

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Genética



TESIS DOCTORAL

Estudio genómico de la tolerancia a suelos ácidos en cereales

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Naike Salvador Moreno

Directores

Francisco Gallego Rodríguez
César Benito Jiménez

Madrid, 2014

Estudio genómico de la tolerancia a suelos ácidos en cereales

Naike Salvador Moreno

Madrid, 2014



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Genética

VºBº del Director de la Tesis

VºBº del Director de la Tesis

Fdo. Naike Salvador Moreno

Fdo. Francisco Javier Gallego Rodríguez

Fdo. César Benito Jiménez

Al amor de mi vida, Ibon:

«I love you like the stars above,

I'll love you till I die»

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis, Javier Gallego y César Benito, porque me han abierto las puertas al mundo de la investigación dándome la oportunidad de realizar esta tesis doctoral con ellos. He aprendido muchísimo de ellos y creo que no saben hasta qué punto les estoy agradecida.

Durante los cinco años que he pasado en el Departamento de Genética he recibido el apoyo de mucha gente. A la que ha sido la directora del departamento casi todo este tiempo, Conchita, le debo un reconocimiento especial, ya que fue ella la que me introdujo en el departamento y me presentó a Javier Gallego. Gracias también por ayudarme y darme ánimo, junto con Mónica de la Cruz, con los interminables trámites para mi estancia. Igualmente, gracias a la directora actual, Charo, por estar siempre que la he necesitado. Quiero agradecer a todos y cada uno de los profesores del departamento. Gracias a Julia, Javier Espino, Chechu, Juanma, Araceli, Aurora y Alicia por las gratas experiencias durante las prácticas. Por supuesto, les doy las gracias a los técnicos del departamento, José y M^a Carmen, por ayudarme con problemas informáticos y con todo tipo de dudas sobre antibióticos y compuestos varios para preparar medios de cultivo; y también a Rosa por su ayuda con todo el papeleo y trámites.

Le agradezco a Juan Carlos del Pozo el haberme proporcionado semillas, consejos y un hueco en su laboratorio para terminar mis experimentos.

Les doy las gracias a mis padrinos Australianos, Peter Ryan y Manny Delhaize, por acogerme en su laboratorio y darme sabios consejos. Gracias a Linda por ayudarme en mi pelea con las qRT-PCRs y a Tina por soportar mis infinitas preguntas acerca de todo. Siempre recordare con cariño a todos los miembros del laboratorio.

Gracias a mi compañera de despacho, de alegrías y penas, Cecilia, por su apoyo y ayuda constantes; a Diego, también mi compañero de despacho, por sus reflexiones y sus explicaciones estadísticas; a Javi, siempre con una sonrisa en la cara; a Mónica, por alentarme a seguir adelante; a Celia, a María, a Elisa, a Marina, a Ale, a Eugenio, a Bea, a Myriam, a Roberto, en definitiva, a todos los doctorandos y polluelos de la Complu por todos los momentos que hemos vivido juntos. También a mis compañeros de laboratorio del CBGP: A Silva, mi “hermano mayor”, por resolverme mil dudas y

enseñarme cómo funciona un laboratorio; a David y Alberto, a quienes debo prácticamente todo lo que sé sobre qRT-PCRs, a Bárbara, a Sara, a Elena, a Merce, a Concha y a Juan, por vuestra compañía, consejos y los buenos ratos que hemos pasado juntos.

Gracias a mi familia, mis amigos y mis “tzikos”. Y sobre todo le doy las gracias a Ibon, por estar a mi lado y apoyarme siempre, por ayudarme más allá de cualquier límite razonable, por animarme, por consolarme, por protegerme, por acompañarme a los confines de la Tierra... Sin ti no sería quien soy.

Abreviaturas y siglas

ABA: Abscisic acid-responsive protein

ABC: ATP-binding cassette

ABRC: Arabidopsis Biological Resource Center of Ohio State University

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism

Ai: Cultivar Ailés

Al: Aluminio

ALMT: Aluminum-induced malate transporter

ALS: Aluminum sensitive

Alt: Locus de tolerancia al aluminio

Aqua: Aquaporin

ATP: Adenosina trifosfato

bHLH: basic helix-loop-helix

Blast: The Basic Local Alignment Search Tool

cDNA: Complementary Deoxyribonucleic Acid

CDT: Cadmium Tolerant

Col: Ecotipo Columbia

cv.: Cultivar

CS: Chinese Spring

CSI: Chinese Spring- Imperial

DNA: Deoxyribonucleic Acid

dNTP: Desoxinucleótido trifosfato

DREB: Dehydration-Responsive Element-Binding protein

EDTA: Ácido etilen-diamin-tetraacético

EST: Expressed Sequence Tag

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

FDR: False Discovery Rate

FRDL: Ferric Reductase Defective Like

gDNA: DNA genómico

GEO: Gene Expression Omnibus

Harpin: Harpin induced gene

Im: Imperial

Kb: Kilobase

KDa: Kilodalton

KO: Knock Out

LBA: Luria Bertani ampicillin

LP: Left Primer

MATE: Multidrug and toxic compound extrusion

MDR: Multidrug resistance protein

Min: Minuto

MITE: Miniature Inverted repeat Transposable Element

mRNA: RNA mensajero

MS: Medio Murashige y Skoog

NASC: Nottingham Arabidopsis Stock Center

NCBI: National Centre for Biotechnology Informaion

NRAMP: Natural Resistance-Associated Macrophage Protein

NRAT: NRAMP Aluminum Transporter

Pb: Pares de bases

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

qRT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa

QTL: Quantitative Trait Locus

RAP: Related to Apetala

RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DNA

RB: Right Border

Rd: Línea consanguínea Riodeva

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RNA: Ribonucleic acid

RP: Right Primer

Rpm: Revoluciones por minuto

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SCAR: Sequence Characterized Amplified Region

STAR: Sensitive To Aluminum Rhizotoxicity

STOP: Sensitive To Proton rhizotoxicity

TAE: Tris/Acetato/EDTA

TAIR: The Arabidopsis Information Resource

T-DNA: Transferred DNA

Tris: Trihidrometil aminometano

UTR: Untranslated Region

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopyranoside

Índice

Summary	13
INTRODUCCIÓN	19
Suelos ácidos y estrés por aluminio	21
Suelos ácidos: distribución, causas y efectos	21
El aluminio: su comportamiento y efectos	23
Mecanismos de tolerancia al aluminio	25
Exudación de ácidos orgánicos	28
Tolerancia al aluminio en centeno	29
Genes de tolerancia al aluminio.....	30
Familia ALMT (Aluminum-activated Malate Transporters)	31
Familia MATE (Multidrug and Toxic compound Extrusion)	32
Familia de transportadores ABC (ATP-binding cassette)	33
Familia Nramp (natural resistance-associated macrophage protein)	35
Reguladores de la expresión de genes de tolerancia al aluminio	36
Factores de transcripción	36
Secuencias reguladoras que actúan en <i>cis</i>	37
Microarrays y aluminio.....	38
OBJETIVOS.....	41
MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
Material vegetal.....	47
Métodos	49
Obtención de líneas homocigotas para las inserciones de T-DNA	49
Tratamientos pre-germinación	50
Condiciones de crecimiento.....	50
Análisis fenotípico de la tolerancia al aluminio.....	52
Análisis molecular	52
Análisis <i>in silico</i>	60
RESULTADOS.....	65
Análisis de la expresión génica en centeno.....	67
Análisis <i>in silico</i> de los dominios, la topología y la localización subcelular	76
Análisis de la expresión	78
Análisis fenotípico de líneas de inserción de T-DNA	80
Cribado de líneas transgénicas en medio de cultivo con aluminio	85

Identificación y caracterización de genes relacionados con la tolerancia al aluminio en centeno	98
Familia ALMT	98
Familia MATE	103
Familia ABC	105
Familia NRAMP	108
<i>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</i>	111
Análisis transcriptómico en centeno	113
Cribado de líneas trasngénicas en medio de cultivo con aluminio	121
Identificación y caracterización de genes relacionados con la tolerancia al aluminio en centeno	125
<i>Conclusiones</i>	128
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	131
<i>ANEXOS</i>	151

Summary

Introduction

Aluminum is the mayor toxin plants encounter on acid soils. It inhibits root growth by damaging cells at the root apex, limiting crop yields. Rye is one of the most aluminum tolerant species among cereals. It releases malate and citrate from the root apices which excludes aluminum from its tissues. Five independent loci related to aluminum tolerance have been described in rye. Aniol and Gustafson (1984) located three of them: *Alt1* on the short arm of chromosome 6R; *Alt2* on the short arm of chromosome 3; and *Alt3* on the long arm of chromosome 4; Matos et al. (2005) located *Alt4* on the short arm of chromosome 7; and Silva-Navas et al. (2012) located Q_{Alt5} also on the short arm of chromosome 7. The *ALMT1* (aluminum-activated malate transporter 1) co-segregates with *Alt4* and *MATE1* with Q_{Alt5} (Silva-Navas et al. 2012), but the identity of the genes located on the other three loci remains unknown.

Objective

The aim of this work was to identify a new aluminum tolerance gene. We used three different approaches:

- Transcriptional analysis of rye using a wheat microarray.
- Screening of a collection of transgenic lines in aluminum containing medium.
- Characterization in rye of aluminum tolerance genes already described in other species.

Results

- The microarray:

To identify genes that could be related to the loci *Alt2* (3R) and *Alt1* (6R), we used the wheat microarray Agilent 4x44K (Design ID 022297) to carry out a transcriptional

analysis over roots from rye (cv. Imperial), hexaploid wheat (cv. Chinese Spring) and the wheat-rye addition lines 3R and 6R, treated with or without aluminum (24h at 200 μ M). Results with FDR (RankProd) < 0,05 were considered statistically significant.

After a couple of unsuccessful tests, we set a threshold for the fold-change on ≥ 10 and ≤ -10 for the induced and repressed genes, respectively. We had to dismiss all the rye genes, and that forced us to change the approach and seek for aluminum tolerance genes based on their putative function or cellular localization. We analyzed the genes one by one, and most of the induced ones turn out to be related to pathogen or stress response, while most of the repressed ones were related to oxidative stress.

We chose six candidate genes among the induced ones to further analyze them:

- *bHLH51*.
- *CDT1*.
- *MDR4*.
- *Harpin*.
- *Aqua*.
- *ABA*.

The fold-change of the six genes was at least two times higher in wheat and the addition line 6R than in 3R.

We did an *in silico* analysis of the proteins encoded by the six candidate genes. As well as that, we performed a qRT-PCR assay to check if induction of these six genes was an universal response to aluminum in rye. We employed two rye genotypes different from Imperial: aluminum tolerant 390 and sensitive 389. Results show that unlike the aluminum tolerance gene *ALMT1*, which has a higher expression in the tolerant genotype, the six candidates are induced by aluminum only in the sensitive genotype.

We also wanted to see whether the candidate genes had a role in aluminum tolerance in *Arabidopsis*. We found the homologous of these genes in *Arabidopsis* and asked for their T-DNA lines. Seedlings were grown in a medium with different aluminum concentrations, and even though all the mutants had shorter roots than Columbia, that

also happened in the absence of this metal. Therefore, none of them showed reduced root growth due to aluminum compared with Columbia.

Taken together, results from the experiments with *Arabidopsis* and rye indicate that the six candidate genes behave as aluminum stress response genes, and not as tolerance genes.

- The screening:

The second approach consisted of a screening of a collection of transgenic lines in aluminum containing medium. 208 lines from the Transplanta Project were tested. These are plants that overexpress one transcription factor each, induced by estradiol. The goal was to characterize a transcription factor that could either confer resistance or sensitivity to aluminum stress.

We experienced several problems getting the medium ready. Nevertheless, we managed to choose a few candidates that seem to respond to aluminum. We assessed the candidates taking into account the results of other groups working with Transplanta lines, so they would not respond to other stresses. We came up with three candidate genes:

- *Related to Apetala 2.3 (RAP2.3).*
- *Transmembrane Domain Ring H2.*
- *Dehydration-Responsive Element Binding Protein 2.*

We asked for their T-DNA insertion lines and test them in a medium with different aluminum concentrations.

- *Related to Apetala 2.3 (RAP2.3):*

We analyzed two different T-DNA insertion lines corresponding this gene. Seemingly, this gene is unrelated to the aluminum tolerance. Additionally, the absence of the gene does not make the plant specially sensitive to pH variations either.

- *Transmembrane Domain Ring H2*:

The T-DNA insertion line in this gene showed no differential growth compared to Columbia's in medium with aluminum, suggesting it is not involved in the response to this metal.

- *Dehydration-Responsive Element Binding Protein 2*:

We studied two different T-DNA insertion lines of this gene, and both of them showed longer roots than Columbia when grown in a medium with aluminum.

We checked the expression of the gene in the insertion lines and they turn out to be knock down lines instead of knock out. Interestingly, the gene is induced by aluminum.

All in all, this candidate appears to be involved in the response to aluminum stress, possibly as a repressor.

- The characterization of aluminum tolerance genes:

The third approach to identify aluminum tolerance genes was to characterize in rye genes that have already been described in other species. It was a rather direct approach and it allowed us to identify genes from families like ALMT, MATE, ABC and NRAMP, all of them related to aluminum tolerance.

- *ALMT family*:

ScALMT1 is an aluminum tolerance gene in rye (Fontecha et al. 2007; Collins et al. 2008). Given that, we characterized the following members of this family:

- *ScALMT2*: We sequenced a 1374 base long open reading frame in the cultivars Ailes, Imperial and Riodeva. We also isolated two pseudogenic sequences of this gene in Ailes and Riodeva. We located the gene in the long arm of chromosome 2.

- *ScALMT3*: We obtained a fragment of the gene of about 1230 nucleotides in the cultivars Ailes, Imperial and Riodeva.

- *ScALMT4*: We amplified a 441 base long fragment of the gene in cultivars Ailes and Riodeva. It was located in the short arm of chromosome 3, which is also the location of the aluminum tolerance locus *Alt2*.

- *ScALMT5*: We sequenced fragments of the gene of 275, 388 and 387 nucleotides in the cultivars Petkus, Ailes and Riodeva, respectively.

- *ScALMT6*: We obtained a 679 base long gene fragment in the cultivars Petkus, Ailes and Riodeva.

- *MATE family*:

In this family, *ScFRDL2* has been described as an aluminum tolerance gene (Yokosho et al. 2010), thus, we sought for other members that could also be involved in tolerance:

- *ScMATE2*: We managed to amplify 545 nucleotides of the gene in the cultivar Imperial and we located it in the long arm of chromosome 1. We verify, as well, that its expression was induced by aluminum.

- *ABC family*:

We searched for the rye homologues of the *Arabidopsis STAR1* (Huang et al. 2010), and rice *STAR1* and *STAR2* (Huang et al. 2009).

-*ScSTAR1*: We sequenced a 291 base long fragment from the gene in the cultivars Ailes and Riodeva. We analyzed the expression pattern of the gene, and like its homologues in rice, it is induced by aluminum.

-*ScSTAR2*: We obtained a fragment of the gene of 841 nucleotides in the cultivar Petkus.

- *NRAMP family*:

The rice gene *Nrat1* has been associated with aluminum tolerance (Xia et al. 2010), so we looked for its homologue in rye.

We amplified 760 and 762 nucleotides of the gene in the cultivars Ailes and Riodeva, respectively.

Discussion and conclusions

Altogether, we have been able to characterize three candidate genes that seem to be related to the aluminum response: *ALMT4*, which is located in the same chromosome arm as the aluminum tolerance locus *Alt2*; *STAR1*, which is induced by aluminum and whose homologues in *Arabidopsis* and rice participate in the response to this metal; *DREB2A*, which is also induced by aluminum, and whose partial inhibition seems to improve the response to this metal in *Arabidopsis*.

INTRODUCCIÓN

Suelos ácidos y estrés por aluminio

Suelos ácidos: distribución, causas y efectos

Los suelos pueden clasificarse según su pH. De acuerdo con la escala de Wilde, un suelo es neutro si su pH oscila entre 6,5 y 7,3. Así, los suelos con un pH inferior a 5,5 se consideran fuertemente ácidos, y los que tienen un pH inferior a 4 extremadamente ácidos.

Los suelos ácidos se encuentran extensamente distribuidos en regiones tropicales y subtropicales, aunque también están presentes en zonas de clima templado, afectando hasta un 40% de los suelos potencialmente cultivables (Haug et al. 1984) (figura 1).

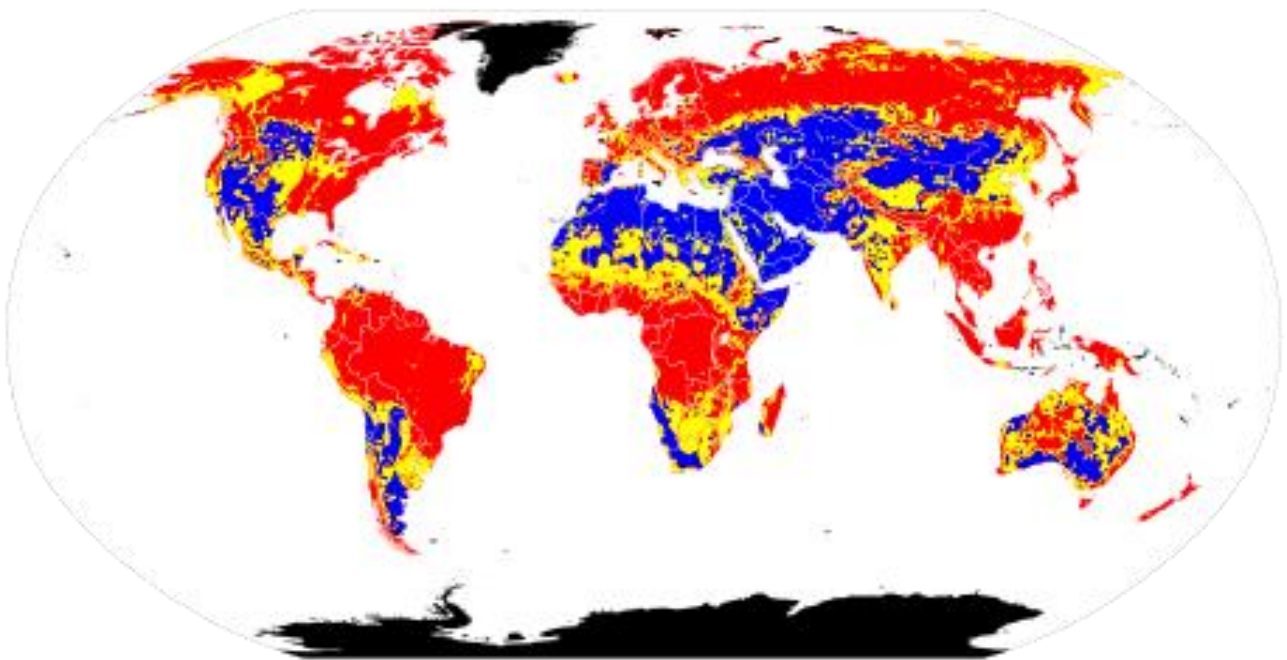


Figura 1: Distribución de suelos ácidos en el mundo. Rojo: suelos ácidos. Amarillo: suelos neutros. Azul: suelos alcalinos. Negro: sin datos.

La actividad agrícola también puede conducir a la acidificación del suelo (Simoes et al. 2012), así como la lluvia ácida, resultado de procesos industriales y uso de combustibles fósiles. Este es el caso de Europa, donde los suelos ácidos cubren gran

Introducción

parte de la península escandinava, Rusia, Polonia y Portugal. En España, los suelos ácidos afectan principalmente a las regiones del norte y Extremadura.

Aproximadamente el 67% de los suelos ácidos están cubiertos de bosques y el 18% de sabana, praderas y vegetación esteparia. Solamente el 4,5% de los suelos ácidos se utiliza para cultivos. Sin embargo, existen grandes extensiones de suelos ácidos en áreas tropicales deforestadas y abandonadas que podrían ser usadas (von Uexkull and Mutert, 1995).

La acidez del suelo limita la productividad de los cultivos debido a múltiples estreses. El pH afecta a la solubilidad y disponibilidad de nutrientes, reduciéndose éstas a medida que disminuye el pH (Foy et al. 1978). Entre los factores que afectan el crecimiento de las plantas se encuentran las deficiencias de elementos esenciales, como el fósforo, nitrógeno, potasio, calcio, magnesio y algunos micronutrientes; así como niveles tóxicos de otros como manganeso, hierro o aluminio (figura 2).

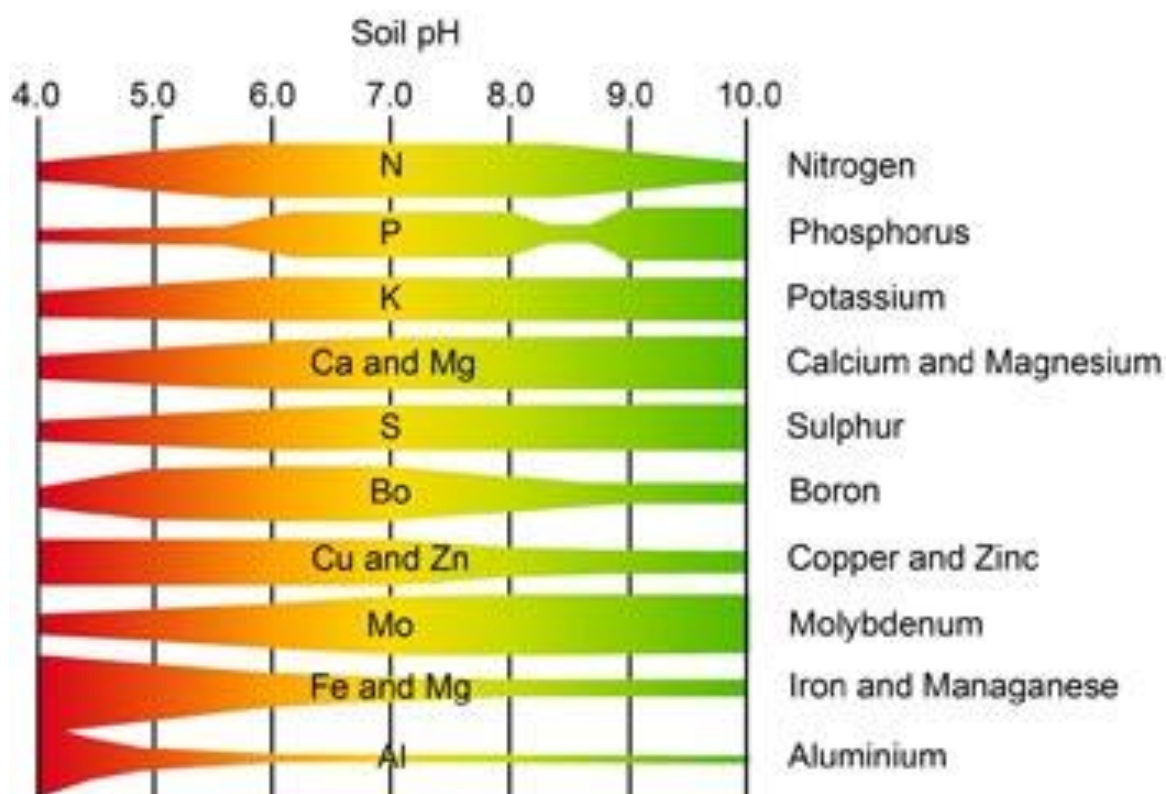


Figura 2: Solubilidad de distintos compuestos según el pH del suelo.

De hecho, la toxicidad por aluminio es uno de los principales factores limitantes en esta clase de suelos, afectando al 14% de los suelos a nivel mundial según la Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (Raman and Gustafson, 2011). La causa principal es la lixiviación resultante de la alta tasa de precipitación, característica de los trópicos húmedos y subhúmedos. De ahí que los países más afectados se encuentran mayoritariamente en zonas de selva (Bot et al., 2000).

El aluminio: su comportamiento y efectos

El aluminio es el metal más abundante en la superficie terrestre, y comprende alrededor de un 7% de su masa. La mayoría del aluminio se encuentra precipitado o formando parte de compuestos no fitotóxicos, como aluminosilicatos. Sin embargo, a pH ácido el aluminio es liberado de los minerales del suelo.

A pH <5 la forma mayoritaria es el catión trivalente (Al^{3+}). A medida que aumenta el pH las formas $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ y $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ se hacen más frecuentes. A pH neutro se forma la fase sólida $\text{Al}(\text{OH})_3$ o gibbsita, mientras que en condiciones alcalinas $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ o aluminato es la forma predominante (Delhaize and Ryan, 1995; Simoes et al. 2012).

Existe otra forma de aluminio, Al_{13} , polinuclear y muy tóxica, que se forma cuando las soluciones de aluminio se neutralizan parcialmente con una base fuerte (Parker and Bertsch, 1992).

El aluminio tiene un comportamiento químico complejo, lo cual hace difícil el estudio de procesos relacionados con él. Así, aunque en general se asume que la forma fitotóxica principal del aluminio es Al^{3+} , casi todas las formas monoméricas se han demostrado tóxicas en un estudio u otro (Kinraide et al., 1991).

Los efectos del aluminio en los procesos metabólicos de la planta son observables a los pocos minutos del comienzo del estrés, seguidos por los efectos secundarios que ocurren en estadios más tardíos (Kochian, 1995).



Figura 3: Efecto del aluminio en el crecimiento de las plantas. A la izquierda se muestran plantas de maíz tolerantes y a la derecha, sensibles.

La toxicidad del aluminio proviene de un amplio espectro de efectos deletéreos (figura 3). Debido a su alta afinidad por donadores de electrones, se cree que el aluminio se une a los grupos carboxil y fosfato en la pared celular, causando cambios estructurales y afectando la expansión de la misma (Ma et al., 2004a). A nivel intracelular, sus dianas incluyen el citoesqueleto (Grabski and Schindler, 1995; Blancaflor et al., 1998), transportadores de iones (Huang et al., 1992; Liu and Luan, 2001), constituyentes de los sistemas de señalización (Haug et al., 1994; Jones and Kochian, 1995), y otros componentes celulares y enzimas (Jones and Kochian, 1997), muchos de los cuales están cargados negativamente o coordinan cofactores cargados positivamente (Kochian, 1995).

El aluminio daña las células del ápice radicular, inhibiendo la elongación de la raíz (figura 4). Consecuentemente se reduce la absorción de agua y nutrientes, lo cual limita el rendimiento agronómico (Ma et al., 2001; Kochian et al., 2004; Delhaize et al., 2012). En estos casos, la mayor parte del aluminio se localiza en la epidermis y el cortex (Jones et al., 2006).

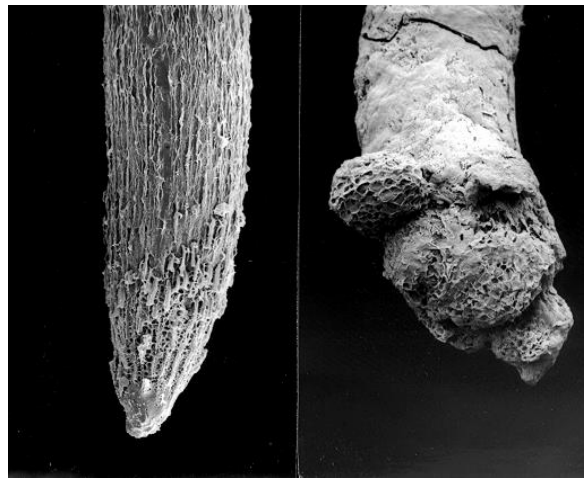


Figura 4: Raíz de trigo en ausencia (izquierda) y presencia (derecha) de aluminio (Delhaize et al., 2004).

Los síntomas de toxicidad por aluminio se asemejan a los de la deficiencia de calcio. Sin embargo, la relación entre los estreses producidos por estos cationes parece ser indirecta (Ryan et al., 1994).

Mecanismos de tolerancia al aluminio

La concentración de aluminio que las plantas son capaces de tolerar difiere entre especies e incluso entre variedades dentro de la misma especie.

El orden de la tolerancia en cereales ha sido representado de la siguiente manera (figura 5):

Centeno (*Secale cereale*) > Avena (*Avena sativa*) > Mijo (*Panicum miliaceum*) > Trigo panadero (*Triticum aestivum*) > Cebada (*Hordeum vulgare*) > Trigo duro (*T. turgidum ssp durum*) (Bona et al. 1993).

El arroz (*Oryza sativa*) también se considera uno de los cultivos más tolerantes (Famoso et al., 2010; Raman and Gustafson, 2011).

Introducción

Las plantas han desarrollado mecanismos que les permiten lidiar con el aluminio. Éstos pueden dividirse de forma general en mecanismos internos y externos.



Centeno > Avena > Mijo > Trigo panadero > Cebada > Trigo duro

Figura 5: Representación gráfica del orden de la tolerancia al aluminio en diferentes especies de cereales.

Los mecanismos de tolerancia internos, también conocidos como mecanismos simplásticos, detoxifican el aluminio una vez que éste entra en la célula (Taylor, 1991; Ma et al., 2001). Esto ocurre principalmente en dos lugares:

- En el citoplasma, donde se forman complejos estables con ácidos orgánicos (como citrato, malato, oxalato), taninos (Tahara et al., 2014) o proteínas (Ma et al., 1997; Ma et al., 1998).
- En orgánulos, principalmente en la vacuola, donde se secuestra (Watanabe et al., 1998).

Otra forma de hacer frente al aluminio internamente consiste en reparar rápidamente los daños causados por él (incluyendo los causados por estrés oxidativo) (Delhaize et al. 2012).

Estos mecanismos son frecuentes en plantas que habitan zonas donde los suelos ácidos son endémicos (áreas tropicales y subtropicales) (Metali et al., 2012). Algunas especies son capaces de acumular el aluminio en sus hojas sin presentar síntomas adversos. Este es el caso del té (*Camelia sinensis*), el trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) y la hortensia (*Hydrangea macrophylla*) (figura 6) (Takeda et al., 1985; Ma and Hiradate, 2000).

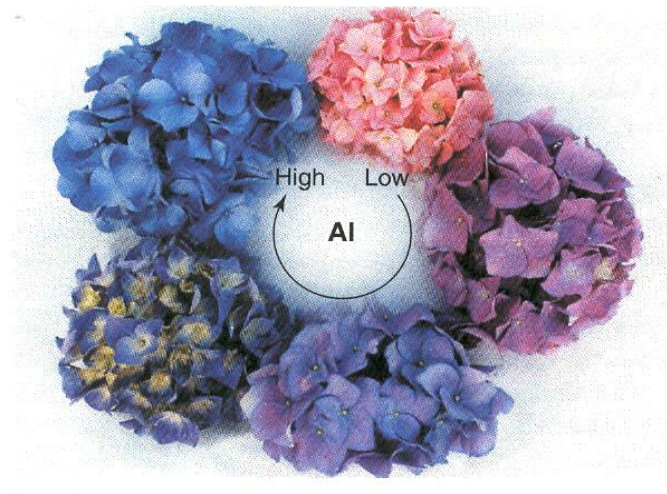


Figura 6: La coloración de los sépalos de las hortensias depende de la concentración de aluminio en éstos (Ma et al., 2001).

Los mecanismos de exclusión o mecanismos apoplásticos limitan el aluminio que penetra en las raíces y minimizan las interacciones dañinas entre el aluminio y los sitios en el apoplasto sensibles a él (como membrana plasmática o pared celular). Se tiene constancia de los siguientes mecanismos de exclusión:

- Secreción de compuestos fenólicos (Ofei-Manu et al., 2001).
- Formación de mucílago (Miyasaka and Hawes, 2001).
- “Barrera de pH” resultado del incremento de pH en la rizosfera (Degenhardt et al., 1998).
- Exportación activa de aluminio desde el citoplasma (Taylor et al., 1991; Xia et al., 2010).
- Exudación de ácidos orgánicos (Delhaize et al., 1993b).

Este último es un mecanismo conservado de tolerancia al aluminio, descrito en muchas especies y con fuertes evidencias genéticas y moleculares. Diversas especies secretan estos ácidos orgánicos a través de transportadores de membrana, formando

Introducción

complejos no tóxicos con el aluminio y protegiendo el ápice radicular. En la mayoría de los casos es el propio aluminio el que activa esta secreción desde la raíz (Raman and Gustafson, 2011; Delhaize et al., 2012).

Exudación de ácidos orgánicos

El malato y el citrato son los aniones orgánicos secretados más comunes, aunque algunas especies exudan oxalato (figura 7). Es el citrato el que muestra mayor avidez de unión al aluminio, requiriéndose mayores concentraciones de malato para igualar su poder como quelante (Delhaize et al., 1993). Irónicamente, las especies o genotipos tolerantes tienden a exudar malato (Silva-Navas et al., 2012).

Se ha descrito la exudación de malato en trigo (Delhaize et al., 1993b; Sasaki et al., 2004), *Arabidopsis* (Hoekenga et al., 2006), colza (*Brassica napus*) (Ligaba et al., 2006) y centeno (Collins et al., 2008). Entre otras, se ha visto secreción de citrato en especies como maíz, soja, sorgo (*Sorghum bicolor*), cebada (Pellet et al., 1995; Yang et al., 2000; Magalhaes et al., 2007; Furukawa et al., 2007; Maron et al. 2010).

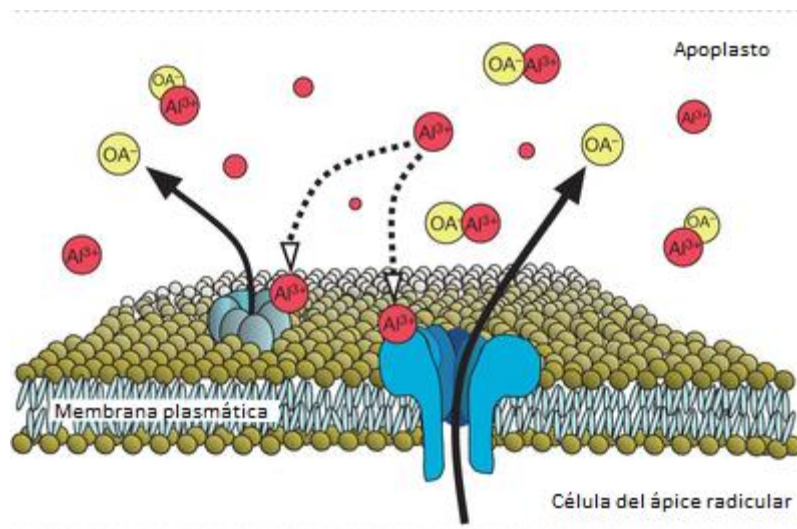


Figura 7: Modelo de secreción de ácidos orgánicos (OA⁻) quelando el aluminio soluble (Al³⁺) (Shroeder et al. 2013).

En algunas especies aparece la coexistencia de mecanismos de tolerancia. Por ejemplo, en arroz, la exudación de citrato (Yokosho et al., 2011) se combina con mecanismos simplásticos (Huang et al., 2009) para detoxificar el aluminio. En otras especies, como el trigo, *Arabidopsis* y centeno, lo que ocurre es una secreción simultánea de malato y citrato (Ryan et al., 2009; Liu et al., 2009; Yokosho et al., 2010). En maíz, en cambio, se exudan citrato (Piñeros et al., 2002) y oxalato (Kidd et al., 2001), aunque en este caso, la correlación entre la secreción de citrato y la tolerancia al aluminio es baja. La participación de múltiples mecanismos de detoxificación del aluminio no parece estar relacionada con una respuesta mejor, y es independiente del nivel de tolerancia (Simoes et al., 2012).

Tolerancia al aluminio en centeno

El centeno es un cereal diploide ($2n=14$) con un genoma relativamente complejo (figura 8). Del 70 al 75% de su genoma se compone de secuencias repetidas. La mayoría de las secuencias de copia única tienen longitudes que oscilan entre los 400 y los 3500 nucleótidos, y se hallan dispersas entre las regiones repetitivas (Smith and Flavell, 1977).

Este cereal posee características fisiológicas y genéticas que lo convierten en una especie interesante. Por ello, ha sido empleada en programas de mejora de trigo (Driscoll and Jensen, 1964; Steward et al., 1968) como fuente de genes de resistencia a estrés abiótico, a varias enfermedades y a insectos.

La hibridación entre el trigo y el centeno ha conducido al desarrollo de una variedad anfiploide de cereal: el triticale (*Triticosecale* Wittmack) (Muntzing, 1936). Esta variedad sirve de puente genético entre el trigo y el centeno, para introducir genes deseables de centeno en el trigo cultivado (Zeller, 1973; May and Appels, 1978; Hu and Roelfs, 1986; Lukaszewski et al., 2001). Esta compatibilidad genética también ha servido para la construcción de líneas de adición y de sustitución trigo-centeno, que constituyen un material valioso para la cartografía genética y la investigación agronómica.



Figura 8: Espiga y semillas de centeno.

El centeno es una de las especies cultivadas más tolerantes al aluminio. Se han descrito cinco loci independientes relacionados con la tolerancia al aluminio. Aniol y Gustafson (1984) localizaron los tres primeros: *Alt1* en el brazo corto del cromosoma 6; *Alt2* en el brazo corto del cromosoma 3; y *Alt3* en el brazo largo del 4; Matos y colaboradores (2005) localizaron *Alt4* en el brazo corto del cromosoma 7; y Silva-Navas y su grupo localizaron Q_{Alt5} también en el brazo corto del cromosoma 7.

Se cree que el locus más influyente en la tolerancia al aluminio es *Alt2* (Aniol, 2004). Por otro lado, algunos trabajos indican que el locus *Alt3* contribuye con el 48% de variación fenotípica (Hede et al., 2001). Sin embargo, sólo a *Alt4* y a Q_{Alt5} se les ha asignado un gen, *ScALMT1* (Fontecha et al., 2007; Collins et al., 2008) y *ScMATE1* (Silva-Navas et al., 2012), respectivamente, dos de los más importantes en relación a la tolerancia al aluminio.

Se han descrito varios marcadores ligados a los loci *Alt*: isoenzimas (Gallego and Benito, 1997), SCARs (Gallego et al., 1998a), RAPDs (Gallego et al., 1997), AFLPs y RFLPs (Miftahudin et al., 2002; Miftahudin et al., 2005).

Genes de tolerancia al aluminio

Se han identificado genes asociados a la tolerancia al aluminio gracias a múltiples estudios genéticos y moleculares. Estos genes incluyen transportadores de membrana de las familias ALMT, MATE, ABC y NRAMP en diferentes especies, así como factores

de transcripción y elementos-*cis* implicados en la expresión de estos genes de tolerancia.

Familia ALMT (Aluminum-activated Malate Transporters)

Las proteínas ALMT forman una pequeña familia exclusiva de plantas. Constan de cinco a siete dominios transmembrana en la región N terminal de la proteína y una larga cola C terminal. Se han caracterizado muchos ALMT en diferentes especies, sin embargo, sólo una pequeña parte de ellos confieren tolerancia al aluminio mediante secreción de malato desde el ápice radicular. Entre ellos se encuentran los *ALMT* de:

- Trigo: *TaALMT1* (Sasaki et al., 2004),
- *Arabidopsis*: *AtALMT1* (Hoekenga et al., 2006),
- Colza: *BnALMT1* y *BnALMT2* (Ligaba et al., 2006),
- Centeno: *ScALMT1* (Fontecha et al., 2007; Collins et al., 2008).

TaALMT1 fue el primer gen de tolerancia al aluminio descrito. Se localiza en el cromosoma 4DL y co-segrega con un importante QTL de tolerancia al aluminio (*Alt_{BH}*) (Riede and Anderson, 1996, Sasaki et al., 2004). Codifica una proteína que se sitúa en la membrana plasmática (Yamaguchi et al., 2005) y que transporta malato desde el ápice radicular. A pesar de que la expresión del gen es constitutiva, el transporte es inducido por aluminio (Delhaize et al., 1993b).

En centeno es *ScALMT1* el que controla la secreción de malato. Ortólogo del gen de trigo, se localiza en el cromosoma 7R (Fontecha et al., 2007). Los genotipos sensibles y tolerantes difieren en el número de copias del gen, su nivel de expresión y su secuencia codificante. Por ejemplo, el genotipo tolerante M39A1-6 posee un cluster con cinco copias, de las cuales se expresan dos. Mientras tanto, el genotipo sensible M77A-1 tiene dos copias, de las cuales solamente una se expresa. Así mismo, parece que el tipo de splicing sufrido por el mRNA también afecta a la tolerancia (Collins et al., 2008).

Los miembros de la familia ALMT no relacionados con la tolerancia al aluminio codifican también para canales de aniones. No obstante, éstos varían en especificidad de sustrato y localización, y desempeñan diferentes funciones. En maíz se han descrito dos genes, *ZmALMT1* (Piñeros et al., 2008) y *ZmALMT2* (Ligaba et al., 2012).

Introducción

En cebada, *HvALMT1* (Gruber et al., 2010) codifica un canal de aniones que facilita el transporte de aniones orgánicos encargados de la expansión de las células guarda y la función de los estomas.

Familia MATE (Multidrug and Toxic compound Extrusion)

Las proteínas MATE constituyen una amplia familia presente tanto en procariotas como en eucariotas. Son transportadores que utilizan gradientes electroquímicos de iones, como el sodio o protones, para exportar compuestos tan dispares como metabolitos secundarios o xenobióticos. La familia se nombró debido a los miembros que confieren resistencia a antibióticos en bacterias, expulsando el compuesto de las células.

Un subgrupo de esta familia en plantas transporta citrato con dos funciones diferentes, nutrición de hierro y conferir tolerancia al aluminio. En *Arabidopsis*, *FRD3* (Ferric reductase defective 3) fue el primer gen descrito relacionado con la translocación de hierro desde las raíces a los tallos mediante la exudación de citrato en el xilema (Rogers and Guerinot, 2002; Green and Rogers, 2004). Se han descrito MATEs relacionados con la tolerancia al aluminio en las siguientes especies:

- Sorgo, *SbMATE*: Se corresponde con el locus *Alt_{SB}* situado en el cromosoma 3. La expresión se induce con la exposición al aluminio y es más abundante en el ápice de la raíz. *SbMATE* media la exudación de citrato activada por aluminio desde el ápice radicular (Magalhaes et al., 2004; Magalhaes et al., 2007).
- Cebada, *HvAACT1*: Se sitúa en el cromosoma 4H y co-localiza con un QTL que explica el 50% de la variación fenotípica (*Alp*). *HvAACT1* media la secreción de citrato de manera constitutiva, aunque el transporte es activado por el aluminio (Furukawa et al., 2007).
- Trigo, *TaMATE1*: Situado en el cromosoma 4BL, en un QTL que explica el 49% de la variación fenotípica. Su expresión es constitutiva, no inducida por aluminio, en algunos cultivares brasileños y portugueses (Ryan et al., 2009; Tovkach et al., 2012; Garcia-Oliveira et al., 2014).
- Arroz, *OsFRDL4*: Co-localiza con un QTL en el cromosoma 1. El aluminio induce su expresión. *OsFRDL4* es responsable de la exudación de citrato activada por aluminio desde el ápice radicular (Yokosho et al., 2011).

- Centeno, *ScFRDL2*: Se induce en presencia de aluminio tanto en el ápice como en raíz basal. La secreción de citrato se corresponde con el patrón de expresión (Yokosho et al., 2010).

- Maíz:

a) *ZmMATE1*: Situado en el cromosoma 6, co-localiza con un importante QTL de tolerancia al aluminio. Codifica una proteína transmembrana muy similar a *SbMATE*. Su sobreexpresión en *Arabidopsis* produce una mayor exudación de citrato y una mayor tolerancia al aluminio (Maron et al., 2010).

b) *ZmMATE2*: Se sitúa en el cromosoma 5, y también co-localiza con un importante QTL de tolerancia al aluminio. Su expresión es muy similar en genotipos sensibles y tolerantes, y no se induce por aluminio. Parece que no existe una asociación entre este gen y la exudación de citrato (Maron et al., 2010).

- Judía caupí (*Vigna umbellata*), *VuMATE*: Tanto la expresión del gen como la secreción de citrato desde el ápice de la raíz, son inducidos por el aluminio (Yang et al., 2011).

- Judía común (*Phaseolus vulgaris*): Su expresión se induce por aluminio (Eticha et al., 2010).

- *Arabidopsis*, *AtMATE*: Se expresa principalmente en raíz e inducido por aluminio (Liu et al., 2009).

Las proteínas ALMT y MATE se localizan en la membrana plasmática, y tanto si su expresión es constitutiva como si es inducida, los genotipos tolerantes muestran siempre mayor expresión que los sensibles.

Familia de transportadores ABC (ATP-binding cassette)

Son transportadores de una amplia variedad de compuestos, como lípidos, hormonas, metales, ácidos inorgánicos, conjugados de glutatión, péptidos, metabolitos secundarios y xenobióticos (Verrier et al., 2008). Típicamente, estos transportadores poseen los motivos Walker A, Q loop, ABC signature, y Walker B y H.

Introducción

Se han descrito transportadores ABC relacionados con la tolerancia al aluminio en *Arabidopsis* y arroz.

- *Arabidopsis*:

a) *ALS3*: Codifica un transportador ABC de tipo medio (half-type). Se expresa en muchos tejidos, pero principalmente en hidatodos de hoja, floema y cortex de la raíz, tras el tratamiento con aluminio. *ALS3* se localiza en membrana plasmática (Larsen et al. 2005).

b) *ALS1*: Codifica el dominio transmembrana. Se expresa en el ápice de la raíz, hidatodos y tejidos vasculares. Su expresión es constitutiva, no inducida por aluminio. *ALS1* está presente en la membrana de la vacuola (Larsen et al., 2007).

A pesar de que el silenciamiento de cualquiera de los dos genes produce hipersensibilidad al aluminio, su sobreexpresión en *Arabidopsis* no aumenta la tolerancia. Se ha sugerido que ambos participan en la redistribución del aluminio, desde los tejidos más sensibles a los menos sensibles.

c) *STAR1* (sensitive to aluminum rhizotoxicity gene 1). Codifica el dominio de unión a ATP. Aunque su expresión no se induce por aluminio, su silenciamiento produce hipersensibilidad a este catión, por lo que su contribución a la tolerancia no está clara. Se localiza en la membrana plasmática (Huang et al., 2010).

- Arroz:

a) *STAR1*: Codifica el dominio de unión a nucleótidos que interactúa con el dominio transmembrana codificado por *STAR2* (Huang et al., 2009).

b) *STAR2*: Es homólogo de *AtALS3*. Codifica el dominio transmembrana de un transportador ABC de tipo bacteriano. Participa en el transporte de UDP-glucosa (Huang et al., 2009).

Ambos se expresan en la raíz inducidos por aluminio y su silenciamiento produce hipersensibilidad a este catión. *STAR1* y *STAR2* se localizan en

membranas de vesículas en el citoplasma. Se cree que participan en modificaciones de la pared celular que reducen la acumulación de aluminio y por tanto los efectos tóxicos de éste.

c) *OsALS1*: Codifica un transportador ABC de medio tamaño (half-size) miembro del subgrupo de transportadores asociados con procesamiento de antígenos (TAP). Su expresión se induce en presencia de aluminio. Debido a que su silenciamiento produce mayor acumulación de aluminio en el núcleo y en el citosol, y a su localización en la membrana de las vacuolas de células de la raíz, se piensa que participa en la redistribución intracelular del aluminio, secuestrándolo en la vacuola (detoxificación interna) (Huang et al., 2012).

Familia Nramp (natural resistance-associated macrophage protein)

Las proteínas Nramp están evolutivamente conservadas y están presentes en bacterias, algas, plantas y animales. Se tiene constancia de que transportan un amplio rango de compuestos incluyendo Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} y Pb^{2+} . Juegan un papel importante en la homeostasis de iones metálicos; especialmente en la captación y reciclaje de hierro en mamíferos, y en la captación de manganeso en levaduras y bacterias.

En cuanto a plantas, en *Arabidopsis* se han descrito varios *Nramp* que codifican transportadores de iones metálicos divalentes. En arroz, existen siete miembros de esta familia, pero uno de ellos (*Nrat1*), tiene una baja similitud con el resto, con una identidad del 36 al 59% a nivel de aminoácidos.

Nrat1 (Nramp aluminum transporter1) (Xia et al., 2010) codifica una proteína transportadora de aluminio, pero no de otros cationes divalentes ni complejos de aluminio. Entre los siete miembros Nramp de arroz, es el único que muestra este tipo de transporte. Esta diferencia de sustratos de transporte puede explicarse dada la baja similitud entre *Nrat1* y las otras proteínas Nramp.

La expresión de *Nrat1* se induce por aluminio y es específica de la raíz cercana al ápice (excepto la epidermis). El silenciamiento del gen produce sensibilidad al aluminio, mayor acumulación de éste en la pared celular, y menor acumulación dentro de las células de la raíz.

Nrat1 se localiza en la membrana celular de las células radiculares y se piensa que controla la absorción intracelular de aluminio, tras lo cual éste se secuestraría en la vacuola mediante detoxificación interna (Xia et al., 2010; Xia et al., 2011).

Reguladores de la expresión de genes de tolerancia al aluminio

Factores de transcripción

En *Arabidopsis* se describió *STOP1* (Sensitive To Proton rhizotoxicity 1) (Iuchi et al., 2007). Se trata de un gen que codifica un factor de transcripción dedo de zinc de tipo Cys₂-His₂. Éste, se localiza en el núcleo y participa tanto en la tolerancia al aluminio como en la respuesta a pH ácido, a pesar de que se sabe que los genes inducidos por aluminio difieren de los inducidos por toxicidad de protones. La expresión del gen no se induce por aluminio, por lo que se postula una activación post-traducciona de la proteína mediante una o varias fosforilaciones. *STOP1* co-regula múltiples genes que posiblemente están implicados en la tolerancia al aluminio, como *AtALS3*, *AtALMT1* y *AtMATE* entre otros (Sawaki et al., 2009). Sin embargo, también se conocen al menos dos genes de tolerancia, *ALS1* y *AtSTAR1*, independientes de *STOP1*.

Hace unos meses, se caracterizó el gen *TaSTOP1* en trigo (García-Oliveira et al., 2013). En esta especie parecen existir tres homeólogos de éste, uno por cada genoma (A, B y D). Parece haber un predominio de *TaSTOP1-A* seguido de *TaSTOP1-D* y *TaSTOP1-B* en la raíz, y de *TaSTOP1-A* en las hojas. A diferencia de *Arabidopsis*, el aluminio y el pH ácido sí parecen modular levemente su expresión.

En arroz se caracterizó un homólogo de *AtSTOP1*, llamado *ART1* (Al Resistance Transcription factor 1) (Yamaji et al., 2009). Se trata de otro un factor de transcripción dedo de zinc de tipo Cys₂-His₂. Su expresión tampoco es inducida por el aluminio y se expresa de manera constitutiva en las raíces. Regula la expresión de al menos 31 genes de los 48 loci asociados con la tolerancia al aluminio en arroz, implicados tanto en la detoxificación interna como en la externa. Entre ellos se encuentran *STAR1*, *STAR2*, *Nrat1*, *OsFRDL4* y *OsALS1*.

Recientemente, se ha descubierto un regulador negativo del gen *ALMT1*, el factor de transcripción, *WRKY46* (Ding et al., 2013). Éste, contiene un dominio *WRKY*, se expresa en la médula de la raíz y su expresión se inhibe por aluminio. *WRKY46* se une

directamente al promotor de *ALMT1* a través de “W-boxes” y es capaz de inhibir su expresión.

Secuencias reguladoras que actúan en cis

Este tipo de secuencias se han descrito en varias especies y se encuentran dentro de intrones, así como en regiones promotoras.

Se sabe que en sorgo la región codificante del *SbMATE* es idéntica entre los genotipos tolerantes y sensibles. Existen polimorfismos en el segundo intrón, así como un transposón de tipo MITE (tourist-like Miniature Inverted repeat Transposable Element) en la región promotora. Suele haber de 1 a 5 elementos, y el número de repeticiones se correlaciona positivamente con la tolerancia al aluminio (Magalhaes et al., 2007).

En trigo, la región codificante del *ALMT* también está conservada entre genotipos sensibles y tolerantes. Aguas abajo, hay 8 SNPs y un transposón de 160 pb, pero ninguno de ellos está correlacionado con la tolerancia al aluminio. Aguas arriba, han sido descritos ocho alelos diferentes hasta la fecha. Éstos, incluyen SNPs y repeticiones en tándem de varios tamaños. Entre ellos, los bloques de secuencias repetidas duplicados o triplicados tienen aumentada la expresión, exudan más malato y muestran mayor tolerancia al aluminio (Sasaki et al., 2006).

En el caso de *TaMATE*, la secreción constitutiva de citrato en varias líneas brasileñas está asociada con la inserción de un elemento Sukkula-like de 11,1kb a 25pb del codón de inicio de la transcripción (Tovkach et al., 2013).

En *Brachypodium distachyon* y *B. hybridum* se ha encontrado que todos los ecotipos tolerantes presentan una inserción en la región promotora del gen *BdALMT1* a unos 1789 pb del triplete ATG (Contreras et al. 2014).

En arroz se ha encontrado un elemento *cis* al que se une el factor de transcripción ART1. Su secuencia es la siguiente: GGN(T/g/a/C)V(C/A/g)S(C/G). Se encuentra presente en la región promotora de 29 de los 31 genes regulados por ART1, incluyendo *STAR1*, *STAR2* (posee dos copias), *Nrat1* (posee tres copias) y *OsFRDL4* (Tsutsui et al., 2011).

Se ha visto que a 4,6Kb aguas arriba de la región codificante del gen *AACT1* de cebada, hay una inserción de 1023pb. Ésta, añade múltiples sitios de inicio de la

transcripción, aumentando la expresión en el ápice de las raíces, lo que produce una mayor secreción de citrato inducida por aluminio y mejora la tolerancia al aluminio (Fujii et al., 2012). Además, la inserción también altera la localización de la expresión. En su ausencia, la expresión se limita a los haces vasculares, donde la secreción de citrato en el xilema participaría en el transporte de hierro a larga distancia. En presencia de la inserción, la expresión se extiende a los ápices radiculares, donde la exudación de citrato confiere tolerancia al aluminio.

Microarrays y aluminio

Los “microarrays” son una herramienta muy poderosa, ya que permiten el análisis de miles de genes al mismo tiempo. Anteriormente, este tipo de análisis se realizaba por medio de otras herramientas, como por ejemplo, generando librerías de cDNA y comparando la del tratamiento y la del control (Milla et al., 2002).

Los primeros “microarrays” que estudiaban los cambios de expresión en respuesta a estrés se hicieron en arroz, *Arabidopsis* y cebada (Kawasaki et al., 2001; Seki et al., 2002; Ozturk et al., 2002). Dado que el aluminio afecta a muchos procesos biológicos, pronto se vio el potencial de este tipo de estudios con capacidad de evaluación de cambios en la expresión génica a nivel global. Los primeros estudios de cambios en los niveles de expresión en respuesta al aluminio se realizaron en “Near-Isogenic Lines” de trigo, en maíz y *Arabidopsis* (Guo et al., 2007; Cançado et al. 2008; Maron et al., 2008; Kumari et al., 2008). Guo y colaboradores identificaron 28 genes expresados diferencialmente en dos líneas isogénicas de trigo con distinta tolerancia al aluminio, entre los que se encontraban transportadores de malato, una β -glucosidasa, lectinas y una histidina kinasa. El grupo de Maron observó que la expresión de genes que participan en procesos como la remodelación de la pared celular, la respuesta a estrés oxidativo y la deficiencia de fosfato están regulados diferencialmente en genotipos de maíz con diferente tolerancia al aluminio. Kumari y sus colaboradores constataron que el aluminio induce la expresión numerosos genes que codifican proteínas ribosomales, peptidasas y fosfatasas.

Posteriormente también se han realizado este tipo de análisis en respuesta al aluminio en especies como judía común, álamo temblón (*Populus tremula*), soja (Eticha et al., 2010; Grisel et al., 2010; You et al., 2011). Eticha y colaboradores asociaron la

inducción de genes *MATE* al tratamiento con aluminio en judía común. El grupo de Grisel vio que los homólogos de los genes *ALS3* y *MATE* podrían ser importantes en la respuesta al aluminio del álamo temblón. You y sus colaboradores detectaron homólogos de los genes *STOP1* y *MATE* en su estudio.

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis era encontrar genes de tolerancia al aluminio. Para ello, se emplearon aproximaciones que pudieran cubrir las fuentes más probables de genes candidatos, y se abordaron mediante los siguientes objetivos:

1. Seleccionar genes candidatos para los loci de tolerancia al aluminio situados en los cromosomas 3R (*Alt2*) y 6R (*Alt1*) en centeno, comparando el perfil transcriptómico global en raíces de centeno (cv. Imperial), de trigo hexaploide (cv. Chinese Spring) y de las líneas de adición trigo-centeno (3R y 6R) en ausencia y presencia de aluminio.
2. Encontrar algún factor de transcripción que participe en la respuesta al aluminio, mediante el cribado en un medio de cultivo con aluminio de una colección de líneas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan cada una un factor de transcripción cuya expresión está regulada por un promotor inducible por estradiol.
3. Caracterización en centeno de genes de las familias ALMT, MATE, ABC y NRAMP, previamente descritos en otras especies como relacionados con la tolerancia al aluminio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

- Centeno: Se utilizaron los cultivares tolerantes al aluminio Imperial, Ailés, Petkus y 390; el cultivar sensible al aluminio 389 y la línea consanguínea también sensible al aluminio Riodeva.
- Trigo hexaploide: Se empleó el cultivar Chinese Spring.
- Titalca (cv. Chinese Spring – cv. Imperial).
- Líneas de adición de trigo-centeno (compuestas de un fondo genético de trigo cv. Chinese Spring con un par cromosómico de centeno cv. Imperial): Se usaron las líneas 1R, 2R, 3R, 4R, 5R, 6R y 7R.
- Líneas ditelosómicas de trigo-centeno (compuestas de un fondo genético de trigo cv. Chinese Spring con un par de brazos cromosómicos de centeno cv. Imperial): Se trabajó con las líneas 1RS, 1RL, 2RL y 3RS.
- *Arabidopsis thaliana*: Se utilizaron dos tipos de líneas:
 - Transplanta: Pertenecen al proyecto con el mismo nombre (http://bioinfogp.cnb.csic.es/transplanta_dev/). Se trata de una colección de líneas transgénicas de *Arabidopsis*, cada una de las cuales sobreexpresa un factor de transcripción bajo el control de un promotor inducible por estradiol. Se estudiaron 208 de estas líneas (Anexo 6).
 - Líneas de inserción de T-DNA: Son líneas de *Arabidopsis* que tienen la expresión de un gen alterada debido a la inserción de un T-DNA. Proceden de diferentes colecciones (SALK, SAIL, GABI-Kat). En este trabajo se utilizaron 13 líneas (tabla 1), obtenidas del Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) (Columbus, Ohio, USA) y del Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC, UK).

