

Consejo Superior de Investigaciones Científicas



Departamento de Genética y Producción Vegetal

Estación Experimental de Aula Dei

Zaragoza



Tesis Doctoral

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN
LA EMBRIOGENESIS DE LA MICROSPORA EN CEBADA Y TRIGO**

Memoria presentada por Dña. Rosa Angélica Sánchez Díaz,
Ingeniera Agrónoma, para optar al grado de Doctor en Ciencias

Zaragoza, Marzo 2014



MINISTERIO
DE ECONOMÍA Y
COMPETIVIDAD



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

ESTACIÓN EXPERIMENTAL
DE AULA DEI

Dña. MARIA PILAR VALLÉS BRAU, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y Dña. ANA MARIA CASTILLO ALONSO Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), adscritos a la Estación Experimental de Aula Dei de Zaragoza

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada **“Estudio de los mecanismos moleculares implicados en la embriogénesis de la microspora en cebada y trigo”** ha sido realizada por la Ingeniera ROSA ANGÉLICA SÁNCHEZ DÍAZ en el Departamento de Genética y Producción Vegetal de la Estación Experimental de Aula Dei (CSIC) de Zaragoza bajo su dirección y que reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor en Ciencias.

Zaragoza, Marzo de 2014

Fdo.: María Pilar Vallés Brau

Fdo.: Ana María Castillo Alonso

Este trabajo ha sido realizado con cargo a los Proyectos del Plan Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias AGL2007-62930/AGR y AGL2010-17509, y con la ayuda de una beca Predoctoral de la Junta de Ampliación de Estudios del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Agradezco:

A mi familia por todo su amor, apoyo incondicional, por estar conmigo siempre a pesar de la distancia y el tiempo, y por todo el ejemplo inculcado que me ha permitido llegar hasta aquí y superar muchos obstáculos.

Al Ministerio de Economía y Competitividad de España; y al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), por la beca predoctoral y por la estancia realizada.

A mis directoras de tesis Dra. María Pilar Vallés Brau y Dra. Ana María Castillo Alonso, por confiar en mí para realizar este trabajo.

Al Dr. Manuel Matamoros, por su ayuda y enseñanza con la técnica de qRT-PCR y por sus palabras de animo.

A la Dra. Adela Olmedilla de la Estación Experimental del Zaidin-Granada, por permitirme trabajar en su laboratorio y por proporcionarme todas las facilidades para los estudios citológicos que se presentan en esta tesis.

A los chicos y chicas de Aula Dei: a Martha Sainz y Erica Fadon, por todo su cariño, por estar dispuestas a tomarse un café conmigo, por escucharme y entenderme; a María Peñuelas, Laura Calvo, Hamdi, Jorge Lora, Pablo Díaz, Elain Gutiérrez, etc etc., por sus palabras de animo, por la agradable compañía a la hora de la comida, por las cervezas de los jueves y por tener una sonrisa dispuesta a ayudarme, los extrañaré mucho.

A Carmen Pérez por su gran ayuda en la maquetación de esta tesis.

A Sra. Chus, Isabel Lacasa, Sandra Allué, Dr. Luis Cistué, Patricia, Begoña, etc. por sus palabras de ánimo.

A Elena Paracuellos, Hoozita, Samuel Pironon, Juan Martínez, Grace Benitez, Néstor Romero, etc. por todos y cada uno de los momentos bonitos que pasamos juntos, por escucharme cuando mas lo necesitaba, por su cariño y amistad incondicionales. Espero verles pronto.

A Lidia Casanova, mi amiga de alegrías y tristezas, gracias por tus lindas palabras y cariño, te extrañaré mucho.

No dejare de agradecer a todas las personas de la Estación Experimental de Aula Dei que han hecho que mi estancia en el centro sea agradable.

Nunca olvidare a todos mis amigos y amigas de la distancia, a los que conocí años atrás, no importa las millas que nos separan, al final sabemos que la amistad y el cariño no conocen barreras ni tiempo ni dificultades, gracias por ser mis amigos y gracias por su gran cariño.

Quizá me olvide de nombrar a muchos e intentar escribir una lista de todas las personas que me han impulsado, impactado, enseñado y apoyado en cada paso del camino para finalmente estar aquí, sería interminable, aun así; a quienes les he fallado y lo han perdonado, a quienes nunca me han negado una segunda oportunidad, a los recién encontrados y a quienes siguen aquí, a los que nunca dejan de estar a mi lado, a todos ustedes gracias por hacer cada día, cada segundo de mi vida un nuevo aprendizaje, una enseñanza y una satisfacción o una añoranza. Gracias por ser parte de quien soy, del final de esta etapa y del comienzo de una nueva porque sin ustedes no sería posible.

A todos muchas gracias.

A mis queridos padres y hermana

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1. Aspectos generales de la cebada (<i>Hordeum vulgare</i> L.) y del trigo panadero (<i>Triticum aestivum</i> L.)	1
1.2. Plantas haploides y plantas doblehaploides (DHs)	4
1.3. Aplicaciones de las plantas doblehaploides (DHs)	4
1.4. Métodos de producción de plantas DHs	6
1.5. Producción de plantas DHs mediante embriogénesis de la microspora	7
1.6. Factores que afectan la embriogénesis de la microspora	10
1.6.1. Factores genéticos	10
1.6.2. Factores fisiológicos	11
1.7. Características de las plantas regeneradas	13
1.7.1. Albinismo	13
1.7.2. Nivel de ploidía	14
1.7.3. Estabilidad genética y potencial agronómico	14
1.8. Cambios celulares en la embriogénesis de la microspora	15
1.8.1. Cambios morfológicos	15
1.8.2. Cambios en la expresión génica	17
1.8.2.1. Genes asociados a la fase de tratamiento de estrés de la microspora	17
1.8.2.2. Genes asociados al desarrollo embriogénico de la microspora	19
1.8.2.3. Genes asociados a procesos de síntesis, degradación y señalización de Acido Abscísico (ABA).....	20
1.8.2.4. Genes asociados al efecto inductor de los ovarios	24
2. OBJETIVOS.....	27
3. MATERIALES Y METODOS.....	29
3.1. Material vegetal	29
3.1.1. Genotipos utilizados	29
3.1.2. Condiciones de crecimiento de las plantas madre	30
3.2. Metodología general del cultivo de anteras	30

3.2.1. Esterilización	30
3.2.2. Medios de cultivo	31
3.2.2.1. Medio de tratamiento de estrés	31
3.2.2.2. Medio de inducción de embriogénesis.....	32
3.2.2.3. Medio pre-acondicionado con ovarios	34
3.2.2.4. Medio de cultivo de regeneración de plantas.....	35
3.2.3. Cosecha de la espiga: estado de desarrollo de la microspora y mantenimiento de las espigas.....	37
3.2.4. Tratamiento de estrés	38
3.2.5. Cultivo de anteras	38
3.2.6. Cultivo de microsporas	38
3.2.7. Regeneración de embriones	40
3.3. Caracterización morfológica.....	40
3.3.1. Caracterización citológica del cultivo de anteras	40
3.3.2. Caracterización morfológica <i>in vivo</i> del cultivo de microsporas aisladas ...	41
3.4. Estudios de expresión génica	41
3.4.1. Recogida de muestras	41
3.4.2. Aislamiento de RNA	43
3.4.2.1. Homogenización de las muestras.....	43
3.4.2.2. Extracción de RNA mediante Trizol.....	43
3.4.3. Síntesis de cDNA	45
3.4.4. Amplificación de genes mediante PCR-Semicuantitativa.....	47
3.4.4.1. Diseño de Cebadores.....	48
3.4.4.2. PCR-Semicuantitativa	50
3.4.5. Amplificación de genes mediante qRT-PCR (Quantitative Real Time PCR)	51
3.4.5.1. Diseño de cebadores para qRT-PCR	52
3.4.5.2. qRT-PCR (Quantitative Real Time PCR).....	53
3.4.5.2.1. Condiciones de la qRT-PCR.....	55
3.5. Herramientas bioinformáticas.....	58
3.5.1. Programas asociados a bases de datos.....	58
3.5.2. Programas de análisis de datos genómicos	62

4. RESULTADOS.....	65
4.1. Caracterización de la respuesta al cultivo de anteras en cebada.....	65
4.1.1. Caracterización morfológica de las fases tempranas de la embriogénesis de la microspora en cebada.....	67
4.1.1.1. Estudios citológicos del cultivo de anteras.....	67
4.1.1.2. Estudio <i>in vivo</i> del cultivo de microsporas aisladas.....	69
4.2. Identificación de genes que se inducen en la embriogénesis de la microspora en cebada	71
4.2.1. Caracterización y clasificación funcional de los genes identificados en un estudio de transcriptómica.....	71
4.2.2. Selección de genes que se inducen <i>de novo</i> al iniciarse el desarrollo embriogénico de la microspora en cebada.....	74
4.2.2.1. Caracterización de los genes del Clúster 4.....	79
4.2.2.2. Caracterización de los genes del Clúster 7.....	83
4.2.3. Validación de la expresión de los genes seleccionados mediante PCR-Semicuantitativa.....	87
4.3. Comparación de la expresión génica entre embriogénesis de la microspora y embriogénesis zigótica en cebada.....	92
4.4. Comparación de la expresión génica en tres líneas de cebada de distinta respuesta a la embriogénesis de la microspora	100
4.5. Estudio de la expresión de genes implicados en la síntesis, degradación y regulación de Acido Abscísico (ABA) durante la embriogénesis de la microspora en cebada.....	105
4.6. Caracterización de la respuesta al cultivo de anteras en trigo panadero	108
4.6.1. Caracterización morfológica de las fases tempranas de la embriogénesis de la microspora en trigo panadero.....	109
4.6.1.1. Estudios citológicos del cultivo de anteras.....	109
4.6.1.2. Estudio <i>in vivo</i> del cultivo de microsporas aisladas.....	112
4.7. Selección de genes que se inducen en la embriogénesis de la microspora en trigo panadero	115
4.8. Estudio de la expresión de los genes seleccionados en trigo panadero mediante PCR-Semicuantitativa	119

4.9. Comparación de la expresión génica en la embriogénesis de la microspora y embriogénesis zigótica en trigo panadero.....	122
4.10. Comparación de la expresión génica en dos cultivares de distinta respuesta a la embriogénesis de la microspora en trigo panadero.....	125
4.11. Identificación de genes asociados al efecto inductor de los ovarios, en cultivo de anteras en trigo panadero.....	129
4.11.1. Caracterización de la expresión génica mediante PCR-Semicuantitativa de los genes seleccionados.....	129
4.11.2. Validación de la expresión de los genes seleccionados mediante qRT-PCR.....	134
5. DISCUSION.....	137
6. CONCLUSIONES.....	177
7. BIBLIOGRAFIA.....	181
8. ANEXOS.....	213

Indice de figuras

Figura 1: Producción de plantas DHs en cebada mediante el cultivo de anteras y de microsporas aisladas según el protocolo de Cistué y col. (2003) y Castillo y col. (2000) 9

Figura 2: Esquema de los pasos de biosíntesis y degradación de ABA (Seiler y col. 2011)..... 23

Figura 3: Preparación de medio pre-acondicionado con ovarios. a) Espiga embolsada. b) Cosecha de las espigas. c) Microspora en estado binucleado tardío (tinción con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol diclorohidrato). d) Espiga esterilizada. e y f) Medio preacondicionado (0 y 5 días, respectivamente)..... 34

Figura 4: Curva de amplificación de la qRT-PCR. Threshold (umbral), Baseline (línea de fluorescencia basal), No Template (control sin cDNA), Sample (muestra), ΔRn (diferencia de fluorescencia), CT (ciclo umbral). Fuente: Applied Biosystems 52

Figura 5: Programa de amplificación de la qRT-PCR 58

Figura 6: Respuesta al cultivo de anteras de las líneas DH6148, DH6183 y DH6004 de cebada. a, d y g) Estructuras y embriones a los 17 días de cultivo. b, e y h) Estructuras y embriones a los 28 días de cultivo. c, f e i) Plántulas verdes y albinas a los 55 días de cultivo 66

Figura 7: Caracterización citológica de las anteras en las fases iniciales de cultivo de anteras de las líneas DH6148 y DH6183 de cebada. Cortes semifinos de 1 μm teñidos con azul de toluidina. a y e) Microsporas en el interior de las anteras a los 4 días de inducción por estrés (4di). b y f) Microsporas en el interior de las anteras a los 4 días de cultivo (4dc). c y g) Estructuras en el interior de las anteras a los 8 días de cultivo (8dc). d y h) Estructuras embriogénicas (flecha) y proliferaciones de tipo callo (asterisco) en el interior de las anteras a los 12 días de cultivo (12dc). Las barras corresponden a 50 μm 68

Figura 8: Caracterización morfológica del cultivo de microsporas aisladas de las líneas DH6148 y DH6183 de cebada. a, i) Microsporas a los 4 días de inducción por estrés con aspecto estrellado “star like” en DH6148 (flecha) y microsporas vacuoladas en DH6183 (asterisco). b y j) Microsporas a 1 día de cultivo. c y k) Microsporas a los 2 días de cultivo con aspecto estrellado (flecha) y microsporas muertas (asterisco). d y l) Microsporas a los 4 días de cultivo presentado divisiones (flecha). e y m) Microsporas con divisiones (flecha) a los 6 días de cultivo. f y n) Microsporas y estructuras a los 8 días de cultivo, en algunas se observa la rotura de la exina (flecha). g y o) Estructuras embriogénicas en estado globular en DH6148 (flecha) y estructuras tipo callo en DH6183 (asterisco) a los 12 días de cultivo. h y p) Embriones (flecha) y proliferaciones de tipo callo (asterisco) a los 16 días de cultivo. Barras corresponden a 50 μm 71

Figura 9: Distribución en categorías funcionales mediante el programa FunCatDB del MIPS (“Munich Information Center for Protein Sequences”) de los genes que tienen homología con *Arabidopsis* y cambiaron su expresión en las primeras fases de la embriogénesis de la microspora 74

Figura 10: Perfil de expresión de los 1.797 genes que aumentaban su expresión al inicio del desarrollo embriogénico de la microspora (4dc vs. 4di). Los valores corresponden a los datos de “fold change” normalizados (\log_2). Los límites de la escala de color, correspondientes a valores de expresión, van del rojo (+ 10) al negro (-10)75

Figura 11: Análisis de clústeres mediante el algoritmo “k-means” del programa MeV (MULTIEXPERIMENT VIEWER v. 4.5) de los perfiles de expresión de los 1.797 genes que aumentaban su expresión a los 4dc vs. 4di. Los datos de expresión corresponden al “fold change” normalizados (\log_2) de los puntos 0 y 4 días de inducción por estrés (0di y 4di) y a los 4 y 8 días de cultivo de anteras (4dc y 8dc). Los límites de la escala de color van del rojo (+ 10) al negro (-10) 76

Figura 12: Distribución en categorías funcionales de los 13 clústeres identificados de los genes que aumentan su expresión a los 4dc vs. 4di (1.797 genes). El porcentaje

en todos los clústeres representa al número de genes en esa categoría respecto al número total de genes de ese clúster..... 78

Figura 13: Representación de los valores de expresión de los 69 genes del clúster 4 mediante análisis de clústeres jerárquicos realizados con el programa HCL-MeV. Los valores corresponden a los datos de “fold change” normalizados (\log_2) de los puntos 0di, 4di, 4dc y 8dc. Los límites de la escala de color van del rojo (+6) al negro (-6) ... 80

Figura 14: Representación de los valores de expresión de los 44 genes del clúster 7 mediante análisis de clústeres jerárquicos realizados con el programa HCL-MeV. Los valores corresponden a los datos de “fold change” normalizados (\log_2) de los puntos 0di, 4di, 4dc y 8dc. Los límites de la escala de color van del rojo (+6) al negro (-6) ... 85

Figura 15: Distribución en categorías funcionales de los genes de los clústeres 4 y 7 y del total de genes que aumentaban su expresión en 4dc vs. 4di (“fold change” > 5.0), mediante el programa FunCatDB del MIPS..... 87

Figura 16: Perfil de expresión de los 16 genes seleccionados de los clústeres 4 y 7. Los valores corresponden a los datos de “fold change” normalizados con \log_2 , en los puntos 0di, 4di, 4dc y 8dc..... 89

Figura 17: Análisis de expresión de los 16 genes seleccionados de los clústeres 4 y 7, y de los genes *ECA1* y *HvPG1* mediante PCR-Semicuantitativa y gel de agarosa, en los puntos 0, 2 y 4 días de inducción por estrés (0di, 2di y 4di) y 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 16 días de cultivo (1dc, 2dc, 4dc, 6dc, 8dc, 12dc y 16dc) de la línea DH6148 de cebada. *ACTINA* es el gen constitutivo utilizado como control..... 91

Figura 18: Análisis de clústeres mediante el algoritmo “k-means” (MeV) de los valores de expresión de los 113 genes de los clústeres 4 y 7, en el experimento BB3 (PLEXdb) (Druka y col. 2006), en los tejidos: raíz (r), hoja (h), anteras (a), carióspside de 5, 10 y 16 DAP (días después de la polinización) (c5, c10 y c16), embrión de 22 DAP (e22) y endospermo de 22 DAP (en22), del genotipo Morex..... 94

Figura 19: Perfil de expresión de los 16 genes seleccionados de los clústeres 4 y 7 con los valores del experimento BB3 (PLEXdb) (Druka y col. 2006), en los tejidos raíz, hoja, anteras, carióspside de 5, 10 y 16 DAP y embrión y endospermo de 22 DAP..... 98

Figura 20: Análisis de expresión por PCR-Semicuantitativa de los 16 genes seleccionados, y de los genes *ECA1* y *HvPG1*, en ovario maduro (ov), carióspside de 1, 2, 4, 6 y 8 DAP (c0d, c1d, c2d, c4d, c6d y c8d), embrión a los 8 y 10 DAP (e10 y e12d), raíz (r) y hoja (h), en la línea DH6148. *ACTINA* es el gen constitutivo utilizado como control 99

Figura 21: Análisis de expresión de los 16 genes seleccionados de los clústeres 4 y 7, y del gene *ECA1* mediante PCR-Semicuantitativa y gel de agarosa, en los puntos 0 y 4 días de inducción por estrés (0di y 4di) y 4 y 8 días de cultivo (4dc y 8dc) de la líneas DH 6148 y DH6183 de cebada. *EF-1 α* es el gen constitutivo utilizado como control..... 102

Figura 22: Análisis de expresión de los 8 genes de los clústeres 4 y 7 con mayores diferencias de expresión entre las líneas DH6148 y DH6183, mediante PCR-Semicuantitativa y gel de agarosa, en los puntos 0 y 4 días de inducción por estrés (0di y 4di), 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 16 días de cultivo (1dc, 2dc, 4dc, 6dc, 8dc, 12dc y 16dc) en la líneas DH6148, DH6183 y DH6004 de cebada. *ACTINA* es el gen constitutivo utilizado como control 104

Figura 23: Perfiles de expresión de los genes de síntesis (*ZEP2* y *AO5a*) y degradación (*ABA8'OH* y *BG3*), cuantificados mediante qRT-PCR a los 0, 2 y 4 días de inducción por estrés (0di, 2di y 4di) y a los 1, 2, 4, 8 y 12 días de cultivo (1dc, 2dc, 4dc, 8dc y 12dc) de la línea DH6148 de cebada. *β -TUBULIN* es el gen utilizado como control..... 106

Figura 24: Perfiles de expresión de los genes *ABI1b*, *ABI5*, *FCA*, *VP1* y *FUS3*, cuantificados mediante qRT-PCR a los 0, 2 y 4 días de inducción por estrés (0di, 2di y 4di) 1, 2, 4, 8 y 12 días de cultivo (1dc, 2dc, 4dc, 8dc y 12dc) de la línea DH6148 de cebada. *β -TUBULIN* es el gen utilizado como control 107

Figura 25: Respuesta al cultivo de anteras de los cultivares de trigo Pavon y Caramba. a y e) Anteras a los 5 días de inducción por estrés. b y f) Estructuras y embriones a los 30 días de cultivo. c y g) Estructuras y embriones a los 40 días de cultivo. d y h) Plántulas obtenidas en medio de regeneración a los 65 días de cultivo 109

Figura 26: Caracterización citológica de las anteras en las fases iniciales del cultivo de los cultivares de trigo Pavon y Caramba. Cortes semifinos de 1 μm teñidos con azul de toluidina. a y e) Anteras a los 5 días de inducción por estrés (5di). b y f) Microsporas en el interior de las anteras a los 5 días de cultivo (5dc). c y g) Microsporas en el interior de las anteras a los 10 días de cultivo (10dc). d y h) Estructuras embriogénicas (flecha) y proliferaciones de tipo callo (asterisco) en el interior de las anteras a los 15 días de cultivo (15dc). Las barras corresponden a 50 μm 111

Figura 27: Caracterización morfológica del cultivo de microsporas aisladas de los cultivares de trigo Pavon y Caramba. a, i) Microsporas a los 5 días de inducción por estrés con aspecto estrellado “star like” en Pavon (flecha). b y j) Microsporas con aspecto estrellado (flecha) después de 1 día de cultivo. c y k) Microsporas a los 3 días de cultivo, con aspecto estrellado (flecha). d y l) Microsporas a los 5 días de cultivo, presentando divisiones en Pavon (flecha) y microsporas no inducidas en Caramba (asterisco). e y m) Microsporas con divisiones (flecha) a los 7 días de cultivo. f y n) Microsporas y estructuras a los 10 días de cultivo con alguna rotura de la exina (flecha). g y o) Estructuras embriogénicas en estado globular en Pavon (flecha) y estructuras tipo callo en Caramba (asterisco) a los 15 días de cultivo . h y p) Embriones (flecha) y proliferaciones de tipo callo (asterisco) a los 20 días de cultivo. Las barras corresponden a 50 μm 114

Figura 28: Perfil de expresión de los 14 genes seleccionados, de entre los asociados a la embriogénesis de la microspora en cebada, para los estudios en trigo. Los valores corresponden a los datos de “fold change” normalizados con \log_2 en los puntos Odi, 4di, 4dc y 8dc 116

Figura 29: Análisis de expresión de los 14 genes seleccionados por su asociación con la embriogénesis de la microspora en cebada, y de los genes *FLA14*, *FLA25*, *SERK2* y *SERK1* mediante PCR-Semicuantitativa y gel de agarosa, en los puntos 0 y 5 días de inducción por estrés (0di y 5di) y 5, 10, 15 y 20 días de cultivo (5dc, 10dc, 15dc y 20dc) del cultivar Pavon. *18SrDNA* es el gen constitutivo utilizado como control..... 121

Figura 30: Perfil de expresión de los 18 genes seleccionados con los valores del experimento TA3 (PLEXdb) (Druka y col. 2006), en raíz, hoja, anteras, carióspside de 5 DAP, embrión y endospermo de 22 DAP 122

Figura 31: Análisis de expresión mediante PCR-Semicuantitativa y gel de agarosa, de los 14 genes seleccionados, y de los genes *FLA14*, *FLA25*, *SERK2* y *SERK1* en ovarios maduros (ov), carióspside de 2, 4, 6 y 8 DAP (c2d, c4d, c6d y c8d), embrión a los 10, 12 y 14 DAP (e10, e12 y e14), endospermo a los 10, 12 y 14 DAP (en10, en12 y en14), hoja (h) y raíz (r) , del cultivar Pavon. *18SrDNA* es el gen constitutivo utilizado como control 124

Figura 32: Análisis de expresión de los 14 genes seleccionados por su asociación con la embriogénesis de la microspora en cebada, y de los genes *FLA14*, *FLA25*, *SERK2* y *SERK1* mediante PCR-Semicuantitativa y gel de agarosa, en los puntos 0 y 5 días de inducción por estrés (0di y 5di), y 5, 10, 15 y 20 días de cultivo (5dc, 10dc, 15dc y 20dc) en los cultivares de trigo Pavon y Caramba. *18SrDNA* es el gen constitutivo utilizado como control 128

Figura 33: Análisis de expresión de los 10 genes seleccionados mediante PCR-Semicuantitativa y gel de agarosa en ovarios jóvenes y maduros de los cultivares de trigo Pavon y Caramba a los 0, 5, 10, 15 y 20 días de inoculación en el medio de cultivo (0dc, 5dc, 10dc, 15dc y 20dc). *18SrDNA* es el gen constitutivo utilizado como control..... 133

Figura 34: Niveles de expresión de los 4 genes seleccionados, cuantificados mediante qRT-PCR, a los 0, 5, 10 y 15 días de inoculación en medio de cultivo (0dc, 5dc, 10dc

y15dc) en ovarios jóvenes (OVJ) y ovarios maduros (OVM) de los cultivares de Pavon (P) y Caramba (C). *Ta27771* es el gen constitutivo utilizado como control 135

Figura 35: Relación entre perfiles de expresión génica y estructuras de microsporas aisladas a lo largo del cultivo de anteras, en los 16 genes de la embriogénesis de la microspora en cebada y del gen *FUS3* relacionado con embriogénesis zigótica. El punto 0 corresponde a 4 días de tratamiento de inducción por estrés (4di). 149

Figura 36: Relación entre perfiles de expresión génica y estructuras de microsporas aisladas a lo largo del cultivo de anteras, en los 14 genes de la embriogénesis de la microspora en trigo. El punto 0 corresponde a 5 días de tratamiento de inducción por estrés (5dp). Flechas en color morado pertenecen a los genes estudiados en la embriogénesis de la microspora de cebada. Flechas turquesa corresponden a genes estudiados de forma específica en trigo 166

Indice de tablas

Tabla 1: Superficie de cultivo y producción de cereales en el mundo y en España según datos de 2011 (FAOSTAT 2013)2

Tabla 2: Composición de los medios de tratamiento de estrés de cebada (TEC), y de trigo (TET)..... 31

Tabla 3: Composición del medio de inducción de la embriogénesis en cebada (FHGI) y trigo (MMS3M) 33

Tabla 4: Composición del medio de regeneración de plantas de cebada (FHGR) y trigo (J25-8) 36

Tabla 5: Composición del gel de agarosa y de la muestra, utilizados para la electroforesis de RNA 45

Tabla 6: Composición de la mezcla de la reacción para síntesis de cDNA 47

Tabla 7: Secuencias de los pares de cebadores diseñados para PCR-Semicuantitativa en cebada y trigo, diseñadas con el programa PrimerQuestSM. Secuencias de los pares de cebadores de los genes constitutivos utilizados como control 49

Tabla 8: Composición de la mezcla de la reacción para PCR-Semicuantitativa 50

Tabla 9: Programa de amplificación para PCR-Semicuantitativa 50

Tabla 10: Secuencias de los pares de cebadores para qRT-PCR, de cebada tomados de Seiler y col. (2011), Moreno-Risueno y col. (2008) y Kumar (2010), y de los cebadores diseñados en trigo con el programa Primer Express[®] Software v. 3.0..... 53

Tabla 11: Composición de la mezcla de la reacción para “Primer Dimer” 54

Tabla 12: Secuencias de los pares de cebadores control para qRT-PCR de cebada56

Tabla 13: Secuencias de los pares de cebadores control para qRT-PCR de trigo.....	56
Tabla 14: Composición de la mezcla de la reacción para qRT-PCR.....	57
Tabla 15: Respuesta al cultivo de anteras de las líneas DH6148, DH6183 y DH6004 de cebada.....	66
Tabla 16: Número de genes con expresión diferencial entre las anteras antes de la inducción por estrés (0di), después de 4 días de inducción por estrés (4di), y después de 4 y 8 días de cultivo de anteras (4dc y 8dc)	72
Tabla 17: Valores de expresión de los genes (Probe set) del clúster 4 (datos de “fold change” normalizados con \log_2) en los puntos 0di, 4di, 4dc y 8dc, ordenados según las diferencias entre 4dc y 4di. Homologías de secuencia de los genes establecidas mediante el programa HarvEST Barley v. 1.74, y valores de similitud (“e-value”)	82
Tabla 18: Valores de expresión de los genes (Probe set) del clúster 7 (datos de “fold change” normalizados con \log_2) en los puntos 0di, 4di, 4dc y 8dc, ordenados según las diferencias entre 4dc vs 4di. Homologías de secuencia de los genes establecidas mediante el programa HarvEST Barley v. 1.74, y valores de similitud (“e-value”)	86
Tabla 19: Valores de expresión de los 16 genes seleccionados de los clústeres 4 y 7 (datos de “fold change” normalizados con \log_2) en los puntos 0di, 4di, 4dc y 8dc. Homologías de secuencia de los genes establecidas mediante el programa HarvEST Barley v. 1.74, y valores de similitud (“e-value”).....	88
Tabla 20: Valores de expresión de los 113 genes de los clústeres 4 y 7 en el experimento BB3 (“Transcription patterns during barley development”), en los tejidos: raíz (r), hoja (h), anteras (a), carióspside de 5, 10 y 16 días después de la polinización (DAP) (c5, c10 y c16), embrión de 22 DAP (e22) y endospermo de 22 DAP (en22), agrupados en clústeres de expresión mediante el algoritmo “k-means” (MeV). Homologías de secuencia de los genes establecidas mediante el programa HarvEST Barley v. 1.74.....	95

Tabla 21: Respuesta al cultivo de anteras de los cultivares de trigo Pavon y Caramba	109
Tabla 22: Valores de expresión de los 14 genes (Probe set) seleccionados, de entre los asociados a la embriogénesis de la microspora en cebada, para los estudios en trigo (datos de “fold change” normalizados con \log_2) en los puntos 0di, 4di, 4dc y 8dc, ordenados según las diferencias entre 4dc vs. 4di	116
Tabla 23: Homologías de secuencia de los 18 genes estudiados establecidas mediante los programas FASTA-EMBL-EBI (Nucleotide similarity search) (http://www.ebi.ac.uk), PLEXdb (Plant Expression Database) (http://www.plexdb.org) y HarvEST wheat v. 1.59 (http://www.harvest.ucr.edu)	118
Tabla 24: Homologías de secuencia de los 10 genes seleccionados establecidas mediante los programas FASTA-EMBL-EBI (Nucleotide similarity search) (http://www.ebi.ac.uk), PLEXdb (Plant Expression Database) (http://www.plexdb.org) y HarvEST wheat v. 1.59 (http://www.harvest.ucr.edu)	131
Tabla 25: Valores de expresión de los 1797 genes (Probe set) (datos de “fold change” normalizados con \log_2), en los puntos 0di, 4di, 4dc y 8dc. Homologías de secuencia de los genes establecidas mediante el programa HarvEST Barley v. 1.74, y valores de similitud (“e-value”).....	214
Tabla 26: Listado de los 1.797 genes (Probe set), de los 13 clústeres identificados en la embriogénesis de la microspora en cebada (Figura 11).	240
Tabla 27: Valores de ΔCT , $\Delta\Delta CT$, $2^{-\Delta\Delta CT}$ y medias de cada réplica biológica y técnica de los genes de síntesis (<i>ZEP2</i> y <i>AO5a</i>), degradación (<i>ABA8'OH</i> y <i>BG3</i>), y de los genes <i>ABI1b</i> , <i>ABI5</i> , <i>FCA</i> , <i>VP1</i> y <i>FUS3</i> de la línea DH6148 de cebada.....	245
Tabla 28: Valores de ΔCT , $\Delta\Delta CT$, $2^{-\Delta\Delta CT}$ y medias de cada réplica biológica y técnica de los genes <i>FLA26</i> , <i>TAA1b</i> , <i>FER</i> y <i>CGL1</i> , en ovarios jóvenes y maduros de los cultivares Pavon y Caramba.....	247

Indice de abreviaturas

μE: microEinstein	EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
μg: microgramo	EMBL: “European Molecular Biology Laboratory”
μl: microlitro	ESTs: “Expressed Sequence Tags”
μm: micra	e-value: “Expectation value” medida de similitud
μM: micromolar	FAO: Food and Agriculture Organization
2,4 D: ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético	FAOSTAT: FAO Statistical Database
ABA: ácido abscísico	FHGI: medio de inducción de embriogénesis de cebada
ANOVA: análisis de varianza	FHGR: medio de regeneración cebada
BA: 6-bencilaminopurina	g: gramos
BB3: “Transcription patterns during barley development”	h: horas
BLAST: “Basic Local Alignment Search Tool”	ha: hectáreas
BrEt: Bromuro de etidio	HCL: clúster jerárquico
cDNA: DNA copia	IAA: ácido indolacético
CIMMYT: Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo	J25-8: medio de regeneración de trigo
cm: centímetros	Kg: kilogramo
C_T: Ciclo umbral	l: litro
DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato	log₂: logaritmo base 2
DArT: “Diversity Arrays Technology”	m: metro
DDBJ: “DNA data base” de Japón	M: molar
DEPC: dietilpirocarbonato	MeV: “Multiexperiment Viewer”
DH: doblehaploide	mg: miligramo
DHs: doblehaploides	min: minutos
DNA: ácido desoxirribonucleico	MIPS: “Munich Information Center for Protein Sequences”
DNasa: desoxirribonucleasa	ml: mililitros
dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato	mm: milímetro
E: Eficiencia	mM: milimolar
EBI: “European Bioinformatics Institute”	

MMS3M: medio de inducción de embriogénesis de trigo
mRNA: RNA mensajero
MSU: "Rice Genome Annotation Project Database and Resource"
N:P:K: Nitrógeno:Fósforo:Potasio
N₂: nitrógeno líquido
NCBI: National Center for Biotechnology Information
nm: nanómetros
nM: nanomolar
Nº: número
Ø: diámetro
°C: grado centígrado
pb: pares de bases
PCD: muerte celular programada
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PLEXdb: "Plant Expression data base"
qRT-PCR: Quantitative Real Time-PCR
QTLs: Quantitative Trait Loci
RNA: ácido ribonucleico
RNasa: ribonucleasa
rpm: revoluciones por minuto
RT: Transcriptasa reversa
s: segundo
SB: tampón de muestra
SNPs: "Single Nucleotide Polymorphisms"
SSD: "Single Seed Descent"
t: toneladas
T^a: temperatura
TA3: "Transcription patterns during wheat development"
TAIR: *Arabidopsis* Information Resource"

TAQ: "*Thermus aquaticus* polymerase"
TBE: Tris-borato-EDTA Tampón
TEC: medio de tratamiento de estrés de cebada
TET: medio de tratamiento de estrés de trigo
Tm: temperatura de fusión
u: unidades de actividad
v.: versión
V: voltios
vs.: versus
W: watios
ΔRn: diferencia de fluorescencia

Muestras

a: anteras
C: Caramba
cx_d: cariósipide de x días
DAP: días después de la polinización
dc: días de cultivo
di: días inducción por estrés
e: embrión
en: endospermo
en_x: endospermo aislado x días
ex_d: embrión aislado x días
h: hoja
ov: ovários maduros
OVJ: ovários jóvenes
OVM: ovários maduros
P: Pavon
r: raíz

1. Introducción

1.1. Aspectos generales de la cebada (*Hordeum vulgare* L.) y del trigo panadero (*Triticum aestivum* L.)

De las especies cultivadas por el hombre, los cereales son los más importantes en la alimentación humana. A nivel mundial, los cereales representan casi un 50% de la energía que se ingiere en la dieta (FAO 2006). La FAO prevé que será necesario aumentar la producción anual de cereales en unos 1.000 millones de toneladas en el periodo 2000-2050, para poder satisfacer la demanda de la población mundial prevista para dicho periodo (8.9 millones en 2050) (FAO 2011). Las perspectivas macroeconómicas indican que la producción agrícola deberá ser capaz de mantener la seguridad alimentaria de la población, y al mismo tiempo atender la nueva demanda de biocombustibles, materias prima y alimentos energéticos (FAO 2011).

Actualmente, el trigo es el cereal que ocupa la mayor superficie de cultivo a nivel mundial con 220.385 miles de ha, y el tercero en la clasificación por producción (704.080 miles de t) después del maíz y arroz (Tabla 1). La cebada se sitúa en cuarta posición tanto en superficie de cultivo (48.604 miles de ha) como en producción (134.279 miles de t) después del maíz, arroz y trigo. En España, la cebada y el trigo ocupan el primer y el segundo lugar, respectivamente, en cuanto a producción total y superficie cultivada (Tabla 1). La cebada posee una gran capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales, de ahí que ocupe mayor superficie de cultivo en España que el trigo. La cebada presenta una ventaja productiva frente a otros cereales en zonas más áridas y en suelos más pobres y salinos.

La cebada y el trigo son plantas monocotiledóneas, autógamas, que pertenecen a la tribu *Triticeae* Dumort, la cual está incluida dentro de la familia *Poaceae* (*Gramineae*).

La cebada fue una de las primeras especies cultivadas por el hombre (Zohary y Hopf 1988). Perteneció al género *Hordeum*, dentro de este género la única especie

que se cultiva es *Hordeum vulgare* L. La mayoría de las especies de *Hordeum* son diploides ($2n=2x=14$) y autógamias, aunque algunas de ellas son tetraploides ($2n=4x=28$) y hexaploides ($2n=6x=42$). Existen diferentes hipótesis sobre el origen de la cebada como cultivo. La más aceptada sitúa a su centro de origen en el Creciente Fértil hace unos 10.000 años (Zohary y Hopf 1988), aunque también ha sido propuesta la hipótesis de un origen multicéntrico (Molina-Cano y col. 2002).

Tabla 1: Superficie de cultivo y producción de cereales en el mundo y en España según datos de 2011 (FAOSTAT 2013).

Cultivos	Mundo		España	
	Superficie (Miles de ha)	Producción (Miles Ton)	Superficie (Miles de ha)	Producción (Miles Ton)
Maíz	170.398	883.460	368	3.855
Trigo	220.385	704.080	1.993	6.900
Arroz cáscara	164.125	722.760	121	929
Cebada	48.604	134.279	2.697	8.328
Avena	9.679	22.505	491	1.078
Centeno	5.113	12.949	132	250
Triticale	3.851	13.385	82	205

De acuerdo a la morfología, la cebada puede ser de dos carreras o de seis carreras. En las espigas de dos carreras las espiguillas laterales abortan, y en las de seis carreras todas las espiguillas son fértiles. En cuanto a los usos, aproximadamente el 85% de la producción de cebada se utiliza para la alimentación de ganado bovino, porcino y aves de corral. El segundo uso más importante es para malteo, principalmente para la elaboración de cerveza y otras bebidas alcohólicas. Recientemente ha aumentado su uso en alimentación humana (harinas panificables, alimentación infantil, comida sana y espesantes) (Akar y col. 2004).

El trigo pertenece al género *Triticum*, especie alopoliploide, que contiene especies diploides ($2n=2x=14$), tetraploides ($2n=4x=28$) y hexaploides ($2n=6x=42$). El 95% del trigo cultivado hoy en día es hexaploide (*Triticum aestivum* L. subsp. *vulgare*), usualmente denominado trigo blando o panadero. El 5% restante

corresponde al trigo tetraploide (*Triticum turgidum* L. subsp *durum*), también denominado trigo duro o de pasta (Guerrero 1992). El trigo panadero (*Triticum aestivum* L.) da lugar a harinas muy finas haciendo posible la panificación. Según la dureza del endospermo se clasifica en trigos flojos utilizados principalmente en pastelería, o en trigos fuertes que son adecuados para la elaboración de pan. El trigo duro (*Triticum durum* L.) se utiliza primordialmente en la elaboración de pastas y sémolas. El trigo se utiliza también para la fabricación de cereales de desayuno, bebidas alcohólicas y piensos para ganado (Peña 2002, Belderok 2000).

Tanto en cebada como en trigo, pueden definirse tres tipos de variedades según su hábito de crecimiento: variedades de invierno o ciclo largo que requieren de vernalización para florecer, variedades de primavera o ciclo corto que no requieren vernalización, y variedades alternativas que pueden alargar o acortar su ciclo según el momento de la siembra.

En la tribu *Triticeae* el número básico de cromosomas de cada genomio se clasifica en 7 grupos de homeología. Así, la cebada tiene un genomio denominado H y los siete cromosomas de su genomio se clasifican en base a su tamaño y sus características, denominándose de 1H a 7H (Linde-Laursen y col. 1997). El trigo hexaploide tiene los genomios A, B y D, y a cada cromosoma se le asigna un número correspondiente al grupo de homeología seguido de la letra correspondiente a su genomio: 1A al 7A, 1B al 7B y 1D al 7D (Mackey 1966).

Los avances recientes en la genómica de cereales han hecho posible analizar la arquitectura de sus genomas y de su expresión. Tanto la cebada como el trigo tienen genomas complejos de gran tamaño ($5,5 \times 10^9$ pb y $17,9 \times 10^9$ pb, respectivamente) con porcentajes de secuencias repetitivas de 76% en cebada y 83% en trigo. En ambas especies se han desarrollado técnicas y plataformas que han permitido el desarrollo de marcadores moleculares para un genotipado de alta precisión, selección asistida por marcadores, genómica funcional y comparada y secuenciación de genomas (Varshney y col. 2006, Cockram y col. 2010, Mayer y col. 2011, Paux y col. 2012).

1.2. Plantas haploides y plantas doblehaploides (DHs)

Se define como haploide a aquellos esporofitos cuya dotación cromosómica es la gamética (n). Los haploides se pueden originar espontáneamente en la naturaleza pero con muy baja frecuencia, o como resultado de diversas técnicas de inducción (Murovec y Bohanec 2012). El desarrollo espontáneo de las plantas haploides es conocido desde que Blakeslee y col. (1922) describieron por primera vez este fenómeno en *Datura stramonium*. Posteriormente también se documentó en tabaco (*Nicotiana tabacum*), trigo (*Triticum aestivum*) y otras especies (para revisión ver Forster y col. 2007).

Las plantas haploides son viables pero estériles debido a su incapacidad de producir gametos con un número de cromosomas equilibrado durante la meiosis (ver revisión de Murovec y Bohanec 2012). La haploidía hace que todos los alelos se encuentren en hemigosis, lo que pone de manifiesto los alelos recesivos deletéreos en plantas alógamas. Por tanto, la tolerancia a la haploidía es mayor en especies autóгамas y en especies poliploides que en especies alógamas (Grimanelli y col. 2001).

Las plantas DHs son aquellas que se obtienen mediante la duplicación cromosómica, espontánea o mediante inducción química, de las plantas haploides. Por lo tanto, son plantas totalmente homocigóticas en todos los *loci* y completamente fértiles. La selección de plantas DHs permite la selección de nuevas variedades en especies autóгамas, o de líneas puras que servirán para la producción de híbridos en especies alógamas (Maluszynski y col. 2003a, Kasha 2005, Seguí-Simarro 2010, Murovec y Bohanec 2012).

1.3. Aplicaciones de las plantas doblehaploides (DHs)

La producción y calidad del grano de cebada y trigo se han ido mejorando en las últimas décadas por métodos de mejora tradicional, fundamentalmente selección

masal, genealógica, SSD o retrocruzamiento (Sánchez-Monje 1974). Sin embargo, estos métodos tradicionales son procesos muy largos que son insuficientes para hacer frente a la continua demanda mundial de producción de alimentos (FAO 2011). De ahí que sean necesarios métodos que acorten el tiempo de obtención de nuevas variedades.

La utilización de líneas DHs tiene gran importancia en programas de mejora, ya que permite disminuir la duración del proceso de obtención de nuevas variedades a unos 5 a 6 años, frente a los 10 a 12 años necesarios por los métodos tradicionales (Snape y col. 1986, Thomas y col. 2003, Forster y col. 2007, Seguí-Simarro 2010). Esto se debe fundamentalmente a dos razones: **1)** la fijación de caracteres a partir de F1 ó F2 se realiza en una sola generación, mientras que por el método tradicional de autofecundación hacen falta de 5 a 6 generaciones; **2)** el aumento de la eficiencia de selección, ya que el fenotipo de la planta no queda enmascarado por los efectos de dominancia (especialmente importante cuando manejamos caracteres cuantitativos). Además, la utilización de DHs en programas de mejora evita los problemas de pureza varietal que suelen ser frecuentes a la hora de registrar una variedad (Choo y col. 1985, Forster y col. 2007).

Por otro lado, una población de DHs producida a partir de una F1 es un material ideal para el mapeo genético, ya que las líneas DHs han sufrido sólo una ronda de recombinación y por tanto muestran una expresión máxima de las relaciones de ligamiento (Forster y Powell 1997, Forster y col. 2007, Seguí-Simarro 2010, Muñoz-Amatriaín y col. 2011, Poland y col. 2012). Además, estas poblaciones son especialmente útiles en estudios genéticos y análisis de QTLs (Quantitative Trait Loci) (Devaux y Pickering 2005, Forster y Thomas 2005, Zhao y col. 2009, Riedel y col. 2011, Dahleen y col. 2012, Castro y col. 2012, Fisk y col. 2013). La combinación de líneas DHs y selección asistida por marcadores permite también reducir considerablemente el tiempo necesario para la obtención de nuevas variedades (Thomas y col. 2003, Tuveesson y col. 2007, Melchinger y col. 2011).

La producción de DHs en combinación con técnicas de biotecnología como la mutagénesis y la transformación genética, facilitan la obtención de nuevas fuentes de variabilidad que quedan fijadas en la primera generación (Jähne y col. 1994, Castillo y col. 2001, Seguí-Simarro 2010, Chauhan y Khurana 2011, Kapusi y col. 2013). Además son materiales ideales para la secuenciación del genoma y para la mejora inversa (Dirks y col. 2009, Ferrie y Möllers 2011). Otra ventaja de los DHs es la capacidad de servir como sistema modelo para estudiar el desarrollo embrionario *in vitro*, sin la interferencia de los tejidos maternos, debido a la gran similitud entre la embriogénesis de la microspora y la embriogénesis zigótica (Supena y col. 2008, Prem y col. 2012).

1.4. Métodos de producción de plantas DHs

Aunque existen numerosas especies que son capaces de producir haploides de forma natural, la frecuencia con la cual se producen es muy baja (0.001% a 0.01%) para que puedan ser utilizados en programas de mejora (Palmer y Keller 2005). Por ello se han realizado muchos esfuerzos para desarrollar métodos que induzcan la formación de plantas DHs.

En la actualidad, los métodos más efectivos para la producción de DHs son:

a. Ginogénesis: Ovarios u óvulos cultivados *in vitro* dan lugar a embriones que se forman a partir de alguna de las células haploides del saco embrionario. En este método la frecuencia de embriogénesis es baja. Se ha utilizado en aquellos casos en los que los otros métodos no han tenido éxito, como en cebolla, remolacha, *Gerbera*, calabacín (para revisión ver Bohanec 2009).

b. Partenogénesis: Un embrión se desarrolla *in vivo* a partir de la ovocélula sin intervención de un núcleo espermático. Se puede inducir artificialmente mediante polen inactivado o tratamientos químicos, aunque las frecuencias de inducción son

muy bajas. Actualmente se utiliza en especies como melón, pepino y mandarino (Lofti y col. 2003, Claveria y col. 2005, Froelicher y col. 2007).

c. Cruzamiento interespecífico o intergenérico: Producción de un embrión haploide mediante la eliminación de los cromosomas de uno de los parentales, generalmente el que poliniza. En cebada se obtienen mediante el cruzamiento con *H. bulbosum* y en trigo mediante el cruzamiento con maíz o mijo (para revisión ver Maluszynski y col. 2003a, Jauhar y col. 2009).

d. Embriogénesis de la microspora o androgénesis: En este método la microspora es capaz de cambiar su patrón de desarrollo de la vía gametofítica a la vía esporofítica para dar lugar a una planta completa. Esto se logra mediante el cultivo de anteras o de microsporas aisladas, y es uno de los métodos más utilizados en la actualidad (para revisión ver Maluszynski y col. 2003a).

En cebada y trigo los métodos de producción de DHs más utilizados son el cruzamiento interespecífico o intergenérico y la embriogénesis de la microspora. Ambos han dado lugar al registro de un elevado número de nuevas variedades (Thomas y col. 2003). En cebada el 50% de las variedades que se registran son obtenidas a partir de la selección de líneas DHs (Weyen, J. SAATEN-UNION BIOTEC, comunicación personal). Actualmente existen empresas de producción de semillas que utilizan el método de DH como exclusivo para la obtención de nuevas variedades, tanto en cebada como en trigo (Orsini, J. SAATEN-UNION BIOTEC, comunicación personal).

1.5. Producción de plantas DHs mediante embriogénesis de la microspora

La embriogénesis de la microspora, es el proceso mediante el cual una microspora, tras ser sometida a un tratamiento de estrés, cambia su patrón de desarrollo y forma un embrión haploide que da lugar a una planta completa. Las

plantas haploides son estériles, pero mediante duplicación cromosómica (espontánea o inducida) se pueden obtener plantas fértiles y completamente homocigotas (DHs). Este método tiene el potencial de producir un número muy elevado de plantas DHs ya que existe un gran número de microsporas por flor. Las limitaciones de este método son la gran dependencia del genotipo (Lantos y col. 2013) y la producción de plantas albinas (Muñoz-Amatriaín y col. 2008). De ahí la necesidad de desarrollar protocolos que puedan ser efectivos en un amplio rango de genotipos.

Se ha publicado la obtención de plantas DHs en más de 220 especies, aunque no se ha conseguido regenerar plantas en todas ellas (Maluszynski y col. 2003b, Thomas y col. 2003). La eficiencia de inducción de la embriogénesis de la microspora en cebada y trigo ha aumentado considerablemente durante los últimos años mediante cambios en el pretratamiento de estrés, la composición de los medios y las condiciones de cultivo (Hunter 1987, Finie y col. 1989, Fadel y Wenzel 1990, Cistué y col. 1994, 1999, Hu y Kasha 1997, Castillo y col. 2000, Soriano y col. 2007, 2008, Jacquard y col. 2006, 2009a, Islam y Tuteja 2012, Asif y col. 2013). Entre los cereales, la cebada es la especie modelo en embriogénesis de la microspora, aunque existen genotipos que presentan baja respuesta (pocas microsporas que se inducen para dar lugar a la formación de un embrión, bajo porcentaje de embriogénesis y altas tasas de albinismo). En trigo panadero, además de los problemas descritos en cebada, existen genotipos que presentan porcentajes de duplicación cromosómica espontánea muy bajos, por lo que es necesario hacer tratamientos diploidizantes que con frecuencia producen altas tasas de mortalidad de las plantas. Por lo tanto, en esta especie la obtención de plantas verdes a partir de un elevado número de genotipos sigue siendo todavía un reto (Ascough y col. 2006, Lantos y col. 2013).

En la figura 1 se muestran las distintas fases de la obtención de plantas DHs de cebada mediante cultivo de anteras o microsporas aisladas según los protocolos de nuestro grupo de trabajo (Cistué y col. 2003, Castillo y col. 2000). En primer lugar se somete a la anteras a un tratamiento de estrés en medio con manitol (Figura 1a). En el cultivo de microsporas, éstas son aisladas de los tejidos de la antera después del tratamiento de estrés (Figura 1d). Posteriormente, las anteras o las microsporas

aisladas se inoculan en el medio de inducción de embriogénesis, donde las microsporas empiezan a dividirse (Figura 1b y e). Las microsporas que han dividido pueden dar lugar a formaciones de tipo callo o embriones (Figura 1c y f).

Los embriones bien diferenciados (Figura 1g) son transferidos a medio de regeneración para que den lugar a plántulas. Las plántulas pueden ser verdes o albinas (Figura 1h). Las plantas verdes son transferidas a un medio para el fortalecimiento de la raíz (Figura 1i). Posteriormente se realiza el trasplante a tierra y aclimatación (Figura 1j) antes de ser transferidas al invernadero para la obtención de semilla (Figura 1k).

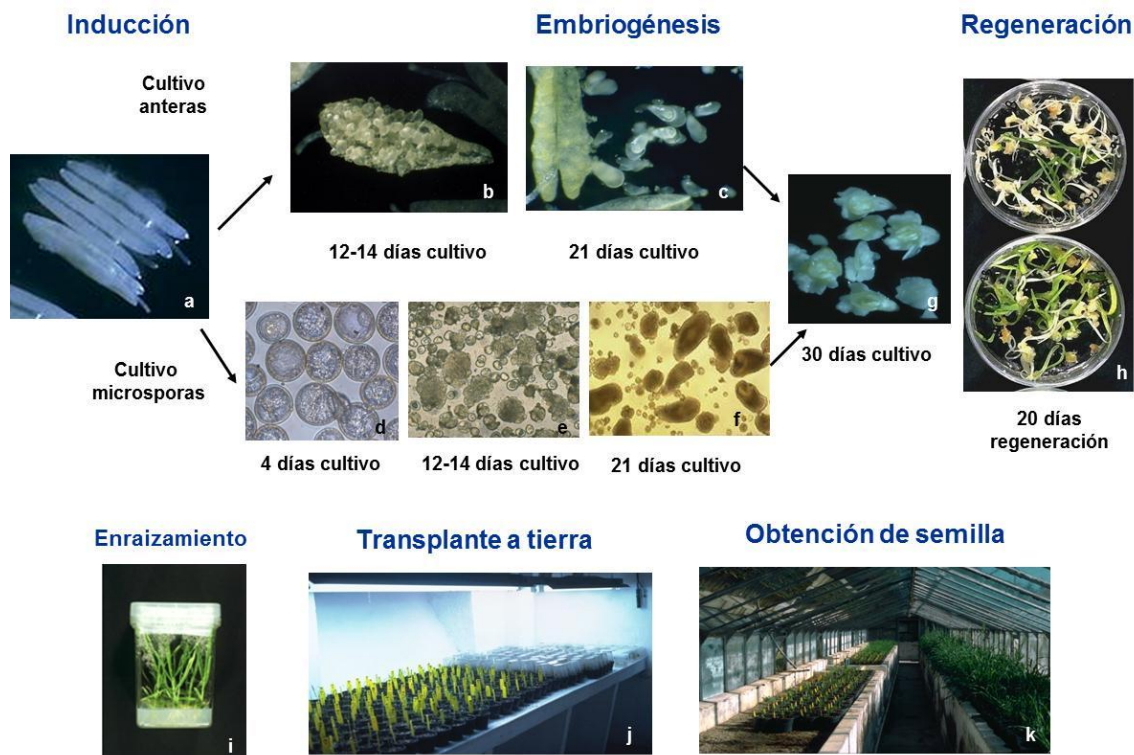


Figura 1: Producción de plantas DHs en cebada mediante el cultivo de anteras y de microsporas aisladas según el protocolo de Cistué y col. (2003) y Castillo y col. (2000).

1.6. Factores que afectan la embriogénesis de la microspora

La eficiencia del proceso de producción de plantas DHs depende de la eficiencia de cada una de las fases: inducción, embriogénesis, regeneración, albinismo y duplicación cromosómica. Todas estas fases se ven afectadas por factores genéticos y factores fisiológicos.

1.6.1. Factores genéticos

De los distintos factores que afectan a la embriogénesis de la microspora, el efecto genético es uno de los más importantes, existiendo una gran variación en cuanto a la producción de plantas entre distintos genotipos (Cistué y col. 1999, Holme y col. 1999, Lantos y col. 2013). Entre las especies descritas, el tabaco, la colza y la cebada son consideradas especies modelo en la embriogénesis de la microspora. En otras especies se han obtenido resultados en sólo algunos genotipos (Forster y Thomas 2005).

En cebada y trigo se ha descrito la existencia de distintos genes nucleares con efectos aditivos o de dominancia, así como efectos citoplasmáticos, que actúan independientemente en cada fase del proceso (Tuveesson y col. 1989, Larsen y col. 1991, Zhou y Konzak 1992, Hou y col. 1994). Estudios más recientes han identificado marcadores moleculares asociados con la producción de plantas DHs en cebada, trigo, centeno y triticale (Grosse y col. 1996, Manninen 2000, Torp y col. 2001, 2004, González y col. 2005, Chen y col. 2007a, Muñoz-Amatriaín y col. 2008).

En cebada, en nuestro grupo de trabajo, se han identificado diferentes QTLs asociados a los caracteres número de embriones y producción de plantas verdes. Así se han identificado QTLs asociados al número de embriones en la región del locus *vr51* del cromosoma 2H y en el cromosoma 6H, para el número de plantas verdes en los cromosomas 3H, 5H, y 6H, y para el porcentaje de plantas verdes en 3H y 5H. El porcentaje de varianza fenotípica explicada por los marcadores identificados para el

porcentaje de plantas verdes fue del 65.2% (Chen y col. 2007a, Muñoz-Amatriaín y col. 2008).

En trigo se han identificado QTLs asociados con el porcentaje de plantas verdes en los cromosomas 2AL, 2BL y 5BL (Torp y col. 2001, 2004).

1.6.2. Factores fisiológicos

a. Condiciones de crecimiento de las plantas donantes: Es muy importante que las plantas donantes crezcan en condiciones óptimas con respecto al fotoperiodo, intensidad y calidad de la luz, temperatura y nutrición. Además, deben estar libres de plagas y enfermedades (Cistué y col. 2003).

b. Estado de desarrollo de la microspora: El estado de desarrollo óptimo de la microspora varía según la especie y el método de cultivo. En los cereales, el estado uninucleado medio a tardío en cultivo de anteras y el estado uninucleado tardío a binucleado temprano en cultivo de microsporas son los que producen las mayores eficiencias de inducción de la embriogénesis (Soriano 2008). Para identificarlo, se establece una correlación entre el estado de desarrollo de las microsporas y distintos caracteres morfológicos de la espiga (Cistué y col. 2003, Soriano 2008).

c. Tratamiento de estrés o pretratamiento: Se han aplicado diferentes tipos de tratamiento de estrés dependiendo de la especie y el estado de desarrollo de las microsporas (para revisión ver Shariatpanahi y col. 2006). Los tratamientos de estrés más utilizados en cebada y trigo son: el choque térmico por frío (14-28 días a 4°C) y la inanición por carbohidratos en medio con manitol (0,4 M durante 4-7 días a 25°C). En nuestro grupo de trabajo se utiliza una modificación del tratamiento con manitol desarrollado por Roberts-Oehlschlager y Dunwell (1990), en la que se ha aumentado la concentración de manitol en el medio de 0,4M a 0,7M, o incluso a 1,5 M en los genotipos más recalcitrantes en cebada, lográndose así que el estrés por inanición

este acompañado por un estrés osmótico (Cistué y col. 1994, 1999, Soriano 2008). La aplicación del alcohol butílico, n-butanol, después de un tratamiento con manitol, aumentó significativamente el número de embriones y de plantas verdes en todos los genotipos de trigo y genotipos recalcitrantes de cebada (Soriano y col. 2008, Castillo y col. 2009a, 2014).

d. Composición de los medios de cultivo

Medio de inducción de embriogénesis: En cebada el medio de cultivo más utilizado es el FHG (Hunter 1987) y BAC3 (Szarejko 2003), y en trigo se utilizan diferentes medios de cultivo como MMS3 (medio MS modificado por Hu y Kasha 1997), MMS4 (Kasha y col. 2003), W14 (Ouyang 1986) y 190.2 (Wang y Hu 1984) (para revisión ver Maluszynski y col. 2003a).

Para un aumento en la eficiencia de obtención de plantas DHs en cebada y trigo ha sido esencial la sustitución de sacarosa, como fuente principal de carbono, por maltosa, y la incorporación de una fuente de nitrógeno orgánico como la glutamina (Hunter 1987, Finie y col. 1989, Fadel y Wenzel 1990). Por otro lado, la incorporación de Ficoll (polímero de alto peso molecular que incrementa la tensión superficial y la viscosidad del medio) aumentó considerablemente el número de embriones y de plantas verdes, tanto en cebada (Cistué y col. 1999), como en trigo (Zhou y col. 1991). Un aumento de la concentración de $ZnSO_4$ y $CuSO_4$ produjo un incremento del número de plantas verdes en cebada (Echavarri y col. 2008, Jacquard y col. 2009a). En trigo, el co-cultivo con ovarios o el uso de medios preacondicionados con ovarios o diferentes tejidos de la flor es esencial para la obtención de un número elevado de embriones (Hu y Kasha 1997). La incorporación de agentes antioxidantes como el glutatión y la prolina ha mejorado el número de plantas verdes en genotipos recalcitrantes de trigo (Asif y col. 2013)

Medio de regeneración: Las modificaciones más importantes del medio de regeneración, respecto al medio de embriogénesis, son la disminución de la concentración de auxinas y/o el aumento de la concentración de citoquininas, así como la reducción de la concentración de azúcares (Castillo y col. 2000, para revisión ver Maluszynski y col. 2003a). En trigo, la utilización del medio J25-8 ha permitido aumentar los porcentajes de regeneración de plantas (Cistué y col. 2006). Además de la composición del medio de cultivo, la calidad de los embriones condiciona enormemente la capacidad de regeneración.

1.7. Características de las plantas regeneradas

1.7.1. Albinismo

Uno de los fenómenos asociados al cultivo de anteras y microsporas en cereales, y que presenta una fuerte dependencia del genotipo, es la regeneración de plantas albinas (para revisiones ver Kumari y col. 2009, Torp y Andersen 2009, Makowska y Oleszczuk 2014). Estas plantas presentan alteraciones en el tamaño y la organización interna de los plástidos, así como una mayor acumulación de almidón (Caredda y col. 1999, 2000). Hasta el momento numerosos estudios han intentado determinar el origen y las causas del albinismo (Harada y col. 1991, Maier y col. 1995). Un factor común a todas las plantas albinas es la deficiencia en ribosomas plastídicos y la presencia de un patrón de transcripción y traducción alterado en comparación con las plantas verdes (Hofinger y col. 2000).

Además de los factores genéticos que controlan el albinismo (Apartado 1.6.1), también existen factores fisiológicos que pueden aumentar la presencia de plantas albinas como: el estado de desarrollo de la microspora (He y Ouyang 1984), el tipo de pretratamiento de estrés (Cistué y col. 1999, Kunz y col. 2000), la composición del medio de cultivo (Jacquard y col. 2009a) y la duración del cultivo (Cistué y col. 1995, Puolimatka y Pauk 2000).

1.7.2. Nivel de ploidía

Aunque las plantas resultantes de la embriogénesis de la microspora son plantas haploides, en algunos casos se produce una duplicación cromosómica espontánea al inicio de la inducción de la embriogénesis que da lugar a plantas DHs. Los porcentajes de duplicación espontánea varían dependiendo de la especie, del tipo de tratamiento de estrés y el estado de desarrollo de la microspora (para revisión ver Castillo y col. 2009b). En nuestro grupo los porcentajes de autoduplicación en cebada son del 85-90 % (Cistué y col. 2003), y en trigo son menores (35-50 % en cultivo de anteras y 70 % en cultivo de microsporas) (Cistué y col. 2006, Soriano y col. 2007).

Se han utilizado distintos métodos para duplicar artificialmente la dotación cromosómica de las plantas haploides. Tradicionalmente, se han tratado las plantas con la sustancia diploidizante colchicina, pero recientemente se han desarrollado protocolos para incorporar agentes diploidizantes como colchicina, orizalina y amiprofosmetilo en el medio de cultivo (Soriano y col. 2007, para revisión ver Castillo y col. 2009b).

1.7.3. Estabilidad genética y potencial agronómico

Según Snape y col. (1986), entre los requisitos que ha de cumplir un sistema de producción de DHs para que el método pueda utilizarse en mejora genética cabe mencionar: la producción de plantas genéticamente normales y estables; y que la población de plantas DHs represente de forma aleatoria la totalidad de los gametos de la planta madre.

Se ha estudiado la estabilidad genética y el potencial agronómico de líneas DHs de cebada y trigo. En cebada se analizó la estabilidad genética a nivel de cariotipo, proteínas y DNA en diferentes poblaciones de líneas DHs producidas mediante el cultivo de microsporas, y los resultados no mostraron cambios en la estabilidad genética (Finnie y col. 1991). Otros estudios indican que en cebada los

materiales generados por el método de DHs tienen características agronómicas (producción y estabilidad en el rendimiento) similares a los materiales obtenidos mediante métodos tradicionales de mejora (Devaux y col. 1993, Cistué y col. 2005).

En trigo se compararon líneas DHs obtenidas mediante el cultivo de anteras con líneas obtenidas mediante hibridación interespecífica con maíz (Guzy-Wróbelska y Szarejlo 2003) y con líneas generadas mediante el método de mejora tradicional SSD (Ma y col. 1999). Las líneas DHs obtenidas mediante los dos primeros sistemas representaron mayoritariamente una muestra al azar de los gametos parentales y presentaron respuestas similares en el campo respecto a las líneas generadas mediante mejora tradicional (Guzy-Wróbelska y Szarejlo 2003).

1.8. Cambios celulares en la embriogénesis de la microspora

Se han realizados estudios sobre los cambios celulares que se producen en el proceso de producción de DHs mediante embriogénesis de la microspora. Estos estudios se han centrado fundamentalmente en: **1)** fase de tratamiento de estrés, en la que la microspora cambia su patrón de desarrollo gametofítico y se produce la desdiferenciación adquiriendo la totipotencia celular; **2)** fase de cultivo, en el que la microspora se divide produciendo estructuras multicelulares, inicialmente contenidas en el interior de la exina, y que posteriormente proliferan y rompen la exina dando lugar a embriones o estructuras de tipo callo (embriogénesis o fases tempranas de desarrollo embriogénico).

1.8.1. Cambios morfológicos

Antes del tratamiento de estrés, la microspora en estado uninucleado medio-tardío tiene una gran vacuola en posición central y el núcleo se encuentra en una situación periférica cercana al extremo opuesto al poro. Durante el tratamiento de estrés la microspora aumenta de tamaño, la vacuola sigue teniendo una posición central y el núcleo se desplaza hasta el extremo opuesto al poro. El núcleo presenta

una cromatina muy descondensada y uno o dos pequeños nucleolos. Además, se produce una desdiferenciación del citoplasma, es decir, el citoplasma aparece con regiones libres de orgánulos, con un número muy reducido de ribosomas, de gránulos de almidón y cuerpos lipídicos (Hoekstra y col. 1992, Telmer y col. 1995, Ramirez y col. 2001, Maraschin y col. 2005a y b). En cebada estos cambios van acompañados de la presencia de una fina capa de intina, a diferencia de la intina gruesa de los granos de polen (Maraschin y col. 2005a y b).

En general cuando las microsporas son inoculadas en el medio de cultivo, el núcleo migra hacia el centro de la microspora y la vacuola queda fragmentada por hilos de citoplasma que se disponen en forma radial dando lugar a una morfología estrellada (“star-like”) que va acompañada de grandes cambios en el citoesqueleto. Estos cambios se han descrito como indicadores de la adquisición de potencial embriogénico, tanto en cebada como en trigo (Touraev y col. 1996, Reynolds 1997, Indrianto y col. 2001, Maraschin y col. 2005 a y b). Una vez que la microspora ha adquirido el potencial embriogénico comienza a dividirse.

