
aCL862Contig1	3,7	AT3G21090.1	Proteína de la familia de transportadores ABC parecida a MSA6.21 de <i>Mus musculus</i>	
aCL1103Contig1	5,2	AT5G63850.1	Transportador de aminoácidos ( <i>AAP4</i> )	
aCL5Contig3	3,7	AT5G47560.1	Transportador de malato/fumarato del tonoplasto	Estrés osmótico (4)
<b>Fotosíntesis</b>				
aCL12Contig4	3	AT5G20230.1	Plastocianina	Estrés osmótico (14), salinidad (42) y daño mecánico (9)
<b>Miscelanea</b>				
aCL705Contig2	14	AT3G26740.1	Proteína de respuesta a la luz (CCR-L)	
aCL196Contig1	4,5	AT1G73570.1	Proteína parecida a Sel-1L humana	
aCL7216Contig1	4	AT4G31850.1	Proteína que contiene repeticiones del motivo pentatricopeptido (PPR)	
aC01010D12SK_c	3,2	AT2G31400.1	Proteína que contiene repeticiones del motivo pentatricopeptido (PPR)	
aCL3626Contig1	4	AT1G10630.1	Factor de ADP-ribosilación (ARF)	
aCL1092Contig1	3,4	AT2G16595.1	Proteína parecida a la subunidad alfa SSR de <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar)	

aCL5274Contig1	4,5	AT2G25690.2	Proteína parecida a la proteína asociada a la senescencia SAG10 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	Salinidad (2)
aCL6688Contig1	3,7	AT4G20390.1	Proteína integral de membrana	
aCL669Contig1	3,7	AT5G09440.1	Proteína de respuesta a fosfato parecida al gen phi-1 (phosphate-induced gene) de <i>Nicotiana tabacum</i>	
aCL3202Contig1	2,8	AT3G17020.1	Proteína de la familia de respuesta a estrés universal (UPS)	
aC20010H07SK_c	3,2	AT3G02060.1	Helicasa con una caja DEAD/DEAH parecido al extremo C-terminal del factor de acoplamiento al complejo de la reparación de la transcripción (TRCF)	
aCL1233Contig1	2,8	AT4G34710.2	Arginina decarboxilasa 2 (ADCS2)	ABA (2.2), MJ (2.5), estrés osmótico (4.5) y salinidad (3.3)
aCL4779Contig1	3,4	AT1G80490.2	Proteína con 9 repeticiones WD-40	
aCL493Contig1	3	AT5G13850.1	Proteína que contiene un dominio NAC (nascent polypeptide-associated complex)	
aCL559Contig1	3	AT5G64300.1	3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfato sintasa	
aCL4374Contig1	3	AT4G25910.1	Proteína de fijación de nitrógeno nifU	
aCL1799Contig2	3	AT2G28760.1	Proteína de la familia de las epimerasas/dehidratasas dependientes de NAD parecida a la decarboxilasa del ácido UDP-glucurónico Uxs1p de <i>Filobasidiella neoformans</i>	
aCL914Contig1	3	AT5G13420.1	Transaldolasa	
aCL1112Contig2	3	AT2G47770.1	Receptor de benzodiazepina	ABA (64), estrés osmótico (92) y salinidad (40)

**Tabla 4. Unigenes específicos de EH-Hojas (Reprimidos)**

Categoría Funcional	Código CFGP	Máximo factor de represión	Homólogo de Arabidopsis		Represión <sup>1</sup> (Factor entre paréntesis)
			Código	Función (nombre del gen)	
<b>Metabolismo</b>					
	aCL5Contig18	4,2	AT5G05580.1	Omega-3 Desaturasa de ácidos grasos ( <i>FAD8</i> ), cloroplasto	Estrés osmótico (2.5)
	aCL4763Contig1	3,4	AT1G22440.1	Alcohol deshidrogenasa	
	aC18005G11Rv_c	3,2	AT5G02970.1	Hidrolasa	
	aC02019G07SK_c	3,7	AT4G38540.1	Monooxigenasa (MO2)	
	aC18009D04Rv_c	5	AT5G59530.1	Dioxigenasa dependiente del 2-Oxoglutarato similar a la proteína reguladora de la síntesis de etileno E8 de <i>Lycopersicon esculentum</i>	
	aCL409Contig1	6,5	AT2G38230.1	Proteína ATPDX1.1 que actúa en tandem con PDX2 para formar el complejo glutamina aminotransferasa que está relacionado con la biosíntesis de vitamina B6	Estrés osmótico (2)
	aCL655Contig1	3,5	AT1G74470.1	Geranilgeranil reductasa	
	aCL281Contig3	4,5	AT1G42970.1	Glicerinaldehído-3-fosfato deshidrogenasa (NADP+) de cloroplasto ( <i>GAPB</i> )	Estrés osmótico (2.3)
	aCL1355Contig1	4	AT4G15290.1	Celulosa sintasa	
	aCL38Contig6	3,3	AT5G54160.1	Quercetina 3-O-metiltransferasa ( <i>OMT1</i> )	
	aC01011F03SK_c	3,8	AT2G38050.1	Esteroido deshidrogenasa ( <i>DET2</i> )	
	aCL1091Contig1	3,8	AT3G52300.2	Proteína parecida a una ATP sintasa de cadena D de <i>Oryza sativa</i>	
	aCL2708Contig1	3,3	AT1G06690.1	Aldo-ceto reductasa	
	aCL336Contig1	3	AT5G08640.1	Flavonol sintasa 1 ( <i>FLS1</i> )	Estrés osmótico (2) y salinidad (2)
	aCL1551Contig1	2,8	AT5G67030.1	Zeaxantina epoxidasa ( <i>ABA1</i> )	

**Síntesis, plegamiento y degradación de Proteínas**

aCL1666Contig1	3,3	AT1G17220.1	Factor de iniciación de la traducción IF-2 (cloroplasto)	
aCL5265Contig1	2,8	AT3G14400.1	Ubiquitin proteasa ( <i>UBP25</i> )	
aCL1953Contig1	2,8	AT5G07090.2	Proteína ribosomal S4 ( <i>RPS4D</i> ), subunidad 40S	Estrés osmótico (2) y salinidad (2)

**Antioxidantes**

aCL7Contig10	3,7	AT3G15353.1	Metalotionina (MT3)	
--------------	-----	-------------	---------------------	--

**Defensa antimicrobiana y antihérviboros**

aCL12Contig9	2,8	AT3G18280.1	Inhibidor de proteasas/Proteína de transferencia de lípidos (LTP)	
--------------	-----	-------------	---	--

**Factores de transcripción**

aC07001A09SK_c	3	AT3G12630.1	Proteína de la familia de dedos de zinc (AN1-like)	
aCL2656Contig1	3	AT1G01060.3	Factor de transcripción de la familia myb ( <i>CCA1</i> )	

**Proteínas kinasas**

**Transportadores**

aCL3139Contig1	2,5	AT5G13580.1	Proteína de la familia de transportadores ABC	
aCL4736Contig1	3,3	AT1G79900.1	Transportador mitocondrial de aminoácidos. Transportador de ornitina	
aC02019E08SK_c	4	AT1G31885.1	Proteína MIP (major intrinsic family protein)	Estrés osmótico (2.5)

**Fotosíntesis**

aCL2388Contig1	5,2	AT3G16140.1	Subunidad H del I centro de reacción del fotosistema I (PSI-H)	
aCL1349Contig1	3,2	AT1G44575.2	Subunidad S del fotosistema II (PSII-S)	Estrés osmótico (2.2)
aCL1214Contig1	4	AT1G15820.1	Proteína de unión a la clorofila a-b ( <i>LHCB6</i> )	Estrés osmótico (2)
aCL242Contig1	3,2	AT3G61470.1	Proteína de unión a la clorofila a-b ( <i>LHCA2</i> )	
aCL5Contig32	6	AT1G29930.1	Proteína de unión a la clorofila a-b ( <i>CAB1</i> )	
aCL2578Contig1	3,8	AT3G56940.1	Dicarboxilato diférico	

**Miscelánea**

aCL725Contig1	3	AT1G66330.2	Proteína parecida a una proteína asociada a la senescencia de <i>Ipomoea batatas</i>	
aCL7364Contig1	3	AT5G20140.1	SOUL proteína de transporte de grupos hemo	Estrés osmótico (2)
aC20002A07SK_c	2,8	AT5G43630.1	Proteína de la familia de proteínas con nudos de cinc (CCHC-type)	
aCL4257Contig1	3,5	AT4G28070.1	ATPasa tipo AFG1	
aCL1254Contig1	6	AT2G30520.1	Transductor de la señal de respuesta fototrópica ( <i>RPT2</i> )	MJ (2)