Tabla 1: Listado de líneas de inserción usadas en este trabajo. Se indica el nombre que se les ha dado, el gen de la inserción, la referencia en la base de datos (ATG), el nombre de la línea, la colección de la que proceden, lugar de la inserción y el apartado de la tesis en que se han utilizado, así como el “Probe ID” de los presentes en el “microarray”.

Nombre	Gen	ATG	Línea	Colección	Inserción	Tema	Probe IDs
bHLH51	basic helix-loop-helix 51	AT2G40200	SALK_084837.46.00.x	SALK	Exón	Microarray	TC312133
CDT1	Cadmium tolerant 1	AT1G52827	GK-426C01-018095	GABI-Kat	Exón	Microarray	TC333223, TA88472_4565 (x2), TA81806_4565, TA74515_4565
MDR4	Multidrug Resistance Protein 1 homolog	AT2G47000	SALK_088311.54.25.x	SALK	Exón	Microarray	AB055077
HIN1	Harpin Induced Gene 1 homolog	AT2G35980	GK-246F07-014441	GABI-Kat	Exón	Microarray	TA68555_4565
LEA		AT2G35460	SALK_106063.21.85.n	SALK	Exón	Microarray	
Aqua	Aquaporin	AT1G73190	GK-395G01-018298	GABI-Kat	Exón	Microarray	TA67357_4565
ABA	ABA-responsive Protein	AT5G13200	GK-783H10-025723	GABI-Kat	Exón	Microarray	TA54290_4565, TA54169_4565 (x2)
C14	Related to Apetala 2.3	AT3G16770	SALK_030459.49.55.x	SALK	Promotor	Cribado	-
RAP2.3			GK_734E09	GABI-Kat	Exón	Cribado	-
JVC41	Transmembrane Domain Ring H2	AT5G66160	SAIL_1160_D03	SAIL	Promotor	Cribado	-
JVC51D	Dehydration-Responsive Element Binding Protein 2	AT5G05410	SALK_016495.38.50.x	SALK	Promotor	Cribado	-
JVC51A			SALK_084889	SALK	3'UTR	Cribado	-
ALMT1 KO	ALuminum-activated Malate Transporter	At1g08430	SALK_009629	SALK	Exón	Microarray	-

Estas líneas se compararon con la cepa silvestre de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, Columbia (Col).

Métodos

Obtención de líneas homocigotas para las inserciones de T-DNA

Tabla 2: Parejas de cebadores de las regiones flanqueantes al T-DNA en el extremo derecho (RP) e izquierdo (LP) de cada línea. Las tres últimas filas muestran los cebadores específicos del T-DNA de cada colección (SALK, SAIL y GABI-Kat).

Nombre	Secuencia 5'-3'	Colección
bHLH51-LP	CAAATCTAAACCAAAATGCGG	SALK
bHLH51-RP	ACGACTCAAGCAAGTGGTCTG	SALK
CDT1-LP	TTGTTGGTAAAATGTCGAGCC	GABI-Kat
CDT1-RP	TTTGCACGTTTTTCTTGAACC	GABI-Kat
MDR4-LP	TGAACAAGATTGGTTCTTGGC	SALK
MDR4-RP	CTTGTTGGCAATTAGCTTTTCG	SALK
HIN1-LP	GGATGGAAGCTTACTCGCAAAG	GABI-Kat
HIN1-RP	CTCCCAAAGGCTACTACCGAC	GABI-Kat
LEA-LP	GCTCCGAAGGGTATTATCGTC	SALK
LEA-RP	CGTGCCAATCTACATCTCTCC	SALK
Aqua-LP	CAAGACTCCACTGCTGGAAAG	GABI-Kat
Aqua-RP	GTTAAGGCTCACAACAAACGG	GABI-Kat
ABA-LP	TCCAACCTTAATCCCAAAGG	GABI-Kat
ABA-RP	CAGATGATGCGTAGCCTTCTC	GABI-Kat
C14-LP	ATTCTGGTTCAACGAGCACTG	SALK
C14-RP	GTACATACCTTGGTTGGTGGG	SALK
RAP2.3-LP	TGCAATCAAAAATAATTAATGGC	GABI-Kat
RAP2.3-RP	CCTAATTATACTCCTCCGCCG	GABI-Kat
JVC41-LP	TTGCTTCATCATTATAGCCC	SAIL
JVC41-RP	GCTTCTATTCTCTGTAAAGACGTGG	SAIL
JVC51D-LP	ATAAACTGCCATCTCCTTCCC	SALK
JVC51D-RP	TCACCTCTGCTCGAAGCTAAG	SALK
JVC51A-LP	TATGTATGGTCCTTTGGCTCG	SALK
JVC51A-RP	CTGACTCTTGGCTGGTCTTTG	SALK
ALMT1-LP	GAAATTATTTGGGGAAGCTGC	SALK
ALMT1-RP	TCTTTACCCATGGGAAAACC	SALK
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	SALK
LB2	GCTTCCTATTATATCTTCCCAAATTACCAATACA	SAIL
LB	ATATTGACCATCATACTCATTGC	GABI-Kat

Materiales y Métodos

Todas las líneas de inserción de T-DNA se germinaron en placas de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50% con antibiótico. En el caso de las líneas SALK, en presencia de kanamicina a una concentración de 0,15 mg por litro; en el de las líneas GABI-Kat, sulfadiazina a 1µg por litro; y en el de la línea SAIL con BASTA a 25 ng por litro.

Las plántulas se transplantaron a sustrato universal y vermiculita (proporción 3:1), y cuando alcanzaron aproximadamente 3 cm de diámetro, se extrajo DNA de una hoja y se chequeó mediante PCR que fueran homocigotas para las inserciones de T-DNA, con dos mezclas de reacción para cada línea, una utilizando dos cebadores específicos de la región flanqueante al T-DNA y otra con un cebador específico del extremo derecho (RP) y un cebador del T-DNA (tabla 2).

Tratamientos pre-germinación

Todas las semillas de *Arabidopsis* se esterilizaron durante diez minutos en lejía comercial diluída al 50% en agua miliQ y se aclararon al menos cinco veces con agua estéril. Posteriormente, se dejaron tres días en agua a 4°C en oscuridad.

Las semillas de centeno, trigo, triticale, líneas de adición y líneas ditelosómicas se esterilizaron en lejía comercial diluida al 10% en agua miliQ durante 10 minutos y se aclararon con agua estéril al menos siete veces. Después, se pusieron sobre papel de filtro mojado en una placa Petri envuelta en papel de aluminio, que se tuvo 24 horas a 4°C y otras 24 horas a temperatura ambiente.

Condiciones de crecimiento

- *Arabidopsis*:

Las 208 líneas Transplanta utilizadas para el cribado se sembraron en placas cuadradas con el medio descrito por Ezaki y colaboradores (2004), compuesto por medio MS, en el que las sales y las vitaminas B₅ estaban diluidas un sexto, sacarosa a una concentración de 10 g por litro como fuente de carbono, Plant agar al 1,5% como agente gelificante y 200 µM de AlCl₃. Además, se añadió estradiol a 10 µM como inductor de la expresión de los factores de transcripción. En cada placa se sembraban

unas ocho semillas del mutante y cuatro de Col, y se ponía en vertical en la cámara de cultivo. Las plántulas crecían diez días a una temperatura de aproximadamente 15°C y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Las 109 líneas que mostraban diferencias con Col en el medio de Ezaki fueron sembradas en el medio descrito por el grupo del Dr. Ryan (2007). Este medio consistía en KNO₃ a 1,67 mM, CaCl₂ a 0,66 mM, MgSO₄ a 0,66 mM, KH₂PO₄ a 0,067 mM, H₃BO₄ a 7,6 mM, MnCl₂ a 1,8 mM, ZnSO₄ a 0,23 mM, CuCl₂ a 0,2 mM, FeCl₃ a 16,67 mM, Plant agar al 1% y 300 µM de AlCl₃. Se tamponó a pH 4,8-4,9 con de ácido succínico a 5 mM. También se añadieron 10 µM de estradiol como inductor de la expresión de los factores de transcripción. Los mutantes se volvieron a sembrar junto con Col y las placas cuadradas se pusieron en vertical en la cámara de cultivo. Las plántulas crecían ocho días a una temperatura de 15°C y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Las líneas de inserción de T-DNA empleadas para el cribado y el análisis de los genes del “microarray”, se sembraron en el medio de Ryan, a 0, 400, 500 y 600 µM de AlCl₃. En este caso no se añadió estradiol y las semillas se sembraron en placas de Petri. Cada placa contenía unas doce semillas del mutante y otras doce de Col, y se pusieron inclinadas 45° en la cámara de cultivo. Las plántulas crecían ocho días a una temperatura de aproximadamente 15°C y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. La línea llamada RAP2.3 con una inserción de T-DNA en el gen del mismo nombre, se sembró además en el medio de Ryan, sin aluminio, a diferentes pHs (6'5, 6, 5'5, 5 y 4'5).

- Cereales:

Las semillas de centeno, trigo, triticale, líneas de adición y líneas ditelosómicas germinadas, se trasladaron a cultivo hidropónico sobre flotadores con una malla de polietileno, bajo luz incandescente cíclica a 12 W/m² con un fotoperiodo de 16h de luz y 8h de oscuridad en condiciones de aireación permanentes. La cámara de cultivo se mantuvo a 25°C. Las plántulas fueron cultivadas cinco días en el medio de Aniol, 1981 con las modificaciones de Gallego y Benito, 1997. La solución nutritiva se componía de CaCl₂ 0,4 mM, KNO₃ 0,65 mM, MgCl₂·6H₂O 0,25 mM, (NH₄)₂SO₄ 0,01 mM y NH₄NO₃ 0,04 mM a pH = 4,0 ±0,1. Esta solución fue sustituida diariamente. Después de cuatro

Materiales y Métodos

días de crecimiento, las plántulas fueron expuestas a la misma solución nutritiva más 200 μM de AlCl_3 durante 24 horas.

Análisis fenotípico de la tolerancia al aluminio

Las plantas crecidas en el medio de Ezaki, durante diez días, en posición vertical, se clasificaron visualmente en comparación a Col en cinco categorías a las que se les asignó el siguiente código numérico atendiendo a la longitud de la raíz principal: Más largo (+2), Ligeramente más largo (+1), Sin diferencias (0), Ligeramente más corto (-1), y Más corto (-2). Los experimentos se repitieron tres veces y el tamaño muestral era de unas 16 plántulas de cada mutante.

Se utilizó el programa Image J para medir el crecimiento de la raíz principal de las plántulas crecidas en el medio de Ryan, tras ocho días creciendo en placas Petri inclinadas 45° , tanto a diferentes concentraciones de aluminio como a diferentes pHs. Se repitieron los experimentos dos veces y cada mutante contó con un tamaño muestral de 24 plántulas por tratamiento.

Los resultados obtenidos mediante Image J fueron analizados con el programa SPSS. Se compararon las medias de longitud de la raíz principal y las de proporción de crecimiento de la raíz a diferentes concentraciones de aluminio con respecto a su ausencia, de cada una de las líneas con la de Col. Para ello se utilizó el test estadístico t de Student. La comparación entre las medias de longitud de la raíz principal y las proporciones de crecimiento a diferentes pHs con respecto a pH 6,5 entre las líneas RAP 2.3 y Col también se realizó de la misma manera.

Análisis molecular

- Extracción de DNA genómico

Se obtuvo DNA genómico a partir de *Arabidopsis* y centeno. La homogenización del tejido se realizó en un homogeneizador "TissueLyser II" (Qiagen) con las cuentas de acero "Stainless Steel Beads" de 5 mm (Qiagen) en el caso de centeno y con bolitas de vidrio (Izasa) en el de *Arabidopsis*. La extracción se llevó a cabo con el kit "DNeasy Plant Mini Kit" (Qiagen) en ambos casos, siguiendo las instrucciones del fabricante. La

calidad y concentración del DNA total se cuantificó mediante NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

- Amplificación por PCR

La amplificación de secuencias por PCR se ha realizado con tres fines, principalmente. En primer lugar, secuenciar los genes elegidos como candidatos del análisis del “microarray”. Para ello, se alinearon las secuencias de nucleótidos de las sondas de trigo del “microarray” con secuencias homólogas de cebada, *Brachypodium*, maíz y arroz, y se diseñaron cebadores en las regiones más conservadas de los seis candidatos (tabla 3).

Tabla 3: Parejas de cebadores para amplificar los genes candidatos del “microarray”. Para cada uno se muestra el cebador directo (Fw) y el reverso (Rv).

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tm (°C)
ScCadmium-106-array-Fw	GGAGAAGGGCTGCATCTACG	57,7
ScCadmium-106-array-Rv	TTAGTTGCAGCAGCAGCAGA	57,2
ScHarpin-221-array-Fw	CTCTACTACGACCGCGTCGA	58,2
ScHarpin-221-array-Rv	CGGAGCTTGCGTTGAGCTT	60,8
ScABA-216-array-Fw	TCTACCTCACCAACCTGAACGT	57,8
ScABA-216-array-Rv	TGACGAAGCCCATGAACCAGAA	58,8
ScMulti-218-array-Fw	GGGTGCACAAGGTTATGCTCAA	58
ScMulti-218-array-Rv	CAAGCCCTCCAACGATTCCACT	59,6
ScAqua-235-array-Fw	GTCAACCCGGCCATCACCTT	60,3
ScAqua-235-array-Rv	TCGCGTAGTAGGCGTACATGAG	58,3
ScbHLH-116-array-Fw	ATGGACAAGGCCACCTTGTTAG	57,3
ScbHLH-116-array-Rv	TCGTTAGCCTCCGGAGGGAT	60,1

En segundo lugar, verificar que las líneas de *Arabidopsis* eran homocigotas para las inserciones de T-DNA, para lo cual se emplearon los cebadores ya descritos en la tabla 2.

Materiales y Métodos

Y en tercer lugar, para la caracterización de los genes de las familias ALMT, MATE, ABC y NRAMP. En el caso de la familia ALMT, los cebadores se diseñaron a partir de secuencias de arroz descritas por Delhaize y sus colaboradores (2007). Para las otras tres familias, los cebadores se diseñaron basándose en secuencias homólogas de *Brachypodium* y/o arroz (tabla 4).

Tabla 4: Parejas de cebadores para amplificar los genes de las familias ALMT, MATE, ABC y NRAMP. Para cada uno se muestra el cebador directo (Fw) y el reverso (Rv).

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tm (°C)
ScALMT2-1F	ATGGAGGTTGATCACCGCATCAG	66,16
ScALMT2-1R	TTATCTGCTCGGAATGTTGATAGC	60,4
ScALMT2_loc-1F	TACTCTGGTGTCCGTCCTCTACTA	57,97
ScALMT2_loc-1R	GCCACCAGCGTCGCGAAGGCTCTA	74,46
ScALMT3-1U	ATGGAGATGGCCCCGGCGACGAG	76,1
ScALMT3-1R	TCAGGTCTTCGCGTCCGCTGATC	70,57
ScALMT4-1F	CTGAGATCTTAGATGCCACAAA	52,4
ScALMT4-1R	TACTTTCAAGTGCACGCATCCT	56,9
ScALMT4_loc-1F	ACCAAGCTGCAGAGTTATTGCG	67,4
ScALMT4_loc-1R	GACAACCCTGGAGGTTTTTAGT	62
ScALMT5-1F	AGGTTTCAATAGGGGATTAGGA	52,9
ScALMT5-1R	TGACAGCAGCACCAAGAGCAAT	59,6
ScALMT6-1F	GCACACTATGCAAGCTGGGAGC	61
ScALMT6-1R	GTGCTTCAGAGAACTCAAGGCT	57,1
ScMATE2-1F	TACTTGGTGGGGTACTTGGTC	57,35
ScMATE2-1R	TGCCAACCCAGATCTGCAAGC	63,2
ScMATE2_loc-1F	GCCATACTCCTATGTAGACTAA	54,3
ScMATE2_loc-1R	GAATGCAGCCATTTGAGTTGA	65
ScSTAR1-1F	GTGGCCCTGGCCCCGCACCCTCG	79,38
ScSTAR1-1R	TCAGCTGCTGAGCTCCAGGAAG	65,18
ScSTAR2-1F	ATCGGCTTCGTGCTCCACTTC	69,8
ScSTAR2-1R	CGCCCATGATGAGCCCCGTCA	78,4
ScNRAMP1-1F	ATCATAGCAGCGTTCATGTTCA	64,4
ScNRAMP1-1R	GAGCTTGATCTCCCCAGAACATT	66,5

En cuanto a las condiciones generales de la reacción, la mezcla de reacción se realizó en un volumen de 20 µl, con 30 ng/µl de gDNA o cDNA, 1x de tampón de reacción (Tris-HCl 100 mM pH 8.3, KCl 100 mM, MgCl₂ 2 mM), 100 µM de cada dNTP, 10 pmoles de cada cebador, y 2,5 U de *Taq* polimerasa (Biotools). Las reacciones se

llevaron a cabo en dos termocicladores: PTC-100 (MJ Research) y G-Storm I (Gene Technologies Ltd). El programa de amplificación fue:

94°C 4min
94°C 1min }
En función de los cebadores 1min } 35 ciclos
72°C 2min }
72°C 7min

Los resultados se analizaron en geles de agarosa al 1% en TAE (40 mM Tris-acetato, 1mM EDTA), teñido con Sybr green. El tamaño de los productos de amplificación se calculó mediante comparación con los marcadores de peso molecular “1 Kbp Ladder” y “100 bp Ladder” (Biotools).

- Clonaje y secuenciación

Los productos de PCR que presentaban un tamaño parecido al esperado, fueron recuperados del gel de agarosa mediante extracción física y posteriormente purificados con “FavorPrep GEL/PCR Purification Mini Kit” (Favorgen Biotech). Dichos fragmentos de DNA fueron enviados a secuenciar directamente o clonados en un plásmido vector mediante “TOPO TA Cloning kit” (Invitogen) según las especificaciones del fabricante.

En el caso de las secuencias clonadas, las colonias de bacterias que contenían el inserto de DNA eran fácilmente identificables por el color blanco que producían en el medio de cultivo LBA (LB + Ampicilina) con 40 µL de X-gal 20 mg/mL. Para asegurarnos de que las colonias blancas contuvieran el inserto adecuado, se realizó una PCR con las condiciones, variables y cebadores M13 incluidos en el kit de clonación. Las colonias seleccionadas fueron cultivadas en medio LBA líquido durante 18 horas a 37°C en agitación constante a 200 rpm. Los plásmidos fueron recuperados de los cultivos mediante purificación con “High Pure Plasmid Isolation Kit” (Roche).

Materiales y Métodos

La secuenciación directa de los productos de PCR o de los obtenidos mediante clonación fueron realizadas por la empresa Secugen S.L. en un secuenciador automático ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems).

- Extracción de RNA

- Arabidopsis:

Se utilizó el kit “EZNA Plant RNA Kit” (Omega Bio-tek), siguiendo las recomendaciones del fabricante, para extraer RNA de raíz de las líneas JVC51A, JVC51D y Col, crecidas ocho días en presencia (300 μ M) y ausencia de aluminio. Se hicieron tres réplicas de cada línea, con unas doce plantas cada una. El material vegetal se recogió en tubos Eppendorf de 1,5 ml y se congeló en nitrógeno líquido. La homogenización del tejido se realizó en un homogeneizador “TissueLyser II” (Qiagen) con bolitas de vidrio (Izasa). Para eliminar la contaminación con DNA, las muestras se sometieron a un tratamiento con DNAsa libre de RNAsa (Invitrogen), al final de la extracción. La concentración de RNA total se cuantificó mediante NanoDrop ND-1000 (Termo Scientific).

- Cereales:

Se extrajo RNA de raíces de trigo, de las líneas de adición trigo-centeno 3R y 6R, y de los cultivares de centeno Imperial, Ailés, Riodeva, 389 y 390. Se hicieron tres réplicas de cada genotipo y tratamiento. Cada réplica se componía de nueve ápices de raíz, de un cm de largo. Las muestras se recogieron en tubos Eppendorf de 2 ml y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. La homogenización del tejido se realizó en un homogeneizador “TissueLyser II” (Qiagen) con las cuentas de acero “Stainless Steel Beads” de 5 mm (Qiagen). Para la extracción se utilizó el reactivo Trizol (Invitrogen) seguido de una extracción con el kit “EZNA Plant RNA Kit” (Omega Bio-tek). Finalmente, se realizó un tratamiento con DNAsa libre de RNAsa (Invitrogen), para eliminar cualquier rastro de DNA genómico. Se usó NanoDrop ND-1000 (Termo Scientific) para medir la concentración de RNA total.

- *Transcripción inversa*

Se sintetizó cDNA a partir de RNA de *Arabidopsis* y centeno. La retrotranscripción se realizó con el kit “GoScript Reverse Transcription System” (Promega) a partir de 1 µg de RNA total, cebador oligo dT y con el siguiente programa: 25°C durante 5 min, 42°C durante 60 min y 70°C durante 5 min, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

- *Análisis transcripcional*

- A nivel genómico:

Con la intención de encontrar nuevos genes candidatos para los loci de tolerancia situados en los cromosomas 3R (*alt2*) y 6R (*alt1*) en centeno, se realizó un análisis de la expresión génica utilizando el “microarray” de trigo de dos colores de Agilent 4x44K (Design ID 022297).

Se empleó el RNA extraído de raíces de plántulas de trigo, de las líneas de adición 3R y 6R, y del cultivar de centeno Imperial, crecidas en el medio de Aniol, 1981 con las modificaciones de Gallego y Benito, 1997, durante 5 días, en ausencia o presencia de 200 µM de AlCl₃ durante 24 horas. Se utilizaron tres réplicas biológicas de cada genotipo y tratamiento.

La amplificación del cDNA a partir de 7,5 µg de RNA total, marcado con los fluoróforos Cy3 y Cy5, hibridación, cuantificación y análisis fue realizado por la Unidad de Genómica del CNB (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid).

El “microarray” contenía unas 43.800 sondas representativas de genes de trigo. Para el análisis de los resultados se estableció un filtro de fiabilidad consistente en un False Discovery Rate (FDR) inferior al 0,05 mediante un paquete bioconductor llamado RankProd, el cual permite detectar genes expresados diferencialmente bajo dos condiciones experimentales distintas (Hong et al., 2006). FDR, a su vez, es un método estadístico utilizado para corregir comparaciones múltiples, controlando la proporción esperada de hipótesis nulas rechazadas incorrectamente. Inicialmente establecimos umbrales “≥5.0

fold-change” para los genes inducidos y “ ≤ -5.0 fold-change” para los genes reprimidos. El “fold change” es una medida de las diferencias de expresión en logaritmo con base dos. Por lo tanto, un “fold-change” ≥ 5 es equivalente a una diferencia de expresión $\geq 2^5$, o sea, ≥ 32 . La anotación de los genes, el análisis de su ontología, la predicción de dominios proteicos, función y localización subcelular se realizó mediante herramientas bioinformáticas (ver sección “Análisis *in silico*”).

- A nivel génico:

La cuantificación de los diferentes transcritos se hizo mediante qRT-PCR o PCR semi-cuantitativa, en función de cada caso.

Tabla 5: Cebadores usados para la cuantificación de transcritos. Para cada uno se muestra el cebador directo (Fw) y el reverso (Rv).

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tm (°C)
ScCadmium-new-69-array-Fw	AGAAGGGCTGCATCTACGCA	64,29
ScCadmium-new-69-array-Rv	GCACTCACAGGTCTCGTAGCA	64,61
ScHarpin-new-90-array-Fw	CCTTCTTCCAGGGCCACCA	64,36
ScHarpin-new-90-array-Rv	AGGTTGGACTGGGTAACATCCC	64,25
ScABA-new-91-array-Fw	ATCATGATCCCGCTGGCCA	64,6
ScABA-new-91-array-Rv	TCGACGGTGACGATGTGGA	63,68
ScMulti-new-111-array-Fw	TCAAGTTGCAACTGATGCTGTC	62,15
ScMulti-new-111-array-Rv	TCCCTGTTTCCTTAAAGCTTCAC	61,27
ScAqua-new-148-array-Fw	CTCTTCTACTGGGTCGCGCA	64,55
ScAqua-new-148-array-Rv	AACGTCATCACCGCCTCCA	64,33
ScbHLH-new-85-array-Fw	GTGGTGAGCCAAGTGAAGGA	62,55
ScbHLH-new-85-array-Rv	TTAGCCTCCGGAGGGATGG	63,27
ScGAPDH-Fw	GTGAGGCTGGTGCTGATTACG	61,56
ScGAPDH-Rv	TGGTGCAGCTAGCATTGAGAC	61,28

- qRT-PCR:

El ensayo de qRT-PCR se llevó a cabo con el kit “iQ Sybr Green Supermix” (Bio-Rad) en el sistema Bio-Rad CFX. Se utilizó cDNA de los genotipos 389 y 390 de centeno, cultivados en ausencia y presencia (200 μ M) de aluminio. Se añadió 1 μ l de muestra a 6,25 ng/ μ l por pocillo. Se hicieron tres réplicas biológicas y tres experimentales. Los

cebadores utilizados para el análisis se diseñaron a partir de fragmentos génicos de centeno secuenciados (tabla 5). Los niveles de expresión relativa fueron normalizados mediante la expresión del gen constitutivo *GAPDH*. Los resultados fueron analizados con el programa BioRad CFX Manager.

- PCR semi-cuantitativa:

- *Arabidopsis*:

Se usaron 10 μ l de cDNA a 15 ng/ μ l de las líneas JVC51A, JVC51D y Col, crecidas en presencia (300 μ M) y ausencia de aluminio. Se utilizó la polimerasa de DNA "Jumpstart Redtaq" (Sigma-Aldrich) siguiendo las recomendaciones del fabricante y cada reacción de PCR tuvo un volumen final de 50 μ l. El programa de amplificación fue: 94°C durante 2 min; cuarenta ciclos de 94°C durante 30 s, 55°C 30 s y 72°C 1min; y un paso final de 72°C durante 5 min. Se cogieron 10 μ l de cada muestra cada 5 ciclos a partir del ciclo 20. Los cebadores empleados fueron diseñados en exones, alineando cDNA y gDNA del gen *JVC51* (tabla 6).

- Centeno:

Se utilizaron 3 μ l de cDNA a 170 ng/ μ l del cultivar de centeno Imperial, crecido en presencia (200 μ M) y ausencia de aluminio. Se utilizó la polimerasa de DNA "Jumpstart Redtaq" (Sigma-Aldrich) siguiendo las recomendaciones del fabricante y cada reacción de PCR tuvo un volumen final de 30 μ l. El programa de amplificación fue: 94°C durante 2 min; cuarenta ciclos de 94°C durante 30 s, 60°C 30 s y 72°C 1min; y un paso final de 72°C durante 5 min. Se cogieron 10 μ l de cada muestra en los ciclos 25, 30 y 40. Los cebadores empleados fueron diseñados a partir de fragmentos secuenciados de los genes *MATE2* y *STAR1* en

centeno (tabla 6). Se usó la expresión del gen constitutivo *GAPDH* como referencia.

Tabla 6: Cebadores utilizados en el análisis de expresión de los genes *JVC51*, *MATE2* y *STAR1*. Se muestran el cebador directo (Fw) y el reverso (Rv).

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tm (°C)
JVC51expFW	TGGCAGTTTATGATCAGAGTGG	59,69
JVC51expRV	CTCAGCCACAGTAGTACCGT	60,46
ScMATE2-exp-1R	AACTGTGGCTGGAGATGCAAT	60
ScMATE2-exp-1F	GTGTTACACAGCATGTTGCGG	60
ScSTAR1-exp-1F	GTGGCCCTGGCCCGCACCCCTCG	79,38
ScSTAR1-exp-1R	TCAGCTGCTGAGCTCCAGGAAG	65,18
ScGAPDH-Fw	GTGAGGCTGGTGCTGATTACG	61,56
ScGAPDH-Rv	TGGTGCAGCTAGCATTGAGAC	61,28

Los fragmentos de DNA amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE (40 mM Tris-acetato, 1mM EDTA), teñido con Sybr green. Se tomó como referencia de tamaño los marcadores de peso molecular “1 Kbp Ladder” y “100 bp Ladder” (Biotools).

Análisis in silico

- *Análisis de secuencias*

Las secuencias de DNA obtenidas fueron editadas en primer lugar con el programa Chromas Pro 1.5 (Technelysium Pty, Ltd). Para confirmar la identidad de las secuencias, así como para comparar las secuencias entre sí se utilizó la aplicación Blast del NCBI. Para elaborar árboles filogenéticos a partir de las secuencias obtenidas y de otras ya descritas se utilizó el programa MEGA 4 (Tamura et al., 2007).

- Homólogos de centeno en Arabidopsis

Para buscar los homólogos de los genes candidatos del “microarray” en *Arabidopsis* (tabla 1) se utilizó el algoritmo tBlastn, buscando una secuencia de nucleótidos a partir de las secuencias de fragmentos de proteína deducidas de nucleótidos de las sondas de trigo del “microarray”. Para corroborar los resultados, se hizo un BlastP de los fragmentos de proteína deducidos en *Arabidopsis*. Se dieron por buenos los casos en que la secuencia de nucleótidos y la proteína se correspondían con el mismo gen. Debido a que “Harpin” no tenía un homólogo claro, se escogieron dos líneas de inserción de T-DNA (tabla 1).

- Genes descritos relacionados con el aluminio en el “microarray”

Con el objetivo de encontrar genes asociados al aluminio, previamente descritos, en el “microarray”, en primer lugar se hizo un Blast en el DFCI y el TIGR, se anotó la correspondiente referencia (ID) (tabla 7) y ésta se buscó entre los IDs del “microarray”.

Tabla 7: Nombre y referencia (ID) en las bases de datos del DFCI y el TIGR de los genes descritos previamente en relación al aluminio.

Nombre	ID TIGR	ID DFCI
ALMT1	CA638049	TC397445
ALMT2	TA98382_4565	TC368653
ALMT3	TA98382_4565	TC368653
ALMT4	CD922475	TC447914
ALMT5	TA106914_4565	TC425580
ALMT6	TA43897_4513	TC374131
MATE1	TA97897_4565	TC409236
MATE2	CK194607	TC449127
STAR1	TA89332_4565	TC446517
STAR2	CK162881	-
NRAMP	BE587193	-

- *Resumen de los programas utilizados*

A lo largo de esta tesis se han utilizado los siguientes programas:

- **AmiGO**. Asignar función y localización subcelular a los genes del “microarray” (http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/search.cgi?action=advanced_query&session_id=) (Carbon et al., 2009).
- **Arabidopsis eFP Browser**. Mirar el patrón de expresión de los homólogos de los genes candidatos del “microarray” (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) (Winter et al., 2007).
- **Blast (DFCI)**. Asignar una referencia del TaGI a los genes descritos relacionados con la tolerancia al aluminio (<http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/Blast/index.cgi>) (Gish, 1993).
- **Blast (NCBI)**. Anotar e identificar dominios proteicos de genes del “microarray”, e identificar sus homólogos en *Arabidopsis* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Zhang et al., 2000).
- **Blast (TIGR)**. Asignar una referencia del TIGR a los genes descritos relacionados con la tolerancia al aluminio (http://blast.jcvi.org/euk-blast/plantta_blast.cgi) (Yuan et al., 1998).
- **Clustal Omega**. Alineamiento de secuencias de nucleótidos o proteínas (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Sievers et al. 2011).
- **ChromasPro 1.5**. Editar secuencias de DNA.
- **Conserved Orthologs in Plants (Arabidopsis Single Copy Genes)**. Comprobar que los homólogos de los genes candidatos del “microarray” en *Arabidopsis* son de copia única (http://cgpdb.ucdavis.edu/COS_Arabidopsis/).
- **ENA (EBI)**. Asignar el “Gene Ontology” a los genes del “microarray” (<http://www.ebi.ac.uk/ena/about/about>) (Goujon et al., 2010).
- **ExPASy**. Predecir dominios proteicos de los genes candidatos del “microarray” (<http://www.expasy.org/>) (Artimo et al., 2012).

- **GEO Profiles (NCBI)**. Mirar patrón de expresión de los homólogos de los genes candidatos del “microarray” en *Arabidopsis* bajo distintos estreses (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles>).
- **InterProScan**. Predecir dominios proteicos de los genes candidatos del “microarray” (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) (Zdobnov and Apweiler, 2001).
- **MEGA 4.0**. Construcción de árboles filogenéticos (Tamura et al., 2007).
- **Multiexperiment Viewer**. Representar la expresión de los genes candidatos del “microarray” (Saeed et al., 2003).
- **SOSUI**. Predecir la topología y regiones transmembrana de los productos de los genes candidatos del “microarray” (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>) (Hirokawa et al., 1998).
- **TargetP1.1**. Predecir la localización subcelular de los productos de los genes candidatos del “microarray” (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) (Nielsen et al., 1997).
- **TMHMM**. Predecir la topología y regiones transmembrana de los productos de los genes candidatos del “microarray” (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (Krogh et al., 2001).
- **TMpred**. Predecir la topología y regiones transmembrana de los productos de los genes candidatos del “microarray” (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) (Hofmann and Stoffel, 1993).

RESULTADOS

La finalidad de este trabajo era la identificación y posterior caracterización de genes relacionados con la tolerancia al aluminio en centeno. Se emplearon tres enfoques diferentes para la obtención de genes candidatos:

- Análisis transcriptómico en centeno utilizando un “microarray” de trigo.
- Cribado de una colección de líneas transgénicas mutantes para diferentes factores de transcripción (del Proyecto Transplanta) en medio de cultivo con aluminio.
- Identificación y caracterización en centeno de genes previamente descritos en otras especies como relacionados con la tolerancia al aluminio.

Análisis de la expresión génica en centeno

Hasta la fecha se han descrito cinco loci de tolerancia al aluminio en centeno: *Alt1*, *Alt2*, *Alt3*, en los brazos cortos de los cromosomas 6 y 3, y en el brazo largo del 4, respectivamente (Aniol et al., 1984); *Alt4* en el brazo corto del cromosoma 7 (Matos, 2005); y *Q_{Alt5}*, también en el brazo corto del cromosoma 7 (Silva-Navas et al., 2012). Sin embargo, solamente a *Alt4* y a *Q_{Alt5}* se les ha asignado un gen, *ScALMT1* (Fontecha et al., 2007, Collins et al., 2008) y *ScMATE1* (Silva-Navas et al., 2012), respectivamente.

Con la intención de seleccionar genes candidatos para los loci de tolerancia al aluminio situados en los cromosomas 3R (*Alt2*) y 6R (*Alt1*) en centeno, se realizó un análisis de la expresión génica utilizando el “microarray” de trigo de dos colores de Agilent 4x44K (Design ID 022297), que contiene unas 43.800 sondas representativas de genes de trigo. En un “microarray” de dos colores, los cDNAs de dos tratamientos compiten por las mismas sondas. En este caso, se estudió el perfil transcriptómico global en raíces de centeno (cv. Imperial), de trigo hexaploide (cv. Chinese Spring) y de las líneas de adición trigo-centeno (3R y 6R) en ausencia y presencia de aluminio (plantas tratadas 24h a una concentración de 200 μ M). De esta forma, pudo verse qué sondas hibridaban más o menos, debido al tratamiento con aluminio, con los cDNAs de cada genotipo. Y así, analizar qué genes se inducían o reprimían sólo en 3R o 6R en los distintos genotipos.

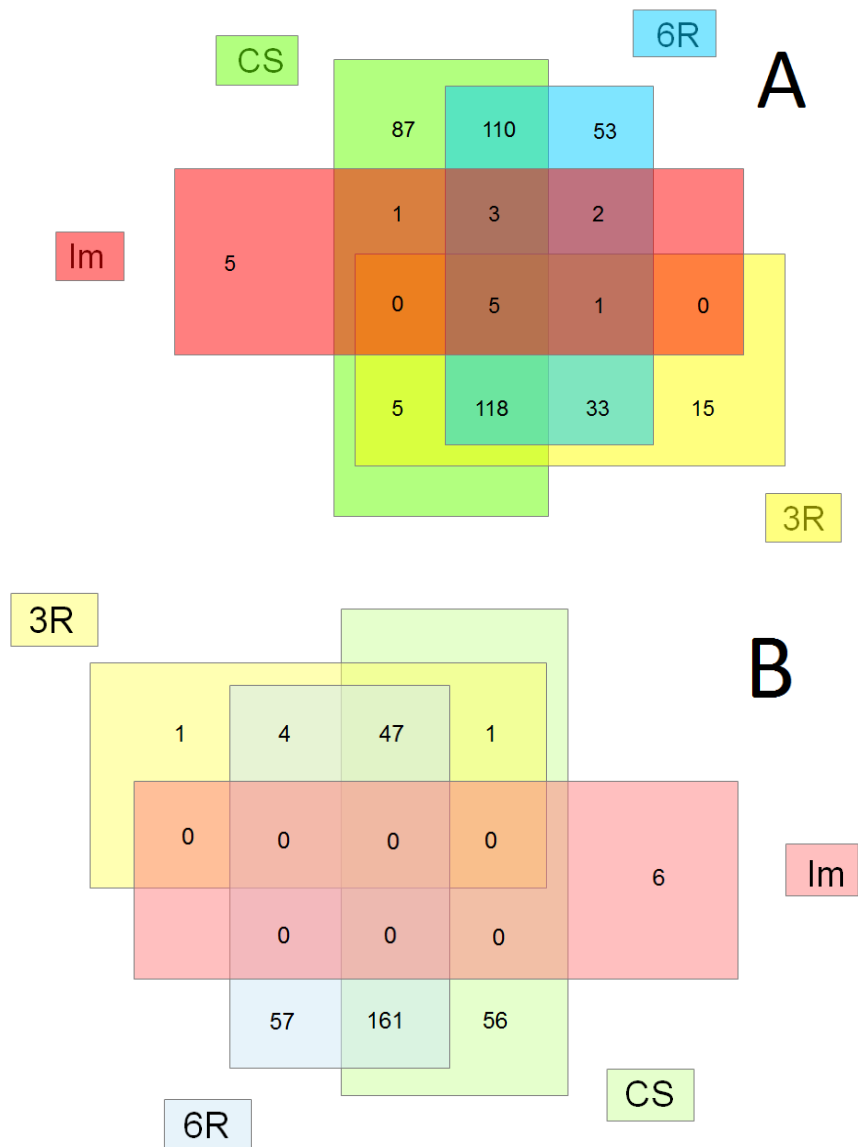


Figura 9: Diagramas de Venn de comparación múltiple de genes inducidos (A) y reprimidos (B) en presencia de aluminio. Cada cuadrado representa los genes expresados con una diferencia de 5 fold respecto al control sin aluminio en un genotipo (Imperial, rojo; 3R, amarillo; 6R, verde; y Chinese Spring, azul). Los solapamientos indican genes en común entre diferentes genotipos.

Se reconocieron como resultados significativos aquellos que presentaban un FDR (RankProd) < 0,05. Inicialmente establecimos umbrales “ ≥ 5.0 fold-change” para los genes inducidos y “ ≤ -5.0 fold-change” para los genes reprimidos. Un “fold-change” ≥ 5 es equivalente a una diferencia de expresión $\geq 2^5$, o sea, ≥ 32 . Con este criterio, en presencia de aluminio se identificaron 17 genes en Imperial, 177 en 3R, 325 en 6R y 329 en Chinese Spring (figura 9 A). Del mismo modo, el número de genes reprimidos fue 6 en Imperial, 53 en 3R, 269 en 6R y 265 en Chinese Spring (figura 9 B).

Estos genes fueron anotados mediante los programas BlastN y BlastX (The Basic Local Alignment Search Tool, del National Center for Biotechnology Information) para buscar secuencias de nucleótidos o protéicas, respectivamente, a partir de las secuencias de nucleótidos de las sondas de trigo del “microarray”. También se apuntó la referencia del gen más parecido de arroz.

Para encontrar candidatos para los loci *Alt2* y *Alt1*, se buscaron genes inducidos o reprimidos de manera común en Imperial y 3R, 6R o ambos. No había ningún gen entre los reprimidos que cumpliera esos requisitos. Tampoco había ninguno inducido en común entre Imperial y 3R. Los dos genes inducidos comunes entre Imperial y 6R resultaron ser: una secuencia de mRNA de trigo de una biblioteca de cDNA no publicada de Ogihara; y un precursor de Wheatwin-2 de trigo, una proteína relacionada con patogénesis. El único gen inducido en común entre Imperial, 3R y 6R, mostró una identidad del 89% con una cobertura de secuencia del 78% con una secuencia similar a glucan endo-1,3-beta-glucosidasa 3 de *Brachypodium distachyon*.

A la vista de que estos genes no se ajustaban al tipo de genes candidatos con funciones relacionadas con la tolerancia al aluminio, se restringió la búsqueda a genes inducidos y reprimidos con un “fold-change” ≥ 10 y ≤ -10 , respectivamente; para así, reducir el número de candidatos (Anexo 1 y 2). De esta manera, los genes inducidos en presencia de aluminio fueron 1 en Imperial, 27 en 3R, 76 en 6R y 59 en Chinese Spring (figura 10 A), mientras que los reprimidos fueron 1 en Imperial, 15 en 3R, 93 en 6R y 77 en Chinese Spring (figura 10 B).

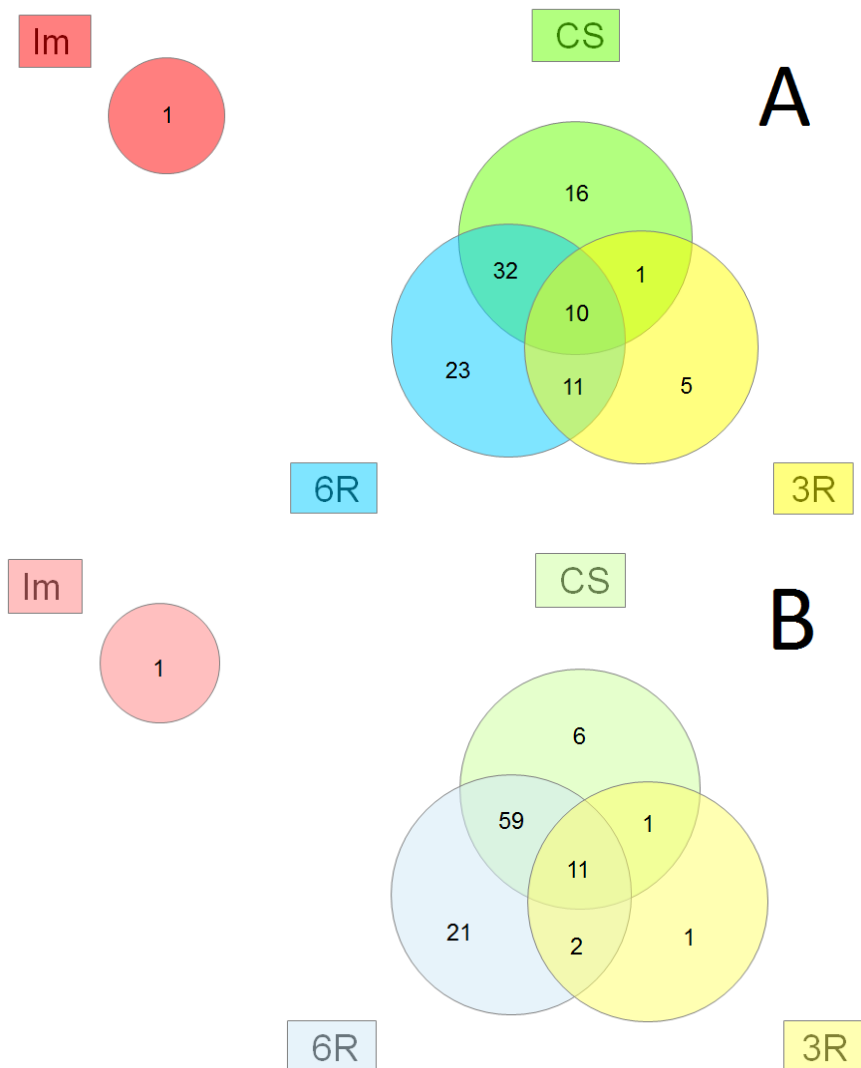


Figura 10: Diagramas de Venn de genes inducidos (A) y reprimidos (B) en presencia de aluminio. Cada círculo representa los genes expresados con una diferencia de 10 fold respecto al control sin aluminio en un genotipo (Im, 3R, 6R y CS). Los solapamientos indican genes en común entre diferentes genotipos.

El gen inducido por aluminio con un “fold-change” >10 en Imperial (figura 10 A) se correspondía con un mRNA de la librería de trigo FGAS con una identidad del 89% con una glicosiltransferasa (gen 1a) de trigo, aunque con una cobertura de solo el

32%. Tenía un fold de 16,23 en Imperial, mientras que en 3R, 6R y Chinese Spring era <3. Sin embargo, no se tuvo en cuenta para subsiguientes análisis porque su FDR (RankProd) > 0,05. El gen reprimido en Imperial (figura 10 B) con un fold de -19,44 y un fold >1 en 3R, 6R y Chinese Spring, mostró una identidad del 87% y una cobertura de secuencia del 85% con una secuencia similar a monodehidroascorbato reductasa de *Brachypodium distachyon*. Al igual que en el caso anterior, resultó no ser significativo en estos tres últimos genotipos, por lo que tampoco se tuvo en cuenta.

Habiendo descartado todos los candidatos de Imperial, se decidió cambiar el enfoque y elegir los candidatos que pudieran estar relacionados con la tolerancia al aluminio, basándonos en su función putativa o supuesta localización subcelular. Para ello, se buscó su correspondiente número de Gene Ontology. Sin embargo, sólo a 32 de los 199 genes (16%) con un “fold-change” ≥ 10 y ≤ -10 se les pudo asignar uno, por lo que la función de cada uno de los 199 genes se decidió analizándolos uno a uno (figura 11).

El 43,6% de los genes reprimidos resultaron ser oxidoreductasas (respuesta a estrés oxidativo), de las cuales la mayoría eran peroxidasas (40/44). Las siguientes categorías reprimidas fueron la elasticidad de la pared celular, las β -glucosidasas, las hidrolasas y la inhibición de proteasas (con dominio de unión a lípidos), todas ellas con algún grado de relación con la pared celular. También estaban reprimidos algunos genes de transporte, lipasas y genes de delineación celular, estos últimos relacionados con el desarrollo de células corticales y que participan, seguramente, en algún aspecto del transporte de moléculas desde la vasculatura.

En cuanto a los genes inducidos, la mayoría estaban relacionados con la respuesta a patógenos; algunos, con la respuesta a estrés ambiental; y muchos eran transferasas, principalmente glicosil-transferasas (9/10). Bastantes genes estaban relacionados con la respuesta a estrés oxidativo, entre los cuales las oxidorreductasas eran las más abundantes, seguidas de las glutatión-S-transferasas. También había inducidas proteasas y Fosfo-enol-piruvato carboxikinasas (relacionadas con el ciclo de los ácidos tricarbóxicos), así como inhibidores de proteasas, en concreto, endopeptidasas. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios de tolerancia al aluminio en trigo (Houde et al., 2008).

Resultados

A pesar de que bastantes genes no estaban descritos y su función era desconocida, muchas de las secuencias estaban presentes en otros estudios de expresión en respuesta a aluminio (Houde et al., 2008) y/u otros estreses (Allard et al., 2003; Mochida et al., 2006; Manickavelu et al., 2012), así como en patentes (Abiotic stress responsive polynucleotides and polypeptides, EP1925672 A1) y proyectos (The structure and function of the expressed portion of the wheat genomes - Aluminum-stressed root tip cDNA library) (tabla 8). En algunos casos, la secuencia estaba presente en más de un estudio.

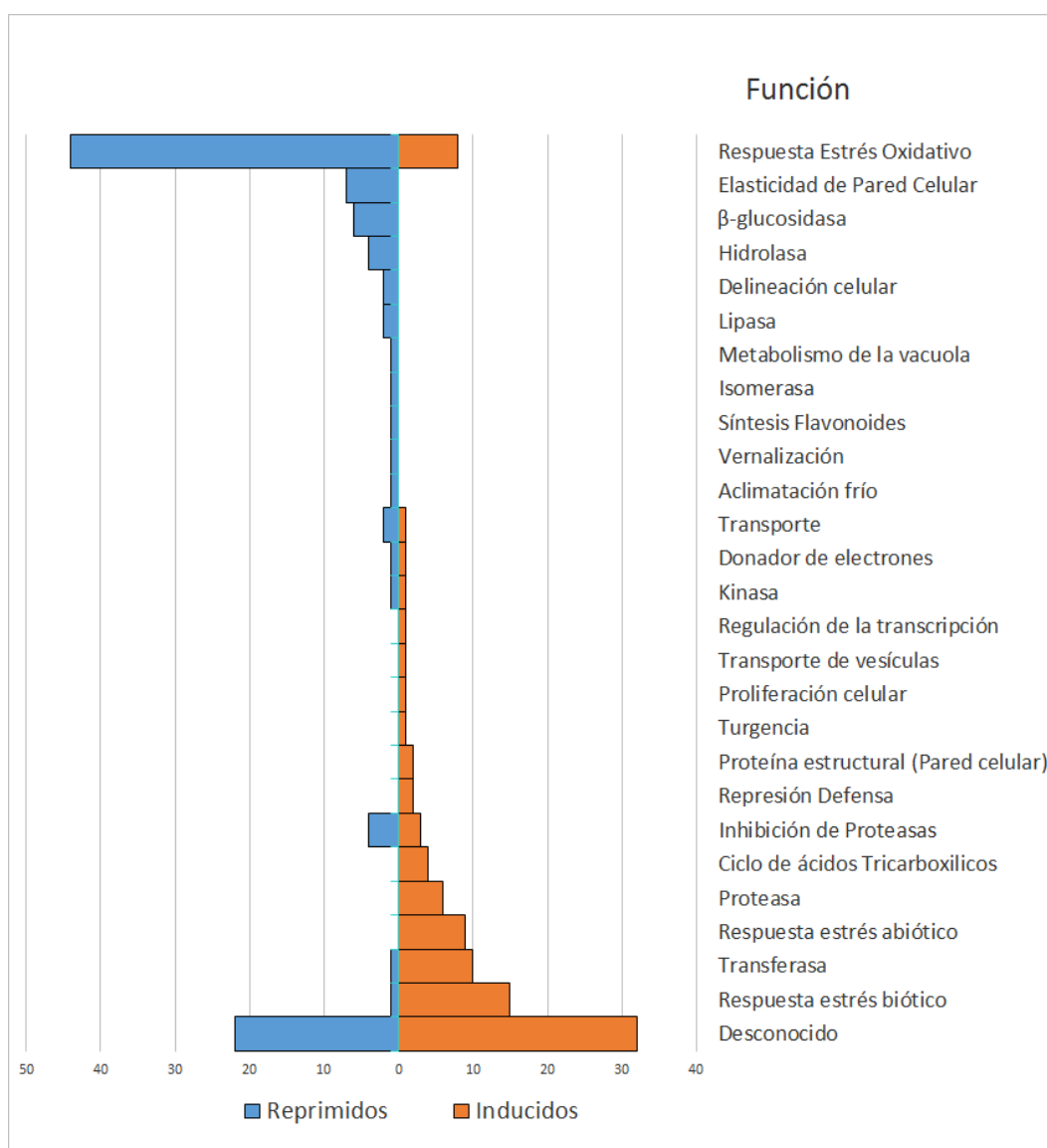


Figura 11: Distribución del número de genes inducidos (naranja) y reprimidos (azul) en las diferentes categorías funcionales. El número total de genes inducidos era 98 y el de reprimidos 101.

Tabla 8: Listado de “Probe IDs” del “microarray” presentes en otros estudios. Se muestran el tipo de estudio y los “Probe IDs” presentes en cada uno de ellos. Nótese que algunos “Probe IDs” están presentes en varios estudios. En algunos casos se señala el tipo de estrés que causó la respuesta.

Tipo de estudio	Estudio	Probe IDs	Respuesta a
Estudio de expresión	Houde and Diallo, 2008	BQ838103	aluminio
	Manickavelu et al. 2012	CA688352, CJ954884	estrés por sal
		CJ808899, CJ834714, CJ849756, CJ852491, TC312133-bHLH-, TC339932, TA84481_4565, TC361150	tratamiento con aluminio
		DR741149	-
	Allard et al. 2003	CK162115, CK162597, CK202278, CK203276, CK206223, CK217341, CV763497, CV772025, DR738342, DR741149, DR741563, TC292601, TC298541, TC342333, TA54169_4565, TA54290_4565, TA57430_4565, TA60129_4565, TA62610_4565, TA59735_4565	boro
Mochida et al. 2006	DR740180, DR741149, TC333195, TA53077_4565, TA53557_4565, TA57429_4565, TA59278_4565, TA98876_4565, TA90276_4565, TA86588_4565, TA84010_4565, TA60129_4565, TA71278_4565	-	
Proyecto	“The structure and function of the expressed portion of the wheat genomes - Aluminum-stressed root tip cDNA library”	TC361150, TA88472_4565, TA88134_4565, TA81806_4565, TA74515_4565, TA72806_4565, TA68760_4565	-
Patente	“Abiotic stress responsive polynucleotides and polypeptides, EP1925672 A1”	TA51171_4565, TA68765_4565	-

Resultados

Se escogieron doce candidatos que pudieran tener alguna relación con la tolerancia al aluminio de entre los genes inducidos >10 “fold-change” y seis de entre los reprimidos <-10 “fold-change”, tratando de que hubiera diferencias entre los niveles de expresión en los tres genotipos (marcados en rosa en el Anexo 1 y 2). Los “Probe IDs” TA54169_4565 (ABA-responsive protein) y TA88472_4565 (Cadmium tolerant) estaban repetidos, pero solo se tuvieron en cuenta una vez para el análisis. Por otro lado, varias secuencias parecían ser el mismo gen, incluso teniendo diferentes “Probe IDs”, con niveles de expresión similares en los distintos genotipos. Se hizo una representación de la expresión de los dieciséis candidatos mediante Multiexperiment Viewer (figura 12).

Todos los candidatos inducidos resultaron estar sobreexpresados en 6R y Chinese Spring con respecto a 3R. Con un “fold-change” dos veces mayor en el caso de Cadmium tolerant (tres de los cuatro “Probe ID” sinónimos), ABA-responsive protein (los dos “Probe ID” sinónimos), Multimultidrug Resistance Protein 1 homolog, el factor de transcripción bHLH51, Harpin Induced Gene 1 homolog; e incluso el triple, en el caso de Aquaporin. En el caso de Multimultidrug Resistance Protein 1 homolog y Harpin Induced Gene 1 homolog solamente en Chinese Spring era el “fold-change” >10 .

Respecto a los candidatos reprimidos, todos tenían un “fold-change” en Chinese Spring y 6R de al menos tres veces el de 3R. En el caso de Cortical Cell-Delineating Protein y Extensin-like Protein, el “fold-change” en 6R era muy superior al de Chinese Spring; en el de Expansin, ocurría lo contrario; mientras que Protease inhibitor tenían un “fold-change” similar en Chinese Spring y 6R.

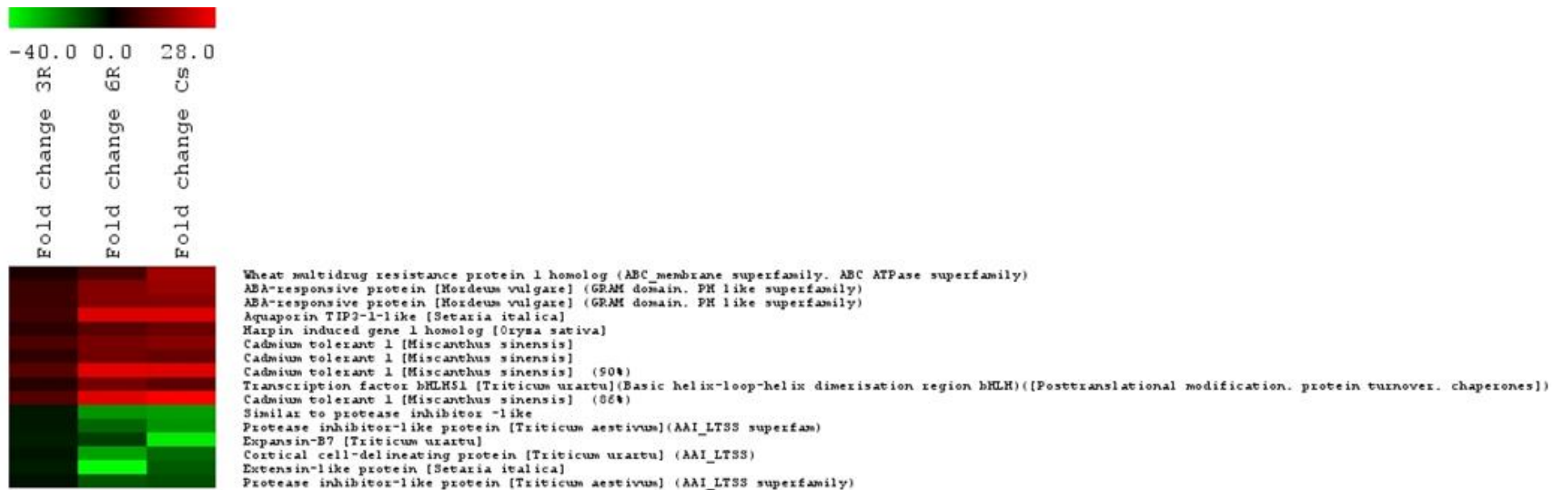


Figura 12: Análisis de los candidatos mediante Multiexperiment viewer 4-7-4. El diagrama muestra el fold-change de los genes reprimidos (verde) e inducidos (rojo) en los genotipos 3R, 6R y Chinese Spring. A la derecha aparece la descripción de los candidatos. Nótese que el fold-change va de -40 a 28. Los valores cercanos a 0 tienden al negro.