Se han descrito hasta cinco patrones diferentes de división de la microspora en función de la simetría de la primera división (para revisión ver Aionesei y col. 2005). En cultivos embriogénicos de cebada se ha descrito la coexistencia de estructuras multicelulares homogéneas con un tipo de células, y que por lo tanto derivarían de una división simétrica, y de estructuras multicelulares heterogéneas con dos tipos celulares bien diferenciados, y que por lo tanto derivarían de una división asimétrica (Ramírez y col. 2001, Pulido y col. 2005, Maraschin y col. 2005a y c). Estas estructuras heterogéneas estaban formadas por dos dominios: uno de ellos de pequeño tamaño, formado por células pequeñas con el núcleo muy condensado y citoplasma denso que contiene gran cantidad de ribosomas y orgánulos, que derivarían de la división de la célula generativa, y el segundo dominio de mayor tamaño formado por células grandes redondeadas con una superficie rugosa, con núcleos que presentaban la cromatina menos condensada y citoplasma más laxo que contiene grandes vacuolas, que derivarían de la división del núcleo vegetativo (Ramírez y col. 2001, Maraschin y col. 2005c).

El proceso de ruptura de la exina se dio en el dominio de células pequeñas que sufrieron muerte celular programada (PCD) (Maraschin y col. 2005c). En maíz también se ha descrito la existencia de un dominio embrión que se asocia al dominio con células pequeñas y un dominio endospermo que se asocia al dominio con células grandes en las estructuras multicelulares (Testillano y col. 2002), que corresponderían a los dos dominios descritos en cebada.

En trigo las estructuras multicelulares no han sido tan estudiadas, aunque hay indicios de que al igual que en cebada existirían dos dominios, diferenciados por el tamaño de las células y por la presencia de gránulos de almidón. La rotura de la exina se efectuaría en la región opuesta a la zona de acumulación de almidón, que correspondería a la zona que dará lugar a la raíz (Bonet y Olmedilla 2000, Indrianto y col. 2001).

1.8.2. Cambios en la expresión génica

Durante la embriogénesis de la microspora intervienen distintos procesos moleculares que implican el cambio en la expresión de multitud de genes. Aunque en los últimos años se ha hecho un esfuerzo por identificar genes marcadores asociados a las fases de tratamiento de estrés y de desarrollo embriogénico (temprano y avanzado), todavía no se conocen los mecanismos moleculares que controlan dichas fases. La mayor parte de los trabajos encaminados a la identificación y aislamiento de genes asociados a la embriogénesis de la microspora se han realizado en especies modelo para producción de DHs como *Brassica*, tabaco y cebada.

1.8.2.1. Genes asociados a la fase de tratamiento de estrés de la microspora

Se han asociado genes implicados en distintos mecanismos en la fase de pretratamiento de estrés. En tabaco se identificó el gen *EMBRYOGENIC POLLEN-abundant (NtEPc)* que codifica para una fosfoproteína y estaba asociado a la respuesta a citoquininas (Kyo y col. 2000), posteriormente se identificaron también

otros genes asociados a metabolismo, remodelación de la cromatina, transcripción, traducción y señalización (Kyo y col. 2003, Hosp y col. 2007a). Genes de la familia de las HSPs (heat shock proteins) también se expresan activamente en microsporas de *Brassica* y tabaco durante un pretratamiento de estrés con calor o por inanición (Zarsky y col. 1995, Smykal y Pechan 2000). En *Brassica* también se han identificado cambios en la expresión del gen *BnMET1a-LIKE* que está involucrado en la metilación de DNA (Solis y col. 2012). En cebada se ha descrito la activación de genes relacionados con una respuesta general a estrés como *GLUTATIONE-S-TRANSFERASA (GST)*, *OXALATO OXIDASA (OXO)* y genes que codifican a proteínas relacionadas con patogénesis (PR) como la quitinasa 2b (Jacquard y col. 2009b).

En 2006 se publicaron los dos primeros estudios en los que se analizaban, mediante técnicas de genómica funcional, la respuesta al estrés en la embriogénesis de la microspora en cebada. En el primero Maraschin y col. (2006), utilizando un “macroarray” de 1421 cDNAs de desarrollo de carióspside de 1 a 15 días, describieron la inducción de genes asociados a metabolismo lipídico y proteico, respuesta a estrés, muerte celular programada, señalización y proteólisis. El segundo estudio se realizó en nuestro grupo, usando un “microarray” comercial de Affimetrix (22k Barley1 GeneChip) que permite el análisis simultáneo de 22.000 genes de cebada. Se observó que la respuesta al tratamiento de estrés se caracterizaba por grandes diferencias en la expresión de genes de rutas metabólicas y una respuesta multidimensional al estrés, observándose que había una parada del patrón de desarrollo gametofítico, quedando la microspora en un estado desdiferenciado (Muñoz-Amatriaín y col. 2006). Posteriormente, se analizaron los cambios en los perfiles de expresión de factores transcripcionales (Muñoz-Amatriaín y col. 2009a), y se compararon los transcriptomas de líneas casi isogénicas de distinta respuesta a la embriogénesis de la microspora, pudiendo determinar patrones de expresión génica que ya durante el tratamiento de estrés caracterizaban las fases posteriores de la embriogénesis de la microspora (Muñoz-Amatriaín y col. 2009b).

1.8.2.2. Genes asociados al desarrollo embriogénico de la microspora

Distintos estudios se han centrado en los mecanismos de activación de la ruta embriogénica de la microspora y en la identificación de genes marcadores específicos de esta etapa. El primer trabajo realizado en cebada identificó tres genes que codificaban para una proteína transferidora de lípidos (ECLTP), una glutatión-S-transferasa (ECGST), y una proteína tipo arabinogalactano (AGP) early culture abundant (ECA1), que en estudios posteriores esta última resultó ser la única proteína específica en embriogénesis de la microspora (Vrinten y col. 1999).

Posteriormente se han identificado genes asociados a la inducción de la ruta embriogénica de la microspora mediante distintos tipos de análisis como hibridación substractiva, transcriptómica y proteómica en *Brassica* (para revisión ver Maraschin y col. 2005a, Pauls y col. 2006, Seguí-Simarro y Nuez 2008). Entre los genes identificados destacan: el factor transcripcional *BABYBOOM* (*BBM*) que presenta similitud con la familia de factores transcripcionales *AP2/ERF*, que juega un papel importante en la proliferación celular y la morfogénesis durante la embriogénesis y cuya expresión ectópica en *Arabidopsis* y *Brassica* resulta en la formación espontánea de embriones somáticos (Boutilier y col. 2002); genes que codifican para proteínas ROPs de la superfamilia Ras de GTPasas, que actúan como interruptores moleculares y que interaccionan con el citoesqueleto (Chan y Pauls 2007).

También se han identificado genes asociados al establecimiento de la polaridad del nuevo embrión, metabolismo, transferencia de proteínas lipídicas, señales de transducción, cambio de un patrón de desarrollo radial a bilateral, modificaciones de la pared celular y muerte celular programada (PCD) asociada a la rotura de la exina (Malik y col. 2007, Joosen y col. 2007, Tsuwamoto y col. 2007, Stasolla y col. 2008, Maraschin y col. 2005a).

Existen pocos estudios en fases más avanzadas de la embriogénesis de la microspora, sólo el trabajo de Stasolla y col. (2008) en *Brassica* proporciona

información sobre los mecanismos moleculares que se activan cuando los embriones se encuentran en estado cotiledonar y han completado su programa de histodiferenciación, y cuando los embriones están totalmente maduros y el meristemo apical completamente formado. En dicho trabajo se describe la activación, durante la primera fase, de genes relacionados con desarrollo como *LOB 41* y *NO APICAL MERISTEM (NAM)*, metabolismo (*FRUCTOSE-6-P-PHOSPHOTRANSFERASE*, *GLUTATION-S-TRANSFERASE* y *ASPARTATE AMINOTRANSFERASE*), y durante la fase de embrión maduro genes que codifican factores de transcripción (myb-related protein, *HAP5a* y homeodomain leucine-zipper protein), proteínas reguladoras de auxinas y giberelinas, un gen *LEA (LATE-EMBRYOGENESIS ABUNDANT)* y proteínas de reserva.

Genes de expresión en embrión zigótico como los “*LEAFY COTYLEDON*” (*LEC1* y *LEC2*), *FUSCA (FUS3)*, *BABYBOOM (BBM)*, *WUSHEL-related homeobox (WOX2* y *WOX9)* y *ABSCISIC ACID INTENSITIVE3 (ABI3)*, o genes asociados a zonas meristemáticas como el *PROTODERMAL FACTOR2 (PDF2)* y *CLAVATA3/ESR*, también actuarían como marcadores de la embriogénesis de la microspora en *Brassica* (Custers y col. 2001, Malik y col. 2007, 2009).

Por otro lado, se ha descrito la expresión de un gen que codifica una quinasa la cual está asociada a procesos de señalización, *ZmSERK1 (SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE)* en estructuras multicelulares derivadas de microsporas de maíz (Baudino y col. 2001), y la activación de genes marcadores meristemáticos como *SHOOTMERISTEMLESS (STM)*, *CLAVATA 1 (CLV1)* y *ZWILLE (ZLL)* (Belmonte y col. 2006, 2010, Elhiti y col. 2010).

1.8.2.3. Genes asociados a procesos de síntesis, degradación y señalización de Acido Abscísico (ABA)

Acido abscísico (ABA) es una de las hormonas más importantes asociadas al estrés y que juega un papel esencial en distintos procesos fisiológicos de las plantas

como la dormancia de la semilla, el movimiento de los estomas o la respuesta a estrés abiótico (para revisión ver Finkelstein 2013).

En distintos trabajos también se le ha asignado un papel importante en la embriogénesis de la microspora. Así Imamura y Harada (1980) en cultivo de anteras de tabaco describieron que el tratamiento con ABA exógeno tenía un efecto inductor sobre la producción de plantas DHS y además que el pretratamiento de estrés mediante manitol aumentaba el nivel endógeno de ABA. Estos resultados se confirmaron en estudios posteriores al observar el efecto inductor de la aplicación de ABA exógeno en trigo (Hu y col. 1995), tabaco (Kyo y Harada 1985) y arroz (Guzman y Arias 2000), y la producción de ABA en respuesta al pretratamiento de estrés (Davies y Jones 1991) en particular en el cultivo de anteras de cebada (van Bergen y col. 1999).

Estos resultados parecen indicar que el ABA efectivamente interviene en la reprogramación del desarrollo del polen. Sin embargo, también se ha descrito una falta de correlación entre el nivel de ABA y la eficiencia de la inducción de la embriogénesis de la microspora en triticale y *Brassica*, y que el ABA solo estaría implicado en el mecanismo general de adaptación al tratamiento de estrés (Zur y col. 2012, Dubas y col. 2013).

Se han propuesto distintos mecanismos en los que podría intervenir el ABA en la embriogénesis de la microspora: aumentando el porcentaje de microsporas viables y reduciendo del número de microsporas binucleadas por la represión del desarrollo gametofítico (van Bergen y col. 1999, Wang y col. 1999); previniendo la muerte celular programada (PCD) (Rodríguez-Serrano y col. 2012); activando cascadas de señalización a través de las MAPKs (mitogen-activate protein kinase) (van Bergen y Wang 2002, Liu 2012); estabilizando membranas celulares e iniciando mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo (Prasad y col. 1994, Dubas y col. 2013).

Las respuestas a la acción del ABA están bajo el control de mecanismos regulatorios complejos que incluyen la homeostasis, percepción y señalización (Xu y

col. 2013). Entre estos mecanismos, la fluctuación de los niveles celulares de ABA juegan un papel esencial y tienen gran importancia para entender el resto de los mecanismos regulados por ABA.

La ruta principal de síntesis *de novo* de ABA es a partir de los carotenoides (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción 2012). Los genes implicados en esta ruta de biosíntesis han sido identificados en cebada (Seiler y col. 2011). En el primer paso se produce la conversión de Zeaxantina a Violaxantina (Figura 2) mediante la Zeaxantina epoxidasa (ZEP), de la que en cebada se han identificado dos genes *HvZEP1* y *HvZEP2* (Audran y col. 2001, Park y col. 2008). El siguiente paso está catalizado por la 9-cis-epoxycarotenoide dioxigenasa (NCED), y en cebada se han descrito dos genes (*HvNCED1* y *HvNCED2*) (Leymarie y col. 2008, Millar y col. 2006), produciéndose Xantoxina. Estos dos primeros pasos tienen lugar en los plástidos. Los dos últimos pasos de la biosíntesis se realizan en el citosol, en el primero la Xantoxina se convierte en ABA aldehído, en una reacción catalizada por ABA2 que pertenece a la familia de dehidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDR). Posteriormente, en el paso final, se produce la oxidación del ABA aldehído a ABA mediante una ABA aldehído oxidasa (AAO/AO) y se han identificado dos genes *HvAO2* y *HvAO3* en cebada (Seo y col. 2000, 2004, Seiler y col. 2011).

Los procesos de catálisis de ABA se dividen en dos rutas, una de hidroxidación y otra de conjugación con glucosa. En la primera se da el paso de ABA a 8'-Hidroxi ABA mediante la enzima ABA8'OH codificada por un gen de la familia *CYP707A*, un tipo de P450 monooxigenasa, de la que en cebada se han identificado dos genes (*HvABA8'OH-1* y *HvABA8'OH-2*) (Mizutani y Todoroki 2006). En la ruta de conjugación, el ABA es conjugado con la glucosa (ABA-GE) mediante la ABA-glucosiltransferasa (UGT). Este paso puede ser reversible mediante la hidrólisis de ABA-GE por una β -glucosidasa (*BG*) y en cebada se han descrito los genes *BG2*, *BG3*, *BG6*, *BG7* y *BG8* (Seiler y col. 2011).

Otro mecanismo de regulación de la acción de ABA se da una vez los niveles de ABA se perciben a nivel celular por los receptores, desencadenando la señalización por ABA (para revisión ver Finkelstein 2013). Entre los intermediarios en las rutas de señalización por ABA se han descrito fosfatasa de la familia de serina/threonina fosfatasa PP2C. Entre ellos destacan algunos genes *ABA INSENSITIVE (ABI)* como *ABI1* y *ABI2* (Leung y col. 1997, Meyer y col. 1994), actuando la mayoría de estas PP2C fosfatasa como reguladores negativos de la respuesta por ABA.

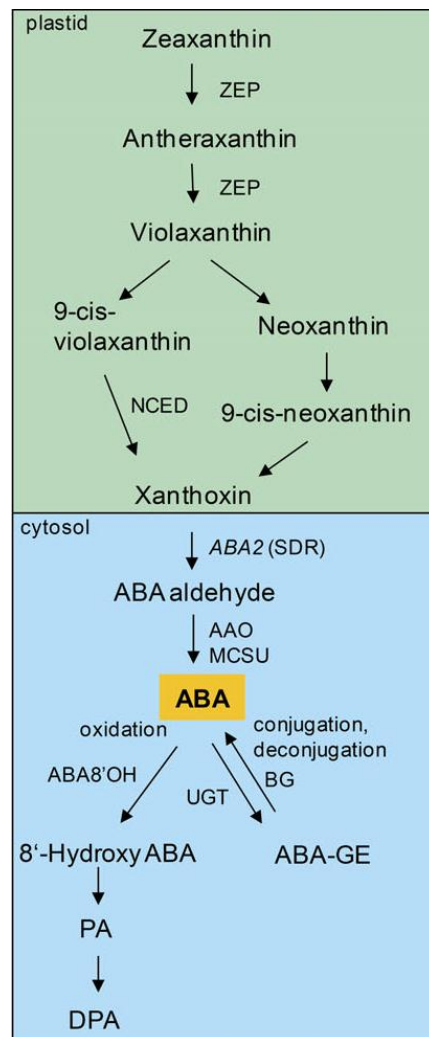


Figura 2: Esquema de los pasos de biosíntesis y degradación de ABA (Seiler y col. 2011).

Otros intermediarios en las rutas de señalización son factores transcripcionales. Entre ellos destacan algunos genes *ABA INSENSITIVE (ABI)*, como *ABI3* y *ABI5* que codifican para factores transcripcionales de la familia B3-domain y basic leucine zipper- (bZIP) domain, respectivamente. El gen *ABI3* y el gen de maíz *VIVIPAROUS1 (VP1)* son ortólogos (Suzuki y col. 2001). En cebada se describió que los genes *HvABI5* y *HvVP1* intervienen en la inducción por ABA de la expresión de genes como *HVA1* y *HVA22* (Cassaretto y Ho 2003). Entre los miembros de la subfamilia de factores transcripcionales B3-domain se incluyen dos miembros de la familia de reguladores *LEAFY COTYLEDON* que controlan la maduración de los embriones: *FUSCA3 (FUS3)* y *LEAFY COTYLEDON2 (LEC2)*. Sólo una subfamilia de factores transcripcionales se ha asociado a la respuesta por ABA entre los que se encuentra el gen *ABI5*. También se ha descrito que *ABI5* regula la expresión de genes *LEA (LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT)* en *Arabidopsis* (Finkelstein y Lynch 2000).

1.8.2.4. Genes asociados al efecto inductor de los ovarios

Uno de los factores esenciales para inducir la embriogénesis de la microspora en trigo y obtener plantas verdes, es el uso de medios preacondicionados con ovarios o el co-cultivo con ovarios (Mezja y col.1993, Hu y Kasha 1997, Zheng y col. 2002). Aunque no se sabe la naturaleza de los compuestos que son liberados al medio por los ovarios, Letarte y col (2006) propusieron que podrían ser proteínas de tipo arabinogalactanos (AGPs). Los AGPs son glicoproteínas de la pared celular de plantas que intervienen en diferentes procesos biológicos entre los que se encuentran la división, expansión y proliferación celular, síntesis de la pared celular, muerte celular programada, formación de patrones de desarrollo del embrión, procesos de la reproducción como la guía del tubo polínico a través del estigma, procesos de incompatibilidad del polen, y formación de la semilla (Majewska-Sawka y Nothnagel 2000, van Hengel y col. 2002, Seifer y Roberts 2007, Nguema-Ona y col. 2012, Tryfona y col. 2012).

Letarte y col (2006) demostraron que el uso de Larcoll (AGP) y goma arábiga (AG) en presencia de ovarios disminuyeron la mortalidad de las microsporas y estimularon el desarrollo de estructuras embriogénicas en trigo. Por otro lado, se han identificado diferentes AGPs en medio preacondicionado con microsporas de cebada y maíz (Paire y col. 2003, Borderies y col. 2004), así como la estimulación de la embriogénesis zigótica de maíz mediante el uso de medio preacondicionado con microsporas de cebada (Paire y col. 2003).

También se ha descrito que la expresión de estas proteínas es esencial para el desarrollo de embriones derivados de microsporas de *Brassica* (Tang y col. 2006, El-Tantawy y col. 2013), y en embriogénesis somática en diferentes especies como zanahoria, maíz, *Cichorium*, roble, *Trifolium*, algodón, etc. (Chapman y col. 2000, van Hengel y col. 2002, Samaj y col. 1999, Poon y col. 2012, Pilarska y col. 2013, Mallon y col. 2013). El-Tantawy y col (2013) observaron un aumento de la expresión del gen *BnAGP Sta 39-4* en las paredes celulares de embriones derivados de la microsporas de 2 a 4 días en *Brassica*.

A pesar de toda la información que se ha adquirido durante los últimos años sobre los AGP, todavía no se conoce su función exacta (para revisión ver Seifert y Roberts 2007), ni el papel que juegan en la embriogénesis de las microsporas (El-Tantawy y col. 2013). Se ha descrito la posibilidad de que los productos de degradación de los AGPs, lípidos, oligosacáridos o proteínas podrían funcionar como moléculas de señalización. Así, se conoce que la N-Acetilglucosamina controla la embriogénesis somática en zanahoria (van Hengel y col. 2001).

Aunque los estudios llevados a cabo para identificar los compuestos inductores secretados por los ovarios se han centrado en los AGPs, el ovario constituye un órgano complejo en el que se han detectado más de 25.000 genes que se expresan en ovarios maduros al final de su desarrollo, cuando ya se han preparado para la polinización y fertilización (Tran y col. 2013). La mayoría de los genes no son específicos de ovarios, observándose una alta correlación del transcriptoma del ovario con otros transcriptomas como el de la cariósida y el estigma (Druka y col. 2006,

Davidson y col. 2011, Xu y col. 2012a). Entre los genes identificados en ovarios destaca un conjunto asociado al desarrollo de embrión zigótico (Tran y col. 2013) como el gen *BABY BOOM (BBM)* (Boutilier y col. 2002), que juega un papel importante en la embriogénesis de la microspora. También destaca un conjunto de genes asociados a mecanismos de defensa que pudieran tener un papel en las interacciones con el polen como la defensin-like *LURE* (Okuda y col. 2009) o las proteínas ricas en cisteína con papeles clave en la comunicación polen-pistilo (Higashiyama 2010), que podrían tener un papel señalizador entre ovarios y microsporas durante el co-cultivo con ovarios.

2. Objetivos

La embriogénesis de la microspora, mediante el cultivo de anteras o microsporas aisladas, es el método de producción de DHs en cereales con mayor potencialidad. Aunque los protocolos de producción de DHs mediante la embriogénesis de la microspora se han mejorado durante los últimos años, sigue existiendo un gran desconocimiento de los mecanismos moleculares que controlan este proceso.

Esta tesis doctoral tiene como objetivo principal el estudio de los mecanismos moleculares implicados en el inicio del patrón de desarrollo embriogénico de la microspora en cereales. Para abordar este objetivo se ha tomado la cebada como especie modelo, y el trigo como especie que presenta una mayor dificultad en la producción de DHs. Para cumplir este objetivo se ha planteado los siguientes subobjetivos:

- 1- Identificación y caracterización de genes que se expresan al inicio del patrón de desarrollo embriogénico de la microspora en cebada y trigo panadero.
- 2- Comparación de la expresión génica entre embriogénesis de la microspora y embriogénesis zigótica en cebada y trigo panadero.
- 3- Comparación de la expresión génica entre genotipos de distinta respuesta a la embriogénesis de la microspora en cebada y trigo panadero.
- 4- Estudio de la expresión de genes implicados en síntesis, degradación y regulación de Acido Abscísico (ABA) durante la embriogénesis de la microspora en cebada.
- 5- Identificación de genes asociados al efecto inductor de los ovarios en cultivo de anteras de trigo panadero.

3. Materiales y Métodos

3.1. Material vegetal

3.1.1. Genotipos utilizados

En cebada se utilizaron las líneas doblehaploides (DHs) DH6148, DH6183 y DH6004 obtenidas previamente a partir del cruzamiento de Igri x DH46. Igri es una variedad de invierno, considerada modelo para la embriogénesis de la microspora, caracterizada por presentar muy buena respuesta al cultivo de anteras, es decir, da lugar a un elevado número de divisiones, embriones y plantas verdes, y altos porcentajes de plantas verdes. DH46 es una línea obtenida del cruce entre Igri x Dobra. Dobra se caracteriza por tener una respuesta media al cultivo de anteras, dando lugar a un número alto de divisiones, un número medio de embriones y un número medio-bajo de plantas verdes (Chen y col. 2007a). DH46 se caracteriza por presentar un número de divisiones y embriones similar a Igri, pero un porcentaje de plantas verdes muy bajo (2.3 %) (Muñoz-Amatriaín y col. 2008).

Las líneas DH6148, DH6183 y DH6004 son líneas casi isogénicas. En cultivo de anteras las líneas DH6148 y DH6183 presentan un elevado número de divisiones, mientras que la línea DH6004 presenta un número muy bajo. Las características que diferencian a estas líneas son el elevado número de embriones y alto porcentaje de plantas verdes de la línea DH6148, el bajo número de embriones y bajo porcentaje de plantas verdes de la línea DH6183, y un número muy bajo de embriones y alto porcentaje de plantas verdes de la línea DH6004.

En trigo, se utilizaron los cultivares de primavera Pavon y Caramba. Pavon es un cultivar que ha sido ampliamente utilizado como parental de nuevas variedades, presenta una alta calidad harino-panadera y amplia adaptabilidad (Dr. Peña, CIMMYT, comunicación personal). Además este cultivar presenta una alta eficiencia de producción de plantas verdes. Caramba es un cultivar de interés agronómico en España con una calidad harino-panadera equilibrada y productividad alta, y presenta

una eficiencia media a baja de producción de plantas verdes (Soriano y col. 2007, 2008).

3.1.2. Condiciones de crecimiento de las plantas madre

Las semillas se sembraron en un sustrato compuesto por arena, vermiculita y turba (1:1:1) en un "paper-pot". Se vernalizaron en una cámara de cultivo a 4°C, con un fotoperiodo de 8/16 h luz/oscuridad, y 100 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa proporcionada por tubos fluorescentes (Mazdafluor 18W). La cebada se vernalizó durante 4 semanas y el trigo durante 5 semanas. Posteriormente, las plántulas fueron trasplantadas a macetas de 15 cm de 2,5 l con el mismo sustrato (2 plántulas/maceta) y fueron transferidas a una cámara de crecimiento a 14°C/12°C (día/noche), con un fotoperiodo de 12/12 h luz/oscuridad, y 500 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa proporcionada por lámparas de halogenuro metálico de alta presión (Philips Powertone HPI-T Plus 400 W). Después de 21 días, la temperatura se incrementó a 21-18°C (día/noche) y el fotoperiodo a 16/8 h luz/oscuridad, hasta que las espigas fueron cosechadas. La humedad relativa para ambos períodos fue del 60-65%. En el momento de la preparación del sustrato, éste se fertilizó con una combinación de N:P:K (15:15:15). Además la fertilización foliar "Zelti foliage" (Zeneca-Agro S.A.), que contiene N:P:K (20:20:20) y micronutrientes se aplicó una vez por semana durante todo el ciclo de crecimiento.

3.2. Metodología general del cultivo de anteras

3.2.1. Esterilización

Material de laboratorio: El material de vidrio, las puntas de pipeta, etc., se esterilizaron en autoclave durante 23 min a 120°C y 1 Kg/cm². El material de acero, como las pinzas y las tijeras, también se autoclavaron, y después de cada utilización se desinfectaron con etanol al 96%.

Medios de cultivo: Para evitar la posible degradación de algunos componentes termolábiles, como los azúcares, aminoácidos, reguladores de crecimiento, etc., se esterilizaron por filtración, utilizando filtros Millipore de 0,22 μm \varnothing de poro y una bomba de vacío. Otros compuestos como el gelrite, la agarosa y las sales minerales se esterilizaron en autoclave durante 23 min a 120°C y 1 Kg/cm².

Material vegetal: Las espigas envueltas en su vaina se rociaron con etanol al 96%, se dejaron secar dentro de una cámara de flujo laminar y posteriormente se sacaron de la vaina y se colocaron en placas Petri.

3.2.2. Medios de cultivo

A continuación se detalla la composición de los medios.

3.2.2.1. Medio de tratamiento de estrés

El medio de tratamiento de estrés en cebada (TEC) estaba compuesto por 0,7 M manitol, 40 mM CaCl₂ y 8 g/l agarosa Sea Plaque (Lonza) (Tabla 2). El de trigo (TET) se componía de 0,7 M manitol, 40 mM CaCl₂, los macronutrientes del medio FHG (Hunter 1987) y 8 g/l agarosa Sea Plaque (Lonza) (Tabla 2).

Tabla 2: Composición de los medios de tratamiento de estrés de cebada (TEC), y de trigo (TET).

Componente	TEC mg/l	TET mg/l
Manitol	127.500	127.500
KNO ₃	-	1900*
NH ₄ NO ₃	-	165*
KH ₂ PO ₄	-	170*
CaCl ₂ 2H ₂ O	5.880	5.880
MgSO ₄ 7H ₂ O	-	370*
Agarosa Sea Plaque	8.000	8.000

*macronutrientes de FHG (Hunter 1987)

3.2.2.2. Medio de inducción de embriogénesis

En cebada se utilizó el medio de inducción FHG (Hunter 1987), el cual es una modificación del medio MS (Murashige y Skoog 1962) que contiene una alta concentración de glutamina y un reducido aporte de nitrato amónico, y la sacarosa ha sido remplazada por maltosa. El medio está suplementado con 0,4 mg/l de tiamina y 1 mg/l de 6-bencilaminopurina (BA) y 200 ó 400 g/l de Ficoll tipo 400 (FHGI) (Tabla 3).

En trigo se utilizó una modificación del medio MMS3 (medio MS modificado por Hu y Kasha (1997), en el que se ha reducido el nitrógeno inorgánico y se ha incorporado nitrógeno orgánico en forma de glutamina, y la sacarosa ha sido remplazada por la maltosa. El medio esta suplementado con diferentes vitaminas, 1 mg/l de BA y 1 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 200 ó 400 g/l de Ficoll tipo 400 (MMS3M) (Tabla 3).

Tabla 3: Composición del medio de inducción de la embriogénesis en cebada (FHGI) y trigo (MMS3M).

Componentes del medio	FHGI CEBADA mg/l	MMS3M TRIGO mg/l
Macronutrientes		
KNO ₃	1.900	1.400
NH ₄ NO ₃	165	300
KH ₂ PO ₄	170	170
CaCl ₂ 2H ₂ O	440	440
MgSO ₄ 7H ₂ O	370	370
Micronutrientes		
MnSO ₄ 4H ₂ O	22,3	22,3
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8,6	8,6
H ₃ BO ₃	6,2	6,2
KI	0,83	0,83
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0,25	0,25
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,025	0,025
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025	0,025
Hierro		
FeNa ₂ EDTA	40	40
Vitaminas		
Tiamina HCl	0,4	0,4
Piridoxina HCl	-	0,5
Acido Nicotínico	-	0,5
Biotina	-	0,25
Acido Ascórbico	-	0,5
Pantetonato de Calcio	-	0,25
Aminoácidos		
Glutamina	730	500
Glicina	-	1
Reguladores de Crecimiento		
BA	1	1
2,4 D	-	1
Otros Componentes		
Mio-Inositol	100	100
Maltosa	62.000	62.000
	2x10 ⁵	2x10 ⁵
Ficoll	ó	ó
	4x10 ⁵	4x10 ⁵
pH	5,8	5,8

3.2.2.3. Medio pre-acondicionado con ovarios

Este medio se utilizó sólo para el cultivo de anteras de trigo. Los ovarios se obtuvieron de espigas que contenían microsporas en estado binucleado tardío (Figura 3c). Para evitar contaminaciones las espigas se cubrieron con una bolsa de plástico estéril cuando todavía estaban dentro de la vaina (Figura 3a). Las espigas se recogieron a los 4 ó 5 días después de ser embolsadas (Figura 3b).

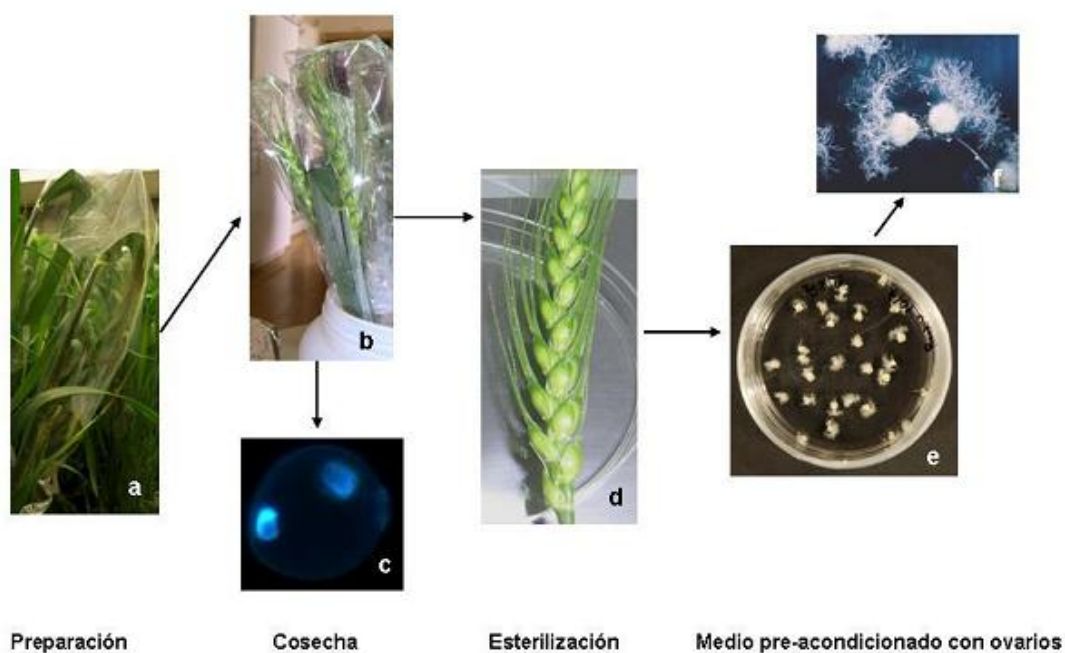


Figura 3: Preparación de medio pre-acondicionado con ovarios. a) Espiga embolsada. b) Cosecha de las espigas. c) Microspora en estado binucleado tardío (tinción con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol diclorohidrato). d) Espiga esterilizada. e y f) Medio preacondicionado (0 y 5 días, respectivamente).

Las espigas se esterilizaron como se indica en el apartado 3.2.1 (Figura 3d). Los ovarios se extrajeron de la flor bajo una lupa binocular con ayuda de unas pinzas. Para evitar variaciones debidas al estado fisiológico de los ovarios, se prepararon 8 ml de medio MMS3M con 200 g/l de Ficoll en placas de 6 cm Ø y se inocularon 32 ovarios procedentes de 1 ó 2 espigas diferentes (Figura 3e). Este medio se incubó en

la oscuridad durante 5 días a 24°C (Figura 3f). El medio y los ovarios procedentes de la misma placa de 6 cm Ø se repartieron entre todas las placas de 3 cm Ø de la misma réplica (8 ovarios/placa).

3.2.2.4. Medio de cultivo de regeneración de plantas

En cebada se utilizó el medio de regeneración FHGR (Tabla 4). Este medio es similar al FHGI con pequeñas modificaciones que son: eliminación de la glutamina, reducción de la concentración de maltosa a la mitad, incorporación de 0,5 mg/l de la auxina ácido indolacético (IAA), y la utilización de 3 g/l de Gelrite como agente solidificante.

En trigo se utilizó el medio de regeneración J25-8, descrito por Jensen (1983) (Tabla 4) para la regeneración de embriones de cebada obtenidos del cruzamiento interespecífico *Hordeum vulgare* x *H. bulbosum*. En comparación con el medio FHGR, el medio J25-8 es un medio rico, con elevado aporte de macronutrientes, aminoácidos y vitaminas, y carece de reguladores de crecimiento. Además, la maltosa del medio FHGR ha sido sustituida por sacarosa y glucosa en el medio J25-8. Por otro lado, este medio contiene carbón activo para inhibir los fenoles.

Tabla 4: Composición del medio de regeneración de plantas de cebada (FHGR) y trigo (J25-8).

Componentes del medio	FHGR CEBADA mg/l	J25-8 TRIGO mg/l
Macronutrientes		
KNO ₃	1.900	2.200
NH ₄ NO ₃	165	600
KH ₂ PO ₄	170	150
CaCl ₂ 2H ₂ O	440	295
MgSO ₄ 7H ₂ O	370	310
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	-	75
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	67
Micronutrientes		
MnSO ₄ 4H ₂ O	22,3	6,6
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8,6	5
H ₃ BO ₃	6,2	3
KI	0,83	-
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0,25	0,25
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,025	0,025
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025	0,025
Hierro		
FeNa ₂ EDTA	40	40
Vitaminas		
Tiamina HCl	0,4	10
Nicotinamida	-	1
Piridoxina	-	1
Aminoácidos		
Glutamina	-	120
Asparagina	-	50
Treonina	-	25
Arginina	-	25
Prolina	-	50
Reguladores de Crecimiento		
BA	1	-
IAA	0.5	-
Otros Componentes		
Mio-Inositol	100	100
Acido málico	-	100
Leche de coco	-	25*
Caseína	-	125
Carbón activo	-	4.000
Maltosa	31.000	-
Sacarosa	-	20.000
Glucosa	-	7.000
pH	5,8	5,8
Fitagel	3.000	3.000

*ml/l

3.2.3. Cosecha de la espiga: estado de desarrollo de la microspora y mantenimiento de las espigas

Estado de desarrollo de la microspora: Se cosecharon espigas que contenían microsporas en estado de desarrollo uninucleado medio a tardío. El estado de desarrollo de la microspora se determinó mediante tinción con el fluorocromo (4',6-diamidino-2-fenilindol diclorohidrato) DAPI (Vergne y col. 1987). Se preparó una solución stock de 4 µg/ml, se alicuotó y se conservó a -20°C.

Se tomaron 2 ó 3 anteras de las flores centrales de una espiga, se colocaron en un porta sobre una gota de manitol 0,3 M y se cortaron en varios trozos con un bisturí para facilitar que salieran las microsporas fuera de la antera. Se añadieron aproximadamente 3 µl de la solución stock de DAPI y se cubrieron con un cubre. Se observaron los núcleos en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse T300 con luz ultravioleta (330-380 nm).

Para cada tanda de plantas, en el momento de la recogida del material vegetal se estableció una correlación entre el estado de desarrollo de las microsporas y caracteres morfológicos, que fueron distintos según la especie. En cebada se utilizó la longitud de las barbas que sobresalían de la hoja bandera (2-4 cm. aproximadamente), y en trigo se utilizó la distancia existente desde el extremo superior de la espiga hasta la base de la hoja bandera (1-2 cm). Esto permitía recoger las espigas en el estado de desarrollo adecuado para el cultivo de anteras y desechar las espigas en estadios más tempranos o más tardíos.

Mantenimiento de las espigas: En cebada, las espigas esterilizadas se sacaron de la vaina y se colocaron en placas Petri de 9 cm Ø que contenían una gota de agua. Las placas se cerraron con Parafilm y se almacenaron en una nevera a 4°C durante 2-3 días hasta su posterior uso.

En trigo las espigas se conservaron 4°C envueltas en su vaina, en un recipiente con agua durante 2 a 5 días, y posteriormente se esterilizaron y se inocularon en el medio de cultivo.

3.2.4. Tratamiento de estrés

Las anteras fueron extraídas de la flor bajo un microscopio estereoscópico con la ayuda de pinzas, y se inocularon en los medios TEC (cebada) y TET (trigo) (Tabla 2). Las placas se cerraron con Parafilm y se incubaron en oscuridad a 24°C durante 4 y 5 días en cebada y trigo, respectivamente.

3.2.5. Cultivo de anteras

En cebada, después de los 4 días de tratamiento de estrés, se inocularon 20 anteras en placas Petri de 3 cm Ø con 2 ml de FHGI con 200 g/l de Ficoll (Tabla 3). En trigo, después de los 5 días de tratamiento de estrés, se inocularon 30 anteras en placas Petri de 3 cm Ø que contenían 2 ml de medio MMS3M con 200 g/l de Ficoll (Tabla 3) pre-acondicionado con ovarios, como se indica en el apartado 3.2.2.3.

Las placas Petri se cerraron con Parafilm y se incubaron en una cámara de cultivo a 24°C en oscuridad. Después de 10 a 12 días de cultivo se añadieron 2 ml de medio FHGI y MMS3M con 400 g/l de Ficoll en cebada y trigo, respectivamente.

3.2.6. Cultivo de microsporas

a. Aislamiento de las microsporas

Homogeneización: Después del tratamiento de estrés, las anteras se colocaron en un vaso de precipitados con 5 ml de manitol 0,3 M (54,6 g/l de manitol en H₂O destilada, esterilizado por filtración). Posteriormente, las anteras en el manitol se trasladaron a un homogeneizador de vidrio. El émbolo se giró varias veces con suavidad para la

homogenización. Con el fin de separar los restos de las paredes de la antera de las microsporas, el homogeneizado resultante se filtró a través de una malla de 100 μm \varnothing de poro, y las microsporas se recogieron en un tubo de centrifuga estéril de 15 ml (Sterilin).

Separación de microsporas viables sobre banda de maltosa. Se añadió solución de manitol 0,3 M a la suspensión de microsporas hasta un volumen de 15 ml. Posteriormente se centrifugó durante 5 min a 100 g y se eliminó el sobrenadante. Las microsporas se resuspendieron en 1,5 ml de manitol 0,3 M y se colocaron cuidadosamente sobre 5 ml de maltosa al 20%. Tras una centrifugación de 5 min a 100 g las microsporas viables permanecieron en la fase superior sobre la banda de maltosa, mientras que las no viables quedaron en el fondo del tubo. Se recogieron las microsporas viables cuidadosamente con una pipeta Pasteur y se trasladaron a un nuevo tubo.

Lavado. Con el fin de eliminar los restos de maltosa, a las microsporas recogidas sobre la banda de maltosa se añadió manitol 0,3 M hasta un volumen de 15 ml, se centrifugó (5 min, 100 g) y se descartó el sobrenadante. Las microsporas se resuspendieron en 1 ml de medio MMS3M líquido (Tabla 3).

b. Cultivo de las microsporas

Las microsporas se inocularon en placas Petri de 3 cm \varnothing con medio FHGI con 100 g/l de Ficoll en cebada, o MMS3M con 100 g/l de Ficoll (Tabla 3) pre-acondicionado con ovarios en trigo, como se indica en el apartado 3.2.2.3. Las microsporas se contaron en una cámara de Neubauer. Se ajustó el volumen de medio para conseguir una densidad de 100.000 microsporas/ml. Aproximadamente 10 días después de haber inoculado las microsporas, se añadió el mismo volumen del mismo medio fresco con 300 mg/l de Ficoll (Tabla 3) a cada placa.

3.2.7. Regeneración de embriones

Los embriones de buena calidad, con eje embrionario bien diferenciado, desarrollados en el medio de inducción de embriogénesis fueron transferidos al medio de regeneración (FHGR y J25-8 en cebada y trigo, respectivamente) (Tabla 4) después de 25 a 30 días de cultivo.

Se inocularon alrededor de 25 embriones en cada placa de 6 cm Ø, que contenía 10 ml de medio. Las placas Petri se cerraron con Parafilm y se incubaron en una cámara de cultivo a 24°C, en oscuridad durante los 2 primeros días. Posteriormente se transfirieron a la luz con un fotoperiodo de 16 h y una intensidad luminosa de 100 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ proporcionada por lámparas fluorescentes-incandescentes (Mazdafluor TF 58W/LJ 54-Philips 25 W), y 70-80 % de humedad relativa.

3.3. Caracterización morfológica

3.3.1. Caracterización citológica del cultivo de anteras

En cebada se tomaron las anteras de las líneas DH6148 y DH6183 a los 4 días de inducción por estrés (4di), y a los 4, 8 y 12 días de cultivo de anteras (4dc, 8dc y 12dc), y en trigo se tomaron las anteras de los cultivares Pavon y Caramba a los 5 días de inducción por estrés (5di), y a los 5, 10 y 15 días de cultivo de anteras (5dc, 10dc y 15dc).

Las anteras se fijaron durante 3 h a temperatura ambiente en el fijador Karnovsky (4% de paraformaldehído y 0,25% de glutaraldehído en un tampón de cacodilato 0,1 M, pH 7.2). A continuación se hizo un cambio a fijador fresco y se dejó toda la noche a 4°C. Después de la fijación las muestras se lavaron tres veces en tampón cacodilato 0,05 M a 4°C durante 30 min, se deshidrataron durante 1 h a 4°C en cada serie de etanol de 30, 50 y 70%. Se realizó la inclusión a 4°C en Unicryl siguiendo los siguientes pasos: 1 h en etanol de 90%, tres veces en etanol absoluto

durante 1 h, etanol absoluto:unicryl (3:1) durante 3 h, etanol absoluto:unicryl (1:1) durante toda la noche, etanol absoluto:unicryl (1:3) durante 3 h, unicryl puro durante 3 h, unicryl puro durante toda la noche y unicryl puro durante 3 h. La polimerización se realizó bajo luz ultravioleta a -20°C durante 44 h.

Se realizaron cortes de 1 µm utilizando un microtomo RM2164 (Leica). Los cortes se tiñeron con 0,05% de azul de toluidina. Para observar los cortes se utilizó un microscopio Zeiss Axioplan y las imágenes fueron capturadas con una cámara digital CCD.

3.3.2. Caracterización morfológica *in vivo* del cultivo de microsporas aisladas

En cebada la caracterización morfológica de las microsporas aisladas a lo largo del cultivo se realizó *in vivo* con un microscopio Nikon Eclipse T300 a 100 y 200 aumentos, y una cámara digital Nikon DS-U2, a los 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 16 días después de ser transferidas al medio de cultivo (1dc, 2dc, 4dc, 6dc, 8dc, 12dc y 16dc).

En trigo la caracterización morfológica de las microsporas aisladas se realizó de la misma forma que en cebada a los 1, 3, 5, 7, 10, 15 y 20 días después de ser transferidas al medio de cultivo (1dc, 3dc, 5dc, 7dc, 10dc, 15dc y 20dc). Todas las imágenes fueron adquiridas y procesadas usando el software NIS-Elements D 3.2 y Adobe Photoshop CS4.

3.4. Estudios de expresión génica

3.4.1. Recogida de muestras

En cebada para el estudio de la expresión de genes en las primeras fases de la embriogénesis de la microspora se tomaron tres réplicas biológicas de anteras de la línea DH6148 de cebada a los 0, 2 y 4 días de inducción por estrés (0di, 2di y 4di), y a los 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 16 días de cultivo de anteras (1dc, 2dc, 4dc, 6dc, 8dc, 12dc y

16dc). Para estudiar la expresión de los genes en las fases tempranas de la embriogénesis zigótica, se tomaron ovarios maduros (ov), carióspside a los 1, 2, 4, 6 y 8 días de desarrollo después de la fecundación (c1d, c2d, c4d, c6d y c8d), embrión aislado a los 10 y 12 días después de la fecundación (e10d y e12d), raíz (r) y hoja de plántula (h) de la línea DH6148 de cebada. Para comparar la expresión génica en tres líneas de distinta respuesta a embriogénesis de la microspora en cebada se tomaron también anteras de las líneas DH6183 y DH6004 a los 0 y 4 días de inducción por estrés (0di y 4di), y a los 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 16 días de cultivo de anteras (1dc, 2dc, 4dc, 6dc, 8dc, 12dc y 16dc).

En trigo se tomaron anteras de los cultivares Pavon y Caramba a los 0 y 5 días de inducción por estrés (0di y 5di), y a los 5, 10, 15 y 20 días de cultivo de anteras (5dc, 10dc, 15dc y 20dc). Para estudiar la expresión de los genes en las fases tempranas de la embriogénesis zigótica, se tomaron ovarios maduros (ov), carióspside a los 2, 4, 6 y 8 días de desarrollo después de la fecundación (c2d, c4d, c6d y c8d), embrión aislado a los 10, 12 y 14 días después de la fecundación (e10, e12 y e14), endospermo aislado a los 10, 12 y 14 días después de la fecundación (en10, en12 y en14), raíz (r) y hoja de plántula (h) del cultivar Pavon.

Para el estudio de identificación de genes asociados al efecto inductor de la embriogénesis de los ovarios en cultivo de anteras de trigo, se tomaron tres replicas biológicas de ovarios frescos (0dc), y a los 5, 10, 15 y 20 días de inoculación en el medio de cultivo (5dc, 10dc, 15dc y 20dc) de ovarios jóvenes y maduros (correspondientes a estadio de la microspora uninucleada media a tardía y binucleada tardía, respectivamente) de los cultivares Pavon y Caramba.

De cada uno de los estadios de desarrollo se tomaron muestras de 50 mg aproximadamente, que correspondían a 400-500 anteras, 4-6 carióspsides, 10-12 embriones y 4-6 endospermos. Para las muestras de ovarios se tomaron 15 ovarios jóvenes aproximadamente, y 6 ovarios maduros. Todas las muestras se congelaron en N₂ y se conservaron a -80°C para el posterior aislamiento de RNA.

3.4.2. Aislamiento de RNA

Todo el material utilizado se esterilizó en autoclave durante 40 min a 120°C y 1 kg/cm². Los reactivos se prepararon con agua ultrapura (MilliQ, Millipore) tratada para la eliminación de RNasas. Para ello, se tomaron 1000 ml de agua ultrapura se añadió 1 ml de DEPC (dietilpirocarbonato 97% NMR), se agitó durante al menos 2 h y se autoclavó durante 40 min con las condiciones descritas anteriormente (agua DEPC). Esta agua se utilizó para preparar etanol al 75% y 80%, la disolución final del RNA extraído, la preparación de los geles de agarosa para análisis de RNA y la preparación del tampón TBE 0,5x.

3.4.2.1. Homogenización de las muestras

Para la homogenización se utilizó el Molino Mezclador MM 301 RETSCH y el Kit criogénico. Los tubos Eppendorf de 1,5 ml que contenían las muestras congeladas a -80°C se colocaron en el bloque criogénico, que se mantuvo sumergido en N₂. A cada tubo Eppendorf se añadieron 3 bolitas de acero inoxidable de 3 mm. Los bloques se acoplaron al molino para la homogenización. Las muestras de anteras, raíz y hoja se trituraron durante 4 min a 3.000 rpm y las de ovarios 8 min a 3.000 rpm. Las muestras de mayor dureza como las de cariósido y endospermo se homogenizaron en morteros. Posteriormente todas las muestras se mantuvieron en N₂.

3.4.2.2. Extracción de RNA mediante Trizol

Para la extracción de RNA se siguió el procedimiento de Trizol® (Invitrogen). Este compuesto es una solución monofásica de fenol que contiene un inhibidor de RNasas (isotiocianato de guanidina) y otros componentes que facilitan el aislamiento de RNA. Trizol® mantiene la integridad del RNA debido a la inhibición de la actividad RNasa mientras disuelve los componentes de la célula durante la homogenización de la muestra. Se siguieron las indicaciones de la casa comercial.

A cada tubo Eppendorf con las muestras homogenizadas se agregaron 500 µl de Trizol® en una campana de extracción de gases, y se agitó suavemente por inversión del tubo. Las muestras se incubaron en un bloque seco (AccuBlock Digital Dry Bath de Labnet) durante 5 min a 60°C para permitir la completa disolución de los complejos nucleoprotéicos. A continuación se realizaron los siguientes pasos:

- a. **Separación de fases:** Se añadieron 100 µl de cloroformo en una campana de extracción de gases y se agitaron fuertemente los tubos durante 15 s. Se incubaron 3 min a T^a ambiente, y posteriormente se centrifugaron a 12.000 rpm en la centrífuga Biofuge Primo R de Heraeus a 4°C durante 15 min. Se extrajo cuidadosamente la fase superior y se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf. Además se repitió otro paso de limpieza del RNA a las muestras de ovarios y endospermo.

- b. **Precipitación de ácidos nucleicos:** Se añadieron 250 µl de propanol a cada muestra (en una campana de extracción de gases) y se mezcló suavemente por inversión del tubo. Las muestras se incubaron 10 min en hielo y posteriormente se centrifugaron a 12.000 rpm a 4°C durante 10 min.

- c. **Lavado:** Se desechó el sobrenadante y se añadieron 500 µl de etanol al 75% en agua DEPC. El pellet se separó del fondo del tubo Eppendorf utilizando un vortex y se centrifugaron a 7.500 rpm a 4°C durante 6 min.

- d. **Redisolución:** Se desechó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado durante 5 min a T^a ambiente. Se añadieron 100 µl de agua DEPC, se agitó en un vortex para resuspender el precipitado, se centrifugó 10 s en una microcentrífuga (Biofuge Pico de Heraeus), y posteriormente se incubó en un bloque seco a 60°C durante 10 min para la completa disolución del RNA.

e. **Medición y visualización del RNA:** La calidad y cantidad del RNA se determinó utilizando el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Para cada muestra se midieron los valores de concentración del RNA en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y la relación de absorbancia a 260/280 que indica la pureza del RNA, la cual debe estar entre 1,7 y 1,9. Se comprobó el estado del RNA mediante electroforesis en gel de agarosa (MS-12 Conda), utilizando las condiciones óptimas para evitar la degradación del RNA. La electroforesis en gel de agarosa es un método que separa macromoléculas tales como ácidos nucleídos y proteínas en función del tamaño y la carga eléctrica. Se añadió bromuro de etidio (BrEt) a la muestra para la visualización del RNA (Tabla 5). La electroforesis se efectuó a 100 V en el equipo E300 de Pharmacia Biotech, durante 20 min. Para visualizar el gel se utilizó el programa Quantity One 4.6.7 en el trasiluminador de luz ultravioleta del Gel Doc 2000 de Bio Rad.

Tabla 5: Composición del gel de agarosa y de la muestra, utilizados para la electroforesis de RNA.

Gel de agarosa 1.2 %	Agarosa	0,7 g
	TBE (0,5x en H ₂ O DEPC)	60 ml
Muestra	RNA (2,5 μg totales)	x μl *
	Tampón de muestra	3 μl
	BrEt 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1 μl
	H ₂ O DEPC	x μl *
	Volumen total	15 μl

x μl * (depende de la concentración de RNA de cada muestra)

3.4.3. Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se realizaron previamente dos tratamientos de la muestra de RNA:

a. **Tratamiento con DNasa:** Se tomaron 10 μg de RNA y se diluyeron a un volumen total de 100 μl con agua DEPC en tubos Eppendorf de 1,5 ml. Se añadió 1 μl

de DNasa (10u/μl de Roche) a cada muestra para eliminar las posibles contaminaciones con DNA, y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 s. Se incubó en un bloque seco (AccuBlock Digital Dry Bath de Labnet) 10 min a 37°C, y posteriormente 15 min a 65°C, para la inactivación de las DNasas.

b. Limpieza del RNA mediante el kit "RNA MiniElute": Se utilizó el kit "RNeasy MinElute Cleanup Kit (50)" de Quiagen para purificar y concentrar el RNA, y se siguió el protocolo descrito en las especificaciones del kit.

A los 100 μl de muestra de la fase anterior se añadieron 350 μl de tampón RLT, se mezclaron y se añadieron 250 μl de etanol absoluto y se volvieron a mezclar. A continuación los 700 μl se depositaron sobre una columna contenida en un tubo colector de 2 ml (Spin Column-KIT) y se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 s. Se transfirió la columna a otro tubo colector de 2 ml, se añadieron 500 μl de tampón RPE y se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 s. Seguidamente se eliminó el fluido resultante del tubo colector y se añadieron a la columna 500 μl de etanol al 80% en agua DEPC, y se centrifugó a 10.000 rpm durante 2 min. La columna se transfirió a otro tubo colector de 2 ml, se abrió la tapa de la columna y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min. Posteriormente la columna se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se añadieron 10 μl de agua libre de RNasa directamente en el centro de la membrana. Se cerró el tubo y se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 min. Finalmente se repitió la operación con otros 10 μl de agua libre de RNasa (volumen final 20 μl).

c. Síntesis de cDNA: Se utilizó el Kit "M-MLV RT Reverse Transcriptase" de Promega para transcribir el RNA a cDNA. A cada tubo Eppendorf que contenía los 20 μl de RNA obtenidos en el paso anterior, se añadió 1 μl de oligo DT (Oligo (dT)₂₀ Primer) de Invitrogen, el cual es una cadena corta de 20 nucleótidos con base timina que hibrida con la cola Poly(A) de mRNA y que se utiliza como cebador. Se incubó a 70°C durante 10 min en un bloque seco (AccuBlock Digital Dry Bath de Labnet). Se

preparó la mezcla de la reacción para la síntesis de cDNA en un volumen final de 30 μ l tal como se detalla a continuación (Tabla 6).

Tabla 6: Composición de la mezcla de la reacción para síntesis de cDNA.

H ₂ O DEPC 16,7 μ l	x N ^o reacciones	=	μ l H ₂ O DEPC
Tampón RT 5x 10 μ l	x N ^o reacciones	=	μ l Buffer RT
dNTPs (20mM) 1,8 μ l	x N ^o reacciones	=	μ l dNTPs
Inhibidor de RNasa 0,5 μ l	x N ^o reacciones	=	μ l Inhibidor de RNasa
RT (transcriptasa reversa) (200 u/ μ l) 1 μ l	x N ^o reacciones	=	μ l RT

Las características y casa comercial de cada reactivo son las siguientes: dNTPS (DNA Polymerization Mix, 20 mM) de Amersham Biosciences e Inhibidor de RNasa (Protector RNasa Inhibitor, 40 u/ μ l) de Roche. A cada muestra se añadieron 30 μ l de la mezcla de la reacción, se centrifugó 10 s, y se incubó 1 h a 42°C en un bloque seco (AccuBlock Digital Dry Bath de Labnet). Se realizó una determinación aproximada de la calidad y cantidad del cDNA utilizando el equipo Nanodrop 2000. Para cada muestra se midieron la concentración de cDNA en μ g/ μ l, y la relación de absorbancia 260/280 que indica la pureza del cDNA, la cual debe estar entre 1,7 y 1,9.

d. Dilución del cDNA: Las muestras de cDNA se diluyeron con agua MilliQ estéril a una concentración de 5 μ g/ μ l para las PCR-semicuantitativas y una dilución de 1:5 para las qRT-PCR.

3.4.4. Amplificación de genes mediante PCR-Semicuantitativa

Se diseñaron los pares de cebadores correspondientes a los genes seleccionados y posteriormente se realizó la amplificación de estos genes mediante PCR-Semicuantitativa. Esta técnica permite estimar la cantidad de cDNA inicial, obteniendo un gran número de copias de un fragmento de DNA. Para ello, se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas que permiten desnaturalizar el DNA, la unión de los cebadores y la síntesis de nuevo DNA en cada ciclo.

3.4.4.1. Diseño de Cebadores

Para diseñar los cebadores utilizados en cebada y trigo se partió de las secuencias consenso de cDNA correspondientes a los genes a estudiar, contenidas en el programa HarvEST Barley v. 1.74 (Apartado 3.5.1). En trigo se buscaron las secuencias homólogas a las de cebada en el programa HarvEST Wheat v. 1.59 y en las bases de datos blastx-NCBI, cerealsDB y Fasta-EMBL-EBI (Apartado 3.5.1). Se diseñaron los cebadores para PCR-Semicuantitativa mediante el programa PrimerQuestSM (“IDT-Integrated DNA Technologies”), (<http://eu.idtdna.com/SCITOOLS/Applications/PrimerQuest/Default.aspx>).

PrimerQuestSM es una modificación del programa Primer3, que había sido desarrollado por el Instituto de Investigación Biomédica “Whitehead”. Este programa permite el diseño de cebadores para todo tipo de PCR, teniendo en cuenta, además de los criterios básicos, los riesgos de formación de bucles y dimerización entre cebadores.

Para el diseño de los cebadores, se tuvieron en cuenta los siguientes criterios básicos:

- a. La longitud de los cebadores debe ser de 18-24 pb.
- b. La T_m (temperatura de fusión) debe estar entre 55-63°C. La diferencia de T_m entre los dos cebadores no debe ser superior a 5°C.
- c. El contenido de GC debe estar entre 45-55%, teniendo en cuenta que las últimas cinco bases no tengan más de dos GC.
- d. Un aspecto importante es evitar la complementariedad de bases en y entre los cebadores, para que no se formen bucles y evitar la formación de dímeros.
- e. La longitud óptima del amplicon resultante debe estar entre 250 y 300 pb.

Los cebadores diseñados fueron sintetizados por Invitrogen (Tabla 7). Se preparó una solución stock de 200 µM y una dilución final de 20 µM en H₂O DEPC.

Tabla 7. Secuencias de los pares de cebadores diseñados para PCR-Semicuantitativa en cebada y trigo, diseñadas con el programa PrimerQuestSM. Secuencias de los pares de cebadores de los genes constitutivos utilizados como control.

Probe set	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
Cebada		
HS17D15r_s_at	TGGGCTAAGGCGAACCTGAA	TTCTTGGGACTGACGACGAT
HK06N02r_s_at	TGACACCAAAGCTCGTGTGATG	TCGTTGAGGAAGGCCGAGTT
Contig4506_at	AAGTGCTGCTGTTGTGGTCGT	TCGGTGCAGGTGTTGGTGAT
Contig3480_at	CCCTGTCTCGCCAACAAGTC	GCCACTACCTAGCGGCAGAT
Contig21354_at	GCATACGCGCCAGGAAATAG	TCGATCGATGGTGCTCCAT
Contig22553_at	GCTCAAACGCTCCAACCTCGTA	ATGGTCCACAACACACAGGT
Contig17489_at	AATGCACTGGAGCCCAACAC	CGAGCATTGCCACGAACTC
Contig19759_at	CACAGAGGGTTACTGACCTA	GCAGCTTCAGCGATCATCATA
Contig7855_s_at	TGCAGCCATCCTGATACTGATGC	TTGGTGCAGACGGTGCTGTT
Contig12818_at	ACTGTTGCTTCTCGCCGTTT	AGCGATCTTCATGCCTTGCT
HA04g14r_at	AATGCCCGACACACATTGCT	TAATCCGCGAAGTGGGACCAA
Contig23976_at	TGCATGAAGAAGCACACGGAAC	GCTGCCGCGATTATCTTTAGTGA
Contig13064_at	GGAGTTCGTCGAGAGGTACGA	AGCCAGCCTAAACCAAACA
Contig14215_at	TCAAGAGGGAGGAGGTGAAG	ACAAGCAGTACCCGATGGAT
Contig775_x_at	ATTGCCGTTAGTTGTGTCAGC	ACGCTAGAGGAGGAAATGTGT
Contig4058_s_at	TTCTGACACCGTGCAAGCAGTT	TGCTTCTCAACGCGGAACATGA
<i>ECA1</i>	TCATGCTGTCCGTCAATCGGGTTC	TGCTGGGGTTAGCAACTACTCGC
<i>HvPG1</i>	GACAGAAATGGCGTTCAAGAACGT	AGCAAAGTTGCCTCCAGCTTGAT
<i>Hv-Actin2</i>	GGCTGACGGTGAGGACATCCAG	GCTCATTGTAGAAAGTGTGATGCCAG
<i>EF-1α</i>	GGCTGTCAAGGATCTCAAGC	AACTATCGCCACCACCAAAC
Trigo		
TaAffx.3154.1	AAGTTTCAGCGTCTTCCTCGCT	TCGATGCAGGTGTTGGTGAAC
Ta.9528.1	TGCTCTCCATCCTCTGTGTC	GGGATGTGGACCTTGAAGAAGT
Ta.1775.1 / Ta.30944.1	CGGCAAAGCTGACGAATCTGTT	ACTTCTCTGCCTTCTTTCCGAACC
Ta.303.2	GCGGAATCGAAGAATTAGCAATGG	AAGGTGAACGGGATGTGGTT
Ta.5024.1	AGTAGCACACTCCTGGTCAT	AACGCTTCTTAGGGCTCGT
Ta.21342.1	TTCAAAGACGGCGTTGTGGTTCT	TGGTTGTAGCAGTCCAGGTTGT
Ta.28319.1	AACGCCCTTACCAGGTCCCTT	ACGTTGGTGAACCTGGCTCGTGT
Ta.10047.1	AGGCAAGATGATGTCCGGCTTTG	GCATGGTATTGCTTCGCGTTCA
Ta.1839.1	TGCAGGAGGACTTCAACCG	TTGTACCCGCCGTAGAGGA
Ta.6411.1	TCTTGAGAAAGGAGCTGAGGTT	CGTTGTTAGCGAGGTGGAT
Ta.13785.1	GGCTCTGGAACCTTCAACAAGGACT	TTTGGGTGAACGTAACCGACCT
Ta.18801.1	AACACTTGCCCGTCTCATCTGGT	ACGTCCTGGTGATGGTGTACGA
Ta.7773.1	ACCAAAGCTCGTGTGATGAGGA	TTCGTTGAGGAAGGCCAGTT
Ta.3749.1	GGCTACAAGCACACTAACCAGT	TTGCATGGCACCCCTTTGGAA
Ta.1852.1	ATGAAGGAGACGCAGCAGGA	TGGTGACGTTGACCTGGTTGT
Ta.28834.1	TCGACTACTCCAAGGACAAGGA	GGGCCACCTTACTCAATTCTCA
Ta.6832.1	AGCTTCGATTCTCCGTCTT	AGGCACCTGCTGATTGAGTT
Ta.12817.1	AACTGTCAGGTGCATTGGTGTC	TCCAGAACTTGGAGGGTGCTAA
Ta.14561.2	TGGGCTTCACTACCTTCACA	AGCACAAAGGACCTCGAACA
Ta.13696.1	AGGATGAGCAGAAGGTGTTGGA	AGATGCCGATTACCGAGTTGT
Ta.6184.1	CCATGAAGTGGGTCTTCTGGAT	CTCCTTGGACATCAGTGCAGTT
Ta.12025.1	AGACGAGTAGTAGCACCCACAT	TGACACACAGAGGAGAGAGACA
<i>18SrDNA</i>	CGGCTACCACATCCAAGGAA	TGCTACTACCTCCCCGTGTCA

3.4.4.2. PCR-Semicuantitativa

Para la amplificación de los genes seleccionados se preparó la mezcla de la reacción en un volumen final de 18 µl en una cabina de flujo vertical, tal como se detalla a continuación (Tabla 8).

Tabla 8: Composición de la mezcla de la reacción para PCR-Semicuantitativa.

H ₂ O DEPC 13,66 µl	x N ^o reacciones	=	µl H ₂ O DEPC
Tampón TAQ 10x 2 µl	x N ^o reacciones	=	µl Tampón TAQ
MgCl ₂ (50 mM) 0,34 µl	x N ^o reacciones	=	µl MgCl ₂
dNTPs (20 mM) 0,2 µl	x N ^o reacciones	=	µl dNTPs
Mezcla de Cebadores (25 nM) 0,8 µl	x N ^o reacciones	=	µl Mezcla de Cebadores
TAQ (5 u/µl) 0,2 µl	x N ^o reacciones	=	µl TAQ

La mezcla de reacción se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 s y se añadieron 18 µl a cada tubo que contenía 2 µl de cDNA. Se han utilizado tiras de 8 tubos de 0,2 ml (Thermo-Stripe de ABgene). A continuación se agregó una gota de aceite (Mineral Oil de Sigma), se mezcló en un vortex y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 s. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador DNA Engine Peltier Thermal Cycl er 4.0 (Bio Rad) de acuerdo al siguiente programa (Tabla 9).

Tabla 9: Programa de amplificación para PCR-Semicuantitativa.

1ciclo	94°C	2 min	
33 Ciclos	[94°C	1 min
		x°C	1 min
		72°C	1 min
1 Ciclo	72°C	10 min	

x °C (depende de la temperatura de fusión (T_m) de los cebadores)

Finalizada la reacción las muestras se conservaron a 4°C. La comprobación del producto de la amplificación se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% (MS-12 Conda) en 275 ml de TBE 0,5x. Para ello, se utilizaron 18 µl de muestra y 3 µl de tampón de muestra SB (50% de glicerol, 250 mM EDTA pH 8,0 y 0,01% bromofenol). La visualización del gel se hizo por tinción utilizando 20 µl de SYBR® Safe DNA Gel Stain de Invitrogen.