**Tabla 5. Unigenes específicos de EH-Raíces (Inducidos)**

**Homólogo de Arabidopsis**

Categoría Funcional	Código CFGP	Máximo factor de inducción	Código	Función (nombre del gen) y regulación	Inducción <sup>1</sup> (Factor entre paréntesis)
<b>Metabolismo</b>					
	aCL578Contig1	6,8	AT3G12120.1	Omega-6 desaturasa de ácidos grasos ( <i>FAD2</i> )	
	aCL1563Contig1	9,9	AT4G33150.2	Enzima bifuncional lisina-cetoglutarato/sacaropina deshidrogenasa ( <i>LKR/SDH</i> ).	ABA (5.6), estrés osmótico (19) y salinidad (4.7)
	aCL271Contig1	6,2	AT5G49360.1	Glicosil hidrolasa de la familia 3	

aCL32Contig1	6	AT5G66430.1	S-adenosil-L-metionona:carboxil metiltransferasa	
aCL35Contig1	4,1	AT4G25700.1	Beta-caroteno hidroxilasa ( <i>CHY1</i> )	
aCL5Contig5	2,9	AT3G23920.1	Beta amilasa 7 ( <i>BM7</i> )	ABA (6.4), estrés osmótico (6.8) y salinidad (4.2)
aCL134Contig1	3,3	AT1G33720.1	Citocromo P450	
<b>Síntesis, plegamiento y degradación de proteínas</b>				
aCL2091Contig1	9,1	AT4G02733.1	Proteína de la familia F-box	
aCL5560Contig1	4,3	AT4G33210.1	Proteína de la familia F-box ( <i>FBL15</i> )	
aCL2844Contig1	10,3	AT1G23030.1	Proteína con repeticiones armadillo/beta catenina	
aCL5317Contig1	3,1	AT2G05230.1	Proteína de choque térmico con un dominio DNAJ en el extremo N-terminal	
aCL1495Contig1	3,8	AT4G00100.1	Proteína ribosomal S13 ( <i>RPS13A</i> ), subunidad 40S	
aCL4108Contig1	3,4	AT1G75350.1	Proteína ribosomal L3, subunidad 60S	
aCL664Contig1	3,3	ATCG00900.1	Proteína ribosomal S7 ( <i>RPS7.1</i> ), subunidad pequeña	Estrés osmótico (2)
<b>Antioxidantes</b>				
aCL74Contig3	3,9	AT2G43350.1	Glutacion peroxidasa 3 ( <i>ATGPX3</i> )	
aCL4011Contig1	3,6	AT2G15570.1	Tioredoxina M tipo 3 ( <i>TRX-M3</i> )	
aCL7Contig9	3,6	AT3G15353.1	Metalotionina ( <i>MT3</i> )	
aCL803Contig1	3,1	AT2G29490.1	Glutación S-transferasa ( <i>GST19</i> )	
<b>Proteínas LEA (Late embryogenesis abundant protein)</b>				
aCL6Contig21	7,1	AT1G54410.1	Dehidrina. Proteína LEA grupo 2	
aCL53Contig3	3,1	AT1G20450.2	Dehidrina ( <i>LTI45/ERD10</i> ). Proteína LEA grupo 2	ABA (4.5), estrés osmótico (8) y salinidad (6)
aCL9Contig23	8,3	AT1G02820.1	Proteína LEA del grupo 3	ABA (11) y ACC (2.8)
aCL9Contig19	7,1	AT1G02820.1	Proteína LEA del grupo 3	ABA (11) y ACC (2.8)
aCL9Contig1	6,9	AT1G02820.1	Proteína LEA del grupo 3	ABA (11) y ACC (2.8)
aCL9Contig21	6,6	AT1G02820.1	Proteína LEA del grupo 3	ABA (11) y ACC (2.8)
aCL9Contig6	5,7	AT1G02820.1	Proteína LEA del grupo 3	ABA (11) y ACC (2.8)
aCL9Contig20	4,7	AT1G02820.1	Proteína LEA del grupo 3	ABA (11) y ACC (2.8)
<b>Osmolitos</b>				
aCL2181Contig1	2,6	AT5G40390.1	Rafinosa sintasa	ABA (3.5), estrés osmótico (2) y salinidad (2.4)
aCL923Contig1	2,2	AT4G02280.1	Sacarosa sintasa ( <i>SUS3</i> )	ABA (30), ACC (2.4), estrés osmótico (19) y salinidad (6.7)
<b>Defensa antimicrobiana y antihervíboros</b>				
aCL856Contig1	6,1	AT3G12500.1	Endoquitinasa básica (PR3 )	ABA (2), estrés osmótico (4) y salinidad (2)
aCL76Contig1	4,2	AT5G24620.1	Taumatina. Proteína antifúngica PR5	
aCL927Contig2	4,1	AT5G55180.1	Glucosil hidrolasa parecida a la quitinasa Nt-SubE76 de <i>Nicotiana tabacum</i>	ABA (2.4)
aCL371Contig2	2,9	AT2G43610.1	Glucosil hidrolasa parecida a la quitinasa de <i>Brassica napus</i>	
aCL1Contig19	3	AT1G73325.1	Inhibidor de tripsina y proteasas tipo Kunitz parecido a Dr4	
aCL1Contig11	3	AT1G73325.1	Inhibidor de tripsina y proteasas tipo Kunitz parecido a Dr4	
aCL297Contig2	3,2	AT1G17860.1	Inhibidor de tripsina y proteasas tipo Kunitz parecido LeMir ( <i>Lycopersicon esculentum</i> miraculin homolog)	
<b>Factores de transcripción</b>				
aCL228Contig1	2,3	AT2G44910.1	Proteína con cremellara de leucina de la familia homeobox (HB-4)	Salinidad (2.4)
aC01008E03SK_c	2,6	AT1G54830.3	Factor de transcripcion que se une a caja CCAAT ( <i>Hap5</i> )	Estrés osmótico (2.5) y salinidad (2)
aCL728Contig2	3	AT3G04070.1	Factor de transcripcion de la familia de proteínas NAM (no apical meristem)	ABA (3.8), estrés osmótico (5) y salinidad (2.8)

**Proteínas kinasas y fosfatasa**

aCL3951Contig1	6,4	AT5G03730.1	Serina/ treonina proteína kinasa ( <i>CTR1</i> )	
aCL111Contig1	2,2	AT3G55550.1	Lectina proteína kinasa	ACC (2)

**Transportadores**

aCL7977Contig1	3,9	AT5G04930.1	ATPasa transportadora de fosfolipidos ( <i>ALA1</i> )(flipasa)	
aCL167Contig1	5,1	AT1G16370.1	Transportador de cationes organicos similar a OCTN1 humano	
aCL734Contig2	7,4	AT2G38905.1	Proteína hidrofóbica parecida a RCI2A	ABA (3), estrés osmótico (2.4) y salinidad (2.7)
aCL387Contig3	2,5	AT1G66950.1	Proteína de la familia de transportadores ABC parecida a <i>PDR5</i> de <i>Spirodela polyrhiza</i>	
aCL5Contig3	6,6	AT5G47560.1	Transportador de malato/fumarato del tonoplasto	Estrés osmótico (4)

**Fotosíntesis**

aCL223Contig1	4,4	AT1G55670.1	Subunidad V del fotosistema I (PSI-G)	
aCL148Contig2	3	AT1G79040.1	Proteína de 10 kDa del fotosistema II	
aCL5Contig17	3	AT4G14690.1	Proteína de unión a la clorofila a/b ( <i>ELIP2</i> )	Estrés osmótico (3) y salinidad (2,7)

**Miscelanea**

aCL196Contig1	12,8	AT1G73570.1	Proteína parecida a Sel-1 humana	
aCL1785Contig1	6,8	AT2G01660.2	Proteinaparecida a proteína secretora de 33kDa	
aCL547Contig1	5,6	AT1G26420.1	Proteína con dominio de unión a FAD similar a reticulina axidasa	Estrés osmótico (6.7) y salinidad (8.3)
aCL705Contig1	2,8	AT3G26740.1	Proteína de respuesta a la luz (CCR-L)	
aCL290Contig1	4,2	AT2G27480.1	Proteína de unión a calcio con dominio EF	
aCL3716Contig1	3,7	AT5G10950.1	Proteína parecida a "cylicin"	
aCL3887Contig1	3,5	AT3G61070.1	Factor 11 de biogenesis del peroxisoma	
aCL286Contig1	3	AT5G47530.1	Proteína inducida por auxina ( <i>AIR12</i> )	ABA (7.2) y estrés osmótico (2.5)

**Tabla 6. Unigenes específicos de EH-Raíces (Reprimidos)**

Categoría Funcional	Código CFGP	Máximo factor de represión	Homólogo de Arabidopsis		Represión <sup>1</sup> (Factor entre paréntesis)
			Código	Función (nombre del gen)	
<b>Metabolismo</b>					
	aCL29Contig4	2,7	AT1G79530.1	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	
	aCL3488Contig1	2,3	AT2G19590.1	ACC oxidasa ( <i>ACO1</i> )	Salinidad (5)
	aC08002E04SK_c	2,2	AT3G03980.1	Alcohol deshidrogenasa	
	aCL120Contig2	2,6	AT5G51490.1	Pectinesterasa	ABA (2.2), ACC (2.3), MJ (2.9), estrés osmótico (4.4), salinidad (4.3) y daño mecánico (2)
	aCL1819Contig1	2,5	AT3G18000.1	Fosfoetanolamina N-metiltransferasa ( <i>NMT1</i> )	Estrés osmótico (2)
	aCL2018Contig1	2	AT3G60750.1	Transcetolasa	
<b>Síntesis, plegamiento y degradación de proteínas</b>					
	aCL179Contig2	2	AT3G44110.2	Proteína de choque térmico DNAJ3	
	aCL362Contig1	2	AT5G39850.1	Proteína ribosomal S9 ( <i>RPS9C</i> ), subunidad 40S	
<b>Antioxidantes</b>					
	aCL47Contig1	2,6	AT3G09640.2	L-ascorbato peroxidasa ( <i>APX1</i> )	MJ (2)
	aCL7Contig8	2,3	AT3G15353.1	Metalotionina ( <i>MT3</i> )	

aCL113Contig1	2,4	AT1G02950.2	Glutation S-transferasa ( <i>GST31</i> )	
<b>Defensa antimicrobiana y antihervíboros</b>				
aCL155Contig1	2,3	AT5G59320.1	Proteína de transferencia de lípidos ( <i>LTP3</i> )	
aCL4352Contig1	2,1	AT3G45140.1	Lipoxigenasa ( <i>LOX2</i> )	
<b>Factores de transcripción</b>				
aCL89Contig1	2,1	AT1G53910.2	Factor de transcripción de la familia AP2/ERF ( <i>RAP2.2</i> )	
<b>Transportadores</b>				
aCL165Contig1	5,5	AT3G53420.2	Proteína intrínseca de membrana ( <i>PIP2A</i> ). Acuaporina	
aCL62Contig1	2,6	AT3G26520.1	Proteína intrínseca del tonoplasto ( <i>TIP2</i> )	Estrés osmótico (2.4)
<b>Miscelanea</b>				
aCL430Contig3	7,1	AT1G70850.3	Proteína alergénica Bet v I	
aCL705Contig2	2,7	AT3G26740.1	Proteína de respuesta a la luz ( <i>CCR-L</i> )	
aC01012F08SK_c	2,3	AT1G42470.1	Proteína parecida a la Niemann-Pick C1 humana	
aCL26Contig9	2,1	AT3G47480.1	Proteína de unión a calcio con dominio EF	