Resultados

Se creyó razonable comenzar con los candidatos inducidos un análisis más en profundidad. Los doce “Probe ID” iniciales se agruparon en seis candidatos (tabla 1 - material y métodos-):

- *bHLH51*.
- *CDT1*.
- *MDR4*.
- *Harpin*.
- *Aqua*.
- *ABA*.

El análisis de los seis candidatos se dividió en tres secciones:

- 1) Análisis *in silico* de los dominios, la topología y la localización subcelular de las proteínas deducidas de los seis candidatos.
- 2) Análisis de la expresión de los seis candidatos en un cultivar sensible (389) y uno tolerante (390) de centeno.
- 3) Análisis fenotípico de líneas de inserción de T-DNA en los seis genes candidatos en *Arabidopsis*.

Análisis *in silico* de los dominios, la topología y la localización subcelular

Las secuencias de nucleótidos de las sondas de trigo del “microarray” de los candidatos elegidos (Anexo 3), se tradujeron y alinearon mediante el algoritmo BlastX, consiguiendo los fragmentos de las proteínas correspondientes a los candidatos elegidos (Anexo 4). Estos fragmentos se utilizaron para predecir sus dominios proteicos, topología y localización (tabla 9).

Tabla 9: Predicción de los dominios proteicos, topología y localización subcelular de los seis candidatos del “microarray”. Los programas que se usaron para las predicciones de los dominios proteicos fueron InterProScan, Expasy y el NCBI. Las predicciones sobre la topología y el número de hélices transmembrana se realizaron con los programas SOSUI, TMpred y TMHMM, aunque en ocasiones sus predicciones no coincidían. El programa TargetP1.1 localizaba las proteínas en el cloroplasto, la mitocondria, la vía secretora o ninguno de ellos. Las probabilidades para cada caso se indican mediante flechas y entre paréntesis (alta: ↑, baja: ↓).

Candidato	Dominios	Topología (nº hélices transmembrana)			Localización		
		SOSUI	TMHMM	TMpred	Mitocondria	Cloroplasto	Vía secretora
bHLH51	Basic helix-loop-helix	0 (↑)	0 (↑)	1 (↓)	No	Sí (↑)	No
CDT1	-	0 (↑)	0 (↑)	0 (↑)	No (↑)	No (↑)	No (↑)
MDR4	Transportador ABC con dominio ATPasa	9 (↑)	10 (↑)	11 (↑)	No (↑)	No (↑)	No (↑)
Harpin	Late Embryogenesis Abundant	2 (↑)	1 (↑)	1 (↑)	No	No	Si (↑)
Aqua	Proteína Intrínseca del Tonoplasto (TIP) de la familia Major Intrinsic Protein (MIP)	3 (↑)	5 (↑)	5 (↑)	No (↓)	No (↓)	No (↓)
ABA	Dominio GRAM parte de un plegamiento tipo Pleckstrin Homology (PH)	0 (↑)	0 (↑)	1 (↓)	No (↓)	No (↓)	No (↓)

Análisis de la expresión

Para comprobar si la inducción de los seis genes candidatos en respuesta al aluminio vista en el “microarray” era lo habitual en centeno, se decidió medir su expresión en dos genotipos diferentes a Imperial, uno sensible al aluminio (389) y el otro tolerante (390).

Alineando las secuencias de nucleótidos de las sondas de trigo del “microarray” con secuencias homólogas de cebada, *Brachypodium*, maíz y arroz, se diseñaron cebadores en las regiones más conservadas para amplificar fragmentos de los candidatos elegidos (tabla 3 -material y métodos-). Se secuenciaron esos fragmentos, tanto en 389 como en 390 (Anexo 5) y se diseñaron nuevos cebadores dentro de estas secuencias conocidas de centeno (tabla 5 -material y métodos-).

Se sometió a plantas 389 y 390 al mismo tratamiento dado a las plantas que se utilizaron para el estudio del perfil transcriptómico global (24h a una concentración de 200 μ M de aluminio). Se extrajo el RNA y se sintetizó cDNA.

El cDNA de los cultivares de centeno 389 y 390, tratados con y sin aluminio, se utilizó para realizar qRT-PCRs. Se empleó una pareja de cebadores específicos para cada gen (tabla 5 -material y métodos-). Se midió la expresión de siete genes (los seis candidatos y el conocido gen relacionado con la tolerancia al aluminio *ALMT1*). Los resultados muestran que los seis genes candidatos se inducen en mayor medida en el genotipo sensible (389) que en el tolerante (390), mientras que *ALMT1* se induce más en el genotipo tolerante (figura 13).

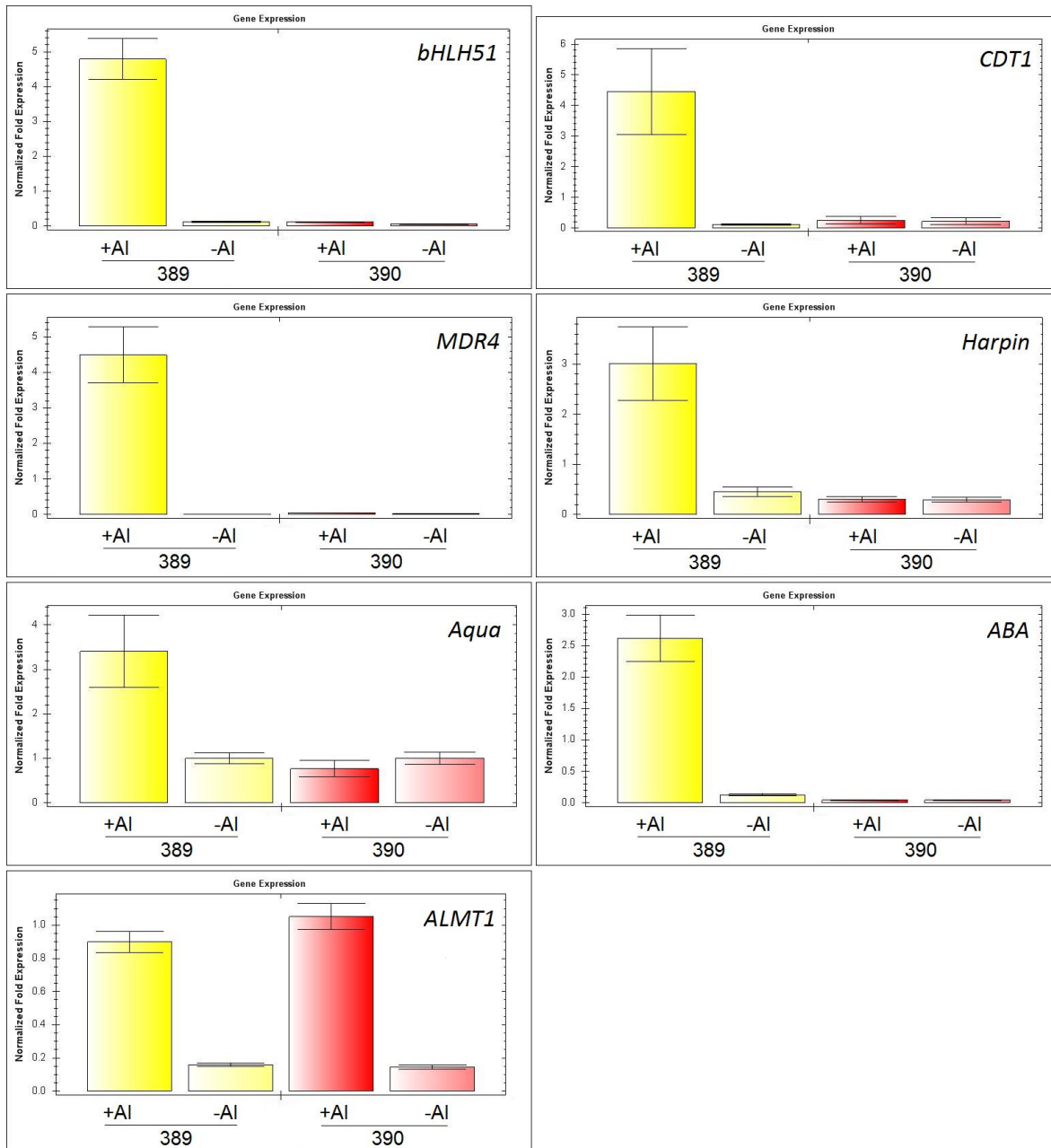


Figura 13: Análisis de la expresión de los genes *bHLH51*, *CDT1*, *MDR4*, *Harpin*, *Aqua*, *ABA*, y *ALMT1*, en presencia de aluminio (200 μ M) (+Al) respecto a su ausencia (-Al). El análisis mediante qRT-PCR se realizó con tres réplicas biológicas y tres experimentales de mRNA de los cultivares de centeno 389 (sensible) y 390 (tolerante), cultivadas cinco días en el medio de Aniol, 1981 con las modificaciones de Gallego y Benito, 1997. En el eje de abscisas se muestran los dos genotipos en presencia y ausencia de aluminio; en el de ordenadas, se indica el valor de cambio o “fold-change” respecto a una réplica del genotipo sensible en ausencia de aluminio. La expresión de los genes se relativizó frente a la expresión del gen *GAPDH* usado como control.

Análisis fenotípico de líneas de inserción de T-DNA

Para comprobar si los seis genes candidatos están relacionados con la tolerancia al aluminio en *Arabidopsis*, en primer lugar, se buscaron los homólogos de los candidatos elegidos en esta especie y se analizaron los patrones de expresión de cada uno de ellos disponibles en el “*Arabidopsis* eFP Browser” (BAR). Se miró la zona de expresión máxima, las condiciones, estreses y hormonas que inducen su expresión, su función y su localización (tabla 10).

Una vez valorada la idoneidad de los seis genes candidatos, se pidieron sus correspondientes líneas de inserción de T-DNA, todas ellas en exones (tabla 1 - material y métodos-). En el caso de *Harpin* no se pudo determinar un único homólogo en *Arabidopsis*; se construyó un árbol filogenético, pero *HIN1* y *LEA* aparecían agrupados juntos frente a homólogos de otras especies (figura 14). Dado que parecían homólogos muy cercanos, se pidieron ambas líneas.

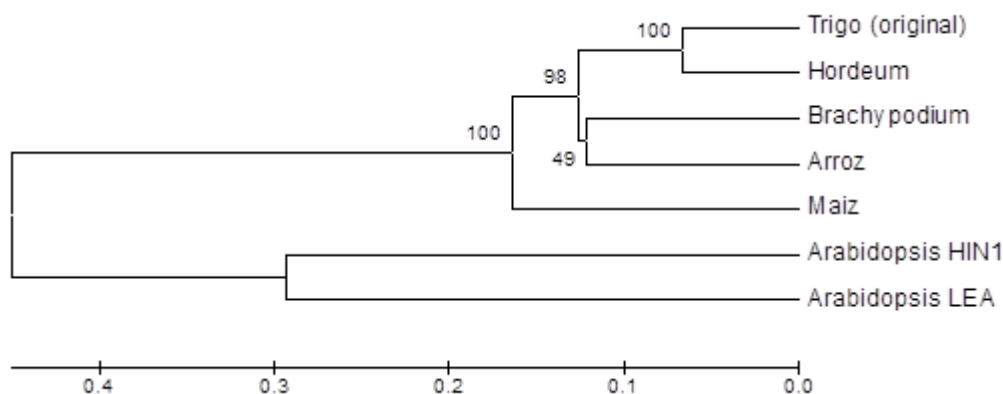


Figura 14: Árbol filogenético de secuencias de nucleótidos de los homólogos de *Harpin* en cebada, *Brachypodium*, arroz, maíz y *Arabidopsis*, donde existen dos homólogos (*HIN1* y *LEA*). La secuencia de trigo es la de la sonda del “microarray”.

Cinco de las líneas (todas excepto MDR4 y ABA) se germinaron en antibiótico y se chequeó mediante PCR que fueran homocigotas para las inserciones de T-DNA. Hubo problemas con CDT1 y Aqua, ya que parecían no tener inserto, por lo que se autofecundaron, y las semillas de la descendencia se volvieron a germinar en antibiótico.

Tabla 10: Zona de expresión máxima, inductores de la expresión, función y localización de los genes candidatos *bHLH51*, *CDT1*, *MDR4*, *Harpin*, *Aqua*, y *ABA*. Los guiones significan ausencia de información. En el caso de *Harpin* se muestran dos homólogos, porque no se pudo determinar cuál de los dos era el más cercano.

Nombre	Gen	Zona expresión máx.	Inducido por			Función	Localización
			Condiciones	Estrés	Hormonas		
<i>bHLH51</i>	basic helix-loop-helix 51	Raíz	Deficiencia Pi, pH bajo.	Heridas, UV, Sal.	ACC, Zeatina, Metil jasmonato, Brasinolida.	Factor de transcripción	Núcleo
<i>CDT1</i>	Cadmium tolerant 1	-	-	-	-	Desconocida	Membrana no plasmática
<i>MDR4</i>	Multidrug Resistance Protein 1 homolog	Raíz	Ph bajo, Deficiencia azufre.	UV, Sal, Frío.	IAA	Transducción señales, Transporte auxinas	Membrana plasmática
<i>HIN1</i>	Harpin Induced Gene 1 homolog	Hoja	Deficiencia Pi, pH bajo.	Sal, Frío.	Zeatina	Transducción señales	Mitocondria
<i>LEA</i>		Hoja	Deficiencia Pi, pH bajo.	Sal, Frío.	Zeatina	Desconocida	Desconocida
<i>Aqua</i>	Aquaporin	Semilla	Deficiencia Pi, Deficiencia azufre.	UV, Sal, Geno-tóxico.	ACC.	Transporte	Membrana no plasmática
<i>ABA</i>	ABA-responsive Protein	Raíz	Deficiencia Pi, pH bajo.	Sal, Frío.	ABA	Respuesta estrés	Citoplasma

Resultados

En primer lugar se comprobó que el medio de Ryan et al. 2007 servía para diferenciar genotipos sensibles al aluminio atendiendo al crecimiento de las raíces. Para ello se comparó la longitud de las raíces de un conocido mutante sensible al aluminio, *almt1* KO (Hoekenga et al., 2006), con la de Columbia a diferentes concentraciones de aluminio (0, 400, 500 y 600 μ M). Tanto la media como el porcentaje de reducción de la longitud de las raíces de *almt1* KO revelaron diferencias muy significativas ($p < 0,001$) respecto a Col en todas las concentraciones de aluminio (figura 15).

Al sembrar las líneas con inserciones de T-DNA en los genes candidatos en el medio de Ryan a diferentes concentraciones de aluminio (0, 400, 500 y 600 μ M), todas mostraron una respuesta muy similar. Debido a que el tamaño de los mutantes era inferior al de Col incluso sin aluminio, las t de Student eran significativas siempre al comparar los mutantes con Col. Sin embargo, al calcular el porcentaje de reducción de la longitud de las raíces comparado con el de Col, ninguna de las cinco líneas mostraba diferencias significativas para ninguna de las concentraciones de aluminio (figura 16). Esto parece indicar que los homólogos de los genes candidatos no participan en la tolerancia al aluminio en *Arabidopsis*.

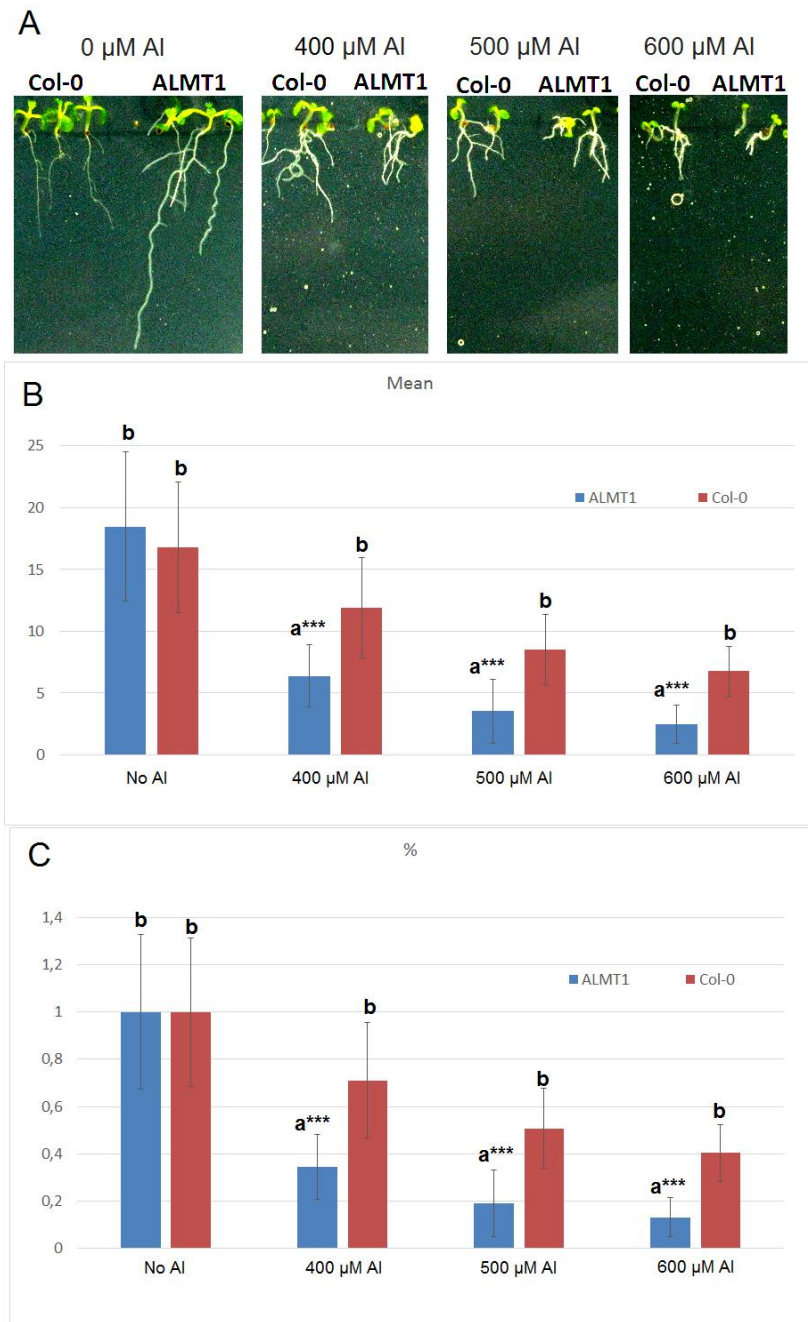


Figura 15: Efecto del aluminio en el crecimiento de la raíz de plantas *almt1* KO y Col. A) Fotografía de las plantas *almt1* KO y Col de 8 días en el medio de Ryan, a diferentes concentraciones de AlCl_3 . B) Representación gráfica de la media de la longitud de las raíces en milímetros \pm SD ($n=18$) de dos réplicas biológicas de las plantas del apartado A: *almt1* KO y Col. C) Gráfica ilustrativa del porcentaje de reducción de la longitud de las raíces \pm SD ($n=18$) de dos réplicas biológicas de las plantas del apartado A: *almt1* KO y Col. Las distintas letras indican diferencias significativas entre *almt1* KO y Col (t de Student; * $\rightarrow p < 0,05$; ** $\rightarrow p < 0,01$; *** $\rightarrow p < 0,001$).

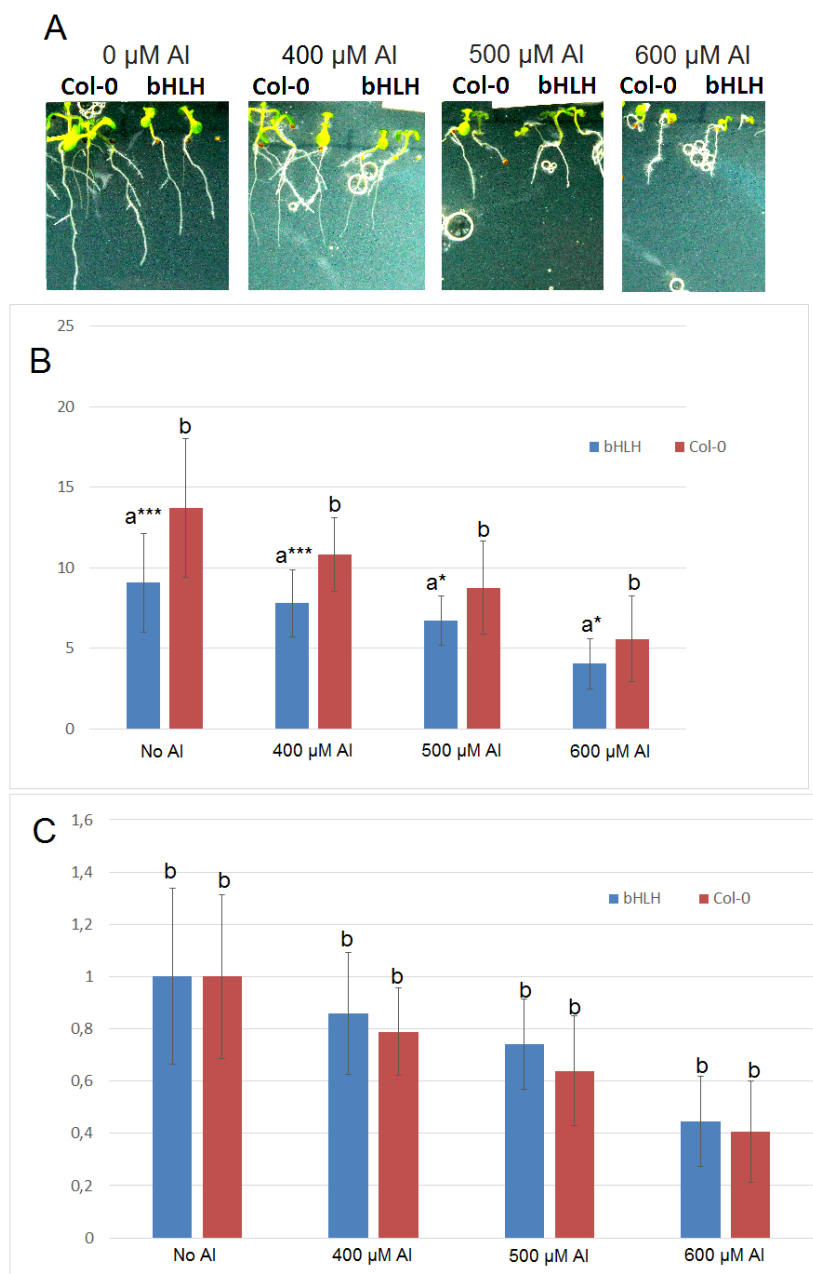


Figura 16: Efecto del aluminio en el crecimiento de la raíz. Se presentan los datos de *bHLH51*, representando la respuesta de las cinco líneas de inserción de T-DNA en los genes candidatos (*bHLH51*, *CDT1*, *HIN1*, *LEA*, y *Aqua*). A) Fotografía de las plantas *bHLH51* y Col de 8 días en el medio de Ryan, a distintas concentraciones de AlCl_3 . B) Gráfica representativa de la media de la longitud de las raíces en milímetros \pm SD ($n=18$) de dos réplicas biológicas de las plantas del apartado A: *bHLH51* y Col. C) Gráfica ilustrativa del porcentaje de reducción de la longitud de las raíces \pm SD ($n=18$) de dos réplicas biológicas de las plantas del apartado A: *bHLH51* y Col. Las distintas letras indican diferencias significativas entre *bHLH51* y Col (t de Student; * $\rightarrow p < 0,05$; ** $\rightarrow p < 0,01$; *** $\rightarrow p < 0,001$).

Cribado de líneas transgénicas en medio de cultivo con aluminio

En los últimos años se han descrito varios factores de transcripción relacionados con la tolerancia al aluminio, como STOP1 en *Arabidopsis* (Iuchi et al., 2007) y trigo (Garcia-Oliveira et al., 2013), ART1 en arroz (Yamaji et al., 2009), y WRKY46 también en *Arabidopsis* (Ding et al., 2013).

Ante estos precedentes, se decidió hacer un cribado de 208 líneas pertenecientes al Proyecto Transplanta. Éstas, son líneas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan cada una un factor de transcripción de manera inducible (material y métodos). El objetivo era encontrar factores de transcripción que participaran en la respuesta al aluminio, tanto que confirieran resistencia, como que produjeran mayor sensibilidad al sobreexpresarse.

En primer lugar se realizó un cribado en el medio descrito en Ezaki et al. 2004. El crecimiento de los mutantes se comparó con el de Col y se clasificaron visualmente en cinco categorías a las que se les asignó el siguiente código numérico atendiendo a la longitud de la raíz principal: Más largo (que Col) (+2), Ligeramente más largo (+1), Sin diferencias (0), Ligeramente más corto (-1), y Más corto (-2) (Anexo 6). En la figura 17 se muestran ejemplos de las categorías.

Se descartaron las líneas en las que no había diferencias en ninguna de las réplicas y se repitió el cribado de las 109 líneas restantes en el medio de Ryan. En este caso, las longitudes de las raíces de los mutantes se compararon mediante t de Student con las longitudes de las raíces de Col. Los resultados se compararon con los del medio de Ezaki en una tabla (Anexo 7) y se representaron en una gráfica el número de líneas en cada categoría (figura 18).

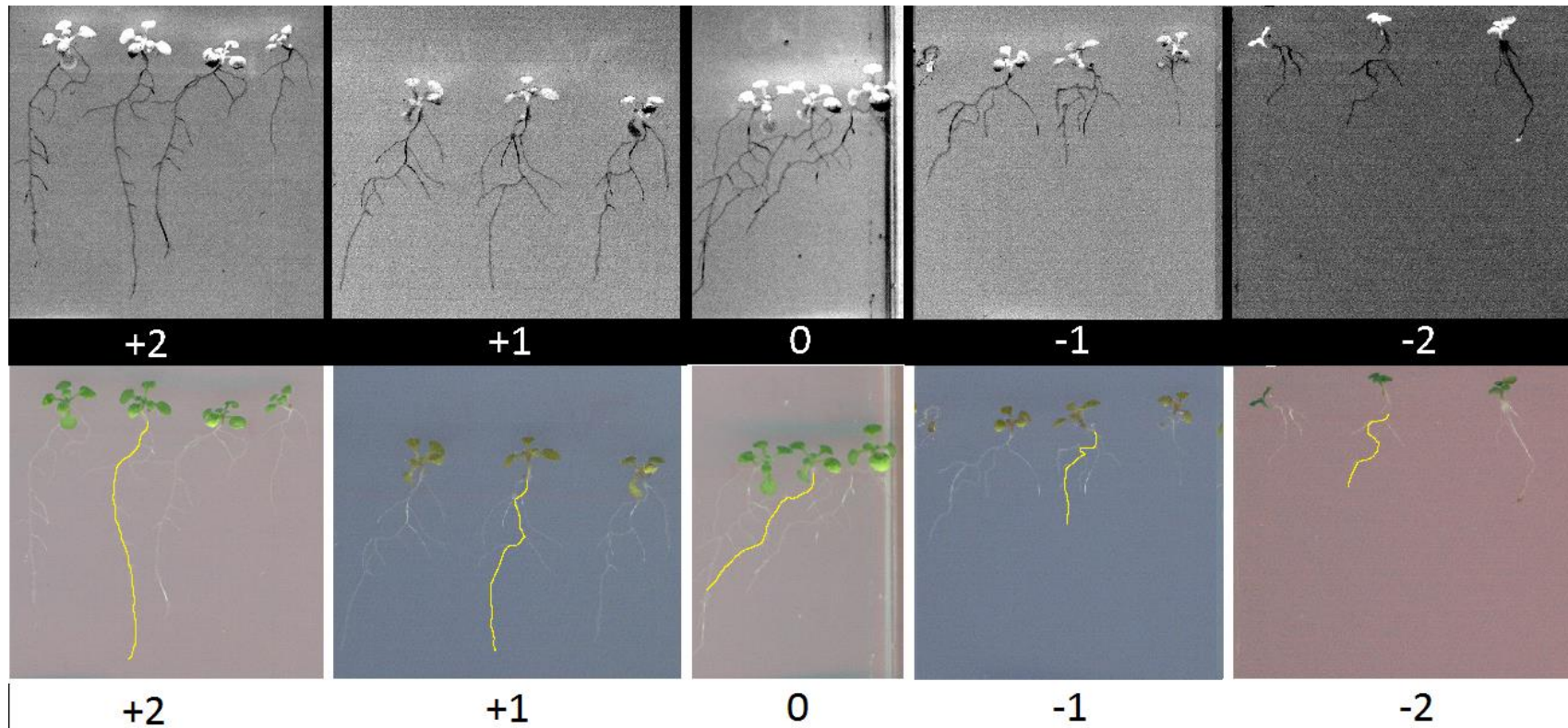


Figura 17: Fotografías de ejemplos de líneas clasificadas en las categorías Más largo (+2) (C77), Ligeramente más largo (+1) (JVC22), Sin diferencias (0) (Col), Ligeramente más corto (-1) (JVC5), y Más corto (-2) (C64), en relación a Col. Las plantas crecieron en el medio de Ezaki más 10 μM estradiol y 200 μM AlCl_3 durante 10 días.

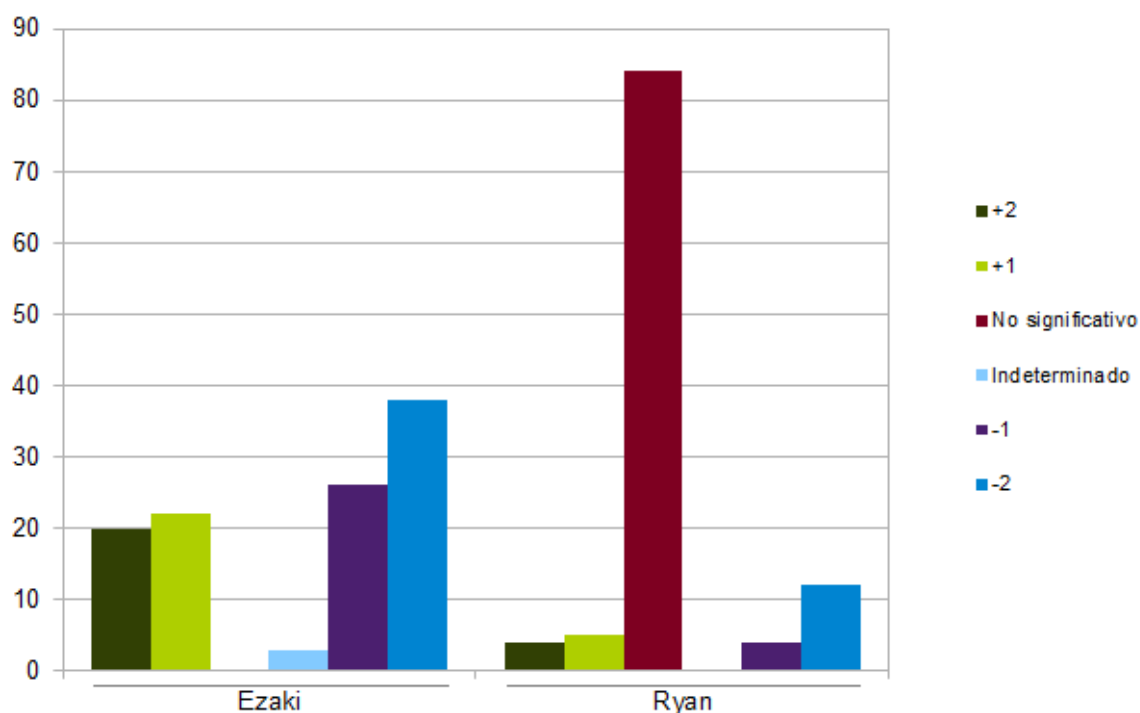


Figura 18: Gráfica representativa del número de líneas en las categorías Más largo (+2), Ligeramente más largo (+1), Sin diferencias (0), Ligeramente más corto (-1), y Más corto (-2), en relación a Col, en el medio de Ezaki en comparación al medio de Ryan.

El número de líneas cuyas raíces tenían diferencias significativas respecto a Col se redujo mucho de un medio a otro (figura 18). Además, las líneas con raíces más largas o cortas en el medio de Ryan no fueron siempre las mismas que en el medio de Ezaki, y en algunos casos se observaron inconsistencias entre los dos medios (tabla 11). Del mismo modo, se obtuvieron resultados anómalos, como raíces más largas en presencia de aluminio que en su ausencia (incluso en Col).

Por este motivo, se llevó a cabo un nuevo abordaje. Se eligieron las doce líneas con fenotipos más acusados (señaladas en rojo en el Anexo 7) y se contrastaron con los resultados de otros grupos que trabajan con líneas Transplanta. De este modo, se escogieron los genes que parecían no responder a otros estreses (como salinidad, frío, arsénico, etc.) para que hubiera más posibilidades de que estuvieran relacionados únicamente con la respuesta al aluminio y no fueran genes de respuesta a estrés. Así,

Resultados

se redujeron los candidatos a tres y se pidieron sus correspondientes líneas de inserción de T-DNA (tabla 1 -material y métodos-):

- *Related to Apetala 2.3 (RAP2.3).*
- *Transmembrane Domain Ring H2.*
- *Dehydration-Responsive Element Binding Protein 2.*

Tabla 11: Algunos ejemplos de líneas del Anexo7 cuyos fenotipos se contradicen en el medio de Ezaki y Ryan.

Gen	Nombre	Nombre Familia	Fenotipo Ezaki	Fenotipo Ryan
AT2G17180	P8		+1	-2 (significativa t)
AT2G18300	9C	transcription factor bHLH64	+2	-2 (significativa t)
AT3G05200	P54		-1	+1 (significativa t)
AT5G23260	34C	protein TRANSPARENT TESTA 16	-2	+1 (significativa t)

Tras obtener plantas homocigotas para las inserciones de T-DNA, las cinco líneas se sembraron en el medio de Ryan a diferentes concentraciones de aluminio (0, 400, 500 y 600 μ M).

- *Related to Apetala 2.3 (RAP2.3):*

Se pidieron dos líneas de inserción de T-DNA correspondientes a este gen: C14 y RAP2.3, con las inserciones en la región promotora y en un exón, respectivamente.

- C14:

Las plantas de esta línea parecían tener las raíces de longitud similar a las de Col (figura 19). A pesar de que la media de longitud de la raíz principal era significativamente superior la de Col a 400 μM de aluminio, esto no ocurría al comparar el resto de concentraciones. Además, se analizaron los porcentajes obtenidos al dividir la longitud de la raíz principal a distintas concentraciones de aluminio entre su longitud en ausencia de este metal. Debido a que en este caso tampoco hubo diferencias significativas entre el mutante y el control a ninguna de las concentraciones, la línea C14 se desestimó como candidata.

- RAP2.3:

En el caso de esta línea, todas las plantas tenían una longitud de raíz menor que Col, independientemente de la concentración de aluminio, lo que suponía que aparecieran diferencias significativas al comparar las medias. Sin embargo, al comparar las proporciones de crecimiento entre plantas sin y con aluminio (600 μM), hubo diferencias significativas debido a que la longitud de la raíz a penas se redujo en el mutante, a diferencia de en Col (figura 20).

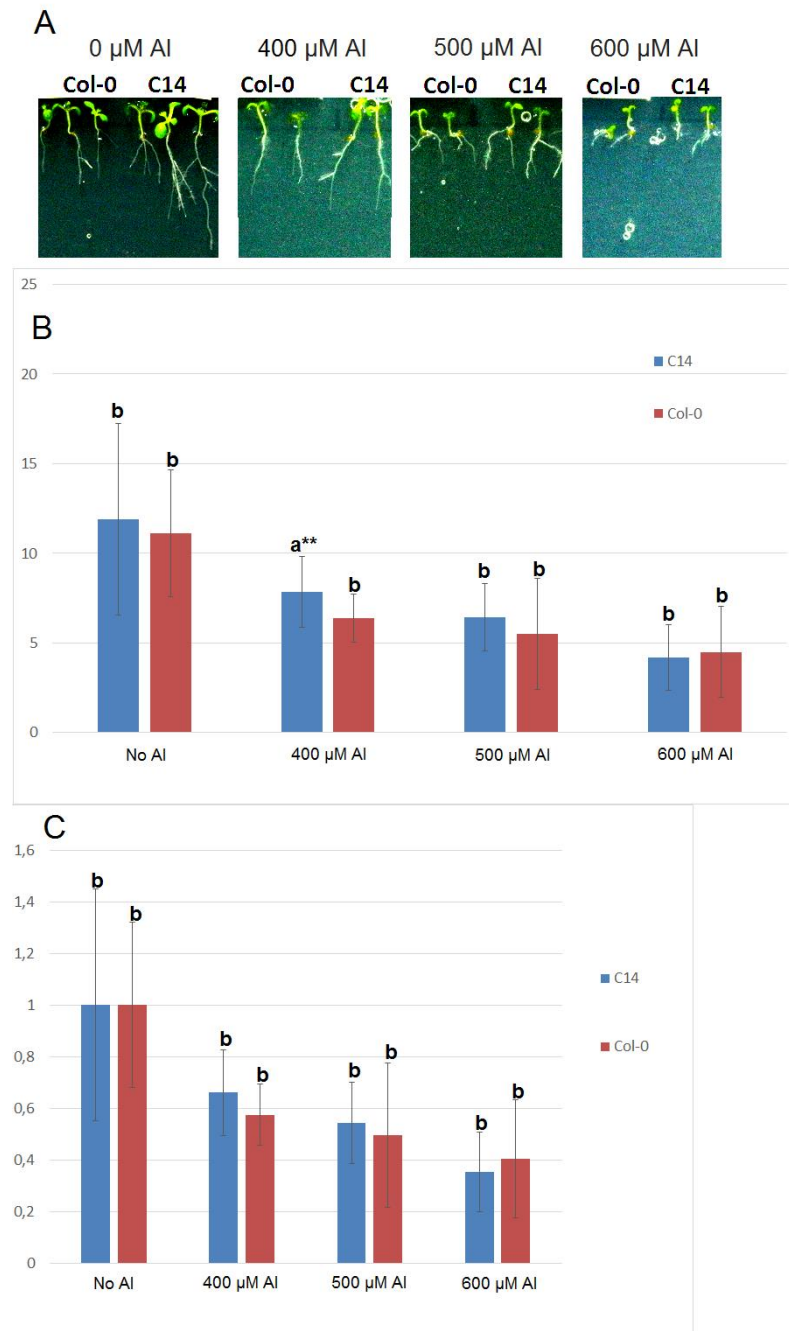


Figura 19: Efecto del aluminio en el crecimiento de la raíz de plantas de la línea C14 y Col. A) Fotografía de las plantas C14 y Col de 8 días en el medio de Ryan, a distintas concentraciones de AlCl_3 . B) Representación gráfica de la media de la longitud de las raíces en milímetros \pm SD ($n=18$) de dos réplicas biológicas de las plantas del apartado A: C14 y Col. C) Gráfica ilustrativa del porcentaje de reducción de la longitud de las raíces \pm SD ($n=18$) de dos réplicas biológicas de las plantas del apartado A: C14 y Col. Las distintas letras indican diferencias significativas entre C14 y Col (t de Student; * $\rightarrow p < 0,05$; ** $\rightarrow p < 0,01$; *** $\rightarrow p < 0,001$).

Dado que el tamaño de las plantas de la línea RAP2.3 no variaban apenas al aumentar la cantidad de aluminio en el medio, se decidió estudiar si era el pH ácido lo que causaba su pequeño tamaño.

Se sembraron plantas de la línea RAP2.3 y Col en el medio de Ryan a diferentes pHs (6'5, 6, 5'5, 5 y 4'5). Teniendo en cuenta la longitud total de la raíz principal, había diferencias significativas entre el mutante y Col, pero solamente porque las plantas de la línea RAP2.3 tenían un menor tamaño siempre. Sin embargo, al analizar las proporciones de crecimiento respecto a pH 6'5, el grado de inhibición del crecimiento por reducción del pH es muy similar en ambas líneas (figura 21). Hasta pH 6, parece que la longitud de las raíces de RAP2.3 se reduce más lentamente que la de Col. A partir de pH 5,5, en cambio, hay una reducción más drástica en RAP2.3. Aunque, finalmente, a pH 4,5, el grado de inhibición se iguala en las dos líneas.

Teniendo en cuenta que la línea RAP2.3 no parecía significativamente más sensible que Col ni al aluminio, ni al pH, se descartó como candidata.

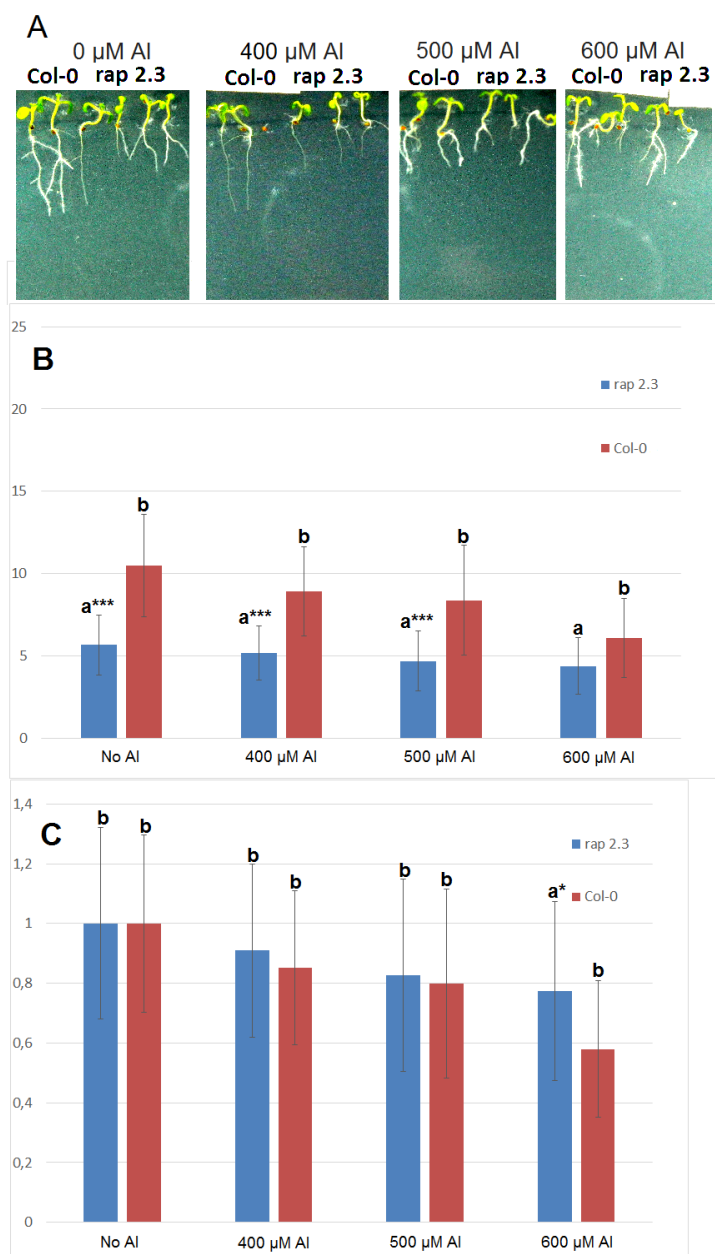


Figura 20: Efecto del aluminio en el crecimiento de la raíz de plantas de la línea RAP2.3 y Col. A) Fotografía de las plantas RAP2.3 y Col de 8 días en el medio de Ryan, a distintas concentraciones de AlCl_3 . B) Representación gráfica de la media de la longitud de las raíces en milímetros \pm SD ($n=18$) de dos réplicas biológicas de las plantas del apartado A: RAP2.3 y Col. C) Gráfica ilustrativa del porcentaje de reducción de la longitud de las raíces \pm SD ($n=18$) de dos réplicas biológicas de las plantas del apartado A: RAP2.3 y Col. Las distintas letras indican diferencias significativas entre RAP2.3 y Col (t de Student; * $\rightarrow p < 0,05$; ** $\rightarrow p < 0,01$; *** $\rightarrow p < 0,001$).

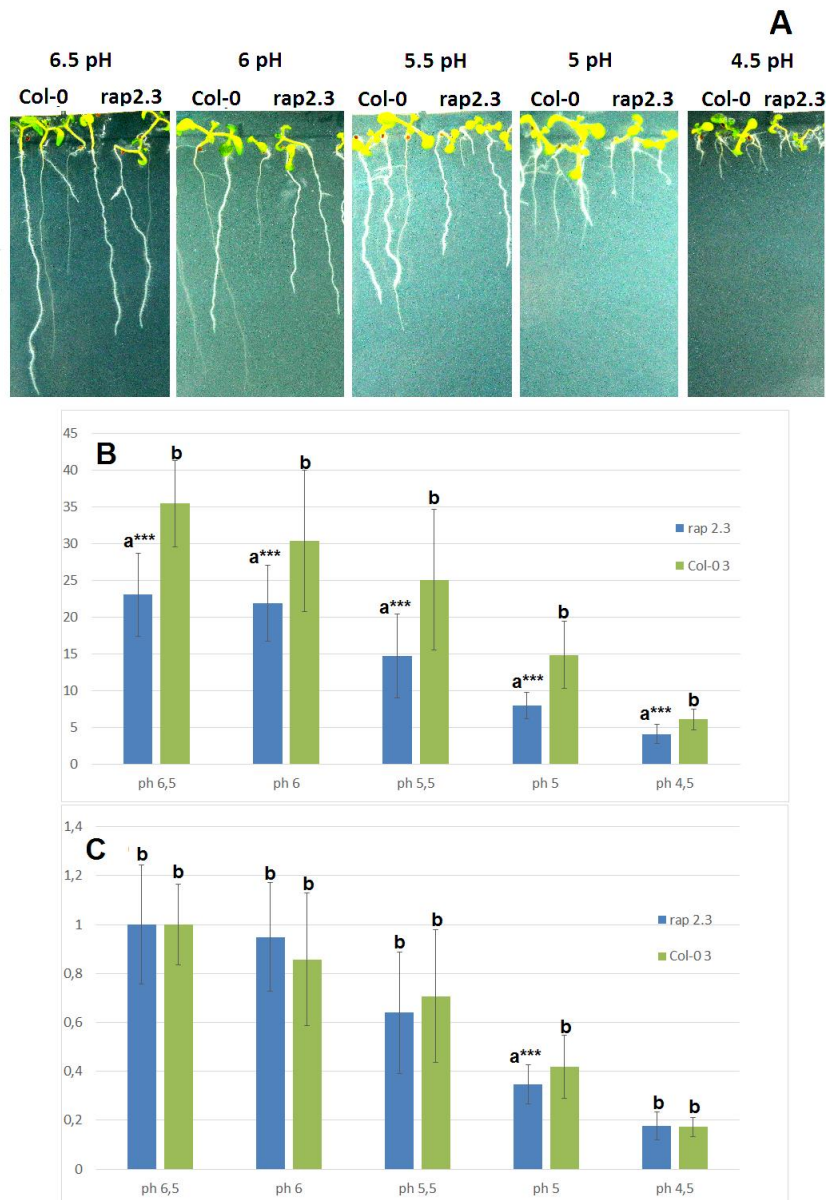


Figura 21: Efecto del pH en el crecimiento de la raíz de plantas de la línea RAP2.3 y Col. A) Fotografía de las plantas RAP2.3 y Col de 8 días en el medio de Ryan, a distintos pHs. B) Representación gráfica de la media de la longitud de las raíces en milímetros \pm SD (n=18) de dos réplicas biológicas de las plantas del apartado A: RAP2.3 y Col. C) Gráfica ilustrativa del porcentaje de reducción de la longitud de las raíces \pm SD (n=18) de dos réplicas biológicas de las plantas del apartado A: RAP2.3 y Col. Las distintas letras indican diferencias significativas entre RAP2.3 y Col (t de Student; * \rightarrow $p < 0,05$; ** \rightarrow $p < 0,01$; *** \rightarrow $p < 0,001$).

- *Transmembrane Domain Ring H2*:

La línea de inserción de T-DNA correspondiente a este gen se denominó JVC41, y su inserción se encontraba en el promotor.

- JVC41:

Esta línea presentaba un mayor crecimiento que Col en ausencia de aluminio. Esto causó que la reducción de tamaño debida a 400 y 500 μM de aluminio fuera significativamente mayor que la de Col (figura 22). No obstante, teniendo en cuenta que esta diferencia se perdía a concentraciones de aluminio mayores (véase 600 μM), y que las diferencias absolutas entre las medias de Col y JVC41 en presencia de aluminio eran pequeñas, esta línea se desechó como candidata.

- *Dehydration-Responsive Element Binding Protein 2*:

En el caso de este gen se pidieron dos líneas de inserción de T-DNA, que se llamaron JVC51A y JVC51D. Sus inserciones se situaban en el 3'UTR y en la región promotora, respectivamente.

- JVC51A y JVC51D:

Ambas líneas presentaron siempre un mayor crecimiento que Col, incrementándose la diferencia según aumentaba la concentración de aluminio (figura 23).

Debido a que ambas líneas, con inserciones de T-DNA en diferentes lugares, tenían una respuesta parecida y sus raíces tenían una media de longitud superior a la de Col, se decidió seguir su estudio.

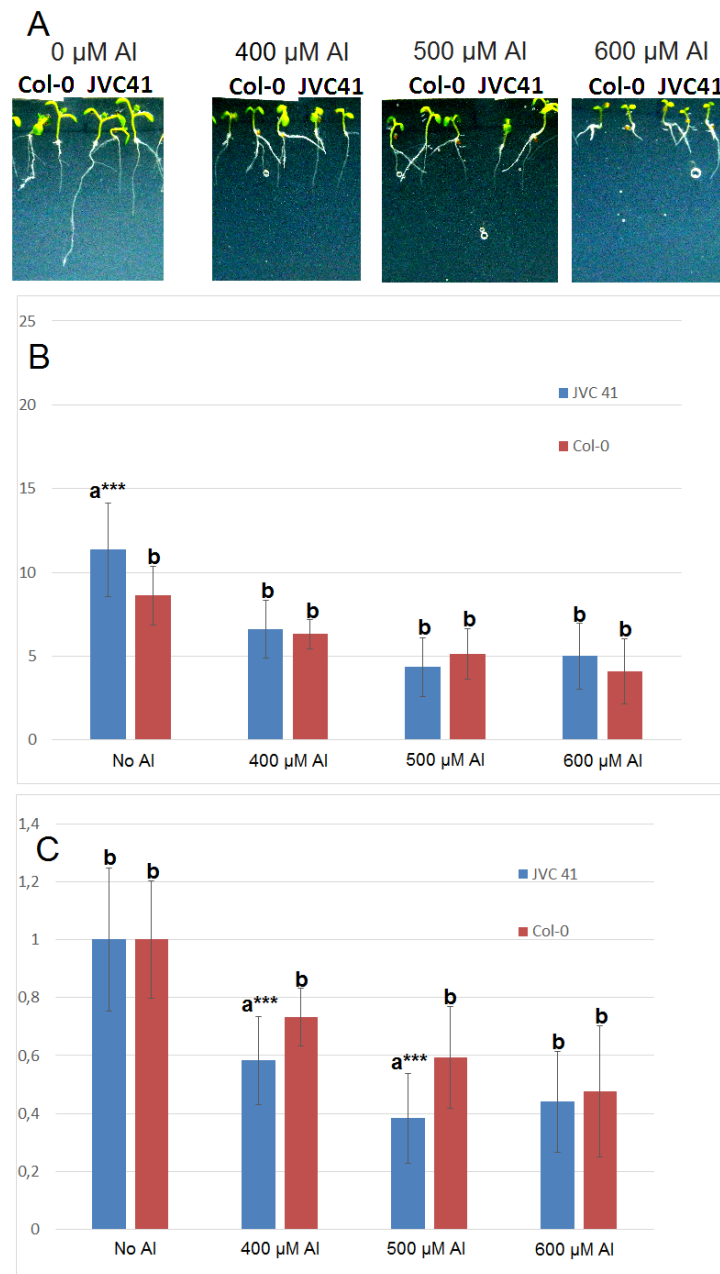


Figura 22: Efecto del aluminio en el crecimiento de la raíz de plantas de la línea JVC41 y Col. A) Fotografía de las plantas JVC41 y Col de 8 días en el medio de Ryan, a distintas concentraciones de AlCl_3 . B) Representación gráfica de la media de la longitud de las raíces en milímetros \pm SD ($n=18$) de dos réplicas biológicas de las plantas del apartado A: JVC41 y Col. C) Gráfica ilustrativa del porcentaje de reducción de la longitud de las raíces \pm SD ($n=18$) de dos réplicas biológicas de las plantas del apartado A: JVC41 y Col. Las distintas letras indican diferencias significativas entre JVC41 y Col (t de Student; * $\rightarrow p < 0,05$; ** $\rightarrow p < 0,01$; *** $\rightarrow p < 0,001$).

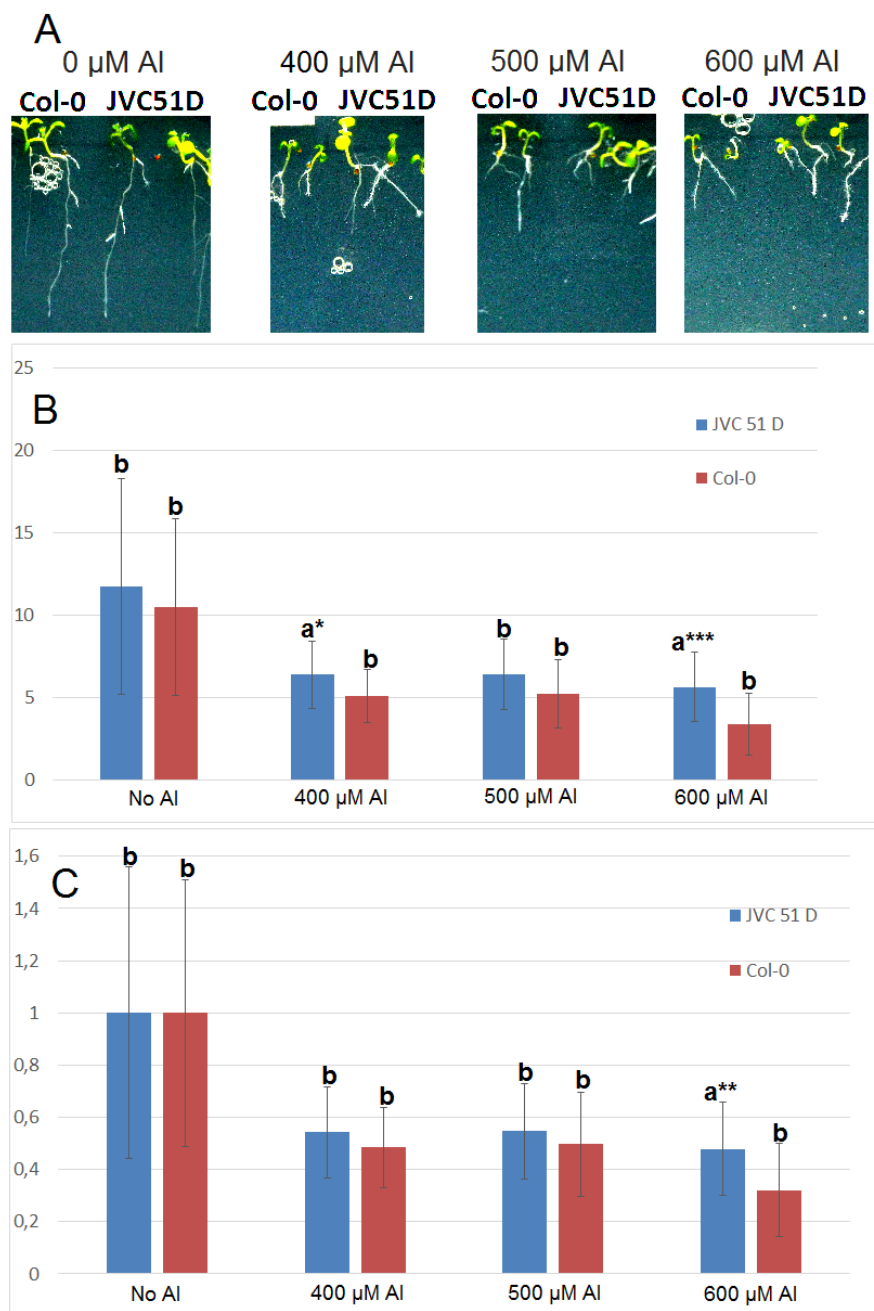


Figura 23: Efecto del aluminio en el crecimiento de la raíz. Se presentan los datos de la línea JVC51D, representando la respuesta de las líneas JVC51A y JVC51D, cuyos datos eran muy similares. A) Fotografía de las plantas JVC51D y Col de 8 días en el medio de Ryan, a diferentes concentraciones de AlCl_3 . B) Gráfica representativa de la media de la longitud de las raíces en milímetros \pm SD ($n=18$) de dos réplicas biológicas de las plantas del apartado A: JVC51D y Col. C) Gráfica ilustrativa del porcentaje de reducción de la longitud de las raíces \pm SD ($n=18$) de dos réplicas biológicas de las plantas del apartado A: JVC51D y Col. Las distintas letras indican diferencias significativas entre JVC51D y Col (t de Student; * $\rightarrow p < 0,05$; ** $\rightarrow p < 0,01$; *** $\rightarrow p < 0,001$).

En primer lugar se quiso comprobar si las inserciones de T-DNA afectaban a la expresión del gen. Para ello, se llevó a cabo una PCR semi-cuantitativa del gen *JVC51* en Col y los mutantes JVC51A y JVC51D, en ausencia y presencia de aluminio (300 μ M) con una pareja de cebadores específicos (*JVC51expFW* y *JVC51expRV*, tabla 6 - material y métodos-) (figura 24).