En los pocillos del gel se introdujeron 15 µl de muestra. Como marcador de peso molecular se utilizó el 100 pb DNA Ladder de Invitrogen. La electroforesis se efectuó a 80 V en el equipo E300 de Pharmacia Biotech durante 1 h y 40 min. Para la visualización del producto de amplificación se utilizó el programa Quantity One 4.6.7 en el trasiluminador de luz ultravioleta del Gel Doc 2000 de Bio Rad.

3.4.5. Amplificación de genes mediante qRT-PCR (Quantitative Real Time PCR)

El sistema de qRT-PCR se basa en la detección y cuantificación de un producto mediante fluorescencia (Livak 1995). El incremento de la señal es directamente proporcional a la cantidad de producto amplificado en una reacción de PCR. Mediante la cantidad de fluorescencia emitida en cada ciclo, es posible cuantificar un producto durante la fase exponencial, y con ello la cantidad inicial de muestra analizada (Dorak 2008). Se ha utilizado el fluorocromo SYBR Green que se une a la estructura secundaria del DNA y por tanto, la cantidad total de fluorescencia emitida es directamente proporcional a la cantidad de producto amplificado. La línea de fluorescencia basal o “baseline” representa los ciclos iniciales donde no se observan cambios en la fluorescencia (Figura 4). El umbral o “threshold” es el nivel de fluorescencia que se sitúa en la zona de amplificación exponencial de la reacción de PCR. Esto permite determinar el valor C_T (Ciclo umbral o “threshold cycle”), que es el ciclo de la PCR en que la curva de amplificación corta el umbral, este valor es inversamente proporcional a la cantidad inicial de producto o moléculas molde (Dorak 2008).

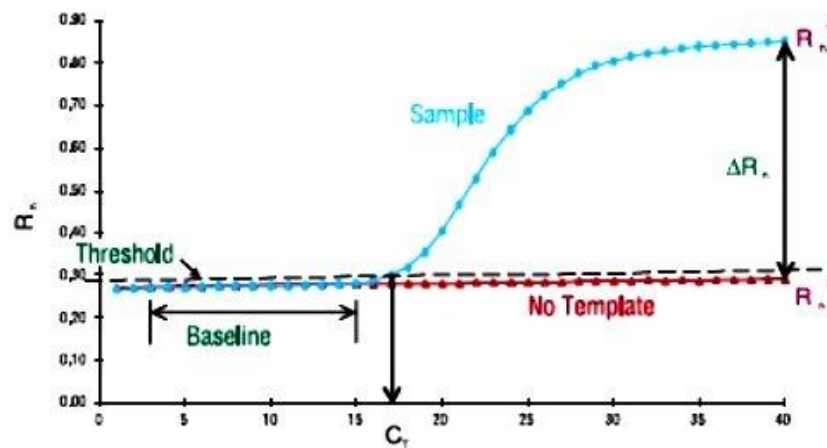


Figura 4: Curva de amplificación de la qRT-PCR. Threshold (umbral), Baseline (línea de fluorescencia basal), No Template (control sin cDNA), Sample (muestra), ΔR_n (diferencia de fluorescencia), C_T (ciclo umbral). Fuente: Applied Biosystems.

3.4.5.1. Diseño de cebadores para qRT-PCR

Para la identificación de genes asociados al efecto inductor de los ovarios en cultivo de anteras de trigo se partió de las secuencias de cDNA correspondientes a los genes a estudiar contenidas en el programa HarvEST Wheat v. 1.59. Se diseñaron los cebadores para qRT-PCR mediante el programa Primer Express® Software v. 3.0, el cual utiliza una aplicación específica para ensayos de cuantificación absoluta y relativa de expresión génica, y discriminación alélica.

Para el diseño de los cebadores, se tuvo en cuenta los siguientes criterios básicos:

- a. La longitud óptima del amplicon debe estar entre 50-150 pb.
- b. La longitud de los cebadores debe ser de 13-25 bp.
- c. La T_m (temperatura de fusión) debe estar entre 68-70°C.
- d. El contenido de GC debe estar entre 30-80 %.
- e. La terminación 5' no puede tener el nucleótido G, ya que podría disminuir o anular la fluorescencia.

Tabla 10: Secuencias de los pares de cebadores para qRT-PCR, de cebada tomados de Seiler y col. (2011), Moreno-Risueno y col. (2008) y Kumar (2010), y de los cebadores diseñados en trigo con el programa Primer Express® Software v. 3.0.

Probe set	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
Cebada		
ZEP2	CTTCCTGGCTCGTCGGTTCGTC	GCTGGGAGTGGAGGGCGTGTA
AO5a	CAGGGCGGCCAGGAAGGAAT	GCGGCGGCAGAGGAGAGG
ABA8'OH-1	AGCACGGACCGTCAAAGTC	TGAGAATGCCTACGTAGTG
BG3	CAGCGCCGATGAGTCCAGAAT	GCACGAGGTCCAATAGGCACAC
ABI1b	GCACGTCGGCAAATCCAGCAGT	TTTCCTCCGGGTTTCAAGTCG
ABI5	GCAAGCAGGCTTATACAATGG	TCAACAGGGCCCGGTGAC
FCA	AGGCTCAAACAATCCATCTA	TCAACTTTTCCAAGAACGCTCT
VP1	TCTCGATCCCCATTGAGGAC	CTTTACATCGGAGTAGAGCAC
FUS3	TCTTTGTTTCCCAACCCGAA	AAGGCTTGGTGACTCCGAACT
β-TUBULIN	CAAGGAGGTGGACGAGCAGATG	GACTTGACGTTGTTGGGGATCCA
Trigo		
Ta.1839.1	GTCAGCGATCGCGATTAGC	TCTTCCGAATCCTTCTCCAT
Ta.9528.1	TGCTCTCCATCCTCTGTTGC	GGGATGTGGACCTTGAAGAAAGT
Ta.14561.2	TGTCTGAGCAGGGCATAATG	TGCCGGAGCTTTGACAACA
Ta.13696.1	AGGATGAGCAGAAGGTGTTGGA	AGATGCCGATTCACCGAGTTGT
Ta27771	CAAGGAGTACCGTGACAC	GCGGGAACCTTGATCTTCG

Para los genes de cebada implicados en síntesis (*AO5a* y *ZEP2*), degradación (*ABA8'OH* y *BG3*) y señalización de ABA (*ABI1b*, *ABI5* y *FCA*) se tomaron los cebadores descritos por Seiler y col. (2011); para los genes de señalización por ABA: *VP1* se tomaron los cebadores descritos por Kumar (2010) y *FUS3* los cebadores descritos por Moreno-Risueno y col. (2008). Los cebadores diseñados fueron sintetizados por Invitrogen (Tabla 10). Se preparó una solución stock de 200 µM y una dilución final de 3 µM.

3.4.5.2. qRT-PCR (Quantitative Real Time PCR)

El análisis de qRT-PCR se llevó a cabo en un termociclador de PCR 7500 Fast Real-Time PCR System de Applied Biosystems utilizando el sistema Fast SYBR® Green Master Mix de Applied Biosystems y Rox Reference Dye de Invitrogen de acuerdo con los protocolos de cada casa comercial.

Antes de iniciar las reacciones de qRT-PCR fue necesario comprobar la validez de los cebadores según dos parámetros: formación de "Primer Dimers" y eficiencia en la amplificación.

a. "Primer Dimer": Se define como "Primer Dimer" a la existencia de complementariedad de bases entre las secuencias de los cebadores, dando como resultado una reducción en la eficiencia de la amplificación debido a una incorrecta cuantificación de los productos de PCR.

Para determinar si los cebadores diseñados no formaban "Primer Dimer", se realizó un control para cada pareja de cebadores a una concentración de 150 nM cada uno (Paolacci y col. 2009). Se preparó la mezcla de la reacción en un volumen final de 20 µl, tal como se detalla a continuación (Tabla 11).

Tabla 11: Composición de la mezcla de la reacción para "Primer Dimer".

Fast SYBR® Green Master Mix 10 µl	x N° reacciones	= µl Fast SYBR® Green Master Mix
Cebador Forward 1 µl (150 nM)	x N° reacciones	= µl Cebador Forward
Cebador Reverse 1 µl (150 nM)	x N° reacciones	= µl Cebador Reverse
Rox 50x 0,4 µl	x N° reacciones	= µl Rox
H ₂ O Milli Q. 7,6 µl	x N° reacciones	= µl H ₂ O

Las características y casa comercial de cada reactivo son: el kit "Fast SYBR® Green Master Mix" de Applied Biosystems, Rox (50x) Reference Dye de Invitrogen. Rox es un colorante que normaliza la señal de fluorescencia en qRT-PCR sin modificar los parámetros durante el proceso de análisis. Se utilizó Rox para reducir la desviación entre replicas, debido a posibles diferencias en el momento de la preparación de la reacción.

b. Cálculo de eficiencias: Se determino la eficiencia (E) de los pares de cebadores con la finalidad de estudiar su estabilidad a diferentes concentraciones de las muestras. Para ello se analizaron series de diluciones de las muestras a 1:1, 1:2,

1:4 y 1:6. En cebada las muestras utilizadas fueron anteras de 6 días de cultivo (6dc) de la línea DH6148, y anteras de 4 y 8 días de cultivo (4dc y 8dc) de la línea DH6183. En trigo se utilizaron las muestras de ovarios jóvenes frescos (0dc), ovarios maduros de Pavon a los 5 y 20 días de cultivo (5dc y 20dc), ovarios jóvenes frescos (0dc), y ovarios maduros de 10 días de cultivo (10dc) del cultivar Caramba. Para el cálculo de la eficiencia se aplicó la siguiente fórmula (Paolacci y col. 2009).

$$E=(10^{(-1/m)}-1) \times 100$$

m es la pendiente del modelo de regresión lineal sobre el logaritmo transformado de las diluciones de cDNA versus el valor C_T de acuerdo con la siguiente ecuación lineal:

$$y=m \cdot \log(x)+b$$

Se consideraron válidas aquellas parejas de cebadores cuya eficiencia estuvo entre el 90 y el 100%.

3.4.5.2.1. Condiciones de la qRT-PCR

a. Selección de genes control (House Keeping o genes constitutivos): Con la finalidad de seleccionar el gen control más estable entre las distintas repeticiones, se analizaron varios genes constitutivos descritos en la bibliografía. Se realizó un análisis de “Primer Dimer” y se calcularon las eficiencias como se detalla en el apartado 3.4.5.2 a y b.

Para cebada las secuencias de los cebadores de los genes *GAPDH* (*GLICERALDEHÍDO-3-FOSFATO DESHIDROGENASA*), *β-TUBULIN*, *18SrDNA* y *ELF1A* se tomaron de Jarosova y Kundu (2010), para el gen *βL-GAPDH* se utilizaron los cebadores de Burton y col. (2008) y para el gen *ACTINA* se utilizaron los cebadores de Kapazoglou y col. (2010) (Tabla 12).

Tabla 12: Secuencias de los pares de cebadores control para qRT-PCR de cebada.

Gen control	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>GAPDH</i>	TGTCCATGCCATGACTGCAA	CCAGTGCTGCTTGAATGATG
<i>β-TUBULIN</i>	CAAGGAGGTGGACGAGCAGATG	GACTTGACGTTGTTGGGGATCCA
<i>18SrDNA</i>	GTGACGGGTGACGGAGAATT	GACACTAATGCGCCCGGTAT
<i>ELF1A</i>	CAGTGCTGGACTGCCACA	CTCCACCACCATGGGCTT
<i>βL-GAPDH</i>	GTGAGGCTGGTGCTGATTACG	TGGTGCAGCTAGCATTGAGAC
<i>ACTINA</i>	ATGGCTGACGGTGAGGACATCCAGCC	TCAGAAGCACTTCTGTGGACGATCGC

Para trigo, las secuencias de los genes *Ta2291*, *Ta2776* y *Ta27771* se tomaron de Paolacci y col. (2009) y el gen *EF-1α* se tomó de Soriano (2008) (Tabla 13).

Tabla 13: Secuencias de los pares de cebadores control para qRT-PCR de trigo.

Gen control	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>Ta2291</i>	CGTCTCCAACAACATTGCCAAC	GCTTCTGCCTGTACATACGC
<i>Ta2776</i>	CGATTGAGAGCAGCGTATTGTTG	AGTTGGTCGGTCTCTTCTAAATG
<i>Ta27771</i>	CAAGGAGTACCGTGACAC	GCGGGAACCTGATCTTCG
<i>EF-1α</i>	TCACTCTTGAGTGAAGCAGATG	CATAACGCGCCTTTGAGTACTTG

b. Validación de muestras y análisis de qRT-PCR: Se realizaron reacciones de qRT-PCR para validar las muestras a emplear utilizando 1 µl de RNA original en lugar de cDNA, con la finalidad de detectar posible contaminación de DNA genómico en las muestras. Se utilizaron tres réplicas biológicas de cada uno de los estadios del cultivo de anteras en estudio y dos réplicas técnicas de cada réplica biológica.

El volumen final de cada reacción fue de 20 µl. Se preparó la mezcla de la reacción en una cabina de flujo vertical, tal como se detalla a continuación (Tabla 14).

Tabla 14: Composición de la mezcla de la reacción para qRT-PCR.

Fast SYBR® Green Master Mix 10 µl	x N° reacciones	=	µl Fast SYBR® Green Master Mix
Rox 50x 0,4 µl	x N° reacciones	=	µl Rox
H ₂ O Milli Q. 6,6 µl	x N° reacciones	=	µl H ₂ O

La mezcla de reacción se centrifugó a 13.000 rpm en una microcentrifuga durante 10 s. Se utilizaron placas de 96 pocillos (FrameStar 96 Semi Skirted with upstand de 4titude). A cada uno de los pocillos se añadió 1 µl de cada cebador a una concentración de 150 nM, 1 µl de cDNA de las diluciones 1:5 de cada muestra a analizar y 17 µl de la mezcla de la reacción. La placa se cubrió con una lámina adhesiva (QPCR Adhesive Clear Seals 4titude). Esta misma mezcla se utilizó para la validación de las muestras.

Las condiciones de amplificación fueron: 10 min a 95°C para la desnaturalización, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95°C para la amplificación, 1 min a 60°C para la elongación, y seguido de un programa para la curva de melting o curva de la temperatura de fusión de 60-95°C, la cual es específica para cada fragmento amplificado, cuya forma se relaciona con la cantidad de GC o tamaño de los amplicones y sirve para identificar fragmentos amplificados de DNA concretos. Los datos de fluorescencia fueron adquiridos durante la elongación a 60°C y durante el programa de la curva de melting (Figura 5).

Para determinar la cuantificación relativa en la expresión génica de las muestras a analizar, se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen 2001). Los valores de CT obtenidos para cada gen en cada punto se corrigieron respecto a los valores obtenidos para la expresión del gen control.

$$2^{-(CTMUESTRA-CTCONTROL) tiempox-(CTMUESTRA-CTCONTROL) tiempo0}$$

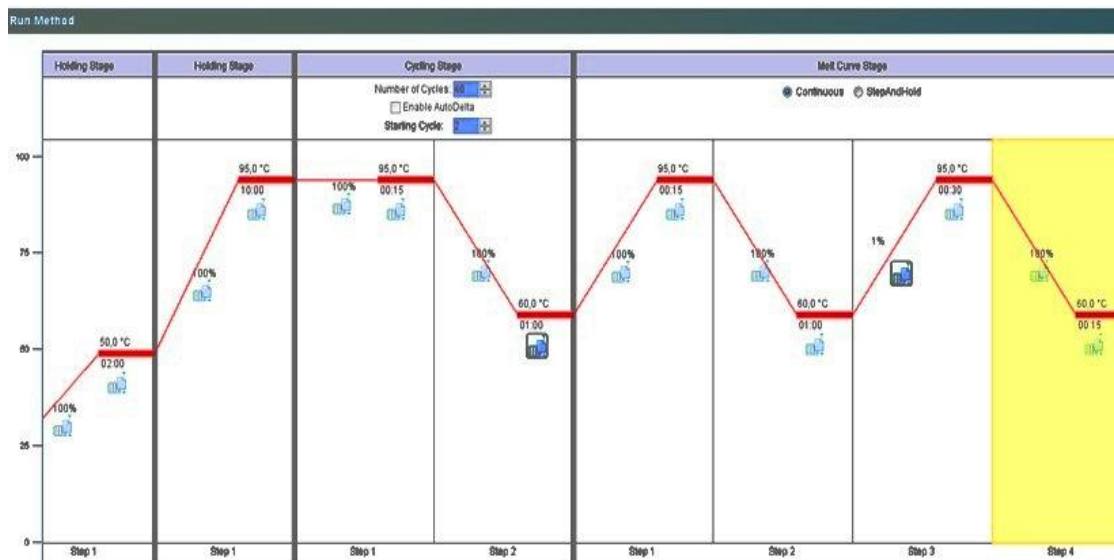


Figura 5: Programa de amplificación de la qRT-PCR.

3.5. Herramientas bioinformáticas

A lo largo del trabajo se han ido utilizando distintas herramientas bioinformáticas, todas ellas de acceso libre, que se detallan a continuación.

3.5.1. Programas asociados a bases de datos

a. HarvEST Barley v. 1.74

(<http://harvest.ucr.edu/>)

HarvEST Barley es un programa asociado a una base de datos de 444.652 ESTs (“Expressed Sequence Tags”) y aproximadamente otras 1.100 secuencias de cebada. Fue desarrollado en la Universidad de California-Riverside por los investigadores Steve Wanamaker y Timothy Close. Este programa está concebido como una herramienta para la genómica comparativa asociado al “microarray” de cebada “Barley1 GeneChip” de Affymetrix, facilitando entre otras, la búsqueda de

homologías, diseño de cebadores, determinación de funcionalidad de genes, diseño de SNPs, diseño de genotipados y diseño de mapas genéticos.

En este trabajo, este programa nos ha facilitado la búsqueda de secuencias consenso y la asociación de las sondas del “Barley1 GeneChip” con genes homólogos a través de hipervínculos con BLASTX, considerando la mejor asociación de distintas bases de datos tales como: UniProt (general), arroz (“Rice Genome Annotation Project Database and Resource”, MSU), *Arabidopsis* (“Arabidopsis Information Resource”, TAIR) y *Brachypodium* (Phytozome Bradi 1).

b. HarvEST Wheat v. 1.59

(<http://harvest.ucr.edu/>)

HarvEST Wheat es un programa asociado a una base de datos de 101.107 ESTs y aproximadamente 91.130 secuencias de trigo, asociado a “Affymetrix Wheat chip”. También fue desarrollado en la Universidad de California-Riverside por los investigadores Steve Wanamaker y Timothy Close. Al igual que en cebada, es un programa que sirve de herramienta para la genómica funcional comparada, y facilita la búsqueda de homologías, diseño de cebadores y SNPs y determinación de funcionalidad.

En este trabajo se utilizó para la búsqueda de secuencias, y búsqueda de las homologías mediante hipervínculos con BLASTX, y distintas bases de datos tales como: UniProt (general), arroz (“Rice Genome Annotation Project Database and Resource”, MSU), *Arabidopsis* (“Arabidopsis Information Resource”, TAIR) y *Brachypodium* (Phytozome Bradi 1).

c. *blastx-NCBI (Basic Local Alignment Search Tool)*

(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&BLAST_PROGRAM_S=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome)

BlastX (Basic Local Alignment Search Tool) es un programa desarrollado por NCBI (“National Center for Biotechnology Information, USA”) que usa como entrada una secuencia de nucleótidos, traduce la secuencia en sus seis posibles marcos de lectura (tres marcos de lectura por hebra) y compara estas secuencias traducidas con una base de datos de proteínas contenidas en BLAST, permitiendo la búsqueda de homologías de una secuencia nucleotídica a través de su traducción a proteína.

Esta herramienta se utilizó para determinar las homologías en trigo de las secuencias de los genes seleccionados en cebada, para el posterior diseño de cebadores.

d. *cerealsDB*

(<http://www.cerealsdb.uk.net/database.htm>)

CerealsDB es una base de datos que contiene datos genómicos de trigo (*Triticum aestivum*). Actualmente incluye más de 100.000 SNP, marcadores DArT y secuencias EST, facilitando la selección asistida por marcadores (Wilkinson y col. 2012). Esta base de datos fue desarrollada por el grupo de genómica funcional de la Universidad de Bristol (UK), en la que se reúnen datos procedentes de 35 librerías de cDNA relacionadas con diferentes estados de desarrollo del grano y varios tratamientos de estrés en trigo.

En esta tesis se utilizó para identificar las secuencias homólogas en trigo de los genes seleccionados en cebada, para el posterior diseño de cebadores.

e. Fasta- EMBL-EBI (Nucleotide Similarity Search)

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/nucleotide.html>

Programa desarrollado por el EBI (“European Bioinformatics Institute”) del EMBL (“European Molecular Biology Laboratory”). Permite identificar secuencias nucleotídicas homologas en la base de datos “EMBL-Bank” (“EMBL Nucleotide Sequence Database”) desarrollada en colaboración con GenBank (USA) y la “DNA Database” de Japón (DDBJ).

Este programa permite realizar comparaciones nucleotídicas o de proteínas mediante la búsqueda óptima de alineaciones locales. Este programa se utilizó para identificar las secuencias homólogas en trigo de los genes seleccionados en cebada y para el posterior diseño de cebadores.

f. FunCatDB (MIPS Functional Catalogue)

http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB/search_main_frame.html

Este programa, desarrollado por el Instituto de Bioinformática del “Munich Information Center for Protein Sequences” (MIPS), constituye una herramienta para la anotación de información de genómica funcional. Incluye aplicaciones como anotación manual del genoma y análisis de datos a gran escala del transcriptoma y proteoma (Ruepp y col. 2004). Dentro del programa se utilizó una herramienta de búsqueda que permite establecer una distribución funcional por categorías de un listado de genes.

Este programa se utilizó para la clasificación funcional de los genes seleccionados en cebada, basándonos en las homologías de secuencia en *Arabidopsis thaliana*.

g. PLEXdb (Plant Expression Database)

(<http://www.plexdb.org/>)

PLEXdb es un programa asociado a una base de datos de expresión de genes, que permite integrar datos de un perfil de expresión con datos de genómica funcional estructural y datos fenotípicos (Dash y col. 2011), y constituye una herramienta para estudios comparativos de genómica funcional (Wise y col. 2007).

En este trabajo se utilizó para estudiar los datos de expresión de los genes seleccionados en cebada, en el experimento BB3 “Transcription patterns during barley development”. En este experimento se estudiaron los niveles de expresión de todos los genes del “Barley1 GeneChip” en tejidos de cebada representativos de distintas fases de desarrollo vegetativo y reproductivo en los cv. Morex y Golden Promise (Druka y col. 2006). También se utilizó para estudiar los datos de expresión de los genes seleccionados de trigo en el experimento TA3 (“Transcription patterns during wheat development (Mirrors BB3)”). En este experimento se estudiaron los niveles de expresión de todos los genes del “Wheat GeneChip” a lo largo del desarrollo de trigo del cv. Chinese Spring (Schreiber y col. 2009).

3.5.2. Programas de análisis de datos genómicos

a. MeV v. 4.5 (MULTIEXPERIMENT VIEWER)

(<http://www.tm4.org/mev/>)

MeV fue desarrollado por Saeed y col. (2003), como una aplicación para el análisis de datos genómicos. Es una herramienta que incorpora algoritmos sofisticados para análisis de clústeres, visualización, clasificación y análisis estadísticos, y permite el análisis de expresión de uno o múltiples experimentos y la representación gráfica de los mismos.

El programa nos ha permitido agrupar genes por su patrón de expresión mediante análisis de clústeres utilizando el algoritmo K-means (MacQueen 1967). El algoritmo k-means tiene como objetivo minimizar la disimilaridad de los elementos dentro de cada clúster, al mismo tiempo que se maximiza la disimilaridad de los elementos que caen en diferentes clústeres. Tres factores hay que tener en cuenta: **1)** definir el número de clústeres (variable según el análisis); **2)** seleccionar el criterio para medir distancias (distancias euclídeas); **3)** definir el criterio para determinar el grado de pertenencia a cada grupo (“Complete linkage”).

4. Resultados

4.1. Caracterización de la respuesta al cultivo de anteras en cebada

En este trabajo se han utilizado tres líneas doble haploides (DHs) de cebada: la línea DH6148 se seleccionó para realizar los análisis de transcriptómica por su alta capacidad embriogénica, las líneas DH6183 y DH6004 se seleccionaron para asociar expresión génica y respuesta embriogénica, dada la baja eficiencia de producción de embriones y de plantas verdes de la línea DH6183 y la baja capacidad de división de la línea DH6004, en comparación con la línea DH6148. Estas tres líneas, casi isogénicas, habían sido obtenidas y caracterizadas en cuanto a su respuesta final al cultivo de anteras previamente en el grupo de trabajo (Muñoz-Amatriaín y col. 2008 y Muñoz-Amatriaín y col. 2009b).

Para asegurar que los materiales de partida al recoger las muestras para el análisis de expresión génica estaban en buenas condiciones, es decir, presentaban respuestas al cultivo de anteras similares a las obtenidas previamente, se llevó a cabo la caracterización de la respuesta al cultivo de anteras de dichos materiales (Tabla 15 y Figura 6). Se pudo observar que las líneas DH6148 y DH6183 mostraban un número elevado de anteras que responden, es decir que se hinchan y adquieren un color translucido o amarillo claro, y de divisiones por 100 anteras (2165,8 y 2646,6, respectivamente, Figura 6a y d), mientras que en la línea DH6004 sólo respondieron la mitad de las anteras y se obtuvieron 380 divisiones por 100 anteras (Tabla 15 y Figura 6g).

La línea DH6148 produjo un número de embriones por 100 anteras (444,7) casi tres veces superior a la línea DH6183 (158,7), siendo la línea DH6004 la que produjo el menor número de embriones por 100 anteras (81,4) (Tabla 15 y Figura 6b, e y h). Los porcentajes de regeneración de la línea DH6148 fueron del 85,3% lo que indica que los embriones eran de muy buena calidad, presentando un eje embrionario bien diferenciado (Figura 6b). La línea DH6183 dio lugar a embriones de mala calidad, con ejes embrionarios no bien diferenciados, y a un elevado número de proliferaciones de tipo callo (Figura 6e), presentando un porcentaje de regeneración del 33,6%.

Tabla 15: Respuesta al cultivo de anteras de las líneas DH6148, DH6183 y DH6004 de cebada.

Cultivar	Anteras responden*	Divisiones*	Embriones*	Plantas*		Regeneración %	Plantas verdes %
				Verdes	Albinas		
DH6148	87,5	2165,8	444,7	363,3	15,8	85,3	95,8
DH6183	81,6	2646,6	158,7	6,6	46,6	33,6	12,4
DH6004	45,8	380	81,4	50,7	5	68,4	93,6

* Valores por 100 anteras

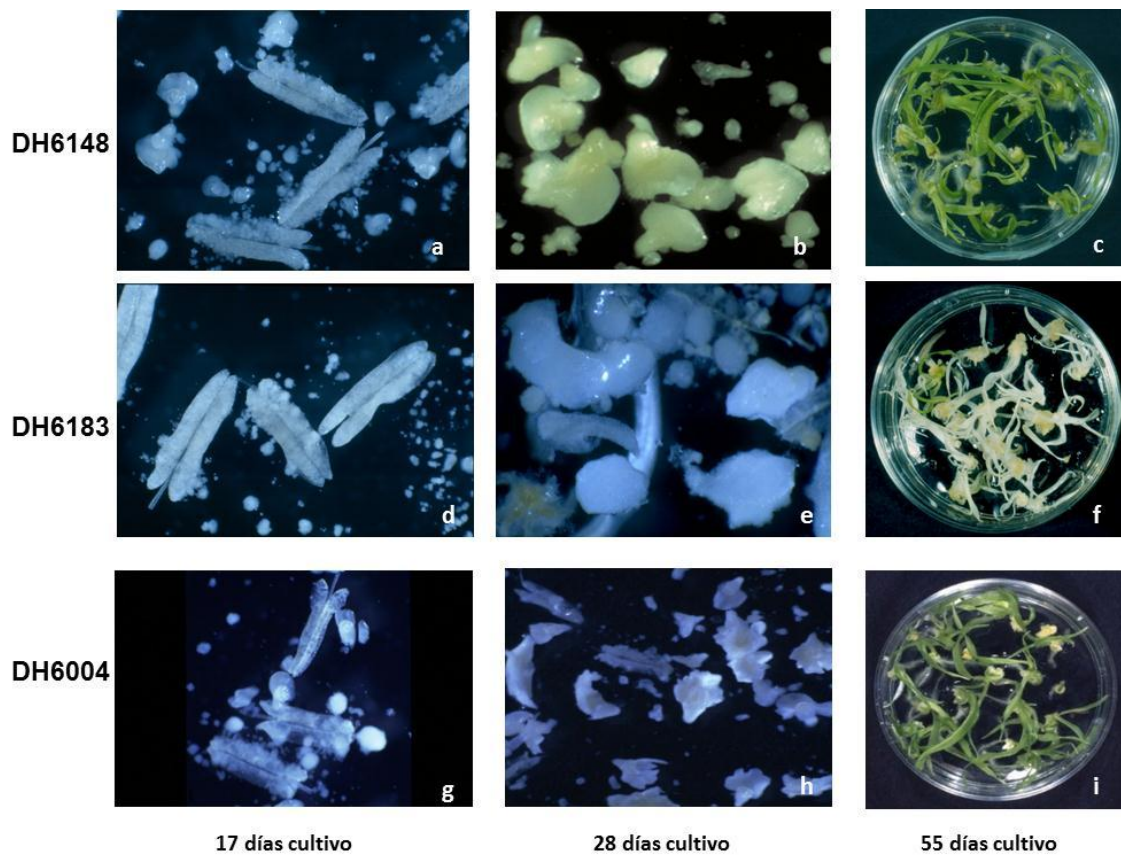


Figura 6: Respuesta al cultivo de anteras de las líneas DH6148, DH6183 y DH6004 de cebada. a, d y g) Estructuras y embriones a los 17 días de cultivo. b, e y h) Estructuras y embriones a los 28 días de cultivo. c, f e i) Plántulas verdes y albinas a los 55 días de cultivo.

En la línea DH6004 el porcentaje de regeneración fue de 68.4%, lo que indica que en general los embriones fueron de buena calidad (Figura 6h). Además, las líneas DH6148 y DH6004 presentaron un porcentaje de plantas verdes cercano al 100% (Figura 6c e i), mientras que sólo el 12% de las plantas regeneradas en la línea DH6183 fueron verdes (Figura 6f).

4.1.1. Caracterización morfológica de las fases tempranas de la embriogénesis de la microspora en cebada

4.1.1.1. Estudios citológicos del cultivo de anteras

Se realizó un estudio citológico de las fases tempranas del cultivo de anteras para poder caracterizar con detalle las estructuras presentes en el cultivo en los puntos que posteriormente se tomarían para los estudios de expresión génica.

Se tomaron anteras a los 4 días de inducción por estrés (4di) y a los 4, 8 y 12 días de cultivo (4dc, 8dc y 12dc) (Figura 7), de las líneas DH6148 y DH6183 que eran las que presentaban mayores diferencias morfológicas. Después del tratamiento de estrés (4di), en ambas líneas, las microsporas se distribuyeron al azar dentro del lóculo de la antera, y se observó que el tapetum estaba degradado (Figura 7a y e). Después de 4 días de cultivo (4dc) muchas microsporas, especialmente en la línea DH6148, aumentaron de tamaño presentando un citoplasma denso, y en algunas de ellas se observaban las primeras divisiones (Figura 7b y f). A los 8 días de cultivo (8dc) se observaron estructuras multicelulares, especialmente en la línea DH6148 (Figura 7c y g). A los 12 días de cultivo (12dc) se pudo observar que algunas estructuras ya habían roto la exina. En la línea DH6148 estas estructuras estaban formadas por células redondeadas con el citoplasma denso con un aspecto claramente embriogénico, mientras que en la línea DH6183 algunas estaban formadas por células grandes con el citoplasma laxo, presentado características de estructuras de tipo callo (Figura 7d y h).

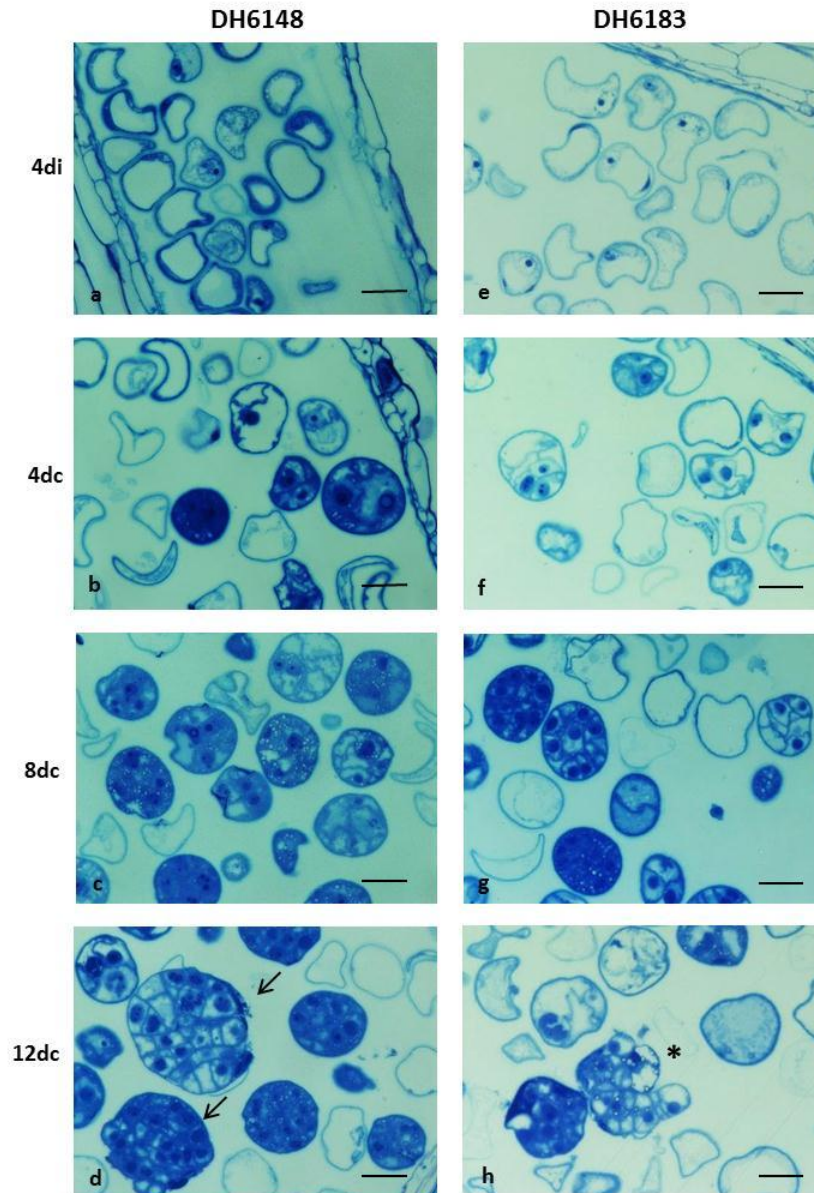


Figura 7: Caracterización citológica de las anteras en las fases iniciales de cultivo de anteras de las líneas DH6148 y DH6183 de cebada. Cortes semifinos de 1 μm teñidos con azul de toluidina. a y e) Microsporas en el interior de las anteras a los 4 días de inducción por estrés (4di). b y f) Microsporas en el interior de las anteras a los 4 días de cultivo (4dc). c y g) Estructuras en el interior de las anteras a los 8 días de cultivo (8dc). d y h) Estructuras embriogénicas (flecha) y proliferaciones de tipo callo (asterisco) en el interior de las anteras a los 12 días de cultivo (12dc). Las barras corresponden a 50 μm .

4.1.1.2. Estudio *in vivo* del cultivo de microsporas aisladas

Para hacer un seguimiento más continuo y detallado del desarrollo embriogénico de las microsporas, se realizó una caracterización morfológica *in vivo* en cultivo de microsporas aisladas en las líneas DH6148 y DH6183. Se caracterizaron las microsporas a los 4 días de inducción por estrés (4di) y a los, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 16 días del cultivo de microsporas aisladas (1dc, 2dc, 4dc, 6dc 8dc, 12dc y 16dc) (Figura 8). Después del tratamiento de estrés (4di) (Figura 8a e i), se observó que tanto en DH6148 como en DH6183 en la mayoría de las microsporas la vacuola ocupaba gran parte de la superficie de la microspora y el núcleo se encontraba en el extremo opuesto del poro. Sólo en muy pocas microsporas se observó que la vacuola se había reducido, el núcleo había pasado a ocupar la posición central, observándose hilos del citoplasma atravesando la vacuola dándole un aspecto estrellado (“star like”), estructura descrita como indicadora de la adquisición del potencial embriogénico. Estas estructuras se observaban en mayor número en la línea DH6148 (Figura 8a e i).

Después de un día de cultivo (1dc) la mayoría de las microsporas habían aumentado su tamaño, y se observó un mayor número de microsporas en las que la vacuola empezaba a revertir, y como consecuencia el núcleo se había desplazado hacia el centro de la microspora (Figura 8b y j). A los 2 días de cultivo (2dc) en algunas microsporas se observa un citoplasma más denso y en muchas la primera división. Ya se distinguen las microsporas que no han inducido, por su menor tamaño y por su morfología semejante a la mayoría de las microsporas en 4di (Figura 8c y k). También se aprecian diferencias entre líneas, en la línea DH6183 se observan menos microsporas y presentan un citoplasma más denso que la línea DH6148. A los 4 días de cultivo (4dc) se podían observar microsporas con varias divisiones caracterizadas por presentar un citoplasma denso (Figura 8d y l). A los 6 días de cultivo (6dc) se observaban microsporas de gran tamaño, en las que ya se habían producido muchas divisiones (Figura 8e y m). A los 8 días de cultivo (8dc) algunas microsporas habían roto la exina en ambas líneas. En este punto se observaron diferencias entre líneas, fundamentalmente en el número de estructuras multicelulares (Figura 8f y n).

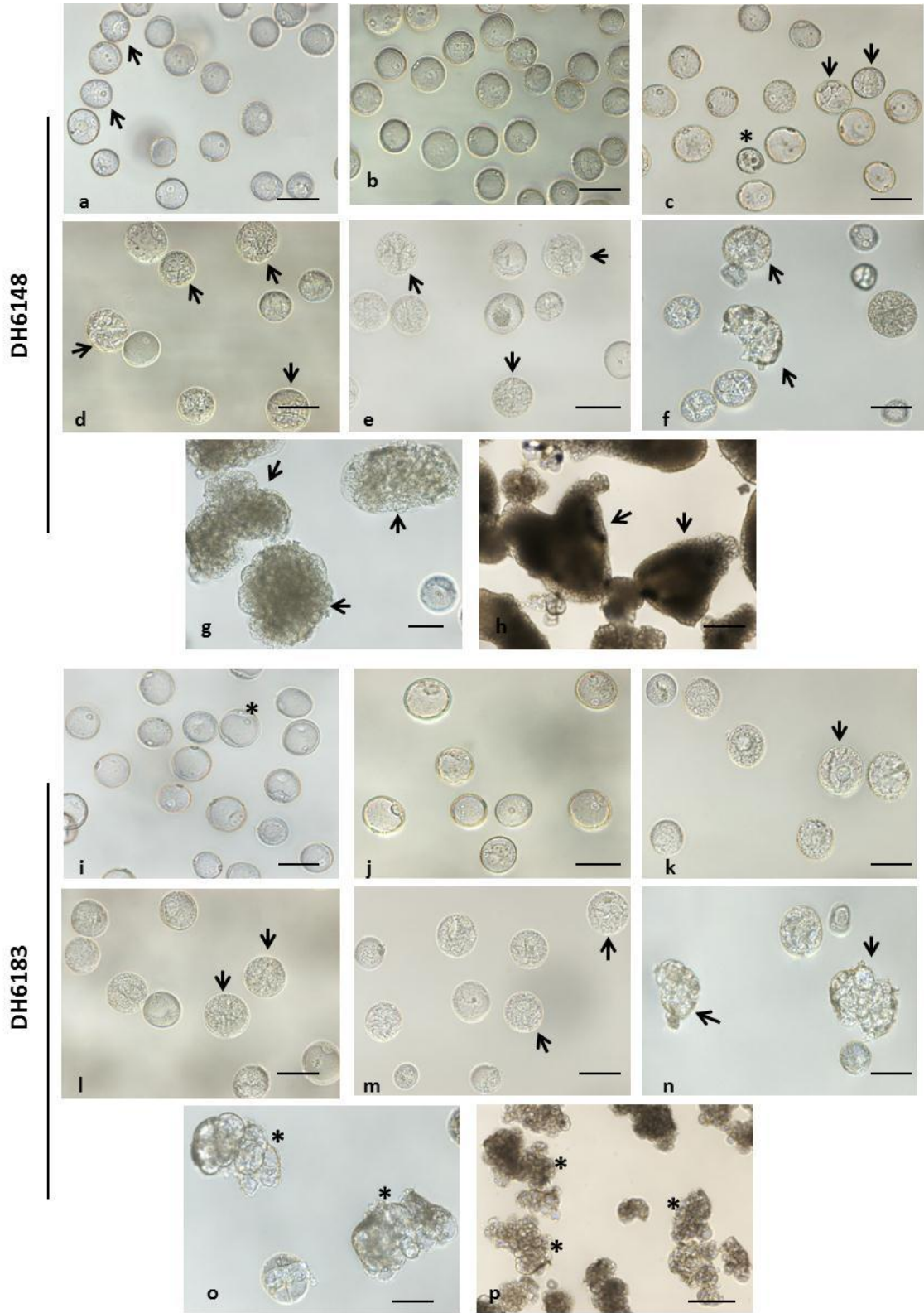


Figura 8: Caracterización morfológica del cultivo de microsporas aisladas de las líneas DH6148 y DH6183 de cebada. a, i) Microsporas a los 4 días de inducción por estrés con aspecto estrellado “star like” en DH6148 (flecha) y microsporas vacuoladas en DH6183 (asterisco). b y j) Microsporas a 1 día de cultivo. c y k) Microsporas a los 2 días de cultivo con aspecto estrellado (flecha) y microsporas muertas (asterisco). d y l) Microsporas a los 4 días de cultivo presentado divisiones (flecha). e y m) Microsporas con divisiones (flecha) a los 6 días de cultivo. f y n) Microsporas y estructuras a los 8 días de cultivo, en algunas se observa la rotura de la exina (flecha). g y o) Estructuras embriogénicas en estado globular en DH6148 (flecha) y estructuras tipo callo en DH6183 (asterisco) a los 12 días de cultivo. h y p) Embriones (flecha) y proliferaciones de tipo callo (asterisco) a los 16 días de cultivo. Barras corresponden a 50 μm .

A los 12 días de cultivo (12dc) se pudieron diferenciar claramente distintos tipos de estructuras en las dos líneas. En la línea DH6148 se observaron mayoritariamente estructuras embriogénicas, en estado globular caracterizadas por tener células redondeadas, pequeñas y con citoplasma denso (Figura 8g). En la línea DH6183 se apreciaron un menor número de estructuras embriogénicas, predominando las proliferaciones tipo callo, caracterizadas por tener células grandes no redondeadas y citoplasma laxo (Figura 8o).

Finalmente a los 16 días de cultivo (16dc) se observaron claramente las diferencias entre líneas. En la línea DH6148 algunos embriones ya habían empezado a diferenciarse pudiendo apreciarse la zona que dará lugar a la raíz y la que dará lugar al coleoptilo (Figura 8h). Sin embargo en la línea DH6183 muy pocas estructuras tenían forma de embrión, siendo la mayoría de ellas de tipo callo (Figura 8p).

4.2. Identificación de genes que se inducen en la embriogénesis de la microspora en cebada

4.2.1. Caracterización y clasificación funcional de los genes identificados en un estudio de transcriptómica

Para la identificación de genes implicados en el inicio del patrón de desarrollo embriogénico de la microspora se disponía de los datos provenientes de un estudio de

transcriptómica en el que se usó el 22K “Barley1 GeneChip” (Affymetrix). Este “chip” fue desarrollado por Close y col. (2004) e incluye 22.840 pares de sondas (“probe sets”) derivadas de 350.000 ESTs provenientes de 84 librerías de cDNA, y 1.145 secuencias génicas de cebada de la base de datos NCBI (“National Center for Biotechnology Information, USA”). En dicho estudio se habían comparado, en dos replicas biológicas, los valores de expresión de los genes en muestras de anteras antes de la inducción por estrés (0di), después de 4 días de inducción por estrés (4di), y después de 4 y 8 días de cultivo de anteras (4dc y 8dc) de la línea DH6148 de cebada. Mediante un ANOVA se habían seleccionado 11.454 genes que presentaban expresión diferencial cuando se comparaban dos puntos del análisis entre si.

A partir de ese análisis inicial, en este trabajo, se utilizaron una serie de criterios que nos permitieron seleccionar aquellos genes que se inducían *de novo* al iniciarse el desarrollo embriogénico de la microspora. Inicialmente, se adoptó un criterio de filtrado de los datos con el que se eliminaron todos aquellos genes que presentaban una diferencia de expresión, entre dos puntos, menor de 5.0 (fold change < 5.0). Mediante este filtrado se seleccionaron 7.578 genes (Tabla 16), de los cuales la mayor parte (4.140 genes) cambiaban su expresión entre 0di y 4di (fase de inducción por estrés), 3.074 genes entre 4di y 4dc (primeras divisiones de la microspora) y 364 genes entre 4dc y 8dc (formación de estructuras multicelulares y rotura de la exina). Durante la fase de inducción por estrés el número de genes que disminuyeron su expresión (2.688) fue mucho mayor que los que aumentaron (1.452) (Tabla 16).

Tabla 16: Número de genes con expresión diferencial entre las anteras antes de la inducción por estrés (0di), después de 4 días de inducción por estrés (4di), y después de 4 y 8 días de cultivo de anteras (4dc y 8dc).

Comparaciones	Nº de Genes que Aumentan	Nº de Genes que Disminuyen	Total de Genes
4di vs. 0di	1.452	2.688	4.140
4dc vs. 4di	1.797	1.277	3.074
8dc vs. 4dc	252	112	364

Sin embargo, durante la fase de cultivo fue mayor el número de genes que aumentaron su expresión que los que disminuyeron, siendo de 1.797 y 1.277 genes, respectivamente al iniciar la fase de cultivo (4dc vs. 4di), y de 252 y 112 genes en la fase más avanzada (8dc vs. 4dc).

Mediante el programa HarvEST Barley v. 1.74, y a través de hipervínculos con el programa “blastx”, se pudieron establecer homologías entre las secuencias de los 7.578 genes seleccionados después del filtrado y las secuencias de genes incluidos en las bases de datos de proteínas de UniProt (general), MSU (arroz), y TAIR (*Arabidopsis*). El criterio de similitud de secuencia fue de 8, en una escala de 1 a 11.

A partir de las homologías de secuencia establecidas con la base de datos de *Arabidopsis*, se realizó la clasificación funcional del 84.7% de los 7.578 genes mediante el programa FunCatDB del MIPS (“Munich Information Center for Protein Sequences *Arabidopsis thaliana* Database”).

Esta clasificación nos mostró que más del 30 % de los genes que cambiaron su expresión en las primeras fases de la embriogénesis de la microspora correspondían a la categoría funcional “Metabolismo”, más del 15 % a “Transporte celular” y más del 10% a “Respuesta a estrés” (Figura 9). Así mismo, se observó que había cuatro categorías funcionales (“Energía”, “Ciclo celular”, “Transcripción” y “Componentes celulares”) que constituían cerca del 10% de los cambios.

En las distintas categorías funcionales, se observaron diferencias en el número de genes entre las fases. En la fase de 4di vs. 0di únicamente destacaba por presentar el mayor número de genes que aumentan y disminuyen su expresión en la categoría de “Metabolismo”. La fase de 4dc vs. 4di destacaba por tener el mayor número de genes que aumentan su expresión en las categorías de “Ciclo celular” y “Transcripción”, mientras que en las categorías de “Transporte celular” y “Respuesta a estrés” destacaron por el mayor número de genes que disminuían su expresión. La fase de 8dc vs. 4dc destacó por presentar el mayor número de genes que aumentaban su expresión, entre las distintas fases, en las categorías “Componentes celulares” y

“Diferenciación celular”, y el mayor número de genes que disminuían su expresión en las categorías funcionales “Energía”, “Proteínas de reserva” y “Regulación del metabolismo”.

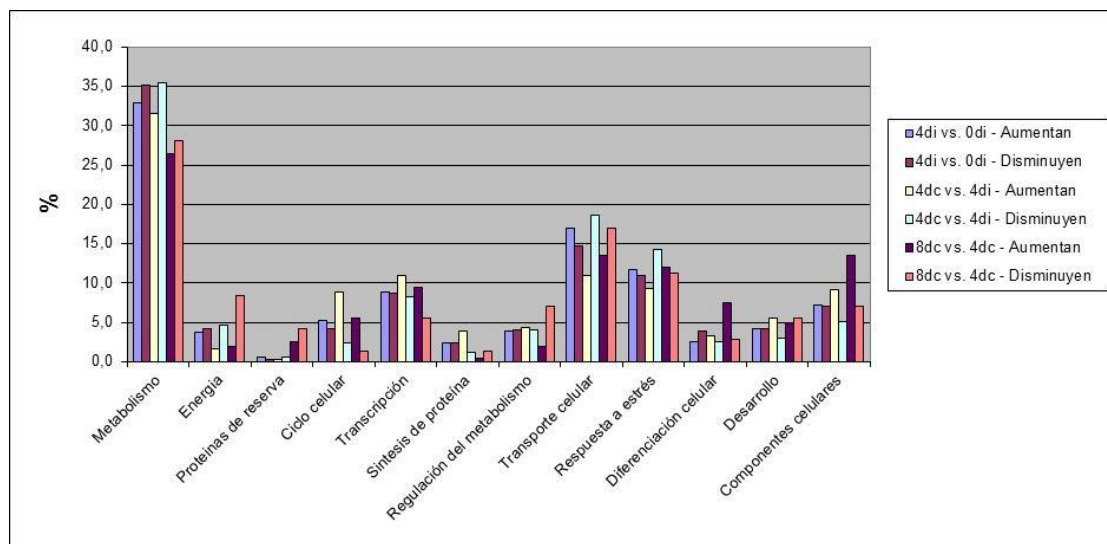


Figura 9: Distribución en categorías funcionales mediante el programa FunCatDB del MIPS (“Munich Information Center for Protein Sequences”) de los genes que tienen homología con *Arabidopsis* y cambiaron su expresión en las primeras fases de la embriogénesis de la microspora.

4.2.2. Selección de genes que se inducen *de novo* al iniciarse el desarrollo embriogénico de la microspora en cebada

Para la selección se tomaron inicialmente los 1.797 genes que aumentaban su expresión entre las fases 4dc y 4di (Tabla 16). El perfil de expresión de los genes seleccionados a lo largo de las fases iniciales del cultivo de anteras se determinó utilizando los valores de “fold change” obtenidos en el experimento de transcriptómica y normalizados mediante la transformación \log_2 (Figura 10). Se pudieron observar distintos patrones en los perfiles de expresión, así a 0di la proporción de genes con niveles de expresión altos y bajos fue muy similar, mientras que en 4di la mayoría de los genes presentaron niveles de expresión bajos ó muy bajos. Como era de esperar

la expresión de los genes aumentaba a los 4dc, aunque en muy diferente proporción. A los 8dc la mayoría de los genes tenían niveles de expresión similares a 4dc.

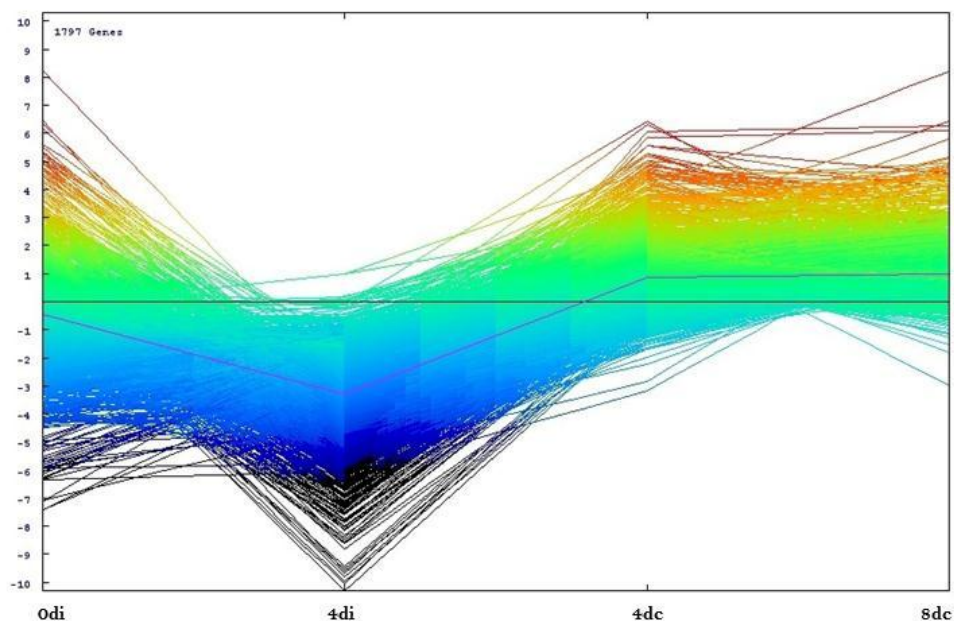


Figura 10: Perfil de expresión de los 1.797 genes que aumentaban su expresión al inicio del desarrollo embriogénico de la microspora (4dc vs. 4di). Los valores corresponden a los datos de "fold change" normalizados (\log_2). Los límites de la escala de color, correspondientes a valores de expresión, van del rojo (+ 10) al negro (-10).

Para agrupar los genes según sus perfiles de expresión se realizó un análisis de clústeres mediante el programa MeV (MULTIEXPERIMENT VIEWER v. 4.5) y el algoritmo "K-means" con los valores normalizados (\log_2) de "fold change" de cada uno de los genes, y en cada punto (Figura 11 y Tabla 26 del apartado de Anexos).

Se identificaron trece clústeres que agrupaban genes con perfiles de expresión similares. Ocho clústeres correspondían a patrones en los que si bien la expresión de los genes aumentaba a los 4dc vs. 4di, los niveles de expresión en 4dc eran similares o inferiores a los niveles en 0di (clústeres 1, 2, 8, 10 y 12), y o ligeramente superiores (clústeres 5, 9 y 11). El clúster 3 agrupó genes con niveles de expresión bajos en 0di y

que aumentaban progresivamente su expresión en 4di y 4dc, manteniéndose a 8dc. Finalmente los clústeres 4, 6, 7 y 13 agrupaban genes cuyos niveles de expresión eran bajos o muy bajos en 0di, su nivel de expresión no se modificaba por el tratamiento de estrés (4di), pero aumentaba claramente en la primera fase de cultivo (4dc). De estos clústeres, el clúster 4 agrupó los perfiles de expresión que presentaban una mayor diferencia en el nivel de expresión entre 4dc y 4di, y el clúster 7 agrupó perfiles con una mayor especificidad de expresión a los 4dc, por ello se seleccionaron para los análisis posteriores.

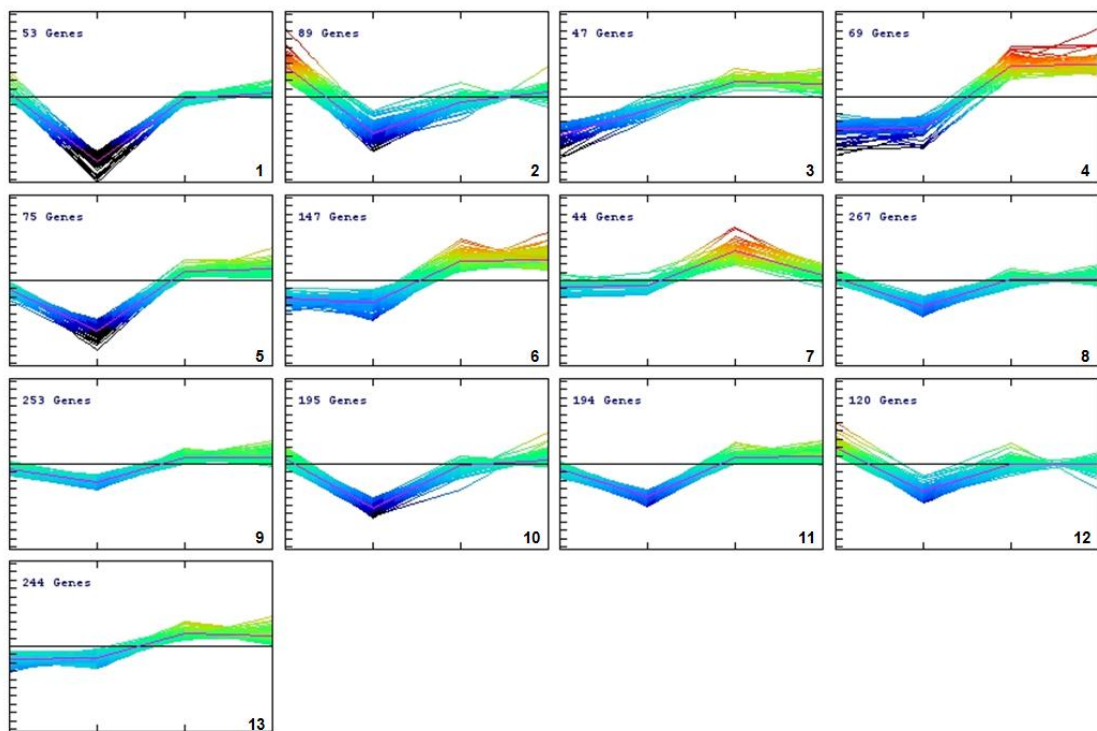


Figura 11: Análisis de clústeres mediante el algoritmo “k-means” del programa MeV (MULTIEXPERIMENT VIEWER v. 4.5) de los perfiles de expresión de los 1.797 genes que aumentaban su expresión a los 4dc vs. 4di. Los datos de expresión corresponden al “fold change” normalizados (\log_2) de los puntos 0 y 4 días de inducción por estrés (0di y 4di) y a los 4 y 8 días de cultivo de anteras (4dc y 8dc). Los límites de la escala de color van del rojo (+ 10) al negro (-10).

Al estudiar las categorías funcionales a las que correspondían los genes agrupados en los clústeres se observó que en la mayoría de ellas existían grandes diferencias en el porcentaje de genes en cada clúster (Figura 12 y Tabla 26 del apartado de Anexos). Así, aunque la categoría con mayor número de genes entre todos los clústeres correspondía a “Metabolismo”, en los clústeres 3 y 4 el porcentaje de genes de esta categoría es mucho menor que en el resto. En los genes relacionados con “Energía” destaca el clúster 7 con un mayor número de genes y los clústeres 4, 5, 11, y 13 con un número muy bajo de genes.

Tres clústeres tienen genes relacionados con “Proteínas de reserva” aunque sólo en el clúster 4 hay valores reseñables. En las categorías de “Ciclo celular” y “Transcripción” destacan los clústeres 13 y 4, respectivamente, correspondientes a genes inducidos *de novo* a los 4dc. En la categoría “Síntesis de proteína” destacan los clústeres 1, 8 y 10, cuyos niveles de expresión en 4dc eran similares o inferiores a los niveles a 0di. En la categoría “Regulación del metabolismo” destacaron los clústeres 1 y 3, pero este último clúster no tiene genes relacionados con “Transporte celular”. No hay grandes diferencias entre clústeres en la categoría “Respuesta a estrés”, pero en las categorías “Diferenciación celular”, “Desarrollo” y “Componentes celulares” si existían, siendo los clústeres con mayor y menor número de genes, 2 y 4, 2 y 1 y 4 y 8, respectivamente.

Finalmente esta clasificación también nos mostró que los clústeres seleccionados para los posteriores estudios destacaban frente a los otros clústeres en las categorías siguientes: “Proteínas de reserva”, “Transcripción” y “Componentes celulares” en el clúster 4, y “Energía” en el clúster 7.

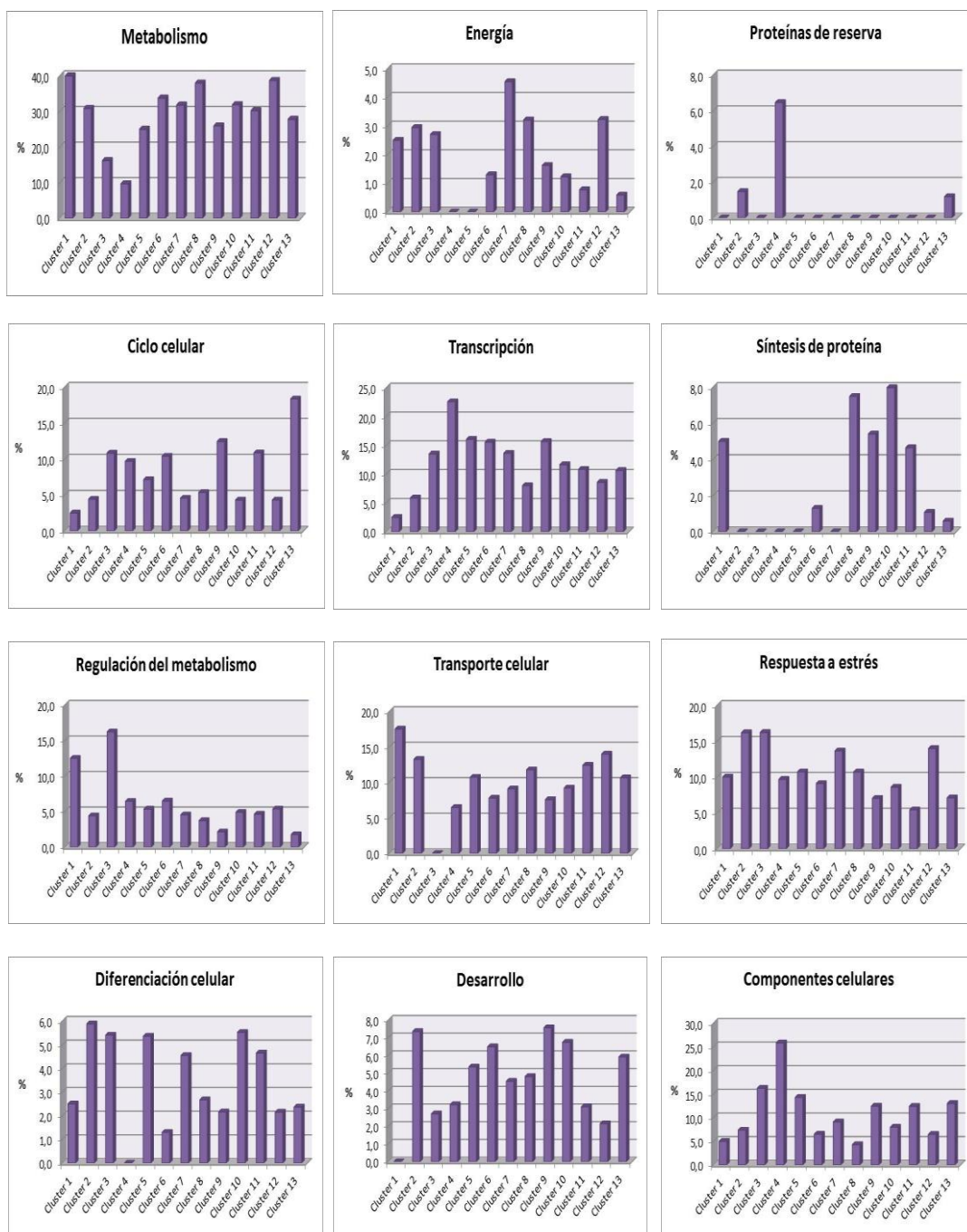


Figura 12: Distribución en categorías funcionales de los 13 clústeres identificados de los genes que aumentan su expresión a los 4dc vs. 4di (1.797 genes). El porcentaje en todos los clústeres representa al número de genes en esa categoría respecto al número total de genes de ese clúster.

4.2.2.1. Caracterización de los genes del Clúster 4

El clúster 4 comprende un grupo de 69 genes caracterizados por presentar un perfil de expresión que corresponde a una alta y *de novo* inducción a los 4dc manteniendo los niveles de expresión a los 8dc (Figura 11).

En la figura 13 se muestra la representación de los valores de expresión de los 69 genes (valores normalizados (\log_2) de “fold change”) utilizando un escala de color que va del rojo (+6) al negro (-6). Los genes se agruparon mediante el algoritmo “HCL” (clústeres jerárquicos) del programa MeV. En la Figura se aprecia la alta inducción después de 4 días de cultivo de todos los genes englobados en este clúster.

En la tabla 17 se presentan los valores de expresión de los genes del clúster 4 a 0di, 4di, 4dc y 8dc, ordenados según el nivel de inducción en 4dc determinado por las diferencias en los valores de expresión entre 4dc y 4di. El gen que presentó una mayor inducción correspondía al Contig3480_at (12,09) y el de menor inducción al gen AF109193_at (4,96) (valores no mostrados en la Tabla). El valor de expresión máximo en 4dc fue de 6,05 (Contig3480_at) y el mínimo de 2,16 (Contig13769_at).

Cuando se compararon los niveles de expresión entre 4dc y 8dc se observó que, mientras unos genes aumentaban su expresión en 8dc (Contig19110_at, Contig16272_at, Contig2587_at, HA09g16r_at), otros mantuvieron su nivel de expresión (Contig3480_at, Contig21354_at, Contig6278_at, Contig12924_at) y finalmente otros disminuyeron (Contig7855_s_at, Contig22399_at, Contig15557_at).