Tabla 7. Unigenes comunes de EH-ER-Hojas (Inducidos)

Categoría Funcional	Código CFGP	Máximo factor de inducción		Código	Función (nombre del gen) y regulación	Inducción <sup>1</sup> (Factor entre paréntesis)
		EH	ER			
<b>Metabolismo</b>						
	aCL578Contig1	7	2	AT3G12120.1	Omega-6 desaturasa de ácidos grasos ( <i>FAD2</i> )	
	aCL32Contig1	49	64	AT5G66430.1	S-adenosil-L-metionona:carboxil metiltransferasa	
	aCL32Contig2	30	67	AT3G11480.1	S-adenosil-L-metionona:carboxil metiltransferasa	Estrés osmótico (38) y salinidad (3)
	aCL6289Contig1	4	7	AT2G18860.1	Sintaxín ( <i>AtSYP61</i> )	
	aCL28Contig2	3,4	4,2	AT4G13940.1	S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa ( <i>SAHH</i> )	
	aCL28Contig1	2,4	5	AT4G13940.1	S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa ( <i>SAHH</i> )	
	aCL316Contig2	4,5	7,5	AT5G21105.1	L-ascorbato oxidasa	
	aCL316Contig1	3,2	4	AT5G21105.1	L-ascorbato oxidasa	
	aCL1450Contig1	2	3	AT3G09820.2	Adenosina kinasa ( <i>ADK1</i> )	
	aCL1030Contig1	4,2	7,5	AT5G54770.1	Enzima de la biosíntesis de tiazol ( <i>THI1</i> )	
	aCL16Contig1	2	3,2	AT5G54770.1	Enzima de la biosíntesis de tiazol ( <i>THI1</i> )	
	aCL322Contig1	3,5	8	AT2G30830.1	Dioxigenasa dependiente del 2-Oxoglutarato similar a la proteína reguladora de la síntesis de etileno E8 de <i>Lycopersicon esculentum</i>	
	aCL459Contig1	5	5	AT5G17990.1	Antranilato fosforibosiltransferasa	
	aCL1767Contig2	2,3	3,7	AT3G26310.1	Citocromo P450	
	aCL1102Contig1	15	9,8	AT3G47340.1	Asparagina sintasa dependiente de glutamina ( <i>ASN1</i> )	Sequía (4.5), estrés osmótico (5.6), salinidad (4) y daño mecánico (4)
	aCL9337Contig1	5,6	16	AT5G51260.1	Fosfatasa ácida	
	aCL194Contig1	2,4	2,8	AT2G23210.1	UDP-glucuronosil/UDP-glucosil transferasa	
	aCL99Contig1	3	6,2	AT2G43840.1	UDP-glucuronosil/UDP-glucosil transferasa	
	aCL22Contig1	3	2,3	AT1G62380.1	ACC oxidasa ( <i>ACO2</i> )	
	aCL22Contig3	2,5	4,2	AT1G77330.1	ACC oxidasa parecida a la ACC oxidasa de <i>Sorghum bicolor</i>	
	aCL52Contig1	2,8	1,7	AT3G01120.1	Cistationina-y sintasa ( <i>MTO1</i> )	
	aCL6Contig19	3	5,7	AT1G55740.1	α-Galactosidasa alcalina	Estrés osmótico (2)

aCL201Contig1	3	2,6	AT1G71695.1	Peroxidasa 12 ( <i>PER12</i> )	
<b>Síntesis, plegamiento y degradación de proteínas</b>					
aC04011F08SK_c	1,7	8	AT5G42320.1	Carboxipeptidasa	
aCL1305Contig2	4	9,8	AT4G10530.1	Subtilasa	Salinidad (2)
aCL7420Contig1	3,4	15	AT5G24510.1	Proteína ácida ribosomal P1, subunidad 60S	
aCL1274Contig1	2,2	2,8	AT5G45775.1	Proteína ribosomal L11 ( <i>RPL11D</i> ), subunidad 60S	
aCL2890Contig1	1,8	3,7	AT5G56710.1	Proteína ribosomal L31 ( <i>RPL31C</i> ), subunidad 60S	
aCL309Contig1	1,7	3,2	AT5G02870.1	Proteína ribosomal L4/L1 ( <i>RPL4D</i> ), subunidad 60S	
aCL2000Contig1	1,8	2,8	AT2G19730.2	Proteína ribosomal L28 ( <i>RPL28A</i> ), subunidad 60S	
aCL362Contig1	1,6	2,8	AT5G39850.1	Proteína ribosomal S9 ( <i>RPS9C</i> ), subunidad 40S	
aCL2810Contig1	2,6	5	AT3G62030.1	Cis-trans peptidil-propil isomerasa ( <i>ROC4</i> )	
aCL12Contig10	3	3,5	AT4G34870.1	Cis-trans peptidil-propil isomerasa ( <i>ROC5</i> )	
aCL766Contig1	2,6	2,8	AT5G50920.1	Clp proteasa (CLPC)	
<b>Antioxidantes</b>					
aCL18Contig1	4	6	AT5G42980.1	Tioredoxina H tipo 3 (TRXH3)	
aC08008G07SK_c	3,7	3,4	AT1G45145.1	Tioredoxina H tipo 5 (TRXH5)	Estrés osmótico (2.5)
aCL110Contig1	3,4	3	AT1G69930.1	Glutación S-transferasa ( <i>GST11</i> )	Estrés osmótico (3) y salinidad (14)
aCL113Contig1	2,8	4,5	AT1G02950.2	Glutación S-transferasa ( <i>GST31</i> )	
aCL803Contig1	1,8	3	AT2G29490.1	Glutación S-transferasa ( <i>GST19</i> )	
aCL87Contig1	2,3	3	AT1G78380.1	Glutación S-transferasa ( <i>GST8</i> )	
aCL654Contig2	2	3	AT2G29480.1	Glutación S-transferasa ( <i>GST20</i> )	Estrés osmótico (2) y salinidad (5.6)
<b>Proteínas LEA (Late embryogenesis abundant protein)</b>					
aCL6Contig7	6,5	1,7	AT1G54410.1	Dehidrina. Proteína LEA grupo 2	
aCL6Contig16	6	2,4	AT1G54410.1	Dehidrina. Proteína LEA grupo 2	
<b>Osmolitos</b>					
aCL923Contig1	4,5	10,5	AT4G02280.1	Sacarosa sintasa ( <i>SUS3</i> )	ABA (30), ACC (2.4), estrés osmótico (19) y salinidad (6.7)
<b>Defensa antimicrobiana y antifúngica</b>					
aCL10Contig7	3,4	25	AT3G12500.1	Endoquitinasa básica (PR3 )	ABA (2), estrés osmótico (4) y salinidad (2)
aCL10Contig1	5	32	AT3G16920.1	Quitinasa de clase I	
aCL1854Contig1	3,7	7,5	AT4G33355.2	Proteína de transferencia de lípidos ( <i>LTP3</i> )	
aCL1Contig5	29	70	AT1G73260.1	Inhibidor de tripsina y proteasas tipo Kunitz	ABA (3.4), MJ (2.3), estrés osmótico (4), salinidad (2.8) y daño mecánico (2.2)
aCL1Contig12	4	7,5	AT1G73260.1	Inhibidor de tripsina y proteasas tipo Kunitz	ABA (3.4), MJ (2.3), estrés osmótico (4), salinidad (2.8) y daño mecánico (2.2)
aCL1Contig13	11	22	AT1G73325.1	Inhibidor de tripsina y proteasas tipo Kunitz parecido a Dr4	
aCL1Contig11	9	18	AT1G73325.1	Inhibidor de tripsina y proteasas tipo Kunitz parecido a Dr4	
aCL1Contig19	9	18	AT1G73325.1	Inhibidor de tripsina y proteasas tipo Kunitz parecido a Dr4	
aCL1Contig33	5,6	10,5	AT1G73325.1	Inhibidor de tripsina y proteasas tipo Kunitz parecido a Dr4	
aCL1Contig10	7	13	AT1G73325.1	Inhibidor de tripsina y proteasas tipo Kunitz parecido a Dr4	
aCL1Contig1	8	16	AT1G17860.1	Inhibidor de tripsina y proteasas tipo Kunitz parecido LeMir ( <i>Lycopersicon esculentum</i> miraculin homolog)	