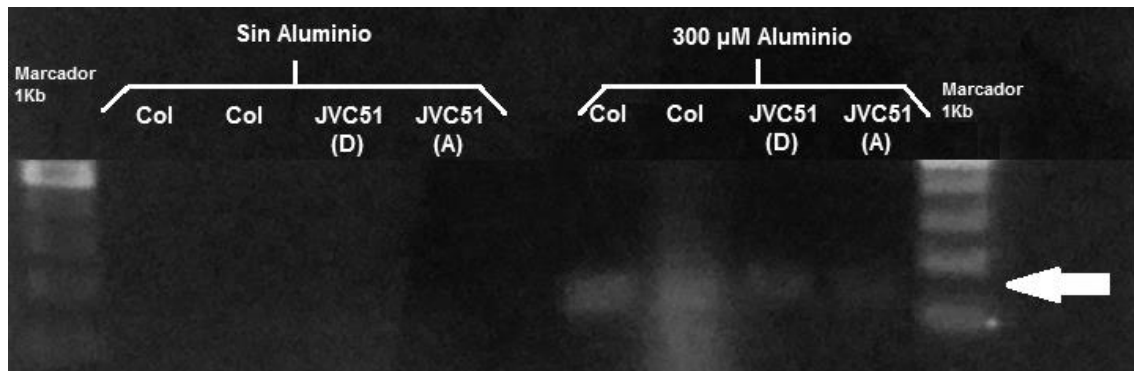


Figura 24: Expresión de gen *JVC51* en distintas líneas. Ensayo de PCR semi-cuantitativa con cDNA de las líneas: Col (con dos réplicas), y los mutantes JVC51A y JVC51D. El RNA se extrajo de plantas crecidas 8 días en el medio de Ryan, en ausencia o presencia de 300 μ M de AlCl_3 . Los productos de 40 ciclos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% teñido con Sybr green. Aparecen señalados por una flecha y su tamaño es de 101 pb.

Los resultados señalan que ninguna de las dos líneas de inserción de T-DNA son “knock out”, ya que en ambas se observa expresión. No obstante, esta expresión es menor que la de Col, indicando que probablemente JVC51A y JVC51D son líneas “knock down”.

Al mismo tiempo, cabe destacar que *Dehydration-Responsive Element Binding Protein 2* parece un gen inducido por aluminio, con una expresión considerablemente mayor en todas las líneas tratadas con 300 μ M, lo que lo convierte en un buen candidato para su caracterización en profundidad.

Identificación y caracterización de genes relacionados con la tolerancia al aluminio en centeno

Una aproximación evidente para obtener genes candidatos en centeno consiste en identificar genes ya descritos en especies como trigo, arroz y *Brachypodium*. Se escogieron genes de las familias ALMT, MATE, ABC y NRAMP, todas ellas relacionadas con la tolerancia al aluminio.

Así mismo, se estudiaron sus respectivas localizaciones para ver si se correspondían con alguno de los loci de tolerancia al aluminio descritos en centeno a los que aún no se les ha asignado ningún gen: *Alt1*, *Alt2* y *Alt3*.

Familia ALMT

Dentro de los genes de la familia ALMT descritos en cereales, el gen de tolerancia al aluminio *TaALMT1* y los genes de *Aegilops tauschii* *AetALMT1* y *AetALMT2*, son los más próximos filogenéticamente (Gruber et al., 2010). La gran semejanza entre los genes *ALMT* de trigo y centeno sugiere la posibilidad de que existan genes homólogos a *AetALMT2* en centeno. Por este motivo, nuestro grupo se planteó identificarlos, así como otros miembros de la familia ALMT, que podrían estar implicados en procesos de tolerancia al aluminio.

- Identificación y caracterización de genes homólogos de *AetALMT2* en centeno

Con el propósito de identificar los genes homólogos de *AetALMT2* en centeno (cv. Ailés e Imperial y línea consanguínea Riodeva), se diseñó una pareja de cebadores (ScALMT2-1F y ScALMT2-1R, tabla 4 -material y métodos-) basados en la secuencia descrita para este gen en *Aegilops tauschii* por Delhaize y sus colaboradores (2007). Mediante amplificación por PCR a partir de cDNA obtenido de plántulas de centeno expuestas 24 horas a aluminio, se obtuvo, en todos los casos, una única banda que poseía un tamaño similar al esperado, que fue clonada y secuenciada.

Tanto para los cultivares Ailés e Imperial y como para la línea consanguínea Riodeva, se obtuvo una secuencia, que comprendía un marco de lectura completo, de 1374 pb (Anexo 8). Al ser comparada con el gen *AetALMT2*, presentaba una identidad nucleotídica del 96% en los tres casos. Las proteínas deducidas en Ailés, Riodeva e Imperial consistían en 457 aminoácidos (Anexo 9), con una masa molecular de 49,701, 49,694 y 49,700 KDa y un punto isoeléctrico teórico de 8,81, 8,59 y 8,81, respectivamente. Todas ellas presentaban el dominio característico de la familia ALMT (pfam11744) y una identidad en la secuencia aminoacídica comprendida entre el 96-97% respecto a *AetALMT2*.

Además de las secuencias descritas con anterioridad, se aislaron en Ailés y Riodeva dos secuencias pseudogénicas del gen *ScALMT2*. En Ailés, esta secuencia estaba formada también por 1374 pb con dos únicos SNPs respecto a la secuencia funcional *ScALMT2-Ai* (Anexo 10). El segundo de ellos consiste en una transición de una citosina por una timina (C por T), que producía un codón de terminación TAG prematuro en el triplete 310, ocasionando una proteína truncada de 310 aminoácidos (Anexo 11). Esta secuencia fue denominada *psScALMT2-Ai* (*pseudo Secale cereale ALuminum-activated Malate Transporter 2-Ailés*). En Riodeva, la secuencia estaba constituida por 1372 pb con cuatro SNPs y dos deleciones de un único nucleótido respecto a la secuencia funcional *ScALMT2-Rd* (Anexo 12). La primera deleción producía un cambio en el marco de lectura que generaba un codón de terminación TAG prematuro en el triplete 138, ocasionando una proteína truncada de 137 aminoácidos (Anexo 13). Esta secuencia fue denominada *psScALMT2-Rd* (*pseudo Secale cereale ALuminum-activated Malate Transporter 2-Riodeva*).

Una vez obtenida la secuencia completa de cDNA del gen *ScALMT2* nos propusimos ubicar su posición en el genoma de centeno. Para ello, se llevaron a cabo amplificaciones con una pareja de cebadores específica de centeno (*ScALMT2_loc-1F* y *ScALMT2_loc-1R*, tabla 4 -material y métodos-) en las líneas de adición disómicas y ditelosómicas de trigo-centeno (cv. Chinese Spring – cv. Imperial, respectivamente). El producto de amplificación específico de centeno se detectó en las líneas de adición *2R* y *2RL* y estaba ausente en el resto, como se muestra en la figura 25. Estos resultados muestran que este

gen no co-localiza con ninguno de los loci de tolerancia al aluminio descritos en centeno.

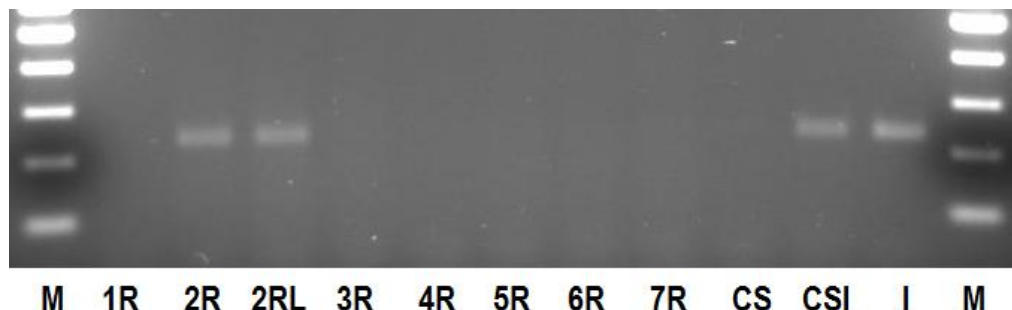


Figura 25: Gel de agarosa al 1,5% teñido con Sybr green. Se muestran amplificaciones en las siete líneas de adición. M se refiere al marcador de peso molecular (100pb), CS significa Chinese Spring e I, Imperial.

- Identificación y caracterización de otros miembros de la familia ALMT

Con el propósito de identificar otros genes de la familia ALMT en centeno, se diseñaron parejas de cebadores basados en secuencias de arroz descritas como pertenecientes a esta familia por Delhaize y su grupo (2007). De esta manera, se diseñaron cebadores a partir de *OsALMT6* para *ScALMT3*, *OsALMT1* para *ScALMT4*, *OsALMT7* para *ScALMT5*, y *OsALMT9* para *ScALMT6* (tabla 4 -material y métodos-). Mediante PCR se amplificaron secuencias parciales de los diferentes genotipos.

- *ScALMT3*

Se obtuvieron secuencias parciales de 1228 nucleótidos para los cv. Imperial y Ailés, y 1231 nucleótidos para la línea consanguínea Riodeva (Anexo 14). Éstas poseían una identidad nucleotídica comprendida entre el 84 y el 85% con el gen *OsALMT6* y del 96% con el gen *AetALMT3*, ambos pertenecientes al mismo subgrupo dentro de la familia ALMT (Delhaize et al., 2007).

Ninguna de las secuencias comprendía un marco de lectura completo. Por ello, se escogió el más largo de cada una de ellas y se dedujo la secuencia de la proteína. Los fragmentos proteicos consistían en 359, 337 y 338 aminoácidos en Imperial, Ailés y Riodeva, respectivamente (Anexo 15). Presentaban una identidad en la secuencia aminoacídica comprendida entre el 95-96% con AetALMT3 y entre el 75-77% con OsALMT6 y en todos aparecía el dominio característicos de la familia ALMT (pfam11744).

Con los fragmentos secuenciados no se consiguió localizar este gen en el genoma de centeno, debido a que no se pudo encontrar una temperatura a la que se amplificaran bandas en centeno pero no en trigo. No obstante, teniendo en cuenta que *OsALMT6* se ubica en el cromosoma 4, las relaciones de ortología entre arroz y centeno predicen que *ScALMT3* podría localizarse en los cromosomas 2 o 7.

- *ScALMT4*

Tanto Ailés como Riodeva amplificaron secuencias parciales de 441 nucleótidos (Anexo 16), ambas con una identidad nucleotídica del 81% con el gen *OsALMT1*.

A pesar de que las secuencias no comprendían el gen completo, toda la secuencia era parte de un marco de lectura. El fragmento proteico constaba de 146 aminoácidos en las dos líneas (Anexo 17) y su identidad con *OsALMT1* era del 75%. El dominio característicos de la familia ALMT (pfam11744) estaba presente al comienzo de la secuencia de aminoácidos.

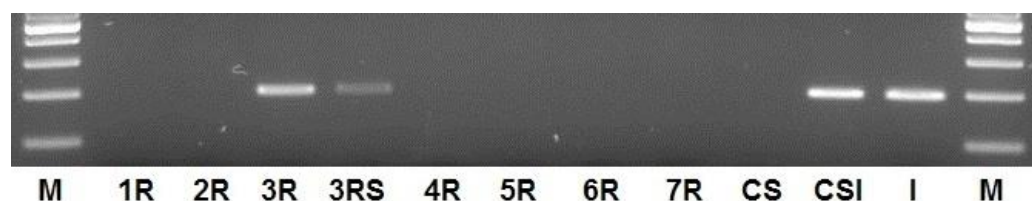


Figura 26: Gel de agarosa al 1,5% teñido con Sybr green. Se muestran amplificaciones en las siete líneas de adición. M se refiere al marcador de peso molecular (100pb), CS significa Chinese Spring e I, Imperial.

Tras secuenciar los fragmentos de DNA genómico correspondientes al *ALMT4* en Ailés y Riodeva, diseñamos una pareja de cebadores (*ScALMT4_loc-1F* y *ScALMT4_loc-1R*, tabla 4 -material y métodos-) para localizarlo en el genoma de centeno. Utilizando líneas de adición disómicas y ditelosómicas de trigo-centeno (cv. Chinese Spring – cv. Imperial, respectivamente) como molde, solamente hubo amplificación en las líneas 3R y 3RS (figura 26). Estos resultados indican que *ScALMT4* se localiza en el mismo cromosoma y brazo que el locus de tolerancia al aluminio *Alt2*.

- *ScALMT5*

Las secuencias obtenidas para los cv. Petkus y Ailés, y la línea consanguínea Riodeva consistían en 275, 388 y 387 nucleótidos, respectivamente (Anexo 18). Todas ellas eran secuencias parciales con identidades del 86% en el caso de Ailés y Riodeva, y del 83% en el de Petkus, con el gen *OsALMT7*.

Debido a que ninguna de las secuencias comprendía un marco de lectura completo, se escogió el más largo de cada una de ellas y se dedujeron los fragmentos proteicos, que consistían en 59 aminoácidos en los tres casos (Anexo 19). Toda la secuencia formaba parte del dominio característicos de la familia ALMT (pfam11744) y mostraba una identidad de aminoácidos con *OsALMT7* del 81% en los cultivares Petkus y Ailés, y del 78% en Riodeva.

La ubicación de este gen en el genoma de centeno tampoco fue posible. Sin embargo, teniendo en cuenta las relaciones de ortología entre arroz y centeno, *ScALMT5* podría localizarse en los cromosomas 2, 4, 5, 6 o 7.

- *ScALMT6*

Los cultivares Petkus y Ailés, y la línea consanguínea Riodeva amplificaron secuencias de 679 nucleótidos (Anexo 20), con identidades de entre el 84 y 85% con el gen *OsALMT9*.

Dado que ninguna de las secuencias comprendía un marco de lectura completo, se escogió el más largo de cada una de ellas y se dedujo su

secuencia de aminoácidos. Los fragmentos proteicos constaban de 151 aminoácidos en los tres casos (Anexo 21). Presentaban una identidad en la secuencia aminoacídica comprendida entre el 82-83% con OsALMT9 y en todos aparecía el dominio característicos de la familia ALMT (pfam11744) al comienzo de la secuencia.

La localización de este gen en el alguno de los cromosomas de centeno no fue posible. En cambio, dado que *OsALMT9* se ubica en el cromosoma 10, las relaciones de ortología entre arroz y centeno predicen que *ScALMT6* podría localizarse en los cromosomas 1, 4 o 7.

Familia MATE

En la familia MATE se han descrito varios miembros relacionados con la tolerancia al aluminio: *SbMATE* (Magalhaes et al., 2004), *HvAACT1* (Furukawa et al., 2007), *TaMATE1* (Ryan et al., 2009), *OsFRDL4* (Yokosho et al., 2011), *ScFRDL2* (Yokosho et al., 2010), *ZmMATE1* y *ZmMATE2* (Maron et al., 2010), *AtMATE* (Liu et al., 2009) y *VuMATE* (Yang et al., 2011). En algunas especies, como maíz (Maron et al., 2010) y judía común (Eticha et al., 2010), se ha constatado la existencia de varios miembros de la familia dentro de la misma especie. Por ello, se decidió caracterizar y localizar *ScMATE2*.

- Caracterización y localización de *ScMATE2*

Con vistas a obtener la secuencia de *ScMATE2* en el cultivar Imperial, se diseñaron cebadores (*ScMATE2*-1F y *ScMATE2*-1R, tabla 4 -material y métodos-) basados en secuencias homólogas de arroz y *Brachypodium*. Mediante amplificación por PCR se obtuvo una secuencia de 545 nucleótidos (Anexo 22) que presentaba una identidad de nucleótidos del 99% con el gen *ScFRDL2*, 90% con *BdFRDL2* y del 87% con *OsFRDL2*.

A pesar de que la secuencia no comprendía el gen completo, toda la secuencia era parte de un marco de lectura. El fragmento proteico constaba de 181 aminoácidos (Anexo 23) y su identidad con *ScFRDL2* era del 99%, con

Resultados

BdFRDL2 del 86% y del 84% con OsFRDL2. Toda la secuencia formaba parte del dominio característico de la familia MATE (pfam01554).

Se diseñó una pareja de cebadores específicos dentro del fragmento del gen secuenciado (ScMATE2_loc-1F y ScMATE2_loc-1R, tabla 4 -material y métodos-) y se utilizaron para localizarlo en el genoma de centeno. Las amplificaciones en líneas de adición disómicas y ditelosómicas de trigo-centeno (cv. Chinese Spring – cv. Imperial, respectivamente) solamente mostraron producto en las líneas 1R y 1RL (figura 27). Por lo tanto, parece que *ScMATE2* no co-localiza con ninguno de los loci de tolerancia al aluminio descritos en centeno.

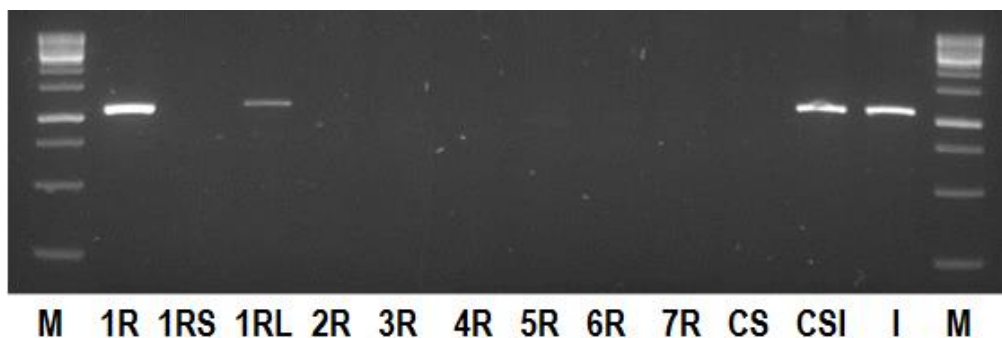


Figura 27: Gel de agarosa al 1,5% teñido con Sybr green. Se muestran amplificaciones en las siete líneas de adición. M se refiere al marcador de peso molecular (100pb), CS significa Chinese Spring e I, Imperial.

Se quiso analizar la expresión de *ScMATE2* en respuesta al aluminio. Para ello se realizó una PCR semi-cuantitativa de plantas sin tratar y tratadas con aluminio (200 μ M) con una pareja de cebadores específicos (ScMATE2-exp-1F y ScMATE2-exp-1R, tabla 6 -material y métodos-). Se utilizó el gen constitutivo *GAPDH* como referencia de expresión (figura 28).

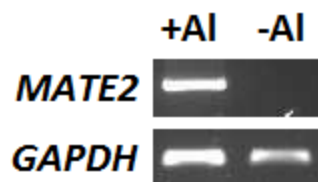


Figura 28: Expresión de los genes *ScMATE2* y *ScGAPDH*. Ensayo de PCR semi-cuantitativa con cDNA del cultivar de centeno Imperial. El RNA se extrajo de plantas cultivadas cinco días en el medio de Aniol, 1981 con las modificaciones de Gallego y Benito, 1997, en ausencia o presencia de 200 μM de AlCl_3 . Los productos de 40 ciclos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% teñido con Sybr green.

Los resultados señalan que el gen *ScMATE2* se induce en presencia de aluminio, lo cual indica que podría participar en la respuesta al aluminio en centeno.

Familia ABC

Se han descrito transportadores ABC relacionados con la tolerancia al aluminio en *Arabidopsis* (*ALS3* (Larsen, 2005), *ALS1* (Larsen, 2007) y *STAR1* (Huang, 2010)) y arroz (*STAR1* y *STAR2* (Huang, 2009) y *OsALS1* (Huang, 2012)). Decidimos caracterizar los homólogos de *STAR1* y *STAR2* en centeno, ya que cabía la posibilidad de que estuvieran implicados en la tolerancia al aluminio de esta especie.

Se diseñaron parejas de cebadores basados en las secuencias descritas de arroz y sus homólogos en *Brachypodium* (tabla 4 -material y métodos-). Mediante PCR se amplificaron secuencias parciales de los diferentes genotipos.

-ScSTAR1

El cultivar Ailés y la línea consanguínea Riodeva amplificaron secuencias parciales de 291 nucleótidos (Anexo 24). Éstas, tenían una identidad nucleotídica del 88% con el gen *OsSTAR1* y del 91% con su homólogo de *Brachypodium* en el caso de Ailés; y del 91% con los dos genes en el caso de Riodeva.

A pesar de que las secuencias no comprendían el gen completo, toda la secuencia era parte de un marco de lectura. El fragmento proteico constaba de 96 aminoácidos en las dos líneas (Anexo 25) y su identidad de aminoácidos era del 94% con *OsSTAR1* y del 95% con su homólogo de *Brachypodium* para Riodeva y del 91% y 94%, respectivamente, para Ailés. El dominio de unión a ATP (cd00267) característico de los transportadores ABC, estaba presente al comienzo de la secuencia de aminoácidos.

A pesar de que no se ha conseguido localizar este gen en el genoma de centeno, *OsSTAR1* se sitúa en el cromosoma 6, por lo que teniendo en cuenta las relaciones de ortología entre arroz y centeno, *ScSTAR1* podría localizarse en los cromosomas 2, 4, 5, 6 o 7.

Se sabe que el gen *AtSTAR1* no se induce por aluminio, mientras que el *OsSTAR1* sí lo hace. Para conocer si el patrón de expresión del gen variaba debido a la presencia de aluminio en centeno, se llevó a cabo una PCR semi-cuantitativa. Se diseñaron cebadores específicos (*ScSTAR1-exp-1F* y *ScSTAR1-exp-1R*, tabla 6 -material y métodos-) y se utilizaron plantas sin tratar y tratadas con aluminio (200 μM). La referencia de expresión fue el gen constitutivo *GAPDH* (figura 29).

Los resultados señalan que el gen *ScSTAR1* se induce en presencia de aluminio, lo cual indica que además de su posible participación en la respuesta al aluminio en centeno, su patrón de expresión se asemeja más al de arroz que al de *Arabidopsis*.

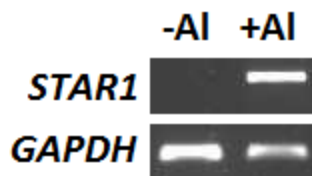


Figura 29: Expresión de los genes *ScSTAR1* y *ScGAPDH*. Ensayo de PCR semi-cuantitativa con cDNA del cultivar de centeno Imperial. El RNA se extrajo de plantas cultivadas cinco días en el medio de Aniol, 1981 con las modificaciones de Gallego y Benito, 1997, en ausencia o presencia de 200 μM de AlCl_3 . Los productos de 40 ciclos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% teñido con Sybr green.

-*ScSTAR2*

Se obtuvo una secuencia de 841 nucleótidos en el cultivar Petkus (Anexo 26), con una identidad de nucleótidos del 84% con el gen *OsSTAR2* y del 86% con su homólogo de *Brachypodium*.

Debido a que la secuencia no comprendía un marco de lectura completo, se escogió el más largo y se dedujo la secuencia de la proteína. El fragmento proteico resultante constaba de 115 aminoácidos (Anexo 27) y presentaba una identidad en la secuencia del 81% con *OsSTAR2* y del 86% con su homólogo de *Brachypodium*. Prácticamente toda la secuencia formaba parte de un dominio característico de un sistema transporte no caracterizado de tipo ABC (pfam03649).

No se consiguió ubicar este gen en el genoma de centeno. Sin embargo, teniendo en cuenta que *OsSTAR2* se ubica en el cromosoma 5, las relaciones de ortología entre arroz y centeno predicen que *ScSTAR2* podría localizarse en los cromosomas 1 o 3.

Familia NRAMP

Uno de los miembros de esta familia se ha asociado con la tolerancia al aluminio en arroz: *Nrat1* (Xia, 2010). Dada la posibilidad de que este gen pudiera jugar un papel en la tolerancia al aluminio en centeno, decidimos identificar su homólogo en esta especie.

Basándonos en la secuencia descrita en arroz, se diseñó una pareja de cebadores (tabla 4 - material y métodos-) y mediante PCR se amplificaron secuencias parciales en el cultivar Ailés y en la línea consanguínea Riodeva. Éstas consistían en 760 y 762 nucleótidos, respectivamente (Anexo 28), y mostraban una identidad de entre el 86-87% con *OsNrat1*.

Ninguna de las secuencias comprendía un marco de lectura completo, por lo que se escogió el más largo de cada una de ellas y se dedujeron los fragmentos proteicos, que constaban de 140 aminoácidos en ambos casos (Anexo 29) y presentaban una identidad en la secuencia aminoacídica comprendida entre el 64-65% con *OsNrat1*. No obstante, el BlastP no identificó ningún dominio característico de la familia NRAMP.

Con los fragmentos secuenciados no se consiguió localizar este gen en el genoma de centeno. No obstante, teniendo en cuenta la ubicación de *OsNrat1* en el cromosoma 2, las relaciones de ortología entre arroz y centeno predicen que *ScNRAMP* podría localizarse en los cromosomas 3, 4, 6 o 7.

De estos 9 genes identificados en centeno, sólo *ScALMT5* y *ScSTAR1* estaban presentes entre las sondas del “microarray”. No obstante, su FDR (RankProd) era > 0,05 en ambos casos (tabla 12) por lo que sus niveles de expresión no se pudieron tener en cuenta.

Los genes típicos de tolerancia al aluminio (*ScALMT1* y *ScMATE1*) no pudieron ser localizados entre las sondas del “microarray”.

Tabla 12: A: "Fold-change", B: "LogA", C: "FDR (RankProd)" y "ProbeID" de los genes *ScALMT5* y *ScSTAR1*.

NOMBRE	3R			6R			CS			Im			ProbeID
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
ALMT5	-1,52	8,83	0,6	-1,61	8,75	0,6	-1,31	9,42	1	1,07	7,17	0,94	TA106914_4565
STAR1	2,44	2,44	0,11	1,29	6,96	0,87	1,28	6,76	0,99	2,77	8,48	0,39	TA89332_4565

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El estrés por aluminio se considera una de las mayores restricciones para la producción agrícola en suelos ácidos (Kochian et al., 2004). El descubrimiento de transportadores que participan en la tolerancia al aluminio permite el uso de estos genes para conseguir cultivos resistentes a este metal, y así mejorar el rendimiento en estos suelos y ayudar a combatir la escasez de alimentos (Schroeder et al., 2013). Sin embargo, estos genes forman parte de una respuesta compleja, gran parte de la cual es aún desconocida. Recientemente se han caracterizado algunos factores de transcripción implicados en la regulación de genes de tolerancia, como STOP1 (Iuchi et al., 2007), ART1 (Yamaji et al., 2009) y WRKY46 (Ding et al., 2013), pero muchos de los componentes de la ruta se desconocen aún.

A lo largo de esta tesis se ha intentado ahondar en el conocimiento de la tolerancia al aluminio, tratando de describir genes implicados en ella. Se emplearon tres enfoques diferentes, que pudieran proporcionar genes candidatos que abarcaran desde transportadores a factores de transcripción, y otros:

- Análisis transcriptómico en centeno utilizando un “microarray” de trigo.
- Cribado de una colección de líneas transgénicas mutantes para diferentes factores de transcripción (del Proyecto Transplanta) en medio de cultivo con aluminio.
- Identificación y caracterización en centeno de genes previamente descritos en otras especies como relacionados con la tolerancia al aluminio.

Análisis transcriptómico en centeno

El análisis de la expresión génica se realizó utilizando el “microarray” de trigo de dos colores de Agilent 4x44K (Design ID 022297), que contiene unas 43.800 sondas representativas de genes de trigo. Los estudios de este tipo tienen la ventaja de permitir el análisis de miles de genes al mismo tiempo, aunque en muchos casos se detecta un elevado número de ESTs anónimas (Milla et al., 2002). Además, se necesita una expresión relativamente alta de los transcritos para poder estudiar sus cambios (Lee et al., 1995).

Discusión y conclusiones

En este caso, se tuvo la desventaja añadida de que al trabajar con centeno, no existen micromatrices de esta especie y se tuvo que utilizar una de trigo. A pesar de que son especies muy cercanas, los resultados muestran muchos menos genes de centeno que de las líneas de adición y trigo, seguramente porque los genes de trigo hibridan con mayor facilidad con las sondas de esta especie que con los de centeno. Por ello, probablemente, la mayoría de genes que se inducen y reprimen en las líneas de adición sean también de trigo.

Otra característica de los resultados obtenidos que llama la atención es que el número de genes tanto inducidos como reprimidos en Chinese Spring y/o la línea de adición 6R eran más del triple que en la línea de adición 3R. Esto podría deberse a que el número de genes inducidos en respuesta al aluminio en genotipos sensibles es mayor que en genotipos tolerantes (Mattiello et al., 2010), y a que la línea de adición 3R sea considerablemente más tolerante al aluminio que la 6R y Chinese Spring (Aniol, 2004). Otra explicación plausible, además de la mayor afinidad de los genes de trigo por las sondas comentada anteriormente, es que la homología entre los genomas de trigo y centeno sea mayor en el cromosoma 6 de centeno que en el 3, ya que algunos segmentos sinténicos del genoma de centeno poseen diferente número de genes ortólogos putativamente conservados respecto a gramíneas modelo como arroz, sorgo o *Brachypodium* (Martis et al., 2013).

El análisis de los resultados de perfiles transcriptómicos globales resulta especialmente complejo en sistemas que no son modelo, como es el caso del centeno. El alineamiento de las secuencias con el genoma de una especie cercana ayuda a construir una estructura en la que basar el estudio (Ward et al., 2012). Por ello, uno de los primeros pasos en este trabajo fue una búsqueda en el programa Blast del NCBI para anotar genes. Aproximadamente el 19% de las secuencias no se consiguieron anotar, lo cual generó dudas sobre la fiabilidad de los resultados. Sin embargo, muchas de las secuencias no caracterizadas también se encontraron en distintos trabajos de respuesta al aluminio u otros estreses (tabla 8 - resultados-), corroborando que los resultados obtenidos no eran artefactos.

Los genes inducidos con un “fold-change” ≥ 10 mostraban un enriquecimiento en las categorías relacionadas con procesos biológicos tales como la respuesta a estrés (biótico y abiótico) y la modificación de la pared celular (figura 11 -resultados-). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos por Milla y sus colaboradores (2002), Houde y Diallo (2008), y Mattiello y su grupo (2010), en centeno, trigo y maíz,

respectivamente. En cuanto a los genes reprimidos con un “fold-change” ≤ -10 se observa un aumento en las categorías de estrés oxidativo y de genes relacionados con la pared celular y su elasticidad (figura 11 -resultados-).

La exposición al aluminio produce la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Este fenómeno fue constatado hace tiempo en especies como la soja, el maíz y el guisante (Cakmak et al., 1991; Yamamoto et al., 2001; Boscolo et al., 2003). No obstante, parece que en los genotipos sensibles se produce una mayor producción de ROS, mientras que en los tolerantes la producción se mantiene constante (Boscolo et al., 2003). Al mismo tiempo, parece que la inducción de genes que eliminan ROS también es mayor en los genotipos sensibles, debido probablemente a que los tolerantes tienen mecanismos que actúan antes de que se produzca el estrés oxidativo (Maron et al., 2008; Mattiello et al., 2010). Los resultados de este trabajo muestran que las oxidorreductasas son una de las categorías con más representantes entre los genes inducidos, sugiriendo que es necesaria la eliminación de ROS. Sin embargo, las oxidorreductasas, principalmente peroxidasas, también son los genes más representados entre los reprimidos, señalando que los genotipos empleados tratan de disminuir la producción de ROS.

Otro de los efectos característicos del aluminio es la inhibición de la elongación de la raíz. Esta inhibición se ha asociado a una mayor deposición de lignina en genotipos de trigo sensibles al aluminio (Sasaki et al., 1996). Para contrarrestar, los genotipos tolerantes tratan de distender la pared celular mediante la expresión de β -glucosidasas e hidrolasas (Guo et al., 2007; Houde and Diallo, 2008). Las transferasas se han relacionado tanto con la elasticidad de la pared celular (glucosil-transferasas) (Houde and Diallo, 2008) como con la acumulación de lignina (O-metiltransferasas) (Mattiello et al., 2010). En este trabajo las transferasas eran la segunda categoría de genes inducidos más representada, la mayoría de las cuales eran glicosil-transferasas (figura 11 -resultados-). Por otra parte, tres de las cuatro primeras categorías de genes reprimidos eran genes relacionados con la elasticidad de la pared celular, β -glucosidasas e hidrolasas, señalando nuevamente que su comportamiento es similar al de trabajos previamente mencionados.

A grandes rasgos y teniendo en cuenta todas las categorías en conjunto, parece que la inducción y represión de genes va dirigida a hacer frente al estrés (modificando la pared celular, reduciendo el estrés oxidativo, etc.) y a evitar malgastar energía en procesos no esenciales (aclimatación al frío, vernalización, etc.). Estos resultados coinciden con lo

publicado en otros estudios de respuesta al aluminio (Milla et al., 2002; Mattiello et al., 2010). Sin embargo, hay que tener en cuenta que en la respuesta al aluminio actúan genes de dos tipos: genes de tolerancia y genes de respuesta al estrés (Houde and Diallo, 2008). Ambos tipos se inducen en presencia de aluminio, pero su patrón de expresión difiere; los genes de respuesta al estrés por aluminio se expresan en mayor medida en los genotipos sensibles, mientras que los de tolerancia lo hacen en los genotipos tolerantes (Mattiello et al., 2010). Cuando se analiza la respuesta al aluminio de un único genotipo, no siempre es fácil distinguir un tipo del otro, ya que los genes de respuesta a estrés son capaces de aliviar efectos directos e indirectos del aluminio, como la pérdida de elasticidad de la pared celular, la deficiencia de fosfato, el estrés oxidativo, etc. (Guo et al., 2007; Houde and Diallo, 2008; Mattiello, et al., 2010). No obstante, si se trata de un gen cuyo efecto también podría aliviar de un estrés diferente (boro, sequía, etc.), probablemente es un gen de respuesta a estrés. Cabe destacar que como estos genes ayudan a detoxificar y combatir el estrés oxidativo y otros efectos de la toxicidad por aluminio, también podrían usarse para la mejora genética de cereales (Ezaki et al., 2000; Basu et al., 2001).

Se escogieron doce candidatos entre los genes inducidos ≥ 10 "fold-change". Entre ellos, varios "Probe ID" estaban repetidos, TA54169_4565 (ABA-responsive protein) tres veces y TA88472_4565 (Cadmium tolerant) cuatro, y otros con diferente "Probe ID" parecían ser el mismo gen. Debido a que entre ellos los niveles de expresión eran similares, se consideró como un indicio de que esos genes no eran artefactos experimentales, ni su nivel de expresión era debido al azar. Finalmente, los doce "Probe ID" se agruparon en seis candidatos: *bHLH51*, *CDT1*, *MDR4*, *Harpin*, *Aqua* y *ABA*.

Los seis genes candidatos estaban inducidos al menos 1024 (2^{10}) veces más en presencia de aluminio que en su ausencia en alguno de los genotipos hibridados con el "microarray". Ante esta diferencia abismal de expresión, se decidió comprobar si se trataba de una respuesta generalizada en centeno. Para ello, se midió su expresión y la del conocido gen relacionado con la tolerancia al aluminio *ALMT1*, en dos genotipos diferentes de centeno, uno sensible al aluminio (389) y el otro tolerante (390). Los siete genes estudiados se inducían en presencia de aluminio, sin embargo, los seis candidatos se inducían considerablemente más en el genotipo sensible que en el tolerante, a diferencia de *ALMT1*, cuya inducción era mayor en el el genotipo tolerante (figura13 -resultados-). Según Mattiello y su grupo (2010) estos resultados parecen indicar que los seis candidatos no son genes de tolerancia al aluminio, sino genes de

respuesta a estrés por aluminio. Los niveles de inducción tan elevados en los genotipos sensibles probablemente sean un intento de aliviar los efectos del aluminio (Guo et al., 2007; Houde and Diallo, 2008).

Sasaki y sus colaboradores (2002) describieron el homólogo de *MDR4* en trigo, *MDR1*. Su expresión también se induce en raíz en presencia de aluminio. A diferencia de centeno, se expresa en cultivares tolerantes y sensibles, pero la concentración requerida para esta inducción es menor en cultivares sensibles, indicando que la acumulación de su mRNA está asociada a la toxicidad por aluminio y no a la tolerancia. Esta afirmación se corresponde con los datos obtenidos en el análisis del “microarray”. Por otra parte, *MDR1* pertenece a la superfamilia de transportadores ABC, que ya ha sido relacionada con la respuesta a estrés por aluminio previamente (Guo et al., 2007). Además, Sasaki y su grupo vieron que la deficiencia de calcio también inducía la expresión del gen, y sugirieron que la ruptura de la homeostasis de calcio debida a la toxicidad por aluminio podría ser el inductor del gen, lo cual confirmaría que la función de *MDR1* es aliviar efectos indirectos del aluminio.

Con la intención de estudiar el papel de los seis genes candidatos en *Arabidopsis*, se buscaron sus homólogos en esta especie. Se analizaron sus patrones de expresión en el “Arabidopsis eFP Browser” (BAR) y se decidió que los seis eran adecuados para continuar su estudio, en tres de los casos porque la expresión máxima del gen se detectaba en raíz, y en el resto porque se creyó que la función o la localización celular podrían estar relacionadas con la tolerancia al aluminio (tabla 10 -resultados-). Se comprobó que todos los genes candidatos tuvieron expresión en la raíz, a pesar de que para alguno de los seis no fuera el lugar de expresión máxima.

Las líneas *bHLH51*, *CDT1*, *HIN1*, *LEA* y *Aqua* sembradas en el medio de Ryan mostraron un tamaño inferior al de Columbia independientemente de la concentración de aluminio. Esto parecía indicar que ninguna de ellas participa en la tolerancia al aluminio.

Al tratarse de genes candidatos expresados en raíz, que se sobreexpresaban en presencia de aluminio (al menos en centeno), pero que no parecían tener un papel en la tolerancia al aluminio, se decidió indagar sobre su posible función mediante el análisis de su expresión en *Arabidopsis* bajo diferentes condiciones. Se utilizó el programa “GEO Profiles” (NCBI) y se miró el efecto de distintos estreses no sólo en las cinco

Discusión y conclusiones

líneas de T-DNA estudiadas, sino en los siete candidatos originales: *bHLH51*, *CDT1*, *MDR4*, *HIN1*, *LEA*, *Aqua* y *ABA* (tabla 1 -material y métodos-).

A pesar de que no se trabajó con la línea *MDR4*, su fenotipo ya había sido descrito. Es un mutante de inserción de T-DNA con la flexión gravitrópica y elongación de la raíz reducidas, y tiene menor formación de raíces laterales. La menor elongación de la raíz depende de la intensidad de la luz y de la sacarosa (Terasaka et al., 2005).

En la tabla 13 se resume la caracterización de los genes candidatos en varios trabajos.

CDT1 no aparecía en ninguno de los trabajos, es más, no había ningún estudio en la base de datos "GEO Profiles" en el que apareciera. Parece tratarse de un gen muy poco estudiado. *CDT1* (Cadmium tolerance 1) es una pequeña proteína, de 49 aminoácidos, que se sitúa en las membranas citoplasmáticas y en la pared celular. Es rica en cisteínas (11 residuos conservados respecto a sus homólogos en arroz y *Digitaria*), residuos que se encuentran en alto porcentaje en componentes que participan en la detoxificación de metales pesados, como fitoquelatinas y metalotioneínas. Se cree que esta proteína confiere tolerancia al cadmio, mediante su quelación (Matsuda et al., 2009).

Por otro lado, *Aqua* es un gen cuya expresión a penas varía en diferentes condiciones; además de los diferentes estreses arriba mencionados se miró su expresión en hojas en respuesta a áfidos o a estrés oxidativo, en raíz tratada con luz roja y en plantas tratadas con péptidos inductores de necrosis y etileno, y su nivel de expresión fue siempre muy similar. El análisis *in silico* de los candidatos (tabla 9 -resultados-) indicó que *Aqua* pertenece a la familia TIP (Tonoplast Intrinsic Proteins). Estas proteínas facilitan el transporte de agua y pequeñas moléculas, como CO₂, H₂O₂ o amonio, a través de la membrana de la vacuola. Se les atribuyen roles en la homeostasis celular y el señalamiento (Maurel et al., 2009). Los miembros de esta familia se expresan en tejidos específicos y fases del desarrollo concretas, lo cual explica que no se expresara en ninguna de las condiciones analizadas en este trabajo. *Aqua* pertenece al subgrupo TIP 3;1 (α TIP), que se encuentran presentes en las vacuolas de almacenamiento de proteínas (Jauh et al., 1999; Paris et al., 1996), y se acumulan durante la maduración del embrión y la germinación de la semilla (Hunter et al., 2007).

Tanto *CDT1* como *Aqua* presentaban características que los convertían en candidatos aptos a genes de respuesta al aluminio; capacidad de detoxificar metales pesados y participación en la homeostasis celular, respectivamente. No obstante, sus respectivos

mutantes de inserción de T-DNA en *Arabidopsis* no mostraron una respuesta diferencial en presencia de aluminio, lo cual los descartó como candidatos.

De los datos de las tablas 10 (resultados) y 13 (discusión) puede deducirse que *bHLH51*, *MDR4*, *HIN1*, *LEA* y *ABA* son genes que se inducen bajo diferentes circunstancias y probablemente participan en la respuesta a diversos estreses. Además, sus correspondientes mutantes de inserción de T-DNA no tuvieron diferencias en la reducción del crecimiento respecto al control en presencia de aluminio. Estos datos sugieren que posiblemente no sean genes de tolerancia al aluminio. Sin embargo, podría tratarse de genes de respuesta a estrés, lo cual se corresponde con los resultados obtenidos para sus homólogos en centeno.

En *Arabidopsis* *bHLH51* forma parte de una superfamilia de factores de transcripción que se unen al DNA en forma de dímeros. Son capaces de formar tanto homodímeros como heterodímeros, lo que les proporciona el potencial para participar en muchas interacciones, capacitándolos para regular diferentes programas transcripcionales (Toledo-Ortiz et al., 2003). Se cree que *MDR4* podría ser un transportador constitutivo de auxinas implicado en la homeostasis celular de auxinas (Cho et al., 2012). *HIN1* y *LEA* participan en la respuesta hipersensible provocada por una cepa avirulenta del virus del mosaico del pepino (CMV), y los transcritos de *HIN1* se acumulan de manera asociada a la senescencia que provoca en las hojas (Zheng et al., 2004; Zheng et al., 2005). *ABA* posee un dominio GRAM, que se encuentra en glucosiltransferasas, miotubulinas y otras proteínas asociadas a membrana. A pesar de que las funciones de la mayoría de estas proteínas GRAM se desconocen, exhiben patrones de expresión diferentes dependiendo del tejido y ante diversos estreses bióticos y abióticos. Se piensa que cada miembro podría estar especializado en un tipo de tejido o estrés y regularía la señalización hormonal (Jiang et al., 2008).

Tabla 13: Factores que inducen la expresión de los genes candidatos en *Arabidopsis*. Se indica si se induce (I), el nivel de inducción (bajo=↓, o alto=↑), o si se reprime (R). Los guiones señalan falta de datos. En algunos casos la expresión no varía (=). Los resultados sobre oligomicina, frío, nitrógeno, peróxido de hidrógeno, ácido salicílico, retenona, cloranfenicol y flagelina se obtuvieron del estudio “Abiotic stress-inducing agents on suspension cell cultures”(Lister et al., 2004; Clifton et al., 2005); los de estrés salino de “Whole seedling roots response to salinity stress: time course”(Dinneny et al., 2008); los de hipoxia de “Hypoxia effect on seedlings”(Branco-Price et al. 2005); los de estrés hídrico de “mRNA translation and dehydration stress”(Kawaguchi et al., 2005); los de estrés lumínico de “High light stress effect on cell suspension cultures containing functional chloroplasts”(González-Pérez et al., 2011); los de selenato de “Selenate effect on roots”(Van Hoewyk et al. 2008); y los de deficiencia de fosfato de “Phosphate deficiency effect on roots: time course” (Lin et al, 2011).

Factor	<i>bHLH51</i>	<i>CDT1</i>	<i>MDR4</i>	<i>HIN1</i>	<i>LEA</i>	<i>Aqua</i>	<i>ABA</i>
Oligomicina	I	-	I	=	I↓	=	=
Frío (10°C)	I	-	=	=	=	=	=
N ₂	I	-	I	=	=	=	=
H ₂ O ₂	=	-	I	=	=	=	=
Ac. salicílico	I	-	I	=	=	=	=
Retenona	=	-	I	=	I↓	=	I↓
Cloranfenicol	=	-	=	=	I↓	=	=
Flagelina	=	-	=	=	=	=	I↓
Estrés salino	=	-	R (con el tiempo)	I↓	=	=	I (más a 1h)
Hipoxia	I	-	I↑	I	I↓	=	I↑
Estrés hídrico	=	-	=	=	R	=	I↑
Estrés lumínico	=	-	=	I	=	=	I
Selenato	=	-	I	=	=	=	I
Deficiencia P _i	=	-	I (a las 24h)	=	=	=	=

Los seis candidatos tienen funciones en *Arabidopsis* que podrían estar relacionadas con la respuesta al estrés por aluminio, y sin embargo, sus mutantes de inserción de T-DNA no mostraban una respuesta diferente en presencia de aluminio (figura 16 -resultados-). Esto podría deberse a que existe redundancia génica. Por ello, se miró si *bHLH51*, *CDT1*, *MDR4*, *HIN1*, *LEA*, *Aqua* y *ABA* eran genes de copia única en “Conserved Orthologs in Plants (Arabidopsis Single Copy Genes)”. Resultó que todos eran genes de copia única, excepto *CDT1* (probablemente porque es un gen no caracterizado). Por lo tanto, la ausencia de un fenotipo de sensibilidad al aluminio en los mutantes de inserción de T-DNA podría estar causada porque exista otro gen que complementa su función o porque en *Arabidopsis* es otro gen el que la cumple (y no el homólogo del gen de centeno).

Tomando en conjunto los datos obtenidos sobre los seis candidatos tanto en *Arabidopsis* como en centeno, todo apunta a que se trata de genes de respuesta al estrés por aluminio y no de genes de tolerancia. Sin embargo, dada su capacidad para aliviar los efectos del aluminio, podrían emplearse para mejorar la tolerancia.

Cribado de líneas transgénicas en medio de cultivo con aluminio

Se disponía de una colección de líneas transgénicas pertenecientes al Proyecto Transplanta. Cada una de ellas sobreexpresaba un factor de transcripción cuya expresión estaba regulada por un promotor inducible por estradiol. Teniendo en cuenta la participación de los factores de transcripción STOP1 (Iuchi et al., 2007), ART1 (Yamaji et al., 2009) y WRKY46 (Ding et al., 2013) en la tolerancia al aluminio, el estudio de la respuesta al aluminio de esta colección de mutantes era muy prometedor.

Sin embargo, el aluminio es un elemento con una química compleja y un comportamiento difícil de estudiar incluso en las disoluciones más sencillas (Kinraide et al., 1991). Los cationes de aluminio tienden a unirse a compuestos orgánicos e inorgánicos cargados negativamente, como PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , F^- entre otros (Delhaize and Ryan, 1995), causando problemas de gelificación, gradientes de concentración, precipitación del aluminio, etc. al interactuar con los componentes del medio de cultivo.

Discusión y conclusiones

Hubo bastantes problemas de este tipo y costó mucho conseguir un medio de cultivo que sirviera para ver diferencias entre genotipos sensibles y tolerantes al aluminio comparando la longitud de las raíces. Se probaron muchos medios diferentes y variaciones, y finalmente el medio descrito por Ryan y su grupo (2007) pareció dar buenos resultados. Este medio se comprobó comparando el crecimiento de las raíces de un conocido mutante sensible al aluminio, *almt1* KO (Hoekenga et al., 2006), con el de Col a diferentes concentraciones de aluminio (0, 400, 500 y 600 μ M) y se obtuvieron diferencias significativas al comparar tanto el crecimiento total como la proporción de reducción del crecimiento (figura 15 -resultados-).

De entre las 208 líneas Transplanta se escogieron doce candidatos que mostraban diferencias respecto a Col en presencia de aluminio mediante los cribados iniciales en los medios de Ezaki y Ryan. Consultando los resultados de otros grupos que trabajan con líneas Transplanta, se eligieron tres genes de los doce, que parecían no responder a otros estreses. Con esto se pretendió que hubiera más probabilidades de que los genes estuvieran relacionados únicamente con la respuesta al aluminio.

El estradiol afecta al crecimiento de las plantas (Shore et al., 1992). Para evitar problemas de este tipo que dificultaran el análisis de los resultados, se pidieron las líneas de inserción de T-DNA de los tres genes candidatos y se analizó su comportamiento en presencia de aluminio y sin el estradiol y sus posibles efectos.

*- Related to *Apetala 2.3* (RAP2.3).*

En este trabajo se estudió este gen empleando dos líneas de inserción de T-DNA diferentes: C14 y RAP2.3. Se miró la elongación de la raíz a diferentes concentraciones de aluminio. La línea C14 mostró siempre un crecimiento similar al de Col (figura 19 -resultados-), mientras que la línea RAP2.3 presentó un escaso crecimiento independientemente de la concentración de aluminio utilizada (figura 20 -resultados-). Esta diferencia entre los fenotipos de las dos líneas podría deberse al lugar de la inserción del T-DNA, en el promotor en C14 y en un exón en RAP2.3. Es posible que la inserción en el promotor apenas afecte a la expresión del gen, mientras que la inserción en el exón reduce la expresión al 50% en este caso.

Teniendo en cuenta que el pequeño tamaño de las plantas de la línea RAP2.3 era independiente al aluminio, se decidió estudiar si era debido al pH ácido. Se sembraron RAP2.3 y Col a diferentes pHs, y a pesar de que RAP2.3 siempre era de menor tamaño, la proporción de reducción del tamaño al acidificarse el medio era la misma en las dos líneas (figura 21 -resultados-). Por lo tanto, RAP2.3 no es particularmente sensible al pH ácido.

RAP2.3 un factor de respuesta a etileno (ERF) que se localiza en el núcleo y funciona como activador transcripcional a través de cajas GCC (Büttner et al., 1997). Es parte de la ruta de señalización de etileno (asociado a la respuesta a patógenos) y su sobreexpresión en tabaco confiere resistencia a H₂O₂ y estrés por calor (Ogawa et al., 2005). Según “Arabidopsis eFP Browser” es un gen que se induce solamente por heridas en las hojas y por pH ácido en el ápice de la raíz. El programa “GEO Profiles” muestra que los distintos factores que inducen su expresión son el etileno, la sal, la retenona, el nitrógeno y el selenato en hojas; mientras que la hipoxia y la flagelina la reprimen.

Parece tratarse de un gen que cumple muchas funciones. Quizá al silenciarse parcialmente su expresión, como en la línea RAP2.3, se estén afectando distintos procesos que participan en el desarrollo de la planta, y esto podría causar una reducción del tamaño incluso en ausencia de estreses exógenos. De este modo, el hecho de que su tamaño no varíe al aumentar la concentración de aluminio no significaría que la línea es tolerante, sino que su tamaño no se reduce más porque ya ha alcanzado el tamaño mínimo para ser viable.

-Transmembrane Domain Ring H2.

Para el estudio de este gen se utilizó la línea de inserción de T-DNA que se llamó JVC41. Se analizó su crecimiento a distintas concentraciones de aluminio, y en general presentó un comportamiento bastante similar al de Col (figura 22 -resultados-).

Se trata de un gen que codifica una proteína implicada en el transporte de proteínas a las vacuolas de almacenamiento de proteínas (Park et al., 2005). Es un gen cuyos niveles de expresión son bastante constantes; sólo muestra una ligera inducción debido a altas temperaturas (38°C) en la base de datos

“Arabidopsis eFP Browser”, e inducción de su expresión por etileno y respresión de ésta en la raíz por selenato, según el programa “GEO Profiles”.

La ausencia de un fenotipo de sensibilidad al aluminio podría deberse a que el gen no participa en la respuesta a este metal o a que su efecto es compensando por algún gen homólogo. Sin embargo, otra explicación probable es que la inserción de T-DNA en el promotor no afecte a la expresión del gen, como también pasó en el caso de la línea C14.

- *Dehydration-Responsive Element Binding Protein 2 (DREB2A)*.

Se emplearon dos líneas de inserción de T-DNA para el análisis de este gen, JVC51A y JVC51D, cuyas inserciones estaban en el 3'UTR y en la región promotora, respectivamente. Ambas líneas mostraron un mayor crecimiento que Col, más evidente a medida que aumentaba la concentración de aluminio (figura 23 -resultados-).

El hecho de que las dos líneas tuvieran un fenotipo similar le daba peso a la idea de que las inserciones estaban afectando a la expresión del gen. Mediante PCR semi-cuantitativa se comprobó que se trataba de líneas “knock down” y que el aluminio inducía la expresión del gen (figura 24 -resultados-).

DREB2A es un factor de transcripción que en condiciones normales está inactivo y necesita una activación postraduccional para unirse a elementos de respuesta a deshidratación (DRE) que actúan en *cis*, y activar genes de respuesta a estrés por sequía, salinidad y calor (Sakuma et al., 2006; Sakuma et al., 2006). También se le ha relacionado con la aclimatación al frío (Maruyama et al., 2009) y la senescencia (Vainonen et al., 2012). Es una proteína que se relaciona con varios estreses, y tanto “Arabidopsis eFP Browser” como “GEO Profiles” muestran que se induce por numerosos factores y circunstancias: necrosis, selenato, hipoxia, deshidratación, sal, H₂O₂, calor, deficiencia de sulfato, frío, estrés osmótico, etc. Recientemente, se ha descrito que la expresión heteróloga de un factor de transcripción del tipo DREB2 truncado de *Eremosparton songoricum* proporciona resistencia a estrés abiótico en tabaco y levadura (Li et al., 2014).

Su participación en la respuesta a numerosos estreses, que su expresión se induzca en presencia de aluminio y que líneas con su expresión reducida ya muestren diferencias de crecimiento, son evidencias que señalan hacia una posible participación en la respuesta al aluminio. Al ser un gen que participa en la respuesta a diversos estreses puede que su función esté más relacionada con la respuesta a estrés que a la tolerancia al aluminio. Además, considerando que cuando se reduce su expresión, las plantas parecen ser más tolerantes, es probable que se trate del represor de alguna ruta de respuesta al estrés por aluminio.

Identificación y caracterización de genes relacionados con la tolerancia al aluminio en centeno

Se obtuvieron secuencias parciales de genes de las familias ALMT, MATE, ABC y NRAMP, a partir de cebadores diseñados en homólogos ya descritos en trigo, arroz y *Brachypodium* (Delhaize et al., 2007, Huang et al., 2009, Xia et al., 2010).

Se secuenciaron fragmentos de los genes *ALMT2*, *ALMT3*, *ALMT4*, *ALMT5* y *ALMT6* de la familia ALMT; *ScMATE2* de la familia MATE; *STAR1* y *STAR2* de la familia ABC; y *NRAMP1* de la familia NRAMP. En casi todos los casos se obtuvieron secuencias que no comprendían un marco de lectura completo, por lo que no fue posible analizar las relaciones filogenéticas de cada familia. Sin embargo, al introducir las secuencias en la aplicación Blast del NCBI, todas ellas mostraban una identidad nucleotídica superior al 80% con la secuencia utilizada para diseñar sus cebadores.

Se consiguió localizar *ScALMT2* en el brazo largo del cromosoma 2; *ScALMT4* en el brazo corto del cromosoma 3; y *ScMATE2* en el brazo largo del cromosoma 1. Las tres localizaciones coinciden con lo esperado según las de sus hipotéticos ortólogos y las relaciones de sintenia existentes entre centeno, trigo, cebada, *Brachypodium* y arroz (The International Brachypodium Initiative, 2010; Martis et al., 2013).

Los cebadores para obtener la secuencia de *ScALMT2* se diseñaron a partir de la secuencia de *AetALMT2*, cuyo homólogo más cercano es *HvALMT1* (Delhaize et al., 2007). La localización de *HvALMT1* es el cromosoma 2 de cebada (Gruber et al. 2010),

Discusión y conclusiones

el cual es casi completamente sinténico con el cromosoma 2 de centeno (Martis et al., 2013), donde se ha localizado *ScALMT2*.

De manera similar, la secuencia de *ScALMT4* se amplificó mediante cebadores diseñados a partir de *OsALMT1* (Delhaize et al., 2007), gen situado en el cromosoma 1 de arroz. El cromosoma 1 de arroz es sinténico con parte del cromosoma 2 de *Brachypodium* (The International Brachypodium Initiative, 2010), gran parte del cual es sinténico con el cromosoma 3 de centeno (Martis et al., 2013), donde se ubica *ScALMT4*.

De estos dos genes de centeno, únicamente *ScALMT4* coincide con la localización de un QTL de tolerancia al aluminio, *Alt2*. Ese QTL es capaz de proporcionar tolerancia al aluminio por sí mismo en triticale, y está relacionado con la secreción de ácidos orgánicos (Ma et al., 2000). Por ello, parece un buen candidato para seguir estudiando.

El diseño de los cebadores para la caracterización de *ScMATE2* se hizo a partir de las secuencias de *BdFRDL2* y *OsFRDL2*. Sin embargo, en 2010 Yokosho y sus colaboradores describieron dos homólogos de los genes *HvAACT1* y *OsFRDL2* en centeno: *ScFRDL1*, cuya expresión no se induce por aluminio pero sí por deficiencia de hierro, y *ScFRDL2*, cuya expresión aumenta en presencia de aluminio pero no por deficiencia de hierro. El primero se relacionó con nutrición de hierro y el segundo con la tolerancia al aluminio, ambos mediante la secreción de citrato. No obstante, parece que el gen *ScFRDL1*, localizado en el cromosoma 7, contribuye a la tolerancia al aluminio en algunos cruzamientos. Aunque, irónicamente, el aluminio induce su expresión en la línea sensible Riodeva y no en el cultivar tolerante Ailés (Silva-Navas et al., 2012). En trigo, también se ha comprobado que el gen ortólogo (*TaMATE1*) contribuye a la tolerancia en algunos cultivares brasileños (Tovkach et al., 2013).