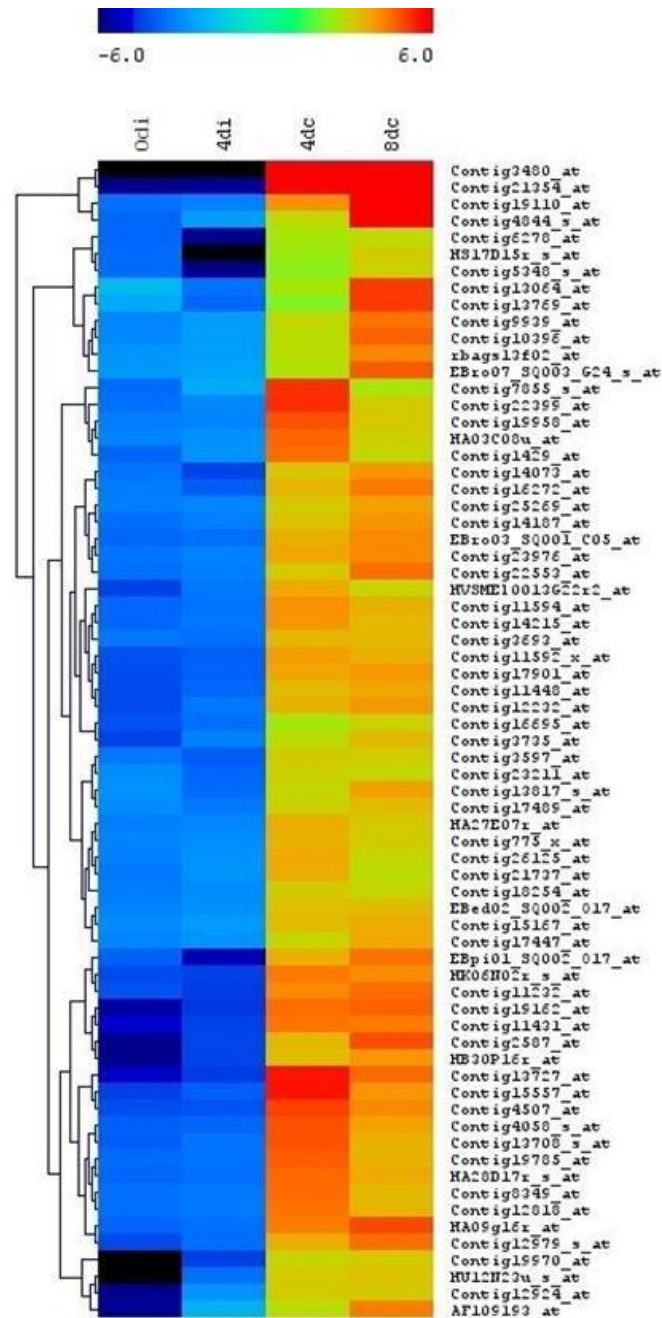


Figura 13: Representación de los valores de expresión de los 69 genes del clúster 4 mediante análisis de clústeres jerárquicos realizados con el programa HCL-MeV. Los valores corresponden a los datos de “fold change” normalizados (\log_2) de los puntos 0di, 4di, 4dc y 8dc. Los límites de la escala de color van del rojo (+6) al negro (-6).

Cuando estudiamos las homologías de secuencia de los genes del clúster 4 (Tabla 17, Tabla 25 del apartado de Anexos). El 17,4% de los genes (12) no presentaron homología con ningún gen caracterizado, el 13,0% (9 genes) presentaron homología con genes cuya función se desconoce, y el 69,5% (48 genes) presentaron homología con genes caracterizados.

Hay que destacar que de entre los 10 genes con una mayor diferencia de expresión entre 4dc y 4di, 5 genes no presentaban homología con ningún gen caracterizado o de función conocida.

Entre los genes caracterizados destacan el Contig3480_at que codifica una proteína Egg Apparatus-1 (EA1), los activadores transcripcionales *HAP3* (Contig21354_at), *HAP2* (Contig19162_at) y el gen que codifica una proteína Tapetum determinant 1 (TPD1) (Contig14507_at). Otros genes que destacan con menor diferencia de expresión son: *NUCLEAR FACTOR-Y* (Contig13817_s_at), los que codifican para proteínas con un dominio AP2 (Contig11448_s_at y Contig25269_at), para una proteína MADS1 (Contig13064_at), y los que codifican para expansinas y proteínas de membranas, como HVSMEI0013G22r2_at, Contig19110_at y Contig19770_at.

Se identificaron homologías de secuencia con genes que se expresan en células generativas como *LGC1* (*LILIUM GENERATIVE CELL*) en HA09g16r_at, HA03C08u_at y Contig3693_at, y con *ECA1* (gametogenesis related family protein) en HA28D17r_s_at, AF109193_at y Contig3597_at.

También se hallaron homologías con genes de endospermo como *MEGL7* (*MATERNALLY EXPRESSED GENE*) en el Contig23976_at, *TaPR60* (*ENDOSPERM TRANSFER CELL SPECIFIC PR60*) en el Contig775_x_at, y con inhibidores de tripsina como en el Contig7855_s_at y Contig4058_s_at.

Tabla 17: Valores de expresión de los genes (Probe set) del clúster 4 (datos de “fold change” normalizados con \log_2) en los puntos Odi, 4di, 4dc y 8dc, ordenados según las diferencias entre 4dc y 4di. Homologías de secuencia de los genes establecidas mediante el programa HarvEST Barley v. 1.74, y valores de similitud (“e-value”).

Probe Set	Odi	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
Contig3480_at	-6,34	-6,04	6,05	6,25	LOC_Os07g41410	3,00E-17	protein EGG APPARATUS-1
Contig21354_at	-5,94	-5,78	5,85	6,11	UniRef90_Q6YNJ7	2,00E-20	HAP3 transcriptional-activator
Contig13727_at	-5,10	-4,56	5,56	4,58	UniRef90_Q2R3F9	8,00E-16	LGC1, putative
Contig15557_at	-4,47	-3,89	5,56	3,95			
Contig4507_at	-4,22	-4,16	5,04	4,13	LOC_Os10g14020	3,00E-32	protein TPD1
Contig19162_at	-5,67	-4,62	4,52	4,68	UniRef90_Q2QM38	3,00E-78	CCAAT-binding transcription factor subunit B protein (HAP2)
EBpi01_SQ002_O17_at	-3,87	-5,39	3,64	4,45			
HK06N02r_s_at	-4,26	-4,48	4,37	4,08	LOC_Os03g61150	3,00E-28	expressed protein
Contig11431_at	-4,95	-4,40	4,43	4,31			
Contig11232_at	-4,13	-4,59	4,16	4,52	LOC_Os04g33860	2,00E-50	expressed protein
HS17D15r_s_at	-3,69	-6,21	2,45	3,14	LOC_Os06g04950	6,00E-44	protein early nodulin 93- ENOD93
Contig4058_s_at	-3,88	-3,77	4,82	3,79	LOC_Os04g44470	2,00E-12	protein KUN1 - Kunitz-type trypsin inhibitor precursor
Contig6278_at	-3,76	-5,89	2,61	2,84	LOC_Os01g21590	8,00E-56	protein homeodomain
Contig22399_at	-3,56	-3,12	5,28	3,19	LOC_Os02g53570	8,00E-13	protein DEFL74 - Defensin and Defensin-like DEFL family
Contig13708_s_at	-3,97	-3,48	4,85	3,58			
Contig19785_at	-3,66	-3,53	4,71	3,55	AT2G02140	9,00E-10	LCR72 (LOW-MOLECULAR-WEIGHT CYSTEINE-RICH 72)
Contig5348_s_at	-3,69	-5,90	2,25	3,00	AT4G10270	5,00E-21	wound-responsive family protein
HA28D17r_s_at	-3,78	-3,57	4,54	3,70	AT1G44191	6,00E-19	Encodes a ECA1 gametogenesis related family protein
Contig19958_at	-3,29	-3,18	4,87	3,19	LOC_Os01g52770	2,00E-29	protein GDSL-like lipase/acylhydrolase
Contig8349_at	-3,56	-3,44	4,56	3,50	LOC_Os08g04740	2,00E-13	expressed protein
HA09g16r_at	-3,82	-3,59	4,33	4,96	LOC_Os11g11680	6,00E-21	protein LGC1
Contig2587_at	-5,90	-4,37	3,50	4,87	LOC_Os12g38140	2,00E-48	expressed protein
Contig12818_at	-3,56	-3,40	4,42	3,50	LOC_Os02g15710	4,00E-35	plastocyanin-like domain containing protein
HB30P16r_at	-5,93	-4,37	3,37	3,97			
Contig11592_x_at	-4,17	-3,89	3,84	3,64			
Contig14073_at	-3,53	-4,44	3,25	3,98	LOC_Os05g08800	8,00E-60	DUF581 domain containing protein
Contig17901_at	-4,24	-3,86	3,77	3,98	LOC_Os05g10830	2,00E-83	protein proteophosphoglycan ppg4
Contig11594_at	-3,77	-3,54	4,07	3,64	LOC_Os01g40750	8,00E-14	expressed protein
Contig7855_s_at	-3,65	-2,33	5,20	2,54	UniRef90_P12940	4,00E-40	Bowman-Birk type trypsin inhibitor
HA03C08u_at	-3,18	-2,91	4,60	3,10	UniRef90_Q2R3F9	5,00E-20	LGC1, putative
Contig16272_at	-3,34	-3,95	3,51	4,40	LOC_Os06g15600	2,00E-41	plastocyanin-like domain containing protein
Contig14215_at	-3,78	-3,44	4,00	3,47	LOC_Os05g45460	6,00E-54	protein POEI52 - Pollen Ole e I allergen and extensin family
Contig19970_at	-7,08	-4,47	2,97	3,14	LOC_Os05g02630	3,00E-33	lysine-rich arabinogalactan protein 19
Contig1429_at	-3,81	-2,89	4,50	2,94	LOC_Os02g36690	2,00E-08	hypothetical protein
Contig19110_at	-3,53	-3,26	4,06	8,23	AT4G13340	3,00E-30	leucine-rich repeat /extensin family protein
Contig12979_s_at	-4,31	-3,63	3,69	4,51	AT1G31810	4,00E-05	actin binding protein
EBro03_SQ001_C05_at	-3,78	-3,61	3,63	4,14	LOC_Os10g22050	4,00E-11	expressed protein
Contig11448_at	-4,26	-3,79	3,42	3,76	LOC_Os03g08460	2,00E-46	AP2 domain containing protein
Contig3597_at	-3,42	-3,99	3,21	3,09	AT1G44191	6,00E-19	Encodes a ECA1 gametogenesis related family protein
HVSMEI0013G22r2_at	-4,48	-3,46	3,70	2,96	UniRef90_Q4W1F8	1,00E-146	Expansin EXPB11 protein
Contig3693_at	-3,43	-3,63	3,50	3,47	UniRef90_Q2R3F8	3,00E-22	LGC1, putative
Contig23976_at	-3,47	-3,25	3,75	4,14	LOC_Os02g13450	8,00E-05	MEGL7 - Maternally expressed gene MEG family protein
Contig12232_at	-4,30	-3,43	3,55	3,96	UniRef90_Q01I2Z	2,00E-82	OSIGBa0102D10.1 protein (H0823A09.7 protein)
Contig23211_at	-3,00	-3,77	3,07	2,93	LOC_Os01g10080	2,00E-20	expressed protein

Probe Set	0di	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
HA27E07r_at	-3,30	-3,14	3,65	3,22			
HU12N23u_s_at	-6,36	-3,56	3,22	3,28	LOC_Os07g41340	3,00E-36	B12D protein
Contig26125_at	-3,24	-2,94	3,72	2,95			
Contig13817_s_at	-2,94	-3,67	2,93	3,84	LOC_Os02g53620	8,00E-91	nuclear transcription factor Y subunit
Contig775_x_at	-3,18	-3,00	3,56	3,16	UniRef90_B2C4K0	1,00E-51	Endosperm transfer cell specific PR60
Contig14187_at	-3,61	-3,28	3,27	4,00	LOC_Os05g50940	5,00E-20	conserved hypothetical protein
Contig21737_at	-3,42	-2,88	3,66	2,84	LOC_Os06g28124	4,00E-30	protein glycosyltransferase
Contig22553_at	-3,62	-3,27	3,22	4,53	LOC_Os03g09200	1,00E-28	protein domain of unknown function DUF966
Contig17489_at	-3,01	-3,42	3,05	3,46	UniRef90_Q0DLG0	1,00E-115	Formin-like protein 14
Contig25269_at	-3,32	-3,17	3,19	3,80	LOC_Os05g28350	1,00E-21	AP2 domain containing protein
EBed02_SQ002_O17_at	-3,25	-2,95	3,39	3,44			
Contig15167_at	-3,03	-2,73	3,44	3,66	AT4G18670	5,00E-16	protein binding / structural constituent of cell wall
Contig18254_at	-3,34	-3,04	3,13	2,98			
Contig16695_at	-4,12	-3,62	2,54	3,00	LOC_Os02g53870	2,00E-30	expressed protein
Contig13064_at	-1,96	-3,54	2,57	5,15	UniRef90_A7YJG3	1,00E-104	MADS1 protein
Contig3735_at	-4,42	-3,24	2,83	3,47	UniRef90_Q8L698	2,00E-25	Defensin
Contig12924_at	-5,89	-2,85	3,15	3,14			
Contig13769_at	-2,37	-3,75	2,16	5,12	LOC_Os04g39110	3,00E-42	GASR4 - Gibberellin-regulated GASA/GAST/Snakin
Contig17447_at	-3,13	-2,86	2,97	3,73	UniRef90_Q6Z4E7	8,00E-85	Putative pectin-glucuronyltransferase
Contig9939_at	-3,14	-2,69	2,92	4,41	LOC_Os06g50080	2,00E-34	DUF581 domain containing protein
Contig4844_s_at	-3,75	-2,64	2,87	6,42	LOC_Os03g10110	2,00E-37	cupin domain containing protein
Contig10396_at	-3,08	-2,63	2,82	4,65	LOC_Os01g12070	6,00E-91	protein endoglucanase precursor
rbags13f02_at	-2,84	-2,63	2,81	4,19			
EBro07_SQ003_G24_s_at	-2,75	-2,49	2,64	4,75	LOC_Os02g37490	3,00E-18	glycine-rich cell wall structural protein
AF109193_at	-5,80	-2,16	2,80	4,32	UniRef90_Q9SES8	6,00E-96	ECA1 protein

4.2.2.2. Caracterización de los genes del Clúster 7

El clúster 7 comprende un grupo de 44 genes caracterizados por presentar un perfil de expresión con inducción específica a 4dc como se observa en la figura 14, dónde se muestra la representación de los valores de expresión de los 44 genes (valores normalizados (\log_2) de "fold change"), utilizando un escala de color que va del rojo (+6) al negro (-6). Los genes se agruparon mediante el algoritmo "HCL" (clústeres jerárquicos) del programa MeV. En la escala de color se destacan los altos niveles de expresión de los genes a los 4dc.

En la tabla 18 se presentan los valores de expresión de los genes del clúster 7 a 0di, 4di, 4dc y 8dc, ordenados según los niveles de inducción en 4dc, determinados por las diferencias en los valores de expresión entre 4dc vs. 4di (valores no mostrados en la tabla). El gen que presentó una mayor inducción correspondía al Contig4506_at (7,83) y el de menor inducción a HV05M17u_s_at (2,34), valores inferiores a los

observados en el clúster 4. Además, el valor de expresión máximo en 4dc fue de 6,30 (Contig4506_at) y el mínimo de 1,91 (Contig11699_at).

Cuando se compararon los niveles de expresión entre 4dc y 8dc se observó que los genes que disminuyeron más su expresión en 8dc fueron HA04g14r_at (-6,31) y Contig4506_at (-4,95), y los genes que menos disminuyeron su expresión en 8dc fueron los Contig21047_at (-1,46) y Contig23940_at (-1,46) (valores no mostrados en la tabla).

Los análisis de homologías de los 44 genes del clúster 7 (Tabla 18, Tabla 25 del apartado de Anexos) mostraron que el 25% (11 genes) no presentaban homología con ningún gen caracterizado, el 6,8% (3 genes) tenían homología con genes de función desconocida y el 68,2% (30 genes) presentaban homología con genes caracterizados. De entre los genes caracterizados destacan por presentar un mayor nivel de inducción el Contig4506_at que codifica una proteína TPD1 (Tapetum determinant 1) y el Contig151_at que codifica para la proteína ribosomal L24. También se identificaron genes asociados a respuesta a estrés, como el Contig25195_at que codifica una quitinasa, el Contig1858_at que codifica una peroxidasa y un factor transcripcional relacionado con la repuesta por ABA, *VirE2-INTERACTING PROTEIN 1* (*VIP1*- Contig5257_at).

Al igual que en el clúster 4, se encontraron genes con homología con genes que se expresan en el endospermo como el *RGE1* (*RETARDED GROWTH OF EMBRYO*) en el Contig14704_at, y dos *TaPR9* (*ENDOSPERM TRANSFER CELL SPECIFIC PR9*) en los Contig20000_s_at y Contig20000_at.

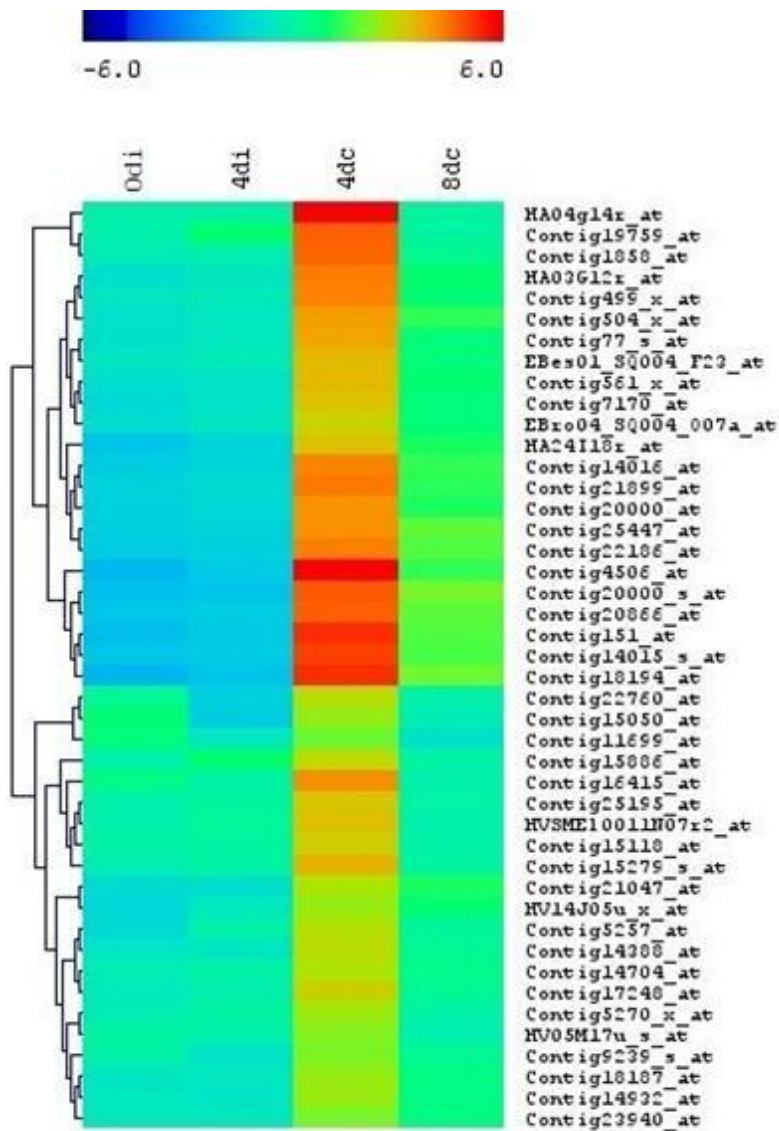


Figura 14: Representación de los valores de expresión de los 44 genes del clúster 7 mediante análisis de clústeres jerárquicos realizados con el programa HCL-MeV. Los valores corresponden a los datos de “fold change” normalizados (\log_2) de los puntos Odi, 4di, 4dc y 8dc. Los límites de la escala de color van del rojo (+6) al negro (-6).

Tabla 18: Valores de expresión de los genes (Probe set) del clúster 7 (datos de “fold change” normalizados con \log_2) en los puntos 0di, 4di, 4dc y 8dc, ordenados según las diferencias entre 4dc vs 4di. Homologías de secuencia de los genes establecidas mediante el programa HarvEST Barley v. 1.74, y valores de similitud (“e-value”).

Probe Set	0di	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
Contig4506_at	-2,04	-1,53	6,30	1,35	LOC_Os10g14020	2,00E-32	protein TPD1
Contig18194_at	-2,10	-1,75	5,28	1,96	LOC_Os02g56870	5,00E-12	protein DEFL38 - Defensin and Defensin-like DEFL family
Contig151_at	-1,89	-1,57	5,28	1,68	LOC_Os01g04730	1,00E-16	protein ribosomal protein L24
Contig14015_s_at	-1,69	-1,54	5,05	1,58	LOC_Os09g32526	4,00E-17	protein peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type
HA04g14r_at	-0,12	-0,09	6,45	0,14	LOC_Os02g07495	3,00E-05	hypothetical protein
Contig20000_s_at	-1,82	-1,75	4,76	2,07	UniRef90_B2C4J7	9,00E-25	Endosperm transfer cell specific PR9
Contig20866_at	-1,65	-1,51	4,65	1,77	LOC_Os02g07440	1,00E-05	protein DEFL78 - Defensin and Defensin-like DEFL family
Contig22186_at	-1,49	-1,37	4,26	1,69			
Contig14016_at	-1,50	-1,24	4,24	1,41	LOC_Os09g32526	4,00E-17	protein peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type
Contig21899_at	-1,34	-1,03	4,39	1,32			
Contig25447_at	-1,41	-1,28	4,05	1,85	LOC_Os12g29590	4,00E-08	expressed protein
Contig20000_at	-1,36	-1,19	4,00	1,19	UniRef90_B2C4J7	9,00E-25	Endosperm transfer cell specific PR9
HA03G12r_at	-0,95	-0,67	4,33	0,92	LOC_Os09g36900	7,00E-09	protein WD domain, G-beta repeat domain containing protein
Contig1858_at	-0,38	-0,24	4,62	0,38	LOC_Os07g44550	1,00E-133	protein peroxidase precursor
Contig499_x_at	-0,68	-0,53	4,26	0,82			
Contig19759_at	-0,15	0,00	4,65	0,04	LOC_Os06g11210	2,00E-37	protein 12-oxophytodienoate reductase
HA24I18r_at	-1,76	-1,24	3,28	1,14	LOC_Os03g31630	1,00E-10	protein OsSub29 - Putative Subtilisin homologue
Contig504_x_at	-0,78	-0,61	3,84	1,39			
Contig77_s_at	-0,85	-0,55	3,78	0,71	LOC_Os02g15710	5,00E-39	plastocyanin-like domain containing protein
Contig561_x_at	-0,90	-0,75	3,44	0,90			
Contig16415_at	0,58	-0,07	4,08	-0,20	LOC_Os04g43650	1,00E-173	protein L-allo-threonine aldolase
Contig22760_at	0,26	-1,38	2,76	-0,13	LOC_Os01g62990	3,00E-84	protein ATROPGEF7/ROPGEF7
Contig7170_at	-1,12	-0,70	3,30	0,73	LOC_Os04g46630	1,00E-112	protein expansin precursor
Contig15050_at	0,82	-1,49	2,42	-0,35	LOC_Os04g56930	1,00E-100	protein glycosyl hydrolases
EBes01_SQ004_F23_at	-0,66	-0,44	3,43	0,77			
EBro04_SQ004_O07a_at	-0,94	-0,67	3,02	0,73	LOC_Os01g11790	2,00E-22	protein GDSL-like lipase/acylhydrolase
Contig21047_at	-0,99	-0,92	2,64	1,18	LOC_Os02g07440	2,00E-09	protein DEFL78 - Defensin and Defensin-like DEFL family
Contig15279_s_at	-0,33	0,02	3,56	0,00			
Contig14388_at	-0,71	-0,66	2,81	0,32	AT2G29210	1,00E-04	splicing factor PWI domain-containing protein
Contig17248_at	-0,52	-0,21	3,07	0,32			
Contig25195_at	-0,18	0,09	3,27	-0,03	UniRef90_Q42839	1,00E-154	Chitinase
Contig14932_at	-0,57	-0,69	2,46	0,55	LOC_Os08g31340	4,00E-76	heavy metal-associated domain containing protein
HVSMEI0011N07r2_at	-0,18	0,18	3,33	-0,15			
Contig15118_at	-0,07	0,03	3,12	-0,03	LOC_Os06g11840	1,00E-126	protein trehalose phosphatase
HV14J05u_x_at	-1,17	-0,58	2,41	0,83			
Contig18187_at	-0,66	-0,56	2,41	0,63	LOC_Os04g43300	1,00E-103	BRCA1 C Terminus domain containing protein
Contig15886_at	-0,13	0,00	2,87	0,01	LOC_Os02g53590	2,00E-06	protein DEFL71 - Defensin and Defensin-like DEFL family
Contig9239_s_at	-0,10	-0,75	2,11	0,29	UniRef90_Q0UDA6	8,00E-06	Putative uncharacterized protein
Contig5257_at	-1,08	-0,11	2,72	0,12	LOC_Os05g47470	9,00E-47	VIP1 protein
Contig14704_at	-0,34	-0,06	2,62	0,49	AT1G49770	1,00E-31	RGE1 (RETARDED GROWTH OF EMBRYO 1)
Contig23940_at	-0,51	-0,53	2,06	0,60	LOC_Os07g02280	1,00E-119	protein pentatricopeptide
Contig11699_at	0,77	-0,59	1,91	-0,84	LOC_Os07g07410	1,00E-146	oxidoreductase, 2OG-Fe oxygenase family protein
Contig5270_x_at	-0,33	0,07	2,48	-0,07			
HV05M17u_s_at	0,00	-0,13	2,21	-0,19	LOC_Os10g13850	2,00E-58	POEI17 - Pollen Ole e I allergen and extensin family protein

Cuando estudiamos la distribución en categorías funcionales (Figura 15) de los genes de los clústeres 4 y 7 comparándola con la del total de genes que aumentaban su expresión en 4dc vs. 4di (“fold change” > 5.0, 1.797 genes), se observó que el

clúster 4 destacaba por una menor proporción de genes en la categoría “Metabolismo”, y un mayor número en las categorías “Componentes celulares”, “Transcripción”, y “Proteínas de reserva”. El clúster 7 destacaba por un mayor porcentaje de genes en las categorías “Energía” y “Respuesta a estrés”, y con menor porcentaje en la categoría de “Ciclo celular”.

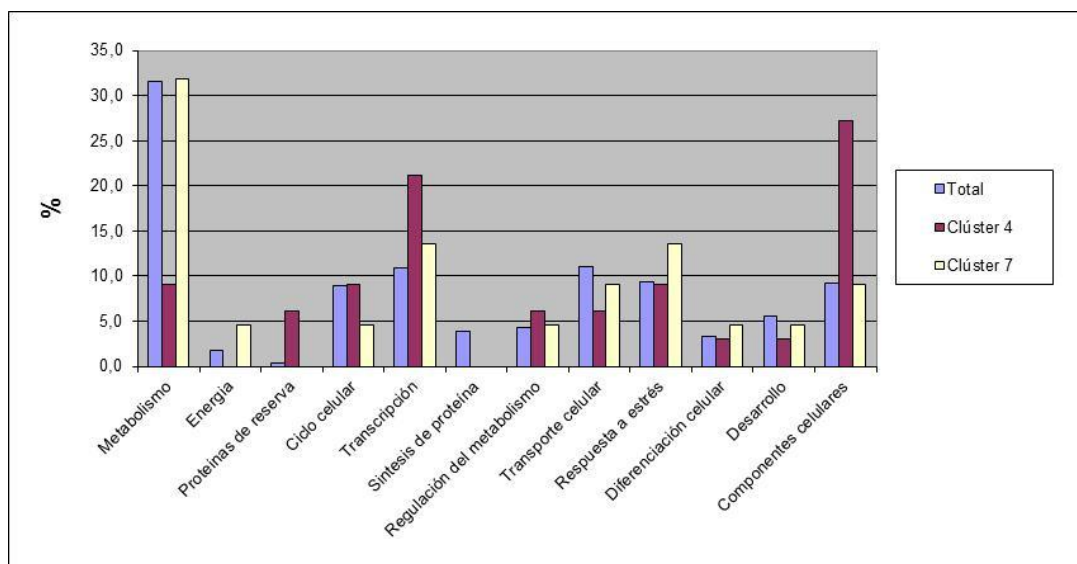


Figura 15: Distribución en categorías funcionales de los genes de los clústeres 4 y 7 y del total de genes que aumentaban su expresión en 4dc vs. 4di (“fold change” > 5.0), mediante el programa FunCatDB del MIPS.

4.2.3. Validación de la expresión de los genes seleccionados mediante PCR-Semiquantitativa

De los 113 genes de los clústeres 4 y 7, se seleccionaron 16 genes por su nivel, patrón de expresión y su homología con genes caracterizados para validar los resultados obtenidos en el análisis de transcriptómica. En la tabla 19 se presentan las homologías de los 16 genes, 13 genes del clúster 4 y 3 genes del clúster 7, y la abreviatura que se utilizará para cada uno de ellos a lo largo del documento. Los

genes con homologías con proteínas desconocidas se nombrarán como *Hv-ME* (*Hordeum vulgare* MICROSPORE EMBRYOGENESIS).

Tabla 19: Valores de expresión de los 16 genes seleccionados de los clústeres 4 y 7 (datos de “fold change” normalizados con \log_2) en los puntos 0di, 4di, 4dc y 8dc. Homologías de secuencia de los genes establecidas mediante el programa HarvEST Barley v. 1.74, y valores de similitud (“e-value”).

Probe Set	0di	4di	4dc	8dc	Número de entrada	E-value	Descripción
Clúster 4							
Contig3480_at	-6,34	-6,04	6,05	6,25	LOC_Os07g41410	3,00E-17	protein EGG APPARATUS-1-EA1
Contig21354_at	-5,94	-5,78	5,85	6,11	UniRef90_Q6YNJ7	2,00E-20	transcriptional-activator-HAP3
Contig7855_s_at	-3,65	-2,33	5,20	2,54	UniRef90_P12940	4,00E-40	Bowman-Birk type trypsin inhibitor-BBI
Contig4058_s_at	-3,88	-3,77	4,82	3,79	LOC_Os04g44470	2,00E-12	Kunitz-type trypsin inhibitor precursor-protein-KUN1
Contig12818_at	-3,56	-3,40	4,42	3,50	LOC_Os02g15710	4,00E-35	plastocyanin-like domain containing protein-PcL
HK06N02r_s_at	-4,26	-4,48	4,37	4,08	LOC_Os03g61150	3,00E-28	expressed protein-Hv-ME1
Contig17489_at	-3,01	-3,42	3,05	3,46	UniRef90_Q0DLG0	1,00E-115	Formin-like protein 14-FMNL14
Contig13064_at	-1,96	-3,54	2,57	5,15	UniRef90_A7YJG3	1,00E-104	protein MADS1
HS17D15r_s_at	-3,69	-6,21	2,45	3,14	LOC_Os06g04950.1	6,00E-44	protein early nodulin 93- ENOD93
Contig22553_at	-3,62	-3,27	3,22	4,53	LOC_Os03g09200	1,00E-28	DUF966 protein domain of unknown function-Hv-ME2
Contig23976_at	-3,47	-3,25	3,75	4,14	LOC_Os02g13450	8,00E-05	Maternally expressed gene MEG family protein-MEGL7
Contig14215_at	-3,78	-3,44	4,00	3,47	LOC_Os05g45460	6,00E-54	Pollen Ole e I allergen and extensin family-POEI52
Contig775_x_at	-3,18	-3,00	3,56	3,16	UniRef90_B2C4K0	1,00E-51	Endosperm transfer cell specific PR60
Clúster 7							
HA04g14r_at	-0,12	-0,09	6,45	0,14	LOC_Os02g07495	3,00E-05	hypothetical protein-Hv-ME3
Contig4506_at	-2,04	-1,53	6,30	1,35	LOC_Os10g14020	2,00E-32	protein TPD1
Contig19759_at	-0,15	0,00	4,65	0,04	LOC_Os06g11210	2,00E-37	protein 12-oxophytodiene reductase-OPR12

Entre los genes seleccionados destacaron por su mayor nivel de expresión en 4dc, el Contig3480_at que codifica una proteína Egg Apparatus-1 (EA1), el Contig21354_at que codifica un activador transcripcional HAP3, HA04g14r_at que codifica una proteína desconocida (Hv-ME2) y el Contig4506_at que codifica una proteína TPD1 (Tapetum determinant 1). Los dos primeros genes pertenecen al clúster 4 y los dos últimos al clúster 7.

En la figura 16 se muestra el perfil de expresión en los puntos 0di, 4di, 4dc y 8dc de los genes seleccionados caracterizados por niveles bajos de expresión en 0di que se mantenían en 4di, y que aumentaban en los 4dc.

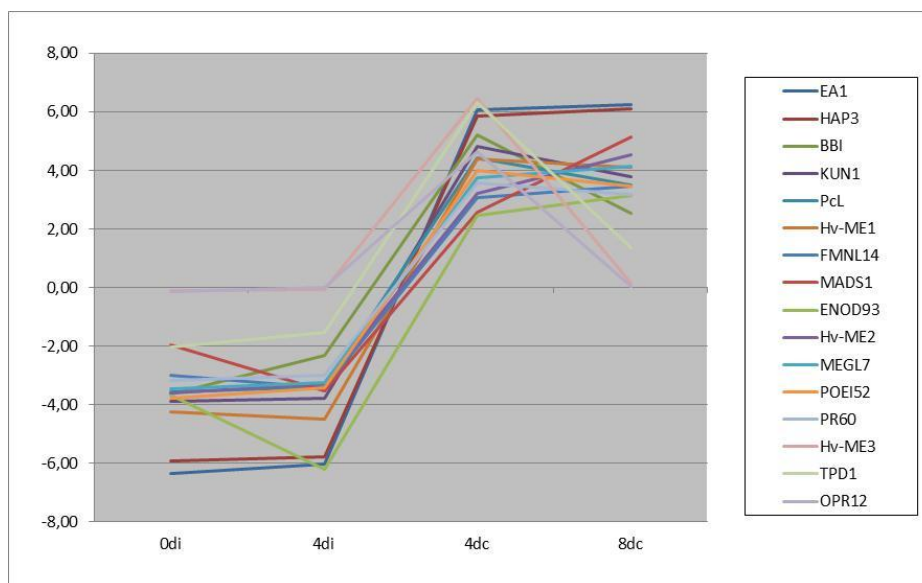


Figura 16: Perfil de expresión de los 16 genes seleccionados de los clústeres 4 y 7. Los valores corresponden a los datos de “fold change” normalizados con \log_2 , en los puntos 0di, 4di, 4dc y 8dc.

Para validar el patrón de expresión de estos genes mediante PCR-Semicuantitativa se utilizó la misma línea DH que se había utilizado en el análisis de transcriptómica (DH6148). Se tomaron muestras de anteras a los 0, 2 y 4 días de inducción por estrés (0di, 2di y 4di), y a los 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 16 días de cultivo (1dc, 2dc, 4dc, 6dc, 8dc, 12dc y 16dc). Se tomaron muestras de fases más tempranas y más avanzadas del cultivo respecto al experimento de transcriptómica, para estudiar con más detalle su perfil de expresión a lo largo del cultivo de anteras. A partir del cDNA obtenido de las muestras, según el método especificado en el apartado 3.4.3 de Materiales y Métodos, se realizaron las amplificaciones utilizando los cebadores correspondientes a los genes seleccionados, según se especifica en el apartado 3.4.4.1 (Tabla 7).

Además se utilizaron como controles del proceso los cebadores para los genes *ECA1* (*EARLY CULTURE ABUNDANT 1*) y *HvPG1* (*POLYGALACTURONASE 1*), descritos como específicos de las fases tempranas de la embriogénesis de la

microspora en cebada (Vrinten y col. 1999, Pulido y col. 2009), y como control el gen constitutivo *ACTINA*.

En la figura 17 se muestran los resultados de las PCR-Semicuantitativas en geles de agarosa. Todos los genes presentaron perfiles de amplificación que se ajustaban a los obtenidos anteriormente en el experimento de transcriptómica (Figura 16), ya que todos se habían inducido a los 4dc, cuando se comparaban con 0di y 4di.

Sin embargo, se pudieron determinar diferencias claras en el punto de inducción al iniciar la fase de cultivo, así mientras que los tres primeros genes *ENOD93*, *Hv-ME1* y *TPD1* se inducen a 1dc, otros 9 genes se inducen a 2dc (*EA1*, *HAP3*, *Hv-ME2*, *FMNL14*, *OPR12*, *BBI*, *PcL*, *Hv-ME3* y *MEGL7*), y otros 4 genes se inducen a los 4dc (*MADS1*, *POEI52*, *PR60* y *KUN1*).

El nivel de amplificación en 8dc también se ajustaba a los patrones de expresión de los clústeres 4 y 7 determinados en el experimento de transcriptómica (Figura 16). Así, los genes del clúster 7: *TPD1*, *OPR12* y *Hv-ME3* presentaron una disminución en el nivel de expresión a partir de los 6-8dc que se mantuvo hasta los 16dc. Así mismo, en los genes del clúster 4 todos salvo los genes *Hv-ME2*, *BBI*, y *POEI52* presentaban una expresión similar a los 4dc y 8dc, aunque en fases posteriores se apreciaron diferencias en los niveles de expresión. Mientras que en los genes *PR60* y *KUN1* se observaba una disminución progresiva de la expresión desde los 6dc hasta los 16dc, otros genes como *ENOD93*, *EA1*, *HAP3*, *Hv-ME2* y *Hv-ME1* mantuvieron su expresión, o la aumentaron progresivamente como *MADS1*.

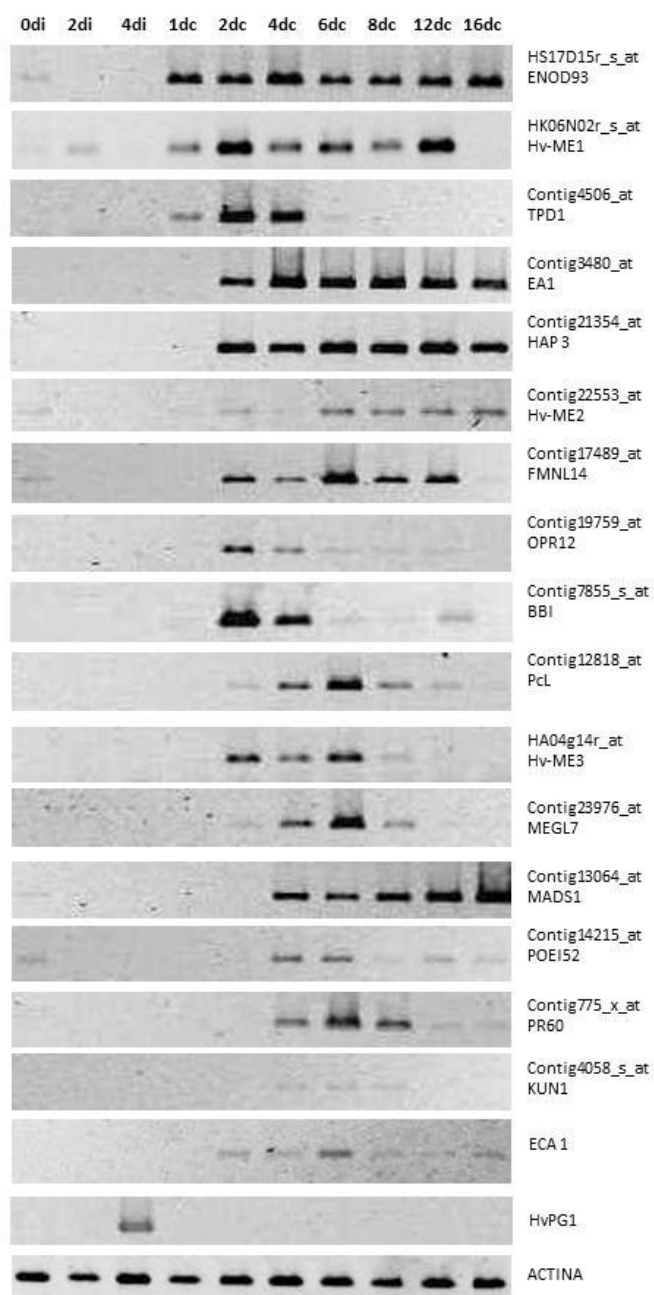


Figura 17: Análisis de expresión de los 16 genes seleccionados de los clústeres 4 y 7, y de los genes ECA1 y HvPG1 mediante PCR-Semicuantitativa y gel de agarosa, en los puntos 0, 2 y 4 días de inducción por estrés (Odi, 2di y 4di) y 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 16 días de cultivo (1dc, 2dc, 4dc, 6dc, 8dc, 12dc y 16dc) de la línea DH6148 de cebada. ACTINA es el gen constitutivo utilizado como control.

Los perfiles de expresión de los genes *PcL*, *FMNL14*, *MEGL7* y *POEI52* mostraron un pico de expresión a los 6dc. Muy pocos genes se expresaban antes del inicio del cultivo, sólo los genes *ENOD93*, *Hv-ME1*, *FMNL14* y *POEI52*, pero siempre con un nivel de expresión muy bajo y nunca después de 4 días de inducción por estrés (4di).

Los genes *ECA1* y *HvPG1*, en nuestro sistema mostraron patrones de expresión muy distintos. Mientras *HvPG1* sólo se expresa después de 4 días de inducción por estrés (4di), *ECA1* se induce en la fase de cultivo en 2dc y aumenta su expresión hasta 6dc, manteniéndola a niveles bajos hasta los 16dc.

4.3. Comparación de la expresión génica entre embriogénesis de la microspora y embriogénesis zigótica en cebada

Para comparar la expresión de los genes activados en la embriogénesis de la microspora con la expresión de dichos genes durante la embriogénesis zigótica, se estudiaron los valores de expresión de los 113 genes de los clústeres 4 y 7 en el experimento BB3 (“Transcription patterns during barley development”) realizado con el 22K “Barley1 GeneChip” (Affymetrix) (Druka y col. 2006) disponible en la base de datos PLEXdb. Los tejidos estudiados fueron: raíz, hoja, anteras, carióspside de 5, 10 y 16 días después de la polinización (DAP), embrión de 22 DAP y endospermo de 22 DAP, del genotipo Morex.

Para agrupar los genes según el patrón de expresión en los tejidos seleccionados del experimento BB3, se realizó un análisis de clústeres mediante el algoritmo “K-means” del programa MeV, en el cual se identificaron ocho clústeres de expresión (Figura 18).

De los ocho clústeres identificados, el clúster BB3-2 agrupaba genes que presentaban un nivel muy bajo de expresión en todos los tejidos estudiados, como el *Contig25195_at* que codifica para una quitinasa (Tabla 20). Dos de los clústeres presentan expresión específica de una fase de desarrollo: el clúster BB3-4 agrupa

genes que se expresaban en todos los tejidos estudiados pero con unos niveles más altos de expresión en cariósido 5 DAP, como el Contig3597_at que codifica una proteína ECA1 (gametogenesis related family protein) (Tabla 20), y el clúster BB3-5 con genes que se expresan en mayor medida en embrión a los 22 DAP como el Contig4507_at que codifica una proteína TPD1 (Tabla 20).

El clúster BB3-7 aunque presenta niveles de expresión elevados en cariósido 5 DAP, no presenta un patrón de expresión tan definido como el clúster BB3-4. El clúster BB3-1 agrupó genes que presentaban niveles altos de expresión en embrión de 22 DAP y en raíz, como el Contig2587_at que codifica una proteína desconocida (Tabla 20).

Los clústeres BB3-6 y BB3-8 agrupan genes que aumentaban su expresión a lo largo del desarrollo de la semilla (cariósido 5, 10 y 16 DAP) y también presentaban una elevada expresión en endospermo 22 DAP, como el Contig775_x_at que codifica una proteína Endosperm transfer cell specific PR60 (PR60) (Tabla 20).

Finalmente, los genes del clúster BB3-3 tienen niveles de expresión altos en todos los tejidos, aunque ligeramente superiores en cariósido, embrión y endospermo. Cuando comparamos la distribución en los clústeres BB3 de los genes de los clústeres 4 y 7, establecidos en el apartado 4.2.2, esta no fue homogénea. Así, conviene resaltar que el 60% de genes del clúster BB3-2, caracterizado por presentar un nivel muy bajo de expresión en todos los tejidos estudiados, correspondían a genes del clúster 7. También hay que destacar que el 82,4% de los genes del clúster BB3-1, caracterizado por presentar niveles altos de expresión en embrión de 22 DAP y en raíz, correspondían al clúster 4.

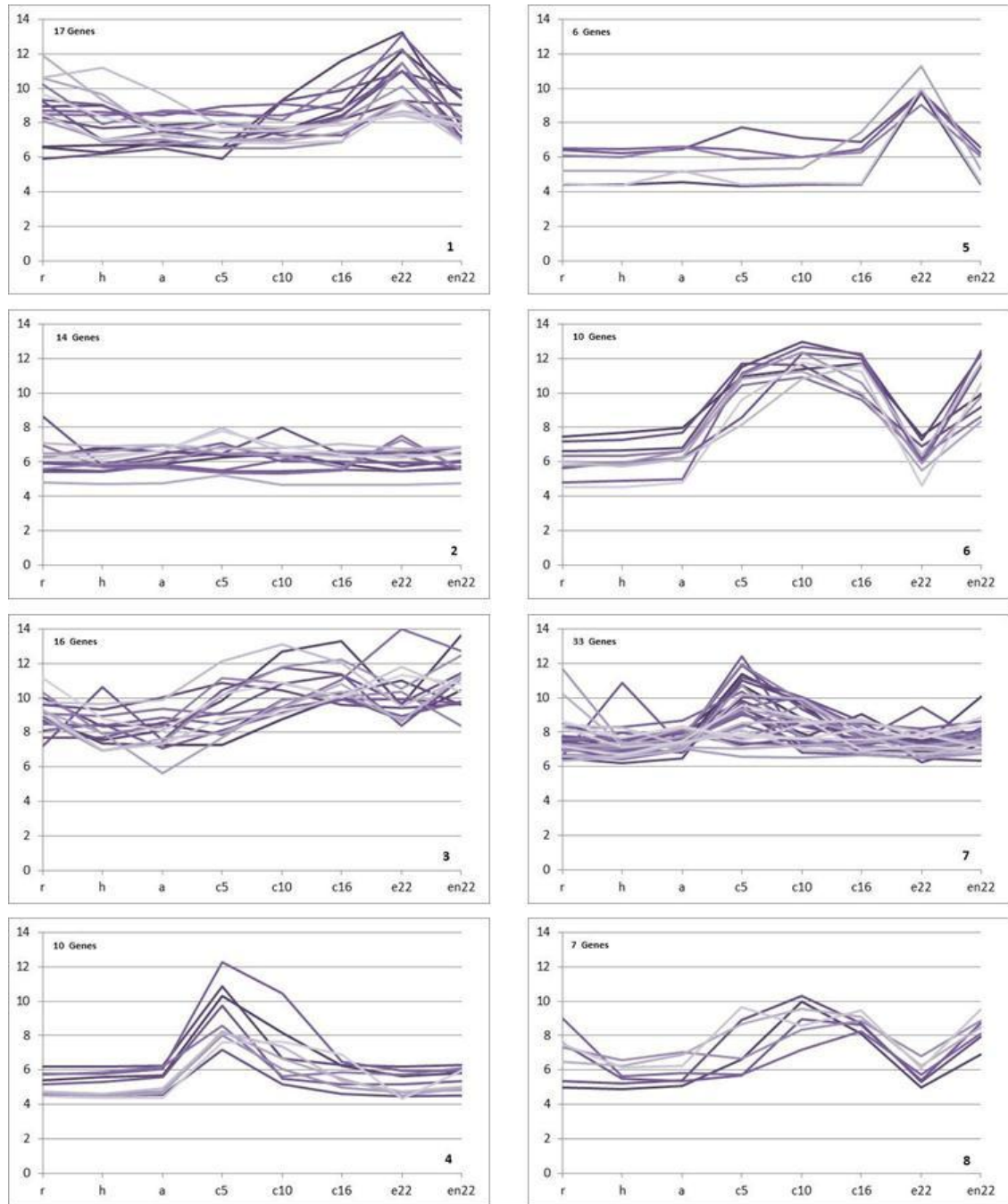


Figura 18: Análisis de clústeres mediante el algoritmo “k-means” (MeV) de los valores de expresión de los 113 genes de los clústeres 4 y 7, en el experimento BB3 (PLEXdb) (Druka y col. 2006), en los tejidos: raíz (r), hoja (h), anteras (a), cariópside de 5, 10 y 16 DAP (días después de la polinización) (c5, c10 y c16), embrión de 22 DAP (e22) y endospermo de 22 DAP (en22), del genotipo Morex.

Tabla 20: Valores de expresión de los 113 genes de los clústeres 4 y 7 en el experimento BB3 (“Transcription patterns during barley development”), en los tejidos: raíz (r), hoja (h), anteras (a), carióspside de 5, 10 y 16 días después de la polinización (DAP) (c5, c10 y c16), embrión de 22 DAP (e22) y endospermo de 22 DAP (en22), agrupados en clústeres de expresión mediante el algoritmo “k-means” (MeV). Homologías de secuencia de los genes establecidas mediante el programa HarvEST Barley v. 1.74.

Probe Set	r	h	a	c5	c10	c16	e22	en22	Descripción
Clúster BB3-1									
Contig12232_at	6.6	6.72	6.72	6.53	7.57	8.75	12.18	9.42	OSIGBa0102D10.1 protein (H0823A09.7 protein)
Contig3480_at	6.58	6.3	6.91	6.57	9.31	11.64	13.23	7.77	protein EGG APPARATUS-1
Contig9239_s_at	8.95	9.0	7.76	7.45	7.44	8.23	9.28	9.06	Putative uncharacterized protein
Contig13064_at	8.31	7.71	7.9	8.02	7.54	8.44	11.0	7.56	MADS1 protein
Contig14187_at	5.94	6.21	6.51	5.91	9.28	9.9	10.97	9.89	conserved hypothetical protein
Contig14215_at	9.22	7.0	7.49	7.06	7.66	8.33	11.49	7.15	protein POE152 - Pollen Ole e I allergen and extensin family
Contig16415_at	9.31	9.07	7.26	8.01	7.29	7.26	9.26	7.25	protein L-allo-threonine aldolase
Contig17489_at	8.74	8.63	8.44	8.94	9.11	8.82	11.01	8.31	Formin-like protein 14
Contig19110_at	8.48	8.46	8.61	8.45	8.46	9.17	13.13	9.49	leucine-rich repeat /extensin family protein
Contig2587_at	10.2	7.94	8.7	8.64	8.14	10.34	12.29	8.1	expressed protein
Contig7855_s_at	8.57	6.92	7.05	6.52	6.51	6.92	11.49	6.86	Bowman-Birk type trypsin inhibitor
rbags13f02_at	8.1	7.02	6.77	7.03	7.1	8.21	10.11	6.9	
Contig13817_s_at	10.57	9.67	7.25	7.03	6.95	7.45	9.34	7.65	nuclear transcription factor Y subunit
Contig16272_at	11.88	9.34	7.7	8.08	7.69	7.9	8.66	8.27	plastocyanin-like domain containing protein
Contig16695_at	10.65	11.22	9.66	7.78	7.72	7.98	8.45	7.75	expressed protein
Contig1858_at	8.49	6.98	7.38	6.91	6.82	6.97	9.19	6.92	protein peroxidase precursor
Contig19162_at	9.65	8.35	7.6	7.5	7.55	7.92	8.52	7.93	CCAAT-binding transcription factor subunit B protein (HAP2)
Clúster BB3-2									
Contig14388_at	5.53	5.47	5.89	6.24	6.48	5.85	5.46	5.59	splicing factor PWI domain-containing protein
Contig23940_at	6.3	6.87	6.57	6.46	6.46	6.43	6.59	6.48	protein pentatricopeptide
Contig25195_at	6.24	6.75	6.59	6.41	6.35	6.61	6.39	6.86	Chitinase
EBed02_SQ002_O17_at	5.92	5.74	6.18	6.46	7.97	6.45	5.75	6.04	
EBro04_SQ004_O07a_at	8.62	5.78	5.76	5.45	5.47	5.54	5.46	5.71	protein GDSL-like lipase/acylhydrolase
Contig15886_at	5.97	5.86	6.43	7.08	6.01	6.03	5.9	5.98	protein DEFL71 - Defensin and Defensin-like DEFL family
Contig21354_at	5.41	5.41	5.83	5.48	6.12	6.61	6.33	5.58	HAP3 transcriptional-activator
Contig21737_at	6.97	5.67	5.64	5.38	5.32	5.48	7.49	5.53	protein glycosyltransferase
Contig22553_at	5.58	5.89	5.92	6.92	6.3	5.69	7.26	5.6	protein domain of unknown function DUF966
HA04g14r_at	6.47	6.56	6.97	6.47	6.39	6.6	6.63	6.87	hypothetical protein
HA27E07r_at	4.82	4.71	4.77	5.21	4.66	4.67	4.66	4.74	
HVSMEI0011N07r2_at	7.08	6.91	6.99	6.74	6.81	7.03	6.76	6.85	
Contig22399_at	6.41	6.32	6.64	7.98	6.52	6.3	6.37	6.41	protein DEFL74 - Defensin and Defensin-like DEFL family
EBes01_SQ004_F23_at	6.19	6.17	6.68	7.77	6.89	6.44	6.18	6.62	
Clúster BB3-3									
Contig12979_s_at	8.89	7.37	7.27	7.29	8.79	10.1	8.7	10.46	actin binding protein
HS17D15r_s_at	8.66	7.56	8.1	9.86	12.67	13.32	9.62	13.62	WD domain, G-beta repeat domain containing protein
Contig11232_at	10.05	8.34	8.51	7.9	9.88	10.25	11.03	9.63	expressed protein
Contig11594_at	9.61	9.31	10.05	10.87	10.43	9.61	9.41	9.65	expressed protein
Contig14073_at	7.69	7.68	8.57	9.15	10.82	11.33	9.71	11.42	DUF581 domain containing protein
Contig19958_at	7.21	10.62	7.57	10.43	11.77	11.4	8.4	11.11	protein GDSL-like lipase/acylhydrolase
Contig23211_at	8.11	8.51	7.08	8.1	9.13	9.91	9.93	9.71	expressed protein
Contig3735_at	8.51	8.38	8.84	8.51	9.41	9.95	8.94	9.79	Defensin
Contig4844_s_at	9.08	8.94	9.36	9.06	9.49	11.07	13.98	12.76	cupin domain containing protein
Contig499_x_at	10.33	7.94	8.36	11.17	10.85	10.07	10.36	8.39	
Contig6278_at	8.81	6.95	7.4	10.19	11.82	12.24	10.54	12.45	protein homeodomain
Contig9939_at	9.22	7.96	5.62	7.71	9.83	10.36	8.68	11.25	DUF581 domain containing protein
HK06N02r_s_at	9.35	6.95	7.63	7.97	9.44	10.83	8.62	11.36	expressed protein
HVSMEI0013G22r2_at	9.73	9.65	9.9	12.11	13.11	12.03	9.51	11.11	Expansin EXPB11 protein
Contig5348_s_at	9.04	6.98	7.3	8.81	9.03	10.12	11.79	10.38	wound-responsive family protein
HV05M17u_s_at	11,17	8,81	8,06	10,22	10,92	10,05	11,36	10,82	POE117 - Pollen Ole e I allergen and extensin family protein

Probe Set	r	h	a	c5	c10	c16	e22	en22	Descripción
Clúster BB3-4									
Contig15167_at	5.39	5.57	5.69	10.32	8.15	6.24	5.62	5.84	protein binding / structural constituent of cell wall
Contig19970_at	6.18	6.21	6.26	10.88	6.69	6.29	6.22	6.29	lysine-rich arabinogalactan protein 19
HA03G12r_at	4.52	4.51	4.56	7.16	5.18	4.6	4.45	4.52	protein WD domain, G-beta repeat domain containing protein
Contig13708_s_at	5.16	5.3	5.61	9.73	5.52	5.17	5.18	5.36	
Contig14015_s_at	5.79	5.77	6.05	12.27	10.46	6.46	5.98	5.9	protein peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type
Contig19785_at	5.73	5.86	6.22	8.59	5.65	5.87	5.74	6.12	LCR72, peptidase inhibitor
Contig20000_at	4.69	4.6	4.75	8.02	6.04	4.98	4.72	4.83	Endosperm transfer cell specific PR9
Contig26125_at	4.65	4.45	4.67	8.25	6.66	5.52	4.51	4.92	
HA03C08u_at	4.73	4.63	4.92	8.14	7.39	5.37	4.74	5.04	LGC1, putative
Contig3597_at	4.47	4.38	4.4	7.61	7.64	6.92	4.33	5.97	Encodes a ECA1 gametogenesis related family protein
Clúster BB3-5									
HV14J05u_x_at	4.42	4.44	4.58	4.33	4.43	4.42	9.77	4.47	
EBpi01_SQ002_O17_at	6.42	6.25	6.49	7.75	7.14	6.91	9.78	6.57	
Contig17447_at	6.55	6.5	6.64	6.45	6.02	6.5	9.76	6.23	Putative pectin-glucuronyltransferase
Contig25269_at	6.1	6.0	6.63	5.94	6.0	6.29	9.03	6.05	AP2 domain containing protein
Contig4507_at	5.2	5.23	5.19	5.29	5.34	7.47	11.27	5.31	protein TPD1
Contig5270_x_at	4.47	4.37	5.2	4.41	4.5	4.46	10.03	4.55	
Clúster BB3-6									
Contig4506_at	7.46	7.68	7.98	10.97	11.37	11.69	7.49	9.95	protein TPD1
Contig775_x_at	6.61	6.65	6.8	11.54	12.98	12.18	7.27	12.25	Endosperm transfer cell specific PR60
Contig12818_at	7.18	7.29	7.68	11.7	11.62	9.83	6.92	9.2	plastocyanin-like domain containing protein
Contig4058_s_at	5.66	5.97	6.25	8.57	12.34	11.97	5.9	11.59	protein KUN1 - Kunitz-type trypsin inhibitor precursor
Contig561_x_at	4.8	4.91	4.99	11.14	12.67	12.27	6.12	12.48	
Contig77_s_at	6.32	6.34	6.6	10.43	10.92	9.59	6.36	8.65	plastocyanin-like domain containing protein
Contig8349_at	6.03	5.94	6.61	11.08	12.38	10.59	5.91	9.79	protein expressed protein
HA28D17r_s_at	5.79	5.84	6.23	10.81	11.24	9.98	5.51	8.37	Encodes a ECA1 gametogenesis related family protein
Contig14704_at	6.01	5.74	6.15	8.17	10.82	11.68	6.38	11.74	RGE1 (RETARDED GROWTH OF EMBRYO 1)
Contig504_x_at	4.51	4.5	4.8	9.6	11.74	11.23	4.6	10.6	
Clúster BB3-7									
Contig13727_at	7.68	7.65	7.96	10.71	8.81	7.78	7.56	7.81	LGC1, putative
Contig15557_at	7.04	6.98	7.25	11.4	9.58	7.0	7.03	6.95	
Contig11431_at	6.96	7.15	7.5	9.37	7.91	6.88	6.88	6.92	
HA09g16r_at	7.48	7.06	7.37	9.21	7.2	7.33	7.5	7.54	protein LGC1
HB30P16r_at	8.51	7.41	7.95	7.29	7.65	9.04	7.23	10.06	
Contig11592_x_at	6.5	6.19	6.5	11.03	9.81	6.72	6.47	6.33	
Contig17901_at	7.72	7.1	6.8	10.04	9.9	8.29	6.24	7.26	protein proteophosphoglycan ppg4
Contig1429_at	7.55	7.62	7.96	9.84	8.36	7.93	7.45	7.92	hypothetical protein
Contig3693_at	6.65	6.63	7.01	9.7	6.8	6.72	6.52	6.95	LGC1, putative
Contig18254_at	6.61	6.45	6.97	11.19	10.03	8.62	6.52	8.25	
Contig12924_at	7.56	7.51	7.59	11.91	9.31	7.59	7.42	7.6	
Contig13769_at	7.35	7.97	7.46	9.02	8.35	7.56	9.46	7.4	GASR4 - Gibberellin-regulated GASA/GAST/Snakin family protein
Contig10396_at	7.1	6.44	7.44	12.41	7.32	7.46	7.8	8.06	protein endoglucanase precursor
EBro07_SQ003_G24_s_at	6.6	10.89	7.16	8.42	7.46	7.13	8.12	7.18	glycine-rich cell wall structural protein
AF109193_at	7.79	7.53	7.97	7.36	7.27	7.43	7.28	7.42	ECA1 protein -Hordeum vulgare
Contig18194_at	8.27	8.29	8.66	10.34	8.37	8.49	8.21	8.61	protein DEFL38 - Defensin and Defensin-like DEFL family
Contig151_at	7.13	7.08	7.29	9.49	10.02	8.16	7.08	7.59	protein ribosomal protein L24
Contig20000_s_at	7.01	6.85	7.35	9.13	7.75	7.2	6.98	7.42	Endosperm transfer cell specific PR9
Contig20866_at	7.61	7.66	8.13	7.66	8.82	7.85	7.72	7.82	protein DEFL78 - Defensin and Defensin-like DEFL family
Contig14016_at	7.18	7.14	7.75	11.93	9.81	7.56	7.16	7.46	protein peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type

Probe Set	r	h	a	c5	c10	c16	e22	en22	Descripción
Clúster BB3-7									
Contig21899_at	6.9	7.05	7.45	8.3	9.58	8.29	7.01	7.89	
Contig25447_at	6.58	6.58	7.06	10.71	7.61	6.71	6.47	6.76	expressed protein
Contig19759_at	11.66	7.4	7.05	6.58	6.51	6.66	6.51	6.81	protein 12-oxophytodienoate reductase
HA24118r_at	7.29	7.16	7.76	9.34	8.73	7.99	7.18	7.55	protein OsSub29 - Putative Subtilisin homologue
Contig22760_at	7.07	7.4	7.15	7.02	7.22	7.39	7.86	7.32	protein ATROPGEF7/ROPGEF7
Contig15050_at	10.24	7.29	8.24	7.07	7.24	7.08	6.99	6.91	protein glycosyl hydrolases
Contig21047_at	6.34	6.53	6.93	10.19	9.94	7.9	6.63	7.41	protein DEFL78 - Defensin and Defensin-like DEFL family
Contig17248_at	6.61	6.57	7.37	8.1	7.0	6.84	6.77	6.86	
Contig14932_at	8.45	8.24	7.29	8.52	8.64	8.64	8.0	8.35	heavy metal-associated domain containing protein
Contig15118_at	8.21	7.71	8.35	7.52	8.45	8.77	7.67	8.84	protein trehalose phosphatase
Contig18187_at	8.27	7.13	7.43	7.86	7.65	7.54	7.9	7.12	BRCA1 C Terminus domain containing protein
Contig5257_at	7.16	6.68	7.5	9.58	8.88	6.97	7.25	6.92	VIP1 protein
Contig11699_at	8.65	7.71	8.29	7.73	7.61	8.21	7.66	8.45	oxidoreductase, 2OG-Fe oxygenase family protein
Clúster BB3-8									
Contig15279_s_at	4.99	4.9	5.07	6.6	9.99	8.1	5.0	6.91	
Contig22186_at	5.36	5.22	5.39	8.9	10.32	8.74	5.32	7.92	
HU12N23u_s_at	8.45	8.24	7.29	8.52	8.64	8.64	8.0	8.35	B12D protein
EBro03_SQ001_C05_at	9.02	5.65	5.81	5.72	7.19	8.25	5.73	8.11	expressed protein
Contig11448_at	7.34	6.57	7.03	6.66	8.33	8.87	6.81	8.86	AP2 domain containing protein
Contig23976_at	6.5	6.27	6.91	8.67	9.56	9.09	6.27	8.49	MEGL7 - Maternally expressed gene MEG family protein
Contig7170_at	7.51	6.17	6.25	9.65	8.56	9.46	6.13	9.51	protein expansin precursor

Se analizaron los perfiles de expresión en el experimento BB3 de los 16 genes seleccionados en el apartado anterior (Figura 19), observándose que los genes resultaban ser representativos de los distintos clústeres BB3 determinados. Así, algunos genes aumentan su nivel de expresión en cariósido y endospermo como los genes *PcL*, *KUN1* y *PR60* (clúster BB3-6), los genes *ENOD93* y *Hv-ME1* (clúster BB3-3) y el gen *MEGL7* (clúster BB3-8).

Otros presentan niveles altos de expresión en embrión como los genes *BBI*, *EA1*, *POEI52*, *FMNL14* y el gen *MADS1* que pertenecen al clúster BB3-1, ó en raíz como el gen *OPR12* del clúster BB3-7. Finalmente los genes *HAP3*, *Hv-ME2* y *Hv-ME3* que pertenecían al clúster BB3-2 se caracterizaron por mantener el mismo nivel de expresión en todos los estadios de desarrollo.

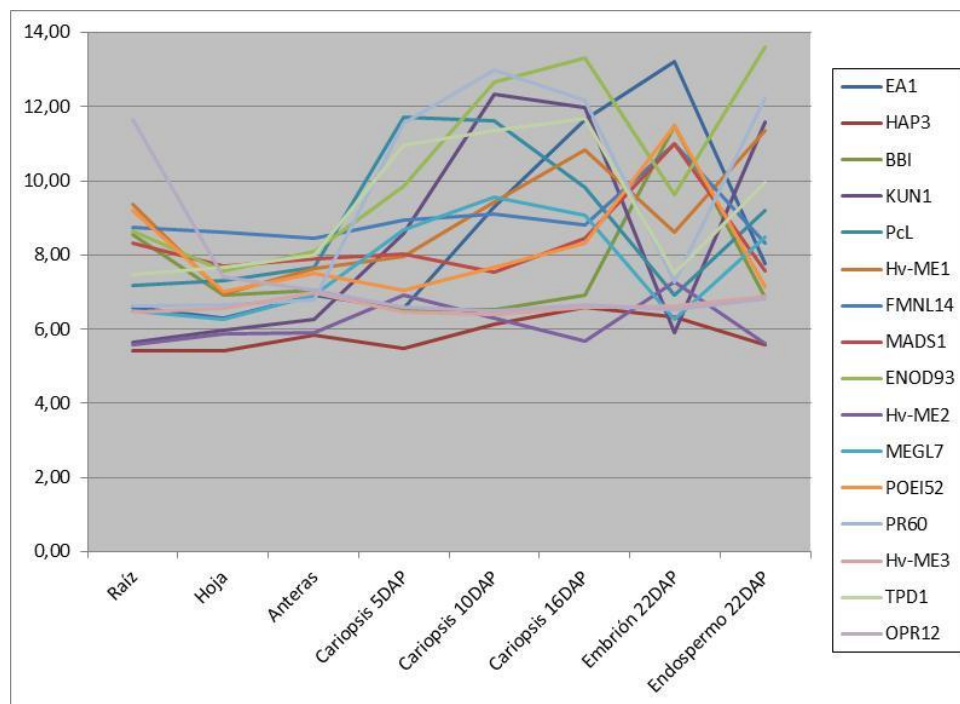


Figura 19: Perfil de expresión de los 16 genes seleccionados de los clústeres 4 y 7 con los valores del experimento BB3 (PLEXdb) (Druka y col. 2006), en los tejidos raíz, hoja, anteras, cariopside de 5, 10 y 16 DAP y embrión y endospermo de 22 DAP.