aCL297Contig2	5	9	AT1G17860.1	Inhibidor de tripsinas y proteasas tipo Kunitz parecido LeMir ( <i>Lycopersicon esculentum</i> homólogo demiraculina)	
aCL241Contig1	14	13	AT3G45140.1	Lipoxigenasa ( <i>LOX2</i> )	Sequía (2.2)
aCL699Contig1	1,8	5	AT5G43570.1	Inhibidor de proteasas de serina	
<b>Factores de transcripción</b>					
aCL35Contig3	11	5,6	AT4G27410.2	Factores de transcripción de la familia de proteínas NAM (no apical meristem) con dominio NAC (nascent polypeptide-associated complex) ( <i>RD26</i> )	ABA (20), MJ (3.4), estrés osmótico (33) y salinidad (18)
aCL267Contig2	7	6,4	AT1G01720.1	Factores de transcripción de la familia de proteínas NAM (no apical meristem) con dominio NAC (nascent polypeptide-associated complex)	ABA (6), estrés osmótico (4) y salinidad (7.7)
<b>Proteínas kinasas y fosfatasas</b>					
aCL11Contig4	16	21	AT4G28350.1	Lectina proteína kinasa	Estrés osmótico (3.6) y salinidad (4)
aCL11Contig2	9	16	AT5G06740.1	Lectina proteína kinasa	
aCL11Contig1	15	25	AT3G55550.1	Lectina proteína kinasa	ACC (2)
aCL7153Contig1	2,8	3	AT1G16270.1	Proteína kinasa	
aCL855Contig1	4	7,5	AT1G17720.1	Serina/treonina proteína fosfatasa 2A ( <i>PP2A</i> )	
<b>Transportadores</b>					
aCL1914Contig1	5,6	7	AT5G62680.1	Proteína de transporte de oligonucleótidos ( <i>POT</i> )	
aCL4055Contig1	2	4	AT3G13320.1	Antiportador de Ca ( <i>CAX2</i> )	
aCL231Contig2	4,5	3,5	AT2G38905.1	Proteína hidrofóbica parecida a <i>RCI2A</i>	ABA (3), estrés osmótico (2.4) y salinidad (2.7)
<b>Fotosíntesis</b>					
aC18002D07Rv_c	2,6	4,2	AT4G14690.1	Proteína de unión a la clorofila a/b ( <i>ELIP2</i> )	Estrés osmótico (3) y salinidad (2,7)
<b>Miscelanea</b>					
aC20005D02SK_c	9	6,5	AT5G10230.1	Anexina 7 ( <i>ANN7</i> )	
aCL705Contig1	15	18	AT3G26740.1	Proteína de respuesta a la luz ( <i>CCR-L</i> )	
aCL18010B05Rv_c	5	5,6	AT3G44880.1	Proteína con dominio Rieske (2Fe-2S) ( <i>ACD1</i> , accelerated cell death 1)	ABA (2), estrés osmótico (7.4) y salinidad (3)
aCL129Contig1	5	3,4	AT2G03440.1	Proteína parecida a la N-12B de <i>Medicago sativa</i>	
aCL5Contig14	4	5,2	AT2G21660.2	Proteína de unión a RNA rica en glicina ( <i>GRP7</i> )	
aCL5Contig23	3	4,6	AT2G21660.2	Proteína de unión a RNA rica en glicina ( <i>GRP7</i> )	
aCL5Contig25	2,6	3,3	AT4G39260.1	Proteína de unión a RNA rica en glicina, ( <i>GRP8</i> )	
aCL7813Contig1	2	3	AT3G23830.2	Proteína de unión a RNA rica en glicina, ( <i>GRP4</i> )	
aC03004C11SK_c	2	3	AT1G10450.1	Proteína que contiene repeticiones de hélice anfipática parecida a Sin3 de <i>Yarrowia lipolytica</i>	
aCL2160Contig1	2,3	3	AT1G60420.1	Proteína que contiene el dominio DC1	
aCL290Contig1	2	4	AT2G27480.1	Proteína de unión a calcio con dominio EF	
aCL311Contig2	4,5	2	AT5G39110.1	Proteína parecida a germina ( <i>GPL6</i> )	
aCL4006Contig2	3,7	4,5	AT2G46790.2	Regulador de pseudorespuesta ( <i>PRR9</i> )	ABA (2) y salinidad (2)
aCL564Contig1	3,4	4,5	AT3G07230.1	Proteína de respuesta a daño mecánico	
aCL4261Contig1	2,3	3	AT4G24450.1	Proteína de exceso de almidón ( <i>SEX1</i> )	Estrés osmótico (2)
aCL477Contig1	1,8	3	AT1G32700.2	Proteína de unión a zinc	

Tabla 8. Unigenes comunes de EH-ER-Hojas (Reprimidos)

Categoría Funcional	Código CFGP	Máximo factor de inducción		Código	Función (nombre del gen) y regulación	Represión <sup>1</sup> (Factor entre paréntesis)
		EH	ER			
<b>Metabolismo</b>						
	aCL2067Contig1	5,1	43,3	AT2G41250.1	Haloácido dehalogenasa	
	aCL105Contig1	2,2	6,1	AT2G26080.1	Glicina deshidrogenasa	
	aCL105Contig2	5,5	3,7	AT4G33010.1	Glicina deshidrogenasa	
	aCL2029Contig1	2,6	3,3	AT4G33440.1	Glicósido hidrolasa de la familia 28	
	aCL627Contig1	5,5	11	AT2G40890.1	Citocromo P450 ( <i>CYP89A3</i> )	
	aCL1Contig2	2,3	3,7	AT4G30950.1	Omega-6 desaturasa de ácidos grasos ( <i>FAD6</i> )	
	aCL216Contig2	2,5	2,9	AT3G48000.1	Aldehído deshidrogenasa (NAD+) ( <i>ALDH2</i> )	
	aCL642Contig1	8,4	3,9	AT3G04120.1	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPC)	
	aCL642Contig2	4	2,6	AT1G42970.1	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (NADP+) de cloroplasto (GAPB)	Estrés osmótico (2.3)
	aCL95Contig1	2,2	3,7	AT5G51970.2	Sorbitol deshidrogenasa	
	aCL411Contig2	2,4	6,7	AT5G11650.1	Hidrolasa	
	aCL436Contig1	2,6	2,8	AT1G23800.1	Aldehído deshidrogenasa ( <i>ALDH2B7</i> )	
	aCL8551Contig1	3	3	ATCG00440.1	NAD(P)H deshidrogenasa subunidad D3 ( <i>NDHC</i> )	
	aCL6161Contig1	5,9	2,7	AT3G57520.2	α-Galactosidasa alcalina	
	aCL4116Contig2	3,4	2,9	AT3G49220.1	Pectinesterasa	
	aCL1370Contig3	6,5	4,1	AT2G35370.1	Glicina deshidrogenasa (descarboxilante). Proteína H.	
	aC01003G01SK_c	3,1	2,1	AT4G10120.2	Sacarosa fosfato sintasa	Estrés osmótico (3.5) y salinidad (3.1)
	aC01014D09SK_c	2,9	2,6	AT3G58610.1	Cetol-Ácido reductoisomerasa	
	aCL1498Contig1	2,6	2,9	AT4G18360.1	Glicolato oxidasa (peroxisomal)	
	aCL151Contig3	1,7	2,9	AT1G67280.1	Lactoilglutacion liasa	
	aCL2018Contig1	2,9	2,4	AT3G60750.1	Transcetolasa	
	aCL1635Contig1	2,1	3,2	AT4G13010.1	Deshidrogenasa conteniendo zinc (NADP)	
	aCL2997Contig1	3,2	3	AT4G13010.1	Deshidrogenasa conteniendo zinc (NADP)	
	aCL551Contig1	3,5	8,3	AT5G24530.1	Flavonona 3-hidroxilasa	
	aCL3403Contig1	2,8	7,6	AT5G44380.1	Reticulina oxidasa (con dominio de unión a FAD)	
	aCL368Contig1	2	4,5	AT3G25570.1	Adenosil metionina decarboxilasa	
	aCL368Contig3	1,6	4,2	AT3G02470.2	Adenosil metionina decarboxilasa	
	aCL5Contig5	1,6	11,8	AT3G23920.1	Beta amilasa 7 ( <i>BMY7</i> )	
	aCL7230Contig1	2,6	9,4	AT1G65060.1	Coumarato CoA-ligasa ( <i>ACL3</i> )	Estrés osmótico (3.3)
	aCL920Contig2	5,2	6,5	AT3G63520.1	9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa ( <i>CCD1</i> )( <i>NCED1</i> )	
	aCL98Contig1	2,2	4,9	AT3G49110.1	Peroxidasa 33 de clase III ( <i>PRX33</i> )	
	aCL622Contig1	2,1	9,8	AT3G01190.1	Peroxidasa 27 ( <i>PER27</i> )	Estrés osmótico (2) y salinidad (2.6)
<b>Síntesis, plegamiento y degradación de proteínas</b>						
	aCL24Contig4	1,6	3,5	AT4G05320.4	Poliubiquitina ( <i>UBQ10</i> )	
	aCL24Contig3	4,4	8,6	AT4G02890.2	Poliubiquitina ( <i>UBQ14</i> )	
	aCL1419Contig1	3,9	3,8	AT2G27710.3	Proteína ácida ribosomal P2 ( <i>RPP2B</i> ), subunidad 60S	Estrés osmótico (2)
	aCL2398Contig2	4,1	4,8	AT3G60245.1	Proteína ribosomal L37a ( <i>RPL37aC</i> ), subunidad 60S	
	aCL1184Contig1	2,1	2,9	AT4G27130.1	Factor de iniciación de la traducción eucariótico (eIF1)	
	aCL1184Contig2	2,4	4,2	AT4G27130.1	Factor de iniciación de la traducción eucariótico (eIF1)	
	aCL8570Contig1	2,6	5	AT5G51440.1	Proteína de choque térmico (HSP23.5-M)	
	aCL7003Contig1	3,4	2,7	ATCG00780.1	Proteína ribosomal L14 ( <i>RPL14</i> ), subunidad grande (cloroplasto)	
	aCL7181Contig1	4,2	3,4	ATCG00810.1	Proteína ribosomal L22 ( <i>RPL22</i> ), subunidad grande (cloroplasto)	
	aCL326Contig1	3,4	2,2	AT5G48570.1	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa ( <i>ROF1</i> )	
<b>Antioxidantes</b>						
	aCL4838Contig1	3	1,6	AT1G76080.1	Tioredoxina	