El gen descrito en este trabajo, *ScMATE2*, tiene una identidad nucleotídica del 99% con el gen *ScFRDL2*. Para comprobar que se trataba del mismo gen, se miró la expresión de *ScMATE2* y al igual que la de *ScFRDL2*, se induce en presencia de aluminio (figura 28 -resultados-). El hecho de que el aluminio induzca la expresión del gen podría sugerir un posible papel de éste en la respuesta al aluminio. No obstante, *ScMATE2* se localiza en el brazo largo del cromosoma 1 (figura 27 -resultados), por lo que no co-localiza con ninguno de los QTL de tolerancia al aluminio descritos hasta hoy. Así mismo, cabe destacar que el ortólogo de *ScMATE2* es *OsFRDL2*, localizado en el cromosoma 10 de arroz (sinténico con parte del cromosoma 1 de centeno), y no el gen descrito en esta

especie relacionado con la tolerancia al aluminio, *OsFRDL4* (Yokosho et al., 2011). Recientemente, se ha descrito que la expresión de *OsFRDL2* en *Arabidopsis* provoca mayor sensibilidad a patógenos y estrés (Tiwari et al., 2014). Estas evidencias no apoyan que *ScMATE2* se trate de un gen de tolerancia.

Se estudió la expresión del gen *ScSTAR1* en centeno y los resultados apuntan a que es un gen inducible por aluminio, lo cual significa que su patrón de expresión se asemeja más al de arroz (Huang et al., 2009) que al de *Arabidopsis* (Huang et al., 2010). El hecho de que su expresión se induzca en presencia de aluminio y de que sus homólogos tengan un papel en la tolerancia al aluminio incita a pensar que *ScSTAR1* pueda tener un papel en la respuesta al aluminio. Sin embargo, algunos estudios indican que los transportadores ABC se inducen en mayor medida en los genotipos sensibles (Guo et al., 2007), y por lo tanto, su función estaría más relacionada con la respuesta al estrés por aluminio que con la tolerancia a este metal.

Los nueve genes caracterizados se buscaron en el “microarray”. Solamente *ScALMT5* y *ScSTAR1* estaban presentes, y dado que ninguno de los dos tenía un valor FDR (RankProd) -filtro de fiabilidad utilizado en este trabajo- significativo, no se pudieron analizar sus niveles de expresión en diferentes genotipos en presencia de aluminio respecto a su ausencia.

En resumen, a pesar de los problemas experimentados al usar un “microarray” de trigo para estudiar la expresión de genes en centeno y a la hora de poner a punto los medios de cultivo, a lo largo de este trabajo se han encontrado varios candidatos que podrían tener un papel en la tolerancia al aluminio: *ScALMT4* que se localiza en el mismo brazo cromosómico que un QTL de tolerancia de centeno, *ScSTAR1* que se induce en presencia de aluminio y cuyos homólogos en *Arabidopsis* y arroz participan en la respuesta a este metal, y *DREB2A*, cuya inhibición parcial hace que *Arabidopsis* responda mejor a la presencia de aluminio. Estudios adicionales de complementación de la función de mutantes KO de *Arabidopsis* con el gen de centeno podrían confirmar su participación en la tolerancia al aluminio en los casos de *ScALMT4* y *ScSTAR1*. El análisis de la expresión de genes relacionados con la tolerancia al aluminio en mutantes que no expresen *DREB2A* o que lo sobreexpresan podría esclarecer si este gen es un represor de la tolerancia al aluminio.

Conclusiones

1. La mayoría de los genes inducidos con un “fold-change” ≥ 10 son genes relacionados con la respuesta a patógenos, respuesta a estrés ambiental y transferasas.
2. Más de la mitad de los genes reprimidos están relacionados con el estrés oxidativo y la remodelación de la pared.
3. A grandes rasgos, parece que la inducción y represión de genes va dirigida a hacer frente al estrés (modificando la pared celular, reduciendo el estrés oxidativo, etc.) y a evitar malgastar energía en procesos no esenciales (aclimatación al frío, vernalización, etc.).
4. El número de genes tanto inducidos como reprimidos en Chinese Spring y/o la línea de adición 6R eran más del triple que en la línea de adición 3R. Esto podría deberse a que la línea de adición 3R sea considerablemente más tolerante al aluminio que la 6R y Chinese Spring.
5. Los seis genes candidatos del “microarray”, con un “fold-change” ≥ 10 en Chinese Spring y/o la línea de adición 6R debido a la presencia de aluminio, parecen tratarse de genes de respuesta al estrés por aluminio, considerando los resultados obtenidos tanto en *Arabidopsis* como en centeno.
6. A partir del cribado de líneas transgénicas se ha encontrado el gen *DREB2A*, que posiblemente se trate de un represor de una ruta de respuesta a estrés por aluminio.
7. *DREB2A* se induce en presencia de aluminio, y su inhibición (parcial) parece conferir cierta tolerancia a este metal.
8. Entre los genes caracterizados en centeno a partir de homólogos de otras especies, *ScALMT4* y *ScSTAR1* podrían jugar un papel en la tolerancia al aluminio.
9. *ScALMT4* se localiza en el mismo brazo cromosómico que el QTL de tolerancia al aluminio *Alt2*.
10. *ScSTAR1* induce su expresión en presencia de aluminio y juega un papel en la tolerancia al aluminio en arroz y *Arabidopsis*.

11. Los mejores candidatos para estudiar más en profundidad son *DREB2A*, *ScALMT4* y *ScSTAR1*.

BIBLIOGRAFIA

- Allard, F.; Crosby, W.L.; Danyluk, J.; Eudes, F.; Frick, M. Gaudet, D.; Genswein, B., Graf, R.; Gulick, P.; Hrycan, L.D.; Laroche, A.; Links, M.G., McCarthy, E.L.; Monroy, A.; Muzak, I.; Nilson, D.; Penniket, C.; Roach, J.L.; Sarhan, F.** 2003. Functional Genomics of Abiotic Stress In Wheat and Canola Crops. *Unpublished*.
- Aniol, A.** 1981. Screening method for aluminum tolerance for cereals. *Bull IHAR*. 43:3.
- Aniol, A.; Gustafson, J.P.** 1984. Chromosome location of genes controlling aluminum tolerance in wheat, rye and triticale. *Can J Genet Cytol*. 26:701-705.
- Aniol, A.** 2004. Chromosomal location of aluminum tolerance genes in rye. *Plant Breed*. 123:132-136.
- Artimo, P.; Jonnalagedda, M.; Arnold, K.; Baratin, D.; Csardi, G.; de Castro, E.; Duvaud, S.; Flegel, V.; Fortier, A.; Gasteiger, E.; Grosdidier, A.; Hernandez, C.; Ioannidis, V.; Kuznetsov, D.; Liechti, R.; Moretti, S.; Mostaguir, K.; Redaschi, N.; Rossier, G.; Xenarios, I.; Stockinger, H.** 2012. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res*. 40:597-603.
- Basu, U.; Good, A.G.; Taylor, G.J.** 2001. Transgenic *Brassica napus* plants overexpressing aluminium-induced mitochondrial manganese superoxide dismutase cDNA are resistant to aluminium. *Plant, Cell & Environment*. 24:1278-1269.
- Blancaflor, E.B.; Jones, D.L.; Gilroy**. 1998. Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant physiology*. 118:159-72.
- Bona, L.; Wright, R.J.; Baligar, V.C.; Matuz, J.** 1993. Screening wheat and other small grains for acid soil tolerance. *Landscape and Urban Planning*. 27:175–178.
- Boscolo, P.R.; Menossi, M.; Jorge, R.A.** 2003. Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry*. 62:181-189.
- Bot, A.J.; Nachtergaele, F.O.; Young, A.** 2000. Land resource potential and constraints at regional and country levels.
- Branco-Price, C.; Kawaguchi, R.; Ferreira, R.B.; Bailey-Serres, J.** 2005. Genome-wide analysis of transcript abundance and translation in Arabidopsis seedlings subjected to oxygen deprivation. *Ann Bot*. 96:647-660.

- Büttner, M.; Singh, K.B.** 1997. Arabidopsis thaliana ethylene-responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC box DNA-binding protein interacts with an ocs element binding protein. *Proc Natl Acad Sci.* 94:5961-5966.
- Cakmak, I.; Horst, W.J.** 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum.* 83:463-468.
- Cançado, G.M.A.; Nogueira, F.T.S.; Camargo, S.R.; Drummond, R.D.; Jorge, R. A.; Menossi, M.** 2008. Gene expression profiling in maize roots under aluminum stress. *Biologia Plantarum.* 52(3):475-485.
- Carbon, S.; Ireland, A.; Mungall, C.J.; Shu, S.; Marshall, B.; Lewis, S.; AmiGO Hub; Web Presence Working Group.** 2009. AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics.* 25(2):288-289.
- Cho, M.; Lee, Z.W.; Cho, H.T.** 2012. ATP-binding cassette B4, an auxin-efflux transporter, stably associates with the plasma membrane and shows distinctive intracellular trafficking from that of PIN-FORMED proteins. *Plant Physiology.* 159(2):642-654.
- Clifton, R.; Lister, R.; Parker, K.L.; Sappl, P.G.; Elhafez, D.; Millar, A.H.; Day, D.A.; Whelan, J.** 2005. Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol.* 58:193-212.
- Collins, N.C.; Shirley, N.J.; Saeed, M.; Pallotta, M.; Gustafson, J.P.** 2008. An ALMT1 gene cluster controlling aluminum tolerance at the Alt4 locus of rye (*Secale cereale* L). *Genetics.* 179:669-682.
- Contreras, R.; Figueiras, A.M.; Gallego, F.J.; Benito, C.** 2014. Brachypodium distachyon: a model species for aluminium tolerance in Poaceae. *Functional Plant Biology* (enviado).
- Degenhardt, T.P.; Thorpe, S.R.; Baynes, J.W.** 1998. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cellular and molecular biology.* 44(7):1139-1145.
- Delhaize, E.; Craig, S.; Beaton, C. D; Bennet, R. J; Jagadish, V. C; Randall, P. J.** 1993. Aluminum Tolerance in Wheat (*Triticum aestivum* L.) (I. Uptake and Distribution of Aluminum in Root Apices). *Plant physiology.* 103(3):685-693.

- Delhaize, E.; Ryan, P. R.; Randall, P. J.** 1993. Aluminum Tolerance in Wheat (*Triticum aestivum* L.) (II. Aluminum-Stimulated Excretion of Malic Acid from Root Apices). *Plant physiology*. 103(3):695-702.
- Delhaize E.; Ryan P.R.** 1995. Aluminum Toxicity and Tolerance in Plants. *Plant physiology*. 107:315-321.
- Delhaize, E.; Gruber, B.D.; Pittman, J.K; White, R.G; Leung, H; Miao, Y; Jiang, L; Ryan, P.R.; Richardson, A.E.** 2007. A role for the AtMTP11 gene of Arabidopsis in manganese transport and tolerance. *The Plant Journal*. 51: 198-210.
- Delhaize, E.; Gruber, B.D.; Ryan, P.R.** 2007. The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition. *FEBS Lett*. 581, 2255–2262.
- Delhaize, E.; James, R.A.; Ryan, P.R.** 2012. Aluminium tolerance of root hairs underlies genotypic differences in rhizosheath size of wheat (*Triticum aestivum*) grown on acid soil. *The New phytologist*. 195:609-619.
- Delhaize, E.; Ma, J.F.; Ryan, P.R.** 2012. Transcriptional regulation of aluminium tolerance genes. *Trends in plant science*. 17:341-348.
- Ding, Z.J.; Yan, J.Y.; Xu, X.Y.; Li, G.X.; Zheng S.J.** 2013. WRKY46 functions as a transcriptional repressor of ALMT1, regulating aluminum-induced malate secretion in Arabidopsis. *Plant J*. 76:825-835.
- Dinneny, J.R.; Long, T.A.; Wang, J.Y.; Jung, J.W.; Mace, D; Pointer, S.; Barron, C.; Brady, S.M.; Schiefelbein, J.; Benfey, P.N.** 2008. Cell identity mediates the response of Arabidopsis roots to abiotic stress. *Science*. 320:942-945.
- Driscoll, C.J; Jensen, N.F.** 1964. Characteristics of Leaf Rust Resistance Transferred from Rye to Wheat. *Crop Sci*. 4:372-374.
- Eticha, D.; Zahn, M.; Bremer, M.; Yang, Z.; Rangel, A.F.; Rao, I.M.; Horst, W.J.** 2010. Transcriptomic analysis reveals differential gene expression in response to aluminium in common bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. *Annals of botany*. 105:1119-1128.
- Ezaki, B.; Gardner, R.C.; Ezaki, Y.; Matsumoto, H.** 2000. Expression of aluminum-induced genes in transgenic arabidopsis plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. *Plant physiology*. 122(3):657-665.
- Ezaki, B.; Suzuki, M; Motoda, H; Kawamura, M; Nakashima, S; Matsumoto, H.** 2004. Mechanism of Gene Expression of Arabidopsis GlutathioneS-Transferase,

- AtGST1*, and *AtGST11* in Response to Aluminum Stress. *Plant physiology*. 134:1672-82.
- Famoso, A.N.; Clark, R.T.; Shaff, J.E.; Craft, E.; McCouch, S.R.; Kochian, L.V.** 2010. Development of a Novel Aluminum Tolerance Phenotyping Platform Used for Comparisons of Cereal Aluminum Tolerance and Investigations into Rice Aluminum Tolerance Mechanisms. *Plant Physiology*. 153:1678–1691.
- Flavell, R.B.; Smith, D.B.** 1977. Hyperpolymer formation during renaturation of DNA from genomes with different sequence organisation. *Nucleic acids research*. 4(7):2429-2444.
- Fontecha, G.; Silva-Navas, J.; Benito, C.; Mestres, M.A.; Espino, F.J.; Hernández-Riquer, M.V.; Gallego, F.J.** 2007. Candidate gene identification of an aluminum-activated organic acid transporter gene at the *Alt4* locus for aluminum tolerance in rye (*Secale cereale* L.). *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*. 114(2):249-60.
- Foy, C.D.; R.L. Chaney; White, M.C.** 1978. The physiology of metal toxicity in plants. *Plant physiology*. 29:511-566.
- Fujii, M.; Yokosho, K.; Yamaji, N.; Saisho, D.; Yamane, M.; Takahashi, H.; Sato, K.; Nakazono, M.; Ma, J.F.** 2012. Acquisition of aluminium tolerance by modification of a single gene in barley. *Nature communications*. 3:713.
- Furukawa, J.; Yamaji, N.; Wang, H.; Mitani, N.; Murata, Y.; Sato, K.; Katsuhara, M.; Takeda, K.; Ma, J.F.** 2007. An aluminum-activated citrate transporter in barley. *Plant & cell physiology*. 48(8):1081-1091.
- Gallego, F.J.; Benito, C.** 1997 Genetic control of aluminium tolerance in rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* 95: 393-399.
- Gallego, F.J.; Calles, C.; Benito, C.** 1998a. Molecular markers linked to the aluminum tolerance gene *Alt1* in rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* 97:1104-1109.
- Garcia-Oliveira, A.L.; Benito, C.; Prieto, P.; de Andrade Menezes, R.; Rodrigues-Pousada, C.; Guedes-Pinto, H.; Martins-Lopes, P.** 2013. Molecular characterization of *TaSTOP1* homoeologues and their response to aluminium and proton (H(+)) toxicity in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC plant biology*. 13:134.

- Garcia-Oliveira, A.L.; Martins-Lopes, P.; Tolrá, R.; Poschenrieder, C.; Tarquis, M.; Guedes-Pinto, H.; Benito, C.** 2014. Molecular characterization of TaMATE1 gene and the analysis of organic acids genes expression under Al stress in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiologia plantarum* (en prensa).
- Gish, W.; States, D.J.** 1993. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature Genet.* 3:266-272.
- González-Pérez, S.; Gutiérrez, J.; García-García, F.; Osuna, D.; Dopazo, J.; Lorenzo, Ó.; Revuelta, J.L.; Arellano, J.B.** 2011. Early transcriptional defense responses in Arabidopsis cell suspension culture under high-light conditions. *Plant physiology.* 156(3):1439-1456.
- Goujon, M.; McWilliam, H.; Li, W.; Valentin, F.; Squizzato, S.; Paern, J.; Lopez, R.** 2010. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic acids research.* 38:695-699.
- Grabski, S.; Schindler, M.** 1995. Aluminum Induces Rigor within the Actin Network of Soybean Cells. *Plant physiology.* 108:897-901.
- Green, L.S.; Rogers, E.E.** 2004. FRD3 controls iron localization in Arabidopsis. *Plant physiology.* 136(1):2523-2531.
- Grisel, N.; Zoller, S.; Künzli-Gontarczyk, M.; Lampart, T.; Münsterkötter, M.; Brunner, I.; Bovet, L.; Métraux, J.P.; Sperisen, C.** 2010. Transcriptome responses to aluminum stress in roots of aspen (*Populus tremula*). *BMC Plant Biology.* 10:185.
- Gruber, B.D.; Ryan, P.R.; Richardson, A.E.; Tyerman, S.D.; Ramesh, S.; Hebb, D.M.; Howitt, S.M.; Delhaize, E.** 2010. HvALMT1 from barley is involved in the transport of organic anions. *J Exp Bot.* 61:1455-1467.
- Guo, P.; Bai, G.; Carver, B.; Li, R.; Bernardo, A.; Baum, M.** 2007. Transcriptional analysis between two wheat near-isogenic lines contrasting in aluminum tolerance under aluminum stress. *Mol Genet Genomics.* 277:1-12.
- Haug, A.** 1984. Molecular aspects of aluminum toxicity. *Plant Sci.* 1: 345-373.
- Haug, A.; Shi, B.; Vitorello, V.** 1994. Aluminum interaction with phosphoinositide-associated signal transduction. *Arch Toxicol.* 68(1):1-7.
- Hede, A.R.; Skovmand, B.; López-Cesati, J.** 2001. Acid soils and aluminum toxicity. *Application of physiology in wheat breeding.* 1 72-182.

- Hirokawa, T.; Boon-Chieng, S.; Mitaku, S.** 1998. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics*. 14(4):378-379.
- Hoekenga, O.A.; Maron, L.G.; Piñeros, M.A.; Cançado, G.M.; Shaff, J.; Kobayashi, Y.; Ryan, P.R.; Dong, B.; Delhaize, E.; Sasaki, T.; Matsumoto, H.; Yamamoto, Y.; Koyama, H.; Kochian, L.V.** 2006. *AtALMT1*, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:9738-9743.
- Hofmann, K.; Stoffel, W.** 1993. TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. 374:166.
- Hong, F.; Breitling, R.; McEntee, C.W.; Wittner, B.S.; Nemhauser, J.L.; Chory, J.** 2006. RankProd: a bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis. *Bioinformatics*. 22:2825-2827.
- Houde, M.; Diallo, A.O.** 2008. Identification of genes and pathways associated with aluminum stress and tolerance using transcriptome profiling of wheat near-isogenic lines. *BMC genomics*. 9:400.
- Hu, C.C.; Roelfs, A.P.** 1986. Postulation of genes for stem rust resistance in 13 Chinese wheat cultivars. *Cereal Rust Bull*. 14: 68-74
- Huang, Z.Z.; Yan, X.; Jalil, A.; Norlyn, J.D.; Epstein, E.** 1992. Short-term experiments on ion transport by seedlings and excised roots: technique and validity. *Plant physiology*. 100:1914-1920.
- Huang, C.F.; Yamaji, N.; Mitani, N.; Yano, M.; Nagamura, Y.; Ma, J.F.** 2009. A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. *The Plant cell*. 21:655-667.
- Huang, C.F.; Yamaji, N.; Ma, J.F.** 2010. Knockout of a bacterial-type ATP-binding cassette transporter gene, *AtSTAR1*, results in increased aluminum sensitivity in *Arabidopsis*. *Plant physiology*. 153(4):1669-1677.
- Huang, C.F.; Yamaji, N.; Chen, Z.; Ma, J.F.** 2012. A tonoplast-localized half-size ABC transporter is required for internal detoxification of aluminum in rice. *The Plant journal: for cell and molecular biology*. 69:857-867.
- Hunter, P.R.; Craddock, C.P.; Di Benedetto, S.; Roberts, L.M.; Frigerio, L.** 2007. Fluorescent reporter proteins for the tonoplast and the vacuolar lumen identify a

- single vacuolar compartment in Arabidopsis cells. *Plant physiology*. 145:1371-1382.
- Iuchi, S.; Koyama, H.; Iuchi, A.; Kobayashi, Y.; Kitabayashi, S.; Kobayashi, Y.; Ikka, T.; Hirayama, T.; Shinozaki, K.; Kobayashi, M.** 2007. Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in Arabidopsis and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:9900-9905.
- Jauh, G.Y.; Phillips, T.E.; Rogers, J.C.** 1999. Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuolar functions. *Plant Cell*. 11:1867–1882.
- Jiang, S.Y.; Ramamoorthy, R.; Ramachandran, S.** 2008. Comparative transcriptional profiling and evolutionary analysis of the GRAM domain family in eukaryotes. *Dev Biol*. 15:314(2):418-432.
- Jones, D. L.; Kochian, L. V.** 1995. Aluminum Inhibition of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Signal Transduction Pathway in Wheat Roots: A Role in Aluminum Toxicity? *The Plant cell*. 11:1913-1922.
- Jones, D.L.; Kochian, L.V.** 1997. Aluminum interaction with plasma membrane lipids and enzyme metal binding sites and its potential role in Al cytotoxicity. *FEBS letters*. 400:51-57.
- Jones, D.L.; Blancaflor, E.B.; Kochian, L.V.; Gilroy, S.** 2006. Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. *Plant, cell & environment*. 29:1309-1318.
- Kawaguchi, R.; Bailey-Serres, J.** 2005. mRNA sequence features that contribute to translational regulation in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res*. 16:955-965.
- Kawasaki, S.; Borchert, C.; Deyholos, M.; Wang, H.; Brazille, S.; Kawai, K.; Galbraith, D.; Bohnert, H.J.** 2011. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell*. 13(4):889-905.
- Kidd, P.S.; Llugany, M.; Poschenrieder, C.; Gunsé, B.; Barceló J.** 2001. The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *Journal of experimental botany*. 52(359):1339-1352.
- Kinraide, T.B.** 1991. Identity of the rhizotoxic aluminum species. *Plant Soill*. 34:167-178.

- Kochian, L.V.** 1995. Cellular Mechanisms of Aluminum Toxicity and Resistance in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 46: 237-260.
- Kochian, L.V.; Hoekenga, O.A.; Pineros, M.A.** 2004. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual review of plant biology*. 55:459-493.
- Krogh, A.; Larsson, B.; von Heijne, G.; Sonnhammer, E.L.** 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*. 305(3):567-580.
- Kumari, M.; Taylor, G.J.; Deyholos, M.K.** 2008. Transcriptomic responses to aluminum stress in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics*. 279(4):339-357.
- Larsen, P.B.; Geisler, M.J.; Jones, C.A.; Williams, K.M.; Cancel, J.D.** 2005. ALS3 encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in Arabidopsis. *The Plant journal: for cell and molecular biology*. 41:353-363.
- Larsen, P.B.; Cancel, J.; Rounds, M.; Ochoa, V.** 2007. Arabidopsis ALS1 encodes a root tip and stele localized half type ABC transporter required for root growth in an aluminum toxic environment. *Planta*. 225:1447-1458.
- Lee, N.H.; Weinstock, K.G.; Kirkness, E.F.; Earle-Hughes, J.A.; Fuldner, R.A.; Marmaros, S.; Glodek, A.; Gocayne, J.D.; Adams, M.D.; Kerlavage, A.R.** 1995. Comparative expressed-sequence-tag analysis of differential gene expression profiles in PC-12 cells before and after nerve growth factor treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:8303-8307.
- Li, X.; Zhang, D.; Li, H.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Wood, A.J.** 2014. EsDREB2B, a novel truncated DREB2-type transcription factor in the desert legume eremosparton songoricum, enhances tolerance to multiple abiotic stresses in yeast and transgenic tobacco. *BMC Plant Biology*. 14:44 .
- Ligaba, A.; Katsuhara, M.; Ryan, P.R.; Shibusaka, M.; Matsumoto, H.** 2006. The BnALMT1 and BnALMT2 genes from rape encode aluminum-activated malate transporters that enhance the aluminum resistance of plant cells. *Plant physiology*. 142(3):1294-1303.

- Ligaba, A.; Maron, L.; Shaff, J.; Kochian, L.; Piñeros, M.** 2012. Maize ZmALMT2 is a root anion transporter that mediates constitutive root malate efflux. *Plant, cell & environment*. 35(7):1185-1200.
- Lin, W.D.; Liao, Y.Y.; Yang, T.J.; Pan, C.Y.; Buckhout, T.J.; Schmidt, W.** 2011. Coexpression-based clustering of Arabidopsis root genes predicts functional modules in early phosphate deficiency signaling. *Plant physiology*. 155(3):1383-1402.
- Liu, K.; Luan, S.** 2001. Internal aluminum block of plant inward K(+) channels. *Plant Cell*. 13(6):1453-65.
- Liu, J.; Magalhaes, J.V.; Shaff, J.; Kochian, L.V.** 2009. Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer Arabidopsis aluminum tolerance. *The Plant journal: for cell and molecular biology*. 57:389-399.
- Lister, R.; Chew, O.; Lee, M.N.; Heazlewood, J.L.; Clifton, R.; Parker, K.L.; Millar, A.H.; Whelan, J.** 2004. A transcriptomic and proteomic characterization of the Arabidopsis mitochondrial protein import apparatus and its response to mitochondrial dysfunction. *Plant physiology*. 134(2):777-789.
- Lukaszewski, K.M.; Bowsher, C.G.; Savory, P.J.; Emes, M.J.** 2001. Protein phosphorylation in pea root plastids. *Plant & cell physiology*. 42(6):642-649.
- Ma, J.F.; Hiradate, S.; Nomoto, K.; Iwashita, T.; Matsumoto, H.** 1997. Internal Detoxification Mechanism of Al in Hydrangea (Identification of Al Form in the Leaves). *Plant physiology*. 113(4):1033-1039.
- Ma J.F.; Hiradate, S.; Matsumoto, H.** 1998. High aluminum resistance in buckwheat. II. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. *Plant physiology*. 117(3):753-759.
- Ma, J.F.; Taketa, S.; Yang, Z.M.** 2000. Aluminum tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in triticale. *Plant physiology*. 122(3):687-694.
- Ma, J.F.; Hiradate, S.** 2000. Form of aluminium for uptake and translocation in buckwheat. *Fagopyrum esculentum Moench*. 211:355-360.
- Ma, J.F.; Ryan, P.R.; Delhaize, E.** 2001. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science*, 6:273-278.

- Ma, J.F.; Shen, R.; Nagao, S.; Tanimoto, E.** 2004. Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. *Plant Cell physiology*. 45(5):583-589.
- Magalhaes, J.V.; Garvin, D.F.; Wang, Y.; Sorrells, M.E.; Klein, P.E.; Schaffert, R.E.; Li L.; Kochian, L.V.** 2004. Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the poaceae. *Genetics*. 167:1905-1914.
- Magalhaes, J.V.; Liu, J.; Guimarães, C.T.; Lana, U.G.; Alves, V.M.; Wang, Y.H.; Schaffert, R.E.; Hoekenga, O.A.; Piñeros, M.A.; Shaff, J.E.; Klein, P.E.; Carneiro, N.P.; Coelho, C.M.; Trick, H.N.; Kochian, L.V.** 2007. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nature genetics*. 39(9):1156-1156.
- Maron, L.G.; Kirst, M.; Mao, C.; Milner, M.J.; Menossi, M.; Kochian, L.V.** 2008. Transcriptional profiling of aluminum toxicity and tolerance responses in maize roots. *New Phytol*. 79:116-28.
- Maron, L.G.; Piñeros, M.A.; Guimarães, C.T.; Magalhaes, J.V.; Pleiman, J.K.; Mao, C.; Shaff, J.; Belicuas, S.N.; Kochian, L.V.** 2010. Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. *The Plant journal: for cell and molecular biology*. 61:728-740
- Manickavelu, A.; Kawaura, K.; Oishi, K.; Shin-I, T.; Kohara, Y.; Yahiaoui, N.; Keller, B.; Abe, R.; Suzuki, A.; Nagayama, T.; Yano, K.; Ogihara, Y.** 2012. Comprehensive functional analyses of expressed sequence tags in common wheat (*Triticum aestivum*). *DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*. 19:165-177.
- Martis, M.M.; Zhou, R.; Haseneyer, G.; Schmutzer, T.; Vrána, J.; Kubaláková, M.; König, S.; Kugler, K.G.; Scholz, U.; Hackauf, B.; Korzun, V.; Schön, C.C.; Dolezel, J.; Bauer, E.; Mayer, K.F.; Stein, N.** 2013. Reticulate evolution of the rye genome. *Plant Cell*. 25:3685-3698.
- Maruyama, K.; Takeda, M.; Kidokoro, S.; Yamada, K.; Sakuma, Y.; Urano, K.; Fujita, M.; Yoshiwara, K.; Matsukura, S.; Morishita, Y.; Sasaki, R.; Suzuki, H.; Saito, K.; Shibata, D.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K.** 2009. Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated analysis

- of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A. *Plant physiology*. 150(4):1972-1980.
- Mattiello, L.; Kirst, M.; da Silva, F.R.; Jorge, R.A.; Menossi, M.** 2010. Transcriptional profile of maize roots under acid soil growth. *BMC plant biology*. 10:196.
- Matos, M.; Camacho, M.V.; Pérez-Flores, V.; Pernaute, B.; Pinto-Carnide, O.; Benito, C.** 2005. A new aluminum tolerance gene located on rye chromosome arm 7RS. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*. 111(2):360-369.
- Maurel, C.; Santoni, V.; Luu, D.T.; Wudick, M.M.; Verdoucq, L.** 2009. The cellular dynamics of plant aquaporin expression and functions. *Current Opinion in Plant Biology*. 12:690–698.
- Matsuda, T.; Kuramata, M.; Takahashi, Y.; Kitagawa, E.; Youssefian, S.; Kusano, T.** 2009. A novel plant cysteine-rich peptide family conferring cadmium tolerance to yeast and plants. *Plant Signal Behav.* 4(5): 419–421.
- May, C.E.; Apples, R.** 1978. Rye chromosome 2R substitution and translocation lines in hexaploid wheat. *Cereals Res. Comm.* 6:175-182.
- Metali, F.; Salim, K.A.; Burslem, D.F.** 2012. Evidence of foliar aluminium accumulation in local, regional and global datasets of wild plants. *New Phytol.* 193(3):637-649.
- Miftahudin; Scoles, G.J.; Gustafson, J.P.** 2002. AFLP markers tightly linked to the aluminum-tolerance gene Alt3 in rye (*Secale cereale* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 104(4)626-631.
- Miftahudin; Chikmawati, T.; Ross, K.; Scoles, G.J.; Gustafson, J.P.** 2005. Targeting the aluminum tolerance gene Alt3 region in rye, using rice/rye micro-colinearity. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*. 110(5):906-913.
- Milla, M.A.; Butler, E.; Huete, A.R.; Wilson, C.F.; Anderson, O.; Gustafson, J.P.** 2002. Expressed sequence tag-based gene expression analysis under aluminum stress in rye. *Plant physiology*. 130:1706-1716.
- Miyasaka SC; Hawes MC.** 2001. Possible role of root border cells in detection and avoidance of aluminum toxicity. *Plant physiology*. 125(4):1978-1987.

- Mochida, K.; Kawaura, K.; Shimosaka, E.; Kawakami, N.; Shin-I, T.; Kohara, Y.; Yamazaki, Y.; Ogihara, Y.** 2006. Tissue expression map of a large number of expressed sequence tags and its application to in silico screening of stress response genes in common wheat. *Molecular genetics and genomics: MGG*. 276:304-312.
- Muntzing, A.** 1936. Über die entstehungsweise 56-chromosomiger-Roggen-Bastarde. *Zvechtec*. 8: 188-191.
- Murashige, T.; F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Plant physiology*. 15:473-497.
- Nielsen, H.; Engelbrecht, J.; Brunak, S.; von Heijne, G.** 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*. 10:1-6.
- Ofei-Manu, P.; Wagatsuma, T.; Ishikawa, S.; Twaraya, K.** 2001. The plasma membrane strength of the root-tip cells and root phenolic-compounds are correlated with Al tolerance in several common woody plants. *Soil Sci. Plant Nutr*. 47 359–375.
- Ogawa, T.; Pan, L.; Kawai-Yamada, M.; Yu, L.H.; Yamamura, S.; Koyama, T.; Kitajima, S.; Ohme-Takagi, M.; Sato, F.; Uchimiya, H.** 2005. Functional analysis of Arabidopsis ethylene-responsive element binding protein conferring resistance to Bax and abiotic stress-induced plant cell death. *Plant physiology*. 138(3):1436-1445.
- Ozturk, Z.N.; Talamé, V.; Deyholos, M.; Michalowski, C.B.; Galbraith, D.W.; Gozukirmizi, N.; Tuberosa, R.; Bohnert, H.J.** 2002. Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Mol Biol*. 48(5-6):551-573.
- Park, M.; Lee, D.; Lee, G.J.; Hwang, I.** 2005. AtRMR1 functions as a cargo receptor for protein trafficking to the protein storage vacuole. *J Cell Biol*. 29;170(5):757-767.
- Paris, N.; Stanley, C.M.; Jones, R.L.; Rogers, J.C.** 1996 Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments. *Cell* 85: 563–572.
- Parker, D.R.; Bertsch, P.M.** 1992. Formation of the "Al₁₃" tridecameric polycation under diverse synthesis conditions. *Environ Sci Technol*. 26: 914-921.

- Pellet, D.M.; Grunes, D.L.; Kochian, L.V.** 1995. Organic acid exudation as an aluminum tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta*. 196:788-795.
- Piñeros, M.A.; Magalhaes, J.V.; Carvalho Alves, V.M.; Kochian, L.V.** 2002. The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. *Plant physiology*. 129(3):1194-1206.
- Raman, H.; Gustafson, P.** 2011. Molecular breeding of cereals for aluminum resistance. *Root Genomics*. 251-187.
- Riede, C.R.; Anderson, J.A.** 1996. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. *Crop Sci.* 36:905–909.
- Rogers, E.E.; Guerinot, M.L.** 2002. FRD3, a member of the multidrug and toxin efflux family, controls iron deficiency responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 14(8):1787-1799.
- Ryan, P.R.; Kinraide, T.B.; Kochian, L.V.** 1994. Al³⁺-Ca²⁺ interactions in aluminum rhizotoxicity. I. Inhibition of root growth is not caused by reduction of calcium uptake. *Planta* 192: 98-103.
- Ryan, P.R.; Liu, Q.; Sperling, P.; Dong, B.; Franke, S.; Delhaize, E.** 2007. A higher plant delta8 sphingolipid desaturase with a preference for (Z)-isomer formation confers aluminum tolerance to yeast and plants. *Plant physiology*. 144:1968-1977.
- Ryan, P.R.; Raman, H.; Gupta, S.; Horst, W.J.; Delhaize, E.** 2009. A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. *Plant physiology*. 149:340-51.
- Saeed, A.; Sharov, V.; White, J.; Li, J.; Liang, W.; Bhagabati, N.; Braisted, J.; Klapa, M.; Currier, T.; Thiagarajan, M.; Sturn, A.; Snuffin, M.; Rezantsev, A.; Popov, D.; Ryltsov, A.; Kostukovich, E.; Borisovsky, I.; Liu, Z.; Vinsavich, A.; Trush, V.; Quackenbush, J.** 2003. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques*. 34(2):374-378.
- Sakuma, Y.; Maruyama, K.; Osakabe, Y.; Qin, F.; Seki, M.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K.** 2006. Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell*. 18(5):1292-1309.

- Sakuma, Y.; Maruyama, K.; Osakabe, Y.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K.** 2006. Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(49):18822-18827.
- Sasaki, M.; Yamamoto, Y.; Matsumoto, H.** 1996. Lignin deposition induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Physiologia Plantarum.* 96:193-198.
- Sasaki, T.; Ezaki, B.; Matsumoto, H.** 2002. A gene encoding multidrug resistance (MDR)-like protein is induced by aluminum and inhibitors of calcium flux in wheat. *Plant & cell physiology.* 43(2):177-185.
- Sasaki, T.; Yamamoto, Y.; Ezaki, B.; Katsuhara, M.; Ahn, S.J.; Ryan, P.R.; Delhaize, E.; Matsumoto, H.** 2004. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *The Plant journal: for cell and molecular biology.* 37(5):645-653.
- Sasaki, T.; Ryan, P.R.; Delhaize, E.; Hebb, D.M.; Ogihara, Y.; Kawaura, K.; Noda, K.; Kojima, T.; Toyoda, A.; Matsumoto, H.; Yamamoto, Y.** 2006. Sequence upstream of the wheat (*Triticum aestivum* L.) ALMT1 gene and its relationship to aluminum resistance. *Plant & cell physiology.* 47(10):1343-1354
- Sawaki, Y.; Iuchi, S.; Kobayashi, Y.; Kobayashi, Y.; Ikka, T.; Sakurai, N.; Fujita, M.; Shinozaki, K.; Shibata, D.; Kobayashi, M.; Koyama, H.** 2009. STOP1 regulates multiple genes that protect arabidopsis from proton and aluminum toxicities. *Plant physiology.* 150(1):281-294.
- Schroeder, J.I.; Delhaize, E.; Frommer, W.B.; Guerinot, M.L.; Harrison, M.J.; Herrera-Estrella, L.; Horie, T.; Kochian, L.V.; Munns, R.; Nishizawa, N.K.; Tsay Y.F.; Sanders, D.** 2013. Using membrane transporters to improve crops for sustainable food production. *Nature.* 2;497(7447):60-66.
- Seki, M.; Narusaka, M.; Ishida, J.; Nanjo, T.; Fujita, M.; Oono, Y.; Kamiya, A.; Nakajima, M.; Enju, A.; Sakurai, T.; Satou, M.; Akiyama, K.; Taji, T.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Carninci, P.; Kawai, J.; Hayashizaki, Y.; Shinozaki, K.** 2002. Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J.* 31(3):279-292.

- Shore, L. S.; Kapulnik, Y.; Ben-Dor, B.; Fridman, Y.; Winger, S.; Shemesh, M.** 1992. Effects of estrone and 17 β -estradiol on vegetative growth of *Medicago sativa*. *Physiol. Plant.* 84: 217-222.
- Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T.J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Söding, J.; Thompson, J.D.; Higgins, D.G.** 2001. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology.* 7:539.
- Silva-Navas, J.; Benito, C.; Téllez-Robledo, B.; Abd El-Moneim, D.; Gallego, F.J.** 2012. The *ScAACT1* gene at the *Q alt5* locus as a candidate for increased aluminum tolerance in rye (*Secale cereale* L.). *Molecular Breeding.* 30:(2)845-856.
- Simoës, C.C.; Melo, J.O.; Magalhaes, J.V.; Guimaraes, C.T.** 2012. Genetics and molecular mechanisms of aluminum tolerance in plants. *Genetics and Molecular Research,* 11: 1949-1957.
- Steward, D.M.; Gilmore, E.C.; Ausemus, E.R.** 1968. Resistance to *Puccinia graminis* derived from *Secale cereale* incorporated into *Triticum aestivum*. *Phytopathology.* 58: 508-511.
- Tahara, K.; Hashida, K.; Otsuka, Y.; Ohara, S.; Kojima, K.; Kenji Shinohara, K.;** 2014. Identification of a Hydrolyzable Tannin, Oenothin B, as an Aluminum-Detoxifying Ligand in a Highly Aluminum-Resistant Tree, *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Physiology.* 164: 683–693.
- Takeda, K.; Kariuda, M.; Itoi, H.** 1985. Blueing of sepal colour of *hydrangea macrophylla*. *Phytochemistry.* 24:2251–2254.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution,* 24:1596-1599.
- Taylor, G.J.** 1991. Current views of the aluminum stress response: the physiological basis of tolerance. *Curr Top Plant Biochem Physiol.* 10:57-93.
- Terasaka, K.; Blakeslee, J.J.; Titapiwatanakun, B.; Peer, W.A.; Bandyopadhyay, A.; Makam, S.N.; Lee, O.R.; Richards, E.L.; Murphy, A.S.; Sato, F.; Yazaki, K.** 2005. PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Cell.* 17(11):2922-1939.

- The International Brachypodium Initiative.** 2010. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature*. 463, 763-768.
- Tiwari, M.; Sharma, D.; Singh, M.; Tripathi, R.D.; Trivedi, P.K.** 2014. Expression of OsMATE1 and OsMATE2 alters development, stress responses and pathogen susceptibility in *Arabidopsis*. *Sci Rep*. 4;4:3964.
- Toledo-Ortiz, G.; Huq, E.; Quail P.H.** 2003. The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell*. 15(8):1749-1770.
- Tovkach, A.; Ryan, P.R.; Richardson, A.E.; Lewis, D.C.; Rathjen, T.M.; Ramesh, S.; Tyerman, S.D.; Delhaize, E.** 2013. Transposon-mediated alteration of TaMATE1B expression in wheat confers constitutive citrate efflux from root apices. *Plant physiology*. 161(2):880-892.
- Tsutsui, T.; Yamaji, N.; Feng Ma, J.** 2011. Identification of a cis-acting element of ART1, a C2H2-type zinc-finger transcription factor for aluminum tolerance in rice. *Plant physiology*. 156(2):925-931.
- Vainonen, J.P.; Jaspers, P.; Wrzaczek, M.; Lamminmäki, A.; Reddy, R.A.; Vaahtera, L.; Brosché, M.; Kangasjärvi, J.** 2012. RCD1-DREB2A interaction in leaf senescence and stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J*. 15;442(3):573-581.
- Van Hoewyk, D.; Takahashi, H.; Inoue, E.; Hess, A.; Tamaoki, M.; Pilon-Smits, E.A.** 2008. Transcriptome analyses give insights into selenium-stress responses and selenium tolerance mechanisms in *Arabidopsis*. *Physiol Plant*. 132(2):236-253.
- Verrier, P.J.; Bird, D.; Burla B.; Dassa, E.; Forestier, C.; Geisler, M.; Klein, M.; Kolukisaoglu, U.; Lee, Y.; Martinoia, E.; Murphy, A.; Rea, P.A.; Samuels, L.; Schulz, B.; Spalding, E.J.; Yazaki, K.; Theodoulou, F.L.** 2008. Plant ABC proteins--a unified nomenclature and updated inventory. *Trends in plant science*. 13(4):151-159.
- Von Uexkull, H.R.; Mutert, E.** 1995. Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant and Soil*. 171:1-15.
- Ward, J.A.; Ponnala, L.; Weber, C.A.** 2012. Strategies for transcriptome analysis in nonmodel plants. *Am J Bot*. 99:267-276.

- Watanabe, T.; Osaki, M.; Yoshihara, T.; Tadano, T.** 1998. Distribution and chemical speciation of aluminum in the Al accumulator plant, *Melastoma malabathricum* L. *Plant and Soil*. 201:165-173.
- Winter, D.; Vinegar, B.; Nahal, H.; Ammar, R.; Wilson, G.V.; Provart, N.J.** 2007. An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS One*. 2(8):718.
- Xia, J.; Yamaji, N.; Kasai, T.; Ma, J.F.** 2010. Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(43):18381-18385.
- Xia, J.; Yamaji, N.; Ma, J.F.** 2011. Further characterization of an aluminum influx transporter in rice. *Plant signaling & behavior*. 6(1):160-163.
- Yamaji, N.; Huang, C.F.; Nagao, S.; Yano, M.; Sato, Y.; Nagamura, Y.; Ma, J.F.** 2009. A zinc finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. *The Plant cell*. 21:3339-3349.
- Yamaguchi, M.; Sasaki, T.; Sivaguru, M.; Yamamoto, Y.; Osawa, H.; Ahn, S.J.; Matsumoto, H.** 2005. Evidence for the plasma membrane localization of Al-activated malate transporter (ALMT1). *Plant & cell physiology*. 46:812–816.
- Yamamoto, Y.; Kobayashi, Y.; Matsumoto, H.** 2001. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant physiology*. 125:199-208.
- Yang, C.H.; Crowley, D.E.** 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and environmental microbiology*. 2000 66(1):345-351.
- Yang, X.Y.; Yang, J.L.; Zhou, Y.; Piñeros, M.A.; Kochian, L.V.; Li, G.X.; Zheng, S.J.** 2011. A de novo synthesis citrate transporter, *Vigna umbellata* multidrug and toxic compound extrusion, implicates in Al-activated citrate efflux in rice bean (*Vigna umbellata*) root apex. *Plant, cell & environment*. 34:2138-2148.
- Yokosho, K.; Yamaji, N.; Ma, J.F.** 2010. Isolation and characterization of two MATE genes in rye. *Func. Plant Biol.* 37, 296-303.
- Yokosho, K.; Yamaji, N.; Ma J.F.** 2011. An Al-inducible MATE gene is involved in external detoxification of Al in rice. *Plant J*. 68:1061-1069.

- You, J.; Zhang, H.; Liu, N.; Gao, L.; Kong, L.; Yang, Z.** 2011. Transcriptomic responses to aluminum stress in soybean roots. *Genome*. 54(11):923-33.
- Yuan, Y.P.; Eulenstein, O.; Vingron, M.; Bork, P.** 1998. Towards detection of orthologues in sequence databases. *Bioinformatics*. 14:285-289.
- Zdobnov, E.M.; Apweiler, R.** 2001. InterProScan - an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics*. 17:847-848.
- Zeller, F.J.** 1973 1B/1R wheat/rye chromosome substitution and translocations. *Proc 4th Int. wheat Genet Symp.* 209-221.
- Zhang, Z.; Schwartz, S.; Wagner, L.; Miller, W.** 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol.* 7(1-2):203-214.
- Zheng, M.S.; Takahashi, H.; Miyazaki, A.; Hamamoto, H.; Shah, J.; Yamaguchi, I.; Kusano, T.** 2004. Up-regulation of Arabidopsis thaliana NHL10 in the hypersensitive response to Cucumber mosaic virus infection and in senescing leaves is controlled by signalling pathways that differ in salicylate involvement. *Planta*. 218(5):740-750.
- Zheng, M.S.; Takahashi, H.; Miyazaki, A.; Yamaguchi, K.; Kusano, T.** 2005. Identification of the cis-acting elements in Arabidopsis thaliana NHL10 promoter responsible for leaf senescence, the hypersensitive response against Cucumber mosaic virus infection, and spermine treatment. *Plant Science*. 168(2):415–422.

ANEXOS

Anexo 1:

Listado de genes inducidos en presencia de aluminio, expresados con una diferencia de >10 fold respecto al control sin aluminio en al menos uno de los genotipos. Se muestra el “fold-change” (Fold), “log signal A” (log) y el “FDR(RankProd)” (FDR) de cada gen en 3R, 6R y Chinese Spring, Probe ID, GO term, Descripción, mejor Blast de arroz, media de los fold en los distintos genotipos, proporción del fold de cada genotipo respecto a la media y en cuáles de los genotipos el fold es >10 (3R, amarillo; 6R, verde; y Chinese Spring, azul). Los genes elegidos para un análisis más profundo aparecen el rosa.

Index	Fold 3R	log 3R	FDR 3R	Fold 6R	log 6R	FDR 6R	Fold CS	log CS	FDR CS	ProbeID	GO term Process	GO term function	GO term component	Description	Best Rice BLAST	media Fold	Fold 3R/ media Fold	Fold 6R/ media Fold	Fold Cs/ media Fold	Inducido >10	
246	10,42	9,14	0	9,46	8,55	0,00087	11,17	9,28	0	CV772025	-	-	-	BLN1-1 (Bln1-1) gene [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	Os08g0331800 (36.6) Os10g0137300 (34.7) Os08g0331000 (30.4)	10,35000	1,00676	0,91401	1,07923	3R	CS
728	6,3	8,94	0,00244	12,1	9,24	0,00049	10,83	9,45	0,00075	DR741563	-	-	-	Glutathione S-transferase (Brachypodium distachyon) (Thioredoxin_like Superfamily)	Os10g0525600	9,74333	0,64660	1,24187	1,11153	6R	CS
1939	7,1	11,03	0,00152	12,62	11,57	0,00050	11,86	12,1	0,00036	TA70104_4565	-	-	-	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP) [Aegilops tauschii] (PEPCK_HprK)	Os03g0255500	10,52667	0,67448	1,19886	1,12666	6R	CS
3424	11	9,01	0	8,46	9,02	0,00078	7,69	10,19	0,00240	TA95904_4565	-	-	-	Polygalacturonase inhibitor [Triticum urartu]	Os05g0104700	9,05000	1,21547	0,93481	0,84972	3R	
3577	7,3	8,33	0,00061	13,21	10,04	0,00053	14,48	9,74	0	TA73486_4565	-	-	-	Putative cinnamyl alcohol dehydrogenase 1 [Aegilops tauschii] (MDR)	Os10g0194200	11,66333	0,62589	1,13261	1,24150	6R	CS
3790	6,43	8,98	0,00158	7,14	10,41	0,00533	14,56	11,03	0	CK202278	-	-	-	Triticum aestivum mRNA for glycosyltransferase (a1 gene)	-	9,37667	0,68574	0,76146	1,55279		CS
4457	4,05	10,48	0,01526	10,86	11,27	0,00081	6,03	11,34	0,00914	TC333195	-	-	-	predicted protein [Hordeum vulgare subsp. Vulgare]	-	6,98000	0,58023	1,55587	0,86390	6R	

Index	Fold 3R	log 3R	FDR 3R	Fold 6R	log 6R	FDR 6R	Fold CS	log CS	FDR CS	ProbeID	GO term Process	GO term function	GO term component	Description	Best Rice BLAST	media Fold	Fold 3R/ media Fold	Fold 6R/ media Fold	Fold Cs/ media Fold	Inducido >10		
4675	6,53	13,72	0,00211	8,93	13,36	0,00297	10,51	13,41	0,00060	TA53557_4565	-	-	-	Germin-like protein 8-12 [Aegilops tauschii](Cupin_2 Superfamily)	Os08g0231400	8,65667	0,75433	1,03157	1,21409			CS
5099	4,47	8,32	0,00878	10,75	8,63	0,00085	10,99	9,27	0,00021	AF442967	-	-	-	thaumatin-like protein (Triticum aestivum) (glycoside hydrolase family 64 and thaumatin-like proteins superfamily)	Os12g0630500	8,73667	0,51164	1,23045	1,25792		6R	CS
5242	11,7	8,92	0	9,88	8,38	0,00116	8,41	8,6	0,00270	TA105821_4565	-	-	-	Subtilisin-like protease [Aegilops tauschii]	Os02g0269600	9,99667	1,17039	0,98833	0,84128	3R		
5602	10,34	10,56	0	19,39	11,04	0	16,6	11,93	0	TA99238_4565	-	-	-	predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	Os02g0567800	15,44333	0,66954	1,25556	1,07490	3R	6R	CS
7612	11,02	11,2	0	31,69	11,73	0	37,15	11,69	0	CJ873852	-	-	-	Conserved hypothetical protein	Os01g0959750	26,62000	0,41397	1,19046	1,39557	3R	6R	CS
8154	4,76	10,93	0,00684	9,93	11,48	0,00090	11,93	11,2	0,00020	TA68555_4565	-	-	-	harpin induced gene 1 homolog [Oryza sativa]	Os04g0685300	8,87333	0,53644	1,11908	1,34448			CS
8899	8,05	10,59	0,00030	13,38	11,07	0,00022	11,09	10,3	0,00076	TA98876_4565	-	-	-	Subtilisin-chymotrypsin inhibitor CI-1B [Aegilops tauschii] (potato_hinibit)	Os12g0437800	10,84000	0,74262	1,23432	1,02306		6R	CS
8966	11,39	10,34	0	12,22	11,87	0,00080	8,14	11,82	0,00340	CK162115	-	-	-	Triticum aestivum mRNA for glycosyltransferase (a1 gene)	-	10,58333	1,07622	1,15465	0,76913	3R	6R	
9608	6,7	9,18	0,00082	14,11	10,03	0,00029	19,78	10,4	0	TA88134_4565	-	-	-	-	-	13,53000	0,49520	1,04287	1,46194		6R	CS
10429	24,25	12,2	0	42,03	12,47	0	26,51	12,79	0	TA77115_4565	-	-	-	Peroxidase 2 [Triticum urartu]	Os07g0639000	30,93000	0,78403	1,35887	0,85710	3R	6R	CS
10523	4,51	9,67	0,00858	12,43	9,96	0,00040	9,31	10,22	0,00080	TA72806_4565	-	-	-	glutathione transferase [Triticum aestivum]	Os10g0530600	8,75000	0,51543	1,42057	1,06400		6R	
11900	8,59	11,04	0,00019	15,95	10,4	0,00033	7,66	11,12	0,00266	BQ838002	-	-	-	predicted protein [Hordeum vulgare subsp. Vulgare]	-	10,73333	0,80031	1,48602	0,71366		6R	

Index	Fold 3R	log 3R	FDR 3R	Fold 6R	log 6R	FDR 6R	Fold CS	log CS	FDR CS	ProbeID	GO term Process	GO term function	GO term component	Description	Best Rice BLAST	media Fold	Fold 3R/ media Fold	Fold 6R/ media Fold	Fold Cs/ media Fold	Inducido >10		
12171	18,2	9,99	0	14,88	10,55	0,00027	9,14	11,46	0,00130	DR740180	-	-	-	Brachypodium distachyon fatty acyl-CoA reductase 1-like (Rossmann-fold NAD(P)(+)-binding protein superfamily)	Os08g0557800	14,07333	1,29323	1,05732	0,64946	3R	6R	
12255	7,18	9,82	0,00083	10,93	10,04	0,00077	6,05	11,16	0,00903	TA49980_4565	-	-	-	chemocyanin-like [Brachypodium distachyon] (Cu_bind_like)	Os03g0709300	8,05333	0,89156	1,35720	0,75124		6R	
12314	21,33	9,7	0	21,53	9,72	0	11,22	10,57	0	TC298541	-	-	-	proline-rich protein (Triticum aestivum)	Os05g0227600	18,02667	1,18325	1,19434	0,62241	3R	6R	CS
13219	17,05	9,49	0	10,82	8,79	0,00082	8,22	8,8	0,00160	TA57429_4565	-	-	-	T.aestivum mRNA for a proline-rich protein	Os05g0226900	12,03000	1,41729	0,89942	0,68329	3R	6R	
13277	3,81	7,78	0,02276	11,05	8,49	0,00086	9,08	8,66	0,00091	TC339932	-	-	-	BLN1-2 [Hordeum vulgare subsp. Vulgare]	Os10g0137300	7,98000	0,47744	1,38471	1,13784		6R	
13373	10,16	10,89	0	21,1	10,88	0	8,93	10,89	0,00170	CA688352	-	-	-	predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	-	13,39667	0,75840	1,57502	0,66658	3R	6R	
13512	8,78	10,44	0,00019	13,61	10,35	0,00038	6,36	11,55	0,00893	TA51171_4565	-	-	-	chemocyanin-like [Brachypodium distachyon] (Cu_bind_like)	Os03g0709300	9,58333	0,91617	1,42017	0,66365		6R	
13846	7,04	10,99	0,00148	8,9	11,15	0,00268	10,33	11,67	0,00060	TA92734_4565	-	-	-	-	-	8,75667	0,80396	1,01637	1,17967			CS
14001	12,96	9,46	0	16,99	9,16	0	6,55	8,94	0,00800	BJ226428	-	-	-	Isoflavone-7-O-methyltransferase 9 [Aegilops tauschii] (Methyltransf_2)	Os08g0169300	12,16667	1,06521	1,39644	0,53836	3R	6R	
14092	10,4	8,4	0	5,8	8,03	0,00843	7,52	8,95	0,00340	TA57430_4565	-	-	-	T.aestivum mRNA for a proline-rich protein	Os05g0226901	7,90667	1,31535	0,73356	0,95110	3R		
14487	9,78	9,99	0	15,73	10,47	0	11,94	10,85	0,00037	AF112963	GO:0006032, GO:0016998, GO:0005975	GO:0004568	-	Cht2 chitinase II precursor (Triticum aestivum) (lysozyme_like Superfamily)	Os04g0494100	12,48333	0,78344	1,26008	0,95648		6R	CS