Para validar los datos del experimento de transcriptómica del experimento BB3 en los 16 genes seleccionados, se realizaron amplificaciones mediante PCR-Semicuantitativa de dichos genes en tejidos correspondientes a las etapas tempranas del desarrollo de la semilla, en raíz y hoja de la línea DH6148. Para ello se tomaron muestras de ovario maduro (ov), cariopside a los 1, 2, 4, 6 y 8 días después de la polinización (DAP) (c1, c2, c4, c6 y c8), embrión a los 10 y 12 DAP (e10 y e12), raíz (r) y hoja (h) de plántula. Se extrajo el RNA, se sintetizó el cDNA y se realizaron las amplificaciones utilizando los mismos cebadores que en el apartado 4.2.3. También se incluyeron en el análisis los genes *ECA1* y *HvPG1* y el gen constitutivo *ACTINA*.

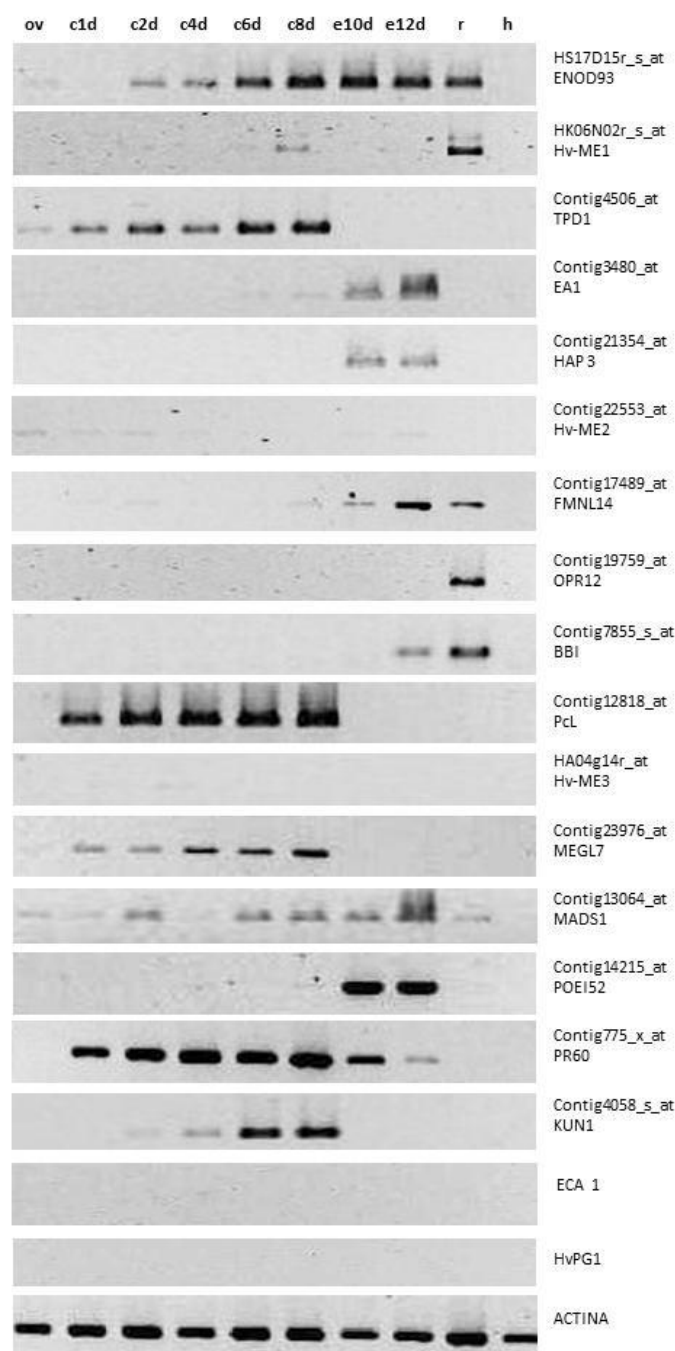


Figura 20: Análisis de expresión por PCR-Semiquantitativa de los 16 genes seleccionados, y de los genes ECA1 y HvPG1, en ovario maduro (ov), carióspside de 1, 2, 4, 6 y 8 DAP (c0d, c1d, c2d, c4d, c6d y c8d), embrión a los 8 y 10 DAP (e10 y e12d), raíz (r) y hoja (h), en la línea DH6148. ACTINA es el gen constitutivo utilizado como control.

Los resultados de la amplificación se muestran en la figura 20. Se pudo observar que la mayoría de los genes se ajustaban a los perfiles de expresión del experimento BB3. Así los genes *TPD1*, *PcL*, *MEGL7* y *KUN1* se expresaron únicamente a lo largo del desarrollo de la cariósida, pero no en embrión. Varios genes (*ENOD93*, *Hv-ME1*, *FMNL14*, *OPR12* y *BBI*) se expresaron en raíz, y además *OPR12* de forma específica.

Los genes *ENOD93*, *EA1*, *HAP3*, *BBI*, *MADS1*, *POEI52* y *PR60* se expresaban en embriones, pero sólo *EA1*, *HAP3* y *POEI52* de forma específica. Sin embargo, los genes *HAP3* y *POEI52* presentaban un nivel de expresión bajo en todos los tejidos en el experimento BB3. Otras discrepancias se observaron en el gen *Hv-ME1* con un nivel de expresión alto en cariósida y endospermo 22DAP en el experimento BB3, y que en este análisis presentó expresión casi específica en raíz. Por otra parte los genes *Hv-ME2* y *Hv-ME3* presentaron muy bajos niveles de expresión en todos los tejidos. Finalmente, los genes *ECA1* y *HvPG1* no se expresaron en ninguno de los tejidos analizados.

4.4. Comparación de la expresión génica en tres líneas de cebada de distinta respuesta a la embriogénesis de la microspora

Para comprobar si existía una asociación entre el perfil de expresión de los genes seleccionados y la respuesta embriogénica, se compararon los perfiles de expresión de los genes seleccionados en la línea de alta respuesta embriogénica DH6148 con los perfiles de expresión de líneas de baja respuesta (DH6183 y DH6004).

En primer lugar se estudiaron los perfiles de expresión en la línea DH6183 que se caracteriza por un elevado número de microsporas que dividen, pero que mayoritariamente forman estructuras poco diferenciadas que no desarrollan embriones (Apartado 4.1). Se tomaron muestras de anteras a 0 y 4 días de inducción por estrés (0di y 4di) y a los 4 y 8 días de cultivo (4dc y 8dc) de la línea DH6183, se extrajo el RNA y se sintetizó el cDNA.

Para las PCR-Semicuantitativas se utilizaron los cebadores correspondientes a los 16 genes seleccionados, el gen *ECA1* y el gen de expresión constitutiva *ELONGATION FACTOR 1 ALPHA (EF-1 α)*.

Los resultados de las PCR-Semicuantitativas en la línea DH6183, y los obtenidos previamente en la línea DH6148, se muestran en la Figura 21.

Se pudo observar que en DH6183 todos los genes seleccionados se inducían al inicio de la fase de cultivo (4dc) como en DH6148, aunque en algunos genes se apreciaban diferencias significativas entre las líneas, tanto en los perfiles como en los niveles de expresión. Así los tres genes (*Hv-ME3*, *TPD1* y *OPR12*) del clúster 7, caracterizados por un pico de inducción a los 4dc en la línea DH6148, en la línea DH6183 mantenían o disminuían ligeramente los niveles de expresión de 4dc en 8dc.

Entre los genes del clúster 4, caracterizado por inducción a los 4dc y mantenimiento o ligero cambio en el nivel de expresión en 8dc, también se observaron diferencias de expresión entre las líneas. Los genes *FMNL14* y *MADS1* en los que aumentaba la expresión a los 8dc en DH6148, en la línea DH6183 se mantenía el nivel de expresión entre 4dc y 8dc. Por el contrario, el gen *PcL* que mantenía el nivel de expresión entre 4dc y 8dc en DH6148, en la línea DH6183 se producía un aumento en 8dc. En los genes *BBI*, *MEGL7*, *POEI52*, *PR60* y *KUN1* las diferencias entre líneas se debían a un cambio en el nivel de expresión, siendo mayor en la línea DH6183.

No se observaron diferencias reseñables entre las dos líneas en la expresión de los genes *ENOD93*, *Hv-ME1*, *EA1*, *HAP3*, *Hv-ME2* y *PcL*. Finalmente el gen *ECA1* alcanzó el mayor nivel de expresión en 8dc en DH6148, y en 4dc en DH6183. En este gen se observó cierta inestabilidad entre las distintas repeticiones.

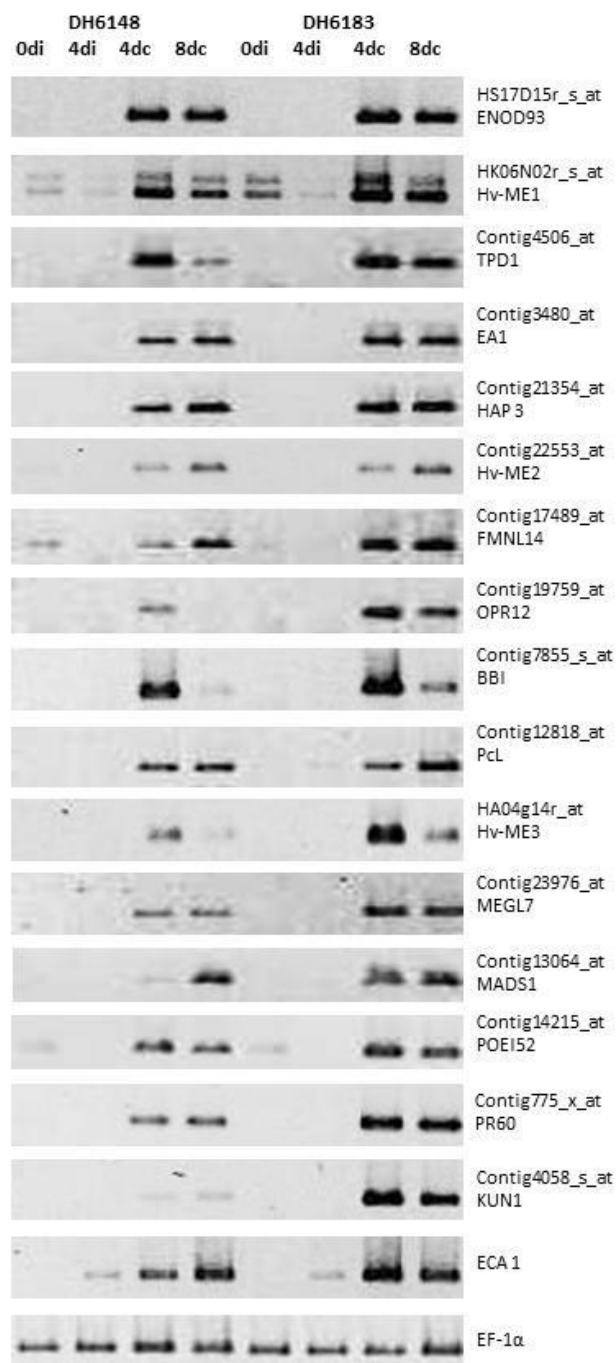


Figura 21: Análisis de expresión de los 16 genes seleccionados de los clústeres 4 y 7, y del gene ECA1 mediante PCR-Semiquantitativa y gel de agarosa, en los puntos 0 y 4 días de inducción por estrés (0di y 4di) y 4 y 8 días de cultivo (4dc y 8dc) de la líneas DH 6148 y DH6183 de cebada. EF-1α es el gen constitutivo utilizado como control.

Como las diferencias en los perfiles de expresión entre las dos líneas estudiadas se limitaban a unos pocos genes, y en muchos casos se debían a ligeras diferencias en el nivel de expresión, se continuó con la caracterización pero limitando el estudio a los genes que habían presentado mayores diferencias, aumentando el número de líneas estudiadas y el número de muestras analizadas. La línea incluida en este nuevo análisis (DH6004) era una línea de muy baja respuesta al cultivo de anteras con un número muy bajo de divisiones que daba lugar a un número bajo de embriones. Se tomaron muestras de anteras correspondientes a 0 y 4 días de inducción por estrés (0di y 4di) y a 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 16 días de cultivo (1dc, 2dc, 4dc, 6dc, 8dc, 12dc y 16dc) de las líneas DH6183 y DH6004. Se extrajo el RNA y se sintetizó el cDNA como se indica en el apartado 4.2.2. Para los estudios de expresión génica mediante PCR-Semicuantitativa se utilizaron los cebadores correspondientes a los genes seleccionados y se utilizó el gen constitutivo *ACTINA*, debido a que su expresión fue más uniforme en las tres líneas DHs.

En la figura 22 se muestra el resultado de la amplificación en las líneas DH6183 y DH6004 comparándolo con los resultados obtenidos previamente en la línea DH6148 (Apartado 4.2.3). Se observaron diferencias significativas en los perfiles y niveles de expresión entre las tres líneas. En los genes del clúster 7 (*TPD1*, *OPR12* y *Hv-ME3*) la inducción se producía en el mismo punto en las tres líneas (1dc y 2dc). Sin embargo, la disminución de la expresión especialmente en el caso de *TPD1* se produjo en 6dc en DH6148, en 8dc en DH6183 y en 12dc en DH6004. El gen *BBI* que se comportaba de forma parecida a los genes del clúster 7 en la línea DH6148 (Figura 21), en las otras dos líneas apenas se observó expresión, demostrando cierta inestabilidad ya que si se había determinado su expresión en la línea DH6183 en el experimento anterior. Tanto el gen *FMNL14* como el gen *MADS1* mostraron diferencias en el punto de inducción siendo sensiblemente más tarde en las líneas DH6183 y DH6004 que en la línea DH6148. Finalmente, confirmamos los resultados obtenidos en el apartado anterior en los genes *PR60* y *KUN1*, ya que *PR60* mostró un mayor nivel de expresión en las líneas DH6183 y DH6004 que en la línea DH6148, mientras que el gen *KUN1* sólo se inducía fuertemente en la línea DH6183.

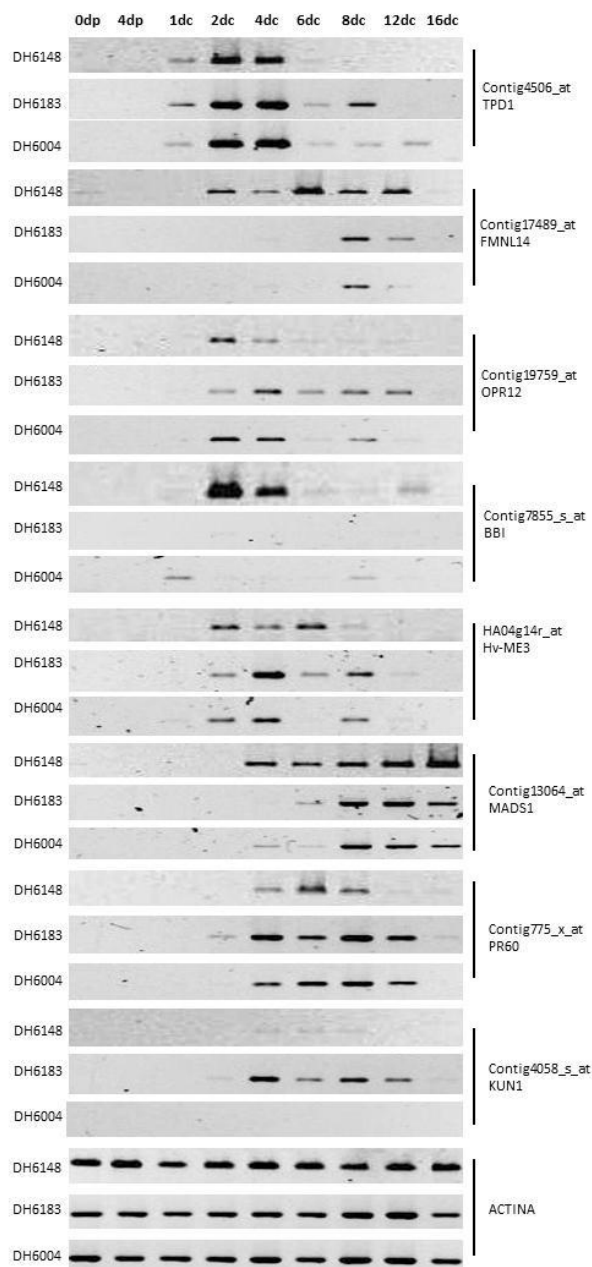


Figura 22: Análisis de expresión de los 8 genes de los clústeres 4 y 7 con mayores diferencias de expresión entre las líneas DH6148 y DH6183, mediante PCR-Semiquantitativa y gel de agarosa, en los puntos 0 y 4 días de inducción por estrés (0di y 4di), 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 16 días de cultivo (1dc, 2dc, 4dc, 6dc, 8dc, 12dc y 16dc) en la líneas DH6148, DH6183 y DH6004 de cebada. ACTINA es el gen constitutivo utilizado como control.

4.5. Estudio de la expresión de genes implicados en la síntesis, degradación y regulación de Acido Abscísico (ABA) durante la embriogénesis de la microspora en cebada

Entre los mecanismos moleculares asociados a la embriogénesis de la microspora se han descrito los modulados por ABA. Aunque entre los genes del clúster 7 se había identificado un gen con homología con *VP1* que interviene en la regulación por ABA, los bajos niveles de expresión de muchos genes implicados en síntesis, degradación y regulación de ABA, hacen que estos queden fuera de los niveles restrictivos de selección que se han utilizado en este trabajo. Por ello se analizaron los perfiles de expresión de genes candidatos, mediante qRT-PCR utilizando cebadores correspondientes a genes previamente identificados por otros autores (Apartado 3.4.5.1 de Materiales y Métodos).

Los genes analizados fueron: *ZEAXANTHIN EPOXIDASE (ZEP2)* y *ALDEHYDE OXIDASE (AO5a)* asociados a síntesis de ABA; *ABA 8' HYDROXYLASE (ABA8'OH)* y *B-GLUCOSIDASE (BG3)* asociados a oxidación y deconjugación de ABA; *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 1 y 5 (ABI1b y ABI5)*, *FUSCA 3 (FUS3)*, *VIVIPAROUS 1 (VP1)* y *FLOWERING TIME CONTROL PROTEIN A (FCA)* asociados a regulación por ABA. Se tomaron muestras de anteras a los 0, 2 y 4 días de inducción por estrés (0di, 2di y 4di) y a los 1, 2, 4, 8 y 12 días de cultivo (1dc, 2dc, 4dc, 8dc y 12dc) de la línea DH6148. Se extrajo el RNA de tres replicas biológicas y se sintetizó el cDNA. Los niveles de expresión de estos genes fueron analizados utilizando qRT-PCR, utilizando como control el gen β -*TUBULIN*. Las amplificaciones se realizaron en dos replicas técnicas de cada réplica biológica. La tabla 27 del apartado de Anexos muestra los valores de Δ CT, $\Delta\Delta$ CT, $2^{-\Delta\Delta$ CT} y las medias de cada réplica biológica y replica técnica utilizados para el análisis.

Los resultados del análisis mediante qRT-PCR de los genes de síntesis y degradación de ABA se muestran en la figura 23. Los genes de síntesis de ABA mostraron perfiles de expresión distintos. Así, el gen *ZEP2* presentó niveles de

expresión altos en 0di, que bajaron durante toda la fase de inducción por estrés y en las primeras etapas del cultivo, aumentando ligeramente a los 4dc. El gen *AO5a* se activó a los 2di, bajando posteriormente al final del tratamiento de estrés (4di) a niveles muy bajos, manteniéndose a esos niveles hasta los 8dc donde presentó un pico de inducción con un nivel de expresión casi dos veces superior al obtenido a los 2di. El gen de degradación de ABA *ABA8'OH* se expresaba en las anteras antes del tratamiento de estrés, pero su expresión bajo durante el tratamiento de inducción por estrés y en los primeros días de cultivo, aumentando a los 4dc y alcanzando un máximo nivel de expresión en 8dc. El gen de deconjugación *BG3* presentaba un perfil de expresión parecido al de *ABA8'OH*, aunque en este caso la activación en la fase de cultivo se observaba a los 8-12dc.

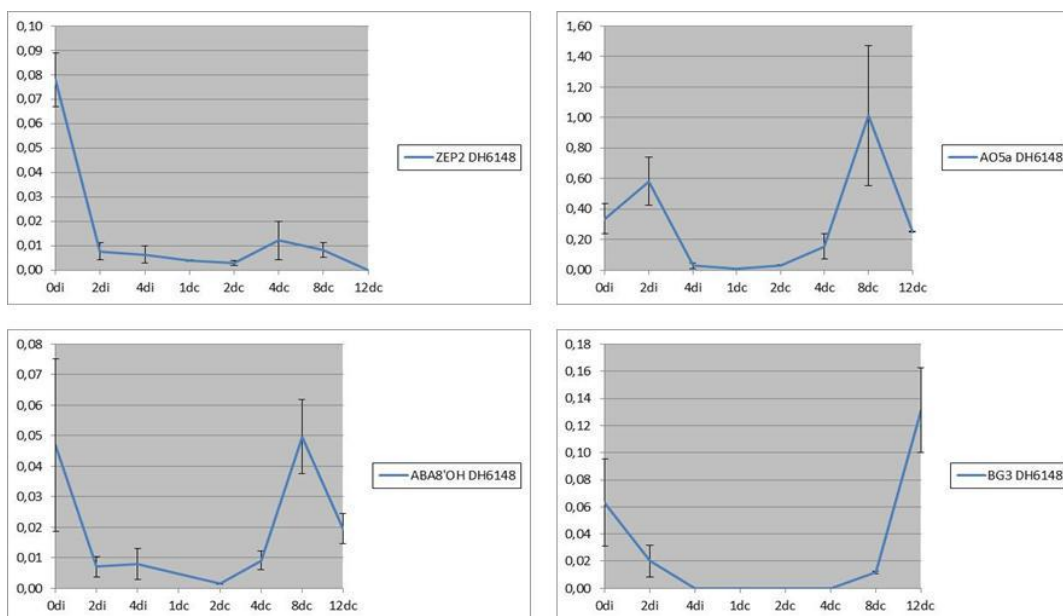


Figura 23: Perfiles de expresión de los genes de síntesis (*ZEP2* y *AO5a*) y degradación (*ABA8'OH* y *BG3*), cuantificados mediante qRT-PCR a los 0, 2 y 4 días de inducción por estrés (0di, 2di y 4di) y a los 1, 2, 4, 8 y 12 días de cultivo (1dc, 2dc, 4dc, 8dc y 12dc) de la línea DH6148 de cebada. β -TUBULIN es el gen utilizado como control.

Los resultados del análisis mediante qRT-PCR de los genes relacionados con regulación por ABA se muestran en la figura 24. El gen *ABI1b* presentó un aumento en el nivel de expresión durante la fase de inducción por estrés a los 2di, la cual

disminuyó considerablemente en la fase final del tratamiento y se mantuvo baja hasta que aumentó ligeramente a los 8dc. El gen *ABI5* también se indujo a los 2di y mantuvo el nivel de expresión a 4di, aunque disminuyó su expresión en las primeras fases del cultivo, aumentando significativamente a los 8dc hasta dos veces más respecto a los niveles de expresión alcanzados a los 2di y 4di (Figura 24). Los genes *FCA*, *VP1* y *FUS3* presentaron perfiles de expresión similares con una activación a los 8dc, siendo el gen *FUS3* el que presentó los mayores niveles de expresión de todos los genes, llegando a ser entre 40 y 100 veces superior al resto de los genes.

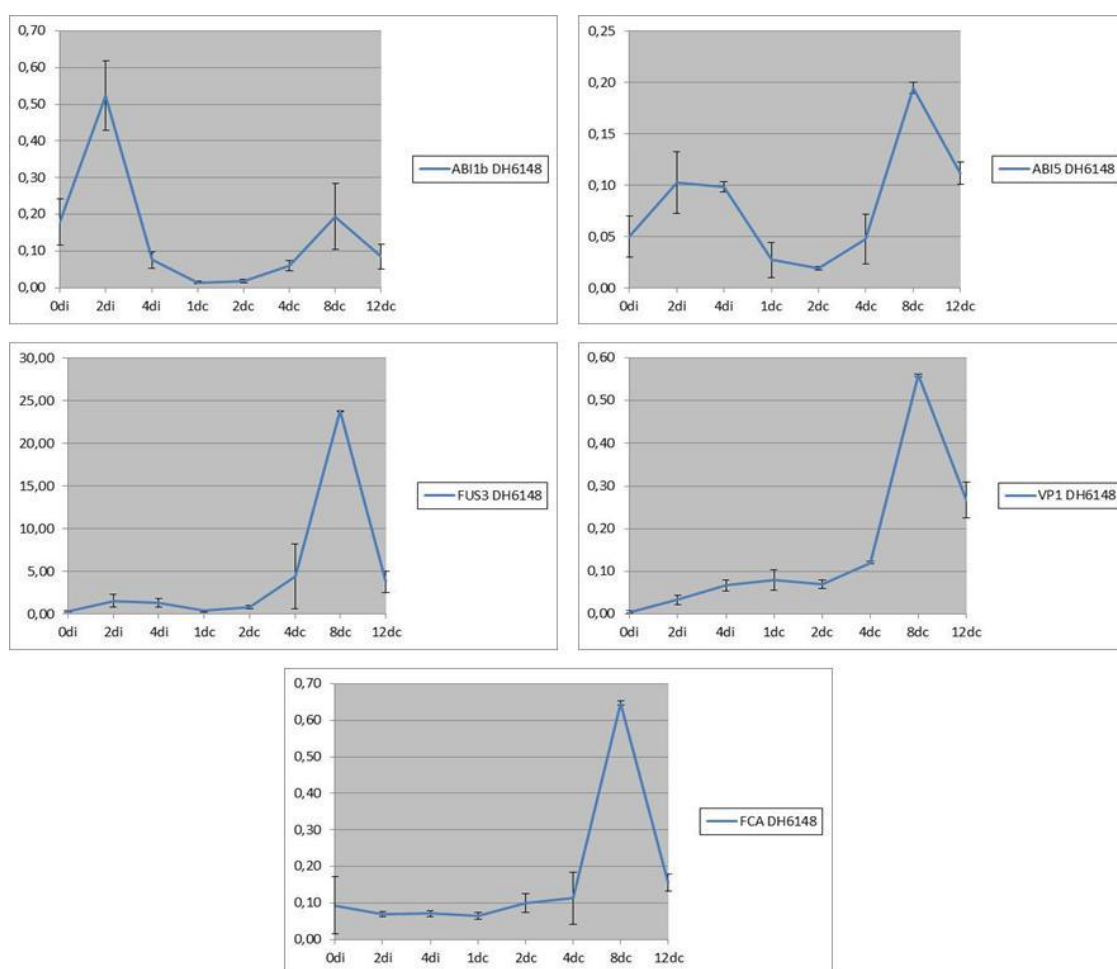


Figura 24: Perfiles de expresión de los genes *ABI1b*, *ABI5*, *FCA*, *VP1* y *FUS3*, cuantificados mediante qRT-PCR a los 0, 2 y 4 días de inducción por estrés (0di, 2di y 4di) 1, 2, 4, 8 y 12 días de cultivo (1dc, 2dc, 4dc, 8dc y 12dc) de la línea DH6148 de cebada. β -TUBULIN es el gen utilizado como control.

4.6. Caracterización de la respuesta al cultivo de anteras en trigo panadero

Para estudiar los patrones de expresión génica en trigo panadero de los genes asociados a la embriogénesis de la microspora en cebada, se utilizaron los cultivares Pavon y Caramba por presentar una capacidad de embriogénesis alta y media-baja, respectivamente. Estos genotipos se han utilizado en los procesos de optimización de protocolos de embriogénesis de la microspora en trigo realizados previamente por el grupo de trabajo.

Para asegurar que los materiales de partida al recoger las muestras para los estudios de expresión génica presentaban frecuencias de embriogénesis similares a las obtenidas anteriormente, se llevó a cabo la caracterización de la respuesta al cultivo de anteras de dichos materiales. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 21 y la figura 25.

Después del tratamiento de estrés ya se apreciaban diferencias entre los cultivares. Así, el número de anteras que se inducen, es decir que se hinchan y adquieren un color translucido o amarillo claro (Figura 25a y e), en el cultivar Pavon fue casi dos veces superior al del cultivar Caramba (Tabla 21). Pavon dio lugar a un mayor número de divisiones por 100 anteras que Caramba (1.077 frente a 683), como se aprecia en la figura 25b y f.

El número de embriones por 100 anteras obtenidos en Pavon fue de 360 mientras que en Caramba fue de 151 (Figura 25c y g, Tabla 21). Ambos genotipos presentaron porcentajes altos de regeneración, superior al 70%, lo que indica que los embriones obtenidos eran de buena calidad, con ejes embrionarios bien formados, como se observa en la figura 25c y g. La mayoría de las plantas obtenidas en ambos genotipos fueron verdes (Figura 21d y h), siendo el porcentaje de plantas verdes superior al 75%.

Tabla 21: Respuesta al cultivo de anteras de los cultivares de trigo Pavon y Caramba.

Cultivar	Anteras responden*	Divisiones*	Embriones*	Plantas*		Regeneración %	Plantas verdes %
				Verdes	Albinas		
Pavon	80,3	1077,4	359,5	233,7	31,0	73,6	88,3
Caramba	42,1	683,1	150,6	84,1	25,9	73,0	76,4

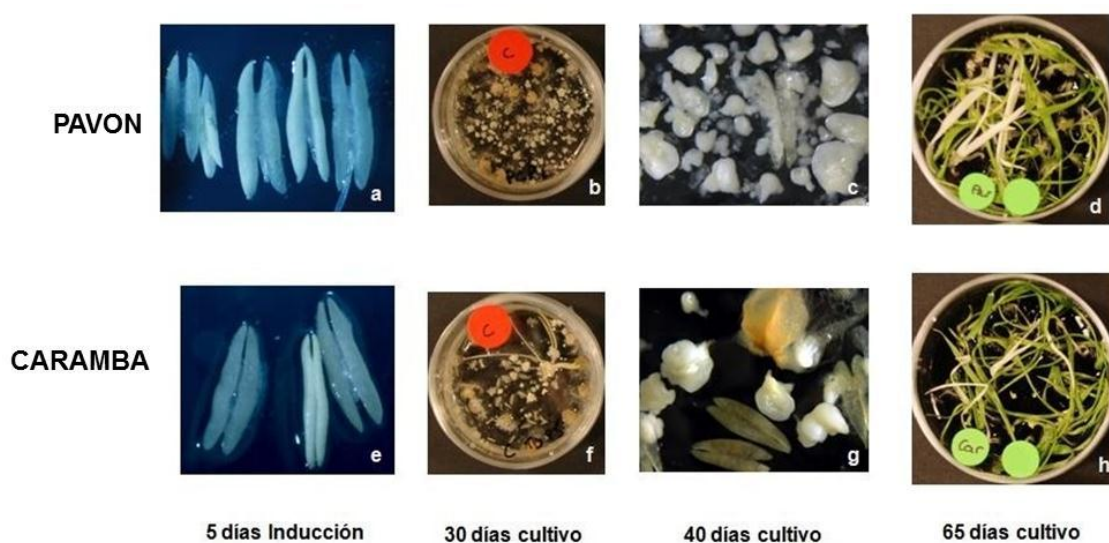


Figura 25: Respuesta al cultivo de anteras de los cultivares de trigo Pavon y Caramba. a y e) Anteras a los 5 días de inducción por estrés. b y f) Estructuras y embriones a los 30 días de cultivo. c y g) Estructuras y embriones a los 40 días de cultivo. d y h) Plántulas obtenidas en medio de regeneración a los 65 días de cultivo.

4.6.1. Caracterización morfológica de las fases tempranas de la embriogénesis de la microspora en trigo panadero

4.6.1.1. Estudios citológicos del cultivo de anteras

Como el objetivo de este trabajo se centraba en fases tempranas del cultivo de anteras, se realizó un estudio citológico de dichas fases que nos permitiera

caracterizar con detalle las estructuras presentes en el cultivo en los puntos en los que se realizaron los análisis de expresión génica.

De estudios anteriores realizados por el grupo de trabajo, se sabía que el desarrollo de la embriogénesis de la microspora en trigo era más lento que en cebada, por ello se tomaron como puntos de estudio en trigo periodos de tiempo más largos que los de cebada. Se caracterizaron anteras a los 5 días de inducción por estrés (5di), y a los 5, 10 y 15 días de cultivo (5dc, 10dc y 15dc) (Figura 26). Después del tratamiento de estrés (5di), en ambos cultivares, las microsporas se distribuyeron al azar dentro de los lóculos de la antera y se apreció que el tapetum estaba degradado (Figura 26a y e). Después de 5 días de cultivo (5dc), en ambos cultivares, muchas microsporas aumentaron de tamaño presentando un citoplasma denso, y en algunas de ellas se observaron las primeras divisiones (Figura 26b y f).

A los 10 días de cultivo (10dc) se observaron ya estructuras multicelulares, incluso se pudo observar que alguna microspora empezaba a romper la exina en Pavon, mientras que en Caramba muchas microsporas estaban muertas (Figura 26c y g). A los 15 días de cultivo (15dc) se observó que las microsporas ya habían roto la exina. En Pavon se observaron estructuras embriogénicas más compactas, mientras que en el cultivar Caramba algunas de esas estructuras estaban formadas por células grandes con el citoplasma laxo característico de estructuras de tipo callo (Figura 26d y h).

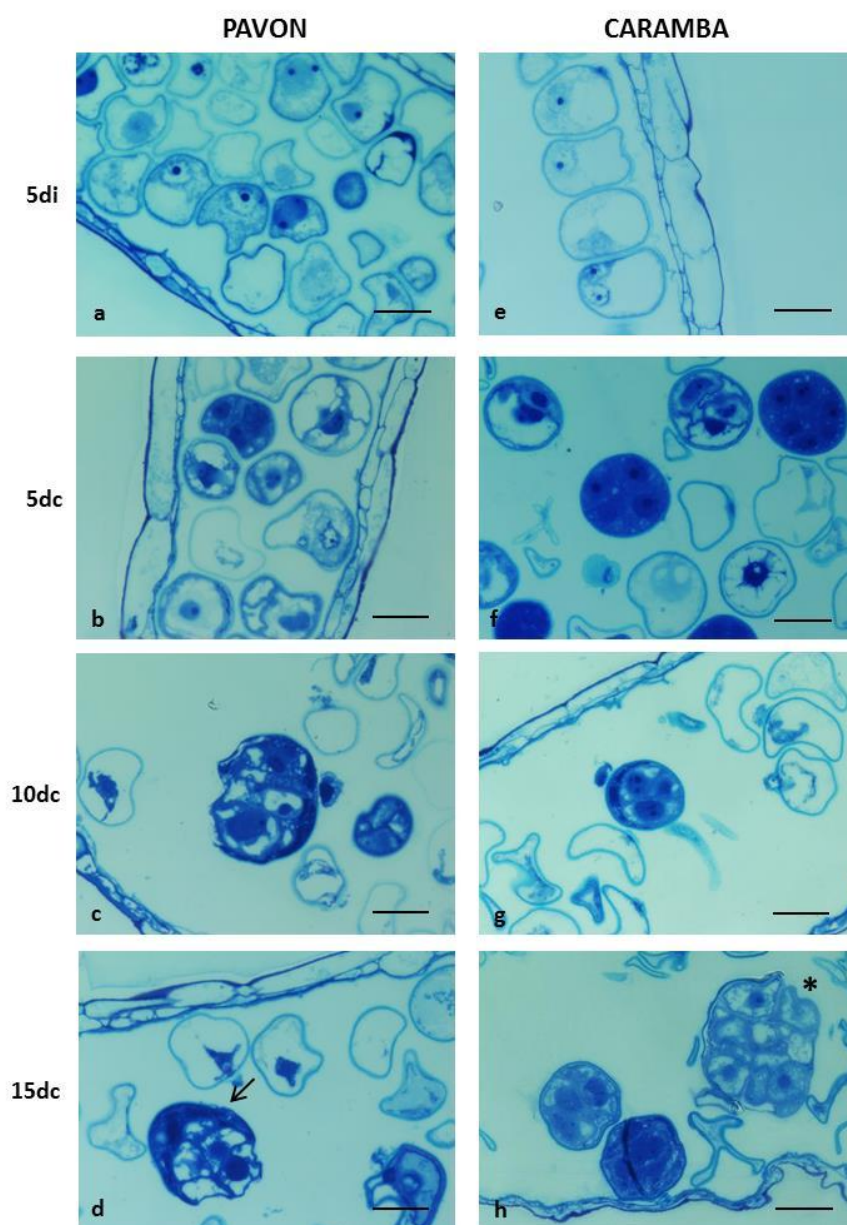


Figura 26: Caracterización citológica de las anteras en las fases iniciales del cultivo de los cultivares de trigo Pavon y Caramba. Cortes semifinos de $1\ \mu\text{m}$ teñidos con azul de toluidina. a y e) Anteras a los 5 días de inducción por estrés (5di). b y f) Microsporas en el interior de las anteras a los 5 días de cultivo (5dc). c y g) Microsporas en el interior de las anteras a los 10 días de cultivo (10dc). d y h) Estructuras embriogénicas (flecha) y proliferaciones de tipo callo (asterisco) en el interior de las anteras a los 15 días de cultivo (15dc). Las barras corresponden a $50\ \mu\text{m}$.

4.6.1.2. Estudio *in vivo* del cultivo de microsporas aisladas

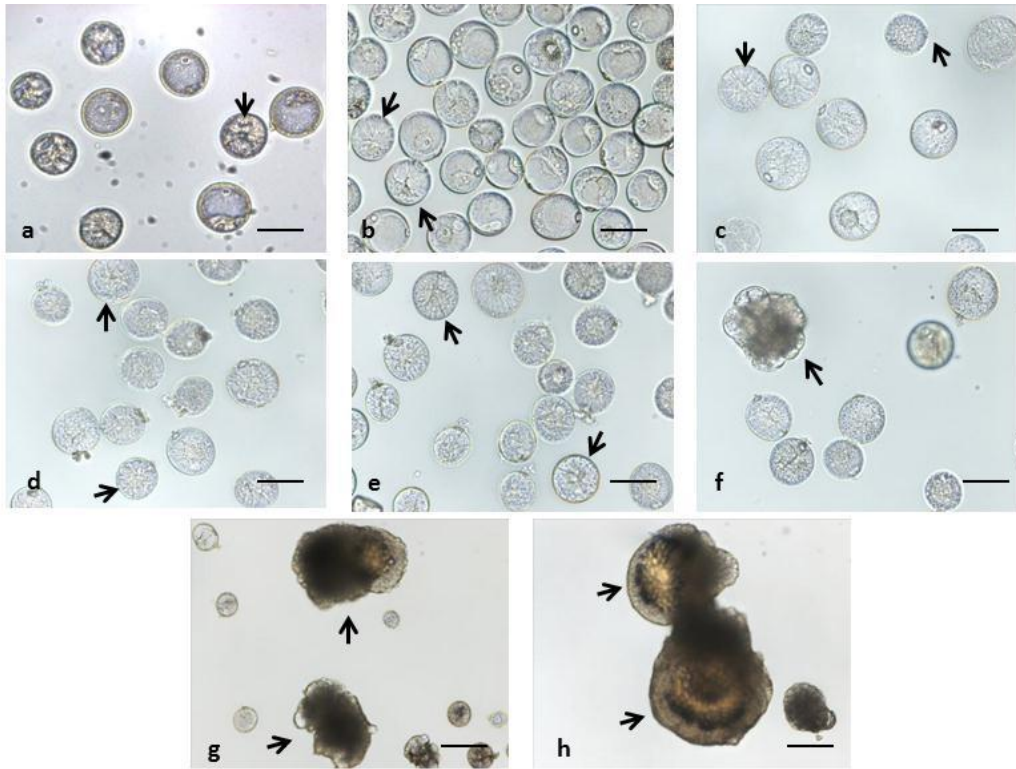
Para hacer un seguimiento más detallado de las estructuras presentes en el cultivo de anteras en los puntos donde se iban a tomar las muestras para los estudios de expresión génica, se realizó una caracterización morfológica *in vivo* de microsporas aisladas.

Se tomaron anteras después de 5 días de inducción por estrés (5di), se realizó el aislamiento de microsporas y se cultivaron *in vitro* para realizar la caracterización morfológica a los 1, 3, 5, 7, 10, 15 y 20 días de cultivo (1dc, 3dc, 5dc, 7dc, 10dc, 15dc y 20dc).

Después de 5 días de tratamiento de estrés (5di), se observó que muchas microsporas habían aumentado de tamaño pero en la mayoría de ellas la vacuola todavía ocupaba gran parte de la superficie de la microspora, especialmente en Caramba (Figura 27a, i). En Pavon se podía observar que algunas microsporas presentaban ya aspecto estrellado o "star-like", con el núcleo en el centro e hilos del citoplasma atravesando la vacuola.

Después de 1 y 3 días de cultivo (1dc y 3dc) la mayoría de las microsporas habían aumentado su tamaño. Se observó un aumento del número de microsporas con aspecto estrellado tanto en Pavon como en Caramba (Figura 27b, j, c y k). A los 3 días de cultivo (3dc), se observaron diferencias entre los dos cultivares en cuanto al número de microsporas que habían aumentado de tamaño y adquirido el aspecto estrellado, siendo mayor en el cultivar Pavon (Figura 27c y k).

PAVON



CARAMBA

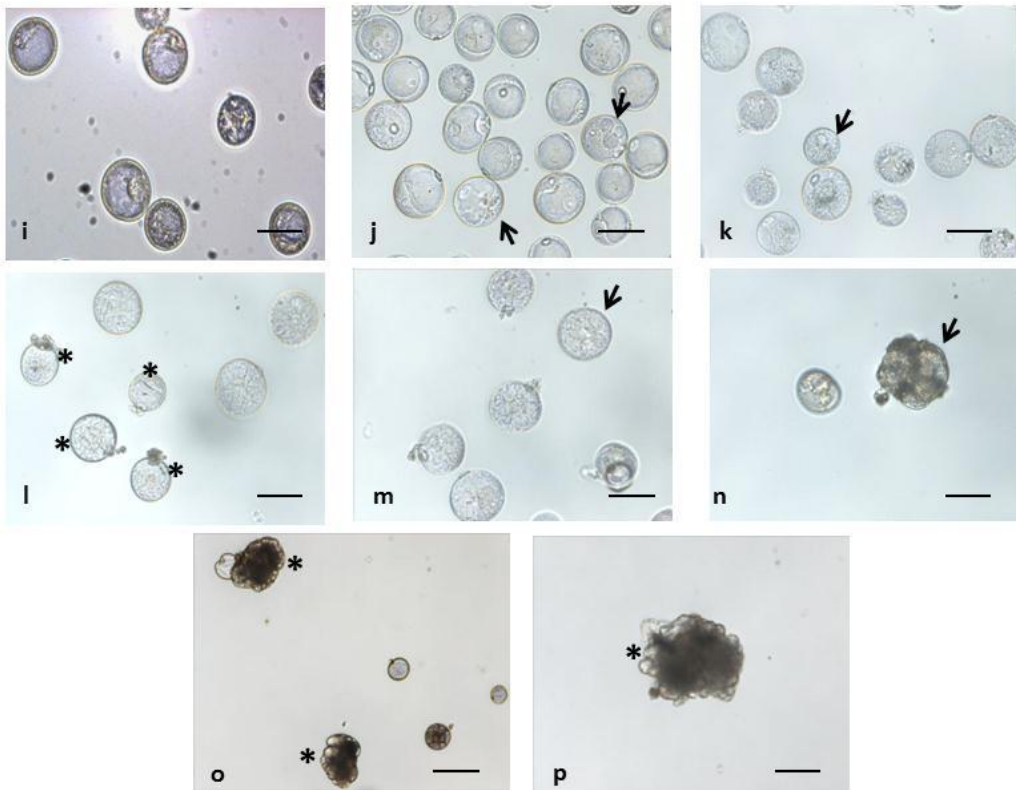


Figura 27: Caracterización morfológica del cultivo de microsporas aisladas de los cultivares de trigo Pavon y Caramba. a, i) Microsporas a los 5 días de inducción por estrés con aspecto estrellado “star like” en Pavon (flecha). b y j) Microsporas con aspecto estrellado (flecha) después de 1 día de cultivo. c y k) Microsporas a los 3 días de cultivo, con aspecto estrellado (flecha). d y l) Microsporas a los 5 días de cultivo, presentando divisiones en Pavon (flecha) y microsporas no inducidas en Caramba (asterisco). e y m) Microsporas con divisiones (flecha) a los 7 días de cultivo. f y n) Microsporas y estructuras a los 10 días de cultivo con alguna rotura de la exina (flecha). g y o) Estructuras embriogénicas en estado globular en Pavon (flecha) y estructuras tipo callo en Caramba (asterisco) a los 15 días de cultivo. h y p) Embriones (flecha) y proliferaciones de tipo callo (asterisco) a los 20 días de cultivo. Las barras corresponden a 50 μ m.

A los 5 días de cultivo (5dc) ya se observaron las primeras divisiones en el cultivar Pavón (Figura 27d). Sin embargo, en Caramba se observó un elevado número de microsporas no inducidas (Figura 27l). A los 7 días de cultivo (7dc) ya se habían producido divisiones dentro de la microspora, especialmente en el cultivar Pavon ya que en Caramba las microsporas que sobrevivieron fueron muy pocas (Figura 27e y m). A los 10 días de cultivo (10dc) se apreciaron los primeros signos de rotura de la exina en ambos cultivares (Figura 27f y n). A los 15 días de cultivo (15dc) se pudieron diferenciar distintos tipos de estructuras. En el cultivar Pavon se observaron mayoritariamente estructuras embriogénicas en estado globular, caracterizadas por tener células redondeadas, pequeñas y con citoplasma denso (Figura 27g). En Caramba el número de estructuras embriogénicas fue muy inferior al de Pavon, además mostraron menor tamaño (Figura 27o).

Finalmente a los 20 días de cultivo (20dc) se observaron claramente las diferencias entre cultivares en cuanto a estructuras embriogénicas, siendo mayor el número de embriones de buena calidad en el cultivar Pavon (Figura 27h y p). En Caramba se observaron estructuras caracterizadas por tener células grandes no redondeadas y citoplasma laxo, es decir con morfología de tipo callo (Figura 27p).

4.7. Selección de genes que se inducen en la embriogénesis de la microspora en trigo panadero

Para estudiar en trigo panadero los patrones de expresión génica de los genes asociados a las fases iniciales del patrón de desarrollo embriogénico de la microspora, se partió de los 16 genes de los clústeres 4 y 7 seleccionados en cebada. A partir de las secuencias consenso de dichos genes obtenidos del programa HarvEST barley v. 1.74 se buscaron las secuencias homólogas en trigo en distintas bases de datos. Sin embargo, en la mayoría de los genes no se pudo proseguir el estudio, ya que o bien no se encontraron las secuencias homólogas, o estas secuencias eran muy cortas y no se pudieron diseñar cebadores adecuados, o los cebadores diseñados no amplificaron. Finalmente, sólo se pudo continuar con el estudio de tres de los genes pertenecientes al clúster 4 (HK06N02r_s_at, Contig13064_at y Contig14215_at) (Apartado 4.2.2.1) y el gen Contig4506_at del clúster 7 (Apartado 4.2.2.2).

Para ampliar el número de genes en el análisis, se seleccionaron nuevos genes candidatos del conjunto de genes que aumentaban su expresión a los 4dc vs. 4di en el análisis de transcriptómica de cebada (Apartado 4.2.2). Así se localizaron las secuencias homólogas y se diseñaron cebadores para los genes Contig10274_at, Contig2975_s_at, EBem05_SQ002_D05_s_at y Contig8533_s_at pertenecientes al clúster 6 (Apartado 4.2.2), Contig3735_at (clúster 4) y Contig2878_at (clúster 13), que correspondían a genes inducidos *de novo* a los 4dc, y para el Contig13240_s_at del Clúster 3, que correspondía a genes con niveles de expresión bajos en 0di y que aumentaban progresivamente su expresión en 4di y 4dc. Finalmente se completó el estudio con otros tres genes, de la selección inicial en el experimento de transcriptómica (Apartado 4.2.1), que presentaban patrones de expresión no estudiados anteriormente: HVSMEb009H14r_s_at que se induce por el tratamiento de estrés pero de nuevo aumenta su nivel de expresión a los 8dc; Contig5827_at que disminuye su expresión después del pretratamiento de estrés pero aumenta paulatinamente su expresión durante la fase de cultivo; y Contig5995_at que se activa únicamente en el paso de 4dc a 8dc.

En la tabla 22 se presentan los valores de expresión normalizados (\log_2) de “fold change” de cada uno de los genes de cebada y el clúster al que pertenecen según el análisis del Apartado 4.2.2. En la figura 28 se presentan los perfiles de expresión de estos genes de acuerdo con los valores obtenidos en el análisis de transcriptómica.

Tabla 22: Valores de expresión de los 14 genes (Probe set) seleccionados, de entre los asociados a la embriogénesis de la microspora en cebada, para los estudios en trigo (datos de “fold change” normalizados con \log_2) en los puntos 0di, 4di, 4dc y 8dc, ordenados según las diferencias entre 4dc vs. 4di.

Probe Set	0di	4di	4dc	8dc	CLUSTER
Contig4506_at	-2,04	-1,53	6,30	1,35	Clúster 7
HK06N02r_s_at	-4,26	-4,48	4,37	4,08	Clúster 4
Contig14215_at	-3,78	-3,44	4,00	3,47	Clúster 4
Contig2975_s_at	-2,58	-1,98	3,18	1,64	Clúster 6
EBem05_SQ002_D05_s_at	-2,75	-2,87	2,90	3,83	Clúster 6
Contig3735_at	-4,42	-3,24	2,83	3,47	Clúster 4
Contig13064_at	-1,96	-3,54	2,57	5,15	Clúster 4
Contig13240_s_at	-5,62	-2,53	2,49	3,02	Clúster 3
Contig10274_at	-3,80	-2,44	2,46	3,02	Clúster 6
Contig2878_at	-1,94	-1,54	2,09	1,58	Clúster 13
Contig8533_s_at	-1,50	-3,11	2,03	1,33	Clúster 6
Contig5827_at	3,36	-1,34	-0,92	0,57	-
HVSMEb0009H14r2_s_at	-6,89	0,57	-0,43	2,13	-
Contig5995_at	-0,07	0,01	-0,03	5,45	-

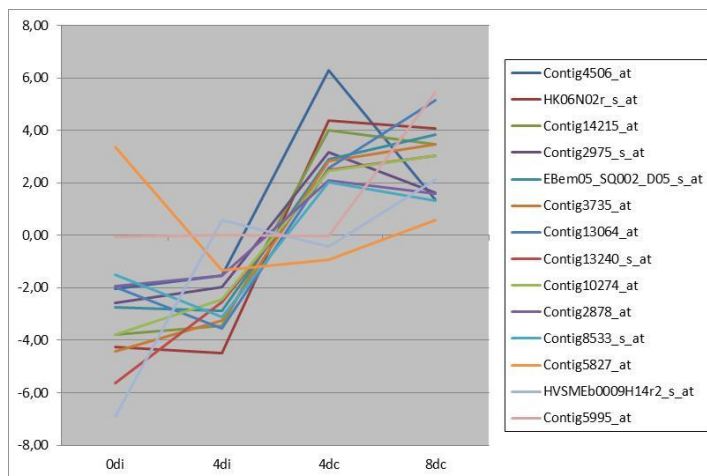


Figura 28: Perfil de expresión de los 14 genes seleccionados, de entre los asociados a la embriogénesis de la microspora en cebada, para los estudios en trigo. Los valores corresponden a los datos de “fold change” normalizados con \log_2 en los puntos 0di, 4di, 4dc y 8dc.

Para determinar las homologías de las secuencias de trigo con genes conocidos se utilizaron distintas bases de datos: HarvEST wheat v. 1.59, Fasta-EMBL-EBI (Nucleotide Similarity Search) y PLEXdb (Plant Expression Database) (Tabla 23).

De estos genes, destacaron por su mayor nivel de expresión en 4dc de cebada (Tabla 22 y Tabla 23) dos genes del clúster 4: el gen HK06N02r_s_at (Ta.7773.1) que codifica para una “expressed proteína” (Hv-ME1) y el Contig14215_at (Ta.18801.1) que codifica para una proteína POEI52 (Pollen Ole e I allergen). También destacó un gen del clúster 7, el Contig4506_at (TaAffx.3154.1) que codifica para una proteína TPD1 (Tapetum Determinant1). En cuanto al mayor nivel de expresión en 8dc destacó el Contig13064_at (Ta.6411.1) que codifica para una proteína MADS1 y el Contig5995_at (Ta.13785.1) que codifica para una proteína “Glycosyl hydrolase”. El gen que presentó niveles más bajos de expresión en 4dc y 8dc fue el Contig5827_at (Ta.1839.1) que codifica para una proteína FLA27 (Fasciclin 27).

También se incluyeron en el análisis, como control del proceso, 4 genes identificados por otros autores: dos arabinogalactanos que se expresan en anteras de trigo y que codifican para proteínas de tipo fasciclinas (FLA14 (Ta.1852.1) y FLA25 (Ta.28834.1)) (Faik y col. 2006), y dos genes asociados a procesos de embriogénesis somática en trigo *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR LIKE KINASE (SERK1* (Ta.12817.1) y *SERK2* (Ta.6832.1)) (Singla y col. 2008). En la tabla 23 se presentan las homologías de los 18 genes seleccionados y la abreviatura que se utilizará para cada uno de ellos a lo largo del documento.

Tabla 23: Homologías de secuencia de los 18 genes estudiados establecidas mediante los programas FASTA-EMBL-EBI (Nucleotide similarity search) (<http://www.ebi.ac.uk>), PLEXdb (Plant Expression Database) (<http://www.plexdb.org>) y HarvEST wheat v. 1.59 (<http://www.harvest.ucr.edu>).

Probe Set	Número de entrada	E-value	Descripción	Base de datos
Contig4506_at	LOC_Os10g14020.1	5,00E-27	protein TPDI-TaTPDI-like	PLEXdb
HK06N02L_s_at	K4AGD5_SETIT K4AGD5	1E-14	Uncharacterized protein-TaME1	FASTA-EMBL-EBI, PLEXdb, HarvEST Wheat
Contig14215_at	AT1G28290.2	2,00E-09	AGP31-like (arabinogalactan-protein 31)	HarvEST wheat
Contig2975_s_at	GSTF2_WHEAT P30111	8E-73	Glutathione S-transferase-GSTA2	FASTA-EMBL-EBI, PLEXdb, HarvEST Wheat
EBem05_S0002_D05_s_at	Q8W427_WHEAT Q8W427	9E-81	Chitinase 3-CH13	FASTA-EMBL-EBI
Contig3735_at	LOC_Os02g041904.1	1,00E-23	DEF7 - Defensin and Defensin-like DEFL family-Tad1	PLEXdb, HarvEST Wheat
Contig13064_at	Q1G165_WHEAT Q1G165	3,00E-38	MADS-box transcription-TaAGL14	FASTA-EMBL-EBI
Contig13240_s_at	LOC_Os01g27210.1	1,00E-69	Glutathione S-transferase-GSTF2	PLEXdb, HarvEST Wheat
Contig10274_at	Q8L4V2_WHEAT Q8L4V2	5E-79	Fatty acyl coA reductase-TAA1b	FASTA-EMBL-EBI, PLEXdb, HarvEST Wheat
Contig2878_at	EA161222 EA161222.1	0	Beta-expansin TaXPB4	FASTA-EMBL-EBI
Contig9533_s_at	LOC_Os03g07880.1	2,00E-92	cDNA nuclear transcription factor Y-TaNF-YA7	HarvEST wheat
Contig5827_at	Q06180_WHEAT Q06180	8,00E-56	Fasciclin-like protein FLA26	FASTA-EMBL-EBI
HVSMEM0009H142_s_at	Q43666_WHEAT A7BJ77	1E-27	Wall6 protein-WALL6	FASTA-EMBL-EBI, PLEXdb
Contig5995_at	A7BJ77_WHEAT A7BJ77	2,00E-58	Xylanase inhibitor-Xp-R1	FASTA-EMBL-EBI
W1852.1	Ta.13785.1	1E-38	Fasciclin-like protein FLA14	FASTA-EMBL-EBI, PLEXdb, HarvEST Wheat
W28834.1	Ta.1852.1	9E-76	Fasciclin-like protein FLA25	FASTA-EMBL-EBI, PLEXdb, HarvEST Wheat
W6832.1	Ta.6832.1	9E-122	Somatic embryogenesis receptor like kinase-SERK2	FASTA-EMBL-EBI, PLEXdb, HarvEST Wheat
12817.1	G4XGX1_WHEAT G4XGX1	1E-94	Somatic embryogenesis receptor like kinase-SERK1	FASTA-EMBL-EBI, PLEXdb, HarvEST Wheat

4.8. Estudio de la expresión de los genes seleccionados en trigo panadero mediante PCR-Semicuantitativa

Para estudiar el perfil de expresión de los genes seleccionados se utilizó el cultivar Pavon de alta capacidad embriogénica. Se tomaron muestras a los 0 y 5 días de inducción por estrés (0di y 5di), y a los 5, 10, 15 y 20 días de cultivo de anteras (5dc, 10dc, 15dc y 20dc), se extrajo el RNA y se sintetizó el cDNA. A partir del cDNA se realizaron las amplificaciones utilizando los cebadores diseñados según se especifica en el apartado 3.4.4.1 de Materiales y Métodos, y se utilizó como gen constitutivo el gen *18SrDNA* (*18S ribosomal DNA*). En la figura 29 se muestran los resultados de la PCR-Semicuantitativa en geles de agarosa. De los 18 genes analizados los 14 primeros, que habían sido seleccionados del estudio en cebada, se indujeron durante la embriogénesis de la microspora en trigo (Figura 29), presentando perfiles de amplificación similares a los esperados según el experimento de transcriptómica de cebada (Figura 28).

Se pudieron determinar diferencias claras en el momento de inducción de los genes en la embriogénesis de la microspora en trigo (Figura 29). Se identificaron 4 genes que se inducían a los 5 días de cultivo (5dc) y mantenían o incrementaban su expresión a los 10dc y 15dc: *TaTPD1-like* (*TAPETUM DETERMINANT 1-like*) (TaAffx.3154.1), *TAA1b* (una “fatty acyl-coA reductase”, *Ta.ANTHER-SPECIFIC 1b*) (Ta.9528.1), *GSTF2* (*GLUTATHIONE S-TRANSFERASE-F2*) (Ta.1775.1/Ta.30944.1) y *GSTA2* (*GLUTATHIONE S-TRANSFERASE-A2*) (Ta.303.2).

También se observaron 7 genes que se inducían en las etapas medias de la embriogénesis (10dc): *WALI6* (*WHEAT ALUMINIUM INDUCED-6*) (Ta.5024.1), *CHI3* (*CHITINASE 3*) (Ta.21342.1), *Tad1* (*Ta.DEFENSIN-1*) (Ta.28319.1), *TaNf-YA7* (*NUCLEAR FACTOR Y-A7*) (Ta.1004.1), *FLA26* (*FASCICLIN-26*) (Ta.1839.1), *TaGL14* (*AGAMOUS LIKE-14*) (Ta.6411.1) y *XIP-R1* (*XYLANASE INHIBITOR-R1*) (Ta.13758.1). Se apreciaron diferencias en los perfiles de expresión de los genes de este grupo, ya que algunos se expresaban también en etapas más tempranas como el

gen *CHI3*, otros genes (*Tad1*, *TaNF-YA7* y *FLA26*) disminuyen su expresión a partir de los 15dc, mientras que *CHI3*, *TaGL14* y *XIP-R1* y *WALI6* aún se expresaban a los 20dc.

Otro grupo de 3 genes se inducían en etapas tardías de la embriogénesis de la microspora: *TaAGP31-like* (*ARABINOGALACTAN PROTEIN 31-LIKE*) (Ta.18801.1), *TaME1* (*MICROSPORE EMBRYOGENESIS-1*) (Ta.7773.1) y *TaEXPB4* (*Ta.EXPANSIN-B4*) (Ta.3749.1). De estos genes, que mostraron una fuerte inducción a los 15dc, sólo *TaAGP31-like* mantuvo su expresión a los 20dc. Considerando el conjunto de genes estudiados hay que destacar que sólo los genes *CHI3* y *TaAGP31-like* mostraron una fuerte expresión a los 20dc, sólo los genes *FLA26* y *TaAGL14* se expresaban al inicio del proceso (0di), y los genes *TAA1b*, *CHI3*, *Tad1* y *XIP-R1* se expresaban después del tratamiento de estrés (5di), aunque a un nivel muy bajo.

Finalmente no se pudo asociar a la fase embriogénica del cultivo de anteras ninguno de los genes analizados como control del proceso, ya que los genes *FLA14* (Ta.1852.1) y *FLA25* (Ta.28834.1) se indujeron a los 5di, y los genes *SERK2* (Ta.6832.1) y *SERK1* (Ta.12817.1) se expresaban únicamente al inicio del proceso, antes del tratamiento de estrés (0di).

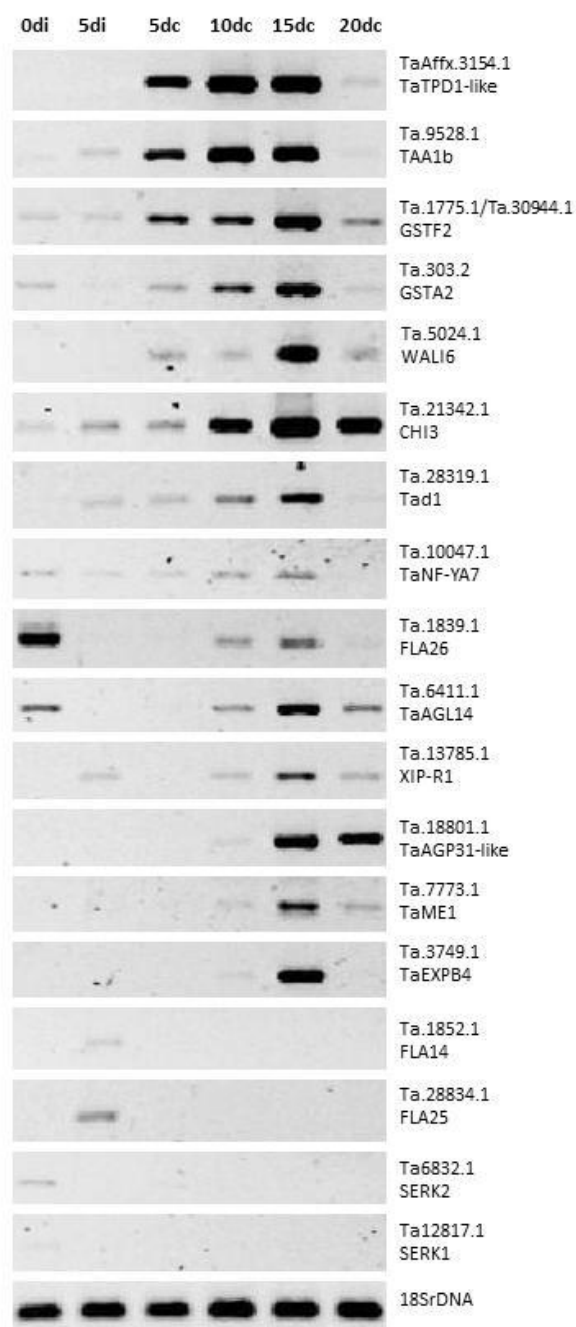


Figura 29: Análisis de expresión de los 14 genes seleccionados por su asociación con la embriogénesis de la microspora en cebada, y de los genes FLA14, FLA25, SERK2 y SERK1 mediante PCR-Semicuantitativa y gel de agarosa, en los puntos 0 y 5 días de inducción por estrés (0di y 5di) y 5, 10, 15 y 20 días de cultivo (5dc, 10dc, 15dc y 20dc) del cultivar Pavon. 18SrDNA es el gen constitutivo utilizado como control.

4.9. Comparación de la expresión génica en la embriogénesis de la microspora y embriogénesis zigótica en trigo panadero

Para caracterizar la expresión de los genes activados en la embriogénesis de la microspora en trigo panadero en otros órganos y tejidos, se estudiaron los valores de expresión de dichos genes en el experimento TA3 (“Transcription patterns during wheat development (Mirrors BB3)”) realizado con el “Wheat GeneChip” (Affymetrix) (Schreiber y col. 2009) disponible en la base de datos PLEXdb.

Los órganos y tejidos estudiados fueron: raíz, hoja, antera, carióspside de 5 días después de la polinización (DAP), embrión 22 DAP y endospermo 22 DAP del cultivar Chinese Spring. Entre los perfiles de expresión no se pudieron establecer patrones de expresión, observándose perfiles muy diferenciados (Figura 30).

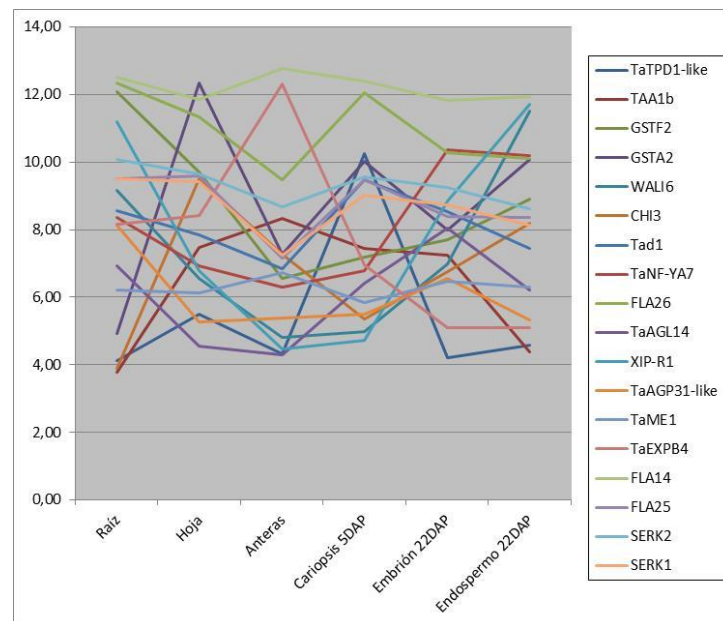


Figura 30: Perfil de expresión de los 18 genes seleccionados con los valores del experimento TA3 (PLEXdb) (Druka y col. 2006), en raíz, hoja, anteras, carióspside de 5 DAP, embrión y endospermo de 22 DAP.