aCL7Contig6	3,3	2,6	AT3G15353.1	Metalotionina (MT3)	
aCL7Contig9	3,1	2,2	AT3G15353.1	Metalotionina (MT3)	
aCL4708Contig1	5,8	5,8	AT3G02960.1	Proteína de unión a cobre	
aCL63Contig2	2,6	4,1	AT4G35090.1	Catalasa 2 (CAT2)	
<b>Osmolitos</b>					
aCL25Contig1	3,7	12,2	AT2G22240.1	Mio-inositol-1-fosfato sintasa (IPS2)	
<b>Factores de transcripción</b>					
aCL665Contig2	1,5	3,3	AT1G08970.2	Factor de transcripción que une caja CCAAT (HAP5C)	
aCL3899Contig1	2,6	4,1	AT3G09600.1	Factor de transcripción de la familia myb (LCL5)	
<b>Proteínas kinasas y fosfatasa</b>					
aC01006A06SK_c	2,9	2,3	AT4G02630.1	Serina/ treonina proteína kinasa	
aC01001C09Rv_c	4,7	5,1	AT1G34110.1	Proteína kinasa transmembrana rica en repeticiones de leucina	
aCL8711Contig1	2,7	6,8	AT1G68830.1	Proteína kinasa (STN7)	
<b>Transportadores</b>					
aCL165Contig1	3,2	3,3	AT3G53420.2	Proteína intrínseca de la membrana plasmática (PIP2A). Acuaporina	
aCL5695Contig1	4,6	1,6	AT5G09930.1	Proteína de la familia de transportadores ABC	
aCL58Contig4	1,6	4,3	AT2G45960.1	Proteína intrínseca de la membrana plasmática (PPI1B)	
aCL62Contig1	2,8	2,7	AT3G26520.1	Proteína intrínseca del tonoplasto (TIP2)	Estrés osmótico (2.4)
aC01009E04SK_c	4,9	4,1	AT4G38510.4	ATPasa vacuolar subunidad B2	
<b>Fotosíntesis</b>					
aC20008B01SK_c	8,2	7,5	ATCG00040.1	Maturasa (MATK)(cloroplasto)	
aCL1319Contig1	7,4	4,2	AT1G32060.1	Fosforibulokinasa (PRK)	Estrés osmótico (2)
aCL6164Contig1	17,6	11,9	AT4G14890.1	Ferredoxina I	Estrés osmótico (3) y salinidad (2)
aCL756Contig1	3,6	3,1	AT1G76100.1	Plastocianina	Estrés osmótico (2.8)
aCL43Contig4	15,3	5,4	AT5G38430.1	RuBisCo (Ribulosa bifosfato carboxilasa). Subunidad pequeña 1B	
aCL43Contig2	12,3	5,2	AT5G38410.1	RuBisCo. Subunidad pequeña 3B	
aCL43Contig3	11,1	4,7	AT5G38410.1	RuBisCo. Subunidad pequeña 3B	
aCL48Contig1	7,2	9	AT2G39730.2	RuBisCo activasa	
aCL48Contig2	6,3	6,7	AT2G39730.1	RuBisCo activasa	
aCL48Contig3	7,1	5,2	AT2G39730.3	RuBisCo activasa	
aCL1139Contig1	3,7	4,6	AT2G30570.2	Subunidad W del fotosistema II (PSII-W)	
aCL4171Contig1	4,3	5,3	AT2G30570.2	Subunidad W del fotosistema II (PSII-W)	
aCL1513Contig1	3,4	3,8	AT1G51400.1	Proteína de 5kDa del fotosistema II	
aCL1971Contig1	6,7	4,6	AT5G64040.2	Subunidad N del fotosistema I (PSI-N)	Estrés osmótico (2)
aCL223Contig1	3,5	3,1	AT1G55670.1	Subunidad V del fotosistema I (PSI-G)	
aCL2388Contig2	4,1	2,8	AT1G52230.1	Subunidad VI del fotosistema I (PSI-H)	Estrés osmótico (2)
aCL2579Contig2	2,2	2,8	AT4G02770.1	Subunidad II del fotosistema I (PSI-D)	
aCL3140Contig1	3,7	2,3	AT4G02770.1	Subunidad II del fotosistema I (PSI-D)	
aCL2714Contig1	4,6	2,8	AT1G30380.1	Subunidad K del fotosistema I (PSI-K)	
aCL247Contig1	7,2	3,9	AT1G61520.2	Proteína de unión a clorofila a/b (LHCA3)	
aCL42Contig1	2,8	3,8	AT2G26500.1	Citocromo b6f	
aC07004F12SK_c	3,9	2,5	AT2G06520.1	Subunidad X del fotosistema II (PSII-X)	
aCL398Contig1	2,8	3,1	AT5G46110.2	Antiportador fosfato/triosa-fosfato	
aCL73Contig1	4,4	4,9	AT4G38970.1	Fructosa bifosfato aldolasa del cloroplasto	Estrés osmótico (2)
aCL871Contig1	6,6	4,5	AT3G01500.2	Anhidrasa carbónica de cloroplasto (CA1)	Estrés osmótico (2.6)
<b>Miscelanea</b>					
aC01006H06SK_c	5,7	3,7	AT3G11540.1	Proteína de transducción de la señal de giberelinas (SPINDLY)	
aCL153Contig3	3	3,2	AT5G65040.1	Proteína asociada a la senescencia parecida a SAG102	
aC04015E11SK_c	2,3	6,8	AT5G03905.1	Proteína con dominio hesB	
aCL1Contig22	3,2	9,3	AT3G05500.1	Factor de elongación del caucho (REF)	
aCL2173Contig1	2,3	5,1	AT3G63000.1	Proteína de la familia NPL4	

aCL2738Contig1	3,6	2,8	AT1G75780.1	Tubulina ( <i>TUB1</i> )	Estrés osmótico (4.5) y salinidad (3)
aCL2924Contig1	4,8	2,2	AT5G64030.1	Proteína de respuesta a la deshidratación (ERD3)	
aCL385Contig1	4	6,2	AT1G48910.1	Flavina monooxigenasa (FMO)	
aCL385Contig2	4,8	6,2	AT1G48910.1	Flavina monooxigenasa (FMO)	
aCL4860Contig1	3	2,9	AT4G01050.1	Glicoproteína rica en hidroxiprolina	Estrés osmótico (2)
aCL613Contig1	2,4	2,9	AT1G04100.1	Proteína inducida por IAA ( <i>IAA10</i> )	
aCL7718Contig1	3	3	AT5G24390.1	RabGAP (GTPase activating protein)	

**Tabla 9. Unigenes comunes de EH-ER-Raíces (Inducidos)**

Categoría Funcional	Código CFGP	Máximo factor de inducción		Código	Función (nombre del gen) y regulación	Inducción <sup>1</sup> (Factor entre paréntesis)
		EH	ER			
<b>Metabolismo</b>						
	aCL1401Contig1	2,1	3,1	AT2G40370.1	Lacasa ( <i>LAC5</i> )	
	aC18016A02Rv_c	8,2	3,5	AT3G26180.2	Citocromo P450	
	aCL4017Contig1	2,4	3,7	AT4G37770.1	ACC sintasa ( <i>ACS8</i> )	ABA (2.2), ACC (2.6) y salinidad (13.8)
	aCL30Contig1	2,8	3,8	AT1G04710.1	3-cetoacil-CoA tiolasa	
	aCL15Contig4	5,7	5,7	AT2G29630.1	Proteína de biosíntesis de tiamina (thiC de bacterias)	
	aCL151Contig3	3	3	AT1G67280.1	Lactoilglutacion liasa	
	aCL2589Contig1	2,8	3,8	AT1G76150.1	17 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa	Estrés osmótico (2)
	aCL7Contig2	3,1	4,3	AT1G55120.1	Invertasa	
	aCL1233Contig1	3	2,8	AT4G34710.2	Arginina decarboxilasa 2 ( <i>ADCS2</i> )	ABA (2.2), MJ (2.5), estrés osmótico (4.5) y salinidad (3.3)
	aCL2Contig13	6,1	1,6	AT4G34350.1	4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il difosfato reductasa	
	aCL3403Contig1	1,9	3,2	AT5G44380.1	Reticulina oxidasa (con dominio de unión a FAD)	
	aCL559Contig1	2,7	3,1	AT5G64300.1	3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato sintasa	
	aCL914Contig1	3,5	2,3	AT5G13420.1	Transaldolasa	
	aCL98Contig1	2,4	3,7	AT3G49110.1	Peroxidasa 33 de clase III ( <i>PRX33</i> )	
	aCL98Contig2	3,5	4,3	AT3G49110.1	Peroxidasa 33 de clase III ( <i>PRX33</i> )	
	aCL98Contig3	2,4	2,6	AT3G32980.1	Peroxidasa 32 ( <i>PER32</i> )	
	aCL201Contig1	2,4	4,8	AT1G71695.1	Peroxidasa 12 ( <i>PER12</i> )	
	aCL201Contig2	1,8	4,3	AT1G71695.1	Peroxidasa 12 ( <i>PER12</i> )	
<b>Síntesis, plegamiento y degradación de proteínas</b>						
	aCL462Contig1	4	4	AT3G62250.1	Ubiquitina 5 ( <i>UBQ5</i> )	
	aCL1208Contig1	3,7	2,1	AT1G55060.1	Poliubiquitina ( <i>UBQ12</i> )	ABA (2.2) y ACC (3)
	aC07007A09SK_c	3,7	4,3	AT1G74310.1	Proteína de choque térmico ( <i>HSP101</i> )	Estrés osmótico (5), salinidad (5.6) y daño mecánico (2.2)
	aCL2154Contig1	3	4,1	AT3G56340.1	Proteína ribosomal S26 ( <i>RPS26C</i> ), subunidad 40S	
	aCL8682Contig1	5,3	5,2	AT3G56150.1	Factor de iniciación de la traducción eucariótico (eIF3C), subunidad 8 (p110)	
	aCL4Contig33	3,3	2	AT1G02980.1	Culina 2 ( <i>CUL2</i> )	ACC (3)
<b>Antioxidantes</b>						
	aCL110Contig2	2,4	4,7	AT1G10360.1	Glutatión S-transferasa ( <i>GST29</i> )	
<b>Proteínas LEA (Late embryogenesis abundant protein)</b>						
	aCL6Contig16	11,8	4,4	AT1G54410.1	Dehidrina. Proteína LEA grupo 2	
	aCL6Contig7	10,2	4,9	AT1G54410.1	Dehidrina. Proteína LEA grupo 2	