Index	Fold 3R	log 3R	FDR 3R	Fold 6R	log 6R	FDR 6R	Fold CS	log CS	FDR CS	ProbeID	GO term Process	GO term function	GO term component	Description	Best Rice BLAST	media Fold	Fold 3R/ media Fold	Fold 6R/ media Fold	Fold Cs/ media Fold	Inducido >10		
15041	12,24	9,47	0	14,11	9,35	0,00024	4,4	8,35	0,03920	AY587018	-	-	-	pore-forming toxin-like protein Hfr-2 (Triticum aestivum) (agglutinin superfam)	-	10,25000	1,19415	1,37659	0,42927	3R	6R	
15672	7,03	9,44	0,00155	15,05	9,6	0,00031	8,83	10,6	0,00205	CJ808899	-	-	-	BURP domain-containing protein 13-like [Brachypodium distachyon](BURP Superfamily)	Os08g049680	10,30333	0,68230	1,46069	0,85700		6R	
15727	8,47	8,66	0,00017	12,42	9,43	0,00083	15,47	9,32	0	TA59313_4565	-	-	-	protein TIFY 10A-like [Brachypodium distachyon](TIFY and CCT_2 motif)	Os09g0439200	12,12000	0,69884	1,02475	1,27640		6R	CS
16215	10,59	9,19	0	10,7	10,85	0,00080	7,72	11,13	0,00480	TC342333	-	-	-	Predicted protein [Hordeum vulgare subsp. Vulgare]	-	9,67000	1,09514	1,10651	0,79835	3R	6R	
16382	7,42	11,7	0,00072	13,51	12,15	0,00041	10,72	12,03	0,00068	CK162597	-	-	-	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP) [Aegilops tauschii] (PEPCK_HprK Superfamily)	Os03g0255500	10,55000	0,70332	1,28057	1,01611		6R	CS
17064	12,4	9,47	0	35,05	9,94	0	21,23	9,6	0	TA65744_4565	-	-	-	thaumatin-like protein [Triticum aestivum] (GH64-TLP-SF superfamily)	Os12g0630500	22,89333	0,54164	1,53101	0,92734	3R	6R	CS
17143	8,49	12,05	0,00020	13,38	12,93	0,00055	14,89	12,82	0	TA74515_4565	-	-	-	cadmium tolerant 1 [Miscanthus sinensis]	Os06g0143100	12,25333	0,69287	1,09195	1,21518		6R	CS
17575	9,86	9,06	0	11,41	10,9	0,00076	7,37	11,52	0,00564	TA68760_4565	-	-	-	-	-	9,54667	1,03282	1,19518	0,77200		6R	
17646	8,61	10,76	0,00020	16,43	11,42	0	31,4	11,12	0	TA87783_4565	-	-	-	Secologanin synthase [Aegilops tauschii] (p450)	Os01g0627900	18,81333	0,45765	0,87332	1,66903		6R	CS
18553	6,33	7,98	0,00204	10,99	8,61	0,00071	15,1	9,3	0	TA86588_4565	-	-	-	glycosyltransferase [Triticum aestivum]	Os01g0959750	10,80667	0,58575	1,01696	1,39729		6R	CS

Index	Fold 3R	log 3R	FDR 3R	Fold 6R	log 6R	FDR 6R	Fold CS	log CS	FDR CS	ProbeID	GO term Process	GO term function	GO term component	Description	Best Rice BLAST	media Fold	Fold 3R/ media Fold	Fold 6R/ media Fold	Fold Cs/ media Fold	Inducido >10		
18718	4,42	7,74	0,01292	12,85	8,45	0,00056	10,27	8,41	0,00090	TC312133	GO:0006355	GO:0030528	GO:0005634 GO:0009536	Transcription factor bHLH51 [Triticum urartu](Basic helix-loop-helix dimerisation region bHLH)([Posttranslational modification, protein turnover, chaperones])	Os01g0159800	9,18000	0,48148	1,39978	1,11874		6R	CS
18719	5,08	12,58	0,00745	9,87	13,39	0,00167	10,08	13,47	0,00080	TA68627_4565	-	-	-	-	-	8,34333	0,60887	1,18298	1,20815			CS
19213	7	11,34	0,00158	12,59	11,7	0,00062	11,84	12,12	0,00036	TA70103_4565	-	-	-	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP) [Aegilops tauschii] (PEPCK_HprK)	Os03g0255500	10,47667	0,66815	1,20172	1,13013		6R	CS
19676	10,16	9,32	0	10,74	9,75	0,00117	7,35	11,13	0,00556	TA60129_4565	-	-	-	metallothionein [Triticum aestivum] (Metallothio_2)	Os01g0149800	9,41667	1,07894	1,14053	0,78053	3R	6R	
19842	8,19	8,87	0,00043	17,47	9,61	0	6,38	9,82	0,00795	TA60065_4565	-	-	-	Chitinase 1 [Triticum urartu](GH18_chitinase-like Superfamily)	Os10g0416500	10,68000	0,76685	1,63577	0,59738		6R	
20034	8,38	9,13	0,00018	6,37	10,68	0,00536	13,51	10,24	0	CK206223	-	-	-	Triticum aestivum mRNA for glycosyltransferase (a1 gene)	-	9,42000	0,88960	0,67622	1,43418			CS
21885	6,69	9,15	0,00202	14,95	10,08	0,00026	12,06	10,13	0	TC330111	-	-	-	Subtilisin-chymotrypsin inhibitor-2A [Aegilops tauschii](Potato inhibitor I family)	Os01g0615050	11,23333	0,59555	1,33086	1,07359		6R	CS
22273	6	10,87	0,00279	14,48	11,83	0,00028	18,08	11,82	0	TA54169_4565	-	-	-	ABA-responsive protein [Hordeum vulgare] (GRAM domain, PH like superfamily)	Os12g0478099	12,85333	0,46680	1,12656	1,40664		6R	CS
22478	9,85	8,89	0	25,2	9,99	0	24,86	10,42	0	TA88472_4565	-	-	-	cadmium tolerant 1 [Miscanthus sinensis] (90%)	Os06g0143100	19,97000	0,49324	1,26189	1,24487		6R	CS

Index	Fold 3R	log 3R	FDR 3R	Fold 6R	log 6R	FDR 6R	Fold CS	log CS	FDR CS	ProbeID	GO term Process	GO term function	GO term component	Description	Best Rice BLAST	media Fold	Fold 3R/ media Fold	Fold 6R/ media Fold	Fold Cs/ media Fold	Inducido >10		
22771	16,25	9,8	0	13,49	9,83	0,00023	7,81	9,16	0,00440	DR741149	-	-	-	T.aestivum mRNA for a thaumatin-like protein (GH64-TLP-SF superfamily)	Os12g0629700	12,51667	1,29827	1,07776	0,62397	3R	6R	
22796	9,76	11,36	0	13,78	11,28	0,00025	9,94	10,04	0,00086	U32431	-	-	-	PR17d precursor [Hordeum vulgare subsp. vulgare](Plant Basic Secretory Protein - BSP family-)	Os10g0490800	11,16000	0,87455	1,23477	0,89068		6R	
22929	8,07	12,73	0,00029	17,44	12,57	0	11,75	12,99	0,00052	CJ852491	-	-	-	-	-	12,42000	0,64976	1,40419	0,94605		6R	CS
24381	5,91	8,6	0,00274	13,22	8,93	0,00022	7,43	8,45	0,00343	CK217341	-	-	-	Triticum aestivum mRNA for glycosyltransferase (a1 gene)	-	8,85333	0,66755	1,49322	0,83923		6R	
25335	16,87	9,38	0	13,71	10,08	0,00030	8,41	9,46	0,00170	TA59735_4565	-	-	-	thaumatin-like protein [Triticum aestivum] (GH64-TLP-SF superfamily)	Os12g0629700	12,99667	1,29803	1,05489	0,64709	3R	6R	
25407	6,04	7,8	0,00226	17,32	8,87	0	7,93	8,73	0,00262	TC292601	-	-	-	endochitinase [Triticum aestivum] (lysozime_like superfamily)	Os06g0726100	10,43000	0,57910	1,66059	0,76031		6R	
25434	7,32	8,67	0,00041	17,25	9,62	0	18,18	9,36	0	TA93331_4565	-	-	-	predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	Os03g0559700	14,25000	0,51368	1,21053	1,27579		6R	CS
26042	8,12	13,04	0,00029	12,72	12,84	0,00048	8,7	12,42	0,00176	DR738342	-	-	-	pathogenesis-related protein [Triticum aestivum] (SRPBCC Superfamily)	Os03g0300400	9,84667	0,82464	1,29181	0,88355		6R	
27182	5,43	7,74	0,00516	8,52	8,49	0,00278	10,7	9,3	0,00060	TA68765_4565	-	-	-	-	-	8,21667	0,66085	1,03692	1,30223			CS
27663	4,34	7,84	0,01475	10,09	8,41	0,00089	9,07	8,06	0,00158	TC361150	-	-	-	predicted protein [Hordeum vulgare subsp. Vulgare]	-	7,83333	0,55404	1,28809	1,15787		6R	
27680	7,59	9,24	0,00063	24,39	10,69	0	24,27	10,9	0	TA67357_4565	-	-	-	aquaporin TIP3-1-like [Setaria italica] (MIP family)	Os10g0492600	18,75000	0,40480	1,30080	1,29440		6R	CS

Index	Fold 3R	log 3R	FDR 3R	Fold 6R	log 6R	FDR 6R	Fold CS	log CS	FDR CS	ProbeID	GO term Process	GO term function	GO term component	Description	Best Rice BLAST	media Fold	Fold 3R/ media Fold	Fold 6R/ media Fold	Fold Cs/ media Fold	Inducido >10		
28249	5,36	7,98	0,00563	9,23	9	0,00173	11,1	8,98	0,00050	TA59278_4565	-	-	-	protein TIFY 10A-like [Brachypodium distachyon](TIFY and CCT_2 motif)	Os09g0439200	8,56333	0,62592	1,07785	1,29622			CS
28393	4,78	9,96	0,00605	7,44	10,16	0,00303	10,79	9,97	0,00020	BQ838103	-	-	-	Conserved hypothetical protein	Os03g0285200	7,67000	0,62321	0,97001	1,40678			CS
30781	13,82	9,58	0	19,72	10,25	0	23,25	10,49	0	CV778567	-	-	-	Triticum aestivum partial mRNA for glycosyltransferase (pglcat6 gene)	Os09g0549600	18,93000	0,73006	1,04173	1,22821	3R	6R	CS
31814	6,62	11,21	0,00198	14,46	12,01	0,00021	16,92	12,43	0	TA54169_4565	-	-	-	ABA-responsive protein [Hordeum vulgare] (GRAM domain, PH like superfamily)	Os12g0478100	12,66667	0,52263	1,14158	1,33579		6R	CS
33026	4,18	7,61	0,01804	8,73	8,7	0,00299	10,24	8,67	0,00070	AY666013	-	GO:0005507, GO:0009055	-	Wheat cold acclimation induced protein 2-1 (Cu_bind_like)	Os06g0681200	7,71667	0,54168	1,13132	1,32700			CS
33351	10,8	9,38	0	5,61	10,36	0,01575	6,41	10,08	0,00720	TA67617_4565	-	-	-	cell number regulator 2-like [Brachypodium distachyon] (PLAC8 superfam)	Os02g0579800	7,60667	1,41981	0,73751	0,84268	3R		
33615	3,26	7,88	0,04379	8,02	10,44	0,00292	17,65	9,99	0	AB055077	GO:0006200	GO:0005524, GO:0042626	GO:0016021	Wheat multidrug resistance protein 1 homolog (ABC_membrane superfamily, ABC ATPase superfamily)	Os01g0695700	9,64333	0,33806	0,83166	1,83028			CS
34069	9,03	13,13	0,00021	12,46	13,05	0,00038	7,73	13,24	0,00447	TA53011_4565	-	-	-	pathogenesis related protein 10 [Triticum aestivum](Bet_v1-like)	Os03g0300400	9,74000	0,92710	1,27926	0,79363		6R	
34072	9,4	12,82	0,00024	13,55	12,9	0,00048	7,56	13,1	0,00397	TA53077_4565	-	-	-	pathogenesis related protein 10 [Triticum aestivum](Bet_v1-like)	Os03g0300400	10,17000	0,92429	1,33235	0,74336		6R	
35217	5,88	10,24	0,00222	7,66	11,11	0,00426	11,5	10,72	0	CJ849756	-	-	-	-	-	8,34667	0,70447	0,91773	1,37780			CS

Index	Fold 3R	log 3R	FDR 3R	Fold 6R	log 6R	FDR 6R	Fold CS	log CS	FDR CS	ProbeID	GO term Process	GO term function	GO term component	Description	Best Rice BLAST	media Fold	Fold 3R/ media Fold	Fold 6R/ media Fold	Fold Cs/ media Fold	Inducido >10		
35632	9	8,83	0,00022	12,72	9,67	0,00063	7,67	10,14	0,00427	CK162115	-	-	-	Triticum aestivum mRNA for glycosyltransferase (a1 gene)	-	9,79667	0,91868	1,29840	0,78292		6R	
36602	6,89	11,49	0,00151	14,65	12,57	0,00029	15,03	12,78	0	TA54290_4565	-	-	-	ABA-responsive protein [Hordeum vulgare] (GRAM domain, PH like superfamily)	Os12g0478100	12,19000	0,56522	1,20180	1,23298		6R	CS
37177	6,34	9,74	0,00160	7,4	9,84	0,00401	14,41	10,25	0	TA63230_4565	-	-	-	Phenylalanine ammonia-lyase [Aegilops tauschii] (Lyase_I like Superfamily)	Os04g0518400	9,38333	0,67567	0,78863	1,53570			CS
37607	10,73	9,36	0	10,07	10,21	0,00088	16,82	9,91	0	BJ212029	-	-	-	-	-	12,54000	0,85566	0,80303	1,34131	3R	6R	CS
37626	9,52	8,3	0	25,27	10,12	0	28,54	9,91	0	TC333223	-	-	-	cadmium tolerant 1 [Miscanthus sinensis] (86%)	Os06g0143100	21,11000	0,45097	1,19706	1,35197		6R	CS
38057	5,89	11,2	0,00272	13,85	12,16	0,00024	10,83	11,99	0,00070	X52472	-	-	-	proline-rich protein (Triticum aestivum)	Os05g0227600	10,19000	0,57802	1,35918	1,06281		6R	CS
38078	6,89	8,6	0,00051	19,04	9,68	0	23,75	9,79	0	TA89953_4565	-	-	-	-	-	16,56000	0,41606	1,14976	1,43418		6R	CS
38129	8,9	10,1	0,00013	10,37	10,13	0,00072	5,5	10,19	0,01447	AB114626	GO:0006508, GO:0045493	GO:0004190	-	TAXI-I Xilanase inhibitor (Triticum aestivum) (pepsin_retropepsin_like Superfamily)	Os01g0937100	8,25667	1,07792	1,25595	0,66613		6R	
38271	15,54	9,67	0	16,21	9,61	0	13,93	9,42	0	U32431	-	-	-	PR17d precursor [Hordeum vulgare subsp. vulgare](Plant Basic Secretory Protein - BSP family-)	Os10g0490801	15,22667	1,02058	1,06458	0,91484	3R	6R	CS
38553	8,71	11,6	0,00021	13,85	11,5	0,00021	14,82	11,84	0	TA90276_4565	-	-	-	-	-	12,46000	0,69904	1,11156	1,18941		6R	CS
38580	5,26	8,03	0,00677	6,39	9,01	0,00884	11,7	8,64	0,00050	CV763497	-	-	-	Triticum aestivum mRNA for glycosyltransferase (a1 gene)	Os05g0142100	7,78333	0,67580	0,82099	1,50321			CS
39156	7,85	9,91	0,00042	8,56	10,71	0,00272	10,34	10,28	0,00090	TA57488_4565	-	-	-	predicted protein [Hordeum vulgare subsp. Vulgare]	Os01g0642200	8,91667	0,88037	0,96000	1,15963			CS

Index	Fold 3R	log 3R	FDR 3R	Fold 6R	log 6R	FDR 6R	Fold CS	log CS	FDR CS	ProbeID	GO term Process	GO term function	GO term component	Description	Best Rice BLAST	media Fold	Fold 3R/ media Fold	Fold 6R/ media Fold	Fold Cs/ media Fold	Inducido >10		
39260	7,28	10,76	0,00063	10,61	11,95	0,00079	9,45	11,38	0,00072	CJ954884	-	-	-	Subtilisin-chymotrypsin inhibitor-2A [Triticum urartu] (Potato inhibitor I family)	Os12g0437800	9,11333	0,79883	1,16423	1,03694		6R	
39289	8,39	10,3	0,00022	24,15	10,62	0	36,9	10,8	0	CJ834714	-	-	-	Secologanin synthase [Aegilops tauschii] (cytochrome P450 monooxygenase family)	Os01g0627600	23,14667	0,36247	1,04335	1,59418		6R	CS
39386	3,5	7,8	0,03535	10,2	8,83	0,00175	7,67	8,47	0,00458	AY234333	-	GO:0016747	-	Wheat putative agmatine coumaroyltransferase (PLN02481 Superfamily)	Os04g0664600	7,12333	0,49134	1,43191	1,07674		6R	
39931	8,13	8,27	0,00030	12,6	8,7	0,00060	9,92	9,06	0,00085	BT009386	-	-	-	Somatic embryogenesis receptor kinase 2 [Aegilops tauschii] (Leucine rich repeat N-terminal domain 2)	Os11g0514500	10,21667	0,79576	1,23328	0,97096		6R	
40196	7,92	8,7	0,00040	20,71	9,88	0	21,58	10,36	0	TA88472_4565	-	-	-	cadmium tolerant 1 [Miscanthus sinensis]	Os06g0143100	16,73667	0,47321	1,23740	1,28938		6R	CS
40715	11,11	9,48	0	9,64	9,75	0,00075	9,52	9,74	0,00070	TA66702_4565	-	-	-	predicted protein [Hordeum vulgare subsp. Vulgare]	Os01g0910900	10,09000	1,10109	0,95540	0,94351	3R		
42136	5,2	8,71	0,00517	12,71	10,04	0,00051	11,37	10,24	0,00049	TA81806_4565	-	-	-	cadmium tolerant 1 [Miscanthus sinensis]	Os06g0143100	9,76000	0,53279	1,30225	1,16496		6R	CS
42447	10,27	11,27	0	30,31	12,08	0	41,13	11,89	0	CJ873852	-	-	-	Conserved hypothetical protein	Os01g0959750	27,23667	0,37707	1,11284	1,51010	3R	6R	CS
42618	3,59	7,96	0,03603	10,37	9,37	0,00149	4,8	8,45	0,02878	TA71278_4565	-	-	-	WIR1 [Triticum aestivum]	Os04g0357700	6,25333	0,57409	1,65832	0,76759		6R	
42732	11,84	8,6	0	14,62	8,91	0,00032	7,74	8,8	0,00240	CK203276	-	-	-	Triticum aestivum mRNA for glycosyltransferase (a2a gene)	-	11,40000	1,03860	1,28246	0,67895	3R	6R	

Index	Fold 3R	log 3R	FDR 3R	Fold 6R	log 6R	FDR 6R	Fold CS	log CS	FDR CS	ProbeID	GO term Process	GO term function	GO term component	Description	Best Rice BLAST	media Fold	Fold 3R/ media Fold	Fold 6R/ media Fold	Fold Cs/ media Fold	Inducido >10		
42812	6,94	12,16	0,00156	13,97	12,07	0,00026	9,56	12,28	0,00128	DR738342	-	-	-	pathogenesis-related protein [Triticum aestivum] (SRPBCC Superfamily)	Os03g0300400	10,15667	0,68330	1,37545	0,94125		6R	
42859	6,07	9,57	0,00273	11,15	10,33	0,00091	13,44	10,45	0	TA95272_4565	-	-	-	-	-	10,22000	0,59393	1,09100	1,31507		6R	CS
43259	8,3	9,77	0,00017	9,61	10,32	0,00152	16,53	10,53	0	TA108272_4565	-	-	-	-	-	11,48000	0,72300	0,83711	1,43990			CS
43553	13,54	8,88	0	24,43	9,11	0	33,15	9,52	0	TA96871_4565	-	-	-	hypothetical protein F775_32176 [Aegilops tauschii]	Os01g0959750	23,70667	0,57115	1,03051	1,39834	3R	6R	CS
43655	6,88	11,06	0,00162	12,33	11,31	0,00074	11,75	11,53	0,00051	TC355589	-	-	-	phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP]-like [Brachypodium distachyon]	Os03g0255500	10,32000	0,66667	1,19477	1,13857		6R	CS
43657	8,36	10,46	0,00017	13,35	10,78	0,00054	16,06	11,2	0	TA85519_4565	-	-	-	Putative syntaxin-24 [Triticum urartu]	Os01g0864500	12,59000	0,66402	1,06037	1,27562		6R	CS

Anexo 2:

Listado de genes reprimidos en presencia de aluminio, expresados con una diferencia de <-10 fold respecto al control sin aluminio en al menos uno de los genotipos. Se muestra el “fold-change” (Fold), “log signal A” (log) y el “FDR (RankProd)” (FDR) de cada gen en 3R, 6R y Chinese Spring, Probe ID, GO term, Descripción, mejor Blast de arroz, media de los fold en los distintos genotipos, proporción del fold de cada genotipo respecto a la media y en cuáles de los genotipos el fold es <-10 (3R, amarillo; 6R, verde; y Chinese Spring, azul).

Index	Fold 3R	log 3R	FDR 3R	Fold 6R	log 6R	FDR 6R	Fold CS	log CS	FDR CS	ProbeID	GO Process	GO Function	GO Component	Best Rice BLAST	Description	media Fold	Fold 3R/ media Fold	Fold 6R/ media Fold	Fold Cs/ media Fold	Reprimidos <-10		
																				3R	6R	CS
9016	-12,51	9,02	0,0000	-41,12	9,08	0,0000	-24,49	8,77	0,0000	TA107785_4565				Os05g0542900	polygalacturonase precursor, putative,expressed [Triticum aestivum] (PLN03003)	-26,0400	0,4804	1,5791	0,9405	3R	6R	CS
10004	-28,67	12,2	0,0000	-89,32	11,27	0,0000	-54,71	11,6	0,0000	TA72217_4565				Os07g0676900	class III peroxidase [Triticum aestivum] (plant_peroxidase_like)	-57,5667	0,4980	1,5516	0,9504	3R	6R	CS
11295	-14,19	8,94	0,0000	-30,86	8,77	0,0000	-17,91	8,65	0,0000	TC367688		GO:0004601	GO:0009536, GO:0016023	Os07g0677200	Peroxidase 2 [Triticum urartu] (plant_peroxidase_like)	-20,9867	0,6761	1,4705	0,8534	3R	6R	CS
37450	-15,34	10,55	0,0000	-33,26	9,08	0,0000	-17,74	9,2	0,0000	TA86488_4565				-	hypothetical protein F775_26526 [Aegilops tauschii]	-22,1133	0,6937	1,5041	0,8022	3R	6R	CS
13393	-9,71	9,11	0,0000	-29,92	8,68	0,0000	-24,61	8,81	0,0000	TC354292		GO:0004601	GO:0016023	Os05g0135000	Peroxidase 2 [Triticum urartu] (plant_peroxidase_like)	-21,4133	0,4535	1,3973	1,1493		6R	CS
20201	-5,87	12,92	0,0008	-33,56	12,06	0,0000	-26,17	11,53	0,0000	AB100035	GO:0005975	GO:0008422	GO:0009507	-	Triticum aestivum TaGlu1a for beta-glucosidase (Glyco_hydro_1 Superfamily)	-21,8667	0,2684	1,5348	1,1968		6R	CS
18247	-5,65	11,76	0,0012	-24,72	10,66	0,0000	-18,66	10,72	0,0000	TC342982	GO:0007568, GO:0009740	GO:0016762, GO:0016798	GO:0016023, GO:0005737, GO:0009505, GO:0005618, GO:0009536	Os08g0240533	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 24 [Triticum urartu] (Glyco_hydrolase_16)	-16,3433	0,3457	1,5125	1,1417		6R	CS
18496	-5,3	12,43	0,0012	-26,83	11,03	0,0000	-29,83	11,12	0,0000	TA103005_4565				-	Vacuolar-processing enzyme [Aegilops tauschii]	-20,6533	0,2566	1,2991	1,4443		6R	CS

Index	Fold 3R	log 3R	FDR 3R	Fold 6R	log 6R	FDR 6R	Fold CS	log CS	FDR CS	ProbeID	GO Process	GO Function	GO Component	Best Rice BLAST	Description	media Fold	Fold 3R/ media Fold	Fold 6R/ media Fold	Fold Cs/ media Fold	Reprimidos <-10	
8889	-5,17	10,07	0,0015	-25,57	9,08	0,0000	-24,59	8,71	0,0000	CJ848938				Os12g0571400	Setaria italica uncharacterized LOC101772120 (LOC101772120), mRNA	-18,4433	0,2803	1,3864	1,3333	6R	CS
31659	-4,84	10,77	0,0040	-31,77	10,18	0,0000	-38,43	9,52	0,0000	TA60092_4565				Os07g0677500	peroxidase [Triticum aestivum] (plant_peroxidase_like)	-25,0133	0,1935	1,2701	1,5364	6R	CS
28712	-4,85	12,58	0,0043	-22,91	11,89	0,0000	-18,66	11,27	0,0000	AB100035	GO:0005975	GO:0008422	GO:0009507	-	Triticum aestivum TaGlu1a for beta-glucosidase (Glyco_hydro_1 Superfamily)	-15,4733	0,3134	1,4806	1,2059	6R	CS
22184	-4,66	13,6	0,0043	-26,46	12,4	0,0000	-19,97	12,44	0,0000	AB100035	GO:0005975	GO:0008422	GO:0009507	-	Triticum aestivum TaGlu1a for beta-glucosidase (Glyco_hydro_1 Superfamily)	-17,0300	0,2736	1,5537	1,1726	6R	CS
17610	-4,41	11,69	0,0044	-31,11	10,77	0,0000	-35,3	10,51	0,0000	TA60080_4565				Os07g0677500	root peroxidase [Triticum aestivum] (plant_peroxidase_like)	-23,6067	0,1868	1,3178	1,4953	6R	CS
10021	-4,42	12,19	0,0046	-29,2	10,86	0,0000	-22,36	10,76	0,0000	TA68004_4565				Os05g0499300	Wheat class III peroxidase (Similar to rice putative peroxidase (-18,6600	0,2369	1,5648	1,1983	6R	CS
29333	-4,16	9,47	0,0048	-23,44	9,5	0,0000	-27,08	9,29	0,0000	X53675	GO:0055114, GO:0006979	GO:0020037, GO:0004601		Os07g0677200	peroxidase [Triticum aestivum (bread wheat)]	-18,2267	0,2282	1,2860	1,4857	6R	CS
24454	-3,86	12,93	0,0091	-54,53	10,85	0,0000	-55,46	10,04	0,0000	TC361106				-	-	-37,9500	0,1017	1,4369	1,4614	6R	CS
40928	-3,84	12,27	0,0099	-55,19	10,23	0,0000	-63,92	10,1	0,0000	TA84481_4565				Os12g0198700	beta-glucosidase aggregating factor [Sorghum bicolor] (Dirigent)	-40,9833	0,0937	1,3466	1,5597	6R	CS
43552	-3,71	11,8	0,0099	-22,05	9,46	0,0000	-18,76	9,97	0,0000	TC293840				Os03g0368600	Peroxidase 2 [Triticum urartu]	-14,8400	0,2500	1,4858	1,2642	6R	CS

Index	Fold 3R	log 3R	FDR 3R	Fold 6R	log 6R	FDR 6R	Fold CS	log CS	FDR CS	ProbeID	GO Process	GO Function	GO Component	Best Rice BLAST	Description	media Fold	Fold 3R/ media Fold	Fold 6R/ media Fold	Fold Cs/ media Fold	Reprimidos <-10	
29148	-3,82	9,43	0,0079	-16,12	9,27	0,0002	-23,46	9,5	0,0000	TA82815_4565				Os04g0554500	protease inhibitor-like protein [Triticum aestivum](AAI_LTSS superfam)	-14,4667	0,2641	1,1143	1,6217	6R	CS
24903	-3,15	12,96	0,0320	-14,68	11,96	0,0002	-23,18	11,15	0,0000	X85228				Os07g0677200	Peroxidase 2 [Aegilops tauschii] (plant_peroxidase_like)	-13,6700	0,2304	1,0739	1,6957	6R	CS
652	-2,96	13,21	0,0476	-14,98	11,94	0,0002	-20,91	11,96	0,0000	X85228				Os07g0677200	Peroxidase 2 [Aegilops tauschii] (plant_peroxidase_like)	-12,9500	0,2286	1,1568	1,6147	6R	CS
32408	-3	11,33	0,0405	-15,78	10,9	0,0002	-22,6	10,37	0,0000	X85228				Os07g0677200	Peroxidase 2 [Aegilops tauschii] (plant_peroxidase_like)	-13,7933	0,2175	1,1440	1,6385	6R	CS
41121	-6,02	9,3	0,0003	-18,6	9,08	0,0002	-17,39	8,96	0,0000	TA72220_4565				Os07g0676900	Peroxidase 2 [Aegilops tauschii](plant_peroxidase_like)	-14,0033	0,4299	1,3283	1,2418	6R	CS
29396	-3,26	12,44	0,0254	-16,6	12,04	0,0002	-24,83	11,62	0,0000	X85228				Os07g0677200	Peroxidase 2 [Aegilops tauschii] (plant_peroxidase_like)	-14,8967	0,2188	1,1143	1,6668	6R	CS
36996	-4,73	12,32	0,0041	-18,46	11,71	0,0002	-25,81	11,12	0,0000	X85230	GO:0055114, GO:0006979	GO:0020037, GO:0004601		Os07g0676900	Peroxidase 2 [Aegilops tauschii]	-16,3333	0,2896	1,1302	1,5802	6R	CS
2545	-6,35	10,29	0,0000	-15,58	9,06	0,0002	-18,2	9,4	0,0000	TC366445				-	-	-13,3767	0,4747	1,1647	1,3606	6R	CS
41329	-3,47	11,92	0,0161	-18,91	11,22	0,0002	-21,21	10,72	0,0000	TC304088		GO:0004601	GO:0009536, GO:0005739, GO:0016023	Os03g0368600	Peroxidase 2 [Aegilops tauschii] (plant_peroxidase_like)	-14,5300	0,2388	1,3014	1,4597	6R	CS
1161	-6,86	9,33	0,0000	-19,43	8,67	0,0002	-23,47	9,01	0,0000	TC340412				Os07g0676900	class III peroxidase [Triticum aestivum]	-16,5867	0,4136	1,1714	1,4150	6R	CS
41404	-3,17	12,98	0,0340	-17,91	11,98	0,0002	-24,22	11,55	0,0000	TA60080_4565				Os07g0677500	root peroxidase [Triticum aestivum] (plant_peroxidase_like)	-15,1000	0,2099	1,1861	1,6040	6R	CS

Index	Fold 3R	log 3R	FDR 3R	Fold 6R	log 6R	FDR 6R	Fold CS	log CS	FDR CS	ProbeID	GO Process	GO Function	GO Component	Best Rice BLAST	Description	media Fold	Fold 3R/ media Fold	Fold 6R/ media Fold	Fold Cs/ media Fold	Reprimidos <-10		
34641	-5,19	12,3	0,0036	-20,8	11,88	0,0002	-18,03	11,87	0,0000	TA68063_4565				Os05g0499300	Triticum aestivum class III peroxidase (Prx109-C) mRNA, complete cds	-14,6733	0,3537	1,4175	1,2288		6R	CS
27594	-3,62	13,48	0,0168	-23,66	12,07	0,0003	-24,81	11,78	0,0000	CK204738	GO:0006869	GO:0008289	GO:0005739, GO:0016023	Os04g0554500	Similar to protease inhibitor -like	-17,3633	0,2085	1,3626	1,4289		6R	CS
11218	-3,85	10,17	0,0099	-21,8	8,72	0,0003	-20,14	9,07	0,0000	TC345789				-	hypothetical protein F775_09534 [Aegilops tauschii]	-15,2633	0,2522	1,4283	1,3195		6R	CS
44177	-6,25	10,9	0,0003	-22,6	9,93	0,0003	-18,63	10,17	0,0000	TA78525_4565				Os03g0368600	Peroxidase 2 [Triticum urartu] (plant_peroxidase_like)	-15,8267	0,3949	1,4280	1,1771		6R	CS
33225	-4,4	9,4	0,0042	-11,92	8,72	0,0009	-30,61	8,89	0,0000	TC331378				Os03g0102700	Expansin-B7 [Triticum urartu] (Pollen_allerg_1)	-15,6433	0,2813	0,7620	1,9567		6R	CS
7787	-7,16	9,89	0,0000	-12,43	8,81	0,0012	-18,6	8,91	0,0000	TA80866_4565				Os03g0829200	hypothetical protein F775_32452 [Aegilops tauschii]	-12,7300	0,5625	0,9764	1,4611		6R	CS
31716	-3,36	10,09	0,0187	-11,63	10,21	0,0012	-15,34	9,56	0,0000	X85230	GO:0055114, GO:0006979	GO:0020037, GO:0004601		Os07g0676900	Peroxidase 2 [Aegilops tauschii]	-10,1100	0,3323	1,1503	1,5173		6R	CS
34834	-4,57	10,5	0,0039	-9,71	8,63	0,0012	-37,15	9,39	0,0000	TA94427_4565				Os03g0102700	Expansin-B7 [Triticum urartu]	-17,1433	0,2666	0,5664	2,1670			CS
37752	-3,28	10,6	0,0226	-11,88	10,24	0,0012	-15,75	9,84	0,0002	X85230	GO:0055114, GO:0006979	GO:0020037, GO:0004601		Os07g0676900	Peroxidase 2 [Aegilops tauschii]	-10,3033	0,3183	1,1530	1,5286		6R	CS
9519	-3,13	10,28	0,0267	-19,63	8,56	0,0002	-14,64	8,39	0,0002	CJ797267				-	hypothetical protein F775_03377 [Aegilops tauschii]	-12,4667	0,2511	1,5746	1,1743		6R	CS
44130	-35,89	9,93	0,0000	-47,45	9,79	0,0000	-16,58	9,37	0,0002	CJ694923				Os09g0490400	Triticum aestivum TaGlu1d mRNA for beta-glucosidase	-33,3067	1,0776	1,4246	0,4978	3R	6R	CS
36969	-3,3	13,25	0,0211	-25,42	11,75	0,0000	-16,59	11,82	0,0002	TA97380_4565				Os10g0552800	Cortical cell-delineating protein [Triticum urartu] (AAL_LTSS)	-15,1033	0,2185	1,6831	1,0984		6R	CS
6880	-10,73	8,56	0,0000	-22,66	8,37	0,0003	-16,85	8,44	0,0002	TC352062		GO:0004601	GO:0009536, GO:0005739, GO:0016023	Os07g0638600	Peroxidase 2 [Triticum urartu] (plant_peroxidase_like)	-16,7467	0,6407	1,3531	1,0062	3R	6R	CS

Index	Fold 3R	log 3R	FDR 3R	Fold 6R	log 6R	FDR 6R	Fold CS	log CS	FDR CS	ProbeID	GO Process	GO Function	GO Component	Best Rice BLAST	Description	media Fold	Fold 3R/ media Fold	Fold 6R/ media Fold	Fold Cs/ media Fold	Reprimidos <-10		
2492	-2,88	9,86	0,0376	-17,49	9,11	0,0002	-16,96	8,78	0,0002	TC350854				-	flavanone 3-hydroxylase [Triticum aestivum] (PLN03176)	12,4433	0,2314	1,4056	1,3630		6R	CS
35081	-3,02	12,46	0,0364	-12,71	11,61	0,0013	-15,07	10,99	0,0003	AY506496	GO:0006979, GO:0055114	GO:0004601, GO:0020037, GO:0046872	-	Os07g0677500	pra2 root peroxidase [Triticum aestivum (bread wheat)] (secretory_peroxidase)	10,2667	0,2942	1,2380	1,4679		6R	CS
38424	-61,71	10,02	0,0000	-72,02	10,05	0,0000	-14,95	10,48	0,0003	BE443807				Os04g0173800	Brachypodium distachyon agglutinin isolectin 3 (ChtBD1)	49,5600	1,2452	1,4532	0,3017	3R	6R	CS
19729	-10,16	8,53	0,0000	-16,66	8,17	0,0002	-14,75	8,46	0,0003	TC334826		GO:0004601	GO:0016023	Os05g0135000	Peroxidase 2 [Triticum urartu] (plant_peroxidase_like)	13,8567	0,7332	1,2023	1,0645	3R	6R	CS
12465	-39,17	8,9	0,0000	-53,44	8,83	0,0000	-14,6	7,89	0,0004	BJ246261				Os06g0210000	GDSL esterase/lipase [Aegilops tauschii]	35,7367	1,0961	1,4954	0,4085	3R	6R	CS
44375	-9,65	9,12	0,0000	-17,12	8,42	0,0003	-15,44	8,39	0,0005	TC315712		GO:0004601	GO:0009536, GO:0005739, GO:0016023	Os07g0639000	Peroxidase 2 [Triticum urartu] (plant_peroxidase_like)	14,0700	0,6859	1,2168	1,0974		6R	CS
34329	-4,54	11,57	0,0044	-44	10,3	0,0000	-14,25	10,9	0,0005	TC317774				Os10g0546100	Extensin-like protein [Setaria italica]	20,9300	0,2169	2,1022	0,6808		6R	CS
7995	-11,46	8,54	0,0000	-8,88	9,07	0,0018	-14,69	9,95	0,0005	TA87234_4565				Os03g0368900	Peroxidase 2 [Triticum urartu] (plant_peroxidase_like)	11,6767	0,9814	0,7605	1,2581	3R		CS
1103	-6,88	8,67	0,0000	-20,16	9,2	0,0002	-13,33	10,46	0,0006	TA89402_4565				Os01g0778300	predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	13,4567	0,5113	1,4981	0,9906		6R	CS
13195	-7,86	10,44	0,0000	-34	9,46	0,0000	-13,97	9,37	0,0006	TA111511_4565				Os09g0323700	Peroxidase 57 [Aegilops tauschii] (plant_peroxidase_like)	18,6100	0,4224	1,8270	0,7507		6R	CS

Index	Fold 3R	log 3R	FDR 3R	Fold 6R	log 6R	FDR 6R	Fold CS	log CS	FDR CS	ProbeID	GO Process	GO Function	GO Component	Best Rice BLAST	Description	media Fold	Fold 3R/ media Fold	Fold 6R/ media Fold	Fold Cs/ media Fold	Reprimidos <-10		
33501	-3,26	11,84	0,0254	-4,68	11,47	0,0304	-12,58	8,75	0,0006	TA54121_4565				Os02g0302700	Nicotianamine aminotransferase A [Triticum urartu] (AAT_I)	-6,8400	0,4766	0,6842	1,8392			CS
8403	-2,94	12,42	0,0444	-13,67	11,16	0,0003	-12,32	11	0,0007	TC347082	GO:0006869	GO:0008289	GO:0005739, GO:0016023	Os04g0554600	protease inhibitor-like protein [Triticum aestivum] (AAI_LTSS superfamily)	-9,6433	0,3049	1,4176	1,2776	6R		CS
24102	-4,07	13,85	0,0097	-17,13	12,91	0,0003	-14,04	12,75	0,0007	AB100035	GO:0005975	GO:0008422	GO:0009507	-	Triticum aestivum TaGlu1a for beta-glucosidase (Glyco_hydro_1 Superfamily)	-11,7467	0,3465	1,4583	1,1952	6R		CS
2685	-16,75	9,3	0,0000	-34,12	9,34	0,0000	-13,62	9,69	0,0007	CJ803025				Os04g0223500	Brachypodium distachyon probable flavin-containing monooxygenase 1-like (LOC100841913), mRNA	-21,4967	0,7792	1,5872	0,6336	3R	6R	CS
19653	-8,88	10,64	0,0000	-9	11,05	0,0041	-14,06	10,53	0,0007	DR741323				-	Triticum aestivum cold-responsive protein (Wlt10) mRNA, complete cds	-10,6467	0,8341	0,8453	1,3206			CS
15246	-4,38	9,95	0,0047	-20	9,32	0,0002	-12,66	9,3	0,0008	TC321051			GO:0005739, GO:0016023	Os05g0499300	Peroxidase 2 [Triticum urartu] (plant_peroxidase_like)	-12,3467	0,3548	1,6199	1,0254	6R		CS
15837	-17,1	9,06	0,0000	-18,02	9,23	0,0002	-12,1	9,04	0,0009	TA108352_4565				Os03g0738600	Lipoxygenase 2 [Triticum urartu] (Lipoxygenase)	-15,7400	1,0864	1,1449	0,7687	3R	6R	CS
29619	-6,46	8,43	0,0000	-15,14	8,3	0,0003	-12,77	8,49	0,0009	TC320749				-	-	-11,4567	0,5639	1,3215	1,1146	6R		CS
3825	-3,08	10,97	0,0262	-16,44	10,27	0,0003	-12,43	10,44	0,0011	TA80031_4565				Os05g0461600	predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	-10,6500	0,2892	1,5437	1,1671	6R		CS
9159	-3,13	10,74	0,0265	-12,96	9,88	0,0012	-11,76	9,25	0,0011	CV763406				Os07g0677500	class III peroxidase [Triticum aestivum] (secretory_peroxidase)	-9,2833	0,3372	1,3961	1,2668	6R		CS

Index	Fold 3R	log 3R	FDR 3R	Fold 6R	log 6R	FDR 6R	Fold CS	log CS	FDR CS	ProbeID	GO Process	GO Function	GO Component	Best Rice BLAST	Description	media Fold	Fold 3R/ media Fold	Fold 6R/ media Fold	Fold Cs/ media Fold	Reprimidos <-10		
13682	-3,44	11,64	0,0156	-17,11	10,49	0,0003	-10,84	10,89	0,0011	TC311622		GO:0004601	GO:0005739, GO:0016023	Os07g0638600	Peroxidase 2 [Triticum urartu] (plant_peroxidase_like)	-10,4633	0,3288	1,6352	1,0360		6R	CS
14035	-2,77	11,64	0,0471	-13,63	10,19	0,0010	-12,38	10,51	0,0011	TA91589_4565				-	hypothetical protein F775_29646 [Aegilops tauschii]	-9,5933	0,2887	1,4208	1,2905		6R	CS
35749	-3,39	10,69	0,0162	-10,28	9,84	0,0013	-10,6	9,7	0,0011	CJ776830				-	hypothetical protein F775_26884 [Aegilops tauschii]	-8,0900	0,4190	1,2707	1,3103		6R	CS
37633	-4,57	12,45	0,0046	-12,07	12,17	0,0012	-12,72	11,53	0,0011	TA55840_4565				Os12g0198700	hypothetical protein F775_29169 [Aegilops tauschii] (Jacalin_like)	-9,7867	0,4670	1,2333	1,2997		6R	CS
20312	-7,57	10,24	0,0000	-16,07	9,95	0,0003	-11,43	9,67	0,0011	TA62610_4565				Os03g0692700	hypothetical protein F775_28270 [Aegilops tauschii] (DUF538)	-11,6900	0,6476	1,3747	0,9778		6R	CS
13508	-4,08	11,97	0,0060	-21,23	10,37	0,0000	-11,11	10,69	0,0011	TC302545				Os05g0499300	Peroxidase 2 [Triticum urartu] (plant_peroxidase_like)	-12,1400	0,3361	1,7488	0,9152		6R	CS
2301	-3,12	13,24	0,0321	-13,64	12,37	0,0011	-12,29	12,38	0,0012	AY506509	GO:0006979, GO:0055114	GO:0004601, GO:0020037, GO:0046872	-	Os07g0677500	Triticum aestivum root peroxidase (prc4) (secretory_peroxidase)	-9,6833	0,3222	1,4086	1,2692		6R	CS
22397	-4,74	7,93	0,0042	-6,52	8,03	0,0075	-10,73	8,73	0,0012	TA87235_4565				Os03g0368900	Peroxidase 2 [Triticum urartu] (plant_peroxidase_like)	-7,3300	0,6467	0,8895	1,4638			CS
17059	-4,07	9,99	0,0047	-12,56	9,98	0,0005	-9,88	9,42	0,0015	TA68717_4565				Os03g0690500	2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one-glucoside dioxygenase [Secale cereale]	-8,8367	0,4606	1,4214	1,1181		6R	
35965	-5,09	8,75	0,0020	-8,57	9,44	0,0027	-10,25	9,66	0,0016	TA74830_4565				Os04g0652400	putative sulfate transporter 3.3 [Triticum urartu] (STAS)	-7,9700	0,6386	1,0753	1,2861			CS

Index	Fold 3R	log 3R	FDR 3R	Fold 6R	log 6R	FDR 6R	Fold CS	log CS	FDR CS	ProbeID	GO Process	GO Function	GO Component	Best Rice BLAST	Description	media Fold	Fold 3R/ media Fold	Fold 6R/ media Fold	Fold Cs/ media Fold	Reprimidos <-10	
36325	-3,09	7,29	0,0259	-6,59	10,71	0,0102	-11,11	10,17	0,0017	CJ691708				Os03g0829200	Brachypodium distachyon epoxide hydrolase 2-like	-6,9300	0,4459	0,9509	1,6032		CS
29739	-5,04	8,73	0,0035	-17,96	8,42	0,0002	-10,24	8,37	0,0019	TC340563	GO:0009409, GO:0042538, GO:0009269	GO:0004601	GO:0005783, GO:0016023	Os07g0104600	Peroxidase 2 [Triticum urartu] (plant_peroxidase_like)	-11,0800	0,4549	1,6209	0,9242	6R	CS
1500	-4,41	8,46	0,0047	-10,55	7,93	0,0012	-9,6	8,64	0,0020	CJ804172				-	hypothetical protein F775_09719 [Aegilops tauschii]	-8,1867	0,5387	1,2887	1,1726	6R	
26302	-3,57	10,13	0,0126	-11,71	9,49	0,0011	-10,38	9,22	0,0020	CJ803796				Os01g0296700	Brachypodium distachyon beta-D-xylosidase 3-like	-8,5533	0,4174	1,3691	1,2136	6R	CS
12304	-6,2	10,17	0,0003	-22,32	8,84	0,0003	-10,62	9,13	0,0020	BE444552				-	-	-13,0467	0,4752	1,7108	0,8140	6R	CS
3300	-4,79	8,63	0,0032	-15,77	8,21	0,0003	-9,78	8,15	0,0021	TA100075_4565				Os06g0335900	Brachypodium distachyon probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 26-like (LOC100842160), mRNA (Glyco_hydrolase_16)	-10,1133	0,4736	1,5593	0,9670	6R	
40937	-7,42	10,75	0,0000	-11,05	11,28	0,0012	-9,1	11,7	0,0022	TA80988_4565				Os03g0850200	P450 [Triticum aestivum] (P450)	-9,1900	0,8074	1,2024	0,9902	6R	
40513	-3	12,55	0,0376	-10,95	12,21	0,0020	-10,86	12,02	0,0022	X85228				Os07g0677200	Peroxidase 2 [Aegilops tauschii] (plant_peroxidase_like)	-8,2700	0,3628	1,3241	1,3132	6R	CS
11642	-4,38	11,66	0,0046	-15,74	10,7	0,0003	-9,59	11,29	0,0022	TA91646_4565				-	hypothetical protein F775_10959 [Aegilops tauschii]	-9,9033	0,4423	1,5894	0,9684	6R	
19802	-4,64	10,95	0,0045	-11,77	10,46	0,0012	-9,61	8,02	0,0022	CD867013				Os11g0135000	Brachypodium distachyon protein ZINC INDUCED FACILITATOR-LIKE 1-like isoform 2	-8,6733	0,5350	1,3570	1,1080	6R	
23585	-4,54	9,02	0,0046	-13,85	8,51	0,0004	-10,63	8,18	0,0024	CJ806969				-	hypothetical protein F775_26593 [Aegilops tauschii]	-9,6733	0,4693	1,4318	1,0989	6R	CS

Index	Fold 3R	log 3R	FDR 3R	Fold 6R	log 6R	FDR 6R	Fold CS	log CS	FDR CS	ProbeID	GO Process	GO Function	GO Component	Best Rice BLAST	Description	media Fold	Fold 3R/ media Fold	Fold 6R/ media Fold	Fold Cs/ media Fold	Reprimidos <-10		
341	-39,84	11,13	0,0000	-29,76	10,99	0,0000	-9,52	11,62	0,0026	BJ279889				-	protein kinase superfamily protein [Zea mays]	-26,3733	1,5106	1,1284	0,3610	3R	6R	
16640	-2,75	11,51	0,0491	-10,31	10,12	0,0012	-8,63	10,69	0,0027	BE446158				Os07g0638900	Setaria italica peroxidase 2-like	-7,2300	0,3804	1,4260	1,1936		6R	
19583	-5,21	10,64	0,0016	-15,45	9,92	0,0003	-8,67	10,29	0,0032	TA100346_4565				-	-	-9,7767	0,5329	1,5803	0,8868		6R	
10080	-3,47	10,27	0,0150	-29,28	9,37	0,0000	-8,93	8,8	0,0033	TC360769				Os01g0266500	Putative isomerase [Aegilops tauschii]	-13,8933	0,2498	2,1075	0,6428		6R	
4068	-2,83	13,2	0,0472	-11,19	12,47	0,0018	-9,61	12,59	0,0033	X85228				Os07g0677200	Peroxidase 2 [Aegilops tauschii] (plant_peroxidase_like)	-7,8767	0,3593	1,4207	1,2201		6R	
10697	-14,12	10,34	0,0000	-7,41	10,3	0,0041	-9,21	9,49	0,0036	TC278715				Os12g0198700	VER2 [Triticum aestivum] (dirigent superfamily, jacalin_like superfamily)	-10,2467	1,3780	0,7232	0,8988	3R		
41915	-20,97	8,98	0,0000	-21,54	8,84	0,0000	-8,66	7,95	0,0036	TC304481				-	hypothetical protein F775_09510 [Aegilops tauschii]	-17,0567	1,2294	1,2628	0,5077	3R	6R	
10217	-6,58	11,04	0,0000	-13,18	11,16	0,0009	-7,65	11,48	0,0040	CJ727174				-	Setaria italica uncharacterized LOC101756459 (LOC101756459), mRNA	-9,1367	0,7202	1,4425	0,8373		6R	
22188	-5,43	8,63	0,0012	-15,03	8,6	0,0003	-7,99	8,37	0,0041	TC360304			GO:0005739, GO:0016023	Os01g0223200	GDSL esterase/lipase [Aegilops tauschii] (SGNH_hydrolase)	-9,4833	0,5726	1,5849	0,8425		6R	
4764	-4,09	7,96	0,0076	-10,82	7,75	0,0012	-7,66	7,87	0,0042	CJ803304				Os05g0353300	Setaria italica expansin-A17-like (Pollen_allerg_1)	-7,5233	0,5436	1,4382	1,0182		6R	
11084	-5	11,32	0,0025	-10,17	11,31	0,0017	-8,23	11,07	0,0042	TA84010_4565				Os01g0117900	Auxin-induced protein 5NG4 [Aegilops tauschii]	-7,8000	0,6410	1,3038	1,0551		6R	
17524	-3,2	8,66	0,0226	-11,99	8,02	0,0011	-7,77	7,67	0,0071	TC360306				Os02g0205200	hypothetical protein TRIUR3_31218 [Triticum urartu]	-7,6533	0,4181	1,5666	1,0152		6R	
28910	-4,59	8,07	0,0025	-10,62	7,83	0,0012	-6,87	7,88	0,0081	TC341202		GO:0004601	GO:0016023	Os05g0135000	Peroxidase 2 [Aegilops tauschii]	-7,3600	0,6236	1,4429	0,9334		6R	

Index	Fold 3R	log 3R	FDR 3R	Fold 6R	log 6R	FDR 6R	Fold CS	log CS	FDR CS	ProbeID	GO Process	GO Function	GO Component	Best Rice BLAST	Description	media Fold	Fold 3R/ media Fold	Fold 6R/ media Fold	Fold Cs/ media Fold	Reprimidos <-10		
34758	-3,68	8,35	0,0102	-10,77	7,97	0,0012	-6,15	8,15	0,0094	TC367923				Os07g0638900	Peroxidase 2 [Triticum urartu]	-6,8667	0,5359	1,5684	0,8956		6R	
42374	-3,76	10,09	0,0097	-10,27	9,18	0,0013	-5,23	10,11	0,0169	TC350564	GO:0006869	GO:0008289	GO:0005739, GO:0016023	Os10g0552100	protease inhibitor-like protein [Triticum aestivum] (AAI_LTSS)	-6,4200	0,5857	1,5997	0,8146		6R	
37217	-5,49	9,64	0,0015	-14,46	9,07	0,0010	-5,44	7,83	0,0197	DQ872384				Os04g0472200	fasciclin-like protein FLA11 [Triticum aestivum] (Fasciclin Superfamily)	-8,4633	0,6487	1,7085	0,6428		6R	
30204	-8,47	8,6	0,0000	-12,14	8,53	0,0010	-5,01	8,24	0,0253	DR740945				Os10g0349300	Cortical cell-delineating protein [Aegilops tauschii]	-8,5400	0,9918	1,4215	0,5867		6R	
7587	-5,77	8,41	0,0008	-10,39	8,32	0,0013	-4,34	7,9	0,0385	TA79877_4565				Os06g0547400	Peroxidase 52 [Aegilops tauschii] (plant_peroxidase_like)	-6,8333	0,8444	1,5205	0,6351		6R	

Anexo 3:

Secuencias de nucleótidos de las sondas de trigo del "microarray" de los candidatos elegidos utilizadas para los análisis:

- Factor de transcripción bHLH51 (Probe ID: TC312133):

TTCCACTGCGATTGAGTGAGTAGAGACTTTGCTTCTNGCATTGGTGAGGAGAAAATGGTGGCCTA
NACCAATGGCAACATGCCAGGCTCCCACTAGCGCGCCGGAGTTGTTCGTTCGTTCGTNGGGTAGGAGC
GCGACNGAGGTGAGGTCGCTGAAGGTCCATAGCGAGTCNGAGAGGCGGCGCCGGGAGAGGATCAA
TACCCACCTGGCCACGCTGAGGAGAATGATCCCTGATGCTAACCAGATGGACAAGGCCACCTTGT
TAGCTTGTGTGGTGAACCAAGTGAAGGAACTCAAGAGGAAAGCAACTGAAACCACACGATTGCAA
GCAACAGCGCCATCCCTCCGGAGGCTAACGAGATCACCGTCCATTGCTACACCGCCGCGCGGA
CAACCGGACCACGTACATTTCGTGCCACCGTCAGCTGTGACGACCGGCGGGACTCTTCCTGGGTC
TGGCCGGAGCGTTCCGTGTCTCCGGCTGAGGGTGTGAGAACAGAGACGGCCTCTCTGGGAGGC
AGGGCGAGCCATTTGTTTTGTGTTGTGCAAGGAGGGCGGCGATGTTCGGTTCGGGCTGAGGGCCAT
GGAGGGGGCGGTCCGGCAGGCGGTTGCCGAGGTTCGCTTCCCCGAGATGGTGTGCGGTGGCAGCT
CGTGGAGCAAGAGGGAGAGGATTTTAGAGGAGTGTGCCCGGTCATGTACTCCGTATAGGTCGTT
TCCTTCGGGAAGAATATTTTCAGATGGAATGCGATTGCAAATCCACACACGTCGATCGCGCCAAA
GCGAGCAAGCAGTCGAGCCAGGGTATTGGGATACCTTGAATGTGTTTGGTTTGAACCAAAAAG
GCATGGTATGTCATGGTCTCGTTCCGAACAAATAGGTTGGTTTCATTCTTGTGTTTCGTTGGAGG
TAAAAAATGTACACGGGTTTCATCATTCCCTGT

- Cadmium tolerant (Probe ID: TC333223=TC454697):

CAGTTCTTCCCTCCATAGTAACCTAACCCACCCTCTGCGAAGATGTACAACGCTCCGTCGGGGCAG
GAGATGTCTACACGGACCATGTGCAGAAGCGCCACGAGGAGAAGGGCTGCATCTACGCATGGTG
ACACACACACACACACACACACTTTGTATTTGTTTCATCCACTCTCATTCTCCCTCTGAGTT
TTGCTCTGCTCGTCTTCGTGTGCATCGGTTCGATGCAAAGGCCGAGAGAGAGAGATAAACTTTT
CTGCCATCTGAAAAATCCTCGGAGAAATCATAGAGACAGGGCAGGAAAATATCTTGGGACTGATT
CCCCTAGTAGGCTAGTACCGGTTCCCTGTTAATTCATTTGTGTTCTGTTTCATTCTCCCTTCTATG
ATGCTGCTATTATTGTTTTGACTGATATAAATGGGTGTTTCATTTGCAGCGTGTTCACGGCGCTGT
GCTGCTTCTGCTGCTACGAGACCTGTGAGTGTGCCTCGATTGCCTCTGCTGCTGCTGCAACTAA
ACCAGCCATGGTCACCATGGACGGACAGACGGACGGAGAAAGGTGCAGCGCGAGATCGAGCGGCC
TGCACTGCTGTTAATTATCCCCCAAAAAAATTTACAATTTTCGTAATAAGCTAGCTAGCAGCTTAG
CTCGATGAGAACTGTATCAGGTACCGCATAATATTATCTGCACCAGGCAACACTATCACTATAAT
CAGTT

- Multidrug Resistance Protein 1 homolog (Probe ID: AB055077):

GAGGAACCACACACGGCGCAGTGCGGCCAGGCTCGTCGAGCACATCAGCACAAAGCAAGTAGCCG
CCAGGAAATGGACGCGACAGCGGAAGCTAGCAGTGGAGAAGGAGCACGCCACGCCACGGCGGAA
AAGATGACCGGCCGGAGAAGAAGGTTCCATTGCTCGGCATGTTTCAGGTACGCCGACCGCCTCGAC
ATGCTGCTCATGGTGGTTCGGCTCGCTCGGGGCGGTGGGCAACGGCGTGTCCGAGCCCCCTCATCTC
GGTCTCTTTGGAGACGTCACTCACTCCTTCGGCGAGAGCACGACCAGCACTGTCTCCCTGCTG
TCACCAAGGTTGTTCTCACTTCATATATCTGGGCATTGGGACAGCAGTTGCTTCTTTCTTTCAG
GTGGCATGCTGGACAATGGCAGGAGAAAGGCAGTCAGCCCGCATCCGTTCTTTGTACCTGAAATC
AGTTCTGAGACAAGATATTGCATTCTTCGACACAGAAATGACAACCTGGCGAAGCAGTTTCTAGAA
TGTCTAGCGATACGGTCATAATTCAAGATGCTCTTGGTGAGAAGGCAGGGAAGCTTGTACAACCT
ACATCTGCCTTCTTTGGGGGTTTTATCATAGCATTACAAAAGGCTGGCTCCTGACTCTTGTTCAT
GCTAACATCACTACCATTAGTTGCTATCGCTGGTGCAGTGTCTGCACAGATGCTAACCCGGGTTT
CTAGCAAGCGTCTAACATCGTATAGTGATGCGGCAAAACACAGTTGAACAGACAATTGGATCTATA
CGAACAGTTGTGTCCTTCAATGGTGAGAAGAAAGCTATAGAAATGTACAATAAATTCATAAAAAG
TGCATACAGGACTGTTGTTGAGGAAGGCCCTTGTCAATGGTTTTGGCATGGGCTCTGTCTTCTGCA
TCTTATTTAGCAGTTATGGCCTAGCCTTCTGGTATGGTGGAAAGCTAATCATTGACAAAGGTTAT