Para determinar los perfiles de expresión de los genes seleccionados en etapas tempranas del desarrollo de la semilla, en raíz y hoja del mismo cultivar utilizado en el cultivo de anteras (Pavon), se tomaron muestras de ovarios maduros (ov), carióspside a los 2, 4, 6 y 8 días después de la polinización (DAP) (c2d, c4d, c6d y c8d), embrión a los 10, 12 y 14 DAP (e10, e12 y e14), endospermo a los 10, 12 y 14 DAP (en10, en12 y en14), raíz (r) y hoja (h) de plántulas. Se extrajo el RNA, se sintetizó el cDNA y se realizaron las amplificaciones utilizando los cebadores correspondientes a los genes seleccionados y al gen constitutivo *18SrDNA* según el apartado 3.4.4.1 de Materiales y Métodos.

Los resultados del análisis se muestran en la figura 31. Los perfiles de expresión obtenidos no se correspondían con los observados en el experimento TA3, salvo en el gen *GSTF2* que presentó un nivel alto de expresión en raíz (r). De los 18 genes analizados, la mayoría (15 genes) se expresaban en embriones zigóticos, aunque a distinto nivel de expresión, siendo las excepciones los genes *Tad1*, *FLA14* y *FLA25*. Cuatro de los genes presentaron expresión específica en embrión zigótico (*TaTPD1-like*, *TaNf-YA7*, *TaAGP31-like* y *TaME1*). El resto de los genes aunque se expresaban en otros tejidos mostraron su nivel de expresión más alto en embrión de 12 DAP (e12), salvo el gen *WAL16* que tenía su expresión máxima en carióspside de 2 DAP (c2d) y en raíz (r), el gen *GSTF2* con expresión máxima en raíz (r), y el gen *CHI3* que se expresó en todos los tejidos y órganos analizados. Cinco genes (*TAA1b*, *GSTA2*, *CHI3*, *FLA26* y *TaAGL14*) se expresaron en ovarios maduros (ov). Solo el gen *Tad1* resultó ser específico de la embriogénesis de la microspora ya que no se expresó en ninguno de los tejidos ni órganos analizados.

Finalmente, los genes *FLA14* y *FLA25* que se inducían después del pretratamiento de estrés en embriogénesis de la microspora, no se expresaron en ninguno de los órganos y tejidos analizados, y los genes *SERK2* y *SERK1* que no se expresaron en la embriogénesis de la microspora, mostraron un nivel de expresión muy bajo y específico en embrión de 12 DAP (e12).

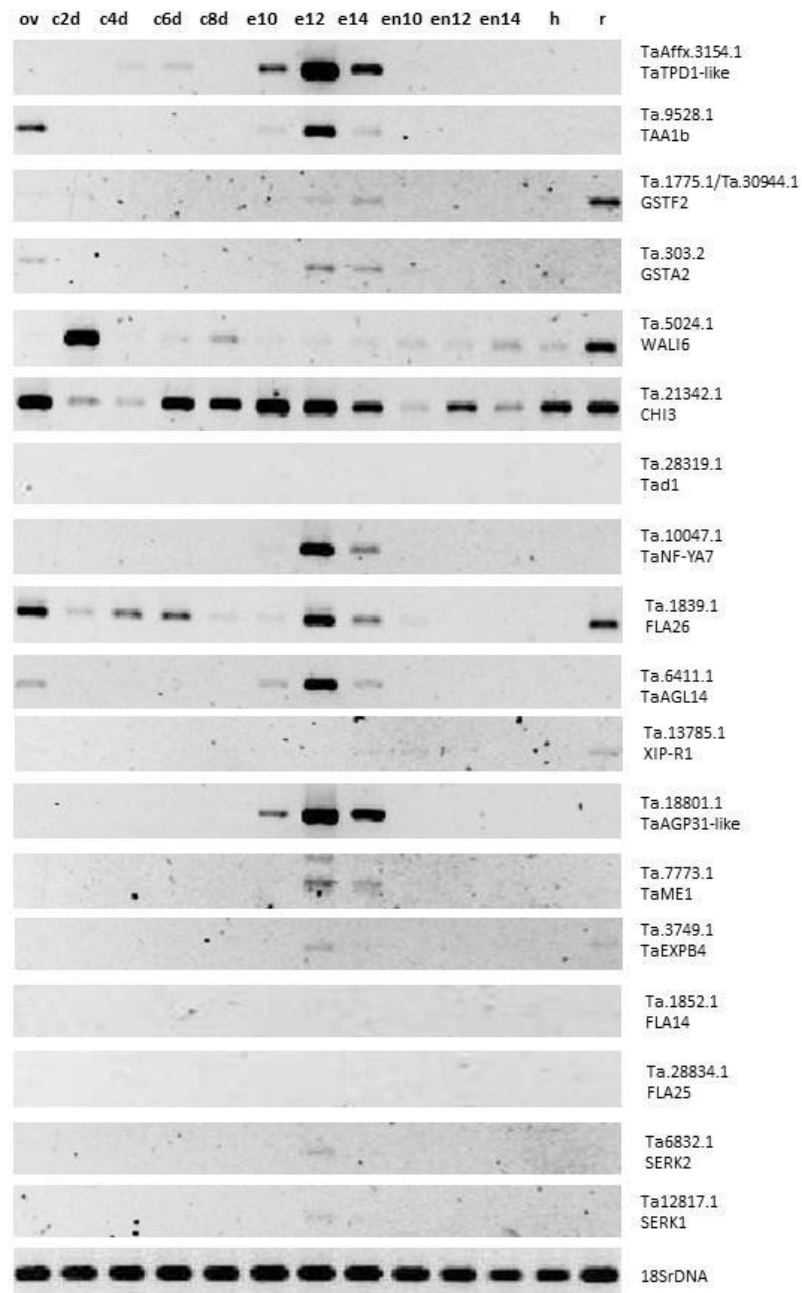


Figura 31: Análisis de expresión mediante PCR-Semiquantitativa y gel de agarosa, de los 14 genes seleccionados, y de los genes FLA14, FLA25, SERK2 y SERK1 en ovarios maduros (ov), carióspside de 2, 4, 6 y 8 DAP (c2d, c4d, c6d y c8d), embrión a los 10, 12 y 14 DAP (e10, e12 y e14), endospermo a los 10, 12 y 14 DAP (en10, en12 y en14), hoja (h) y raíz (r), del cultivar Pavon. 18SrDNA es el gen constitutivo utilizado como control.

4.10. Comparación de la expresión génica en dos cultivares de distinta respuesta a la embriogénesis de la microspora en trigo panadero

Para comprobar si existía una asociación entre el perfil de expresión de los genes seleccionados y la capacidad embriogénica de los cultivos, se estudiaron los perfiles de expresión en un cultivar de baja respuesta al cultivo de anteras (Caramba) y se compararon con los observados en el cultivar de alta respuesta (Pavon). El cultivar Caramba se caracterizaba por el bajo número de microsporas que dividen y el bajo número de embriones y plantas verdes (Apartado 4.6).

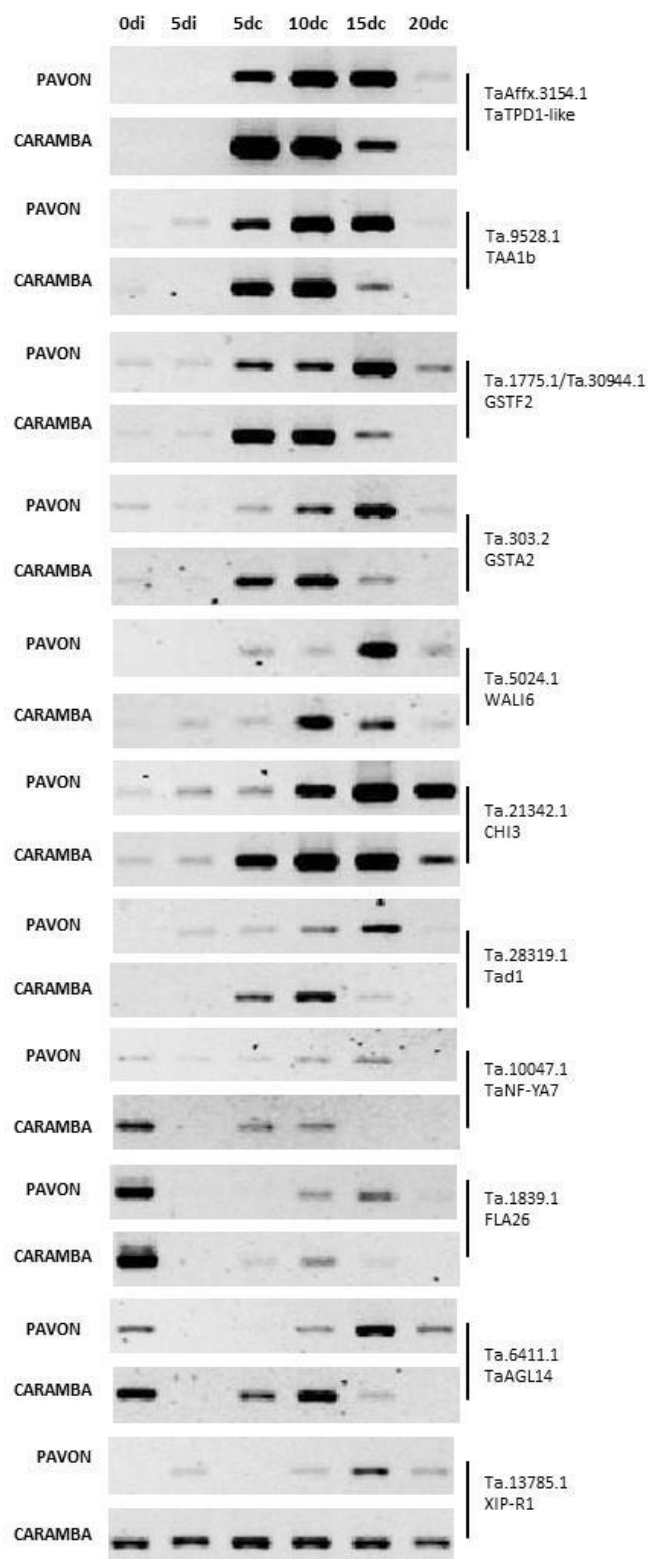
Se tomaron muestras de anteras a los 0 y 5 días de inducción por estrés (0di y 5di), y a los 5, 10, 15 y 20 días de cultivo (5dc, 10dc, 15dc y 20dc), del cultivar Caramba. Se extrajo el RNA, se sintetizó el cDNA, y se realizaron las amplificaciones mediante PCR-Semicuantitativa utilizando los cebadores correspondientes a los genes seleccionados y al gen constitutivo *18SrDNA*.

Los resultados de PCR-Semicuantitativa se muestran en la figura 32, donde se pudo observar que la mayoría de genes también se inducían en Caramba durante la fase de cultivo, aunque se podían apreciar diferencias entre los dos cultivares en los perfiles y niveles de expresión. Así, en los genes que en Pavon se inducían a los 5dc (*TaTPD1-like*, *TAA1b*, *GSTF2* y *GSTA2*) el máximo nivel del perfil de expresión se desplazó de 10dc y 15dc en Pavon a 5dc y 10dc en Caramba.

Los genes *WALI6*, *CHI3*, *Tad1*, *TaNf-YA7*, *FLA26*, *TaAGL14* y *XIP-R1* que se inducían a los 10dc en Pavon podían considerarse como genes de expresión temprana en Caramba, ya que en este cultivar se inducen a los 5dc. Sin embargo el gen *XIP-R1* mostró una expresión constitutiva en Caramba y los genes *TaNf-YA7* y *TaAGL14* mostraron un nivel de expresión mucho más alto a los 0di en Caramba que en Pavon.

De los genes que se inducían en etapas tardías de la embriogénesis (*TaAGP31-like*, *TaME1* y *TaEXPB4*) sólo el gen *TaME1* presentó un desplazamiento en el perfil de expresión con un nivel alto a los 5dc y a los 0di en Caramba, el resto presentaron perfiles de expresión diferentes entre cultivares. En el gen *TaAGP31-like* se observó que en Caramba aunque se expresaba a los 15dc no lo hacía a los 20dc como en Pavon. El gen *TaEXPB4* sólo se expresaba a los 15dc en Pavon, mientras que en Caramba se expresó a los 10dc y 15dc y a niveles más bajos que en Pavon.

Finalmente, los genes *FLA14* y *FLA25* sólo se expresaron a los 5di en ambos cultivares, aunque el nivel de expresión fue mucho mayor en Pavon, y los genes *SERK2* y *SERK1* que se expresaban a los 0di en Pavon, mostraron un nivel de expresión mucho mayor a los 0di en Caramba y sólo el gen *SERK2* se expresó a los 10dc, aunque a un nivel bajo, en este cultivar.



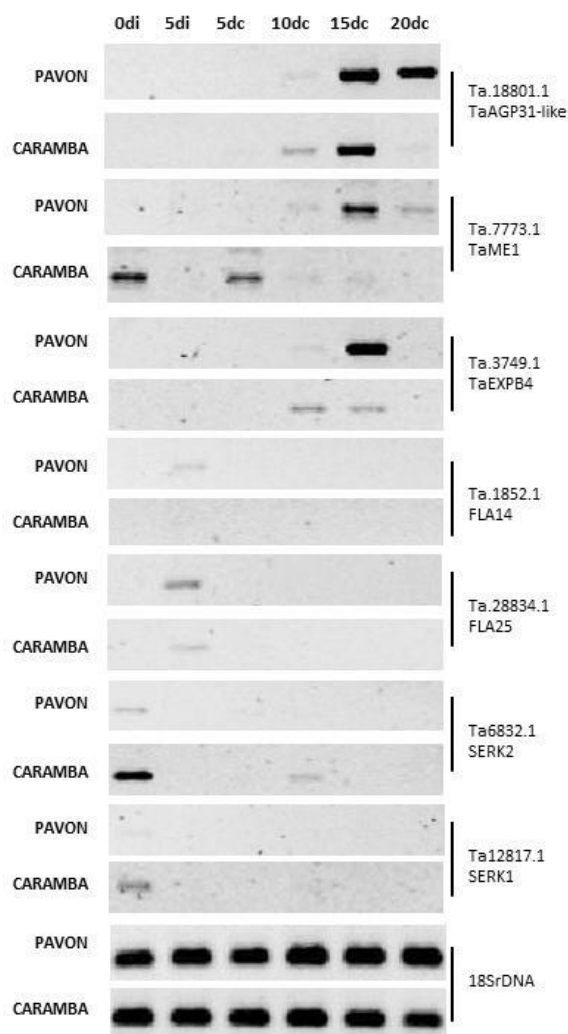


Figura 32: Análisis de expresión de los 14 genes seleccionados por su asociación con la embriogénesis de la microspora en cebada, y de los genes FLA14, FLA25, SERK2 y SERK1 mediante PCR-Semicuantitativa y gel de agarosa, en los puntos 0 y 5 días de inducción por estrés (0di y 5di), y 5, 10, 15 y 20 días de cultivo (5dc, 10dc, 15dc y 20dc) en los cultivares de trigo Pavon y Caramba. 18SrDNA es el gen constitutivo utilizado como control.

4.11. Identificación de genes asociados al efecto inductor de los ovarios, en cultivo de anteras en trigo panadero

4.11.1. Caracterización de la expresión génica mediante PCR-Semicuantitativa de los genes seleccionados

En el cultivo de anteras de trigo, se ha descrito que el uso de medios preacondicionados con ovarios es esencial para la obtención de un número elevado de embriones. En el grupo de trabajo se ha estudiado la influencia del estado de desarrollo y del genotipo del ovario en la eficiencia de la embriogénesis de la microspora. Por un lado, los ovarios de Caramba producían mayor número de embriones que los de Pavon, y por otro lado, los ovarios maduros (estadio que se corresponde con polen binucleado tardío) daban lugar a un mayor número de embriones y plantas verdes que los ovarios jóvenes (estadio correspondiente a microspora uninucleada media a tardía). Cuando se estudió la interacción entre genotipo y estado de maduración se observaron mayores diferencias en la inducción entre ovarios maduros y jóvenes en el cultivar Pavon que en el cultivar Caramba (Castillo, datos no publicados).

Para identificar los genes asociados al efecto inductor de los ovarios se tomaron muestras de ovarios frescos (0dc) y a los 5, 10, 15 y 20 días de inoculación en medio de cultivo (5dc, 10dc, 15dc y 20dc) de ovarios jóvenes y maduros de los cultivares Pavon y Caramba. Se extrajo el RNA, se sintetizó el cDNA y se realizaron las amplificaciones mediante PCR-Semicuantitativa utilizando los cebadores correspondientes a los genes seleccionados, tal como se detalla a continuación. El gen constitutivo utilizado como control fue *18SrDNA*.

Inicialmente se comprobó si los genes asociados al inicio del desarrollo embriogénico en trigo identificados en el apartado 4.7 se expresaban en las muestras de ovarios, observándose que sólo 6 de los genes estudiados, 2 relacionados con

embriogénesis temprana (*TAA1b* y *WAL16*) y 4 con embriogénesis media (*FLA 26*, *CHI3*, *Tad1* y *XIP-R1*), se expresaban en ovarios en cultivo.

Para identificar otros genes candidatos, se tuvo en cuenta la asociación entre el efecto inductor de los ovarios y los arabinogalactanos (AGPs) o sus productos de degradación descrita por otros autores. Por ello, se seleccionaron dos genes que se expresaban en ovarios (HarvEST wheat v. 1.59) y cuya función estaba relacionada con la biosíntesis de glicanos complejos, como el gen *COMPLEX GLYCAN LESS 1 (CGL1)* (Ta.13696.1), y con su degradación como el gen *GLYCOSIDE HYDROLASE 28 (GH28)* (Ta.6184.1). Otros genes candidatos se seleccionaron teniendo en cuenta su función como moléculas señalizadoras asociadas a distintos procesos de desarrollo, y en particular en los ovarios. Así, se seleccionaron dos “receptor-like kinases”: *FERONIA (FER)* (Ta.14561.2) y “*Receptor-like Kinase 5 (RLK5)* (Ta.12025.1).

En la Tabla 24 se presentan las homologías de secuencias de los genes de trigo seleccionados obtenidas en distintas bases de datos (HarvEST wheat v. 1.59), Fasta- EMBL-EBI (Nucleotide Similarity Search) y PLEXdb (Plant Expression Database). A partir de las secuencias consenso en el programa HarvEST wheat v. 1.59 se diseñaron los cebadores según el apartado 3.4.4.1 de Materiales y Métodos.

Tabla 24: Homologías de secuencia de los 10 genes seleccionados establecidas mediante los programas FASTA-EMBL-EBI (Nucleotide similarity search) (<http://www.ebi.ac.uk>), PLEXdb (Plant Expression Database) (<http://www.plexdb.org>) y HarvEST wheat v. 1.59 (<http://www.harvest.ucr.edu>).

Probe Set	Probe Set	Número de entrada	E-value	Descripción	Base de datos
Contig5827_at	Ta.1839.1	Q06180_WHEAT Q06180	8,00E-56	Fasciclin-like protein FLA26	FASTA-EMBL-EBI
EBem05_SO002_D05_s_at	Ta.21342.1	Q8W427_WHEAT Q8W427	9E-81	Chitinase 3-OH3	FASTA-EMBL-EBI
Contig10274_at	Ta.9528.1	Q8L4V2_WHEAT Q8L4V2	5E-79	Fatty acyl coA reductase-TAA1b	FASTA-EMBL-EBI, PLEXdb, HarvEST Wheat
W14561.2	Ta.14561.2	A13G51550.1	1,00E-120	FERONIA-FER	HarvEST Wheat
HVSMIE0009H142_s_at	Ta.5024.1	Q43666_WHEAT Q43666	1E-27	Wall6 protein-WALL6	FASTA-EMBL-EBI, PLEXdb
W13696.1	Ta.13696.1	A14G38240.2	4,00E-08	COMPLEX GLYCAN LESS 1-CGL1	HarvEST Wheat
Contig3735_at	Ta.28319.1	LOC_Os02g041904.1	1,00E-23	DEF7 - Defensin and Defensin-like DEF family-Tad1	PLEXdb, HarvEST Wheat
Contig5995_at	Ta.13785.1	A7BJ77_WHEAT A7BJ77	2,00E-58	Xylanase inhibitor-Xip-R1	FASTA-EMBL-EBI
W6184.1	Ta.6184.1	A13G48950.1	1,00E-156	glycoside hydrolase family 28 protein-GH28	HarvEST Wheat
W12025.1	Ta.12025.1	LOC_Os06g10230.1	0.0	cDNA receptor-like protein Kinase 5 precursor-RLK5	HarvEST Wheat

En la figura 33 se muestran los resultados de las PCR-Semicuantitativas en geles de agarosa. Se pudieron determinar diferencias claras en cuanto al momento de inducción entre los genes estudiados.

Los cinco primeros genes (*FLA26*, *CHI3*, *TAA1b*, *FERONIA* y *CGL1*) ya se expresaban en ovarios frescos (0dc), y en mayor o menor medida se expresan a lo largo del cultivo. Los genes *WALI6*, *Tad1* y *XIP-R1* se inducen fuertemente después de 5dc, excepto *WALI6* en ovarios jóvenes de Pavon que se induce a los 10dc. Sin embargo, *Tad1* y *XIP-R1* únicamente se expresaban con intensidad en ovarios maduros de Pavon. Los dos últimos genes *GH28* y *RLK5* se expresaron sólo en los ovarios frescos (0dc), y de forma débil a los 5dc, en algún caso.

También se pudieron observar diferencias en el nivel de expresión entre ovarios jóvenes y maduros. Así, los máximos niveles de inducción se observaron en ovarios maduros en todos los genes analizados y en ambos cultivares, excepto en el gen *GH28* que mostró un mayor nivel de expresión en ovarios jóvenes de los dos cultivares. Finalmente, se pudieron establecer también algunas diferencias en el nivel de expresión entre cultivares, como ya se ha indicado en el caso de *Tad1* y *XIP-R1*.

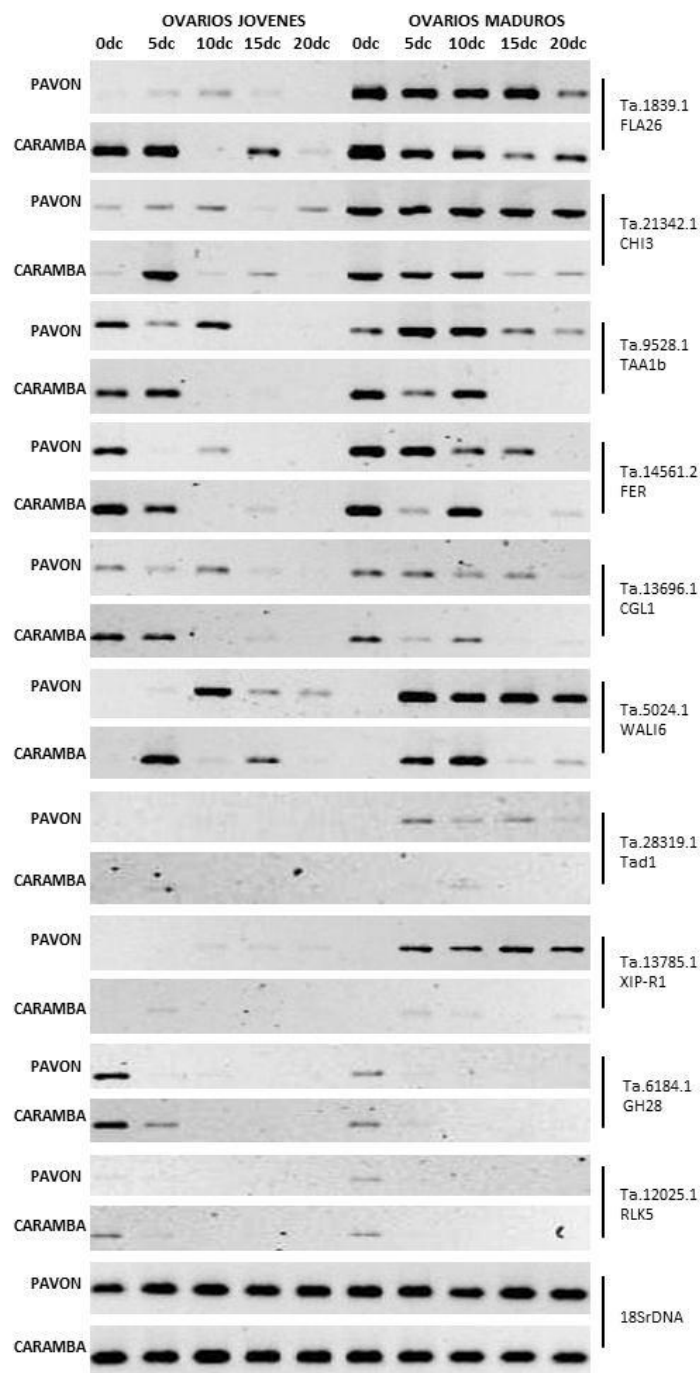


Figura 33: Análisis de expresión de los 10 genes seleccionados mediante PCR-Semiquantitativa y gel de agarosa en ovarios jóvenes y maduros de los cultivares de trigo Pavon y Caramba a los 0, 5, 10, 15 y 20 días de inoculación en el medio de cultivo (0dc, 5dc, 10dc, 15dc y 20dc). 18SrDNA es el gen constitutivo utilizado como control.

4.11.2. Validación de la expresión de los genes seleccionados mediante qRT-PCR

Ya que en los estudios realizados por el grupo de trabajo, se sabía que el efecto inductor de ovarios maduros de Caramba era mayor que del resto de los ovarios analizados, se seleccionaron algunos de los genes que presentaban una fuerte expresión en ovarios maduros de Caramba para un estudio más detallado mediante qRT-PCR. Para estos genes (*FLA26*, *TAA1b*, *FER* y *CGL1*) se diseñaron cebadores adecuados para el análisis de qRT-PCR. Como control interno se utilizó el gen Ta27771, ya que resultó ser el más estable.

Se tomaron muestras de ovarios frescos (0dc) y a los 5, 10, 15 y 20 días de inoculación en medio de cultivo (5dc, 10dc, 15dc y 20dc) de ovarios jóvenes y maduros de los cultivares Pavon y Caramba. Para cada estadio se utilizaron 2 ó 3 réplicas biológicas, y para cada réplica biológica se utilizaron 2 réplicas técnicas. La Tabla 28 del apartado de Anexos muestra los valores de ΔCT , $\Delta\Delta CT$, $2^{-\Delta\Delta CT}$ y las medias de cada réplica biológica y técnica utilizados para el análisis. Las amplificaciones se realizaron según el apartado 3.4.5 de Materiales y Métodos.

Los resultados de los análisis mostrados en la figura 34 confirmaron los resultados obtenidos por PCR-Semicuantitativa en el apartado anterior. Así, los mayores niveles de expresión del gen *FLA26* se obtuvieron en los ovarios maduros de Caramba, alcanzando los mayores niveles de expresión en 15dc y destacando especialmente las diferencias entre estos ovarios y los otros en 0dc, 5dc y 10dc respecto a los otros tres tipos de ovarios, aunque el nivel de expresión máximo se alcanzó en 15dc.

El perfil de expresión del gen *TAA1b*, presentó una fuerte dependencia del genotipo, observándose los niveles de expresión más altos en ovarios jóvenes (10dc) y en maduros (5dc) de Pavon. Los genes *FER* y *CGL1* presentaron, en general, niveles de expresión más bajos que los anteriores. En la figura 34 se observa que la expresión del gen *FER* aumentaba a lo largo del tiempo de inducción, presentando los

mayores niveles de expresión en todos los puntos en ovarios maduros de Caramba, con expresión máxima a los 10dc (hasta 2.3, 2.2 y 1.0 veces más respecto al resto de ovarios en el mismo punto). Finalmente, el gen *CGL1* aunque en ovarios jóvenes aumentó su expresión a lo largo del cultivo, en ovarios maduros presentó un patrón irregular. El mayor nivel de expresión se observó en ovarios jóvenes de Pavon a los 15dc.

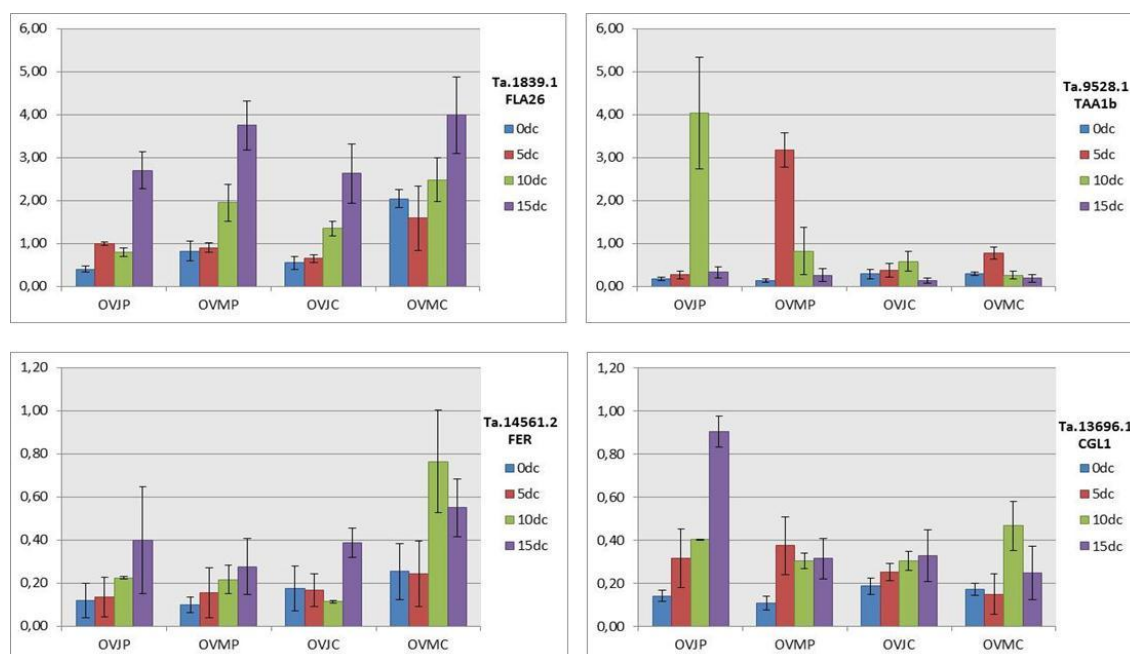


Figura 34: Niveles de expresión de los 4 genes seleccionados, cuantificados mediante qRT-PCR, a los 0, 5, 10 y 15 días de inoculación en medio de cultivo (0dc, 5dc, 10dc y 15dc) en ovarios jóvenes (OVJ) y ovarios maduros (OVM) de los cultivares de Pavon (P) y Caramba (C). Ta27771 es el gen constitutivo utilizado como control.

5. Discusión

Los cereales tienen gran importancia tanto en la alimentación humana como en la alimentación animal. Se prevé que en los próximos años será necesario aumentar la producción de cereales para atender la demanda de la población mundial (FAO 2011). Para satisfacer esta demanda, los programas de mejora disponen de una amplia gama de nuevas tecnologías cada vez más accesibles para la creación, análisis y manipulación de la variabilidad genética. Entre estas tecnologías, las basadas en la producción de líneas doblehaploides (DHs) son de gran utilidad (Crouch y col. 2009). En la última década ha aumentado el interés por la integración de los DHs en programas de mejora tanto en organismos públicos como en privados, estableciéndose laboratorios para la producción de plantas DHs en Europa, Canadá y Australia.

Se define como líneas DHs aquellas que se obtienen mediante la duplicación cromosómica de las plantas haploides y por tanto son plantas homocigóticas y fértiles (Kasha 2005, Murovec y Bohanec 2012). Por ello, la utilización de estas líneas en programas de mejora ofrece múltiples ventajas, las más importantes radican en la posibilidad de acortar el proceso de selección de nuevas variedades, ya que la homocigosis se alcanza en el menor tiempo posible (un año), y en el aumento de la eficiencia de la selección al ejercerse sobre líneas fijadas (Forster y col. 2007, Seguí-Simarro 2010). El uso de líneas DHs también ha sido beneficioso en los estudios genéticos, en particular en la construcción de mapas genéticos (Muñoz-Amatriaín y col. 2011, Poland y col. 2012), análisis de QTLs (Zhao y col. 2009, Riedel y col. 2011, Dahleen y col. 2012, Castro y col. 2012, Fisk y col. 2013) y en la selección asistida por marcadores moleculares (Tuveesson y col. 2007, Melchinger y col. 2011). Otra ventaja en el uso de los DHs es la capacidad de servir como sistema modelo para estudiar el desarrollo embrionario *in vitro*, debido a la gran similitud entre la embriogénesis de la microspora y la embriogénesis zigótica (Seguí-Simarro y Nuez 2008, Supena y col. 2008).

La embriogénesis de la microspora, mediante el cultivo de anteras o microsporas aisladas, es en la actualidad el método de producción de DHs en cereales con mayor potencialidad. En el grupo en el que se ha realizado esta Tesis, se ha

trabajado en los protocolos de regeneración de plantas de cebada y trigo panadero mediante la embriogénesis de la microspora con el fin de mejorar la eficiencia de producción (Cistué y col. 1994, 1999, 2003, 2006, Castillo y col. 2000, Soriano y col. 2007, 2008). Aunque la cebada se considera una especie modelo en la embriogénesis de la microspora, algunos cultivares de gran importancia agronómica presentan tasas de embriogénesis bajas y altos porcentajes de albinismo, especialmente en genotipos de primavera (Muñoz-Amatriaín y col. 2008). En trigo todavía sigue siendo un reto la producción de DHs en gran número de cultivares (Ascough y col. 2006, Lantos y col. 2013).

Aunque en los últimos años se ha hecho un esfuerzo por identificar los mecanismos moleculares que controlan las distintas fases de la embriogénesis de la microspora, la información disponible es muy limitada (Soriano y col. 2013). El conocimiento de los mecanismos que intervienen en este proceso tienen gran interés, ya que estos pueden contribuir a una mejora de los sistemas de producción de plantas DHs, y a un mayor conocimiento del desarrollo embriogénico (Supena y col. 2008, Seguí-Simarro y Nuez 2008, Muñoz-Amatriaín y col. 2009b).

El objetivo final de esta tesis doctoral ha sido el estudio de los mecanismos moleculares implicados en el inicio del patrón de desarrollo embriogénico de la microspora en cereales. Se ha tomado la cebada como especie modelo para identificar marcadores moleculares del desarrollo embriogénico y posteriormente se han caracterizado en trigo, como especie de mayor dificultad en la producción de DHs.

La embriogénesis de la microspora implica una reorganización de la expresión génica a gran escala

El desarrollo de la genómica funcional, que permite describir la función biológica de los genes mediante el conocimiento de su actividad, y en particular, el desarrollo de la técnica de los chips de DNA (Microarray), que permite el análisis de muchos genes en un solo experimento, constituyen una revolución para la comprensión de los procesos biológicos.

En el grupo de trabajo se adoptó como estrategia para el estudio de los mecanismos moleculares en la embriogénesis de la microspora el uso de técnicas de transcriptómica utilizando el chip comercial 22k “Barley1 GeneChip”. Los estudios anteriores del grupo se habían centrado en la fase de tratamiento de estrés, en la cual la microspora cambia su patrón de desarrollo gametofítico y se produce la dediferenciación adquiriendo la totipotencia celular (Muñoz-Amatriaín y col. 2006, 2009 a y b). Estos estudios permitieron identificar genes asociados al pretratamiento de estrés por manitol y además se pudieron determinar patrones de expresión génica, que ya durante el tratamiento de estrés caracterizaban las fases posteriores de la embriogénesis de la microspora, demostrando que el uso de técnicas de transcriptómica tenía un gran valor en el estudio de la embriogénesis de la microspora en cebada.

Para abordar el estudio de la fase de cultivo en la que la microspora se divide produciendo estructuras multicelulares, es decir de la fase temprana de desarrollo embriogénico, también se adoptó una estrategia de transcriptómica funcional. Por ello se realizó un experimento mediante el 22k “Barley1 GeneChip”, considerando cuatro puntos para el estudio: las anteras antes del tratamiento de inducción por estrés (0di) y 4 días después de este tratamiento (4di), y las anteras después de 4 y 8 días de cultivo (4dc y 8dc) en la línea DH6148 de alta capacidad embriogénica. Como resultado de este estudio se seleccionaron 11.454 genes con expresión diferencial cuando se comparaban dos puntos entre sí.

A partir de este análisis inicial, en este trabajo se adoptó un criterio de filtrado restrictivo (“Fold change” > 5.0) para seleccionar 7.578 genes de entre los 11.454 genes previamente seleccionados (Tabla 16). De estos genes, un 55% (4.140 genes) cambiaban su expresión durante la fase de inducción por estrés (4di vs. 0di), y el 65% de ellos disminuían su expresión. Hay que tener en cuenta que la antera en 0di está siguiendo un patrón de desarrollo gametofítico, caracterizado por un transcriptoma con una alta proporción de transcritos que codifican para proteínas estructurales, traducción y metabolismo (Whittle y col. 2010) y que el tratamiento de estrés severo implica no sólo una activación de una respuesta a dicho estrés sino también la

represión del patrón gametofítico y la desdiferenciación de la microspora para adquirir la totipotencia. En esta fase los mayores cambios en el transcriptoma (Figura 9) se asocian a genes relacionados con metabolismo, transporte celular y respuesta a estrés, como se había descrito previamente (Hosp y col. 2007a, Jacquard y col. 2009a, Muñoz-Amatriaín y col. 2006). La reorganización en las anteras después del tratamiento de estrés queda también claramente de manifiesto morfológicamente, ya que después del tratamiento de estrés el tapetum se ha degradado, las microsporas han perdido su posición periférica en el locus de la antera, aumentan de tamaño, y en algunos casos se reduce la vacuola (Figura 7 y 8).

Al inicio del desarrollo del patrón embriogénico (4dc vs. 4di) las microsporas han cambiado su morfología interna, la vacuola ha revertido y muestra un citoplasma denso, y en algunos casos ya se han iniciado las primeras divisiones (Figura 7 y 8). En esta fase 3.074 genes cambian su expresión (40,5% del total), siendo en este caso ligeramente mayor el número de genes que aumentan su expresión que los que la bajan. Al igual que en las otras fases, el mayor número de cambios se dio en genes relacionados con metabolismo. La dominancia de los cambios en procesos metabólicos al inicio de la embriogénesis de la microsporas había sido descrita por Malik y col. (2007), Tsuwamoto y Takahata (2008) y Stasolla y col. (2008) en *Brassica*. También se identificaron genes relacionados con transporte celular y respuesta a estrés. Sin embargo, destaca el aumento de genes asociados a ciclo celular (procesamiento de DNA), transcripción y síntesis de proteínas (biogénesis de ribosomas y traducción) como también había sido descrito por Malik y col. (2007), indicando la activación de mecanismos de crecimiento y desarrollo celular (Figura 9).

Finalmente sólo 364 genes cambiaron su expresión al comparar 8dc vs. 4dc, a pesar de que las microsporas continuaban dividiéndose formando estructuras multicelulares, y en algunos casos se había iniciado la rotura de la exina (Figura 7 y 8). Sin embargo, el 70% de los cambios consistían en un aumento de la expresión, destacando el aumento de genes relacionados con componentes celulares (pared celular y núcleo) y diferenciación celular (morfogénesis y muerte celular) (Figura 9). Estos resultados coinciden con los descritos por Maraschin y col. (2005a y c) que

habían asociado procesos de muerte celular programa con la rotura de la exina. Por lo tanto esta fase reflejaba una continuidad de los procesos iniciados en la fase anterior que iba acompañada de una mayor complejidad estructural.

La fase inicial de desarrollo embriogénico implica la activación *de novo* de un conjunto de genes

Aunque el proceso de la embriogénesis de la microspora ha sido ampliamente estudiado, una de las cuestiones que todavía no tiene respuesta es el punto exacto en el que se inicia el desarrollo embriogénico (Soriano y col. 2013). Aunque se han intentado determinar marcadores morfológicos que señalen dicho punto como: el reordenamiento del citoesqueleto, que mueve el núcleo al centro de la célula dando lugar a la morfología “star-like” (Gervais y col. 2000); la primera división mitótica simétrica, o del núcleo vegetativo del polen binucleado; la autofagia y remodelación citoplásmica (Corral-Martínez y Seguí-Simarro 2012), estos marcadores no pueden considerarse lo suficientemente fiables para la identificación temprana de las microsporas que darán lugar a embriones (Soriano y col. 2013).

Existe la necesidad de recabar más información de los mecanismos moleculares que intervienen en esta fase, así como identificar genes candidatos a ser marcadores moleculares del proceso. Sin embargo, la heterogeneidad de los cultivos, en los que solo una pequeña proporción de las microsporas darán lugar a embriones, y la posible coexistencia en el tiempo del patrón de desarrollo gametofítico y esporofítico de la microspora dificultan su identificación (Soriano y col. 2013).

En este estudio la utilización de una línea altamente embriogénica y la toma como punto de estudio de 4 días de cultivo de anteras (4dc), en el que el tapetum se ha degradado (Figura7) (Muñoz-Amatriaín y col. 2009c) y existe una expresión mínima de genes de polen (Maraschin y col. 2005b, Pulido y col. 2009), han permitido identificar 1.797 genes (Tabla 16) que se activaban simultáneamente en la fase inicial del desarrollo embriogénico de la microspora (Figura 10).

Sin embargo, no todos estos genes tenían el mismo perfil de expresión a lo largo del proceso. Así se pudieron determinar 13 clústeres de expresión que correspondían a tres patrones básicos (Figura 11 y 12). En primer lugar, genes cuyos niveles de expresión disminuyen por el tratamiento de estrés pero que en 4dc son similares a los niveles en 0di, entre los que destacan, por un mayor porcentaje frente a los otros grupos, los asociados a procesos metabólicos (metabolismo de fosfatos), transporte celular (substratos celulares). También se incluían en este grupo genes asociados a respuesta a estrés (estrés osmótico y salino) como había sido descrito por Muñoz-Amatriaín y col. (2006) y genes asociados a procesos de diferenciación celular (morfogénesis) y desarrollo (desarrollo embrionario), como el gen *BABY BOOM* (*BBM*), descrito por Boutilier y col. (2002). Estos genes podrían ser representativos de procesos básicos de funcionamiento celular y desarrollo.

El segundo patrón de expresión corresponde a genes con niveles bajos de expresión en 0di y que aumentaban progresivamente su expresión en 4di y 4dc, entre los que destacan genes relacionados con la regulación del metabolismo (regulación de la actividad proteica), la respuesta a estrés (temperatura) y la diferenciación celular (crecimiento celular y muerte celular). Este último proceso también había sido descrito por Maraschin y col. (2005a y c), por lo que estos genes podrían ser representativos de mecanismos de crecimiento y desarrollo celular.

Finalmente, un último grupo corresponde a genes activados *de novo* en 4dc, y que por lo tanto no corresponden a mecanismos activos en la microspora uninucleada ni activados durante el tratamiento de estrés, ni a mecanismos activos en los tejidos esporofíticos de la antera, ya que están degradados. Tampoco corresponden a un patrón de desarrollo gametofítico ya que la mayoría de las microsporas que han seguido ese tipo de desarrollo ya han degenerado (Malik y col. 2007, Tsuwamoto y Takahata 2008, Stasolla y col. 2008, Maraschin y col. 2005a y c). Por lo tanto, estos genes activados *de novo* en 4dc están asociados a un patrón de crecimiento y desarrollo nuevo, que corresponde al inicio del desarrollo embriogénico. En este grupo destacan con mayores porcentajes los genes asociados a síntesis de proteínas de reserva, procesos de transcripción (síntesis de RNA), biogénesis de componentes

celulares (pared celular y núcleo). La expresión de genes relacionados con pared y membrana celular, comunicación celular y señales de transducción, y síntesis de proteínas, también habían sido descritos en etapas tempranas de la embriogénesis de la microspora en *Brassica* (Malik y col. 2007).

De entre los genes de este grupo los correspondientes a los clústeres 4 y 7 agrupaban los genes con un mayor nivel de activación a los 4dc (Figura 13 y 14). El perfil de expresión correspondiente al clúster 7 es específico de 4dc y engloba 44 genes. En este clúster sólo se han podido clasificar funcionalmente el 68.2% de los genes al no presentar el resto homología con genes conocidos. La mayor proporción de genes corresponden a procesos metabólicos (hidrolasas, quitinasas y trehalosa fosfatasa) (Tabla 18, Figura 15). En estudios realizados por Malik y col. (2007) y Joosen y col. (2007) en *Brassica*, también se habían identificado genes relacionados con metabolismo de los carbohidratos e hidrolasas.

Pero el clúster 7 destaca por tener una mayor proporción, que el resto de los clústeres, de genes relacionados con respuesta a estrés entre los que encontramos genes relacionados con estrés biótico (quitinasas) y oxidativo (peroxidasas), y energía (glucógenos y trehalosa). También destacan las categorías de transcripción y diferenciación celular, entre ellos *VIVIPAROUS 1 (VIP1)* (Cassaretto y Ho 2003, Hobo y col. 1999) relacionado con señalización por ABA, y dos genes de expresión en el endospermo: *RGE1 (RETARDED GROWTH OF EMBRYO 1)* asociado con el control de desarrollo del embrión en *Arabidopsis* (Kondou y col. 2008) y *PR9 (ENDOSPERM TRANSFER CELL SPECIFIC PR9)* que se expresa en las células de transferencia del endospermo (Li y col. 2008a). Estos resultados nos indican que en los primeros días de cultivo la microspora ha de adaptarse a las nuevas condiciones mediante cambios metabólicos y de respuesta a estrés, al mismo tiempo que se activan nuevos procesos transcripcionales.

Los genes del clúster 4 se activaban fuertemente a los 4dc y se mantenían activos en mayor o menor medida en 8dc. De los 69 genes del clúster 4, sólo en el 69,5% se pudo establecer homologías con secuencias de genes conocidos. Estos

genes se asociaron a funciones marcadamente distintas del resto de clústeres, con una mayor proporción de genes relacionados con componentes celulares como arabinogalactanos y expansinas que determinan cambios en la pared celular, o como las proteínas formin-like y actin-binding asociadas a la reorganización del citoesqueleto. También hay una mayor proporción de genes asociados a transcripción como los factores transcripcionales del tipo HAPs y MADS-box y proteínas de reserva como prolaminas, y una menor proporción de genes de metabolismo (Figuras 13, 14 y 15). La expresión de estos genes estaría de acuerdo con cambios morfológicos en la microspora relacionados con crecimiento y diferenciación (Maraschin y col. 2006, Hosp y col. 2007a).

Hay que destacar que también formaban parte de este clúster genes asociados a la célula generativa del polen como *LGC1* (*LILIUM GENERATIVE CELL 1*) que se expresa en la membrana plasmática de las células generativas del polen (Mori y col. 2005) y *ECA1* (gametogenesis related family protein). Además se identificaron genes asociados a endospermo, como *MEGL3* (*MATERNALLY EXPRESSED GENE*) asociados a la región basal de transferencia del endospermo (Gutierrez-Marcos y col. 2004) y *PR60* (*ENDOSPERM TRANSFER CELL SPECIFIC PR60*) (Kovalchuk y col. 2009).

La presencia en estos clústeres de genes cuya función estaba asociada a distintos tejidos, órganos y etapas del desarrollo nos llevó a la caracterización de sus perfiles de expresión en el experimento BB3 (Transcription patterns during barley development) de la base de datos PLEXdb (Figura 18). Según este análisis en las fases tempranas de la embriogénesis de la microspora efectivamente se co-expresan genes específicos de: embrión como el que codifica para una AP2-proteína de la familia de los factores transcripcionales *AP2/ERF*, involucrados en múltiples procesos de regulación, señalización y respuesta a estrés (Sakuma y col. 2002, Salemme y col. 2013); endospermo y desarrollo inicial de la semilla como *PR60*, *LGC1*, *ECA1* y *RGE1*. También identificamos genes con niveles de expresión bajos en todas las fases del desarrollo, y que por lo tanto parecen ser específicos de la embriogénesis de la

microspora, especialmente entre los genes del clúster 7, como una Chitinasa y PWI (splicing factor PWI domain-containing protein) (Tabla 20).

La identificación de genes específicos de embrión esta de acuerdo con la existencia de una semejanza entre el desarrollo embriogénico de la microspora y el embrión zigótico. Esta semejanza ha despertado gran interés en los últimos años por la posibilidad de que la embriogénesis de la microspora pudiera servir como sistema modelo para estudiar el control de las primeras fases del desarrollo del embrión zigótico, al solventar los problemas de accesibilidad y de cantidad de material que se puede obtener para realizar estudios con herramientas genómicas (Pauls y col. 2006, Supena y col. 2008, Seguí-Simarro y Nuez 2008).

Así mismo la identificación de genes asociados a endospermo en la embriogénesis de la microspora había sido previamente descrita en maíz, como los genes *ZmESR2* y *ZmAE3* que codifican para proteínas ESR (embryo-surrounding región) (Massonneau y col. 2005) y que podrían estar involucradas en procesos de señalización durante el desarrollo del embrión (Testillano y col. 2010). También se había descrito, en estructuras heterogéneas procedentes de embriogénesis de la microspora en maíz, la presencia de un dominio con características de endospermo, células grandes de cromatina no condensada y citoplasma laxo (Testillano y col. 2002, 2010).

La co-expresión en las estructuras multicelulares embriogénicas de genes asociados a distintos patrones de desarrollo, así como específicos de la embriogénesis de la microspora, nos llevó a realizar una caracterización más detallada de la expresión génica de genes representativos del conjunto de genes que se expresan y de los mecanismos moleculares implicados.

Complejidad de los mecanismos moleculares asociados a la fase inicial de desarrollo embriogénico en cebada

Aunque los datos obtenidos del experimento de transcriptómica eran reveladores del cambio en el patrón transcripcional que acompaña el inicio de la embriogénesis de la microspora, este recogía transiciones morfológicas muy amplias. Esto es debido a que entre 4dc vs. 4di se produce el paso de microsporas en su mayoría en fase uninucleada vacuolada y solo algunas con regresión de la vacuola, “star-like” o binucleadas, a microsporas con citoplasma denso en las que ya se habían producido varias divisiones. También al ser el último punto analizado 8dc, en el que la mayoría de las microsporas todavía se encuentran dentro de la exina, quedaban fuera del estudio de transcriptómica las fases más avanzadas en las que se observa los primeros signos de carácter embriogénico de las estructuras. Además para entender la naturaleza de los mecanismos implicados era necesario conocer la expresión de los genes identificados con otros sistemas de desarrollo, y en particular con la embriogénesis zigótica. No obstante, conviene destacar que las fases iniciales del desarrollo del embrión zigótico no estaban representadas en este estudio al utilizarse cariósides completas y el estadio de los embriones zigóticos aislados se corresponde con embriones derivados de microsporas de 20 días de cultivo o posteriores. Así mismo, se estudio la relación directa de estos genes con la capacidad embriogénica de diferentes líneas de cebada. Por todo ello se acometieron una serie de experimentos de caracterización de la expresión de un conjunto de genes representativos de los clústeres 4 y 7 (Tabla 19, Figura 16) mediante PCR-Semicuantitativa.

Aunque los genes se habían seleccionado en el experimento de transcriptómica por su inducción a los 4 días de cultivo, se comprobó que, en gran parte de los genes la inducción se producía antes de 4dc, así como la desactivación se producía después de 8dc. Así se pudieron clasificar los genes según el día de cultivo en el que se producía su inducción (Figura 35).

Debido a la asincronía del desarrollo de las microsporas, en los cultivos anteriores a 4dc (1dc y 2dc) observamos la convivencia de microsporas en estado uninucleado vacuolado, con la morfología “star-like” y microsporas en las que ya se ha producido la primera división. La proporción de estructuras en una u otra fase depende del día de cultivo.

En 1dc la mayoría de las microsporas han aumentado su tamaño y presentan una morfología de microspora vacuolada o con el núcleo en posición central (Figura 8). Anteriormente, solo un estudio había abordado el análisis de los mecanismos moleculares implicados en el inicio del patrón de desarrollo embriogénico antes de la primera división (Maraschin y col. 2006), describiendo la activación de mecanismos de proteólisis, respuesta a estrés, inhibición de la muerte celular programada y rutas de señalización relacionadas con la adquisición del potencial embriogénico.

En nuestro estudio en 1dc se inducen tres de los genes seleccionados, *ENOD93* (*EARLY NODULIN 93*), *Hv-ME1* (*Hordeum vulgare-MICROSPORE EMBRYOGENESIS 1*) y *TPD1* (*TAPETUM DETERMINAN 1*) (Figura 35). Todo parece indicar que aunque estos genes puedan tener funciones coincidentes se asociarían a distintos mecanismos moleculares, ya que su expresión decae en tres fases que corresponden a estructuras morfológicas muy distintas, y los patrones de expresión en embriogénesis zigótica y tejidos vegetativos también era muy distinta: *TPD1* en desarrollo de la cariósida hasta 8 DAP, *Hv-ME1* tan solo en cariósida de 8 días y en raíz y *ENOD93* en cariósida de 2 a 8 DAP y en embrión zigótico de 10 y 12 DAP.

De los tres genes, *TPD1* es el que presenta una expresión más específica ya que únicamente se expresa hasta los 4dc. *TPD1* codifica a una proteína secretada que interviene en señalización durante la diferenciación celular del tapetum en *Arabidopsis* y arroz (Yang y col. 2003, Jia y col. 2008, Zhao y col. 2008). Se ha descrito que su homólogo en maíz *MULTIPLE ARCHESPORIAL CELLS 1* (*MAC1*) actuaría determinando la orientación de las divisiones que preceden a la diferenciación celular (Kelliher y Walbot 2012). Recientemente Leljak-Levanic y col. (2013) describieron al gen *TaTPD1-like* como marcador de la reprogramación zigótica temprana en trigo,

interviniendo en la comunicación celular entre el proembrión de dos células y los tejidos que lo rodean o entre la célula basal y apical del embrión.

Los otros dos genes inducidos en esta fase se expresaban hasta los 12 y 16dc cuando ya las estructuras embriogénicas estaban bien desarrolladas. El gen *Hv-ME1* codifica a una proteína desconocida que presenta cierta especificidad de expresión en carióspside de 8 días y en raíz. Finalmente, el gen *ENOD93* pertenece a la superfamilia de proteínas que también incluye las “plastocyanins” y “phytocyanins” y que tienen cierta homología con los arabinogalactanos (AGPs) (Ma y col. 2011). Las ENOD son proteínas de membrana plasmática (Khan y col. 2007) que en leguminosas intervienen en la inducción temprana de la nodulación, actuando como transductores de la señal por calcio y auxinas en la desdiferenciación y división de las células corticales de la raíz (ver revisión en Oldroyd y Downie 2008). En la embriogénesis de la microspora en tabaco se había descrito la inducción del gen *NtEPc* (*EMBRYOGENIC POLLEN-ABUNDANT PHOSPHOPROTEINS*) que presentaba homología con las ENOD y que se consideró como un gen marcador de la diferenciación embriogénica temprana (Kyo y col. 2000, 2002).

Tanto *TPD1* como *ENOD* intervienen en mecanismos de determinación celular a través del establecimiento de cierta polaridad asociada a la división celular. El establecimiento de una polaridad apical-basal parece ser uno de los primeros requisitos al inicio de la embriogénesis. Sin embargo en la embriogénesis de la microspora se desconocen los mecanismos que intervienen en su creación (Soriano y col. 2013). Se ha postulado que en microsporas aisladas, al carecer de referencias posicionales por no tener tejidos alrededor, la polaridad podría derivar de una preexistente en la microspora por la presencia del poro o las propiedades de la pared celular (Hause y col. 1993, Indrianto y col. 2001). Nuestros resultados parecen indicar, que aunque podría existir una polaridad previa en la microsporas, el inicio de la fase de cultivo parece desencadenar nuevos mecanismos que intervienen en el establecimiento de la polaridad en la microspora, pero mientras unos serían más específicos otros intervendrían en el desarrollo embriogénico hasta etapas avanzadas.

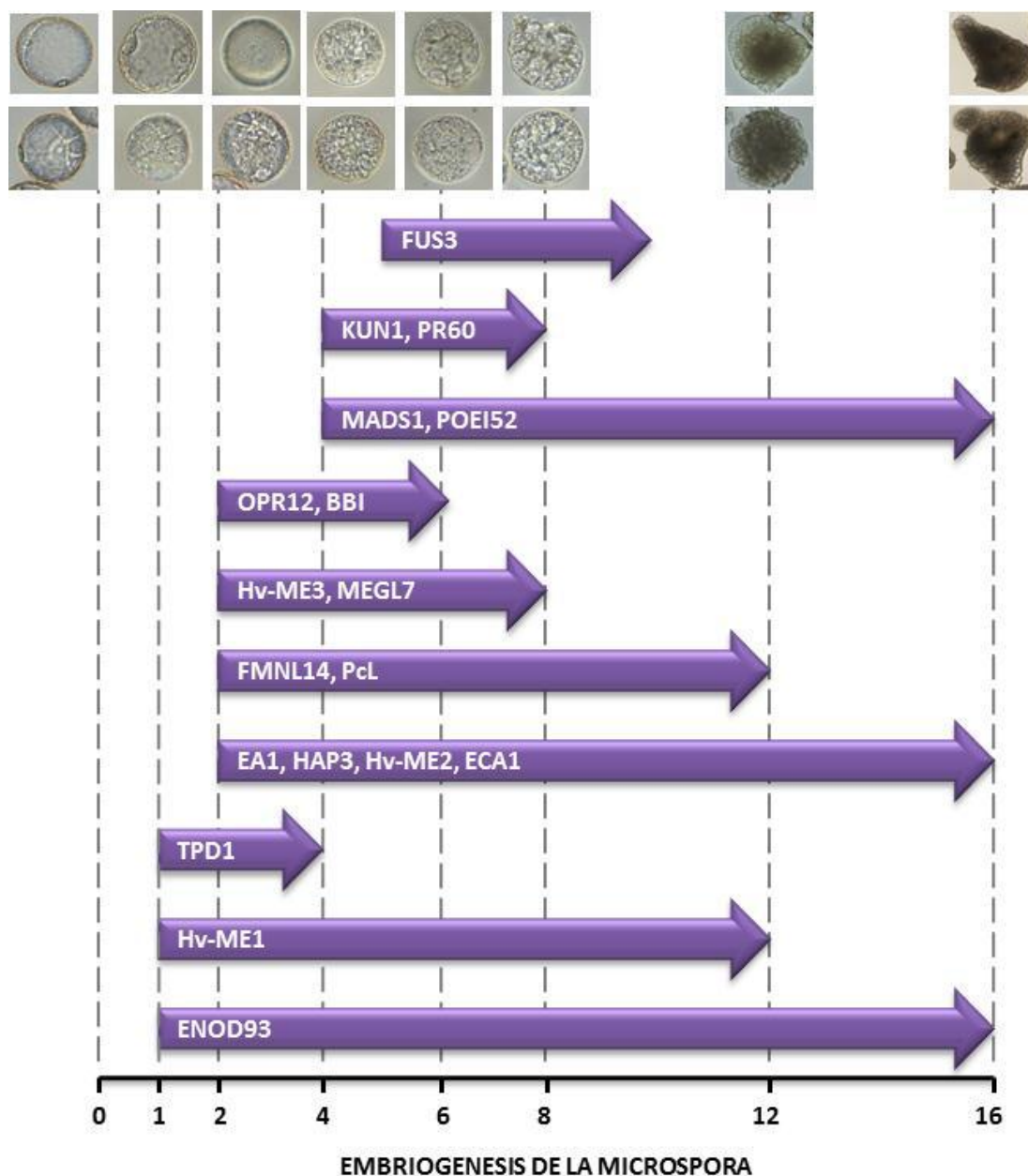


Figura 35: Relación entre perfiles de expresión génica y estructuras de microsporas aisladas a lo largo del cultivo de anteras, en los 16 genes de la embriogénesis de la microspora en cebada y del gen FUS3 relacionado con embriogénesis zigótica. El punto 0 corresponde a 4 días de tratamiento de inducción por estrés (4di).

A los 2 días de cultivo se observa un mayor número de microsporas en las que ya se ha producido la primera división y tienen el citoplasma más denso. Ya se distinguen las microsporas que no han inducido por un tamaño menor, y por sus características que son similares a las microsporas en el estado 0dc (Figura 8). En este punto se inducen 10 genes, que al igual que ocurría en los genes inducidos a 1dc bajan su expresión en distintas fases del cultivo (Figura 35).

Los dos genes que presentan una expresión más específica de esta fase son *OPR12* (*12-OXOPHYTODIENOATE REDUCTASE*) y *BBI* (*BOWMAN-BIRK TYPE TRYPSIN INHIBITOR*). Así mismo, los dos genes presentan una gran especificidad de expresión en los mismos tejidos ya que *OPR12* se expresa únicamente en raíz y *BBI* en raíz principalmente, aunque también se expresa en embrión de 12 DAP con menor intensidad. El gen *OPR12* (*12-OXOPHYTODIENOATE REDUCTASE*) codifica para un miembro de una familia pequeña de oxidoreductasas que participan en la ruta de síntesis de ácido jasmónico (JA) (Schaller y Weiler 1997). El ácido jasmónico y sus derivados regulan distintas respuestas a estrés y también a varios procesos del desarrollo, como el desarrollo floral y la inducción de senescencia (Santino y col. 2013). Cuando se ha estudiado el efecto de la aplicación exógena de JA en la embriogénesis de la microspora en *Brassica*, se observó que este sólo afectaba a la regeneración de embriones, evitando la germinación precoz (Wilén y col. 1991, Ahmadi y col. 2013). El gen *BBI* (*BOWMAN-BIRK TYPE TRYPSIN INHIBITOR*) codifica para proteínas ricas en cisteína con una actividad inhibidora sobre las proteasas (Song y col. 1999, Lin y col. 2006). Se ha descrito que *BBI* está involucrado en el mecanismo de respuesta a distintos estreses (Lin y col. 2006, Shan y col. 2008). La función de estos genes podría estar relacionada con la respuesta a estrés asociada a la adaptación de las microsporas a las nuevas condiciones de desarrollo, tal como se había descrito en la embriogénesis de la microspora en cebada (Maraschin y col. 2006).

Un segundo grupo de genes está formado por *FMNL14* (*FORMIN-LIKE PROTEIN 14*), *EA1* (*EGG APPARATUS-1*) y *HAP3/LEC1* (*LEAFY COTYLEDON1-type HAP3*) que se expresaban a lo largo de todas las fases del desarrollo embriogénico de

la microspora. Este grupo está caracterizado también por su expresión casi específica en embrión de 10-12 DAP, aunque también se aprecia una expresión muy débil en el desarrollo de cariósida, que puede provenir del embrión, y que queda enmascarada por su expresión en otros tejidos de la cariósida.

El gen *FMNL14* codifica para la única forma que funciona como una proteína de unión entre los microtúbulos y los microfilamentos, y por tanto jugaría un papel importante en la división celular (Li y col. 2010). El gen *EA1* pertenece a una clase de proteínas pequeñas secretoras (Gray-Mitsumune y Matton 2006) que primero se identificaron por su papel en los procesos de atracción y guía del tubo polínico (Márton y col. 2005, 2012), pero recientemente también se ha descrito su papel en procesos de señalización en el desarrollo de embriones zigóticos tempranos de trigo (Lejjak-Levanic y col. 2013). Finalmente, el gen *HAP3/LEC1* codifica una subunidad de CCAAT-box-binding factor (CBF), que se expresa en el inicio del desarrollo de la semilla (Xie y col. 2008, Thirumurugan y col. 2008). El gen *LEAFY COTYLEDON 1 (LEC1)* es un regulador de la identidad del embrión (West y col. 1994), y se ha descrito su expresión durante el desarrollo temprano de la embriogénesis de la microspora en *Brassica* (Malik y col. 2007, Stasolla y col. 2008).

En el desarrollo de la embriogénesis de la microspora, una de las cuestiones que quedan por resolver es el punto inicial de la adquisición de la identidad embriogénica. En *Brassica*, al estudiar la expresión de factores transcripcionales que se expresan en embrión zigótico, se observó que estos ya se podían detectar a los 1-2 días de cultivo de microsporas, indicando que la identidad del embrión se establece al producirse las primeras divisiones esporofíticas (Malik y col. 2007). La inducción de un gen que presenta homología con el gen *LEC1* a los 2dc en cebada parece indicar que también en esta especie el carácter embriogénico de las estructuras se establece durante las primeras divisiones.

Dos de los genes que se inducen a los 2dc, *PcL (PLASTOCYANIN-LIKE DOMAIN CONTAINING PROTEIN)* y *MEGL7 (MATERNALLY EXPRESSED GENE 7)* que aumentan su expresión hasta los 6dc, bajando posteriormente en fases más

avanzadas de la embriogénesis de la microspora, se expresan durante el desarrollo de la carióspside pero no en embrión de 10-12 DAP, ni en tejidos vegetativos. El gen *PcL* codifica para una “phytoeyanin” perteneciente a la misma superfamilia que las ENOD (Dong y col. 2005). Las “phytoeyanin” se han descrito como proteínas extracelulares del tipo AGP que estarían unidas a la membrana plasmática y actuarían en procesos de atracción y guía del tubo polínico (Dong y col. 2005), pero también se han encontrado en embrión y en endospermo (Huang y col. 2009). El gen *MEGL7* pertenece a la familia de proteínas ricas en cisteína, pequeñas y glicosiladas, que se expresan principalmente en el endospermo. En esta familia sólo se ha caracterizado el gen *MEG1* cuya expresión es exclusiva en la región basal de transferencia del endospermo en maíz (BETL) (Gutierrez-Marcos y col. 2004) donde participaría en el establecimiento y diferenciación celular de dicha región (Costa y col. 2012, Barrero y col. 2009).

Los otros tres genes que se inducen a los 2dc son específicos de la embriogénesis de la microspora o su expresión no es apreciable en los órganos y tejidos analizados, ni en los datos del experimento BB3 de cebada. Dos de los genes de este grupo *Hv-ME2* y *Hv-ME3* (*MICROSPORE EMBRYOGENESIS 2* y *3*) codifican para proteínas de función desconocida. El tercer gen *ECA1* (*EARLY CULTURE ABUNDANT 1*) se había introducido en nuestro análisis como control del proceso ya que se expresaba en etapas tempranas de la embriogénesis de la microspora en cebada (Vrinten y col. 1999, Pulido y col. 2009). Este gen presenta cierta homología con las AGPs (Vrinten y col. 1999), y se ha demostrado que también se expresa en la ovocélula antes de la fertilización en trigo y arroz (Sprunck y col. 2005, Ohnishi y col. 2011). Sin embargo, en nuestro estudio *ECA1* se expresó durante la embriogénesis temprana, media y tardía de la microspora.