**Defensa antimicrobiana y antifúngica**

aCL1854Contig1	5,2	7,3	AT4G33355.2	Proteína de transferencia de lípidos (LTP3)	
aCL10Contig9	3,8	4,3	AT1G05850.1	Quitinasa ( <i>CTL1</i> )	
aCL5030Contig1	3,1	4,2	AT1G77700.1	Taumatina. Proteína antifúngica PR5	
aCL1Contig18	2,9	2,9	AT3G04720.1	Proteína antifúngica PR4 (heveina)	Estrés osmótico (4)
aCL1Contig12	3,8	4,1	AT1G73260.1	Inhibidor de tripsina y proteasas tipo Kunitz	ABA (3.4), MJ (2.3), estrés osmótico (4), salinidad (2.8) y daño mecánico (2.2)
aCL20Contig2	1,6	3,9	AT5G56590.1	Quitinasa	
aC04017A07SK_c	15,9	6,6	AT3G57270.1	Endo-1,3-beta glucanasa	
aCL20Contig7	3,5	3,5	AT3G57270.1	Endo-1,3-beta glucanasa	
aCL20Contig6	2,3	5,7	AT3G57260.1	Endo-1,3-beta glucanasa	Sequía (5.5), estrés osmótico (16.3), salinidad (6.8) y daño mecánico (6.2)

**Factores de transcripción**

aC20006B02SK_c	6,8	3,7	AT3G46130.1	Factor de transcripción de la familia myb ( <i>MYB48</i> )	
aCL1571Contig1	5,4	3,7	AT1G52880.1	Factor de transcripción de la familia de Proteínas NAM (no apical meristem)	ABA (2)
aCL267Contig2	1,8	3,3	AT1G01720.1	Factores de transcripción de la familia de proteínas NAM (no apical meristem)	ABA (6), estrés osmótico (4) y salinidad (7.7)

**Transportadores**

aC18003A11Rv_c	6	3,3	AT1G73700.1	Proteína de la familia MATE	
aCL231Contig2	6,3	1,7	AT2G38905.1	Proteína hidrofóbica parecida a RCI2A	ABA (3), estrés osmótico (2.4) y salinidad (2.7)
aCL18Contig5	3,1	4	AT5G57110.2	ATPasa transportadora de calcio ( <i>ACA8</i> )	

**Fotosíntesis**

aCL1284Contig1	5	4,5	AT1G14150.1	Proteína 3 estimuladora del desprendimiento de oxígeno (PsbQ)	
----------------	---	-----	-------------	---	--

**Miscelanea**

aCL4250Contig1	15,9	7,2	AT2G34355.1	Nodulina	
aCL5840Contig1	4,9	4,8	AT5G62210.1	Proteína 3 específica de embriones	
aCL4931Contig1	5,2	5,8	AT1G24764.1	Proteína MAP70-2 (Microtubule-associated protein 70)	
aCL3160Contig1	4,1	5,3	AT5G02040.2	Proteína aceptadora de rab prenilado ( <i>PRA1</i> )	
aC18009C01Rv_c	3,1	3	AT1G03190.2	Proteína de reparación de DNA ( <i>UVH6</i> )	
aCL3550Contig1	3,5	4,2	AT2G03730.2	Proteína con dominio ACT ( <i>ACR5</i> )	
aCL4129Contig1	3,2	2,8	AT5G20430.1	Proteína de la familia mob1	
aCL1469Contig1	1,7	3,5	AT5G27760.1	Proteína de respuesta a hipoxia	
aCL3626Contig1	4,5	2,3	AT1G10630.1	Factor de ADP-ribosilación (ARF)	
aCL528Contig1	2,3	6,6	AT5G53750.1	Proteína con dominio CBS	MJ (4.3)
aCL6688Contig1	2,3	3,9	AT4G20390.1	Proteína integral de membrana	

**Tabla 10. Unigenes comunes de EH-ER-Raíces (Reprimidos)**

Categoría Funcional	Código CFGP	Máximo factor de inducción		Código	Homólogo de Arabidopsis Función (nombre del gen) y regulación	Represión <sup>1</sup> (Factor entre paréntesis)
		EH	ER			
<b>Metabolismo</b>						
	aCL4905Contig1	5,7	5,3	AT1G77520.1	O-metiltransferasa	
	aCL1370Contig3	1,6	10,8	AT2G35370.1	Glicina deshidrogenasa (decarboxilante). Proteína H	Estrés osmótico (2)
	aCL1355Contig1	4,3	3,3	AT4G15290.1	Celulosa sintasa	
	aCL36Contig1	5,5	15,4	AT2G37130.1	Peroxidasa 21 ( <i>PER21</i> )	

aCL36Contig2	8,3	6,5	AT2G37130.1	Peroxidasa 21 ( <i>PER21</i> )
aCL36Contig3	3,3	6,5	AT2G37130.1	Peroxidasa 21 ( <i>PER21</i> )

**Síntesis, plegamiento y degradación de proteínas**

aC08002B12SK_c	2,8	4,5	AT3G13920.2	Factor de iniciación de la traducción eucariótico (eIF-4A)
aCL3096Contig1	2,1	3,1	AT5G65220.1	Proteína ribosomal L29
aCL1778Contig1	1,9	2,9	AT1G21750.1	Disulfuro isomerasa

**Defensa antimicrobiana y antifúngica**

aCL12Contig7	3,9	4	AT5G38170.1	Inhibidor de proteasas/proteína de transferencia de lípidos (LTP)	
aCL369Contig2	2	3,3	AT1G73780.1	Inhibidor de proteasas/proteína de transferencia de lípidos (LTP)	ACC (3), MJ (2.8) y salinidad (2)
aCL12Contig9	3,8	4,1	AT3G18280.1	Inhibidor de proteasas/Proteína de transferencia de lípidos (LTP)	
aCL12Contig8	3	3,4	AT1G48750.1	Inhibidor de proteasas/proteína de transferencia de lípidos (LTP)	MJ (2)

**Proteínas kinasas y fosfatasa**

aC20007G06SK_c	2,6	4,1	AT3G02880.1	Proteína quinasa transmembrana con repeticiones ricas en leucina
----------------	-----	-----	-------------	--

**Fotosíntesis**

aCL2872Contig1	3,4	2,4	AT4G12800.1	Subunidad L del fotosistema I (PSI-L)
----------------	-----	-----	-------------	---------------------------------------

**Miscelanea**

aCL573Contig1	2,7	3,5	AT2G21150.1	Proteína de la familia XAP5
aCL1579Contig2	2,6	3	AT1G04140.1	Proteína con repeticiones WD-40 de la familia de la transducina

**Tabla 11. Unigenes específicos de ER-Hojas (Inducidos)**

**Homólogo de Arabidopsis**

Categoría Funcional	Código CFGP	Máximo factor de inducción	Código	Función (nombre del gen) y regulación	Inducción <sup>1</sup> (Factor entre paréntesis)
<b>Metabolismo</b>					
	aCL273Contig1	5	AT4G28780.1	Lipasa con motivo GDSL	
	aCL211Contig3	3,7	AT1G65930.1	Isocitrato deshidrogenasa (NADP)	
	aCL4068Contig1	3,2	AT4G32470.2	Ubiquinol citocromo reductasa. Complejo 14.	
	aCL2743Contig1	2,8	AT1G68530.2	Enzima de condensación de ácidos grasos de gran longitud ( <i>CUT1</i> )	Estrés osmótico (3) y salinidad (2)
	aC07007D05SK_c	2,8	AT1G77810.2	Galactosil transferasa	
	aCL2162Contig1	2,8	AT2G26250.1	β-queto acil-CoA sintasa	
<b>Síntesis, plegamiento y degradación de proteínas</b>					
	aCL7581Contig1	22	AT3G20210.1	Asparaginil endopeptidasa	
	aCL1778Contig1	3,7	AT1G21750.1	Proteína disulfuro isomerasa (PDIL1-1)	
	aCL5560Contig1	4	AT4G33210.1	Proteína de la familia F-box (FBL15)	
	aCL4Contig4	3,2	AT4G02890.3	Poliubiquitina ( <i>UBQ14</i> )	
	aCL80Contig2	5,3	AT5G59720.1	Proteína de choque térmico de clase I ( <i>HSP18.2</i> )	Estrés osmótico (19), salinidad (11) y daño mecánico (4)
	aCL1136Contig2	3	AT3G13310.1	Proteína de choque térmico (HSJ) parecida a J11	
	aCL1602Contig1	6	AT1G67430.1	Proteína ribosomal L17, subunidad 60S (RPL17B)	
	aCL445Contig1	4	AT5G54760.1	Factor de iniciación de la traducción eucariótico (eIF1)	