ACCGGAGGGAAGATCGTCACTGTTTTATTTGCCGTATTGAATGGCGCAACTTCATTAGGTAATGC
AACACCATCAATTTCTGCAATTGCGGAAGGTCAATCTGCAGCATAACAGACTGTTTGAAACGATTG
AGAGGAAGCCCAGAAATAGATTCAGATGATACCAGCGGCATGATCATGGAAAATATCAAGGGTTAT
GTTGAACTAAAGGATGTGTACTTTTCGCTACCCTGCAAGACTTGGGCAGTTAATATTAGATGGATT
GTCATTACAAGTAGCCAGTGGAACAACAATGGCCATAGTTGGAGAGAGTGGAAAGTGGCAAGTCAA
CTGTTATTAGCCTAGTTGAAAGATTCTATGATCCACAGGCTGGTGAAGTTTTGATAGATGGAGTC
AACATCAAGAACTGAATCTTGATTGGATAAGAGGGAAGATCGGCCTTGTTAGCCAAGAACCATT
GTTGTTTTATGACCTCCATTAAGATAACATAATCTATGGTAAAGAAGATGCAACACTTGAAGAGA
TCAAGAGAGCAGCCGAGCTTGCAAATGCAGCAAACCTTCATCGACAAGTTACCAAATGGCTACGAT
ACGTTGGTTGGCCAACGTGGCACTCTGCTTTCTGGAGGACAAAACAAAGAATTGCAATTGCGAG
AGCCATCCTTAAAGATCCAAAATCCTTTTGGCTAGATGAAGCAACAAGTGCATTGGATGTGGAAT
CTGAGAGGATAGTCCAGGAGGCACTCAATAGGATAATGGTAGAAAGAACCACACTCGTCGTTGCT
CATCGTTTGAGCACTGTAAGGAATGTTGACTGCATCACAGTAGTTCATCAAGGGAAAATAGTTGA
ACAAGGTACTCATCATGCATTAGTGAAGGATCCCAATGGAGCTTACTCCAGCTTATTAGGCTAC
AAGAACTCGTGGTGATGAAAGACGTAAAATACAGGATTCGGAGTGCCCAATTCCTTATCAAAA
AGCACTAGTTTGTCAATTAGACGGTCAATGACTAAAGATTCTTTTGGCAATAGCAACAGATACTC
CTTCAAGAACCCTTAGGATTATCAGTTGAGTTGCATGAGGATGAAATCACAGGTGAACAGAACA
AAGACGACCTTCCAAATGGGAAGACCCTTCAGAAAGCACCAATTGGACGTCTTTTTTATCTTAAC
AAGCCGGAGGTACCATTTCTTCTGCTCGGTGCTATAGCAGCATCGGTGCATGGAGTCATTTTTCC
ATTGTTTGGCATACTAATGTCTGGCGTTATAAAAGCATTCTACGAGCCACCAGATAAGCTGCGGA
AAGATTCTAGCTTTTGGGCATTGATATCTGTAGTTCTGGGGTTTGCATCTTTCATTGCAATCCCA
GCAGAATACCTTTTGGTTTGAATTGCTGGTGGCAAGCTTATAGAGCGTGTTCGTACTCTGTCATT
TCAAAATATTGTGCATCAGGAAGTTGCTTGGTTTCGATAATCCCTCAAATTCAGTGGTGCACCTG
GTACACGACTCTCAGTTGATGCATTAATGTTTCGGCGCTTAGTAGGAGATAACCTGGGCCTTATA
GTGCAGTCTACAGCTGCACTGATCACTGGCTTTGTCATAGCATTACAGCGGACTGGAGGCTTGC
ACTGATTATCACTTGTGTCAATTCCTTTAGTGGGTGCACAAGTTATGCTCAAGTGAAGTTCTTGA
AAGGGTTTAGTGAAGAAGCTAAGGAGATGTATGAAGATGCAAGTCAAGTTGCAACTGATGCTGTT
GGCAGTATCAGAACTATAGCATCTTCTGTGCAGAGAAAAGAGTGGTTACAACGTATAACAAGAA
ATGTGAAGCTTTAAGGAAACAGGGAATTCGAAGTGGAAATCGTTGGAGGGCTTGGTTTTGGTTTTT
CATTCTTAGTGTGTATCTTACATATGCTCTATGTTTCTATGTTGGTGCACAGTTTGTACGTCAG
GGAAAACTACTTTTGCAGATGTTTTCAAAGTTTTCTTTGCCTTGGTTTTGGCAGCTGTTGGGGT
TTCGCAGGCAAGTGCATTGGCATCTAATGCAACAAAGGCAAGGGATTACGCCATTTCTGTTTTCA
GTATTCTAGACAGGAAGTCGAAAATTGACACGAGTAACGACGAGGGCCTGGTATTGGAAAATGTC
ACTGGTGACATTCATTTACAGTAACGTCAGTTTCAAGTACCATCACGCCCTGATGTCCAAATATT
CAGTGACTTTACCTTGACATTCCTTCCAGAAAGACCATCGCACTAGTTGGAGAAAAGTGGTAGTG
GCAAGTCCACTATAATTGCTTTACTGGAGCGCTTCTATGATCCTGATTCTGGTATAATCTCAGTA
GATGGAGTCGAAATTAAGAGCTTGAGAATTAGCTGGTTGAGGGATCAGATGGGGCTGGTAGGCCA
GGAGCCAGTACTTTTTCAATGACACAATCCGTGCAAACATAACATATGGGAAACACGGAGAAGTGA
CAGAGGAAGAAGTACGGCTGTGGCCAAGGCAGCAAATGCTCATGAGTTCATATCAAGCTTGCCA
CAGGGATACGACACTCTGGTTGGCGAGAAAGGAGTGCAACTATCTGGTGGACAGAAGCAGAGGGT
AGCTATCGCAAGGGCCATTATAAAGGACCCGAAGATACTACTACTTGTGATGAGGCAACCAGTGCCC
TGGATGCAGAAATCGGAGCGCATCGTTCAAGATGCATTGGATCGAGTCATGGTGGAGCAGGACCACC
ATAGTGGTGGCTCACCGCCTCTCCACAATCAAAGGGGCTGATATGATTGCAGTCCTCAAGGAAGG
CAAATTGCAGAAAAGGGAAAGCATGAGGCCCTAATGGGAATCAAGGATGGGGTCTACGCTTAC
TAGTAGAACTTCGCTCAAATTCCTGAGTAGAATTGTGTATTGTTTACTTTTTTTCTTTCTTCT
TTTACTGCATTTGTTTGTTCCTAGTACAATTAATTTGGCCATGGAATACAATTTGTGATTTGAGAA
GTGAATGCAAGAGGTTAGCGGTTTTGTTG

- Harpin Induced Gene 1 homolog (Probe ID: TA68555_4565):

CTAATAACCAATCTAATCTACTCCTCGCCGTCGCCGCCGGAATCCCCCTCCCTCCCTCCCG
TCCAACAACCGCCGAGTCAGCACCACCAGCTCTCACCGTCGAGCTCGCCAGGATGGGTT
CGGGGAGCCGCGCGGCTCGTGCCTGTGCTGCCCGTTCAAGTGCCTGGCGTGCGGCCTCT
TCAGCTGCCTCTGCAGCATCCTCGTCTCGCTCCTCGTCACCGCCGGCGTCTCGCCCTCA

TCCTCTACTTCTCTTCCGCCCCGAGATGATCGCCGCCACCGTCTGACTCCGCCTCCCTCG
 CCCAGTTCCAGCTCTCCCAGGCCAACCCCGCGCTGCTCCAGTACAACCTCACCCCTCGCCA
 TGACCGTGCGCAACCCCAACAAGCGGGTGGGGCTCTACTACGACGGCGTTCGAGGCCCTCG
 CCTCTTTCGACGGCCAGCGCTTCGGGTTTCGCGCCCTCGACCCCTTCTTCCAGGGCCACC
 AGGCGTCCACGGAGGTGAAGCCGGCGTTTCGGCGGCCAGCAGGTGCTGGAGGGGGACGTCA
 CGCAGGCCAACCTCAGGTTCGAGCTGGCGGGAGGCGCGGTGGAGGTGGAGGTGAAGCTCA
 ACGCCAAGCTCCGCGTCAAGGTGTGGGCGTTCAAGGTGCCCGGGCCCCGCGCCAGGATCA
 GCTGCCCGCTCTCCCTCCCCGCCCCCGCCGCCGAAACGCCCCCGCGTTCAAGCCCACGG
 AGTGCAAAGTCTGGTTCTGATTTCGATTCTCCACCATTGGGGAACCTGATCTGATCCGTTT
 TCTCGATTTCGATTTCCTTGGTTCGTAGGTTGGTTGCGCGATGCTCTTGCTGATGTGCGTTCG
 CCCGCCGTGGTTTATCTTGGTAGTAGAGATTTTTCGCATCTACTGCTAGTAGTACTAGTTG
 GATTTCGTAGCTATGCACATACTGTTCGATTGGTCGATTACTCGTTTCGTTTGGTTCTTTGTT
 AGCGATGTTACCATACTAGTTACATTGGGGTTCTACTATTCGAACCGTGTGATATATG
 CATCGATATTCAGATTTCTTTCATTC

- Aquaporin (Probe ID: TA67357_4565):

CCACGCGTCCGCACTACTTTCGTTGGCAAGAAAGAAGCGTTGAGTTGAACAGAGAAGAGC
 GGCTTGCTTGCTTTGGTACGTACGTACGTCCGTCAGGATGAGCACGGCGGCGCGGACGAC
 GGGGCGGCGGGGTTTACCATGGGGCGCAGCGAGGACGCGACGCACCCGGACACCATCCG
 CGCCGCCATCTCCGAGTTCTCGCCACGGCGATCTTCGTCTTCGCCGCCGAGGGCTCCAT
 CCTCTCCCTCGGGAAGCTCTACCATGACATGAGCACGGCGGGCGGGCTGGTGGCCGTGGC
 GCTGGCACACGCGCTGGCACTGGCCGTGGCGGTGTCCGTGACCGTGAACATCTCCGGGGG
 CCACGTCAACCCGGCCATCACCTTCGGGGCGCTGCTCGGCGGGCGCATCACCCCTCGTGGC
 CGCCCTCTTCTACTGGATCGCGCAGCTCCTCGGCGCCATCGTCGCCTCCCTCCTCCTCCG
 CCTCACACCCGGAGGCATGCGGCCCGCCGTTTCTCCCTGGCGTCCGGGGTGGGGGATTG
 GCACGCGGTGCTGCTGGAGGCGGTGATGACGTTCCGGGTCATGTACGCCACTACGCGAC
 GCTCATCGACCCCAAGAGGGGCCACGTGGGCACCATCGGGCCGCTCGCCGTGGGGTTCCT
 GCTCGGGGCTAACATACTCGCCGGCGGGCCGTTTCGATGGCGCCGCGATGAACCCGGCGCG
 GGTCTTCGGGCCGGCGCTCGTCCGGTGGCGGTGGAGGCACCACTGGGTCTACTGGCTCGG
 GCCCTTCCTCGGCTCCGGCCTCGTGGGCTCCTCTACGAGTACGTGTCATGCCGTCTAC
 CGAGACCGCCGCCACGCCACCAGCCGCTCGCGCCGGAGGACTACTAGCCGCCGCCGCC
 AAAGCAGCTGCTTCAAATCCTTTAAATCCAACACTTGCAGCTATGGTTTATCGCTATATA
 TGTATGTATAGTGTGTGGTACTTTTTGGTTAATAATGGAGGGTGGCCTTGCTGTGCATGGT
 TGCCCCTATAGTATCTCCTAGGTGATGTTTGTCCGTTTGTGTAATAAGTTTTCCAGTGCA
 ATATAGTATCCTCATCTGTTACGGGTTTCGTGATATTGCGTTGGTTAATTGTGCAACAAAA
 TAAACGTGCCAGAAGAAAATACGATAATTCATACTGATAAAAAAA

- ABA-responsive Protein (Probe IDs: TA54290_4565):

CCACGCGTCCGCTGCTACCTGTCCACGGCCACGGGGCCGTCGCCGGCACGCTCTACCTC
 ACCAACCTGAACGTCGCCTTCTGCAGCGACCGCCGCTCTCATTACCGCGCCGTCGGGC
 CAGACCGCATGGAGCTACTACAAGATCGTGATCCCGCTGGCCAAGCTCGCCGCCGTCGAG
 CCCGTACGGCCAAGGAGAGCCCGCCGGAGAAGTACATCCACATCGTCACCGTGGACTCG
 CACGACTTCTGGTTCATGGGCTTCGTTCAGCTACGACAAGGCCGTGCGCCACCTGGGCGGG
 GCCGTCTCGTTCGTCAGCACCACGGCGCCGCTCCCACCGCGGGCGCCGGCGCCGGCACCC
 ACCTACGAGTGATTGGCTGATTGCCGTGTCGCTGCCCTGCCCGCGGCTCTCTGCTTTTTCATT
 GCCGTGTGTGTGCTCTGTTTTTTCGGGCGGATCTGTTTAGTGAGTGCTCTCGTGTGTAGTG
 GATTTCCGTGTGGTTATGTACTGTTGTCTATACGCTTTTGTGCAAATTTAACGTTATCTT
 CTTGATTCCTTTAAAAAATATTGTCCTCCACCTCTTGCCCGATGTATATTTGTGTTCTTC
 GGAGTTGGACAATGTATTTGAAATTTGAGC

Anexo 4:

Fragmentos de las proteínas correspondientes a los candidatos elegidos:

- Factor de transcripción bHLH51 (Probe ID: TC312133):

TCQAPTSAPELSSSXGRSATEVR-
SLKVHseserrrrerINTHLATLRRMIPDANQMDKATLLACVVNQVKELKRKATETTRLQATA-
PIPEANEITVHCYTAA-
GDNRTTYIRATVSCDDRPGLFLGLAGAFRVLGLRVLRTETASLGGRASHLFLVLC--
EGGDVAGALRAMEGAVRQAVAEVAFPEMVCVGS--SWSKRERILEECCPVMYSV

- Cadmium tolerant (Probe ID: TC333223=TC454697):

MYNAPSAQEMSYS DHVQRRHEEKGLYACVFTA

- Multidrug Resistance Protein 1 homolog (Probe ID: AB055077):

MDATAEASSGEGARHAHGKDDRPEKKVPLLGMPFRYADRLDMLLMVVGSLGAVGNGVSEPLISVL
FGDVINSFGESTTSTVLRVAVTKVVLNFIYLGIGTAVASFLQVACWTMAGERQSARIRSLYLKSVL
RQDIAFFDTEMTTGEAVSRMSSTVI IQDALGEKAGKLVQLTSAFFGGFIIAFTKGWlltlvmlt
slplvAIAGAVSAQMLTRVSSKRLTSYSDAANTVEQTIGSIRTVVVSFNGEKKAIEMYNKFIKSAY
RTVVEGLVNGFGMGSVFCILFSSYGLAFWYGGKLIIDKGYTGGKIVTVLFAVLNGATSLGNATP
SISAI AEGQSAAYRLFETIERKPEIDSDDTSGMIMENIKGYVELKDVYFRYPARLGQLILDGLSL
QVASGTTMAIVGESGSGKSTVISLVERFYDPQAGEVLIDGVNIKLNLDWIRGKIGLVSQEPLLF
MTS IKDNI IYGKEDATLEEIKRAAELANAANFIDKLPNGYDTLVGQRGTTLLSGGQKQRIAIARAI
LKDPKILLLLDEATSALDVESERIVQEALNRIMVERTTLVVAHRLSTVRNVDCITVVHQGKIVEQG
THHALVKDPNGAYSQ LIRLQETRGDERRKI QDSGVPNSLSKSTSLSI RRSMTKDSFGNSNRY SFK
NPLGLSVELHEDEITGEQNKDDL SNGKTLQKAPIGR LFYLNKPEVPFLLLGAI AASVHGVI FPLF
GILMSGVIKAFYEPPDKLRKDSSFWALISVVLGFASFIAI PAEYLLFGIAGGKLI ERVRTLSFQN
IVHQEVAWFDNPSNSSGALGTRLSVDALNVRLVGDNLGLIVQSTAALITGFVIAFTADWRLALI
ITCVIPLVGAQGYA QVKFLKGFSEEAKEMYEDASQVATDAVGSIRTIASFCAEKRVVTTYNKKCE
ALRKQgirsgivgglgfgfsflvlyLYALCFYVGAQFVRQKTTfadvfkvffalvlaavGVSQ
ASALASNATKARDSAISVFSILDRKSKIDTSNDEGLVLENVTGDIHFSNVSFKYPSRPDVQIFSD
FTLHIPSRKTIALVGESGSGKSTIIALLERFYDPDSGIISVDGVEIKSLRISWLRDQMGLVGQEP
VLFNDTIRANITYGKHGevteeevtavakaanahEFISSLPQGYDTLVGEKGVQLSGGQKQRVAI
ARAI IKDPKILLLLDEATSALDAESERIVQDALDRVMVSRTTIVVAHRLSTIKGADMI AVLKEGKI
AEK GKHEALMGIKDGVYASLVELRSNS

- Harpin Induced Gene 1 homolog (Probe ID: TA68555_4565):

MGSGSRAASCLCCPFKCLACGLfsc lcsilvsllyTAGVLALILYFLFRPQMIAATVDSASLAQF
QLSQANPALLQYNLTLAMTVRNPKNRVGLYDGEALALFDGQRFGFAPLDPFFQGHQASTEVPK
AFGGQQVLEGDVTQANLRSQLAGGAVEVEVKNLAKLRVKVWAFKVPGP RRARISCP LSLpapaaan
apaFKPTECKVWF

- Aquaporin (Probe ID: TA67357_4565):

HALALAVAVSVTVNISGGHVBP AITFGALLGGRITLVRALFYWIAQLLGAI VASLLLRLTTGGMR
PPGFSLASGVGDWHAVLLEAVMTFGLMYAYYATLIDPKRGHVGTIGPLAVGFLLGANILAGGPF
GAAMNPARVFGPALVGWRWRHHWVYWLGPFLGSGIAGLLYEYVVMPSDTAAHAHQPLAPEDY

- ABA-responsive Protein (Probe IDs: TA54290_4565):

CYLSTATGTPVAGTLYLTNLNVAFCSDRPLSFTAPSGQTAWSYKIVIPLAKLAAVEPVTAKESPP
EKYIHIVTVDSHDFWFMGFVSYDKAVRHLGGAVS

Anexo 5:

Fragmentos de secuencias de centeno de los genes elegidos en los genotipos 389 y 390. En la secuencia se señalan los cebadores "Forward" (FW) en rojo y "Reverse" (RV) en verde, y los SNPs (Single Nucleotide Polimorphisms) entre los dos genotipos en rosa:

- Factor de transcripción bHLH51:

Fw 5 **ATGGACAAGGCCACCTTGTTAG** 3
Rv 5 **TCGTTAGCCTCCGGAGGGAT** 3

bHLH 389 (Fw + Rv):

T**ATGGACAAGGCCACCTTGTTAG**CATGTGTGGTGAGCCAAGTGAAGGAACTCAAGAGGAAAGCAA
CCGAA**ATCCCTCCGGAGGCTAACGAA**

bHLH 390 (Fw + Rv):

ATGGACAAGGCCACCTTGTTAGCATGTGTGGTGAGCCAAGTGAAGGAACTCAAGAGGAAAGCAAC
CGAA**ATCCCTCCGGAGGCTAACGAA**

- Cadmium tolerant:

Fw 5 **GGAGAAGGGCTGCATCTACG** 3
Rv 5 **TTAGTTGCAGCAGCAGCAGA** 3

Cadmium 389 (Fw + Rv):

GGAGAAGGGCTGCATCTACGCATGCGTGTTCACGGCG**T**TGTGCTGCTTCTGCTGCTACGAGACCT
G**T**GAGTGCTGCCTCGACTGCC**TCTGCTGCTGCTGCAACTAA**

Cadmium 390 (Fw + Rv):

GGAGAAGGGCTGCATCTACGCATGCGTGTTCACGGCG**T**TGTGCTGCTTCTGCTGCTACGAGACCT
G**T**GAGTGCTGCCTCGACTGCC**TCTGCTGCTGCTGCAACTAA**

- Multidrug Resistance Protein 1 homolog:

Fw 5 **GGGTGCACAAGGTTATGCTCAA** 3
Rv 5 **CAAGCCCTCCAACGATTCCACT** 3

Multi 389 (Fw + Rv):

T**GGGTGCACAAGGTTATGCTCAA**GTGAAGTTCCTTGAAAGGGTTTAGTGAAGAAGCTAAGGAGATG
TATGAAGATGCAAGTCAAGTTGCAACTGATGCTGTTCGGTAGTATCAGAAGTATAGCATCTTTCTG
TGCAGAGAAAAGAGTGGTTACAACGTATAACAAGAAATGTGAAGCTTTAAGGAAACAGGGAATTC
GA**AGTGAATCGTTGGAGGGCTTG**AGC

Multi 390 (Fw + Rv):

GGGTGCACAAGGTTATGCTCAAGTGAAGTTCCTTGAAAGGGTTTAGTGAAGAAGCTAAGGAGATGT
ATGAAGATGCAAGTCAAGTTGCAACTGATGCTGTTCGGTAGTATCAGAAGTATAGCATCTTTCTGT
GCAGAGAAAAGAGTGGTTACAACGTATAACAAGAAATGTGAAGCTTTAAGGAAACAGGGAATTCG
A**AGTGAATCGTTGGAGGGCTTG**AGC

- Harpin Induced Gene 1 homolog:

Fw 5 **CTCTACTACGACCGCGTCGA** 3

Anexos

Rv 5 **CGGAGCTTGGCGTTGAGCTT** 3

Harpin 389 (Fw + Rv):

CGGAGCTTGGCGTTGAGCTTCAT**CTCTACTACGACCGCGTCTGA**GGCCCTCGCCCTCTTCGACGGC
CAGCGCTTCGGGTTTCGCGCCCCTCGACCCCTTCTTCCAGGGCCACCAGGCGTCCACCGAGCTCAA
GCCGGCGTTTCGGCGGCCAGCAGGTGCT**C**GAGGGGGATGTTACCCAGGCCAACCTCCGGACGCAGC
TGGCGGGCGGCGCGGTGGAGGTGGAGGTG**AAGCTCAACGCCAAGCTCCGA**

Harpin 390 (Fw + Rv):

GAGTCGGAGCTTGGCGTTGAGCTTCAT**CTCTACTACGACCGCGTCTGA**GGCCCTCGCCCTCTTCGA
CGGCCAGCGCTTCGGGTTTCGCGCCCCTCGACCCCTTCTTCCAGGGCCACCAGGCGTCCACCGAGC
TCAAGCCGGCGTTTCGGCGGCCAGCAGGTGCT**C**GAGGGGGATGTTACCCAGTCCAACCTCCGGACG
CAGCTGGCGGGCGGCGCGGTGGAGGTGGAGGTG**AAGCTCAACGCCAAGCTCCGA**

- Aquaporin:

Fw 5 **GTCAACCCGGCCATCACCTT** 3

Rv 5 **TCGCGTAGTAGGCGTACATGAG** 3

Aqua 389 (Fw + Rv):

T**GTCAACCCGGCCATCACCTT**CGGCGCGCTGCTCGGCGGCCGCATCACCCCTCGTGCGCGCCCTCT
TCTACTGGGTTCGCGCAGCTCCTCGGCGCCATCGTCGCTCCCTCCTCCTCCGCTCACCACCGGA
GGCATGCGGCCGCCCGGTTTCTCCCTGGCGTTCGGGGTGGGGGA**C**TGGCACGCGGTGCTGCTGGA
GGCGGTGATGACGTTTCGGG**CTCATGTACGCCTACTACGCGA**A

Aqua 390 (Fw + Rv):

T**GTCAACCCGGCCATCACCTT**CGGCGCGCTGCTCGGCGGCCGCATCACCCCTCGTGCGCGCCCTCT
TCTACTGGGTTCGCGCAGCTCCTCGGCGCCATCGTCGCTCCCTCCTCCTCCGCTCACCACCGGA
GGCATGCGGCCGCCCGGTTTCTCCCTGGCGTTCGGGGTGGGGGA**T**TGGCACGCGGTGCTGCTGGA
GGCGGTGATGACGTTTCGGG**CTCATGTACGCCTACTACGCGA**A

- ABA-responsive Protein:

Fw 5 **TCTACCTCACCAACCTGAACGT** 3

Rv 5 **TGACGAAGCCCATGAACCAGAA** 3

ABA 389 (Fw + Rv):

TCTACCTCACCAACCTGAACGT**C**GCCTTCTGCAGCGACCGCCCGCTCTCCTT**T**ACCGCGCCGTCG
GGCCAGACCGCCTGGAGCTA**T**TACAAGATCATGATCCCGCTGGCCAAGCTCGCCCGGTCGAGCC
CGTCACGGCCAAGGAGAGCCCGCGGAGAAGTACATCCACATCGTCACCGTTCGACTCGCACGAC**T**
TCTGGTTCATGGGCTTCGTCA

ABA 390 (Fw + Rv):

T**TCTACCTCACCAACCTGAACGT****G**GCCTTCTGCAGCGACCGCCCGCTCTCCTT**C**ACCGCGCCGTC
GGCCAGACCGCCTGGAGCTA**C**TACAAGATCATGATCCCGCTGGCCAAGCTCGCCCGGTCGAGC
CCGTCACGGCCAAGGAGAGCCCGCGGAGAAGTACATCCACATCGTCACCGTTCGACTCGCACGAC
TCTGGTTCATGGGCTTCGTC

Anexo 6:

Tabla de las líneas Transplanta sometidas a cribado en el medio descrito por Ezaki et al. 2004. Se muestra la referencia del gen, una abreviación del origen de la semilla y el fenotipo mostrado por las raíces en referencia a Col, con un código de números y colores para facilitar su visualización (-2: Más corto, azul; -1: Ligeramente más corto, morado; 0: Sin diferencias, sin color; +1: Ligeramente más largo, verde claro; +2: Más largo, verde oscuro).

Gen (origen)	Fenotipo
AT1G56160.1B PJ19	-1
AT1G01260.1C P1	+2
AT1G01260.1I P2	-1
AT1G01260.2G 77C	+2
AT1G07530.1B PJ2	-1
AT1G07530.1E PJ3	-2
AT1G18710.1A PJ4	0
AT1G18710.1E PJ5	0
AT1G21450.1A PJ6	0
AT1G21450.1D PJ7	0
AT1G21450.1G PJ8	0
AT1G51950.1A JVC1	+1
AT1G51950.1B JVC2	0
AT1G52890.1B JVC3	-1
AT1G52890.1H JVC4	-1
AT1G53910.1A JVC5	-1
AT1G53910.1I JVC6	-1
AT1G55580.1A P3	+2
AT1G55580.1D P4	+1
AT1G55760.1A PJ9	-2
AT1G55760.1C PJ10	+1
AT1G55760.1E PJ11	-1
AT1G56160.1C PJ12	-2
AT1G56160.1E PJ13	-2
AT1G63840.1E 72C	-2
AT1G63840.1I 65C	-2
AT1G67970.1B 1C	0
AT1G67970.1E 2C	0
AT1G67970.1F 3C	0
AT1G68520.1H PJ14	-1
AT1G69180.1G 64C	-2
AT1G69490.1B P5	0
AT1G71130.1C PJ1	0
AT1G71130.1F PJ15	-1
AT1G71450.1D PJ16	0
AT1G71450.1I PJ17	-1
AT1G79180.1E PJ18	0
AT1G80400.1A 88C	+2 (Problema al germinar)
AT1G80400.1G 71C	-2
AT2G17180.1E P6	-2
AT2G17180.1F P7	-2
AT2G17180.1H P8	+1

AT2G18300.1B 9C	+2
AT2G18300.1C 10C	0
AT2G18300.1I 11C	+2
AT2G20180.1D 66C	-2
AT2G20180.1F 78C	+2
AT2G20180.1G P9	+1
AT2G22630.1A JVC7	-1
AT2G22630.1C JVC8	-1
AT2G22630.1H JVC9	0
AT2G22800.1A JVC 43	-2
AT2G22800.1B JVC 44	0
AT2G22800.1G JVC 45	0
AT2G24790.1A P10	-1
AT2G24790.1H P11	0
AT2G25000.1C P12	+1
AT2G25000.1D P13	0
AT2G25000.1E P14	0
AT2G31180.1A PM1	0
AT2G31180.1D PM2	0
AT2G31180.1G PM3	0
AT2G33710.1C PM4	0
AT2G33710.1E PM5	0
AT2G33710.1G PM6	0
AT2G33880.1A 4C	0
AT2G33880.1C 5C	0
AT2G33880.1E 6C	0
AT2G37000.1A 7C	0
AT2G37000.1B 8C	+2
AT2G38340.1B P15	0
AT2G38340.1I P16	-2
AT2G44940.1A JVC 46	-1
AT2G44940.1F JVC 47	-2
AT2G44940.1G JVC 48	-2
AT2G45660.1I JVC49	+1
AT3G04060.1B JVC10	-2
AT3G04060.1D JVC11	-1
AT3G04730.1A 17C	0

AT3G04730.1B 15C	0
AT3G04730.1D 16C	0
AT3G05200.1B P52	-2 (problemas al germinar)
AT3G05200.2D P53	-2
AT3G05200.3J P54	-1 (problemas al germinar)
AT3G10480.1D P17	0
AT3G10480.1E P18	0
AT3G11580.1A P19	+1
AT3G11580.1E P20	0
AT3G15500.1A 75C	-2
AT3G16770.1A 13C	-2
AT3G16770.1C 14C	+2
AT3G16770.1D 12C	+2
AT3G23050.1H JVC12	+1
AT3G23050.1I JVC13	0
AT3G45150.1B 19C	-2
AT3G45150.1I 18C	-2
AT3G56970.1D P21	0
AT3G56970.1E P22	0
AT3G56970.1G P23	0
AT3G57230.1A JVC14	+1
AT3G57230.1C JVC15	+1
AT3G61150.1A 67C	Problema al germinar
AT3G62690.1F 82C	+2
AT4G00050.1F P55	-1
AT4G00050.1G P56	Problema al germinar
AT4G11680.1F 73C	-1 (Problema al germinar)
AT4G11680.1G 91C	+2 (Problema al germinar)
AT4G11680.1I 92C	-2 (Problema al germinar)
AT4G11880.1D 26C	-2
AT4G11880.1H 28C	0
AT4G13640.1C PM7	0
AT4G13640.1D PM8	0
AT4G13640.1G PM9	-1
AT4G14450.1B 85C	+2
AT4G14450.1C 89C	+2
AT4G14450.1J 76C	-2
AT4G17490.1A 20C	0
AT4G17490.1B 21C	0
AT4G17490.1C 22C	0
AT4G17500.1B JVC16	0

AT4G17500.1E JVC17	0
AT4G17500.1I JVC18	0
AT4G18880.1C 30C	+2
AT4G18880.1E 27C	0
AT4G18880.1F 29C	+2
AT4G27410.1C JVC19	0
AT4G27410.1D JVC20	0
AT4G28270.1B PM10	-1
AT4G28270.1C PM11	-1
AT4G30410.1B P24	-1
AT4G34410.1C JVC21	0
AT4G34410.1G JVC22	+1
AT4G34410.1H JVC23	-1
AT4G36060.1A P25	-1
AT4G36060.1C P26	+1
AT4G36060.1H P27	0
AT4G36540.1B 23C	0
AT4G36540.1C 25C	0
AT4G36540.1E 24C	0
AT4G36710.1B JVC24	0
AT4G36710.1C JVC25	-1
AT4G36710.1D JVC26	-1
AT5G02470.1D 70C	+2 (Problema al germinar)
AT5G03510.1B P28	0 (problemas al germinar)
AT5G03510.1G 74C	-2
AT5G03790.1E P29	+1
AT5G03790.1F P30	+1
AT5G05410.1C JVC50	+2
AT5G05410.1E JVC51	-2
AT5G05410.1I JVC52	+1
AT5G10140.1B 45C	-2
AT5G10140.1D 44C	0
AT5G10140.1E 43C	-2
AT5G10380.1B 86C	+2

AT5G10380.1I 69C	-2 (Problema al germinar)
AT5G11060.1B JVC27	0
AT5G11060.1D JVC28	0
AT5G11060.1G JVC29	+1
AT5G13080.1G P31	-1
AT5G13080.1H P32	+1
AT5G13790.1D JVC30	-1
AT5G13790.1F JVC31	0
AT5G13790.1G JVC32	-1
AT5G15150.1H JVC53	-2
AT5G15150.1I JVC54	0
AT5G17300.1A3 JVC55	0
AT5G17300.1B9 JVC56	-2
AT5G17300.1I8 JVC57	-1
AT5G18270.1A 42C	-2 (Problema al germinar)
AT5G18270.1B 41C	-2 (Problema al germinar)
AT5G18270.1C 40C	-2
AT5G18450.1B JVC58	+1
AT5G20240.1A JVC59	+1
AT5G20240.1B JVC60	+1
AT5G20240.1F JVC 61	+1
AT5G22220.1D P33	0
AT5G22220.1E P34	0
AT5G22220.1I P35	+1
AT5G23260.1E 35C	0
AT5G23260.1F 34C	-2
AT5G23260.1I 36C	-2
AT5G25890.1F JVC 62	0
AT5G43290.1A P36	+1
AT5G43290.1D P37	+1
AT5G47230.1B JVC33	-1
AT5G47230.1C	-1

JVC34	
AT5G47230.1G JVC35	-1
AT5G49330.1C P58	-2
AT5G49330.1D P59	-1
AT5G49330.1E P60	-2
AT5G51870.1D 48C	-2
AT5G51870.1E 46C	0
AT5G51870.1F 47C	0
AT5G53420.1F JVC36	+1
AT5G53420.1G JVC37	0
AT5G55690.1A 39C	-2
AT5G55690.1C 37C	0
AT5G55690.1G 38C	0
AT5G60970.1C P61	-2
AT5G60970.1F P62	-1
AT5G60970.1G P63	-1
AT5G62020.1B JVC38	0
AT5G62020.1F JVC39	+1
AT5G65050.1A 33C	0
AT5G65050.1C 32C	0
AT5G65050.1E 31C	0
AT5G66160.1D JVC41	-2
AT5G66160.1G JVC42	-2

Anexo 7:

Tabla de comparación de la longitud de las raíces de cada línea Transplanta respecto a Col en los medios descritos por Ezaki et al. 2004 y Ryan et al. 2007. En el caso del primer medio, las categorías son iguales a las descritas en el anexo 6, al igual que el código de colores. En el caso del segundo, las raíces se midieron con el programa ImageJ y el estadístico t de Student determinó si las diferencias de cada línea con Col eran significativas o no. A los casos significativos se les aplicó el siguiente código de números y colores: **+2**: muy significativos, más largo, verde oscuro ($p < 0,01$); **+1**: significativos, ligeramente más largo, verde claro ($p < 0,05$); **-1**: significativos, ligeramente más corto, morado ($p < 0,05$); **-2**: muy significativos, más corto, azul claro ($p < 0,01$); NO significativo, sin color. En la tabla también se muestran la referencia del gen, una abreviación del origen de la semilla y el nombre de la familia a la que pertenece el gen. Los genes escogidos para continuar su análisis se muestran en naranja.

ID	Gen	Origen	Nombre Familia	Fenotipo Ezaki	Fenotipo Ryan
1	AT1G01260	77C	transcription factor bHLH13	+2	NO significativo
	AT1G01260	P1	transcription factor bHLH13	+2	NO significativo
	AT1G01260	P2		-1	NO significativo
2	AT1G51950	JVC1	auxin-responsive protein IAA (18)	+1	NO significativo
3	AT1G52890	JVC3	NAC domain-containing protein (19)	-1	NO significativo
	AT1G52890	JVC4		-1	NO significativo
4	AT1G53910	JVC5	ethylene-responsive transcription factor (RAP2-12)	-1	NO significativo
	AT1G53910	JVC6		-1	NO significativo
5	AT1G55580	P3	scarecrow-like protein 18	+2	NO significativo
	AT1G55580	P4		+1	+2 (significativa t)
6	AT1G63840	72C	RING/U-box domain-containing protein	-2	NO significativo
	AT1G63840	65C		-2	NO significativo
7	AT1G69180	64C	CRC protein CRABS CLAW	-2 (POSIBLE FENOTIPO DE FLORACIÓN TEMPRANA)	NO significativo
8	AT1G80400	88C	RING/U-box domain-containing protein	+2 (problema al germinar)	+1 (significativa t)
	AT1G80400	71C		+2	NO significativo
9	AT2G17180	P6	C2H2-like zinc finger protein	-2	-2 (significativa t)
	AT2G17180	P7	C2H2-like zinc finger protein	-2 (MUY)	-2 (significativa t)
	AT2G17180	P8		+1	-2 (significativa t)
10	AT2G18300	9C	transcription factor bHLH64	+2	-2 (significativa t)
	AT2G18300	11C		+2	NO significativo
11	AT2G20180	66C		-2	-2 (significativa t)
	AT2G20180	78C	transcription factor PIF1	+2	NO significativo
12	AT2G20180	P9	transcription factor PIF1	+1	NO significativo
13	AT2G22630	JVC7	agamous-like MADS-box protein AGL17	+1	NO significativo
	AT2G22630	JVC8		-1	NO significativo
14	AT2G22800	JVC 43	homeobox-leucine zipper protein HAT9	-2	NO significativo
15	AT2G24790	P10	zinc finger protein CONSTANS-LIKE 3	-1	NO significativo
16	AT2G25000	P12	putative WRKY transcription factor 60	+1	NO significativo
17	AT2G37000	8C	transcription factor TCP11	+2	NO significativo
18	AT2G38340	P16	dehydration-responsive element-binding protein 2E	-2	NO significativo

Anexos

19	AT2G44940	JVC 46	ethylene-responsive transcription factor ERF034	-1	NO significativo
	AT2G44940	JVC 47		-2	-2 (significativa t)
	AT2G44940	JVC 48		-2	NO significativo
20	AT2G45660	JVC49	MADS-box protein SOC1	+1	NO significativo
21	AT3G04060	JVC10	NAC domain containing protein 46	-2	NO significativo
	AT3G04060	JVC11		-1	NO significativo
22	AT3G05200	P52	E3 ubiquitin-protein ligase ATL6	-2 (problema al germinar)	NO significativo
	AT3G05200	P53		-2	NO significativo
	AT3G05200	P54		-1 (problema al germinar)	+1 (significativa t)
23	AT3G11580	P19	AP2/B3 domain-containing protein	+1	NO significativo
24	AT3G15500	75C	NAC domain-containing protein 55	-2	NO significativo
25	AT3G16770	13C	ethylene-responsive transcription factor RAP2-3	-2	+1 (significativa t)
	AT3G16770	14C		+2	NO significativo
	AT3G16770	12C		+2	NO significativo
26	AT3G23050	JVC12	auxin-responsive protein IAA7	+1	NO significativo
27	AT3G45150	19C	transcription factor TCP16	-2	NO significativo
	AT3G45150	18C		-2	NO significativo
28	AT3G57230	JVC14		+1	NO significativo
	AT3G57230	JVC15	protein agamous-like 16	+1	NO significativo
29	AT3G61150	67C		Problema al germinar	+1 (significativa t)
	AT3G61150	68C	homeobox-leucine zipper protein HDG1	Problema al germinar	NO significativo
30	AT3G62690	82C	RING-H2 finger protein ATL5	+2	NO significativo
31	AT4G00050	P55	transcription factor UNE10	-1	NO significativo
	AT4G00050	P56		Problema al germinar	NO significativo
32	AT4G11680	73C	E3 ubiquitin-protein ligase	-1 (problema al germinar)	NO significativo
	AT4G11680	91C		+2 (problema al germinar)	NO significativo
	AT4G11680	92C		-2 (problema al germinar)	NO significativo
33	AT4G11880	26C		-2	NO significativo
34	AT4G14450	85C	hypothetical protein	+1	NO significativo
	AT4G14450	89C		+1	+2 (significativa t)
	AT4G14450	76C		+2	NO significativo
35	AT4G18880	30C	heat stress transcription factor A-4a	+2	NO significativo
	AT4G18880	29C		+2	NO significativo
36	AT4G30410	P24	sequence-specific DNA binding transcription factor	-1	NO significativo

37	AT4G34410	JVC22	ethylene-responsive transcription factor ERF109	+1	NO significativo
	AT4G34410	JVC23		-1	NO significativo
38	AT4G36060	P25	transcription factor bHLH11	-1	-2 (significativa t)
	AT4G36060	P26		+1	NO significativo
39	AT4G36710	JVC25	scarecrow-like protein 15	-1	NO significativo
	AT4G36710	JVC26		-1	NO significativo
40	AT5G02470	70C	Transcription factor DP	+2 (problema al germinar)	NO significativo
41	AT5G03510	74C	C2H2-type zinc finger protein	-2	NO significativo
42	AT5G05410	JVC50	dehydration-responsive element-binding protein 2A	+2	NO significativo
	AT5G05410	JVC51		-2	NO significativo
	AT5G05410	JVC52		+1	+2 (significativa t)
43	AT5G10140	45C	MADS-box protein FLOWERING LOCUS C	-2	-1 (significativa t)
	AT5G10140	43C		-2	NO significativo
44	AT5G10380	86C	E3 ubiquitin-protein ligase RING1	+2	NO significativo
	AT5G10380	69C		-2 (problema al germinar)	NO significativo
45	AT5G11060	JVC29	homeobox protein knotted-1-like 4	+1	NO significativo
46	AT5G13790	JVC30	agamous-like MADS-box protein AGL15	-1	-1 (significativa t)
	AT5G13790	JVC32		-1	NO significativo
47	AT5G15150	JVC53	homeobox-leucine zipper protein HAT7	-2	NO significativo
48	AT5G17300	JVC56	myb family transcription factor	-2	-2 (significativa t)
	AT5G17300	JVC57		-1	-2 (significativa t)
49	AT5G18270	42C	NAC domain containing protein 87	-2 (problema al germinar)	-2 (significativa t)
	AT5G18270	41C		-2 (problema al germinar)	-2 (significativa t)
	AT5G18270	40C		-2	NO significativo
50	AT5G18450	JVC58	dehydration-responsive element-binding protein 2G	+1	NO significativo
51	AT5G20240	JVC 61	Floral homeotic protein PISTILLATA	+1	NO significativo
	AT5G20240	JVC59	Floral homeotic protein PISTILLATA	+1	+2 (significativa t)
	AT5G20240	JVC60		+2	NO significativo
52	AT5G23260	34C	protein TRANSPARENT TESTA 16	-2	+1 (significativa t)
	AT5G23260	36C		-2	NO significativo
53	AT5G47230	JVC33	ethylene-responsive transcription factor 5	-1	NO significativo
	AT5G47230	JVC34		-1	NO significativo

Anexos

	AT5G47230	JVC35		-1	NO significativo
54	AT5G49330	P58	myb domain protein 111	-2	-2 (significativa t)
	AT5G49330	P59		-1	NO significativo
	AT5G49330	P60		-2	NO significativo
	AT5G51870	48C	protein agamous-like 71	-2	NO significativo
56	AT5G53420	JVC36	CCT motif family protein	+1	NO significativo
57	AT5G55690	39C	MADS-box protein AGL47	-2	NO significativo
58	AT5G60970	P61	transcription factor TCP5	-2	-1 (significativa t)
	AT5G60970	P62		-1	NO significativo
	AT5G60970	P63		-1	-1 (significativa t)
59	AT5G62020	JVC39	heat stress transcription factor B-2a	+1	NO significativo
60	AT5G66160	JVC41	receptor homology-transmembrane-ring H2 domain protein 1	-2	NO significativo
	AT5G66160	JVC42		-2	NO significativo

Anexo 8:

Alineamiento de las secuencias del gen *ScALMT2* en los cv. Imperial (Im) y Ailés (Ai), y en la línea consanguínea Riodeva (Rd). En los tres casos las secuencias constaban de 1374 nucleótidos.

ScALMT2-Rd ATGGAGGTTGATCACCGCATCAGGGTGAGCGACGGCGACGGCAACGGCGAGACGACGGCC
 ScALMT2-Ai ATGGAGGTTGATCACCGCATCAGGGTGAGCGACGGCGACGGCAACGGCGAGACGACGGCC
 ScALMT2-Im ATGGAGGTTGATCACCGCATCAGGGTGAGCGACGGCGACGGCAACGGCGAGACGACGGCC

ScALMT2-Rd GGACAAGGAGGCGTTGTTCGGCGTCTTCTTCGCGGGCTGCTGGCTGCGGCTCCGCTCGGTG
 ScALMT2-Ai GGACAAGGAGGCGTTGTTCGGCGTCTTCTTCGCGGGCTGCTGGCTGCGGCTCCGCTCGGTG
 ScALMT2-Im GGACAAGGAGGCGTTGTTCGGCGTCTTCTTCGCGGGCTGCTGGCTGCGGCTCCGCTCGGTG

ScALMT2-Rd CTCGCCGGGCTCTGGTGCTGGGTCGACGGGTTTCGCCAGGAAGGTGGGCAGGATCGCCAGA
 ScALMT2-Ai CTCGCCGGGCTCTGGTGCTGGGTCGACGGGTTTCGCCAGGAAGGTGGGCAGGATCGCCAGA
 ScALMT2-Im CTCGCCGGGCTCTGGTGCTGGGTCGACGGGTTTCGCCAGGAAGGTGGGCAGGATCGCCAGA

ScALMT2-Rd GAGGATCCAAGGAGGGTGGCGCACTCGTTCAGGTCGGCCTGGCGCTCGCCCTGGTGTCC
 ScALMT2-Ai GAGGATCCAAGGAGGGTGGCGCACTCGTTCAGGTCGGCCTGGCGCTTACTCTGGTGTCC
 ScALMT2-Im GAGGATCCAAGGAGGGTGGCGCACTCGTTCAGGTCGGCCTGGCGCTTACTCTGGTGTCC
 ***** . ***** * ***** . * *****

ScALMT2-Rd GTCTCTACTACGTCACGCCGCTCTTCAAGGGCTTCGGGGTCTCCACGCTCTGGGCCGTG
 ScALMT2-Ai GTCTCTACTACGTCACGCCGCTCTTCAAGGGCTTCGGGGTCTCCACGCTCTGGGCCGTG
 ScALMT2-Im GTCTCTACTACGTCACGCCGCTCTTCAAGGGCTTCGGGGTCTCCACGCTCTGGGCCGTG

ScALMT2-Rd CTCACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTACACCGTCGGTGGCAGCTGAGCAAAGGCTTGAAT
 ScALMT2-Ai CTCACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTACACCGTCGGTGGCAGCTGAGCAAAGGCTTGAAT
 ScALMT2-Im CTCACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTACACCGTCGGTGGCAGCTGAGCAAAGGCTTGAAT
 ***** *****

ScALMT2-Rd AGAGCCTTCGCGACGCTGGTGGCTGGGTTTCATCGCCGTGGGAGCTCATCAGGTAGCTAAC
 ScALMT2-Ai AGAGCCTTCGCGACGCTGGTGGCTGGGTTTCATCGCCGTGGGAGCTCATCAGGTAGCTAAC
 ScALMT2-Im AGAGCCTTCGCGACGCTGGTGGCTGGGTTTCATCGCCGTGGGAGCTCATCAGGTAGCTAAC

ScALMT2-Rd CGCTGTGGTGCACAGGGGGAGCCCATACTGCTCGCCATCTTCGTCTTCTTGCTAGCGTCG
ScALMT2-Ai CGCTGTGGTGCACAGGGGGAGCCCATACTGCTCGCCATCTTCGTCTTCTTGCTAGCGTCG
ScALMT2-Im CGCTGTGGTGCACAGGGGGAGCCCATACTGCTCGCCATCTTCGTCTTCTTGCTAGCGTCG

ScALMT2-Rd GCGGCAACGTTCTCGCGCTTCATCCCGGAGATCAAGGCGAGGTACGACTACGGCGTGACC
ScALMT2-Ai GCGGCAACGTTCTCGCGCTTCATCCCGGAGATCAAGGCGAGGTACGACTACGGCGTGACC
ScALMT2-Im GCGGCAACGTTCTCGCGCTTCATCCCGGAGATCAAGGCGAGGTACGACTACGGCGTGACC

ScALMT2-Rd ATCTTCATACTCACCTTCAGCCTGGTGGCCGTGTCGAGCTACCGCGTGGAGGAGCTCATT
ScALMT2-Ai ATCTTCATACTCACCTTCAGCCTGGTGGCCGTGTCGAGCTACCGCGTGGAGGAGCTCATT
ScALMT2-Im ATCTTCATACTCACCTTCAGCCTGGTGGCCGTGTCGAGCTACCGCGTGGAGGAGCTCATT

ScALMT2-Rd CAGCTGGCGCACCAGCGCTTCTCCACCATCGTCATCGGCGTCTTACCTGCCTCTGCACC
ScALMT2-Ai CAGCTGGCGCACCAGCGCTTCTCCACCATCGTCATCGGCGTCTTACCTGCCTCTGCACC
ScALMT2-Im CAGCTGGCGCACCAGCGCTTCTCCACCATCGTCATCGGCGTCTTACCTGCCTCTGCACC

ScALMT2-Rd ACCATCTTCGTCTTCCCGTCTGGGCCGGCGAGGATCTCCACAAGCTCACTGCCGCCAAC
ScALMT2-Ai ACCATCTTCGTCTTCCCGTCTGGGCCGGCGAGGATCTCCACAAGCTCACTGCCGCCAAC
ScALMT2-Im ACCATCTTCGTCTTCCCGTCTGGGCCGGCGAGGATCTCCACAAGCTCACTGCCGCCAAC

ScALMT2-Rd CTCGACAAGCTGGCACAGTTTCTTCAAGGATTGGAATCTGAATGCTTTGGAGAAAAGGCT
ScALMT2-Ai CTCGACAAGCTGGCACAGTTTCTTCAAGGATTGGAATCTGAATGCTTTGGAGAAAAGGCT
ScALMT2-Im CTCGACAAGCTGGCACAGTTTCTTCAAGGATTGGAATCTGAATGCTTTGGAGAAAAGGCT

ScALMT2-Rd GCCAGCGAGAATCTGGAGGGCAAAGCCTTCTGCAAGTGTAACAAGAGCGTCTCAACTCC
ScALMT2-Ai GCCAGCGAGAATCTGGAGGGCAAAGCCTTCTGCAAGTGTAACAAGAGCGTCTCAACTCC
ScALMT2-Im GCCAGCGAGAATCTGGAGGGCAAAGCCTTCTGCAAGTGTAACAAGAGCGTCTCAACTCC
* *****

ScALMT2-Rd AAGGCTAGTGAGGACTCCCTGTGTAATTTTGCTAAGTGGGAGCCCGGTGATGGCAAATTC
ScALMT2-Ai AAGGCTAGTGAGGACTCCCTGTGTAATTTTGCTAAGTGGGAGCCCGGTGATGGCAAATTC
ScALMT2-Im AAGGCTAGTGAGGACTCCCTGTGTAATTTTGCTAAGTGGGAGCCCGGTGATGGCAAATTC
***** **

ScALMT2-Rd GGCTTCCGGCACCCCTTGGAGCCAATACCAGAAGCTCGGAGCTCTTTGTCGTCAGTGC GCG
ScALMT2-Ai GGCTTCCGGCACCCCTTGGAGCCAATACCAGAAGCTCGGAGCTCTTTGTCGTCAGTGC GCG
ScALMT2-Im GGCTTCCGGCACCCCTTGGAGCCAATACCAGAAGCTCGGAGCTCTTTGTCGTCAGTGC GCG

ScALMT2-Rd TCTTCAATGGAGGCTCTTGCTTCCTATGTCATCACACTGCAAAAATCCAGTACCCTGAG
ScALMT2-Ai TCTTCAATGGAGGCTCTTGCTTCCTATGTCATCACACTGCAAAAATCCAGTACCCTGAG
ScALMT2-Im TCTTCAATGGAGGCTCTTGCTTCCTATGTCATCACACTGCAAAAATCCAGTACCCTGAG

ScALMT2-Rd GCCAATCCAGAGCTAACCTTAAAGGTCCGAATGGCGTGCGGGGAAATGAGCTCGCACTCT
ScALMT2-Ai GCCAATCCAGAGCTAACCTTAAAGGTCCGAATGGCGTGCGGGGAAATGAGCTCGCACTCT
ScALMT2-Im GCCAATCCAGAGCTAACCTTAAAGGTCCGAATGGCGTGCGGGGAAATGAGCTCGCACTCT

ScALMT2-Rd GCTAAGGCGCTCAAGGAGCTATCAACAGCCATTCCGACAATGGTCTGCCATCTCCGGCC
ScALMT2-Ai GCTAAGGCGCTCAAGGAGCTATCAACAGCCATTCCGACAATGGTCTGCCATCTCCGGCC
ScALMT2-Im GCTAAGGCGCTCAAGGAGCTATCAACAGCCATTCCGACAATGGTCTGCCATCTCCGGCC

ScALMT2-Rd AGCATCACCATGTCTGCAGCCATCGAAGCTGCAAAAAGACCTCAGAAATGAATTATCAGAG
ScALMT2-Ai AGCATCACCATGTCTGCAGCCATCGAAGCTGCAAAAAGACCTCAGAAATGAATTATCAGAG
ScALMT2-Im AGCATCACCATGTCTGCAGCCATCGAAGCTGCAAAAAGACCTCAGAAATGAATTATCAGAG

Anexos

```
ScALMT2-Rd      GACGCAGCTCTGTTGCAAGTGATGCATGTGGCTGTACTGCCACACTTATCTCAGACTTG
ScALMT2-Ai      GACGCAGCTCTGTTGCAAGTGATGCATGTGGCTGTACTGCCACACTTATCTCAGACTTG
ScALMT2-Im      GACGCAGCTCTGTTGCAAGTGATGCATGTGGCTGTACTGCCACACTTATCTCAGACTTG
*****

ScALMT2-Rd      GTTACGACAATAGTGAAAATTGCAGAAACTGCTGACAATCTAGCACGGCTTGGACACTTC
ScALMT2-Ai      GTTACGACAATAGTGAAAATTGCAGAAACTGCTGACAATCTAGCACGGCTTGGACACTTC
ScALMT2-Im      GTTACGACAATAGTGAAAATTGCAGAAACTGCTGACAATCTAGCACGGCTTGGACACTTC
*****

ScALMT2-Rd      AAGAACCCTGAAAAAAGCTCAGAAAGATGTTGCTATCAACATTCCGAGCAGATAA
ScALMT2-Ai      AAGAACCCTGAAAAAAGCTCAGAAAGATGTTGCTATCAACATTCCGAGCAGATAA
ScALMT2-Im      AAGAACCCTGAAAAAAGCTCAGAAAGATGTTGCTATCAACATTCCGAGCAGATAA
*****
```

Anexo 9:

Alineamiento de ScALMT2 en los cv. Imperial (Im) y Ailés (Ai), y en la línea consanguínea Riodeva (Rd). Consistían en 457 aminoácidos.

```
ScALMT2-Ai      MEVDHRIRVSDGDGNGETTAGQGGVGVVFFAGCWLRLRSVLAGLWCWVDGFARKVGRIR
ScALMT2-Im      MEVDHRIRVSDGDGNGETTAGQGGVGVVFFAGCWLRLRSVLAGLWCWVDGFARKVGRIR
ScALMT2-Rd      MEVDHRIRVSDGDGNGETTAGQGGVGVVFFAGCWLRLRSVLAGLWCWVDGFARKVGRIR
*****

ScALMT2-Ai      EDPRRVAHSLKVGLALTLVSVLYYVTFPLFKGFGVSTLWAVLTVVVVMEYTVGGTSLKGLN
ScALMT2-Im      EDPRRVAHSLKVGLALTLVSVLYYVTFPLFKGFGVSTLWAVLTVVVVMEYTVGGTSLKGLN
ScALMT2-Rd      EDPRRVAHSFKVGLALALVSVLYYVTFPLFKGFGVSTLWAVLTVVVVMEYTVGGTSLKGLN
*****

ScALMT2-Ai      RAFATLVAGFIAVGAHQVANRCGAQGEPIILLAI FVFLASAATFSRFIPEIKARYDYGV
ScALMT2-Im      RAFATLVAGFIAVGAHQVANRCGAQGEPIILLAI FVFLASAATFSRFIPEIKARYDYGV
ScALMT2-Rd      RAFATLVAGFIAVGAHQVANRCGAQGEPIILLAI FVFLASAATFSRFIPEIKARYDYGV
*****

ScALMT2-Ai      IFILTFSLVAVSSYRVEELIQLAHQRFSTIVIGVLTCLCTTIFVFPWAGEDLHKLTAAN
ScALMT2-Im      IFILTFSLVAVSSYRVEELIQLAHQRFSTIVIGVLTCLCTTIFVFPWAGEDLHKLTAAN
ScALMT2-Rd      IFILTFSLVAVSSYRVEELIQLAHQRFSTIVIGVLTCLCTTIFVFPWAGEDLHKLTAAN
*****

ScALMT2-Ai      LDKLAQFLQGLESECFGEKAASENLEGGKAFQVYKSVLNSKASEDSL CNFAKWE PGHGKF
ScALMT2-Im      LDKLAQFLQGLESECFGEKAASENLEGGKAFQVYKSVLNSKASEDSL CNFAKWE PGHGKF
ScALMT2-Rd      LDKLAQFLQGLESECFGEKAASENLEGGKAFQVYKSVLNSKASEDSL CNFAKWE PGHGKF
*****

ScALMT2-Ai      GFRHPWSQYQKLGALCRQCASSMEALASYVITLQKSQYPEANPELTLKVRMACGEMSSHS
ScALMT2-Im      GFRHPWSQYQKLGALCRQCASSMEALASYVITLQKSQYPEANPELTLKVRMACGEMSSHS
ScALMT2-Rd      GFRHPWSQYQKLGALCRQCASSMEALASYVITLQKSQYLEANPELTLKVRMACGEMSSHS
*****

ScALMT2-Ai      AKALKELSTAIRTMVVPSPASITMSAAI KAAKDLRNESEDAALLQVMHVAVTATLISDL
ScALMT2-Im      AKALKELSTAIRTMVVPSPASITMSAAI KAAKDLRNESEDAALLQVMHVAVTATLISDL
ScALMT2-Rd      AKALKELSTAIRTMVVPSPASITMSAAI EA KDLRNESEDAALLQVMHVAVTATLISDL
*****

ScALMT2-Ai      VTTIVKIAETADNLARLGHFKNPEKTQKDVA INIPSR
ScALMT2-Im      VTTIVKIAETADNLARLGHFKNPEKTQKDVA INIPNR
ScALMT2-Rd      VTTIVKIAETADNLARLGHFKNPEKTQKDVA INIPSR
*****
```