Finalmente cuatro genes se inducen a los 4 días de cultivo (Figura 35), cuando ya se aprecian microsporas con el citoplasma más denso y en las que ya se han producido varias divisiones (Figuras 7 y 8).

Entre estos genes que se inducen en esta fase podemos diferenciar dos grupos. El primero corresponde a los genes *KUN1* (*KUNITZ-TYPE TRYPSIN INHIBITOR PRECURSOR-PROTEIN*) y *PR60* (*ENDOSPERM TRANSFER CELL SPECIFIC PR60*) que se expresan únicamente hasta 8dc, punto en el que las microsporas empiezan a romper la exina. Curiosamente, estos genes como lo hacían *PcL*, *MEGL7* se expresan en el desarrollo de la cariósida, pero mientras *KUN1* de una forma específica, *PR60* también se expresa en embrión de 10 DAP aunque su expresión ya decae a los 12 DAP. El gen *KUN1* codifica para un inhibidor de serin-proteasas que inicialmente se consideraba como una proteína de reserva de la semilla (Jofuku y Goldberg 1989), pero que también interviene en la germinación del embrión y formación del cotiledón (Perez-Grau y Goldberg 1989), y en la regulación de muerte celular programada durante la interacción planta-patógeno (Li y col. 2008b). Recientemente también se ha descrito su papel en la protección de la degradación de proteínas claves en zonas de crecimiento activo, en la regulación del balance entre síntesis de proteínas y degradación, en la división celular o en los primeros estadios de formación de nódulos (Islam 2013). El otro gen de este grupo codifica para una PR60 que corresponde a una proteína pequeña rica en cisteína con función en señalización. Se ha descrito que *PR60* actuaría en el desarrollo temprano de la semilla, se expresa en las células de transferencia del endospermo e interactúa con otras proteínas durante la regulación y degradación de péptidos de señalización (Kovalchuk y col. 2009, Li y col. 2008a).

Los otros dos genes inducidos a los 4dc, *POEI52* (*POLLEN OLE E ALLERGEN*) y *MADS1*, aunque se expresaban hasta los 16dc presentaban patrones de expresión distintos. Así, *MADS1* aumentaba su expresión a medida que avanzaba el desarrollo embriogénico de la microspora, y se expresaba en desarrollo de la cariósida, embrión y raíz, mientras que *POEI52* presentaba su máxima expresión a los 4-6dc, y también se expresó en embrión zigótico de 10 y 12 DAP. *MADS1* pertenece a la familia de factores de transcripción MADS box que son importantes en muchos procesos del desarrollo vegetativo y reproductivo, en particular en procesos de diferenciación (Smaczniak y col. 2012). *MADS1* es un gen de trigo (*TaMADS1*) que pertenece al grupo de MIKCC-MADS y que se asemeja a un gen *SEPALLATA-like*

(*SEP-like*) que se expresa en los primordios de órganos florales, pero también en el desarrollo de carióspside (6-12 DAP) (Zhao y col. 2006a y b). El gen *POE152* codifica a un miembro de la familia de extensinas, componentes de la pared celular que juegan un papel fundamental en la extensión de la pared celular durante el crecimiento celular (Sampedro y Cosgrove 2005). El gen modelo es el *Ole e 1* que se expresa en las paredes extracelulares del tubo polínico y que presenta homología con la proteína LAT52 que participa en vías de señalización de transducción en la guía del tubo polínico (de Dios Alché y col. 2004).

Al mismo tiempo, a los 4dc, se iniciaba la expresión de uno de los genes que se han asociado con la maduración de embrión *FUS3* (*FUSCA 3*), aunque el máximo nivel de expresión se alcanzaba a los 8dc (Figura 24), indicando que el carácter embriogénico estaba ya establecido en las estructuras derivadas de las microsporas y se iniciaba una nueva etapa con mayor presencia de mecanismos de diferenciación celular.

Del análisis de los 16 genes seleccionados hay que destacar que 4 (*TPD1*, *PcL*, *MEGL7* y *KUN1*) se expresaban en el desarrollo de la carióspside hasta los 8 DAP pero no lo hacían en embrión de 10 DAP. Además, en el análisis de transcriptómica utilizando los datos del experimento BB3, el número de genes que se inducían en la embriogénesis de la microspora y que se expresaban en el desarrollo de la carióspside y en el endospermo aumentaba, incluyendo genes con homología con *ECA1* (gametogénesis related family), *RGE1* (*RETARDED GROWTH OF EMBRYO 1*), la proteína B12D, una proteína que contiene un dominio AP2 y una expansina, pero también *PR60*. Se había descrito que algunos de estos genes se expresaban en regiones específicas del endospermo: *MEGL7* en la región basal de transferencia (basal endosperm transfer layer, BETL), que interviene en la captación de nutrientes de los tejidos maternos; *RGE1* y *PR60* en la región que rodea el embrión (ESR), que tiene un papel protector y nutritivo del embrión; *B12D* en la aleurona, que participa en la degradación y movilización de sustancias de reserva en la germinación. En todos estos tejidos se han descrito funciones en la regulación de la embriogénesis, y también en todos ellos se acumulan las auxinas (Forestan y col. 2010).

La expresión de genes específicos de endospermo durante la embriogénesis de la microspora ya había sido descrita anteriormente en maíz (Magnard y col. 2000, Massonneau y col. 2005). Los genes identificados correspondían a los genes *ZmAE* (*Zea mays ANDROGENIC EMBRYO 1*), de los cuales uno de ellos tenía homología con una proteína que contiene un dominio “epidermal growth factor” (EGF-like) de proteínas de membrana (Magnard y col. 2000). Los otros genes identificados eran los llamados ESR ya que se expresaban específicamente en la “embryo surrounding region” (ESR) del endospermo joven y alguno de ellos presentaban homología con un dominio de CLAVATA3 (CLV3) que interviene como péptido secretado en señalización en procesos de desarrollo (Opsahl-Ferstad y col. 1997, Bonello y col. 2000, 2002). Aunque inicialmente se sugirió que la expresión de estos genes podría estar relacionada con la presencia de dos dominios en las estructuras embriogénicas, uno de carácter embrión y otro de carácter endospermo, se observó que estos genes se expresaban en los dos dominios (Magnard y col. 2000, Massonneau y col. 2005) y en las distintas estructuras presentes en los cultivos, localizándose en la pared celular de las células del embrión derivado de microsporas (Testillano y col. 2002, 2010).

Nuestros resultados confirman que señales producidas en distintas regiones del endospermo y que se necesitan en la embriogénesis zigótica para el correcto desarrollo del embrión, serían asumidas por el embrión *per se* en la embriogénesis de la microspora. Resultados similares se han descrito para el gen *ZHOUP1* que controla la formación de la cutícula del embrión (Yang y col. 2008, Xing y col. 2013).

Al disponer en el grupo de trabajo de líneas DHs de cebada casi isogénicas pero con distinta capacidad embriogénica (Muñoz-Amatriaín y col. 2008), la comparación de los perfiles de expresión de los genes seleccionados de estas líneas nos permitía dilucidar que genes podrían ser considerados como marcadores tempranos del desarrollo embriogénico de la microspora.

En una primera aproximación al comparar las líneas DH6148 y DH6183, que diferían básicamente en el carácter embriogénico de las estructuras obtenidas, se observó que todos los genes se inducían en DH6183 a los 4dc al igual que en

DH6148. Además, la mayoría de los genes presentaban el mismo perfil de expresión en 4dc y 8dc, aunque se podían apreciar algunas diferencias significativas (Figura 21 y 22). Curiosamente estas diferencias parecían centrarse en los genes de expresión específica de las primeras fases del cultivo como *TPD1*, *OPR12* y *Hv-ME3*, ya que eran genes cuya expresión bajaba a los 4, 6 ó 8dc en el genotipo embriogénico (DH 6148) y se prolongaba en el tiempo en la línea no embriogénica (DH6183). También se observaron diferencias en los niveles de expresión de algunos genes, siendo en general mayor el nivel en la línea menos embriogénica como en *FMNL14*, *BBI*, *MADS1*, *PR60* y *KUN1*. No se observaron diferencias entre líneas en el resto de los genes estudiados. El gen *ECA1* propuesto como marcador de la inducción de la embriogénesis de la microspora en cebada (Pulido y col. 2009), no presentó diferencias de expresión entre las líneas, lo que indica que su función no está relacionada con la capacidad embriogénica.

Para identificar con mayor claridad las diferencias entre líneas se amplió el estudio a la línea DH6004 de muy baja capacidad embriogénica por el número muy bajo de estructuras que se forman (Tabla 15, Figura 6 y 21). Además se tomaron fases anteriores y posteriores a 4-8dc, de este modo se analizaban fases más avanzadas del cultivo en las que ya se pueden observar signos claros del carácter embriogénico de las estructuras. En este análisis se apreciaron diferencias muy claras entre las líneas.

En dos genes, *FMNL14* relacionado con cambios en el citoesqueleto en la división celular y *MADS1* implicado en la diferenciación celular se producían retrasos en la inducción en los genotipos menos embriogénicos. Y en los genes *TPD1*, implicado en la reorganización embriogénica inicial, *OPR12*, que interviene en la ruta de síntesis del ácido jasmónico, y el gen *PR60*, que participa en cascadas de señalización, la desactivación se produce antes en el genotipo más embriogénico. Dos genes, *BBI* y *KUN1*, relacionados con mecanismos de respuesta a estrés presentaban perfiles de expresión muy distintos entre líneas. Así, mientras los mayores niveles de expresión de *BBI* se observaban en la línea más embriogénica (DH6148), los de *KUN1* se daban en la línea que producía estructuras no embriogénicas (DH6183).

Cuando se había comparado la expresión de genes asociados a la embriogénesis de la microspora en cebada y en *Brassica* en condiciones inductivas o no-inductivas, se pudo diferenciar entre una serie de genes cuya expresión acompañaba al desarrollo embriogénico de las microsporas pero no tenían un papel en su consecución y los que sí tendrían esta función (Maraschin y col. 2006, Tsuwamoto y col. 2007). Sin embargo, cuando se estudiaba la expresión de distintos genes asociados a la embriogénesis de la microspora en distintos cultivares de *Brassica* (Malik y col. 2007, Malik y col. 2008) se observó que muy pocos, entre ellos *LEC2*, permitían distinguir entre cultivares embriogénicos y no embriogénicos en las primeras fases del desarrollo. Sin embargo, un mayor número de genes eran buenos marcadores en cultivos más avanzados. La misma situación se observaba entre cultivos de *Brassica* tratados con buthionine sulfoximine (BSO), que aumenta la capacidad embriogénica, ya que era difícil encontrar marcadores en las etapas tempranas pero no en la tardías (Stasolla y col. 2008). Para identificar marcadores de la embriogénesis de la microspora también se han hecho comparaciones entre condiciones de cultivo en la que se consiguen embriones semejantes a los zigóticos o no, consiguiendo asociar la expresión de genes como las *LTPs* (*LIPID TRANSFER PROTEINS*) a los embriones de buena calidad (Joosen y col. 2007).

En nuestro estudio todos los posibles marcadores se inducen en etapas tempranas de la embriogénesis, antes de la rotura de la exina, fases en las que aunque hay indicios de que el carácter embriogénico ya se ha establecido, todavía no se manifiesta morfológicamente. Las diferencias en los perfiles de expresión de los genes entre las líneas de distinta capacidad embriogénica pueden servir de punto de partida de nuevos estudios.

Durante las fases de tratamiento de estrés y la fase media de la embriogénesis de la microspora de cebada se expresan genes de síntesis, degradación y señalización de Acido Abscísico (ABA)

El ácido abscísico (ABA) es una hormona que regula el crecimiento de plantas, desarrollo, adaptación a diferentes condiciones de estrés, síntesis de proteínas de reserva de las semillas, dormancia, e inhibe la fase embrionaria hacia la germinación y crecimiento vegetativo (Leung y Giraud 1998, Lee y col. 2006). Al estudiar los perfiles de expresión de los genes asociados a ABA durante la embriogénesis de la microspora se observó que el ABA estaría implicado en dos fases bien diferenciadas; el tratamiento de estrés y la fase de desarrollo embriogénico.

El papel del ABA como principal regulador en la respuesta al estrés abiótico en plantas está ampliamente documentada (Finkelstein 2013). El contenido en ABA en las plantas sometidas a estrés aumenta por la inducción de genes de síntesis de ABA. Este aumento de ABA estimula cambios en la expresión génica incrementando la capacidad de resistencia de la planta al estrés (Tuteja 2007).

Se ha descrito que durante el desarrollo de las anteras, en la microspora uninucleada disminuyen los niveles de expresión de los genes de síntesis de ABA y aumenta la de los genes de desactivación, por lo que los niveles de ABA se reducen (Hirano y col. 2008). En nuestro sistema hemos observado que al iniciar el tratamiento de estrés con manitol, esta situación se invierte (Figura 23), aunque no de forma uniforme para los genes de síntesis de ABA estudiados. Así, el gen *ZEP2* (*ZEAXANTIN EPOXIDASE2*) (Audran y col. 2001), que cataliza el primer paso de biosíntesis de ABA en los plástidos, se desactiva por el estrés, mientras que el gen *AO5a* (*ALDEHYDE OXIDASE5*), que cataliza el último paso de la biosíntesis de ABA en el citosol (Seo y col. 2000), aumento su expresión presentando un pico a los 2 días de inducción por estrés. El gen de hidrólisis de ABA *ABA8'OH* (*ABA 8' HYDROXYLASE*) (Mizutani y Todoroki 2006) se desactivaba con el tratamiento de estrés. Estos resultados junto con la desactivación del gen *BG3* (β -*GLUCOSIDASE3*)

(Lee y col. 2006), que permite la síntesis de ABA a partir del conjugado ABA-GE, indican que durante el tratamiento de estrés con manitol se produce una síntesis *de novo* de ABA. Esta síntesis podría venir mediada por la activación directa del gen *AO5a* a través de una ruta alternativa de síntesis de ABA denominada ABA-independent pathway descrita en la respuesta a estrés osmótico en *Arabidopsis* por Barrero y col. (2006). Para confirmar esta hipótesis sería necesario un estudio más completo incluyendo el análisis de la expresión de otros genes implicados en la síntesis de ABA.

Una vez los niveles de ABA han aumentado debido al estrés se produce la activación de una cascada de cambios transcripcionales reguladas por complejos mecanismos que intervienen en percepción y señalización por ABA. Dos de los genes implicados en estos mecanismos se activan por el tratamiento de estrés con manitol. El gen *ABI1b* (*ABSCISIC ACID INSENSITIVE 1*), que codifica una fosfatasa (PP2C) (Leung y col. 1997, Meyer y col. 1994, Merlot y col. 2001) y que junto con PYR/PYL/RCAR y SnRKs forma parte del primer módulo de señalización por ABA, presenta un pico de activación a los 2 días de tratamiento de estrés. Sin embargo, el gen *ABI5* (*ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5*) (Finkelstein y Lynch 2000, Finkelstein y col. 2002), que codifica para un factor transcripcional de tipo bZIP y se sitúa por debajo del gen *ABI1b* en la cadena de señalización por ABA, se activa a los dos días y mantiene el mismo nivel de expresión a los 4 días de tratamiento de estrés, pero bajando su nivel en el primer día de cultivo, indicando que la señalización por ABA se prolonga durante todo el tratamiento de estrés.

En distintos trabajos se había establecido la asociación entre los niveles de ABA y los tratamiento de estrés en embriogénesis de la microspora (Imamura y Harada 1980, Hoekstra y col. 1997, van Bergen y col. 1999, Hu y col. 1995). También se había descrito la activación de genes regulados por ABA durante el tratamiento de estrés como una ABA-regulated alcohol dehydrogenase (ADH) (Maraschin y col. 2006). Estos resultados también confirman los resultados obtenidos en nuestro grupo (Muñoz-Amatriáin y col. 2006), en los que no se apreciaba la expresión de genes de síntesis de ABA después del tratamiento de estrés, pero si cambios en la regulación

con la activación del regulador positivo de ABA, la proteína kinasa (PKABA) que activa un factor transcripcional específico de la semilla que tiene homología estructural con *ABI5* de *Arabidopsis* (Johnson y col. 2002).

Por otro lado, se ha demostrado que el ABA regula varios procesos fisiológicos del desarrollo de las plantas, entre ellos procesos ligados al desarrollo embriónico como la síntesis de proteínas y lípidos de reserva, la morfogénesis del embrión y la dormancia (ver revisión en Finkelstein 2013). Así, se ha descrito un aumento en los niveles de ABA cuando los embriones entran en la fase de maduración, en la que se produce el cambio del crecimiento por división celular al crecimiento por alargamiento de las células que va acompañado del inicio de acumulación de reservas. Aunque en el inicio de la maduración la acumulación de ABA procede del ABA materno (Kanno y col. 2010).

En la embriogénesis de la microspora también se había adjudicado un papel al ABA, no sólo en relación con el tratamiento de estrés sino durante el desarrollo embriónico, ya que la aplicación de ABA exógeno a los embriones preglobulares o globulares aumentaba el porcentaje de embriogénesis en *Brassica* (Ramesar-Fortner y Yeung 2006, Belmonte y col. 2006). En *Brassica* también se ha descrito que una desecación inducida por ABA de los embriones procedentes de las microsporas aumentaba la germinación de los mismos (Rudolf y col. 1999). Por otro lado, entre los genes asociados a la fase de desarrollo embriónico en trigo se aisló el gen *EcMt* correspondiente a una metalotioneína relacionada con la respuesta a ABA (Reynolds y Crawford 1996).

También se ha descrito que los niveles de ABA durante el desarrollo de embriones derivados de cultivo de microsporas y embriones zigóticos en *Brassica* presentan diferencias significativas. Así, mientras en los embriones zigóticos se observaba un único pico de ABA, en los embriones derivados de microsporas se observaba una curva bifásica y falta de decaimiento al final de la curva al no sufrir desecación (Hays y col. 2001).

En nuestro sistema observamos que efectivamente durante la fase de desarrollo embriogénico se activaban todos los genes implicados en síntesis y degradación de ABA, pero a distintos niveles y además existe un cierto desplazamiento en el pico de inducción (Figura 23). Mientras *ZEP2* presenta un pequeño pico de expresión a los 4dc cuando las microsporas inician las primeras divisiones, el gen *AO5a* presenta una fuerte activación a los 8dc cuando ya se observan estructuras multicelulares y se inicia la rotura de la exina. También en semillas de cebada se había observado un desfase en el punto de máxima expresión de los genes, siendo en *ZEP2* a los 20 días y en *AO5a* a los 25 días (Seiler y col. 2011). Esta activación de los genes de síntesis está acompañada por la activación del gene *ABA8'OH*, que participa en la hidrólisis de ABA, presentando también un pico a los 8dc, indicando que en este punto se está produciendo una regulación activa de la homeostasis de ABA, tal como ocurre durante el desarrollo de la semilla de cebada (Seiler y col. 2011). Sin embargo, a los 12 días de cultivo, cuando ya se observan estructuras multicelulares globulares, los genes de síntesis y degradación de ABA decaen y se produce una fuerte activación del gen de deconjugación *BG3*, lo que parece indicar que los embriones durante la fase de maduración necesitan una aportación de ABA más rápida que la que les proporciona la ruta de síntesis que también se aprecia en embriones zigóticos desde los 16 a 25 días (Seiler y col. 2011).

Los dos genes *ABI1b* y *ABI5*, que participan en la percepción y señalización por ABA, también se activan durante el desarrollo embriogénico de la microspora. Estos genes alcanzan un pico de máxima expresión a los 8 días de cultivo, coincidiendo con la activación de genes de síntesis *de novo* de ABA. En este punto los niveles de expresión relativos son inversos a los observados en la fase de tratamiento de estrés siendo *ABI5* el que presenta el mayor pico de expresión en 8dc y *ABI1b* en la fase de tratamiento de estrés. Anteriormente, se había descrito la activación de estos genes en semillas de cebada pero con cierto desfase, ya que *ABI1b* tenía un pico de expresión a 20 y 25 días y *ABI5* a 16 y 20 días (Seiler y col. 2011).

Distintos estudios han establecido que una red de factores transcripcionales de tipo B3-domain, *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3* (*ABI3*), *FUSCA3* (*FUS3*), *LEAFY*

COTYLEDON 2 (LEC2), controlan la maduración del embrión zigótico y su transición hacia la dormancia. La señalización por ABA durante esta fase está íntimamente ligada a la expresión de estos factores transcripcionales. Dos de estos genes (*FUS3* y *ABI3*) se han estudiado en nuestro sistema, observándose que se activaban fuertemente a los 8 días de cultivo. *FUS3* está considerado como el punto de partida de la actividad hormonal en el embrión coordinando la acción de ABA-GA a través de un sistema de feedback asociado con la síntesis de ABA y GA (Suzuki y McCarty 2008). *ABI3* y su ortólogo en monocotiledóneas *VP1 (VIVIPAROUS 1)* (Giraudat y col. 1992) actúa sobre genes que codifican proteínas y lípidos de reserva, y genes que confieren tolerancia a la desecación, aunque también interviene en la señalización por auxinas en los tejidos vasculares y los primordios laterales en la raíz (Brady y col. 2003, Mönke y col. 2012).

También se ha descrito que la amplificación de la señal por ABA a través de la interacción entre *ABI3* y *ABI5* (Gampala y col. 2002, Cassaretto y Ho 2003, 2005), tiene gran importancia en la maduración de las semillas, reactivando programas de embriogénesis tardía (Lopez-Molina y col. 2002). Así, se ha demostrado que *ABI5* es el regulador principal de la expresión de genes *LEA (LATE EMBRIOGENESIS ABUNDANT)* y dehidrinas (Mönke y col. 2012).

En embriogénesis zigótica *FUS3* y *ABI3* presentan diferente patrón de expresión espacio/temporal. Así, la expresión de *ABI3* se mantiene a un nivel relativamente alto durante toda la fase de maduración mientras que *FUS3* declina su expresión antes de que el embrión alcance la madurez. Y mientras *FUS3* se expresa preferentemente en el protodermo del embrión, *ABI3* lo hace en todo el embrión (Suzuki y McCarty 2008). En embriogénesis de la microspora en *Brassica*, Malik y col. (2007) determinaron los patrones de expresión de *FUS3* y *ABI3* junto con *LEAFY COTYLEDON 1 (LEC1)*, regulador inicial de estos genes, describiendo que mientras *FUS3* se expresaba en la fase de inducción *ABI3* y *LEC1* lo hacían cuando las microsporas se estaban dividiendo activamente. Nuestros resultados demuestran que en la embriogénesis de la microspora en cebada también intervienen los reguladores de la maduración de embriones descritos en otros sistemas. La regulación temporal de

estos genes concuerda con los datos de expresión en embrión zigótico y no con los descritos en embriogénesis de la microspora en *Brassica* ya que un homólogo a *LEC1* (*HAP3*, Figura 17) se induce fuertemente a los 2dc y *FUS3* y *ABI3* inician su expresión a los 4dc alcanzando su nivel máximo a los 8dc, pero mientras *FUS3* declina bruscamente su expresión después de los 8dc, *LEC1* (Figura 17), *ABI3* y *ABI5* presentan niveles de expresión altos a los 16dc y 12dc respectivamente (Figura 24).

Finalmente, el gen *FCA* (*FLOWERING TIME CONTROL PROTEIN A*) que codifica a una proteína RNA-binding, es un componente de cascadas postranscripcionales involucrado en el control del tiempo de floración (Macknight y col. 1997, 2002, Simpson y col. 2003). Aunque en dicotiledóneas se ha cuestionado su función como receptor de ABA (Razem y col. 2006, Risk y col. 2009, Jang y col. 2008), en monocotiledóneas se ha descrito que actúa sobre la expresión de genes implicados en la señalización por ABA a través de la regulación de *VP1* y también que el nivel de transcripción en cebada sería proporcional al estado de dormancia (Kumar 2010). Aunque en embriogénesis zigótica se había descrito su expresión desde embriones de 2 DAP hasta el final de la desecación (Kumar y col. 2011), en nuestro sistema presenta un patrón de expresión que se asemeja más a *FUS3* que a *ABI3*.

La fase inicial de desarrollo embriogénico en trigo también implica la activación de un conjunto de genes de embriogénesis

La información disponible sobre los mecanismos moleculares de la embriogénesis de la microspora en trigo panadero es muy limitada, lo que probablemente se debe a los problemas para obtener altas eficiencias de producción de DHs en la mayoría de los genotipos (Lantos y col. 2013). Por lo tanto se necesitan más estudios para aclarar el control molecular de la embriogénesis de la microspora en esta especie que tiene gran importancia agronómica.

En este estudio se han utilizado dos cultivares de trigo panadero Pavon y Caramba que se diferenciaban en el número de microsporas que dividen y en el

número de embriones, siendo en el primero del orden de entre 2 y 3 veces superior al segundo, y por lo tanto parecían ideales para la identificación de genes asociados con el inicio del patrón de desarrollo embriogénico de la microspora.

Inicialmente se pretendió estudiar en trigo panadero los patrones de expresión de los 16 genes asociados con las fases iniciales del patrón de desarrollo embriogénico en cebada. Sin embargo, a pesar de que se buscaron homologías de secuencia en diferentes bases de datos, solamente pudimos diseñar cebadores para 3 genes del clúster 4 y un gen del clúster 7. Por ello, en este estudio se incorporaron otros genes candidatos, pertenecientes a distintos clústeres del estudio de transcriptómica en cebada, que se inducían *de novo* a los 4dc o genes que aumentaban progresivamente su expresión en 4di y 4dc, o genes que aumentaban su expresión a lo largo del cultivo (4dc y 8dc) (Tabla 22, Figura 28). También se realizó el análisis de expresión de 2 genes que codifican a proteínas de tipo fasciclinas y dos genes asociados a embriogénesis somática en trigo (Tabla 23).

La caracterización morfológica durante los procesos de la embriogénesis de la microspora nos permitió establecer asociaciones entre los perfiles de expresión y los posibles mecanismos en los que estaban involucrados los distintos genes estudiados. En la figura 36 se representa de forma gráfica los patrones de expresión de los genes estudiados en trigo. En trigo, a los 5 días de cultivo (estado equivalente a 4dc de cebada) la pared celular de la antera se ha degradado, las microsporas presentan un citoplasma denso y en algunas de ellas se ha producido la segunda división mitótica (Figuras 26 y 27). En este estadio observamos la inducción de cinco genes: *TaTPD1-like*, *TAA1b*, *GSTF2*, *GSTA2* y *WALI6* (Figura 29). Los genes *TaTPD1-like* y *TAA1b* han sido asociados con mecanismos de señalización y desarrollo temprano del polen. *TaTPD1-like* es homólogo con el gen *TAPETUM DETERMINAN 1 (TPD1)* el que codifica a una proteína que interviene en señalización durante la diferenciación celular del tapetum en *Arabidopsis* (Yang y col. 2003, 2005, Jia y col. 2008). Recientemente, Lejjak-Levanic y col. (2013) describieron el gen *TaTPD1-like* como marcador de la reprogramación zigótica temprana en trigo, y que podría jugar un papel esencial en la comunicación intercelular (o célula a célula). La expresión de este gen también se

observo en cebada. Sin embargo, su expresión se limitó a la fase temprana de la embriogénesis, desde 1dc hasta 4dc, mientras que en trigo se expresó en estadios posteriores desde 5dc hasta 15dc (Figuras 35 y 36). El gen *TAA1b* codifica a una proteína Fatty acil-coA reductase que interviene en la biosíntesis de cadenas largas de alcoholes grasos (VLCFA) formando la esporopolenina y los ésteres de cera (Wang y col. 2002). Se ha propuesto que derivados de VLCFA podrían funcionar como moléculas de señalización en el control de la división celular mediante la comunicación de la capa epidérmica y tejidos más internos (Nobusawa y col. 2013). En embriogénesis de la microspora, debido a la ausencia de tejidos circundantes, estos dos genes, *TaTPD1-like* y *TAA1b*, podrían estar implicados en la comunicación interna de las estructuras embriogénicas.

Otros genes que se inducen en esta etapa fueron dos glutathione S-transferase (GSTs), *GSTF2* y *GSTA2*, que codifican para una proteína de tipo phi (F) (Cummins y col. 2003), y una proteína inducida por patógenos (Mauch y Dudler 1993), respectivamente. La expresión de estos genes ha sido descrita en diferentes estados de la embriogénesis de la microspora (Muñoz-Amatriaín y col. 2006, Joosen y col. 2007, Malik y col. 2007, Tsuwamoto y col. 2007, Stasolla y col. 2008). Su expresión se ha relacionado con la protección de los embriones en desarrollo frente a condiciones de estrés en fase de crecimiento activo (Stasolla y col. 2008), pero no con la adquisición del potencial embriogénico (Vrinten y col. 1999, Maraschin y col. 2005a).

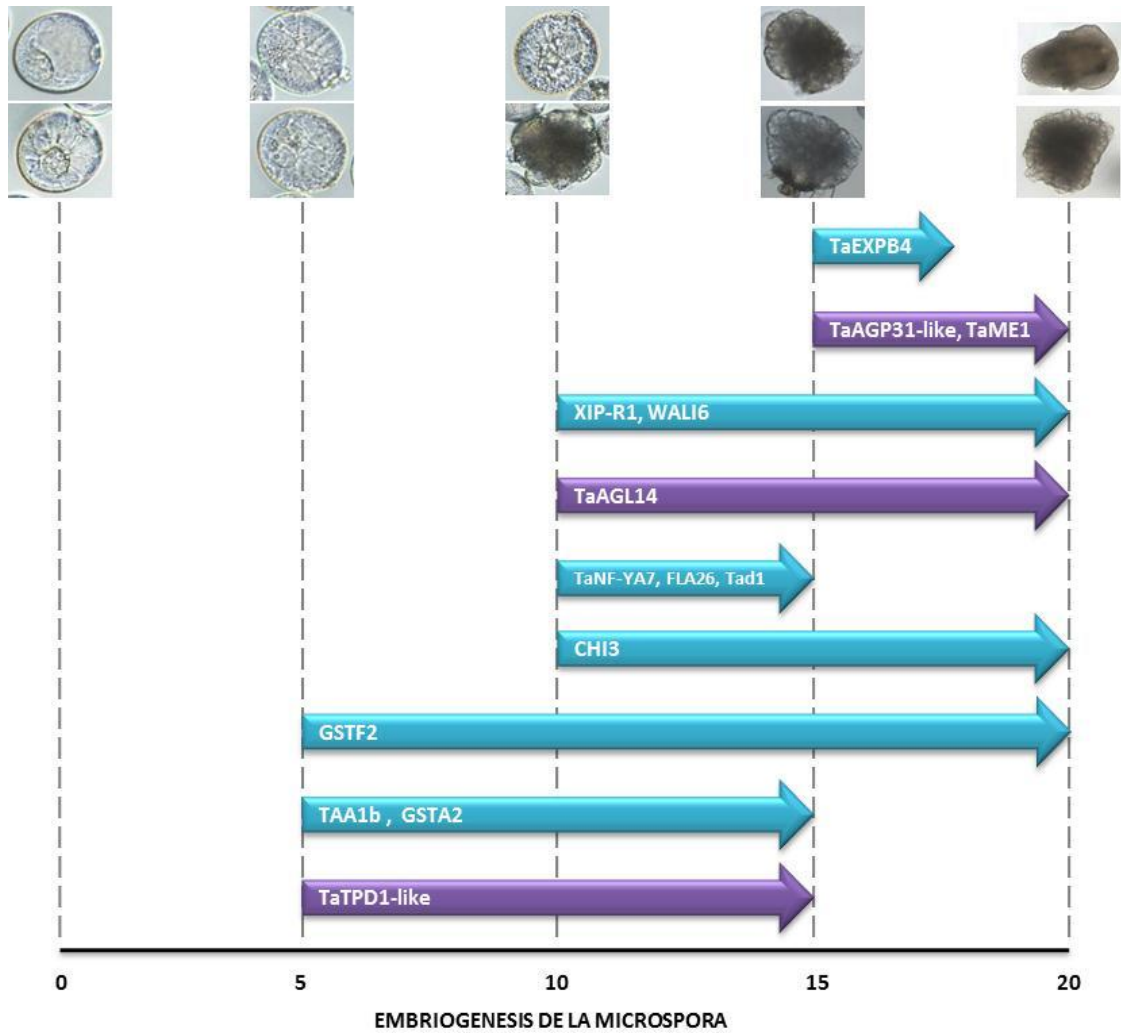


Figura 36: Relación entre perfiles de expresión génica y estructuras de microsporas aisladas a lo largo del cultivo de anteras, en los 14 genes de la embriogénesis de la microspora en trigo. El punto 0 corresponde a 5 días de tratamiento de inducción por estrés (5dp). Flechas en color morado pertenecen a los genes estudiados en la embriogénesis de la microspora de cebada. Flechas turquesa corresponden a genes estudiados de forma específica en trigo.

En la etapa media de la embriogénesis, a los 10 días de cultivo (10dc), estado equivalente a 8dc de cebada, cuando ya se observan estructuras multicelulares, la mayoría de ellas todavía se encuentran dentro de la pared de la exina, que han adquirido una estructura interna organizada (Figuras 26 y 27). Aunque la ruptura de la

exina se ha asociado con el establecimiento de la polaridad del embrión (para revisión ver Soriano y col. 2013), en trigo se ha descrito que la polaridad se establece antes de la ruptura (Indrianto y col. 2001). Entre los genes que se indujeron en esta etapa, se identificaron genes asociados con el control del desarrollo, indicando probablemente la activación del programa embriogénico. Uno de estos genes fue *TaNF-YA7*, un miembro de la familia de factores nucleares NF-Y (Stephenson y col. 2007). Recientemente Mu y col. (2013) describieron que *NF-YA5* y *NF-YA9*, ortólogos de *TaNF-YA7* (Cao y col. 2011) inducían la embriogénesis somática, sugiriendo que *NF-YA5* se encontraba en el mismo complejo que el gen *LEAFY COTYLEDON1 (LEC1)*, un regulador esencial de la identidad del embrión (West y col. 1994). Conviene destacar que *LEC1* se ha asociado con el desarrollo del embrión en microsporas de *Brassica* (Malik y col. 2007, Stasolla y col. 2008). El gen *TaAGL14* que codifica al factor de transcripción MADS-box type II (MIKC-type) (Zhao y col. 2006a). *TaAGL14* y *TaAGL15* junto con el gen *OsMADS32* de arroz, implicados en la identidad de los órganos florales (Sang y col. 2012), forman una nueva subfamilia de genes de tipo II que sólo existen en monocotiledóneas. Este gen también se expresó en cebada (*MADS1*). Sin embargo su expresión comenzó en fases anteriores a los de trigo, a los 4dc. En ambas especies se mantuvo su expresión hasta las últimas fases de la embriogénesis (Figuras 35 y 36).

En esta fase de la embriogénesis, también se indujeron genes asociados con respuesta a estrés y/o degradación o modificación de la pared celular: *Tad1* que pertenece a la familia de péptidos de pequeño tamaño ricos en cisteína conocidas como plant defensins o δ -thionins (Koike y col. 2002), XIP-type xylanase inhibitor relacionado con la señalización por oligosacáridos en la defensa de plantas (Dornez y col. 2010); la quitinasa *CHI3* que actúa sobre los componentes de la pared celular (para revisión ver Grover 2012). Por último, *WAL16*, un inhibidor de una serin-proteasa rica en cisteína que se induce por herida o por estrés provocado por metales, tiene homología con inhibidores de proteasas BBI (Richards y col. 1994). Se ha sugerido que la expresión de factores relacionados con estrés en embriones derivados del cultivo de microsporas podrían llegar a realizar funciones similares a los tejidos que rodean al embrión zigótico (Borderies y col. 2004, Boutilier y col. 2005).

Las proteínas arabinogalactanos (AGPs) son reguladoras en procesos de desarrollo de plantas (para revisión ver Seifer y Roberts 2007). Se han identificado genes específicos de AGPs en el desarrollo temprano de embriones en cebada (Vrinten y col. 1999) y en *Brassica* (Joosen y col. 2007, Malik y col. 2007, Tsuwamoto y col. 2007). También, se ha descrito que los AGPs son liberados al medio en cultivo de anteras de cebada y maíz (Paire y col. 2003, Borderies y col. 2004) y promueven la embriogénesis en trigo (Letarte y col. 2006). En este trabajo se han identificado dos AGPs (*TaFLA26* y *TaAGP31-like*) que se inducen a los 10 y 15 días de cultivo respectivamente. *TaFLA26* codifica a una fasciclin-like arabinogalactan protein (FLAs) (Faik y col. 2006). Por el contrario, las otras dos fasciclinas incluidas en este trabajo (*TaFLA14* y *TaFLA25*) sólo se expresaron de forma específica después del tratamiento de estrés. Hasta nuestro conocimiento, esta es la primera vez que proteínas FLAs se asocian con la embriogénesis de la microspora.

En etapas más tardías de la embriogénesis, a los 15 días de cultivo (equivalente a 12dc en cebada), las estructuras multicelulares han sido liberadas de la exina, se dividen activamente, tienen una forma globular y están formadas por células pequeñas y redondeadas con el citoplasma denso, empezando a observarse los primeros signos de diferenciación con la formación del protodermo (Figuras 26 y 27). En este estadio se indujeron nuevos genes: *TaEXPB4* que codifica a un miembro de la familia de las expansinas (Lin y col. 2005) cuya expresión responde probablemente a la demanda de la extensibilidad de la pared celular durante el crecimiento activo del embrión; el gen *TaAGP31-like* que presenta homología con proteínas que contienen Polen Ole e I domain y con una proteína AGP31 que podría estar relacionada con la diferenciación vascular inicial (Liu y Mehdy 2007); y un gen específico de la embriogénesis de la microspora en trigo *MICROSPORE EMBRYOGENESIS-1* (*TaME1*). Los genes *TaAGP31-like* y *TaME1*, cuyas secuencias son homólogas a *POEI52* y *Hv-ME1* en cebada, presentaron diferentes patrones de expresión en cebada y trigo. Ambos genes se indujeron en etapas anteriores de la embriogénesis de la microspora en cebada. Así, *POEI52* se indujo a 4dc mientras que *TaAGP31-like* lo hacía más tarde, a los 15dc, aunque en ambos casos se expresaron hasta las fases más avanzadas. Sin embargo, no hubo una coincidencia temporal en la expresión de *Hv-ME1* y *TaME1*, ya

que *Hv-ME1* se expresó de 1dc a 12dc, mientras que *TaME1* lo hacía en 15dc y 20dc (Figuras 35 y 36).

A los 20 días de cultivo cuando los embriones eran claramente visibles bajo la lupa, la mayoría de los genes cuya expresión era alta en etapas anteriores bajaron su nivel de expresión o incluso dejaron de expresarse, sólo los genes *CHI3* y *TaAGP31-like* se expresaron con intensidad en este estadio.

Finalmente, esta ampliamente descrito que los genes *SERKs* están involucrados en múltiples programas de señalización, incluyendo la activación de la embriogénesis somática (para revisión ver Li 2010). También se ha descrito la expresión de genes *SERK* en la embriogénesis de la microspora de maíz (Baudino y col. 2001) y *Brassica* (Malik y col. 2007). Sin embargo, en nuestro estudio los genes *SERK1* y *SERK2* no se expresaron en ningún punto de la embriogénesis de la microspora en Pavon.

Como se había hecho en cebada, se realizó un análisis de la expresión génica en embriogénesis zigótica en Pavon (Figura 31). Conviene destacar que en este estudio se utilizaron cariósides completas a lo largo de su desarrollo y como el embrión es una mínima parte del total de la cariósida, los estadios tempranos del desarrollo del embrión zigótico no estarían representados en este estudio, como ha podido ocurrir en cebada, particularmente con los genes clasificados como específicos de la microspora. Además, los embriones de 10 a 14 días después de la fecundación se corresponden con estadios de desarrollo igual o posterior a los embriones derivados de microsporas de 20 días de cultivo. Aun así, 15 de los 18 genes caracterizados en la embriogénesis de la microspora se expresaron en embrión zigótico, indicando que están involucrados en ambos programas de embriogénesis. Cuatro de los genes eran específicos de embrión (*TaTPD1-like*, *TaNf-YA7*, *TaAGP31-like* y *TaME1*). El resto de los genes, aunque se expresaban en otros órganos, presentaron el nivel más alto de expresión en embriones zigóticos de 12DAP, salvo los genes *WALI6* con los niveles más altos en cariósida de 2 días y en raíz, *GSTF2* en

raíz y *CHI3* en casi todos los tejidos analizados. Los genes *SERK2* y *SERK1*, que no se expresaron en embriogénesis de la microspora, mostraron un nivel de expresión bajo y específico en embriones zigóticos de 12DAP. El gen *Tad1* no se expresó en ninguno de los tejidos analizados, indicando que es específico de la embriogénesis de la microspora.

Al igual que en cebada, se han descrito grandes diferencias en la eficiencia de la embriogénesis de la microspora entre distintos cultivares de trigo (Holme y col. 1999, Lantos y col. 2013). Estas diferencias quedaron claras en los estudios de caracterización morfológica del cultivo de anteras y microsporas aisladas entre el cultivar de alta respuesta embriogénica, Pavon, y el de baja respuesta, Caramba (Figuras 26 y 27). A los 5 días de tratamiento de estrés muchas microsporas del cultivar Pavon presentaban la morfología “star-like” mientras que en Caramba la mayoría de las microsporas presentaban una gran vacuola y un citoplasma poco denso. A los 5 días de cultivo Caramba presentaba un mayor número de microsporas muertas que Pavon. Además se observó que las microsporas de Caramba se dividían más rápidamente que las de Pavon mediante análisis con DAPI (resultados no mostrados). Sin embargo, a los 10 y 15 días de cultivo ambos cultivares presentaron estructuras con un número similar de núcleos.

Al comparar los perfiles de expresión entre los genes que se inducen a los 5dc y 10dc entre Pavon y Caramba, estos se desplazaron a etapas más tempranas en el cultivar Caramba (Figura 32). Sin embargo, ninguno de estos genes se indujeron significativamente antes de 5 días de cultivo en este cultivar, excepto el gen *WAL16*. Interesantemente, como las microsporas de Caramba se dividen más rápidamente que las de Pavon en este estadio, el cambio en los perfiles de expresión en Caramba estaban de acuerdo con su estadio más avanzado.

Cuando se compararon los perfiles de expresión de los genes que se inducen a los 15 días de cultivo entre estos dos cultivares, no se observó un patrón de expresión general si no que cada gen presentaba diferentes patrones de expresión en ambos cultivares. Así, en Caramba el gen *TaME1* presentó un desplazamiento significativo de

su perfil de expresión hacia etapas más tempranas, el gen *TaAGP31-like*, que presenta homología con una proteína *AGP31* que podría estar relacionada con la diferenciación vascular inicial (Liu y Mehdy 2007), no mantuvo su expresión al finalizar la etapa de cultivo, y el gen *TaEXPB4* mostró un nivel mucho más bajo de expresión a los 15dc. Sólo se observaron diferencias en los genes *XIP-R1* que presentó una expresión casi constitutiva en Caramba, y el gen *SERK2*, involucrado en programas de señalización, mostró un nivel muy bajo de expresión en la etapa media de la embriogénesis.

El efecto inductor de los ovarios en la embriogénesis de la microspora en trigo podría estar asociado a la expresión de genes relacionados con arabinogalactanos y procesos de señalización.

En estudios previos del grupo de trabajo, se había determinado que no solo el uso de ovarios en el medio de cultivo de anteras de trigo aumentaba la eficiencia de la embriogénesis de la microspora, sino que además dicha eficiencia dependía del estado de desarrollo de los ovarios y del genotipo de los mismos. (Castillo, A., comunicación personal).

Aunque se desconoce la naturaleza de los compuestos que son liberados al medio de cultivo por los ovarios, se ha propuesto que son proteínas de tipo arabinogalactanos (AGPs) (Letarte y col. 2006). Por otro lado, se ha descrito que productos de degradación de los AGPs, como la N-Acetilglucosamina, controlan la embriogénesis somática (van Hengel y col. 2001). Además, se conoce el efecto inductor de cultivos embriogénicos de microsporas de cebada en cultivo *in vitro* de embriones zigóticos de maíz (Paire y col. 2003). Se ha descrito que en cultivos embriogénicos de microsporas de maíz no sólo se identificaban proteínas de tipo AGPs, sino también una invertasa de pared celular, una endo-1,3- β -glucanasa, dos quitinasas y dos “thaumatin-like” (Borderies y col. 2004). La identificación de genes asociados a embriogénesis de la microspora en trigo con funciones semejantes a alguno de los genes identificados en maíz nos permitió analizar su posible papel

inductor. Además se estudio la expresión de otros genes que se expresaban en ovarios y que estaban implicados en la biosíntesis o degradación de glicanos como *COMPLEX GLYCAN LESS 1 (CGL1)* y *GLYCOSIDE HYDROLASE-28 (GH28)*, respectivamente, y en procesos de señalización y desarrollo como *FERONIA (FER)* y *RECEPTOR-LIKE KINASE 5 (RLK5)*.

Cinco genes (*FLA26*, *CHI3*, *TAA1b*, *FER* y *CGL1*) se expresaron en ovarios frescos (0dc) de los dos cultivares analizados (Pavon y Caramba), y mantuvieron su expresión a lo largo del cultivo. Todos ellos presentaron niveles de expresión más altos o se expresaron durante periodos más largos de tiempo en ovarios maduros que en ovarios jóvenes. De los 5 genes, los que codificaban para un arabinogalactano tipo fasciclina (*FLA26*), una quitinasa (*CHI3*), y un gen implicado en mecanismos de señalización en polen (*TAA1b*), se expresaban a lo largo de la embriogénesis de la microspora en trigo (Figura 36). Otro de los genes corresponde a una receptor-like kinase (*FERONIA*, *FER*) que se concentra en la membrana plasmática del aparato filiforme, y está implicado en procesos de señalización en la interacción del polen y el ovario durante la recepción del tubo polínico (Huck y col. 2003, Escobar-Restrepo y col. 2007, Boisson-Dernier y col. 2009). Finalmente, *CGL1* está implicado en la biosíntesis de glicanos complejos, los cuales forman parte de glicoproteínas de membrana y proteínas secretoras (Von Schaewen y col. 2008).

Tres genes (*WALI6*, *Tad1* y *XIP-R1*) se inducían a 5dc en ovarios maduros del cultivar Pavon. Estos genes se expresaban en la embriogénesis de la microspora en trigo desde 10dc hasta 20dc y estaban asociados a respuesta a estrés y/o degradación o modificación de la pared celular. De ellos, solamente *WALI6* se expresó también en ovarios maduros de Caramba y en ovarios jóvenes de ambos cultivares. Teniendo en cuenta que los ovarios maduros de Caramba son los que tienen un mayor efecto inductor, estos resultados nos indican que *Tad1* y *XIP-R1* no intervendrían en este efecto.

Finalmente, se analizaron los genes *GH28* y *RLK5*. El gen *GH28* codifica para una proteína de la familia de las poligalacturonasas (Markovic y Janecek 2001) que

interviene en procesos relacionadas con la degradación de la pectina (Sprockett y col. 2011). El gen *RLK5* codifica para una receptor-like protein kinase que está asociada a procesos de señalización celular y se expresa en raíces y en hojas (Walker 1993). Estos genes se expresaron en ovarios jóvenes y maduros (0dc) de ambos cultivares, pero *GH28* también se expresaba aunque a un nivel mucho más bajo a los 5dc en ovarios de Caramba. Estos resultados nos indican que probablemente ninguno de estos genes estarían implicados en el efecto inductor de los ovarios.

Se seleccionaron los genes que presentaban una mayor expresión en ovarios maduros de Caramba (*FLA26*, *TAA1b*, *FER* y *CGL1*) para hacer un análisis más preciso de su nivel de expresión mediante qRT-PCR (Figura 34).

Solo dos de los genes analizados presentaban un perfil de expresión que se podía asociar al comportamiento como agentes inductores de los distintos tipos de ovarios en la embriogénesis de la microspora. Así, *FLA26* y *FER* presentaron los niveles más altos de expresión en ovarios maduros de Caramba, y además su expresión aumentaba progresivamente a lo largo del cultivo.

Hay que destacar que además de la función de señalización de *FER* en la interacción polen-ovario, se ha descrito que este gen está involucrado en la modulación de la respuesta a brasinoesteroides y antagoniza el efecto de etileno en hipocotilos de *Arabidopsis* (Deslauriers y Larsen 2010). Los brasinoesteroides son reguladores de crecimiento que intervienen en diferentes procesos de desarrollo como transporte de auxinas, protección frente a estrés oxidativo, embriogénesis, etc. (para revisión ver Hayat y Ahmad (2011)). De hecho, la incorporación de brasinoesteroides en el medio de cultivo de microsporas de *Brassica* aumento significativamente el porcentaje de embriogénesis (Ferrie y col. 2005). Por otro lado, se ha descrito que la inhibición de la síntesis de etileno aumenta la embriogénesis en microsporas de *Brassica* (Leroux y col. 2009). Por lo tanto *FER* podría actuar en rutas de señalización a través de mecanismos similares a los que intervienen en la fecundación, o de mecanismos de modulación hormonal.

El gen *FLA26* codifica para una AGP de tipo fasciclin que en nuestro sistema se expresaba en fase media del desarrollo embriogénico de la microspora en trigo, así como en desarrollo de cariósida, embrión zigótico y raíz, lo que parecería indicar que tendría una función general en procesos de desarrollo. Estos resultados coinciden con los descritos por Faik (2006) en trigo que mostraron que las fasciclinas se expresaban a niveles bajos principalmente en órganos reproductivos, semillas y raíz. Recientemente, se ha identificado en arroz una fasciclina *MICROSPORE AND TAPETUM REGULATOR1 (MTR1)* que juega un papel importante en la formación del polen y del tapetum (Tan y col. 2012) teniendo una función parecida a la de *TPD1*.

Durante los últimos años se ha adquirido una gran información sobre los múltiples procesos en los que intervienen AGPs como proliferación y expansión celular, muerte celular programada, crecimiento de tubo polínico, embriogénesis somática y embriogénesis de la microspora (para revisión ver Seifert y Roberts 2007). Sin embargo, todavía no se conocen los mecanismos moleculares de acción de los AGPs en muchos de estos procesos, incluido la embriogénesis de la microspora (El-Tantawy y col. 2013).

Sería necesario continuar los estudios, mediante qRT-PCR, indicados en este trabajo para determinar si otros de los genes que no tienen una asociación clara al efecto inductor de los ovarios serían realmente genes candidatos.

En este estudio se ha abordado con éxito la caracterización de los mecanismos moleculares implicados en el inicio del patrón de desarrollo embriogénico de la microspora en cereales. La utilización de herramientas de análisis genómico nos ha permitido caracterizar los mecanismos moleculares que intervienen en las distintas fases del cultivo de anteras de cebada y la identificación de una colección de genes que se activan al inicio del patrón de desarrollo embriogénico y que constituyen una herramienta muy valiosa para posteriores estudios en este sistema.

Algunos de los genes identificados como los que codifican para AGPs confirman los resultados de estudios en otras especies, pero otros han sido asociados por primera vez a la embriogénesis de la microspora como *TPD1*, *FMNL14*, *OPR12*, *BBI*, *MEGL7*, *PR60* y *KUN*. Se han identificado tres nuevos genes *Hv-ME1*, *Hv-ME2* y *Hv-ME3* de los que no se ha descrito homología con ninguna secuencia conocida. Se ha descrito por primera vez la expresión de genes específicos de la ESR, de la BETL y aleurona del endospermo en embriogénesis de la microspora en cebada. Las diferencias en los perfiles de expresión de los genes entre las líneas de distinta capacidad embriogénica demuestran su validez como posibles genes marcadores de la fase inicial de la embriogénesis de la microspora.

Los resultados del análisis de transcriptómica y de expresión génica en cebada nos ha permitido la identificación de genes asociados a la embriogénesis de la microspora en trigo panadero. Hay que destacar que solo existía un estudio previo de análisis de expresión génica en este cultivo. Nuestros resultados en trigo confirman la asociación de los genes *TPD1*, *Hv-ME1*, *MADS1* y un AGP de cebada indicando la existencia de mecanismos comunes en la embriogénesis de la microspora de cebada y trigo. En nuestro estudio, alguno de los genes caracterizados en trigo codifican para proteínas previamente asociadas con la embriogénesis de la microspora en otras especies como GSTs, quitinasas y AGPs. Otros genes como *TAA1b*, *XIP-R1* y *WALI6* no se habían asociado con la embriogénesis de la microspora en otras especies. Los genes *Ta-TPD1-like*, *TAA1b*, *GSTF2*, *GSTA2*, *CHI3*, *Tad1*, *TaNf-YA7*, *TaAGL14*, *XIP-R1*, *TaME1* y *TaEXPB4*, identificados en trigo panadero, se validaron en cultivo de microsporas aisladas de triticale en un estudio realizado en colaboración con el

Instituto Franciszek Górski of Plant Physiology de la Polish Academy of Sciences (Zur y col. 2013), demostrando la similitud de los mecanismos moleculares implicados en la embriogénesis de la microspora en cereales.

En este estudio se han identificado algunos mecanismos de síntesis, degradación y señalización por ABA que intervienen en la embriogénesis de la microspora en cebada. Aunque se ha confirmado la participación de ABA tanto en la fase de tratamiento de estrés como en la fase media de desarrollo embriogénico, por primera vez se describen los genes implicados en ella, demostrando que los mecanismos que intervienen en ambas fases son diferentes. Así, por ejemplo, entre los genes de señalización por ABA, *ABI1b* y *ABI5* participan en las dos fases mientras que *FUS3*, *VP1* y *FCA* sólo lo hacen en la fase de cultivo. Estos resultados pueden considerarse como un punto de partida para futuros estudios del papel de ABA en la embriogénesis de la microspora en cebada.

También se han identificado por primera vez genes que se asocian al efecto inductor de los ovarios en los medios pre-acondicionados para la embriogénesis de la microspora en trigo panadero. Se describe la implicación de un tipo concreto de AGPs, la Fasciclina (*FLA26*), tanto en el desarrollo embriogénico de la microspora en trigo como en el efecto inductor de los ovarios. Se identificó el gen *FER*, que codifica para una “receptor-like kinase”, como gen candidato del efecto inductor de los ovarios en cultivo de anteras de trigo.

Los genes identificados y caracterizados en este estudio constituyen un recurso muy valioso para estudios de los mecanismos implicados en las etapas tempranas del desarrollo embriogénico, como la adaptación de las microsporas al estrés generado por el cultivo, la determinación de la polaridad en el proembrión, la participación del endospermo en el desarrollo del embrión, la comunicación interna en el embrión, la determinación del carácter embriogénico y de la diferenciación del embrión, la modificación de la pared celular y la inducción por el co-cultivo de ovarios.

6. Conclusiones

1. Las etapas tempranas de la embriogénesis de la microspora de cebada se caracterizan por presentar grandes cambios morfológicos que están ligados a una gran reorganización de la expresión génica. Los mayores cambios en el transcriptoma se asocian mayoritariamente a genes relacionados con metabolismo, transporte celular y respuesta a estrés.
2. Entre los 1.797 genes que se activan simultáneamente en la fase inicial del desarrollo embriogénico de la microspora en cebada, se determinaron 13 clústeres de expresión que seguían tres patrones básicos: genes que disminuían su expresión por el tratamiento de estrés, pero que a los 4 días de cultivo presentaban niveles similares a los de las anteras antes del tratamiento y estaban asociados a procesos metabólicos, transporte celular, diferenciación celular, desarrollo y respuesta a estrés; genes con niveles de expresión bajos en las anteras al inicio del proceso y que aumentaban su expresión en 4 días de inducción y 4 días de cultivo, relacionados con la regulación del metabolismo, respuesta a estrés y la diferenciación celular; y genes activados *de novo* en 4 días de cultivo, asociados a síntesis de proteínas de reserva, transcripción, biogénesis de componentes celulares y metabolismo.
3. La fase inicial del desarrollo embriogénico de la microspora en cebada implica la activación *de novo* de un conjunto de genes tanto de expresión específica en 4 días de cultivo como de expresión en 4 días de cultivo y en etapas más avanzadas.
4. Algunos de los genes identificados, como los que codifican para arabinogalactanos, confirman los resultados de estudios en otras especies. Otros genes han sido asociados por primera vez a la embriogénesis de la microspora como *TPD1*, *FMNL14*, *OPR12*, *BBI*, *MEGL7*, *PR60* y *KUN1*. Se han identificado tres genes *Hv-ME1*, *Hv-ME2* y *Hv-ME3* de los que no se ha descrito homología con ninguna secuencia conocida.

5. La comparación de la expresión de los genes identificados en líneas de distinta capacidad embriogénica de cebada indica que aunque todos los genes se expresaban en las tres líneas, las diferencias en los perfiles de expresión demuestran su validez como posibles genes marcadores de la fase inicial de la embriogénesis de la microspora.
6. Se ha confirmado la participación de ABA tanto en la fase de tratamiento de estrés como en la fase media de desarrollo embriogénico. Por primera vez se describe que los mecanismos que intervienen en ambas fases son diferentes. Durante el desarrollo embriogénico se activan tanto genes de síntesis como de degradación y señalización por ABA.
7. Los resultados del análisis de transcriptómica y de la expresión génica en cebada nos ha permitido la identificación de genes asociados a la embriogénesis de la microspora en trigo panadero. La caracterización morfológica del desarrollo embriogénico nos permitió establecer asociaciones entre los perfiles de expresión y los mecanismos implicados en el proceso.
8. Se ha determinado la expresión de los genes *TPD1*, *Hv-ME1*, *MADS1* y un AGP de cebada en la embriogénesis de trigo, indicando la existencia de mecanismos comunes en la embriogénesis de la microspora de estas dos especies. Algunos de los genes caracterizados en trigo codifican para proteínas previamente asociadas a la embriogénesis de la microspora en otras especies, como GSTs, quitinasas y AGPs. Por primera vez se han asociado los genes *TAA1b*, *XIP-R1* y *WALI6* con la embriogénesis de la microspora.
9. Solo los genes *Hv-ME1*, *Hv-ME3* y *ECA1* en cebada y *Tad1* en trigo eran específicos de la embriogénesis de la microspora, ya que el resto de los genes se expresaban en alguno de los tejidos u órganos: ovarios, durante el desarrollo de la carióspside, embrión zigótico aislado, endospermo, raíz y/o hoja.

10. La comparación de los perfiles de expresión de los genes estudiados de cultivares con distinta capacidad embriogénica en trigo, mostraron que los genes que se expresan en las etapas temprana y media de la embriogénesis de la microspora se activan antes en el cultivar de menor capacidad embriogénica. Los genes que se activan en la etapa tardía tienen patrones de expresión diferentes en ambos cultivares.

11. Se han identificado genes que se asocian al efecto inductor de los ovarios en los medios pre-acondicionados para la embriogénesis de la microspora en trigo: un tipo concreto de AGPs, la fasciclina 26 (*FLA26*), y el gen *FERONIA*, que codifica para una “receptor-like kinase”.

7. Bibliografía

- Ahmadi, B., Shariatpanahi, M. E. y Teixeira da Silva, J. A. (2013). Efficient induction of microspore embryogenesis using abscisic acid, jasmonic acid and salicylic acid in *Brassica napus* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, DOI 10.1007/s11240-013-0408-x.
- Aionesei, T., Touraev, A. y Heberle-Bors, E. (2005). Pathways to microspore embryogenesis. En *Haploids in crop improvement II. Biotechnology in agriculture and forestry*. Palmer, C. E., Keller, W. A. y Kasha, K. J. (eds). Springer Berlin, Heidelberg, New York, 56: 11-34.
- Akar, T., Avci, M. y Dusunceli, F. (2004). Barley: Post harvest operations. Disponible en: <http://www.fao.org/inpho/content/compend/text/ch31/ch31.htm>
- Applied Biosystems User Bulletin nº2. (1997). <http://docs.appliedbiosystems.com/pebiiodocs/04303859.pdf>
- Ascough, G., Bakos, F., Barrabás, B., Balázs, E. y van Staden, J. (2006). Screening South African wheat germplasm for androgenic competence. *S. Afr. J. Bot.*, 72: 40-45.
- Asif, M., Eudes, F., Goyal, A., Amunndsen, E., Randhawa, H. y Spaner, D. (2013). Organelle antioxidant improves microspore embryogenesis in wheat and triticale. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 49: 489-497.
- Audran, C., Liotenberg, S., Gonneau, M., North, H., Frey, A., Tap-Waksman, K., Vartanian, N. y Marion-Poll, A. (2001). Localisation and expression of zeaxanthin epoxidase mRNA in *Arabidopsis* in response to drought stress and during seed development. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28: 1161-1173.
- Barrero, C., Royo, J., Grijota-Martinez, C., Faye, C., Paul, W., Sanz, S., Steinbiss, H-H. y Hueros, G. (2009). *Planta*, (229): 235-247.
- Barrero, J. M., Piqueras, P., González-Guzmán, M., Serrano, R., Rodríguez, P. L., Ponce, M. R., Micol, J. L. (2006). A mutational analysis of the ABA1 gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development. *J. Exp. Bot.*, 56: 2071-83.
- Baudino, S., Hansen, H., Brettschneider, R., Hecht, V. F. G., Dresselhaus, T., Lörz, H., Dumas, C. y Rogowsky, P. M. (2001). Molecular characterisation of two model maize LRR receptor-like kinases, which belong to the SERK gene family. *Planta*, 213: 1-10.
- Belderok, B. (2000). Developments in bread-making processes. En *Plant Foods for Human Nutrition (Anteriormente Qualitas Plantarum)*, 55: 1-86.
- Belmonte, M. F., Ambrose, S. J., Ross, A. R. S., Abrams, S. R. y Stasolla, C. (2006). Improved development of microspore-derived embryo cultures of *Brassica napus* cv Topaz following changes in glutathione metabolism. *Physiologia Plantarum*, 127: 690-700.

- Belmonte, M., Elhiti, M., Waldner, B. y Stasolla, C. (2010). Depletion of cellular brassinolide decreases embryo production and disrupts the architecture of the apical meristems in *Brassica napus* microspore-derived embryos. *Journal of Experimental Botany*, 61(10): 2779-2794.
- Blakeslee, A. F., Belling, J., Farnham, M. E. y Bergner, A. D. (1922). A haploid mutant in the Jimson weed, *Datura stramonium*. *Science*, 55: 646-647.
- Bohanec, B. (2009). Doubled haploids via gynogenesis. En *Advances in Haploid production in Higher Plants*. Touraev, A., Forster, B. P. y Jain, S. M. (Eds), Springer-Verlag, Berlin, pp. 35-46.
- Boisson-Dernier, A., Roy, S., Kritsas, K., Grobei, M. A., Jaciubek, M., Schroeder, J. I. y Grossniklaus, U. (2009). Disruption of the pollen-expressed *FERONIA* homologs *ANXUR1* and *ANXUR2* triggers pollen tube discharge. *Development*, 136: 3279-3288.
- Bonello, J-F., Opsahl-Ferstad, H-G., Perez, P., Dumas, C. y Rogowsky, P. M. (2000). Esr genes show different levels of expression in the same region of maize endosperm. *Gene*, 246: 219-227.
- Bonello, J-F., Sevilla-Lecoq, S., Berne, A., Risueno, M. C., Dumas, C. y Rogowsky, P. (2002). Esr proteins are secreted by the cells of the embryo surrounding region. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1559-1568.
- Bonet, F. J. y Olmedilla, A. (2000). Structural changes during early embryogenesis in wheat pollen. *Protoplasma*, 211: 94-102.
- Borderies, G., le Béhec, M., Rossignol, M., Lafitte, C., Le Deunff, E., Beckert, M., Dumas, C. y Elisabeth, M. R. (2004). Characterization of proteins secreted during maize microspore culture: arabinogalactan proteins (AGPs) stimulate embryo development. *Eur J Cell Biol*, 83(5): 205-12.
- Boutilier, K., Fiers, M., Liu, C-M. y van der Geest, A. H. M. (2005). Biochemical and molecular aspects of haploid embryogenesis. En: Palmer, C. E., Keller, W. A. y Kasha, K. J. (eds). *Haploids in Crop Improvement II*. Springer-Verlag, Berlin, pp 73-96.
- Boutilier, K., Offringa, R., Sharma, V. K., Kieft, H., Ouellet, T., Zhang, L., Hattori, J., Liu, C-H., van Lammeren, A. A. M., Miki, B. L. A., Custers, J. B. M. y van Lookeren Campagne, M. M. (2002). Ectopic expression of *BABY BOOM* triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *The Plant Cell*, 14: 1737-1749.

- Brady, S., Sarkar, S., Bonetta, D. y McCourt, P. (2003). The *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3)* gene is modulated by farnesylation and is involved in auxin signaling and lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 34: 67-75.
- Burton, R. A., Jobling, S. A., Harvey, A. J., Shirley, N. J., Mather, D. E., Bacic, A. y Fincher, G. B. (2008). The Genetics and Transcriptional Profiles of the Cellulose Synthase-Like HvCslF Gene Family in Barley. *Plant Physiology*, 146: 1821-1833.
- Cao, S., Kumimoto, R. W., Siriwardana, C. L., Risinger, J. R. y Holt III, B. F. (2011). Identification and characterization of NF-Y transcription factor families in the monocot model plant *Brachypodium distachyon*. *PLoS ONE*, 6(6): e21805.
- Caredda, S., Devaux, P., Sangwan, R. S. y Clément, C. (1999). Differential development of plastids during microspore embryogenesis in barley. *Protoplasma*, 208: 248-256.
- Caredda, S., Doncoeur, C., Devaux, P., Sangwan, R. S. y Clément, C. (2000). Plastid differentiation during androgenesis in albino and non-albino producing cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Sex. Plant. Reprod.*, 13: 95-104.
- Casaretto, J. A. y Ho, T-H. D. (2005). Transcriptional regulation by abscisic acid in barley (*Hordeum vulgare* L.) seeds involves autoregulation of the transcription factor HvABI5. *Plant Molecular Biology*, 57: 21-34.
- Casaretto, J. y Ho, T-H. D. (2003). The transcription factors HvABI5 and HvVP1 are required for the abscisic acid induction of gene expression in barley aleurone cells. *The Plant Cell*, 15: 271-284.
- Castillo, A. M., Cistué, L., Vallés, M. P. y Soriano, M. (2009b). Chromosome doubling in monocots. En *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Touraev, A., Forster, B. P. y Mohan, J. S. (Eds). Springer-Verlag, Berlin, pp. 329-338.
- Castillo, A. M., Cistué, L., Vallés, M. P., Sanz, J. M., Romagosa, I. y Molina-Cano J. L. (2001). Efficient production of androgenic doubled haploid mutants in barley by the application of sodium azide to anther and microspore cultures. *Plant Cell Report*, 20: 105-111.
- Castillo, A. M., Nielsen, N. H., Jensen, A. y Valles, M. P. (2014). Effects of n-butanol on barley microspore embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, DOI: 10.1007/S11240-014.0451-2.
- Castillo, A. M., Soriano, M. y Vallés, M. P. (2009a). Aumento de la embriogénesis de la microspora en genotipos recalcitrantes de cebada mediante la aplicación de n-butanol. VIII Reunión de la Sociedad Española de Cultivo in Vitro de tejidos Vegetales, Murcia (Spain).