aCL1542Contig1	3,2	AT5G43100.1	Aspartil proteasa	
aCL685Contig1	3	AT5G01800.1	Aspartil proteasa B	
<b>Defensa antimicrobiana y antihervíboros</b>				
aCL18016E06Rv_c	6,5	AT1G67560.1	Lipoxigenasa	MJ (2.2),
aCL241Contig2	3,2	AT1G17420.1	Lipoxigenasa ( <i>LOX3</i> )	ABA (2.2), MJ (27) y salinidad (9.5)
aCL193Contig3	2,7	AT5G36270.1	Dehidroascorbato reductasa	
<b>Factores de transcripción</b>				
aCL228Contig1	2,8	AT2G44910.1	Proteína con cremellera de leucina de la familia homeobox (HB-4)	Salinidad (2.4)
aCL5706Contig1	3,2	AT2G14835.2	Proteína de la familia de dedos de zinc (C3HC4-type, RING finger)	
aCL335Contig1	3,1	AT1G30970.1	Proteína de la familia de dedos de zinc (C2H2-type), ( <i>SUF4</i> )	
aC01014A07SK_c	3	AT5G12850.1	Proteína de la familia de dedos de zinc (CCCH-type)	
<b>Proteínas kinasas y fosfatasas</b>				
aCL3907Contig1	3,7	AT1G55200.1	Proteína kinasa	
aCL7477Contig1	4,5	AT4G03230.1	Proteína kinasa con dominio tipo lectina locus S	
<b>Transportadores</b>				
aCL3139Contig1	5,2	AT5G13580.1	Proteína de la familia de transportadores ABC	ABA (5.6) y estrés osmótico (2.2)
<b>Fotosíntesis</b>				
aCL1414Contig1	3,2	AT5G43860.1	Clorofilasa (CLH2)	
aCL4823Contig1	5,3	AT4G32260.1	ATP sintasa B/B CF(0)	
<b>Miscelanea</b>				
aCL296Contig1	3,7	AT1G35720.1	Anexina 1 (ANN1); unión a calcio y fosfolípidos ácidos	
aCL3938Contig1	4	AT4G05150.1	Octicosa. Proteína con dominio Phox/Bem 1 (PB1)	
aCL6959Contig1	4	AT2G26770.2	Plectina parecida a Plectina ( <i>Cricetulus griseus</i> )	
aC08005B03SK_c	9	AT4G25260.1	Inhibidor de pectin-metilesterasa/Invertasa	
aCL5427Contig1	3	AT5G48600.1	Proteína de mantenimiento de la estructura de los cromosomas (SMC)	
aC02010H06SK_c	2,8	AT3G51670.1	Proteína de transferencia de fosfoglicéridos (SEC14)	
aCL3338Contig1	2,8	AT2G20330.1	Proteína con repeticiones WD-40 de la familia de la transducina	
aCL1462Contig1	5,2	AT2G37200.1	Proteína integral de membrana	
aCL341Contig1	3,1	AT2G39670.2	Proteína con un dominio SAM	
aCL2005Contig1	3,1	AT5G61030.1	Proteína de unión a RNA rica en glicina (GR-RBP3)	
aCL1912Contig1	3	AT4G17620.2	Proteína rica en glicina	
aCL59Contig5	3	AT4G22760.1	Proteína que contiene repeticiones del motivo pentatricopeptido (PPR)	
aCL2699Contig1	2,8	AT3G12390.1	Proteína que contiene un dominio NAC (nascent polypeptide-associated complex)	

Tabla 12. Unigenes específicos de ER-Hojas (Reprimidos)

## Homólogo de Arabidopsis

Categoría Funcional	Código CFGP	Máximo factor de represión	Código	Función (nombre del gen)	Represión <sup>1</sup> (Factor entre paréntesis)
<b>Metabolismo</b>					
	aCL2322Contig1	5,2	AT1G62660.1	Invertasa	
	aC08006E04SK_c	3,7	AT3G20040.1	Hexoquinasa	
	aCL5Contig21	13	AT3G23920.1	Beta amilasa 7 ( <i>BMV7</i> )	
	aCL1401Contig1	15	AT2G40370.1	Lacasa ( <i>LAC5</i> )	
	aCL3200Contig1	3,7	AT5G65110.2	Acil CoA oxidasa ( <i>ACX2</i> )	
	aCL3328Contig1	3,7	AT1G14210.1	Ribonucleasa de la familia T2	Estrés osmótico (2.8) y salinidad (2.6)
	aCL622Contig2	16	AT5G15180.1	Peroxidasa (ATP12a )	
	aCL98Contig3	2,6	AT3G32980.1	Peroxidasa 32 ( <i>PER12</i> )	
<b>Síntesis, plegamiento y degradación de proteínas</b>					
	aCL236Contig1	2,8	AT1G23440.2	Pirrolidona carboxilato peptidasa	
	aCL1593Contig2	2,8	AT4G05320.4	Poliubiquitina ( <i>UBQ10</i> )	
	aCL56Contig1	3	AT5G45360.1	Proteína de la familia F-box parecida a SKP1	
	aCL1136Contig2	8	AT3G13310.1	Proteína de choque térmico (HSP) parecida a J11	
	aCL2730Contig1	7	AT5G66110.1	Chaperona que contiene cobre (CCH)	
<b>Proteínas LEA (Late embryogenesis abundant protein)</b>					
	aCL9Contig20	3,7	AT1G02820.1	Proteína LEA del grupo 3	Sequía (2)
	aCL9Contig19	2,4	AT1G02820.1	Proteína LEA del grupo 3	Sequía (2)
	aCL9Contig6	2,4	AT1G02820.1	Proteína LEA del grupo 3	Sequía (2)
	aCL9Contig8	2,5	AT4G02380.1	Proteína LEA del grupo 3 ( <i>SAG21</i> )	
	aCL6Contig22	2,6	AT4G02380.1	Proteína LEA del grupo 3 ( <i>SAG21</i> )	
<b>Defensa antimicrobiana y antihervíboros</b>					
	aCL2301Contig1	11	AT1G73780.1	Inhibidor de proteasas/proteína de transferencia de lípidos (LTP)	ACC (3), MJ (2.8) y salinidad (2)
	aCL747Contig2	4	AT4G36010.2	Taumatina. Proteína antifúngica PR5	
<b>Proteínas quinasas y fosfatasa</b>					
	aC01011E04SK_c	3,4	AT2G26730.1	Proteína quinasa transmembrana rica en repeticiones de leucina	Estrés osmótico (2)
<b>Fotosíntesis</b>					
	aCL12Contig4	4,5	AT5G20230.1	Plastocianina	
	aCL3449Contig1	6	AT2G31050.1	Plastocianina	
	aCL397Contig1	3	AT2G40100.1	Proteína de unión a clorofila a/b ( <i>LHCB4.3</i> )	Estrés osmótico (2) y salinidad (2)
	aCL1393Contig1	4,2	AT2G06520.1	Subunidad X del fotosistema II (PSII-X)	
<b>Miscelanea</b>					
	aC08002G01SK_c	4	AT3G60190.1	Proteína parecida a la dinamina E (DL1E)	
	aCL26Contig9	10,5	AT3G47480.1	Proteína de unión a calcio con dominio EF	
	aCL4735Contig1	5,6	AT3G52790.1	Proteína que contiene un dominio LysM de unión a peptidoglicano	
	aCL554Contig1	5	AT4G32940.1	Enzima de procesamiento vacuolar (gamma-VPE)	
	aCL5345Contig1	4	AT3G53750.1	Actina 3 ( <i>ATC3</i> )	Estrés osmótico (2)
	aCL8066Contig1	3	AT5G37900.1	Ubiquitina ligasa de la familia "seven in absentia" (SINA)	ABA (2.5)
	aCL528Contig1	4,3	AT5G53750.1	Proteína con dominio CBS	
	aCL7817Contig1	3,7	AT4G17740.1	Proteína de procesamiento del extremo C-terminal	Estrés osmótico (2)
	aCL5670Contig1	2,8	AT3G57540.1	Remorina	ABA (7.6), estrés osmótico (8) y salinidad (4)

Tabla 13. Unigenes específicos de ER-Raíces (Inducidos)

Categoría Funcional	Código CFGP	Máximo factor de inducción	Homólogo de Arabidopsis		Inducción <sup>1</sup> (Factor entre paréntesis)
			Código	Función (nombre del gen) y regulación	
<b>Metabolismo</b>					
	aCL7786Contig1	2,6	AT3G27300.2	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	
	aCL215Contig4	3,4	AT5G47950.1	Acetil transferasa	
	aCL123Contig1	2,9	AT1G77530.1	O-metiltransferasa	MJ (2.2)
	aCL1126Contig1	3,6	AT4G22570.1	Adenina fosforibosiltransferasa ( <i>APT3</i> )	
	aCL1242Contig1	3,4	AT4G34200.1	D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa	
	aCL8415Contig1	2,9	AT4G37560.1	Formamidasa	
	aCL2767Contig1	3	AT1G10070.3	Aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada ( <i>ATBCAT-2</i> )	MJ (2.5)
	aCL622Contig1	4,9	AT3G01190.1	Peroxidasa 27 ( <i>PER27</i> )	
<b>Síntesis, plegamiento y degradación de proteínas</b>					
	aCL910Contig1	2,3	AT5G07090.2	Proteína ribosomal S4 ( <i>RPS4D</i> ), subunidad 40S	
	aCL1025Contig1	2,4	AT1G29965.1	Proteína ribosomal L18A ( <i>RPL18aA</i> ), subunidad 60S	
	aCL12Contig10	3,1	AT4G34870.1	Cis-trans peptidil-proli isomerasa ( <i>ROC5</i> )	
<b>Antioxidantes</b>					
	aCL4064Contig1	3,1	AT2G29490.1	Glutación S-transferasa ( <i>GST19</i> )	
	aCL5500Contig1	3,9	AT3G09640.2	L-ascorbato peroxidasa ( <i>APX1</i> )	Estrés osmótico (14) y salinidad (10)
<b>Osmolitos</b>					
	aCL3743Contig1	2,4	AT5G14800.1	Pirrolina-5-carboxilato reductasa ( <i>P5CR</i> )	
<b>Defensa antimicrobiana y antihervíboros</b>					
	aCL168Contig3	3,3	AT4G26830.1	Quitinasa	
	aCL2301Contig1	4,5	AT1G73780.1	Inhibidor de proteasas/proteína de transferencia de lípidos ( <i>LTP</i> )	ABA (2)
<b>Factores de transcripción</b>					
	aC20002E09SK_c	6,8	AT2G42280.1	Proteína de la familia bHLH (basic helix-loop-helix)	
	aCL1201Contig1	2,4	AT4G04450.1	Factor de transcripción de la familia WRKY ( <i>WRKY42</i> )	
	aCL152Contig1	2,9	AT3G14230.1	Factor de transcripción de la familia AP2/ERF ( <i>RAP2.2</i> )	Estrés osmótico (2)
<b>Transportadores</b>					
	aCL2298Contig1	4,3	AT5G18840.1	Transportador de azúcares	
<b>Fotosíntesis</b>					
	aCL224Contig2	3	AT1G10960.1	Ferredoxina	
<b>Miscelanea</b>					
	aCL5569Contig1	7,8	AT2G26460.1	Proteína de la familia RED	
	aCL3202Contig1	4,6	AT3G17020.1	Proteína de la familia de respuesta a estrés universal ( <i>UPS</i> )	
	aC18016A04Rv_c	3,8	AT3G46960.1	RNA-helicasa con caja DEAD/DEAH	
	aCL2005Contig1	4	AT5G61030.1	Proteína de unión a RNA rica en glicina ( <i>GR-RBP3</i> )	
	aCL410Contig1	3,3	AT4G12390.1	Inhibidor invertasa/pectin metilesterasa	
	aCL7804Contig1	3,2	AT3G11950.1	Preniltransferasa UbiA	
	aCL537Contig1	3	AT2G46620.1	ATPasa tipo AAA	
	aCL2899Contig1	3,5	AT1G34120.3	Inositol polifosfato 5-fosfatasa ( <i>IP5P1</i> )	