Anexo 10:

Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de *psScALMT2* y *ScALMT2* en el cultivar Ailés. Las secuencias constan de 1374 pb con dos únicos SNPs. El segundo de ellos (señalado en rojo) consiste en una transición de una citosina por una timina (C T), que producía un codón de terminación TAG prematuro.

```

ScALMT2-Ai      ATGGAGGTTGATCACCGCATCAGGGTGAGCGACGGCGACGGCAACGGCGAGACGACGGCC
psScALMT2-Ai    ATGGAGGTTGATCACCGCATCAGGGTGAGCGACGGCGACGGCAACGGCGAGACGACGGCC
*****

ScALMT2-Ai      GGACAAGGAGGCGTTGTTCGGCGTCTTCTTCGCGGGCTGCTGGCTGCGGCTCCGCTCGGTG
psScALMT2-Ai    GGACAAGGAGGCGTTGTTCGGCGTCTTCTTCGCGGGCTGCTGGCTGCGGCTCCGCTCGGTG
*****

ScALMT2-Ai      CTCGCCGGGCTCTGGTGCTGGGTCGACGGGTTCCGCCAGGAAGGTGGGCAGGATCGCCAGA
psScALMT2-Ai    CTCGCCGGGCTCTGGTGCTGGGTCGACGGGTTCCGCCAGGAAGGTGGGCAGGATCGCCAGA
*****

ScALMT2-Ai      GAGGATCCAAGGCGGGTGGCGCACTCGCTCAAGGTCGGCCTGGCGCTTACTCTGGTGTCC
psScALMT2-Ai    GAGGATCCAAGGCGGGTGGCGCACTCGCTCAAGGTCGGCCTGGCGCTTACTCTGGTGTCC
*****

ScALMT2-Ai      GTCTCTACTACGTACGCCGCTCTTCAAGGGCTTCGGGGTCTCCACGCTCTGGGCCGTG
psScALMT2-Ai    GTCTCTACTACGTACGCCGCTCTTCAAGGGCTTCGGGGTCTCCACGCTCTGGGCCGTG
*****

ScALMT2-Ai      CTCACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTACACCGTCGGTGGCAGCTGAGCAAAGGCTTGAAT
psScALMT2-Ai    CTCACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTACACCGTCGGTGGCAGCTGAGCAAAGGCTTGAAT
*****

ScALMT2-Ai      AGAGCCTTCGCGACGCTGGTGGCTGGGTTTCATCGCCGTGGGAGCTCATCAGGTAGCTAAC
psScALMT2-Ai    AGAGCCTTCGCGACGCTGGTGGCTGGGTTTCATCGCCGTGGGAGCTCATCAGGTAGCTAAC
*****

ScALMT2-Ai      CGCTGTGGTGCACAGGGGAGCCATACTGCTCGCCATCTTCGTCCTTCTTGCTAGCGTCG
psScALMT2-Ai    CGCTGTGGTGCACAGGGGAGCCATACTGCTCGCCATCTTCGTCCTTCTTGCTAGCGTCG
*****

ScALMT2-Ai      GCGGCAACGTTCTCGCGCTTCATCCCGGAGATCAAGGCGAGGTACGACTACGGCGTGACC
psScALMT2-Ai    GCGGCAACGTTCTCGCGCTTCATCCCGGAGATCAAGGCGAGGTACGACTACGGCGTGACC
*****

ScALMT2-Ai      ATCTTCATACTCACCTTCAGCCTGGTGGCCGTGTCGAGCTACCGCGTGGAGGAGCTCATT
psScALMT2-Ai    ATCTTCATACTCACCTTCAGCCTGGTGGCCGTGTCGAGCTACCGCGTGGAGGAGCTCATT
*****

ScALMT2-Ai      CAGCTCGCGCACCAGCGCTTCTCCACCATCGTCATCGGCGTACTTACCTGCCTCTGCACC
psScALMT2-Ai    CAGCTCGCGCACCAGCGCTTCTCCACCATCGTCATCGGCGTACTTACCTGCCTCTGCACC
*****

ScALMT2-Ai      ACCATCTTCGTCCTCCCTGTCTGGGCCGGCGAGGATCTCCACAAGCTCACCGCCGCCAAC
psScALMT2-Ai    ACCATCTTCGTCCTCCCTGTCTGGGCCGGCGAAGATCTCCACAAGCTCACCGCCGCCAAC
*****

ScALMT2-Ai      CTCGACAAGCTGGCACAGTTTCTTCAAGGATTGGAATCTGAATGCTTTGGAGAAAAGGCT
psScALMT2-Ai    CTCGACAAGCTGGCACAGTTTCTTCAAGGATTGGAATCTGAATGCTTTGGAGAAAAGGCT
*****

ScALMT2-Ai      GTCAGCGAGAATCTGGAGGGCAAAGCCTTTCTGCAAGTGTACAAGAGCGTCTCAACTCC
psScALMT2-Ai    GTCAGCGAGAATCTGGAGGGCAAAGCCTTTCTGCAAGTGTACAAGAGCGTCTCAACTCC
*****

```

Anexos

```
ScALMT2-Ai      AAGGCCAGTGAGGACTCCCTGTGTAATTTTGCTAAGTGGGAGCCCGGTATGGCAAATTC
psScALMT2-Ai   AAGGCCAGTGAGGACTCCCTGTGTAATTTTGCTAAGTGGGAGCCCGGTATGGCAAATTC
*****

ScALMT2-Ai      GGCTTCCGGCACCCTTGGAGCCAATACCAGAAGCTCGGAGCTCTTTGTCGTCAGTGC GCG
psScALMT2-Ai   GGCTTCCGGCACCCTTGGAGCCAATACTAGAAGCTCGGAGCTCTTTGTCGTCAGTGC GCG
*****

ScALMT2-Ai      TCTTCAATGGAGGCTCTTGCTTCCTATGTCATCACACTGCAAAAATCCAGTACCCTGAG
psScALMT2-Ai   TCTTCAATGGAGGCTCTTGCTTCCTATGTCATCACACTGCAAAAATCCAGTACCCTGAG
*****

ScALMT2-Ai      GCCAATCCAGAGCTAACCTTAAAGGTCCGAATGGCGTGC GGGGAAATGAGCTCGCACTCT
psScALMT2-Ai   GCCAATCCAGAGCTAACCTTAAAGGTCCGAATGGCGTGC GGGGAAATGAGCTCGCACTCT
*****

ScALMT2-Ai      GCTAAGGCGCTCAAGGAGCTATCAACAGCCATTCCGACAATGGTCGTGCCATCTCCGGCC
psScALMT2-Ai   GCTAAGGCGCTCAAGGAGCTATCAACAGCCATTCCGACAATGGTCGTGCCATCTCCGGCC
*****

ScALMT2-Ai      AGCATCACCATGTCTGCAGCCATCAAAGCTGCAAAAGACCTCAGAAATGAATTATCAGAG
psScALMT2-Ai   AGCATCACCATGTCTGCAGCCATCAAAGCTGCAAAAGACCTCAGAAATGAATTATCAGAG
*****

ScALMT2-Ai      GACGCAGCTCTGTTGCAAGTGATGCATGTGGCTGTTACTGCCACACTTATCTCAGACTTG
psScALMT2-Ai   GACGCAGCTCTGTTGCAAGTGATGCATGTGGCTGTTACTGCCACACTTATCTCAGACTTG
*****

ScALMT2-Ai      GTTACGACAATAGTGAAAATTCAGAAAAGTGTGACAATCTAGCACGGCTTGGACTTC
psScALMT2-Ai   GTTACGACAATAGTGAAAATTCAGAAAAGTGTGACAATCTAGCACGGCTTGGACTTC
*****

ScALMT2-Ai      AAGAACCCTGAAAAAAGTCAAGAAAGATGTTGCTATCAACATTCCGAGCAGATAA
psScALMT2-Ai   AAGAACCCTGAAAAAAGTCAAGAAAGATGTTGCTATCAACATTCCGAGCAGATAA
*****
```

Anexo 11:

Secuencia de 310 aminoácidos de la proteína trunca da psScALMT2-Ai.

```
MEVDHRIRVSDGDNGETTAGQGGVGVVFFAGCWLRLRSVLAGLWCWVDGFAKRVGRIAREDPRRVAHSLKVLGLALTLVS
VLYYVTPLFKGFVSTLWAVLTVVVVMEYTVGGTLSKGLNRAFATLVAGFIAVGAHQVANRCGAQGEPIILLAI FVFLAS
AATFSRFIPEIKARYDYGTIFILTFSLVAVSSYRVEELIQLAHQRFSTIVIGVLTCLCTTIFVFPVWAGEDLHKLTAAN
LDKLAQFLQGLESECFGEKAVSENLEKAFVQVYKSVLNSKASEDSL CNFAKWEFGHGKFGFRHPWSQY
```

Anexo 12:

Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de *psScALMT2* y *ScALMT2* en el cultivar Riodeva. Las secuencias constan de 1372 y 1374 pb, respectivamente. *psScALMT2* mostraba cuatro SNPs y dos deleciones de un único nucleótido respecto a la secuencia funcional *ScALMT2-Rd*. La primera deleción (señalada en rojo) producía un cambio en el marco de lectura que generaba un codón de terminación TAG prematuro.

```
ScALMT2-Rd      ATGGAGGTTGATCACCGCATCAGGGTGAGCGACGGCGACGGCAACGGCGAGACGACGGCC
psScALMT2-Rd   ATGGAGGTTGATCACCGCATCAGGGTGAGCGACGGCGACGGCAACGGCGAGACGACGGCC
*****

ScALMT2-Rd      GGACAAGGAGGCGTTGTGCGGCTCTTCTTCGCGGGCTGCTGGCTGCGGCTCCGCTCGGTTG
psScALMT2-Rd   GGACAAGGAGGCGTTGTGCGGCTCTTCTTCGCGGGCTGCTGGCTGCGGCTCCGCTCGGTTG
*****

ScALMT2-Rd      CTCGCCGGGCTCTGGTGCTGGGTGACGGGTTCCGCCAGGAAGGTGGGCAGGATCGCCAGA
psScALMT2-Rd   CTCGCCGGGCTCTGGTGCTGGGTGACGGGTTCCGCCAGGAAGGTGGGCAGGATCGCCAGA
*****
```

ScALMT2-Rd GAGGATCCAAGGAGGGTGGCGCACTCGTTCAAGGTCGGCCTGGCGCTCGCCCTGGTGTCC
psScALMT2-Rd GAGGATCCAAGGAGGGTGGCGCACTCGTTCAAGGTCGGCCTGGCGCTCACCTGGTGTCC

ScALMT2-Rd GTCCTCTACTACGTACGCCGCTCTTCAAGGGCTTCGGGGTCTCCACGCTCTGGGCCGTG
psScALMT2-Rd GTCCTCTACTACGTACGCCGCTCTTCAAGGGCTTCGGGGTCTCCACGCTCTGGGCCGTG

ScALMT2-Rd CTCACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTATACCGTCGGTGGCAGCTGAGCAAAGGCTTGAAT
psScALMT2-Rd CTCACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTATACCGTCGGTGGCAGCTGAGCAAAGGCTTGAAT

ScALMT2-Rd AGAGCCTTCGCGACGCTGGTGGCTGGGTTTCATCGCCGTGGGAGCTCATCAGGTAGCTAAC
psScALMT2-Rd AGAGCCTTCGCGACGCTGGTGGCTG-GTTCATCGCCGTGGGAGCTCATCAGGTAGCTAAC

ScALMT2-Rd CGCTGTGGTGCACAGGGGAGCCATACTGCTCGCCATCTTCGTCCTTCTTGTAGCGTCG
psScALMT2-Rd CGCTGTGGTGCACAGGGGAGCCATACTGCTCGCCATCTTCGTCCTTCTTGTAGCGTCG

ScALMT2-Rd GCGGCAACGTTCTCGCGCTTCCATCCCGAGATCAAGGCGAGGTACGACTACGGCGTGACC
psScALMT2-Rd GCGGCAACGTTCTCGCGCTTCCATCCCGAGATCAAGGCGAGGTACGACTACGGCGTGACC

ScALMT2-Rd ATCTTCATACTCACCTTCAGCCTGGTGGCCGTGTCGAGCTACCGCGTGGAGGAGCTCATT
psScALMT2-Rd ATCTTCATACTCACCTTCAGCCTGGTGGCCGTGTCGAGCTACCGCGTGGAGGAGCTCATT

ScALMT2-Rd CAGCTGGCGCACCAGCGCTTCCACCATCGTCATCGGCGTCCCTACCTGCCTCTGCACC
psScALMT2-Rd CAGCTGGCGCACCAGCGCTTCCACCATCGTCATCGGCGTCCCTACCTGCCTCTGCACC

ScALMT2-Rd ACCATCTTCGTCCTTCCCGTCTGGGCCGGCGAGGATCTCCACAAGCTCACTGCCGCAAC
psScALMT2-Rd ACCATCTTCGTCCTTCCCGTCTGGGCCGGCGAGGATCTCCACAAGCTCACTGCCGCAAC

ScALMT2-Rd CTCGACAAGCTGGCACAGTTTCTTCAAGGATTGGAATCTGAATGCTTTGGAGAAAAGGCT
psScALMT2-Rd CTCGACAAGCTGGCACAGTTTCTTCAAGGATTGGAATCTGAATGCTTTGGAGAAAAGGCT

ScALMT2-Rd GCCAGCGAGAATCTGGAGGGCAAAGCCTTCTGCAAGTGTACAAGAGCGTCTCAACTCC
psScALMT2-Rd GCCAGCGAGAATCTGGAGGGCAAAGCCTTCTGCAAGTGTACAAGAGCGTCTCAACTCC

ScALMT2-Rd AAGGCTAGTGAGGACTCCCTGTGTAATTTTGCTAAGTGGGAGCCCGGTTCATGGCAAATTC
psScALMT2-Rd AAGGCTAGTGAGGACTCCCTGTGTAATTTTGCTAAGTGGGAGCCCGGTTCATGGCAAATTC

ScALMT2-Rd GGCTTCCGGCACCCCTTGGAGCCAATACCAGAAGCTCGGAGCTCTTGTGTCAGTGCAGCGG
psScALMT2-Rd GGCTTCCGGCACCCCTTGGAGCCAATACCAGAAGCTCGGAGCTCTTGTGTCAGTGCAGCGG

ScALMT2-Rd TCTTCAATGGAGGCTCTTGCTTCCATATGTCATCACACTGCAAAAATCCAGTACCTTGAG
psScALMT2-Rd TCTTCAATGGAGGCTCTTGCTTCCATATGTCATCACACTGCAAAAATCCAGTACCTTGAG

ScALMT2-Rd GCCAATCCAGAGCTAACCTTAAAGGTCCGAATGGCGTGCAGGGAAATGAGCTCGCACTCT
psScALMT2-Rd GCCAATCCAGAGCTAACCTTAAAGGTCCGAATGGCGTGCAGGGAAATGAGCTCGCACTCT

ScALMT2-Rd GCTAAGGCGCTCAAGGAGCTATCAACAGCCATTCGGACAATGGTCGTGCCATCTCCGGCC
psScALMT2-Rd GCTAAGGCGCTCAAGGAGCTATCAACAGCCATTCGGACAATGGTCGTGCCATCTCCGGCC

ScALMT2-Rd AGCATCACCATGTCTGCAGCCATCGAAGCTGCAAAAAGACCTCAGAAATGAATTATCAGAG

Anexos

```
psScALMT2-Rd      AGCATCACCATGTCTGCAGCCATCAAAGCTGCAAAAGACCTCAGAAATGAATTATCAGAG
*****
ScALMT2-Rd        GACGCAGCTCTGTTGCAAGTGATGCATGTGGCTGTACTGCCACACTTATCTCAGACTTG
psScALMT2-Rd      GACGCAGCTCTGTTGCAAGTGATGCATGTGGCTGTACTGCCACACTTATCTCAGACTTG
*****
ScALMT2-Rd        GTTACGACAATAGTGAAAATTGCAGAAACTGCTGACAATCTAGCACGGCTTGGACACTTC
psScALMT2-Rd      GTTACGACAATAGTGAAAATTGCAGAAACTGCTGACAATCTAGCACGGCTTGGACACTTC
*****
ScALMT2-Rd        AAGAACCCTGAAAAAATCAGAAAAGATGTTGCTATCAACATTCGAGCAGATAA
psScALMT2-Rd      AAGAACCCTGAAAAAATCAGAAAAGATGTTGCTATCAACATTCGAGCAATAA-
*****. : : *
```

Anexo 13:

Secuencia de 137 aminoácidos de la proteína truncada psScALMT2-Rd.

MEVDHRIRVSDGDGNGETTAGQGGVVG VFFAGCWLRLRSVLAGLWCWVDGFARKVG
RIAREDP RRVAHSFKVGLALTLVSVLYVTP LFKGFGVSTLWAVLTVVVVMEYTVGGTLS
KGLNRAFATLVAGSSPWELIR

Anexo 14:

Alineamiento de las secuencias parciales del gen *ScALMT3* en los cv. Imperial (Im) y Ailés (Ai) (1228 nucleótidos), y en la línea consanguínea Riodeva (Rd) (1231 nucleótidos).

```
ScALMT3-Rd        GCGCTCGCGCTGGTCTCGGTGTTCTACTACACCAGGCCCTGTACGAGGGCGTTGGCGGC
ScALMT3-Ai        GCGCTCGCGCTGGTCTCGGTGTTCTACTACACCAGGCCCTGTACGAGGGCGTTGGCGGC
ScALMT3-Im        GCGCTCGCGCTGGTCTCGGTGTTCTACTACACCAGGCCCTGTACGAGGGCGTTGGCGGC
*****

ScALMT3-Rd        GCCGCCATGTGGGCCATCATGACAGTCGTCGTGATCTTCGAGTACACCGTTGGTAAGTCG
ScALMT3-Ai        GCCGCCATGTGGGCCATTATGACAGTCGTCGTGATCTTCGAGTACACCGTTGGTAAGTCG
ScALMT3-Im        GCCGCCATGTGGGCCATCATGACAGTCGTCGTGATCTTCGAGTACACCGTTGGTAAGTCG
*****

ScALMT3-Rd        TCGTACTTACACACCCTCACATCTAGTAGCTGAAGAATACATGTTGCAGTCAACGTACGT
ScALMT3-Ai        TCGTACTTACACACCCTCACATCTAGTAGGTGAAGAATACATGTTGCAGTCAACGTACGT
ScALMT3-Im        TCGTACTTACACACCCTCACATCTAGTAGCTGAAGAATACATGTTGCAGTCAACGTACGT
*****

ScALMT3-Rd        ACTTCGATTGGCTTTCAGATGCTGACCTCTCTCATGCATGCACGTGCAGGTGGCTGTGTG
ScALMT3-Ai        ACTTCGATTGGCTTTCAGATGCTGACCTC--TCATGCATGCACGTGCAGGTGGCTGTGTG
ScALMT3-Im        ACTTCGATTGGCTTTCAGATGCTGACCTC--TCATGCATGCACGTGCAGGTGGCTGTGTG
*****. : : *****

ScALMT3-Rd        TACAAGGGGTTCAACCGAGCCGCCGACGGTCAGCGCCGGCGCGATCGCGCTCGGCCTC
ScALMT3-Ai        TACAAGGGGTTCAACCGAGCCGCCGACGGTCAGCGCCGGCGCGATCGCGCTCGGCCTC
ScALMT3-Im        TACAAGGGGTTCAACCGAGCCGCCGACGGTTAGCGCCGGCGCGATCGCGCTCGGCCTC
*****

ScALMT3-Rd        CACTGGATCGCGGCAACGCCGGCCACGAGCTCGAGCCGTTTCATCCGAGCGGCTCGGTT
ScALMT3-Ai        CACTGGATCGCGGCAACGCCGGCCACGAGCTCGAGCCGTTTCATCCGAGCGGCTCGGTT
ScALMT3-Im        CACTGGATCGCGGCAACGCCGGCCACGAGCTCGAGCCGTTTCATCCGAGCGGCTCGGTT
*****

ScALMT3-Rd        TTCCTGCTCGGTAAGTATCCACGCGTGCCTGTACATGAATCGCGTATACATCGTGTGCGC
ScALMT3-Ai        TTCCTGCTCGGTAAGTATCCACGCGTGCCTGTACATGAATCGCGTATACATCGTGTGCGC
ScALMT3-Im        TTCCTGCTCGGTAAGTATCCACGCGTGCCTGTACATGAATCGCGTATACATCGTGTGCGC
*****

ScALMT3-Rd        CCTAGCTAACGGTCTTGCTACGCGCTCCGTGCGTGCAGCTTCCATGGCGACGTTCTCGCG
```

ScALMT3-Ai CCTAGCTAACGGTCTTGCTACGCGCTCCGTGCGTGCAGCTTCCATGGCGACGTTCTCGCG
 ScALMT3-Im CCTAGCTAACGGTCTTGCTACGCGCTCCGTGCGTGCAGCTTCCATGGCGACGTTCTCGCG

ScALMT3-Rd GTTCATACCCACGGTGAAGGCGCGGTTTCGACTACGGCGTGACCATCTTCATCCTGACGTA
 ScALMT3-Ai GTTCATACCCACGGTGAAGGCGCGGTTTCGACTACGGCGTGACCATCTTCATCCTGACGTA
 ScALMT3-Im GTTCATACCCACGGTGAAGGCGCGGTTTCGACTACGGCGTGACCATCTTCATCCTGACGTA

ScALMT3-Rd CAGCCTGGTGGCCGTGTCCGGGTACCGCGTGGAGGCGCTGCTGGCCATGGCGCAGCAGAG
 ScALMT3-Ai CAGCCTGGTGGCCGTGTCCGGGTACCGCGTGGAGGCGCTGCTGGCCATGGCGCAGCAGAG
 ScALMT3-Im CAGTCTGGTGGCCGTGTCCGGGTACCGCGTGGAGGCGCTGCTGGCCATGGCGCAGCAGAG
 *** *****

ScALMT3-Rd GGTGTGCACCATTGCCATCGGCGTCTTCATGTGCCTCTCCGTCTGTGTGCTCATCTGCC
 ScALMT3-Ai GGTGTGCACCATTGCCATCGGCGTCTTCATGTGCCTCTCCGTCTGTGTGCTCATCTGCC
 ScALMT3-Im GGTGTGCACCATTGCCATCGGCGTCTTCATGTGCCTCTCCGTCTGTGTGCTCATCTGCC

ScALMT3-Rd CGTGTGGGCAGGGCAGGAGCTGCACCGCCTCACTGCGCGCAACATAGATAAGCTCGCCGG
 ScALMT3-Ai CGTGTGGGCAGGGCAGGAGCTGCACCGCCTCACTGCGCGCAACATGGATAAGCTCGCCGG
 ScALMT3-Im CGTGTGGGCAGGGCAGGAGCTGCACCGCCTCACTGCGCGCAACATGGATAAGCTCGCCGG

ScALMT3-Rd CGCCGTCGAGGCCCTGCGTGGAGGACTACTTCGCGGAGCAGACGGACGGCAAGCAGCAGCC
 ScALMT3-Ai CGCCGTCGAGGCCCTGCGTGGAGGACTACTTCGCGGAGCAGACGGACGGCAAGCAGCAGCC
 ScALMT3-Im CGCCGTCGAGGCCCTGCGTGGAGGACTACTTCGCGGAGCAGACGGACGGCAAGCAGCAGCC

ScALMT3-Rd GCCGTCCGCCGGGGCGGACGGGTACAAGTGCCTGCTCAACTCCAAGGCGTCCGAGGACTC
 ScALMT3-Ai GCCGTCCGCCGGGGCGGACGGGTACAAGTGCCTGCTCAACTCCAAGGCGTCCGAGGACTC
 ScALMT3-Im GCCGTCCGCCGGGGCGGACGGGTACAAGTGCCTGCTCAACTCCAAGGCGTCCGAGGACTC

ScALMT3-Rd GCAGGCCAACCTGGCGCGGTGGGAGCCCGCGCACGGCAGGTTCCGGCTCCGCCACCCGTA
 ScALMT3-Ai GCAGGCCAACCTGGCGCGGTGGGAGCCCGCGCACGGCAGGTTCCGGCTCCGCCACCCGTA
 ScALMT3-Im GCAGGCCAACCTGGCGCGGTGGGAGCCCGCGCACGGCAGGTTCCGGCTCCGCCACCCGTA

ScALMT3-Rd CGAACAGTACAGGAACGTCGGCGCCGCCATGCGGCACTGCGCCTACTGCGTGGAGGCACT
 ScALMT3-Ai CGAACAGTACAAGAACGTCGGCGCCGCCATGCGGCACTGCGCCTACTGCGTGGAGGCACT
 ScALMT3-Im CGAGCAGTACAAGAACGTCGGCGCCGCCATGCGGCACTGCGCCTACTGCGTGGAGACCCCT
 *** *****

ScALMT3-Rd GAGCGGGTGTGTCCGCTCAGAGATCCAGGCGCCCGAGCACGTCAAGCGGCACCTCGCCGA
 ScALMT3-Ai GAGCGGGTGTGTCCGCTCAGAGATCCAGGCGCCCGAGCATGTCAAGCGGCACCTCGCCGA
 ScALMT3-Im GAGCGGGTGTGTCCGCTCAGAGATCCAGGCGCCCGAGCACGTCAAGCGGCACCTCGCCGA

ScALMT3-Rd CGGCTGCACGACGGTGGCGGCGCGGTGCGCGCGGGTGCTCGGGGAGGCCGCGAGCTCCGT
 ScALMT3-Ai CGGCTGCACGACGGTGGCGGCGCGGTGCGCGCGGGTGCTCGGGGAGGCCGCGAGCTCCGT
 ScALMT3-Im CGGCTGCACGACGGTGGCGGCGCGGTGCGCGCGGGTGCTCGGGGAGGCCGCGAGCTCCGT
 *** *****

ScALMT3-Rd CAGCGAAATGACTACGTCGTGGAGCCTGGACTTCGCCGTGGCCGAGATGAACACCGCCGT
 ScALMT3-Ai CAGCGCAATGACTACGTCGTGGAGCCTGGACTTCGCCGTGGCCGAGATGAACACCGCCGT
 ScALMT3-Im CAGCGAAATGACTACGTCGTGGAGCCTGGACTTCGCCGTGGCCGAGATGAACACCGCCGT

ScALMT3-Rd GCAGGAGCTCCAGAGCGACCTGAGGGAGCTCCCATCCAAGCTGGCCGAGGAGTGCCTGC
 ScALMT3-Ai GCAGGAGCTCCAGAGCGACCTGAGGGAGCTCCCATCCAAGCTGGCCGAGGAGTGCCTGC
 ScALMT3-Im GCAGGAGCTCCAGAGCGACCTGAGGGAGCTCCCATCCAAGCTGGCCGAGGAGTGCCTGC

ScALMT3-Rd GACGGTGATCGACGCCGTGCAGCTCTTACA
 ScALMT3-Ai GACGGTGATCGACGCCGTGCAGCTCTTAC-

Anexos

ScALMT3-Im GACGGTGATCGACGCCGTGCAGCTCTTCAC-

Anexo 15:

Alineamiento de fragmentos proteicos de ScALMT3 en los cv. Imperial (Im) y Ailés (Ai), y en la línea consanguínea Riodeva (Rd). Consistían en 359, 337 y 338 aminoácidos, respectivamente.

ScALMT3-Rd -----MHVQVAVCTRGSTEPPRRSAPARSRSASTGSRPTPATS
ScALMT3-Im LKNTCCSQRTYFDWLSADLSCMHVQVAVCTRGSTEPPRRRLAPARSRSASTGSRPTPATS
ScALMT3-Ai -----MHVQVAVCTRGSTEPPRRSAPARSRSASTGSRPTPATS
***** * *****

ScALMT3-Rd SSRSSAAARFSCSVSIHACLYMNRVYIVCALANGLATRSVRAASMATFSRFIPTVKARFD
ScALMT3-Im SSRSSAAARFSCSVSIHACLYMNRVYIVCALANGLATRSVRAASMATFSRFIPTVKARFD
ScALMT3-Ai SSRSSAAARFSCSVSIHACLYMNRVYIVCALANGLATRSVRAASMATFSRFIPTVKARFD

ScALMT3-Rd YGVTIFILTYSLVAVSGYRVEALLAMAQQRVCTIAIGVFMCLSVCLICPVWAGQELHRL
ScALMT3-Im YGVTIFILTYSLVAVSGYRVEALLAMAQQRVCTIAIGVFMCLSVCLICPVWAGQELHRL
ScALMT3-Ai YGVTIFILTYSLVAVSGYRVEALLAMAQQRVCTIAIGVFMCLSVCLICPVWAGQELHRL

ScALMT3-Rd TARNIDKLAGAVEACVEDYFAEQTDGKQQPPSAGADGYKCVLNSKASEDSQANLARWEPA
ScALMT3-Im TARNMDKLAGAVEACVEDYFVEQTDGKQQPPSAGADGYKCVLNSKASEDSQANLARWEPA
ScALMT3-Ai TARNMDKLAGAVEACVEDYFVEQADGKQQPPSAGADGYKCVLNSKASEDSQANLARWEPA
.**.***.*****

ScALMT3-Rd HGRFGFRHPYEQYRNVGAAMRHCAVCVEALSGCVRSEIQAPEHVKRHLADGCTTVAARCA
ScALMT3-Im HGRFGFRHPYEQYKNVGAAMRHCAVCVETLSGCVRSEIQAPEHVKRHLADGCTTVAARCA
ScALMT3-Ai HGRFGFRHPYEQYKNVGAAMRHCAVCVEALSGCVRSEIQAPEHVKRHLADGCTTVAARCA
*****.*****.*****

ScALMT3-Rd RVLGEAASSVSEMTTWSLDFAVAEMNTAVQELQSDLRELPSKLAEESEPATVIDAVQLF
ScALMT3-Im RVLGEAASSVSEMTTWSLDFAVAEMNTAVQELQSDLRELPSKLAEESEPATVIDAVQLF-
ScALMT3-Ai RVLGEAASSVSAMTTWSLDFAVAEMNTAVQELQSDLRELPSKLAEESEPATVIDAVQLF-
***** *****

Anexo 16:

Alineamiento de las secuencias parciales del gen ScALMT4 en el cv. Ailés (Ai), y en la línea consanguínea Riodeva (Rd). En ambos casos las secuencias constan de 441 nucleótidos.

ALMT4-Rd CTGAGATCTTAGATGCCACAAaCCAAGCTGCAGAGTTATTGCGCAGTTTGCCAAAGGATG
ALMT4-Ai CTGAGATCTTAGATGCCACAAACCAAGCTGCAGAGTTATTGCGCAGTTTGCCAAAGGATG

ALMT4-Rd TAAACAACATGAAGTGGAGCCTCCAAACAAGCCTACTCAAGCATGTGCATGTCTCAACTG
ALMT4-Ai TAAACAACATGAAGTGGAGCCTCCAAACAAGCCTACTCAAGCATGTGCATGTCTCAACTG

ALMT4-Rd AGCGTCTGCAACAATCAATTGACCTGCACTCCTACCTCTTTGCTGTAAATCATGAAGACA
ALMT4-Ai AGCGTCTGCAACAATCAATTGACCTGCACTCCTACCTCTTTGCTGTAAATCATGAAGACA

ALMT4-Rd ACTCTATCAAGCCACAACCTAAAAACCTCCAGGGTTGTCACTTTCAACCTCAACATCAAAC
ALMT4-Ai ACTCTATCAAGCCACAACCTAAAAACCTCCAGGGTTGTCACTTTCAACCTCAACATCAAAC

ALMT4-Rd AAAATGATGACCCAGAAAGTAAGATAGCTGAAGACATAACAACACAAGTAGCTGGGCCAC
ALMT4-Ai AAAATGATGACCCAGAAAGTAAGATAGCTGAAGACATAACAACACAAGTAGCTGGGCCAC

ALMT4-Rd TGCAACCTGAAGCCTACCATGAGATGATGAAAAGGCAGCAGAGGAGGCTGCATTCGTGGC
ALMT4-Ai TGCAACCTGAAGCCTACCATGAGATGATGAAAAGGCAGCAGAGGAGGCTGCATTCGTGGC

ALMT4-Rd CTTCTCGGGAGGTGGATGATTTTGAAGATGATGAGAATGTCGTTTCTGATATGATTCCGA
 ALMT4-Ai CTTCTCGGGAGGTGGATGATTTTGAAGATGATGCGAATGTCGTTTCTGATATGATTCCGA

ALMT4-Rd GGATGCGTGCACCTGAAAGTA
 ALMT4-Ai GGATGCGTGCACCTGAAAGTA

Anexo 17:

Alineamiento de fragmentos proteicos de ScALMT4 en el cv. Ailés (Ai) y en la línea consanguínea Riodeva (Rd), consistentes ambos en 146 aminoácidos.

ALMT4-Ai EILDATNQAELLRS LAKDVNNMKWSLQTSLLKHVHVSTERLQQSIDLHSYLFAVNHEDN
 ALMT4-Rd EILDATNQAELLRS LAKDVNNMKWSLQTSLLKHVHVSTERLQQSIDLHSYLFAVNHEDN

ALMT4-Ai SIKPQLKTSRVVTFNLNIKQND DPESKIAEDITTQVAGPLQPEAYHEMMKRQQRRLHSWP
 ALMT4-Rd SIKPQLKTSRVVTFNLNIKQND DPESKIAEDITTQVAGPLQPEAYHEMMKRQQRRLHSWP

ALMT4-Ai SREVDDFEDDANVVS DMI PRMRALES
 ALMT4-Rd SREVDDFEDDENVVS DMI PRMRALES

Anexo 18:

Alineamiento de las secuencias parciales del gen ScALMT5 para los cv. Petkus y Ailés, y la línea consanguínea Riodeva. Consistían en 275, 388 y 387 nucleótidos, respectivamente.

ALMT5-Rd AGGTTTCAATAGGGGATTAGGAACACTTACTGCAGGAGGACTTGCTCTAGCAATTGCTGA
 ALMT5-Pe -----
 ALMT5-Ai AGGTTTCAATAGGGGATTAGGAACCTTACTGCAGGAGGGCTTGCTCTAGCAGTTGCCGA

ALMT5-Rd ATCGGCCAAAAACCTGGGGGAAATGGAAGAAGTGATTATTTGTTGTGAGCACCTTCACTGT
 ALMT5-Pe -----TTTACTGT
 ALMT5-Ai ATTGTCAAAAAACCCTGGGGGCATTGGAAGAAGTGATCCTTGTATCAGCATCTTTACTGT
 ** *****

ALMT5-Rd TGGTATGCATCAAAGCTTGCTGAGTTCATTTCCCTGGTGCATGTTATGCGAGTGTATCTA
 ALMT5-Pe TGGTAAGCATTGG-GGCATGCTGCGATAATTTCCCTGGTGCATTTTGTACAAGTGTATCTA
 ALMT5-Ai TGGTAAGCATTGG-GGCATGCTGCGATAATTTCCCTGGTGCATTTTGTACAAGTGTATCTA
 *****:***** .. **:*****.*:*.***** **.*.*****

ALMT5-Rd ACTTGTGTCTACTGGCTCTATGCTTTTACTGCTAGGTTTTTGTACAACCTTGCCAAAG
 ALMT5-Pe ATTTGTACTACTCTACTTTTATGTTTTTACTGTTAGTTTTATCACAACTTGCCAAAG
 ALMT5-Ai ATCTGTACTACTCTACTTTTATGTTTTTACTGTTAGTTTTATCACTAACTTGCCAAAG
 * ***:*.:** * **** ***** *****: **.*.*****

ALMT5-Rd CAGCACCCAAAGATGAAGCCTTATGAATATGGATTTTCGTGTATTCTTGTGTAACATTTGGT
 ALMT5-Pe CTACACCCAACGATGAAGCCTTATGAATATGGATTTTCGTGTATTCTTGTGACATTCGTT
 ALMT5-Ai CTACACCCAACGATGAAGCCTTATGAATATGGATTTTCGTGTATTCTTGTGACATTCGTT
 *.:*****.***** ***** * .***** *

ALMT5-Rd TATGTCATGGTCTCTGGATACAGCACAGGGAAGTTCACTGATACAGCTGTAAACAGATTT
 ALMT5-Pe TATGTCATGGTCTCTGGTACAACACAGGGAAGTTCACTGATACGGCTGTAAGTAGATTT
 ALMT5-Ai TATGTCATGGTCTCTGGTACAACACAGGGAAGTTCACTGATACGGCTGTAAGTAGATTT
 *****.****.*****.*****.*****

ALMT5-Rd GTATTCATTGCTCTTGGTGCTGCTGTCA
 ALMT5-Pe GTATTGATTGCTCTTGGTGCTGCTGTCA
 ALMT5-Ai GTATTGATTGCTCTTGGTGCTGCTGTCA

Anexo 19:

Alineamiento de fragmentos proteicos de ScALMT5 en los cv. Petkus y Ailés, y la línea consanguínea Riodeva. Consistían en 59 aminoácidos en los tres casos.

```
ALMT5-Pe      LLGFITNLAKLHPTMKPYEYGFVFLFTFVYVMVSGYNTGKFTDTAVSRFVLIALGAAV
ALMT5-Ai      LLGFITNLAKLHPTMKPYEYGFVFLFTFVYVMVSGYNTGKFTDTAVSRFVLIALGAAV
ALMT5-Rd      LLGFCTTLAKQHPKMKPYEYGFVFLFTFVYVMVSGYSTGKFTDTAVNRFVFIALGAAV
                **** * .*** ** .***** ***** .***** .** :*****
```

Anexo 20:

Alineamiento de las secuencias del gen ScALMT6 en los cv. Ailés (Ai) y Petkus (Pe), y en la línea consanguínea Riodeva (Rd). En los tres casos las secuencias constan de 679 nucleótidos.

```
ALMT6-Ai      GCACACTATGCAAGCTGGGAGCCAAGAcACTCAATGCAGTGTTACAGTTACCCATGGCAA
ALMT6-Pe      GCACACTATGCAAGCTGGGAGCCAAGACACTCGATGCAGTGTTACAGTTACCCATGGCAA
ALMT6-Rd      GCACACTATGCAAGCTGGGAGCCAAGACACTCGATGCAGTGTTACAGTTACCCATGGCAA
                ***** ***** .***** *****
```

```
ALMT6-Ai      AAGTATGTGAAGCTCGGATCTGTGCTTAGACACTTCGCATATACTGTCGCTGCACCTTCAT
ALMT6-Pe      AAGTATGTGAAGCTCGGATCTGTGCTTAGACACTTCGCATATACTGTCGCTGCACCTTCAT
ALMT6-Rd      AAGTATGTGAAGCTCGGATCTGTGCTTAGACACTTCGCATATACTGTCGCTGCACCTTCAT
                *****
```

```
ALMT6-Ai      GGATGCCTCGAATCAGAAATTCAGGTAAGTGCAGAAACACTTGTGATATAACATGCTTTTCC
ALMT6-Pe      GGGTGCCTCGAATCAGAAATTCAGGTAAGTGCAGAAACACTTGTGATATAACATGCTTTTCC
ALMT6-Rd      GGGTGCCTCGAATCAGAAATTCAGGTAAGTGCAGAAACACTTGTGATATAACATGCTTTTCC
                ** .***** .*****
```

```
ALMT6-Ai      AGATTTATCTGATATATCAATATTATTCAAGCAAACCATCTTCTGTTGTGCTCACAA
ALMT6-Pe      AGATTTATCTGATATATCAATATTATTCAAGCAAACCATCTTCTGTTGTGCTCACAA
ALMT6-Rd      AGATTTGTCTGATATATCAATATTATTCAAGCAAACCATCTTCTGTTGTGCTCACAA
                ***** .*****
```

```
ALMT6-Ai      AGTTATATTTATCGATTGAAGACTCCGACATCCGTCAGATCACTATTTCGAACCCCATGC
ALMT6-Pe      AGTTATATTTATCGATTGAAGACTCCGACATCCGTCAGATCACTATTTCGAACCCCATGC
ALMT6-Rd      AGTTATATTTATCGATTGAAGACTCCGACATCCGTCAGATCACTATTTCGAACCCCATGC
                *****
```

```
ALMT6-Ai      ATGAGAGTTGCACGAGAGGTGACCAAGGTTCTACAGGAGCTTGCAGACAGCATAAGAAAT
ALMT6-Pe      ACGAGAGTTGCACGAGAGGTGACCAAGGTTCTACAGGAGCTTGCAGACAGCATAAGAAAT
ALMT6-Rd      ACGAGAGTTGCACGAGAGGTGACCAAGGTTCTACAGGAGCTTGCAGACAGCGTAAGAAAT
                * ***** .*****
```

```
ALMT6-Ai      CACCATCGCTGTGCCCTGATGTGCTGTGCGATCATCTTCATGAAGCACTACAGGATCTG
ALMT6-Pe      CACCATCGCTGTGCCCTGATGTTCTGTGCGATCATCTTCATGAAGCACTACAGGACCTG
ALMT6-Rd      CACCATCGCTGTGCCCTGATGTTCTGTGCGATCATCTTCATGAAGCACTACAGGACCTG
                ***** ***** *****
```

```
ALMT6-Ai      AACTCAGCAATAAGGTCACAACCACGGCTATTTCTCGGCTCAAACATGGATCTGCCAAT
ALMT6-Pe      AACTCAGCAATAAGGTCACAACCACGGCTATTTCTCGGCTCAAACATGGATCTGCCAAT
ALMT6-Rd      AACTCAGCAATAAGGTCACAACCACGGCTATTTCTCGGCTCAAACATGGATCTGCCAAT
                *****
```

```
ALMT6-Ai      AGTCGTATGCTAATGGAAGTGAATTCAGCAAGCATGCCGCTCAAGAAGTCTGCTGCCC
ALMT6-Pe      AGTCGTATGCTAATGGAAGTGAATTCAGCAAGCATGCCGCTCAAGAAGTCTGCTGCCC
ALMT6-Rd      AGTCGTATGCTAATGGAAGTGAATTCAGCAAGCATGCCGCTCAAGAAGTCTGCTGCCC
                *****
```

```
ALMT6-Ai      TCATTCAAGACTGATACAGCATCGATATTAGAAAGGAGGAACACAAAAGTAGATCAACCA
ALMT6-Pe      TCATTCAAGACTGATACAGCATCGATATTAGAAAGGAGGAACACAAAAGTAGATCAACCA
ALMT6-Rd      TCATTCAAGACTGATACAGCATCGATATTAGAAAGGAGGAACACAAAAGTAGATCAACCA
                *****
```

ALMT6-Ai TCAGAACGCAGTGAGAGGAGCACATTAGGGCGGACGCTAAGTAAGATAGCTATCACGAGC
 ALMT6-Pe TCAGAACGCAGTGAGAGGAGCACATTAGGGCGGACGCTAAGTAAGATAGCTATCACGAGC
 ALMT6-Rd TCAGAACGCAGTGAGAGGAGCACATTAGGGCGGACGCTAAGTAAGATAGCTGTCACGAGC

ALMT6-Ai CTTGAGTTCTCTGAAGCAC
 ALMT6-Pe CTTGAGTTCTCTGAAGCAC
 ALMT6-Rd CTTGAGTTCTCTGAAGCAC

Anexo 21:

Alineamiento de fragmentos proteicos de ScALMT6 en los cv. Petkus y Ailés, y la línea consanguínea Riodeva. Consistían en 151 aminoácidos en los tres casos.

ALMT6-Rd LLCSQSYIYRLKPTSVRSLFRTPCTRVAREVTKVLQELADSVRNHHRCAPDVLCDHLHE
 ALMT6-Pe LLCSQSYIYRLKPTSVRSLFRTPCTRVAREVTKVLQELADSVRNHHRCAPDVLCDHLHE
 ALMT6-Ai LLCSQSYIYRLKPTSVRSLFRTPCMRVAREVTKVLQELADSVRNHHRCAPDVLCDHLHE

ALMT6-Rd ALQDLNSAIRSQPRLFLGSKHGSANSRMLMELNSSKHAASRTALPSFKTDTASILERRNT
 ALMT6-Pe ALQDLNSAIRSQPRLFLGSKHGSANSRMLMELNSSKHAASRTALPSFKTDTASILERRNT
 ALMT6-Ai ALQDLNSAIRSQPRLFLGSKHGSANSRMLMELNSSKHAASRTALPSFKTDTASILERRNT

ALMT6-Rd KVDQPSESRERSTLGRTLSKIAVTSLEFSEA
 ALMT6-Pe KVDQPSESRERSTLGRTLSKIAITSLEFSEA
 ALMT6-Ai KVDQPSESRERSTLGRTLSKIAITSLEFSEA

Anexo 22:

Fragmento 545 bases de la secuencia de nucleótidos correspondiente al gen *ScMATE2* en el cultivar Imperial.

TACTTGGTGGGGTACTTGGTCTTGTGAACTCTGCTGCTGTTTTCTGTGCAAAACCTCTCTTAGACTTCATGGGTGTG
 AAAGCGGACACTGGAATGTTGAAGCCTGCATTACAGTACTTAGTACTCAGATCTTTAGGTGCTCCTGCTGTTCTTTTATC
 TCTGGCAATGCAAGGGGTATCCGTGGACTTAAAGATACAAGGACGCCCTCTATATGCAACTGTGGCTGGAGATGCAATCA
 ATATAGTTTGGATCCAATATTTATGTTTGTGTTTCAGTATGGTGTGCGGTGGTGCAGCAGTTGCTCATGTTATATCACAG
 TATTTTATTGCTGCCATACTCCTATGTAGACTAAGCCTGCAAGTTGAACTACTGCCACCCAACCTGAAACACCTTCCGAT
 TGGTTCGGTTCCTCAAAAACGGTTCCTGTTACTTGCAGAGTTATTGCCGCAACATGCTGTGTAACACTATCTGCATCAA
 TGGCTGCACGGCTAGGTTCAACTCAAATGGCTGCATTCCAGATTTGCTTGCAGATCTGGTTGGCA

Anexo 23:

Fragmento proteico correspondiente a *ScMATE2* en el cultivar Imperial. Consistía en 181 aminoácidos.

LGGVLGLVETLLLVFCAKPLLDPMGVKADTGMKLPALQYLVLRLSLGAPAVLLSLAMQGVFRGLKDRTRTPLYATVAGDAIN
 IVLDPIFMFVFQYGVGGAVAHVISQYFIAAILLCLSLQVELLPPNLKHLPIGRFLKNGSLLLARVIAATCCVTLASAM
 AARLGSTQMAAFQICLQIWL

Anexo 24:

Alineamiento de las secuencias parciales del gen *ScSTAR1* en el cv. Ailés (Ai), y en la línea consanguínea Riodeva (Rd). En ambos casos las secuencias constan de 291 nucleótidos.

ScSTAR1-Ai GTGGCCCTGGCCCGCACCTCGCCAACGACCCGGAGGTGCTGCTGCTGGACGAGCCGACG
 ScSTAR1-Rd GTGGCCCTGGCCCGCACCTCGCCAACGACCCGGAGGTGCTGCTGCTGGACGAGCCGACG

ScSTAR1-Ai AGCGCGCTGGACCCGATCTCCACGCAGAACATCGAGGAGCCATCGTGGCGCTCAAGAAG
 ScSTAR1-Rd AGCGCGCTGGACCCGATCTCCACGCAGAACATCGAGGAGCCATCGTGGCGCTCAAGAAG

Anexos

```
ScSTAR1-Ai      GCGCGGGGGCTCACGACGGTGATCGTCTCGCACAGCGTGCGGCAGATCCAGCGGATCGCC
ScSTAR1-Rd      GCGCGGGGGCTCACGACGGTGATCGTCTCGCACAGCGTGAAGCAGATCCAGCGGATCGCC
*****
ScSTAR1-Ai      GACCTGGTGTGCCTCGTTCGTCGACGGCCTGGTTCGTTGGAGGTGCTCGCGCCGTCCGACCTG
ScSTAR1-Rd      GACCTGGTGTGCCTCGTTCGTCGACGGCCTGGTTCGTTGGAGGTGCTCGCGCCGTCCGACCTG
*****
ScSTAR1-Ai      TCTCAGGCCAAGCATCCCATGGCCCGCCGCTTCCTGGAGCTCAGCAGCTGA
ScSTAR1-Rd      TCCGAGGCCAAGCACCCCATGGCCAGGCGCTTCCTGGAGCTCAGCAGCTGA
** ***** *
```

Anexo 25:

Alineamiento de fragmentos proteicos de ScSTAR1 en el cv. Ailés (Ai) y en la línea consanguínea Riodeva (Rd), consistentes ambos en 96 aminoácidos.

```
ScSTAR1-Rd      VALARTLANDPEVLLLEDEPTSALDPISQNIIEEIVRLKKARGLTTVIVSHSVKQIQRIA
ScSTAR1-Ai      VALARTLANDPEVLLLEDEPTSALDPISQNIIEEIVRLKKARGLTTVIVSHSVRQIQRIA
*****
ScSTAR1-Rd      DLVCLVVGGEVVEVLAPSDLSEAKHPMARRFLELSS
ScSTAR1-Ai      DLVCLVVDGLVVEVLAPSDLSQAKHPMARRFLELSS
***** *
```

Anexo 26:

Fragmento 841 bases de la secuencia de nucleótidos correspondiente al gen ScSTAR2 en el cultivar Petkus.

```
ATCGGCTTCGTGCTCCACTTCATCTTACCCAGAGCAGCCCGCTCTGGATCCTGCTCGCCTACCTCTTCATGGTCACCGT
CGCCGGCTACACGGCGGGCCGCGCGCCAGGCAGGTCCCAGCGGGCGGGTACATCGCCGGCGTGTCCATCCTCGCCGGCA
CGGCCATACCATGTTCCCTGCTCGTGGTGCACGCGTGTTCGCCCTTACGCCCCGCTACATCATCCCCGTCGCGGCATG
ATGGTCGGCAACGCCATGACCGTCACCGCGCTCACCATGAAGAAGCTCCACGAGGACGTCAAGACGCAGCGGAGCCTCGT
AAGTCTTCCATTCAAAAAATCAAATAGTATGCCGATTAATAACTTTGCGTAGTGACTCGCCGTCATCTTGCAATTG
TTAATAACTTTGTTAGAAAAAAGGTCAAGTATAATATCTTTACGCCATTCTGCATTCACCGAAGGTGTGTATTATT
GTTTCTTTCAGTTTAAAGTACATGATCAGTTTCTTTTTCAGTTTAAAGTACATGATCATGATCTCCACGACTACCCAACCTT
TCTCGACATTTAAACGAATTCAGAAGAACTACTAGTAGTACAAAATTTGAACTATTTTCGTCAAAAATTCAGAAAA
GTTGACTCTAGTAACATTTTCATCTTTCTGATCATCTCATTGCAGGTGGAGACGGCGCTGGCGCTGGGGGCGACCCGCGG
CAGGCGACGGTGCAGCAGGTGCGGGCGTCTGCTGGTGCAGCGCTGTCGCCGGTGCATCGACAACGCCAAGACGGTGGGGCT
GATCGCGCTGCCGGGGCCATGACGGGGCTCATCATGGGCG
```

Anexo 27:

Fragmento proteico correspondiente a ScSTAR2 en el cultivar Petkus. Consistía en 115 aminoácidos.

```
IGFVLHFIFITQSSPLWILLAYLFMVTVAGYTAGRRARQVPRGGYIAGVSIILAGTAITMFLVLVSVFPFTPRYIIPVAGM
MVGNAMTVTGVTMKKLHEDVKTQRLVSLPFFKKIK
```

Anexo 28:

Alineamiento de las secuencias parciales del gen ScNRAMP para el cv. Ailés, y la línea consanguínea Riodeva. Consistían en 760 y 762 nucleótidos, respectivamente.

```
ScNRAMP-Rd      ATCATAGCAGCGTTCATGTTACCATGGCCAGGCTGCTTCTTCGGAGAAGTACGCTACCT
ScNRAMP-Ai      ATCATAGCAGCGTTCATGTTACCA-TGGCAGGCTGCTTCTTCGGAGAAGTACGCTACCT
*****
ScNRAMP-Rd      GAGTCCATCTGCCAGAGAGGTGACCAAGGGCATGTTTATCCCCCTCTCTGCGAGGGAAAGG
ScNRAMP-Ai      GAGTCCATCTGCCAGAGAGGTGACCAAGGGCATGTTTATCCCCCTCTCTGCGAGGGAAAGG
*****
```

```

ScNRAMP-Rd      TGCTGCTGCCAACGCGATTGCACTCTTTGGCGCTATCATCACACCGTAAGGAAC TTATTT
ScNRAMP-Ai      TGCTGCTGCCAACGCGATTGCACTCTTTGGCGCTATCATCACACCGTAAGGAAC TTATTT
*****

ScNRAMP-Rd      AGTCACCAGGGTTTGTTCACCTCTGGTTATTGTGCGTCGATCCATATGGATGCAAAGTTCA
ScNRAMP-Ai      AGTCACCAGGGTTTGTTCACCTCTGGTTATTGTGCGTCGATCCATATGGATGCAAAGTTCA
*****

ScNRAMP-Rd      CAGTGAGCCTTTCTGTGACATGCATGCAGGTACAACCTGTTCTTGCACTCTGCCCTTGTC
ScNRAMP-Ai      CAGTGAGCCTTTCTGTGACATGCATGCAGGTACAACCTGTTCTTGCACTCTGCCCTTGTC
*****

ScNRAMP-Rd      CTCTCAAGGAAGACTCCACGATCAGACAAAAGCATCAGAGTAGGTTGCACCGATATGATA
ScNRAMP-Ai      CTCTCAAGGAAGACTCCACGATCAGACAAAAGCATCAGAGTAGGTTGCACCGATATGATA
*****

ScNRAMP-Rd      GGAAAAACGCTCTAAGGACTAGATGCAGTTTCGTTGCTGAGTGGCCAAATGGCTCAC TTG
ScNRAMP-Ai      GGAAAAACGCTCTAAGGACTAGATGCAGTTTCGTTGCTGAGTGGCCAAATGGCTCAC TTG
*****

ScNRAMP-Rd      TTATCATGTTTTGGACAGGTGGCCTGCAGATACTTCTCATAGAGTGCAGCCTCGCTTTC
ScNRAMP-Ai      TTATCATGTTTTGGACAGGTGGCCTGCAGATACTTCTCATAGAGTGCAGCCTCGCTTTC
*****

ScNRAMP-Rd      ATCGTGGCGTTCCTCATCAACGTCGCGGTGGTTGTCGCTGCTGGATCCATTTGCAGTGCT
ScNRAMP-Ai      ATCGTGGCGTTCCTCATCAACGTCGCGGTGGTTGTCGCTGCTGGATCCATTTGCAGTGCT
*****

ScNRAMP-Rd      AATAATCTCTCTCCGCCGATGCTGGCGGTGTGGCGATCTTACTCTTCAATCTGCACCT
ScNRAMP-Ai      AATAATCTCTCTCCGCCGATGCTGGCGGTGTGGCGACCTTACTCTTCAATCTGCACCT
*****

ScNRAMP-Rd      CTGCTGCTCAGGGTATGCTGCTCTTACGCTATTGAAAGGGTCATTCAGCTTCAGAAGCA
ScNRAMP-Ai      CTGCTGCTCAGGGTATGCTGCTCTTACGCTATTGAGAGGGTCATTCAGCTTCAGAAGCA
*****

ScNRAMP-Rd      TCTTG TAGCAGATTATGTTGTGTAATACGAAGGAGTTAAATTGAAGCGTTC TTTAATTAT
ScNRAMP-Ai      TCTTG TAGCAGATTATGTTGTGTAATACGAAGGAGTTAAATTGAAGCGTTC TTTGATTAT
*****

ScNRAMP-Rd      ATTTTTTGTTCATTCAGAATGTCTGGGGAGATCAAGCTC
ScNRAMP-Ai      ATTTTT-TGTTCCATTCAGAATGTCTGGGGAGATCAAGCTC
*****

```

Anexo 29:

Alineamiento de fragmentos proteicos de ScNRAMP en el cv. Ailés (Ai) y en la línea consanguínea Riodeva (Rd), consistentes ambos en 140 aminoácidos.

```

ScNRAMP-Rd      LFLHSALVLSRKT PRSDKSIRVGCTDMIGKNALRTRCSSL SGMHLLSCFGQVACRYF
ScNRAMP-Ai      LFLHSALVLSRKT PRSDKSIRVGCTDMIGKNALRTRCSSL SGMHLLSCFGQVACRYF
*****

ScNRAMP-Rd      LIECSLAFIVAF LINVAVVVAAGSICSANNLSPADAGACGDLTLQSAPLLLRVCCSSAIE
ScNRAMP-Ai      LIECSLAFIVAF LINVAVVVVAGSICSANNLSPADAGACGDLTLQSAPLLLRVCCSSAIE
*****

ScNRAMP-Rd      RVIPASEASC SRLCCVIRRS
ScNRAMP-Ai      RVIPASEASC SRLCCVIRRS
*****

```