Tabla 14. Unigenes específicos de ER-Raíces (Reprimidos)

Categoría Funcional	Código CFGP	Máximo factor de represión	Homólogo de Arabidopsis		Represión <sup>1</sup> (Factor entre paréntesis)
			Código	Función (nombre del gen)	
<b>Metabolismo</b>					
	aCL642Contig2	3,9	AT1G42970.1	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (NADP+) de cloroplasto (GAPB)	Estrés osmótico (2.3)
	aCL627Contig1	4,8	AT2G40890.1	Citocromo P450 ( <i>CYP89A3</i> )	
	aCL5654Contig1	5,2	AT2G23620.1	Esterasa	
	aCL119Contig1	4,8	AT2G23600.1	Esterasa	
	aCL3307Contig1	17,6	AT5G13870.1	Xiloglucano:xiloglucosil transferasa	
	aCL172Contig2	4,7	AT1G23760.1	Poligalacturonasa	
	aCL92Contig1	4,4	AT2G02400.1	Cinamoil-CoA reductasa	
	aCL1958Contig1	3	AT1G53240.1	Malato deshidrogenasa (NAD)	Estrés osmótico (2.2)
	aCL385Contig1	3	AT1G48910.1	Flavina monooxigenasa (FMO)	
	aC05014A08SK_c	3,3	AT5G55050.1	Lipasa con motivos GDSL	
<b>Síntesis, plegamiento y degradación de proteínas</b>					
	aCL265Contig2	3,5	AT5G20720.2	Chaperonina del cloroplasto ( <i>CPN20</i> )	Estrés osmótico (2.5)
	aCL7581Contig1	5	AT3G20210.1	Asparaginil endopeptidasa	
	aCL9002Contig1	3,1	AT1G16340.2	2-deshidro-3-desoxifosfooctanato aldolasa	
<b>Antioxidantes</b>					
	aCL3888Contig1	8,6	AT5G41220.1	Glutation S-transferasa ( <i>GST10C</i> )	
	aC07002C08SK_c	2,9	AT4G33040.1	Glutaredoxina	
<b>Osmolitos</b>					
	aCL9461Contig1	2,9	AT2G47180.1	Galactinol sintasa 1	
	aCL381Contig1	3,4	AT4G26250.1	Galactinol sintasa 6	
	aCL25Contig1	5,9	AT2G22240.1	Mio-inositol-1-fosfato sintasa ( <i>IPS2</i> )	
<b>Defensa antimicrobiana y antihervíboros</b>					
	aCL1Contig19	4,2	AT1G73325.1	Inhibidor de tripsina y proteasas tipo Kunitz parecido a Dr4	
	aCL297Contig1	3,7	AT1G73325.1	Inhibidor de tripsina y proteasas tipo Kunitz parecido a Dr4	
	aCL1Contig13	3,1	AT1G73325.1	Inhibidor de tripsina y proteasas tipo Kunitz parecido a Dr4	
	aCL1Contig1	4,5	AT1G17860.1	Inhibidor de tripsina y proteasas tipo Kunitz parecido LeMir ( <i>Lycopersicon esculentum</i> miraculin homólogo)	
	aCL3Contig13	15,2	AT3G51590.1	Proteína de transferencia de lípidos ( <i>LTP12</i> )	
	aCL3Contig9	8	AT3G51590.1	Proteína de transferencia de lípidos ( <i>LTP12</i> )	
	aCL2301Contig1	6,5	AT1G73780.1	Inhibidor de proteasas/proteína de transferencia de lípidos (LTP)	ACC (3), MJ (2.8) y salinidad (2)
	aCL369Contig1	3,3	AT3G18280.1	Inhibidor de proteasas/proteína de transferencia de lípidos (LTP)	
	aCL3701Contig1	6,4	AT4G12470.1	Inhibidor de proteasas/proteína de transferencia de lípidos (LTP)	
	aCL241Contig2	3,2	AT1G17420.1	Lipoxigenasa ( <i>LOX3</i> )	
	aC05011H05SK_c	6,2	AT3G14460.1	Proteína de resistencia a enfermedades (clase NBS-LRR)	Sequía (2)
<b>Factores de transcripción</b>					
	aCL2843Contig1	3,3	AT3G30210.1	Factor de transcripción de la familia myb ( <i>MYB121</i> )	
<b>Proteínas kinasas</b>					
	aCL11Contig4	5,1	AT4G28350.1	Lectina proteína kinasa	
	aCL11Contig1	6,1	AT3G55550.1	Lectina proteína kinasa	Estrés osmótico (4) y salinidad (3.3)

## Fotosíntesis

aCL1319Contig1	5,4	AT1G32060.1	Fosforibulokinasa (PRK)	Estrés osmótico (2)
aCL756Contig1	5,4	AT1G76100.1	Plastocianina	Estrés osmótico (2.8)
aCL43Contig3	3,7	AT5G38410.1	Ribulosa bifosfato carboxilasa (RuBisCo). Subunidad pequeña 3B	
aCL48Contig2	8,8	AT2G39730.1	RuBisCo activasa	
aCL48Contig3	7,6	AT2G39730.3	RuBisCo activasa	
aCL48Contig1	3,7	AT2G39730.2	RuBisCo activasa	
aCL93Contig1	4,4	AT4G10340.1	Proteína de unión a clorofila a/b ( <i>LHCB5</i> )	
aCL397Contig1	11,5	AT2G40100.1	Proteína de unión a clorofila a/b ( <i>LHCB4.3</i> )	Estrés osmótico (2)
aCL1214Contig1	10,5	AT1G15820.1	Proteína de unión a clorofila a/b ( <i>LHCB6</i> )	Estrés osmótico (2)
aCL14Contig1	8,1	AT2G34420.1	Proteína de unión a clorofila a/b tipo LHCII ( <i>LHB1B2</i> )	
aCL14Contig6	4,3	AT2G34420.1	Proteína de unión a clorofila a/b tipo LHCII ( <i>LHB1B2</i> )	
aCL5Contig15	5,4	AT3G22840.1	Proteína de unión a clorofila a/b ( <i>ELIP1</i> )	
aCL148Contig2	7,2	AT1G79040.1	Proteína de 10 kDa del fotosistema II	
aCL148Contig1	5,6	AT1G79040.1	Proteína de 10 kDa del fotosistema II	
aCL1139Contig1	2,9	AT2G30570.2	Subunidad W del fotosistema II (PSII-W)	
aCL4171Contig1	4,4	AT2G30570.2	Subunidad W del fotosistema II (PSII-W)	
aCL6Contig3	3,1	AT1G06680.1	Proteína de 23 kDa del fotosistema II	
aCL2336Contig1	4,2	AT4G28750.1	Subunidad IV del fotosistema I (PSI-E)	
aCL2714Contig1	6,6	AT1G30380.1	Subunidad K del fotosistema I (PSI-K)	
aCL2579Contig2	4,6	AT4G02770.1	Subunidad II del fotosistema I (PSI-D)	
aCL1971Contig1	4,4	AT5G64040.2	Subunidad N del fotosistema I (PSI-N)	Estrés osmótico (2)
aCL73Contig1	6,4	AT4G38970.1	Fructosa bifosfato aldolasa del cloroplasto	Estrés osmótico (2)

## Miscelanea

aC05014F01SK_c	5,7	AT5G60390.2	Factor de elongación 1-alfa (eEF-1- $\alpha$ )	
aCL440Contig4	4,7	AT1G72610.1	Proteína parecida a germidina ( <i>GER1</i> )	Estrés osmótico (12)
aCL533Contig3	4,3	AT1G76560.1	Proteína con dominio CP12	
aCL8071Contig1	5,1	AT3G16000.1	Proteína de unión a DNA localizada en matriz (MAR)	Estrés osmótico (2.5)
aC18010B05Rv_c	4,8	AT3G44880.1	Proteína con dominio Rieske (2Fe-2S) ( <i>ACD1</i> , accelerated cell death 1)	
aCL7249Contig1	6,8	AT2G24820.1	Proteína con dominio Rieske (2Fe-2S)	
aCL4860Contig1	3,5	AT4G01050.1	Glicoproteína rica en hidroxiprolina	Estrés osmótico (2.1)
aC01003B10SK_c	3,5	AT5G20300.3	Proteína de la membrana externa del cloroplasto	
aCL106Contig1	3,5	AT5G42890.1	Proteína portadora de esteroles (SCP-2)	
aCL6Contig14	5,2	AT5G14120.1	Nodulina	ABA (3)
aCL2730Contig1	3,1	AT5G66110.1	Proteína con dominio de unión a metales pesados (CCH)	