- Castillo, A. M., Vallés, M. P. y Cistué, L. (2000). Comparison of anther and isolated microspore cultures in barley. Effects of culture density and regeneration medium. *Euphytica*, 113: 1-8.
- Castro, A. J., Gamba, F., German, S., Gonzalez, S., Hayes, P. M., Pereyra, S. y Pérez, C. (2012). Quantitative trait locus analysis of spot blotch and leaf rust resistance in the BCD47xBaronesse barley mapping population. *Plant Breeding*, 131: 258-266.
- Chan, J. y Pauls, K. P. (2007). *Brassica napus* Rop GTPases and their expression in microspore cultures. *Planta*, 225: 469-484.
- Chapman, A., Blervacq, A. S., Vasseur, J. y Hilbert, J. L. (2000). Arabinogalactan- proteins in *Cichorium* somatic embryogenesis: effect of beta-glucosyl Yariv reagent and epitope localization during embryo development. *Planta*, 211: 305-314.
- Chauhan, H. y Khurana, P. (2011). Use of doubled haploid technology for development of stable drought tolerant bread wheat (*Triticum aestivum* L.) transgenics. *Plant Biotechnology Journal*, 9: 408-417.
- Chen, X-W., Cistué, L., Muñoz-Amatriaín, M., Sanz, M., Romagosa, I., Castillo, A. M. y Vallés, M. P. (2007a). Genetic markers for doubled haploid response in barley. *Euphytica*, 158: 287-294.
- Choo, T. M., Reinbergs, E. y Kasha K. J. (1985). Use of haploids in breeding barley. *Plant Breed.*, 3: 219-252.
- Cistué, L., Echavarri, B., Batlle, F., Soriano, M., Castillo, A., Valles, M. P. y Romagosa, I. (2005). Segregation distortion for agronomic traits in doubled haploid lines of barley. *Plant Breeding*, 124: 546-550.
- Cistué, L., Ramos, A. y Castillo, A. M. (1999). Influence of anther pretreatment and culture medium composition on the production of barley doubled haploids from model and low responding cultivars. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 55: 159-166.
- Cistué, L., Ramos, A., Castillo, A. M. y Romagosa, I. (1994). Production of large number of doubled haploid plants from barley anthers pretreated with high concentrations of mannitol. *Plant Cell Rep.*, 13: 709-712.
- Cistué, L., Soriano, M., Castillo, A. M., Vallés, M. P., Sanz, M. y Echávarri, B. (2006). Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Reports*, 25: 257-264.
- Cistué, L., Vallés, M. P., Echávarri, B., Sanz, J. M. y Castillo A. M. (2003). Barley anther culture. En *Doubled Haploid Production in Crop Plants. A manual*. Maluszynski, M., Kasha, K. J., Foster, B. P. y Szarejko, I. (eds). Kluwer, Dordecht, pp. 29-34.

- Cistué, L., Ziauddin, A., Simion, E. y Kasha, K. J. (1995). Effects of culture conditions on isolated microspore response of barley cultivar Igri. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 42: 163-169.
- Claveria, E., García-Mas, J. y Dolcet-Sanjuan, R. (2005). Optimization of cucumber doubled haploid line production using *in vitro* rescue of *in vivo* induced parthenogenic embryos. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130: 555-560.
- Close, T. J., Wanamaker, S., Caldo, R. A., Turner, S. M., Ashlock, D. A., Dickerson, J. A., Wing, R. A., Muehlbauer, G. J., Kleinhofs, A y, Wise, R. P. (2004). A new resource for cereal genomics: 22K barley GeneChip comes of age. *Plant Physiol.*, 134: 960-968.
- Cockram, J., White, J., Zuluaga, D. L., Smith, D., Comadran, J., Macaulay, M., Luo, Z., Kearsley, M. J., Werner, P., Harrap, D., Tapsell, C., Liu, H., Hedley, P. E., Stein, N., Schulte, D., Steuernagel, B., Marshall, D. F., Thomas, W. T. B., Ramsay, L., Mackay, I. Balding, D. J., The AGOUEB Consortium, Waugh, R. y O'Sullivan, D. M. (2010). Genome-wide association mapping to candidate polymorphism resolution in the unsequenced barley genome. *PNAS*, 107: 21611-21616.
- Corral-Martínez, P. y Seguí-Simarro, J. M. (2012). Efficient production of callus-derived doubled haploids through isolated microspore culture in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Euphytica*, 187: 47-61.
- Costa, L. M., Yuan, J., Rouster, J., Paul, W., Dickinson, H., y Gutierrez-Marcos, J. F. (2012). Maternal Control of Nutrient Allocation in Plant Seeds by Genomic Imprinting. *Current Biology*, 22: 160-165.
- Crouch, J. H., Payne, T. S., Dreisigacker, S., Wu, H. y Braun, H. J. (2009). Improved discovery and utilization of new traits for breeding. En *Wheats facts and futures 2009*, Dixon, J., Braun, H. J., Kosina, P. y Crouch, J. H. (eds). Mexico, DF: CIMMYT pp. 42-51.
- Cummins, I., O'Hagan, D., Jablonkai, I., Cole, D. J., Hehn, A., Werck- Reichhart, D. y Edwards, R. (2003). Cloning, characterization and regulation of a family of phi class glutathione transferases from wheat. *Plant Mol Biol*, 52: 591-603.
- Custers, J. B. M., Cordewener, J. H. G., Fiers, M. A., Maassen, B. T. H., van Lookeren Campagne, M. M. y Liu, C. M. (2001). Androgenesis in *Brassica*: A model system to study the initiation of plant embryogenesis. En *Current Trends in the Embryology of Angiosperm*. Bhojwani, S. S. y Soh, W. Y. (eds). pp. 451-470.
- Dahleen, L. S., Morgan, W., Mittal, S., Bregitzer, P., Brown, R. H. y Hill, N. S. (2012). Quantitative trait loci (QTL) for *Fusarium* ELISA compared to QTL for *Fusarium* head blight resistance and deoxynivalenol content in barley. *Plant Breeding*, 131: 237-243.

- Dash, S., Hemert, J. V., Hong, L., Wise, R. P. y Dickerson, J. A. (2011). PLEXdb: gene expression resources for plants and plant pathogens. *Nucleic Acids Research.*, 40.
- Davidson, R. M., Hansey, C. N. y Gowda, M. (2011). Utility of RNA sequencing for analysis of maize reproductive transcriptomes. *Plant Genome*, 4: 191-203.
- Davies, W. J. y Jones, H. G. (1991). Abscisic acid physiology and biochemistry. En: Davies, W. J. y Jones, H. G. (eds). *Bio's Scientific*, Oxford, pp 63-77.
- de Dios Alché, J., Mrani-Alaoui, M., Castro, A. J., y Rodríguez-García, M. I. (2004). Ole e 1, the Major Allergen from Olive (*Olea europaea* L.) Pollen, Increases its Expression and is Released to the Culture Medium during in vitro Germination. *Plant Cell Physiol*, 45(8): 1149-1157.
- Deslauriers, S. D. y Larsen, P. B. (2010). FERONIA Is a Key Modulator of Brassinosteroid and Ethylene Responsiveness in *Arabidopsis* Hypocotyls. *Molecular Plant*, 3(3): 626-640.
- Devaux, P. y Pickering, R. (2005). Haploids in the improvement of *Poaceae*. En *Haploids in Crop Improvement II*. Palmer, C. E., Keller, W. A. y Kasha, K. J. (eds). Springer-Verlag, Berlin, pp. 215-242.
- Devaux, P., Kilian, A. y Kleinhofs, A. (1993). Anther culture and *Hordeum bulbosum*-derived barley doubled haploids: mutation and methylation. *Mol Gen Genet*, 241: 674-679.
- Dirks, R., van Dun, K., de Snoo, C. B., van den Berg, M., Lelivelt, C. L. C., Voermans, W., Woudenberg, L., de Wit, J. P. C., Reinink, K., Schut, J. W., van der Zeeuw, E., Vogelaar, A., Freymark, G., Gutteling, E. W., Keppel, M. N., van Drongelen, P., Kieny, M., Ellul, P., Touraev, A., Ma, H., de Jong, H. y Wijnker, E. (2009). Reverse breeding: a novel breeding approach based on engineered meiosis. *Plant Biotechnology Journal*, 7: 837-845.
- Dong, J., Kim, S. T. y Lord, E. M. (2005). Plantacyanin Plays a Role in Reproduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 138: 778-789.
- Dorak, M. T. (2008). Glossary of real-time PCRterms. <http://www.dorak.info/genetics/glosrt.html>
- Dornez, E., Croes, E., Gebruers, K., De Coninck, B., Cammue, B. P. A., Delcour, J. A. y Courtin, C. M. (2010). Accumulated evidence substantiates a role for three classes of wheat xylanase inhibitors in plant defense. *Crit Rev Plant Sci*, 29: 244-264.
- Druka, A., Muehlbauer, G., Druka, I., Caldo, R., Baumann, U., Rostoks, N., Schreiber, A., Wise, R., Close, T., Kleinhofs, A., Graner, A., Schulman, A., Langridge, P., Sato, K., Hayes, P., McNicol, J., Marshall, D. y Waugh, R. (2006). An atlas of gene expression from seed to seed through barley development. *Func. Integr. Genomics*, 6: 202-211.

- Dubas, E., Janowiak, F., Krzewska, M., Hura, T. y Zur, I. (2013). Endogenous ABA concentration and cytoplasmic membrane fluidity in microspores of oilseed rape (*Brassica napus* L.) genotypes differing in responsiveness to androgenesis induction. *Plant Cell Rep*, 32: 1465-1475.
- Echavarri, B., Soriano, M., Cistué, L., Vallés, M. P., y Castillo, A. M. (2008). Zinc sulphate improved microspore embryogenesis in barley. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 93: 295-301.
- Elhiti, M., Tahir, M., Gulden, R. H., Khamiss, K. y Stasolla, C. (2010). Modulation of embryo-forming capacity in culture through the expression of *Brassica* genes involved in the regulation of the shoot apical meristem. *Journal of Experimental Botany*, 61(14): 4069-4085.
- El-Tantawy, A-A., Solís, M. T., Da Costa, M. L., Coimbra, S., Risueño, M-C. y Testillano, P. S. (2013). Arabinogalactan protein profiles and distribution patterns during microspore embryogenesis and pollen development in *Brassica napus*. *Plant Reprod*, 26: 231-243.
- Escobar-Restrepo, J-M., Huck, N., Kessler, S., Gagliardini, V., Gheyselinck, J., Yang, W-C. y Grossniklaus, U. (2007). The FERONIA Receptor-like Kinase Mediates Male-Female Interactions During Pollen Tube Reception. *SCIENCE*, 317: 656.
- Fadel, F. y Wenzel, G. (1990). Medium-genotype interaction on androgenetic haploid production in wheat. *Plant Breeding*, 105: 278-282.
- Faik, A., Abouzouhair, J. y Sarhan, F. (2006). Putative fasciclin-like arabinogalactan-proteins (FLA) in wheat (*Triticum aestivum*) and rice (*Oryza sativa*): identification and bioinformatic analyses. *Mol Gen Genomics*, 276: 478-494.
- FAO. (2006). World agriculture: towards 2030/2050 Interim report. Prospects for food, nutrition, agriculture and major commodity groups. Global Perspective Studies Unit. Roma. Disponible en: <http://www.fao.org/es/ESD/AT2050web.pdf>
- FAO. (2011). Looking ahead in world food and agriculture: Perspectives to 2050. Agricultural Development Economics Division Economic and Social Development Department. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2011. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/014/i2280e/i2280e00.htm>
- FAOSTAT. (2013). Statistics Division. Food and Agriculture Statistics Global Outlook. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- Ferrie, A. M. R., Dirpaul, J., Krishna, P., Krochko, J. y Keller W. A. (2005). Effects of Brassinosteroids on microspore embryogenesis in *Brassica* Species. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 41: 742-745.

- Ferrie, A. M. y Möllers, C. (2011). Haploids and doubled haploids in *Brassica* spp. for genetic and genomic research. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 104: 375-386.
- Finie, S. J., Powell, W. y Dyer, A. F. (1989). The effect of carbohydrate-composition and concentration on anther culture response in barley (*Hordeum-vulgare* L.). *Plant breeding*, 10: 110-118.
- Finkelstein, R. (2013). Abscisic Acid Synthesis and Response. En: *The Arabidopsis Book*, The American Society of Plant Biologists.
- Finkelstein, R. R., Gampala, S. S. L. y Rock, C. D. (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*, 14: 15-45.
- Finkelstein, R. y Lynch, T. (2000). The *Arabidopsis* abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell*, 12: 599-609.
- Finnie, S. J, Forster, B. P., Chalmers, K. J., Dyer, A. F., Waugh, R. y Powell, W. (1991). Genetic stability of microspore-derived doubled haploids of barley: a cytological, biochemical, and molecular study. *Genome*, 34(6): 923-928.
- Fisk, S. P., Cuesta-Marcos, A., Cistué, L., Russell, J., Smith, K. P., Baezinger, S., Bedo, Z., Corey, A., Filichkin, T., Karsai, I., Wangh, R. y Hayes, P. M. (2013). FR-H3: A new QTL to assist in the development of fall-sown barley with superior low temperature tolerance. *Theor Appl Genet*, 126: 335-347.
- Forestan, C., Meda, S. y Varotto, S. (2010). ZmPIN1-Mediated Auxin Transport Is Related to Cellular Differentiation during Maize Embryogenesis and Endosperm Development. *Plant Physiology*, 152: 1373-1390.
- Forster, B. P. y Powell, W. (1997). Haploidy in barley. En *In vitro* haploid production en higher plants. Jain, S. M., Sopory, S. K., Veilleux, R. E. (eds). Kluwe, Dordrecht, pp. 99-115.
- Forster, B. P. y Thomas, W. T. B. (2005). Doubled haploids in genetics plant breeding. *Plant Breeding Reviews*, 25: 57-88.
- Forster, B. P., Heberle-Bors, E., Kasha, K. J. y Touraev, A. (2007). The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in Plant Science*, 12 (8): 368-375.
- Froelicher, Y., Bassene, J-B., Jedidi-Neji, E., Dambier, D., Morillon, R., Bernardini, G., Costantino, G. y Ollitrault P. (2007). Induced parthenogenesis in mandarin for haploid production: induction procedures and genetic analysis of plantlets. *Plant Cell Reports*, 26: 937-944.

- Gampala, S. S. L., Finkelstein, R. R., Sun, S. S. M. y Rock, C. D. (2002). ABI5 Interacts with Abscisic Acid Signaling Effectors in Rice Protoplasts. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 277(3): 1689-1694.
- Gervais, C., Newcomb, W. y Simmonds, D. (2000). Rearrangement of the actin filament and microtubule cytoskeleton during induction of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. *Protoplasma*, 213: 194-202.
- Giraudat, J., Hauge, B. M., Valon, C., Smalle, J., Parcy, F. y Goodman, H. M. (1992). Isolation of the *Arabidopsis*-ABI3 Gene by Positional Cloning. *Plant Cell*, 4: 1251-1261.
- González, J. M., Muñoz, L. M. y Jouve, N. (2005). Mapping of QTLs for androgenetic response based on a molecular genetic map of x *Triticosecale* Wittmack. *Genome*, 48: 999-1009.
- Gray-Mitsumune, M. y Matton, D. P. (2006). The *Egg apparatus 1* gene from maize is a member of a large gene family found in both monocots and dicots. *Planta*, 223: 618-625.
- Grimanelli, D., Leblanc, O., Perotti, E. y Grossniklaus, U. (2001). Developmental genetics of gametophytic apomixis. *Trends in Genetics*, 17: 597-604.
- Grosse, B. A., Deimling, S. y Geiger, H. H. (1996). Mapping of genes for anther culture ability in rye by molecular markers. *Vortr Pflanzenzüchtg*, 35: 282-283.
- Grover, A. (2012). Plant chitinases: genetic diversity and physiological roles. *Crit Rev Plant Sci*, 31: 57-73.
- Guerrero, G. A. (1992). *Cultivos Herbáceos Extensivos*. 5ª edición. Mundi Prensa. Madrid.
- Gutierrez-Marcos, J. F., Costa, L. M., Biderre-Petit, C., Khbaya, B., O'Sullivan, D. M., Wormald, M., Perez, P. y Dickinson, H. G. (2004). Maternally expressed gene1 is a Novel Maize Endosperm Transfer Cell-Specific Gene with a Maternal Parent-of-Origin Pattern of Expression. *The Plant Cell*, 16: 1288-1301.
- Guzman, M. y Arias, F. J. Z. (2000). Increasing anther culture efficiency in rice (*Oryza sativa* L.) using anthers from ratooned plants. *Plant Sci*, 151: 107-114.
- Guzy-Wróbelska, J. y Szarejlo, I. (2003). Molecular and agronomic evaluation of wheat doubled haploid lines obtained through maize pollination and anther culture methods. *Plant Breeding*, 122: 305-313.
- Harada, T., Sato, T., Asaka, D. y Matsukawa, I. (1991). Large-scale deletions of rice plastid DNA in anther culture. *Theor. Appl. Genet.*, 81: 157-161.

- Hause, B., Hause, G., Pechan, P. y van Lammeren, A. A. M. (1993). Cytoskeletal changes and induction of embryogenesis in microspore and pollen cultures of *Brassica napus* L. *Cell Biol Int*, 17: 153-168.
- Hayat, S. y Ahmad, A. (2011). *Brassinosteroids: A class of plant Hormone*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York, ISBN: 978-94-007-0189-2.
- Hays, D. B., Mandel, R. M. y Pharis, R. P. (2001). Hormones in zygotic and microspore embryos of *Brassica napus*. *Plant Growth Regulation*, 35: 47-58.
- He, D-G. y Ouyang, J-W. (1984). Callus and plantlet formation from cultured wheat anthers at different developmental stages. *Plant Science Letters*, 33: 71-79.
- Higashiyama, T. (2010). Peptide signaling in pollen–pistil interactions. *Plant Cell Physiol*, 51: 177-189.
- Hirano, K., Aya, K., Hobo, T., Sakakibara, H., Kojima, M., Shim, R. A., Hasegawa, Y., Ueguchi-Tanaka, M y Matsuoka, M. (2008). Comprehensive Transcriptome Analysis of Phytohormone Biosynthesis and Signaling Genes in Microspore/Pollen and Tapetum of Rice. *Plant Cell Physiol.*, 49(10): 1429-1450.
- Hobo, T., Kowyama, Y. y Hattori, T. (1999). A bZIP factor, TRAB1, interacts with VP1 and mediates abscisic acid-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96: 15348-15353.
- Hoekstra, S., van Bergen, S., van Brouwershaven, I. R., Schilperoort, R. A. y Wang, M. (1997). Androgenesis in *Hordeum vulgare* L.: Effects of mannitol, calcium and abscisic acid on anther pretreatment. *Plant Science*, 126: 211-218.
- Hoekstra, S., van Zijderveld, M. H., Louwerse, J. D., Heidekamp, F. y van der Mark, F. (1992). Anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv. Igri. *Plant Sci.*, 86: 89-96.
- Hofinger B. J., Ankele, E., Güllly, Ch., Heberle-Bors, E. y Pfosser, M. F. (2000). The involvement of the plastid genome in albino plant regeneration from microspores in wheat. En *Biotechnological approaches for utilization of gametic cells*, COST 824 final meeting. Bohanec, B. (ed). Bled, Slovenia, pp. 215-228.
- Holme I. B., Olesen, A., Hansen, N. J. P. y Andersen, S. B. (1999). Anther and isolated microspore culture response of wheat lines from northwestern and eastern Europe. *Plant. Breeding*, 118(2): 111-117.
- Hosp, J., Tashpulatov, A., Roessner, U., Barsova, E., Katholnigg, H., Steinborn, R., Melikant, B., Lukyanov, S., Heberle-Bors, E y, Touraev, A. (2007a). Transcriptional and metabolic

- profiles of stress-induced, embryogenic tobacco microspores. *Plant Mol Biol*, 63: 137-149.
- Hou, L., Ullrich, S. E. y Kleinhofs, A. (1994). Inheritance of anther culture traits in barley. *Crop. Sci.*, 34: 1243-1247.
- Hu, H. y Kasha, K. J. (1997). Improvement of isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) through ovary co-culture. *Plant Cell Reports*, 16: 520-525.
- Hu, T.C., Ziauddin, A., Simion, E. y Kasha, K.J. (1995). Isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) in a defined media: I. Effects of pretreatment, isolation methods and hormones. *In Vitro Cell Dev Biol*, 31: 79-83.
- Huang, Y., Chen, L., Wang, L., Vijayan, K., Phan, S., Liu, Z., Wan, L., Ross, A., Xiang, D., Datla, R., Pan, Y. y Zou, J. (2009). Probing the endosperm gene expression landscape in *Brassica napus*. *BMC Genomics*, 10:256.
- Huck, N., Moore, J. M., Federer, M. y Grossniklaus, U. (2003). The *Arabidopsis* mutant *feronia* disrupts the female gametophytic control of pollen tube reception. *Development*, 130: 2149-2159.
- Hunter, C.P. (1987). European Patent Application, Nr, 0245898, A2, 1-8.
- Imamura, J. y Harada, H. (1980). Effects of abscisic acid and water stress on the embryo and plantlet production in anther culture of *Nicotiana tabacum* cv *Samsun*. *Z Pflanzenphysiologie*, 100: 285-289.
- Indrianto, A., Barinova, J., Touarev, A. y Heberle-Bors, E. (2001). Tracking individual wheat microspores *in vitro*: identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo. *Planta*, 212: 163-174.
- Islam, A. (2013). Deciphering kunitz proteinase inhibitor in white clover (*Trifolium repens* L.): A transcriptional study. PhD. Massey University, New Zealand.
- Islam, S. y Tuteja, N. (2012). Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pretreatments in major crop species. *Plant Sci*, 182: 134-144.
- Jacquard, C., Asakaviciute, R., Hamalian, A. M., Sangwan, R. S., Devaux, P. y Clément, C. (2006). Barley anther culture: effects of annual cycle and spike position on microspore embryogenesis and albinism. *Plant Cell Rep*, 25: 375-381.
- Jacquard, C., Mazeyrat-Gourbeyre, F., Devaux, P., Boutilier, K., Baillieul, F. y Clément, C. (2009b). Microspore embryogenesis in barley: anther pre-treatment stimulates plant defence gene expression. *Planta*, 229: 393-402.

- Jacquard, C., Nolin, F., Hécart, C., Grauda, D., Rashal, I., Dhondt-Cordelier, S., Sangwan, R. S., Devaux, P., Mazeyrat-Gourbeyre, F. y Clément, C. (2009a). Microspore embryogenesis and programmed cell death in barley: effects of copper on albinism in recalcitrant cultivars. *Plant Cell Rep*, 28: 1329-1339.
- Jähne, A., Becker, D., Brettschneider, R. y Lörz, H. (1994). Regeneration of transgenic, microspores derived, fertile barley. *Theor. Appl. Genet.*, 89: 525-533.
- Jang, Y. H., Lee, J. H., y Kim, J. K. (2008). Abscisic acid does not disrupt either the *Arabidopsis* FCA-FY interaction or its rice counterpart *in vitro*. *Plant and Cell Physiology*, 49: 1898-1901.
- Jarsova, J. y Kundu, J. (2010). Validation of reference genes as internal control for studying viral infections in cereals by quantitative real-time RT-PCR. *BMC Plant Biol*, 10:146.
- Jauhar, P. P., Xu, S. S. y Baenziger, P. S. (2009). Haploidy in Cultivated Wheats: Induction and Utility in Basic and Applied Research. *Crop Science*, 49: 737-755.
- Jensen, C. J. (1983). Producing haploid plants by chromosome elimination. En *Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement*, Science Press, Beijing, China, pp. 55-79.
- Jia, G., Liu, X., Owen, H. A. y Zhao, D. (2008). Signaling of cell fate determination by the TPD1 small protein and EMS1 receptor kinase. *PNAS*, 105: 2220-2225.
- Jofuku, K. D. y Goldberg, R. B. (1989). Kunitz Trypsin Inhibitor Genes Are Differentially Expressed during the Soybean Life Cycle and in Transformed Tobacco Plants. *The Plant Cell*, 1: 1079-1093.
- Johnson, R. R., Wagner, R. L., Verhey, S. D. y Walker-Simmons, M. K. (2002). The Abscisic Acid-Responsive Kinase PKABA1 Interacts with a Seed-Specific Abscisic Acid Response Element- Binding Factor, TaABF, and Phosphorylates TaABF Peptide Sequence. *Plant Physiology*, 130: 837-846.
- Joosen, R., Cordewener, J., Supena, E. D. J., Vorst, O., Lammers, M., Maliepaard, C., Zeilmaker, T., Miki, B., America, T., Custers, J. y Boutilier, K. (2007). Combined transcriptome and proteome analysis identifies pathways and markers associated with the establishment of rapeseed microspore-derived embryo development. *Plant Physiol*, 144: 155-172.
- Kanno, Y., Jikumaru, Y., Hanada, A., Nambara, E., Abrams, S. R., Kamiya, Y. y Seo, M. (2010). Comprehensive hormone profiling in developing *Arabidopsis* seeds: Examination of the

- site of ABA biosynthesis, ABA transport and hormone interactions. *Plant Cell Physiol.*, 51: 1988-2001.
- Kapazoglou, A., Tondelli, A., Papaefthimiou, D., Ampatzidou, H., Francia, E., Stanca, M. A., Bladenopoulos, K. y Tsaftaris, A. S. (2010). Epigenetic chromatin modifiers in barley: IV. The study of barley Polycomb group (PcG) genes during seed development and in response to external ABA. *BMC Plant Biology*, 10:73.
- Kapusi, E., Hensel, G., Coronado, M-J., Broeders, S., Marthe, C., Otto, I. y Kumlehn, J. (2013). The elimination of a selectable marker gene in the doubled haploid progeny of co-transformed barley plants. *Plant Mol Biol*, 81: 149-160.
- Kasha, K. J., Simion, E., Oro, R., Yao, Q. A., Hu, T. C. y Carlson, A. R. (2003), Haploid wheat isolated microspore culture protocol. En *Doubled Haploid Production in Crop Plants. A manual*. Maluszynski, M., Kasha, K. J., Foster, B. P. y Szarejko, I. (eds). Kluwer, Dordrecht, pp.77-81.
- Kasha, K. J. (2005). Chromosome doubling and recovery of doubled haploid plants. En *Haploids in crop improvement II*. Palmer, C. E., Keller, W. A., Kasha, K. J. (eds). Springer-Verlag, Berlin, pp. 123-151.
- Kelliher, T. y Walbot, V. (2012). Hypoxia Triggers Meiotic Fate Acquisition in Maize. *SCIENCE*, 337: 345-348.
- Khan, J. A., Wang, Q., Sjölund, R. D., Schulz, A. y Thompson, G. A. (2007). An Early Nodulin-Like Protein Accumulates in the Sieve Element Plasma Membrane of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 143: 1576-1589.
- Koike, M., Okamoto, T., Tsuda, S. y Imai, R. (2002). A novel plant defensinlike gene of winter wheat is specifically induced during cold acclimation. *Biochem Biophys Res Commun*, 298: 46-53.
- Kondou, Y., Nakazawa, M., Kawashima, M., Ichikawa, T., Yoshizumi, T., Suzuki, K., Ishikawa, A., Koshi, T., Ryo Matsui, T., Muto, S. y Matsui, M. (2008). RETARDED GROWTH OF EMBRYO1, a New Basic Helix-Loop-Helix Protein, Expresses in Endosperm to Control Embryo Growth. *Plant Physiology*, 147: 1924-1935.
- Kovalchuk, N., Smith, J., Pallotta, M., Singh, R., Ismagul, A., Eliby, S., Bazanova, N., Milligan, A. S., Hrmova, M., Langridge, P. y Lopato, S. (2009). Characterization of the wheat endosperm transfer cell-specific protein TaPR60. *Plant Mol Biol*, 71: 81-98.
- Kumar, A., Jiang, S., Jami, S. K. y Hill, R. D. (2011). Cloning and characterization of barley caryopsis FCA. *Physiologia Plantarum*, 143: 93-106.

- Kumar, S. (2010). Molecular and Physiological Characterization of the Flowering Time Control Protein, HvFCA and its Role in ABA Signalling and Seed Germination. Tesis Doctoral, Universidad de Manitoba
- Kumari, M., Clarke, H. J., Small, I. y Siddique, K. H. (2009). Albinism in plants: a major bottleneck in wide hybridization, androgenesis and doubled haploid culture. *Crit Rev Plant Sci*, 28: 393-409.
- Kunz, C., Islam, S. M. S., Berberat, J., Peter, S. O., Büter, B., Stamp, P. y Schmid, (2000). Assesment and improvement of wheat microspore derived embryo induction and regeneration. *Journal of Plant Physiology*, 156: 190-196.
- Kyo, M. y Harada, H. (1985). Studies on conditions for cell division and embryogenesis in isolated pollen culture of *Nicotiana rustica*. *Plant Physiol*, 79: 90-94.
- Kyo, M., Hattori, S., Yamaji, N., Pechan, P. y Fukui, H. (2003) Cloning and characterization of cDNAs associated with the embryogenic dedifferentiation of tobacco immature pollen grains. *Plant Sci*, 164: 1057-1066.
- Kyo, M., Miyatake, H., Mamezuka, K. y Amagata, K. (2000). Cloning of cDNA Encoding NtEPc, a Marker Protein for the Embryogenic Dedifferentiation of Immature Tobacco Pollen Grains Cultured in Vitro. *Plant Cell Physiol*, 41(2): 129-137.
- Kyo, M., Yamaji, N., Yuasa, Y., Maeda, T. y Fukui, H. (2002). Isolation of cDNAs coding for NtEPb1 /b3, marker proteins for pollen dedifferentiation in a tobacco pollen culture system. *Plant Science*, 163: 1055 -1061.
- Lantos, C., Weyen, J., Orsini, J. M., Gnad, H., Schlieter, B., Lein, V., Kontowsky, S., Jacobi, A., Mihály, R., Broughton, S. y Pauk, J. (2013). Efficient application of in vitro anther culture for different European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding programmes. *Plant Breeding*, 132: 149-154.
- Larsen, E. T., Tuveesson, I. K. D. y Andersen, S. B. (1991). Nuclear genes affecting percentage of green plants in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. *Theor. Appl. Genet.*, 82: 417-420.
- Lee, K. H., Piao, H. L., Kim, H. Y., Choi, S. M., Jiang, F., Hartung, W., Hwang, I., Kwak, J. M. y Lee, I. J. (2006). Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell*, 126: 1109-1120.
- Leljak-Levanic, D., Juranic, M. y Sprunck, S. (2013). De novo zygotic transcription in wheat (*Triticum aestivum* L.) includes genes encoding small putative secreted peptides and a protein involved in proteasomal degradation. *Plant Reprod*, 26: 267-285.

- Leroux, B., Carmoy, N., Giraudet, D., Potin, P., Larher, F. y Bodin, M. (2009). Inhibition of ethylene biosynthesis enhances embryogenesis of cultured microspores of *Brassica napus*. *Plant Biotechnol Rep*, 3: 347-353.
- Letarte, J., Simion, E., Miner, M. y Kasha, K. J. (2006). Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture. *Plant Cell Rep*, 24: 691-698.
- Leung, J y Giraudat, J. (1998). ABSCISIC ACID SIGNAL TRANSDUCTION. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49: 199-222.
- Leung, J., Merlot, S. y Giraudat, J. (1997). The *Arabidopsis* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell*, 9: 759-771.
- Leymarie, J., Robayo-Romero, M. E., Gendreau, E., Benech- Arnold, R. L. y Corbineau, F. (2008). Involvement of ABA in induction of secondary dormancy in barley (*Hordeum vulgare* L.) seeds. *Plant and Cell Physiology*, 49: 1830-1838.
- Li, J. (2010). Multi-tasking of somatic embryogenesis receptor-like protein kinases. *Curr Opin Plant Biol*, 13: 509-514.
- Li, J., Brader, G. y Palva, E. T. (2008b). Kunitz Trypsin Inhibitor: An Antagonist of Cell Death Triggered by Phytopathogens and Fumonisin B1 in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 1(3): 482-495.
- Li, M., Singh, R., Bazanova, N., Milligan, A. S., Shirley, N., Langridge, P. y Lopato, S. (2008a). Spatial and temporal expression of endosperm transfer cell-specific promoters in transgenic rice and barley. *Plant Biotechnology Journal*, 6: 465-476.
- Li, Y., Shen, Y., Cai, C., Zhong, C., Zhu, L., Yuan, M. y Rena, H. (2010). The Type II *Arabidopsis* Formin14 Interacts with Microtubules and Microfilaments to Regulate Cell Division. *The Plant Cell*, (22): 2710-2726.
- Lin, Y-H., Li, H-T., Huang, Y-C., Hsieh, Y-C., Guan, H-H., Liu, M-Y., Chang, T., Wangc, A. H-J. y Chen, C-J. (2006). Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of rice Bowman-Birk inhibitor from *Oryza sativa*. *Acta Cryst.*, (62): 522-524.
- Lin, Z., Ni, Z., Zhang, Y., Yao, Y., Wu, H. y Sun, Q. (2005). Isolation and characterization of 18 genes encoding a- and b-expansins in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol Gen Genomics*, 274: 548-556.

- Linde-Laursen, I., Heslop-Harrison, J. S., Shepherd, K. W. y Taketa, S. (1997). The barley genome and its relationship with the wheat genomes. A survey with an internationally agreed recommendation for barley chromosome nomenclature. *Hereditas*, 126: 1-16.
- Liu, C. y Mehdy, M. C. (2007). A nonclassical arabinogalactan protein gene highly expressed in vascular tissues, AGP31, is transcriptionally repressed by methyl jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 145: 863-874.
- Liu, Y. (2012). Roles of mitogen-activated protein kinase cascades in ABA signaling. *Plant Cell Rep*, 31: 1-12.
- Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *METHODS*, 2: 402-408.
- Livak, K. J., Flood, S. J. A., Marmaro, J., Giusti, W. y Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Research*, 4: 357-362.
- Lofti, M., Alan, A. R., Henning, M. J., Jahn, M. M. y Earle, E. D. (2003). Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. *Plant Cell Reports*, 21: 1121-1128.
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., McLachlin, D. T., Chait, B. T. y Chua, N-M. (2002). ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *The Plant Journal*, 32: 317-328.
- Ma, H., Busch, R. H., Riera-Lizarazu, O., Rines, H. W. y Dill-Macky, R. (1999). Agronomic performance of lines derived from anther culture, maize pollination and single-seed descent in a spring wheat cross. *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 432-436.
- Ma, H., Zhao, H., Liu, Z. y Zhao, J. (2011). The Phytocyanin Gene Family in Rice (*Oryza sativa* L.): Genome-Wide Identification, Classification and Transcriptional Analysis. *PLoS ONE*, 6(10): e25184.
- Mackey, J. (1966). Species relationship in *Triticum*. Proceedings of the 2nd International Wheat Genetics Symposium. *Lund Hereditas suppl.*, 2: 237-276.
- Macknight, R., Bancroft, I., Page, T., Lister, C., Schmidt, R., Love, K., Westphal, L., Murphy, G., Sherson, S., Cobbett, C. y Dean, C. (1997). *FCA*, a Gene Controlling Flowering Time in *Arabidopsis*, Encodes a Protein Containing RNA-Binding Domains. *Cell*, 89: 737-745.

- Macknight, R., Duroux, M., Laurie, R., Dijkwel, P., Simpson, G. y Dean, C. (2002). Functional Significance of the Alternative Transcript Processing of the Arabidopsis Floral Promoter *FCA*. *The Plant Cell*, 14: 877-888.
- MacQueen, J. B. (1967). "Some methods for classification and Analysis of Multivariate Observations, Proceedings of 5-th Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability", Berkeley, University of California Press, 1: 281-297.
- Magnard, J. L., Le Deunff, E., Domenech, J., Rogowsky, P. M., Testillano, P. S., Rougier, M., Risueño, M. C., Vergne, P. y Dumas, C. (2000). Genes normally expressed in the endosperm are expressed at early stages of microspore embryogenesis in maize. *Plant Molecular Biology*, 44: 559-574.
- Maier, R., Neckermann, K., Igloi, G. y Kössel, H. (1995). Complete sequence of the maize chloroplast genome: gene content hotspots of divergence and fine tuning of genetics information by transcript editing. *J. Mol. Biol.*, 251: 614-628.
- Majewska-Sawka, A. y Nothnagel, E. A. (2000). The Multiple Roles of Arabinogalactan Proteins in Plant Development. *Plant Physiology*, 122: 3-9.
- Makowska, K. y Oleszczuk, S. (2014). Albinism in barley androgenesis. *Plant Cell Rep*, 33: 385-392.
- Malik, M. R. y Krochko, J. E. (2009). Gene Expression Profiling of Microspore Embryogenesis in *Brassica napus*. En *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, Touraev, A., Forster, B. P. y Mohan Jain, S. (eds). Springer-Verlag, pp.115-125.
- Malik, M. R., Wang, F., Dirpaul, J. M., Zhou, N., Hammerlindl, J., Keller, W., Abrams, S. R., Ferrie, A. M. R. y Krochko, J. E. (2008). Isolation of an embryogenic line from non-embryogenic *Brassica napus* cv. Westar through microspore embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 59(10): 2857-2873.
- Malik, M. R., Wang, F., Dirpaul, J. M., Zhou, N., Polowick, P. L., Ferrie, A. M. R. y Krochko, J. E. (2007). Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus*. *Plant Physiol.*, 144: 134-154.
- Mallon, R., Martínez, T., Corredoira, E. y Vieitez, A. M. (2013). The positive effect of arabinogalactan on induction of somatic embryogenesis in *Quercus bicolor* followed by embryo maturation and plant regeneration. *Trees*, 27: 1285-1296.

- Maluszynski, M., Kasha, K. J. y Szarejko, I. (2003b). Published doubled haploid in plant species. En *Doubled Haploid Production in Crop Plants, A Manual*, Maluszynski, M., Kasha, K. J., Foster, B. P. y Szarejko, I. (eds). Kluwer, Dordecht, pp. 309-335.
- Maluszynski, M., Kasha, K. J., Foster, B. P. y Szarejko, I. (eds). (2003a). *Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual*. Kluwer, Dordecht.
- Manninen, O. M. (2000). Associations between anther-culture response and molecular markers on chromosome 2H, 3H and 4H of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 100: 57-62.
- Maraschin, S. F., Caspers, M., Potokina, E., Wülfert, F., Graner, A., Spaink, P. y Wang, M. (2006). cDNA array analysis of stress-induced gene expression in barley androgenesis. *Physiologia Plantarum*, 127: 535-550.
- Maraschin, S. F., de Priester, W., Spaink, P. y Wang, M. (2005a). Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *Journal of Experimental Botany*, 56: 1711-1726.
- Maraschin, S. F., Gaussand, G., Pulido, A., Olmedilla, A., Lamers G. E. M., Korthout, H., Spaink, H. P. y Wang, M. (2005c). Programmed cell death during the transition from multicellular structures to globular embryos in barley androgenesis. *Planta*, 221: 459-470.
- Maraschin, S. F., Vennik, M., Lamers, G. E. M., Spaink, H. P. y Wang, M. (2005b). Time-lapse tracking of barley androgenesis reveals position determined cell death within pro-embryos. *Planta*, 220: 531-540.
- Markovic, O. y Janecek, S. (2001). Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28: sequence-structural features, specificities and evolution. *Protein Engineering*, 14(9): 615-631.
- Márton, M. L., Cordts, S., Broadhvest, J. y Dresselhaus, T. (2005). Micropylar Pollen Tube Guidance by Egg Apparatus 1 of Maize. *Science*, 307: 573-576.
- Márton, M.L., Fastner, A., Uebler, S. y Dresselhaus, T. (2012). Overcoming hybridization barriers by the secretion of the maize pollen tube attractant *ZmEA1* from *Arabidopsis* ovules. *Curr Biol*, 22(13): 1194-1198.
- Massonneau, A., Coronado, M-J., Audran, A., Bagniewska, A., Mol, R., Testillano, P. S., Goralski, G., Dumas, C., Risueño, M-C., Matthys-Rochon, E. (2005). Multicellular structures developing during maize microspore culture express endosperm and embryospesific genes and show different embryogenic potentialities. *Eur J Cell Biol*, 84: 663-675.

- Mauch, F. y Dudler, R. (1993). Differential induction of distinct glutathione-S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiol*, 102: 1193-1201.
- Mayer, K. F. X., Martis, M., Hedley, P. E., Simková, H., Liu, H., Morris, J. A., Steuernagel, B., Taudien, S., Roessner, S., Gundlach, H., Kubaláková, M., Suchánková, P., Murat, F., Felder, M., Nussbaumer, T., Graner, A., Salse, J., Endo, T., Sakai, H., Tanaka, T., Takeshi Itoh, T., Sato, K., Platzer, M., Takashi Matsumoto, T., Scholz, U., Dolezel, J., Waugh, R. y Stein, N. (2011). Unlocking the Barley Genome by Chromosomal and Comparative Genomics. *Plant Cell*, 23: 1249-1263.
- Melchinger, A. E., Technow, F. y Dhillon, B. S. (2011). Gene stacking strategies with doubled haploids derived from biparental crosses: theory and simulations assuming a finite number of loci. *Theoretical and Applied Genetics*, 123: 1269-1279.
- Merlot, S., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A. y Giraudat, J. (2001). The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *The Plant Journal*, 25(3): 295-303.
- Meyer, K., Leube, M. P. y Grill, E. (1994). A protein phosphatase 2C involved in ABA signal-transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 264: 1452-1455.
- Mezja, S. J., Morgant, V., DiBona, D. E. y Wong, J. R. (1993). Plant regeneration from isolated microspores of *Triticum aestivum*. *Plant Cell Rep*, 12: 149-153.
- Millar, A. A., Jacobsen, J. V., Ross, J. J., Helliwell, C. A., Poole, A. T., Scofield, G., Reid, J. B. y Gubler, F. (2006). Seed dormancy and ABA metabolism in *Arabidopsis* and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. *The Plant Journal*, 45: 942-954.
- Mizutani, M. y Todoroki, Y. (2006). ABA 8'-hydroxylase and its chemical inhibitors. *Phytochem Rev*, 5: 385-404.
- Molina-Cano, J. L., Igartua, E., Casas, A. M. y Moralejo, M. (2002). New views on the origin of cultivated barley. En: Slafer, G. A., Molina-Cano, J. L., Savin, R., Araus, J. L. y Romagosa, I. (eds). *Barley Science. Recent advances from molecular biology to agronomy of yield and quality*. Haworth Press, New York, pp. 15-29.
- Mönke, G., Seifert, M., Keilwagen, J., Mohr, M., Grosse, I., Hahnel, U., Junker, A., Weisshaar, B., Conrad, U., Baumlein, H. y Altschmied, L. (2012). Toward the identification and regulation of the *Arabidopsis thaliana* ABI3 regulon. *Nucleic Acids Research*, 40(17): 8240-8254.

- Moreno-Risueno, M. A., González¹, N., Díaz, I., Parcy, F., Carbonero, P. y Vicente-Carbajosa, J. (2008). FUSCA3 from barley unveils a common transcriptional regulation of seed-specific genes between cereals and *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 53: 882-894.
- Mori, T., Kuroiwa, H., Higashiyama, T. y Kuroiwa, T. (2005). GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 is essential for angiosperm fertilization. *NATURE CELL BIOLOGY*, 8(1).
- Mu, J., Tan, H., Hong, S., Liang, Y. y Zuo, J. (2013). *Arabidopsis* transcription factor genes NF-YA1, 5, 6, and 9 play redundant roles in male gametogenesis, embryogenesis, and seed development. *Molecular Plant*, 6(1): 188-201.
- Muñoz-Amatriaín, M., Castillo, A., Chen, X., Cistué, L. y Vallés, M. (2008). Identification and validation of QTLs for green plant percentage in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. *Molecular Breeding*, 22: 119-129.
- Muñoz-Amatriaín, M., Moscou, M. J., Bhat, P. R., Svensson, J. T., Bartoš, J., Suchánková, P., Šimková, H., Endo, T. R., Fenton, R. D., Wu, Y., Lonardi, S., Castillo, A. M., Chao, S., Cistué, L., Cuesta-Marcos, A., Forrest, K., Hayden, M. J., Hayes, P. M., Horsley, R. D., Kleinhofs, A., Moody, A., Sato, K., Vallés, M. P., Wulff, B. B. H., Muehlbauer, G. J., Doležel, J. y Close, T. J. (2011). An improved consensus linkage map of barley based on flow-sorted chromosomes and SNP markers. *The Plant Genome*, 4(3).
- Muñoz-Amatriaín, M., Svensson, J. T., Castillo, A. M., Cistué, L., Close, T. J. y Vallés, M. P. (2006). Transcriptome analysis of barley anthers: effect of mannitol treatment on microspore embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 127: 551-560.
- Muñoz-Amatriaín, M., Svensson, J. T., Castillo, A. M., Cistué, L., Close, T. J., Vallés, M. P. (2009c). Transcriptome comparison of three barley lines after mannitol stress treatment reveals genes involved in genotype-dependent response to microspore embryogenesis. *Funct Integr Genomic*, 9: 321-323.
- Muñoz-Amatriaín, M., Svensson, J. T., Castillo, A. M., Close, T. J. y Vallés, M. P. (2009a). Expression profiles in Barley Microspore Embryogenesis. En *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, Touraev, A., Forster, B. P. y Mohan Jain, S. (eds). Springer-Verlag, pp.127-134.
- Muñoz-Amatriaín, M., Svensson, J. T., Castillo, A. M., Close, T. J. y Vallés, M. P. (2009b). Microspore embryogenesis: assignment of genes to embryo formation and green vs. albino plant production. *Funct. Integr. Genomics*, 9: 311-323.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.

- Murovec, J. y Bohanec, B. (2012). Haploids and Doubled Haploids in Plant Breeding. En Plant Breeding , Abdurakhmonov, I. (ed). InTech, ISBN: 978-953-307-932-5. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/plant-breeding/haploids-and-doubled-haploids-in-plant-breeding>
- Nguema-Ona, E., Coimbra, S., Vické-Gibouin, M., Mollet, J-C. y Driouich, A. (2012). Arabinogalactan proteins in root and pollen-tube cells: distribution and functional aspects. *Annals of Botany*, 110: 383-404.
- Nobusawa, T., Okushima, Y., Nagata, N., Kojima, M., Sakakibara, H. y Umeda, M. (2013). Synthesis of very-long-chain fatty acids in the epidermis controls plant organ growth by restricting cell proliferation. *PLoS Biol*, 11(4): e1001531.
- Ohnishi, T., Takanashi, H., Mogi, M., Takahashi, H., Kikuchi, S., Yano, K., Okamoto, T., Fujita, M., Kurata, N. y Tsutsumi, N. (2011). Distinct Gene Expression Profiles in Egg and Synergid Cells of Rice as Revealed by Cell Type-Specific Microarrays. *Plant Physiology*, 155: 881-891.
- Okuda, S., Tsutsui, H., Shiina, K., Sprunck, S., Takeuchi, H., Yui, R., Kasahara, R. D., Hamamura, Y., Mizukami, A., Susaki, D., Kawano, N., Sakakibara, T., Namiki, S., Itoh, K., Otsuka, K., Matsuzaki, M., Nozaki, H., Kuroiwa, T., Nakano, A., Kanaoka, M. M., Dresselhaus, T., Sasaki, N. y Higashiyama, T. (2009). Defensin-like polypeptides LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. *Nature*, 458, 357-361.
- Oldroyd, G. E.D. y Downie, J. A. (2008). Coordinating Nodule Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59: 519-46.
- Opsahl-Ferstad, H-G., Le Deunff, E., Dumas, C. y Rogowsky, P. M. (1997). ZmESR, a novel endosperm specific gene expressed in a restricted region around the maize embryo. *The Plant Journal*, 12: 235-246.
- Ouyang, J. W. (1986). Induction of pollen plants in *Triticum aestivum*. En Haploids of higher plants *in vitro*, Hu, H. y Yang, Y. (eds). pp. 26-41.
- Paire, A., Devaux, P., Lafitte, C., Dumas, C. y Matthys-Rochon, E. (2003). Proteins produced by barley microspores and their derived androgenic structures promote *in vitro* zygotic maize embryo formation. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 73: 167-176.
- Palmer, C. E. y Keller, W. A. (2005). Overview of Haploidy. En Haploids in Crop Improvement II, Palmer, C. E., Keller, W. A. y Kasha, K. J. (eds). Springer, pp. 3-10.

- Paolacci, A. R., Tanzarella, O. A., Porceddu, E. y Ciaffi, M. (2009). Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Molecular Biology*, 10: 1-27.
- Park, H-Y., Seok, H-Y., Park, B-K., Kim, S-H., Goh, C-H., Lee, B-H., Lee, C-H. y Moon, Y-H. (2008). Overexpression of *Arabidopsis* ZEP enhances tolerance to osmotic stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 375: 80-85.
- Pauls, K. P., Chan, J., Woronuk, G., Schulze, D. y Brazolot, J. (2006). When microspore decide to become embryos-cellular and molecular changes. *Can. J. Bot.*, 84: 668-678.
- Paux, E., Pierre Sourdille, P., Mackay, I. y Feuillet, C. (2012). Sequence-based marker development in wheat: Advances and applications to breeding. *Biotechnology Advances*, 30: 1071-1088.
- Peña, R.J. (2002). Wheat for bread and other foods. En *Bread wheat, improvement and production*, Curtis, B.C., Rajaram, S., Gómez, Macpherson, H. (eds.). FAO, Rome, Italy, pp. 468-482.
- Perez-Grau, L. y Goldberg, R. B. (1989). Soybean Seed Protein Genes Are Regulated Spatially during Embryogenesis. *The Plant Cell*, 1: 1095-1109.
- Pilarska, M. Knox, J. P. y Konieczny, R. (2013). Arabinogalactan-protein and pectin epitopes in relation to an extracellular matrix surface network and somatic embryogenesis and callogenesis in *Trifolium nigrescens* Viv. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 115: 35-44.
- Poland, J. A., Brown, P. J., Sorrells, M. E. y Jannink, J. L. (2012). Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. *PLoS One*, 7(2): e32253.
- Poon, S., Heath, R. L. y Clarke, A. E. (2012). A Chimeric Arabinogalactan Protein Promotes Somatic Embryogenesis in Cotton Cell Culture. *Plant Physiology*, 160: 684-695.
- Prasad, T. K., Anderson, M. D., Martin, B. A. y Steward, R.C. (1994). Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell*, 6: 65-74.
- Prem, D., Solís, M. T., Bárány, I., Rodríguez-Sanz, H., Risueño, M. C. y Testillano, P. S. (2012). A new microspore embryogenesis system under low temperature which mimics zygotic embryogenesis initials, expresses auxin and efficiently regenerates doubled-haploid plants in *Brassica napus*. *BMC Plant Biology*, 12: 127.

- Pulido, A., Bakos, F., Devic, M., Barnabás B. y Olmedilla, A. (2009). *HvPG1* and *ECA1*: two genes activated transcriptionally in the transition of barley microspores from the gametophytic to the embryogenic pathway. *Plant Cell Rep.*, 28: 551-559.
- Pulido, A., Bakos, F., Castillo, A., Vallés, M. P., Barnabas, B. y Olmedilla, A. (2005). Cytological and ultrastructural changes induced in anther and isolated-microspore cultures in barley: Fe deposits in isolated-microspore cultures. *J. Struct. Biol.*, 149: 170-181.
- Puolimatka, M. y Pauk, J. (2000). Effect of induction duration and medium composition on plant regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Journal of Plant Physiology*, 156: 197-203.
- Ramesar-Fortner, N. S. y Yeung, E. C. (2006). Physiological influences in the development and function of the shoot apical meristem of microspore-derived embryos of *Brassica napus* 'Topas'. *Can J Bot Rev Can Bot*, 84: 371-383.
- Ramirez, C., Testillano, P., Castillo, A. M., Vallés, M. P., Coronado, M. J., Cistué, L. y Risueño, M. C. (2001). The early microspora embryogenesis pathway in barley is accompanied by concrete ultrastructural and expression changes. *Int J Dev Biol*, (s1): S57-S58.
- Razem, F. A., El-Kereamy, A., Abrams, S. R. y Hill, R. D. (2006). The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *NATURE*, 439: 19.
- Reynolds, T. L. (1997). Pollen embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 33: 1-10.
- Reynolds, T. L. y Crawford, R. L. (1996). Changes in abundance of abscisic acid-responsive, early cysteine-labeled metallothionein transcript during pollen embryogenesis in bread wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Molecular Biology*, 35: 82-829.
- Richards, K. D., Snowden, K. C. y Cardner, R. C. (1994). *wali6* and *wali7*, Genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant Physiol*, 105: 1455-1456.
- Riedel, C., Habekuß, A., Schliephake, E., Nicks, R., Broer, I. y Ordon, F. (2011). Pyramiding of *Ryd2* and *Ryd3* conferring tolerance to a German isolate of *Barley yellow dwarf virus-PAV* (BYDV-PAV-ASL-1) leads to quantitative resistance against this isolate. *Theoretical and Applied Genetics*, 123: 69-76.
- Risk, J. M., Day, C. L. y Macknight, R. C. (2009). Reevaluation of abscisic acid-binding assays shows that G-Protein-Coupled Receptor2 does not bind abscisic acid. *Plant Physiology*, 150: 6-11.

- Roberts-Oehlschlager, S. L. y Dunwell, J. M. (1990). Barley anther culture: pre-treatment on mannitol stimulates production of microspore-derived embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 20: 235-240.
- Rodríguez-Serrano, M., Bárány, I., Prem, D., Coronado, M. J., Risueño, M. C. y Testilano, P.S. (2012). NO, ROS, and cell death associated with caspase-like activity increase in stress-induced microspore embryogenesis of barley. *J Exp Bot*, 63: 2007-2024.
- Rudolf, K., Bohanec, B. y Hansen, M. (1999). Microspore culture of white cabbage, *Brassica oleracea* var. capitata L.: genetic improvement of non-responsive cultivars and effect of genome doubling agents. *Plant Breed*, 118: 237-241.
- Ruepp, A., Zollner, A., Maier, D., Albermann, K., Hani, J., Mokrejs, M., Tetko, I., Güldener, U., Mannhaupt, G., Münsterkötter, M. y Mewes, H.W. (2004). The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Res.*, 32: 5539-5545.
- Ruiz-Sola, M. A. y Rodríguez-Concepcion, M. (2012). Carotenoid biosynthesis in Arabidopsis: A colorful pathway. *The Arabidopsis Book* 10:e0158. doi:10.1199/tab.0158.
- Saeed, A. I., 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. y Quackenbush, J. (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques*, 34(2): 374-378.
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J. G., Abe, H., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002). DNA-Binding Specificity of the ERF/AP2 Domain of Arabidopsis DREBs, Transcription Factors Involved in Dehydration- and Cold-Inducible Gene Expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290: 998-1009.
- Salemme, M., Sica, M., Iazzetti, G., Gaudio, L. y Aceto, S. (2013). The AP2-Like Gene OitaAP2 Is Alternatively Spliced and Differentially Expressed in Inflorescence and Vegetative Tissues of the Orchid *Orchis italica*. *PLOS ONE*, 8(10): e77454.
- Samaj, J., Baluska, F., Bobák, M. y Volkmann, D. (1999). Extracellular matrix surface network of embryogenic units of friable maize callus contains arabinogalactan-proteins recognized by monoclonal antibody JIM4. *Plant Cell Rep*, 18: 369-374.
- Sampedro, J. y Cosgrove, D. J. (2005). Protein family review The expansin superfamily. *Genome Biology*, 6: 242.

- Sánchez-Monje, E. (1974). Fitogenética: mejora de plantas. Monografías INIA (v.12). Ministerio de Agricultura. Madrid.
- Sang, X., Li, Y., Luo, Z., Ren, D., Fang, L., Wang, N., Zhao, F., Ling, Y., Yang, Z., Liu, Y. y He, G. (2012). CHIMERIC FLORAL ORGANS1, encoding a monocot-specific MADS box protein, regulates floral organ identity in rice. *Plant Physiol*, 160: 788-807.
- Santino, A., Taurino, M., De Domenico, S., Bonsegna, S., Poltronieri, P., Pastor, V. y Flors, V. (2013). Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a)biotic stresses. *Plant Cell Rep*, 32: 1085-1098.
- Schaller, F. y Weiler, E. W. (1997). Molecular Cloning and Characterization of 12-Oxophytodienoate Reductase, an Enzyme of the Octadecanoid Signaling Pathway from *Arabidopsis thaliana*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 272(44): 28066-28072.
- Schreiber, A. W., Sutton, T., Caldo, R. A., Kalashyan, E., Lovell, B., Mayo, G., Muehlbauer, G. J., Druka, A., Waugh, R., Wise, R. P., Langridge, P. y Baumann, UT. (2009). Comparative transcriptomics in the Triticeae. *BMC Genomics*, 10: 285.
- Seguí-Simarro, J. M. (2010). Androgenesis Revisited. *Bot. Rev.*, 76: 377-404.
- Seguí-Simarro, J. M. y Nuez, F. (2008). How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore derived embryogenesis. *Physiol. Plant.*, 134: 1-12.
- Seifert, G. J. y Roberts, K. (2007). The biology of arabinogalactan proteins. *Annu Rev Plant Biol*, 58: 137-161.
- Seiler, C., Harshavardhan, V. T., Rajesh, K., Reddy, P. S., Strickert, M., Rolletschek, H., Scholz, U., Wobus, U. y Sreenivasulu, N. (2011). ABA biosynthesis and degradation contributing to ABA homeostasis during barley seed development under control and terminal drought-stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, 62(8): 2615-2632.
- Seo, M., Aoki, H., Koiwai, H., Kamiya, Y., Nambara, E. y Koshihara, T. (2004). Comparative studies on the *Arabidopsis* aldehyde oxidase (AAO) gene family revealed a major role of AAO3 in ABA biosynthesis in seeds. *Plant and Cell Physiology*, 45: 1694-1703.
- Seo, M., Peeters, A. J. M., Koiwai, H., Oritani, T., Marion-Poll, A., Zeevaart, J. A. D., Koornneef, M., Kamiyai, Y. y Koshihara, T. (2000). The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *PNAS*, 97(23): 12908-12913.

- Shan, L., Li, C., Chen, F., Zhao, S. y Xia, G. (2008). A Bowman-Birk type protease inhibitor is involved in the tolerance to salt stress in wheat. *Plant Cell and Environment*, 31: 1128-1137.
- Shariatpanahi, M. E., Bal, U., Heberle-Bors, E. y Touraev, A. (2006). Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 127: 519-534.
- Simpson, G., Dijkwel, P. P., Quesada, V., Henderson, I. y Dean, C. (2003). FY Is an RNA 3' End-Processing Factor that Interacts with FCA to Control the *Arabidopsis* Floral Transition. *Cell*, 113: 777-787.
- Singla, B., Khurana, J. P y Khurana, P. (2008). Characterization of three somatic embryogenesis receptor kinase genes from wheat, *Triticum aestivum*. *Plant Cell Rep*, 27: 833-843.
- Smaczniak, C., Immink, R. G. H., Angenent, G. C. y Kaufmann, K. (2012). Developmental and evolutionary diversity of plant MADSdomain factors: insights from recent studies. *Development*, 139: 3081-3098.
- Smykal, P. y Pechan, P. M. (2000). Stress, as assessed by the appearance of sHsp transcripts, is required but not sufficient to initiate androgenesis. *Physiologia Plantarum*., 110: 135-143.
- Snape, J. W ., Simpson, E. y Parker, B. B. (1986). Criteria for the selection and use of doubled haploid systems in cereal breeding programmes. En *Genetic manipulation in plant breeding*, Horn, W., Jensen, C. J., Odenbach, W., Schieder, O. (eds). Walter de Gruyter, Berlin, pp. 217-229.
- Solis, M. T., Rodríguez-Serrano, M., Meijón, M., Cañal, M. J., Cifuentes, A., Risueño, M.C. y Testillano, P. S. (2012). DNA methylation dynamics and MET1a-like gene expression changes during stress-induced pollen reprogramming to embryogenesis. *J Exp Bot*, 63: 6431-6444.
- Song, H. K., Kim, Y. S., Yang, J. K., Moon, J., Lee, J. Y. y Suh, S. W. (1999). Crystal Structure of a 16 kDa Double-headed Bowman-Birk Trypsin Inhibitor from Barley Seeds at 1.9 Å Resolution. *J. Mol. Biol.*, 293: 1133-1144.
- Soriano, M. C. (2008). Embriogénesis de la microspora en trigo panadero: Optimización de la producción de plantas doble haploides y estudio de la expresión de genes de estrés durante el pretratamiento. Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza.

- Soriano, M., Cistué, L. y Castillo, A. M. (2008). Enhanced induction of microspore embryogenesis after n-butanol treatment in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Plant Cell Rep.*, 27: 805-811.
- Soriano, M., Cistué, L., Vallés, M. P. y Castillo, A. M. (2007). Effects of colchicine on anther and microspore culture of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Tiss. Organ Cul.*, 91: 225-234.
- Soriano, M., Li, H. y Boutilier, K. (2013). Microspore embryogenesis: establishment of embryo identity and pattern in culture. *Plant Reprod*, 26: 181-196.
- Sprockett, D. D., Piontkivska, H. y Blackwood, C. B. (2011). Evolutionary analysis of glycosyl hydrolase family 28 (GH28) suggests lineage-specific expansions in necrotrophic fungal pathogens. *Gene*, 479: 29-36.
- Sprunck, S., Baumann, U., Edwards, K., Langridge, P. y Dresselhaus, T. (2005). The transcript composition of egg cells changes significantly following fertilization in wheat (*Triticum aestivum* L.). *The Plant Journal*, 41: 660-672.
- Stasolla, C., Belmonte, M. F., Tahir, M., Elhiti, M., Khamiss, K., Joosen, R., Maliepaard, C., Sharpe, A., Gjetvaj, B. y Boutilier, K. A. (2008). Buthionine sulfoximine (BSO)-mediated improvement in cultured embryo quality in vitro entails changes in ascorbate metabolism, meristem development and embryo maturation. *Planta*, 228: 255-272.
- Stephenson, T. J., McIntyre, L., Collet, C. y Xue, G-P. (2007). Genome-wide identification and expression analysis of the NF-Y family of transcription factors in *Triticum aestivum*. *Plant Mol Biol*, 65: 77-92.
- Supena, E. D. J., Winarto, B., Riksen, T., Dubas, E., van Lammeren, A., Offringa, R., Boutilier, K y, Custers, J. (2008). Regeneration of zygotic-like microspore-derived embryos suggests an important role for the suspensor in early embryo patterning. *J. Exp. Bot.*, 59: 803-814.
- Suzuki, M. y McCarty, D. R. (2008). Functional symmetry of the B3 network controlling seed development. *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 548-553.
- Suzuki, M., Kao, C-Y., Cocciolone, S. y McCarty, D. R. (2001). Maize VP1 complements *Arabidopsis abi3* and confers a novel ABA/auxin interaction in roots. *The Plant Journal*, 28(4): 409-418.
- Szarejko, I. (2003). Doubled haploid mutation production. En *Doubled Haploid Production in Crop Plants, A manual*, Maluszynski, M., Kasha, K. J., Forster, B. P. y Szarejko, I. (eds). Kluwer, Dordrecht, pp. 351-362.

- Tan, H., Liang, W., Hu, J. y Dabing Zhang, D. (2012). MTR1 Encodes a Secretory Fasciclin Glycoprotein Required for Male Reproductive Development in Rice. *Developmental Cell*, 22: 1127-1137.
- Tang, X. C., He, Y. Q., Wang, Y. y Sun, M. X. (2006). The role of arabinogalactan proteins binding to Yariv reagents in the initiation, cell developmental fate, and maintenance of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv Topas. *J Exp Bot*, 57: 2639-2650.
- Telmer, C. A., Newcomb, W. y Simmonds, D. H. (1995). Cellular changes during heat shock induction and embryo development of cultured microspores of *Brassica napus* cv. Topas. *Protoplasma*, 185: 106-112.
- Testillano, P. S., Coronado, M-J., Thierry, A-M., Matthys-Rochon, E. y Risueño, M. C. (2010). In situ detection of Esr proteins secretion during maize microspore embryogenesis and their secretion blockage show effects on the culture progression. *Functional Plant Biology*, 37: 985-994.
- Testillano, P., Ramírez, C., Domenech, J., Coronado, M. J., Vergne, P., Matthys-Rochon, E. y Risueño M. C. (2002). Young microspore-derived maize embryos show two domains with defined features also present in zygotic embryogenesis. *The international journal of developmental biology*, 46: 1035-1047.
- Thirumurugan, T., Ito, Y., Kubo, T., Serizawa, A. y Kurata, N. (2008). Identification, characterization and interaction of *HAP* family genes in rice. *Mol. Genet. Genomics*, 279: 279-289.
- Thomas, W. T. B., Foster, B. P. y Gertsson B. (2003). Doubled haploids in breeding. En *Doubled Haploid Production in crop Plants: A Manual*, Maluszynski, M., Kasha, K. J., Foster, B. P. y Szarejko, I. (eds). Kluwer, Dordrecht, pp. 337-349.
- Torp, A. M., Bekesiova, I., Holme, I. B., Hansen, A. L. y Andersen, S. B. (2004). Genetics related to doubled haploid induction in vitro. En *In vitro applications in crop improvement*, Mujib, A. (ed). Science Publishers, Plymouth, pp. 34-52.
- Torp, A. y Andersen, S. (2009). Albinism in microspore culture. En: Touraev, A., Forster, B. P. y Jain, S. M. (eds). *Advances in haploid production in higher plants*. Springer, Dordrecht, pp, 155-160.
- Torp, A.M ., Hansen, A. L. y Andersen, S. B. (2001). Chromosomal regions associated with green plant regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Euphytica*, 119: 377-387.

- Touraev, A., Indrianto, A., Vicente, O., Wratschko, O. y Hebrle-Bors, E. (1996). Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. *Sex. Plant. Reprod.*, 9: 209-215.
- Tran, F., Penniket, C., Patel, R. V., Provart, N. J., Laroche, A., Rowland, O. y Robert, L. S. (2013). Developmental transcriptional profiling reveals key insights into Triticeae reproductive development. *Plant J*, doi: 10.1111/tpj.12206.
- Tryfona, T., Liang, H-C., Kotake, T., Tsumuraya, Y., Stephens, E. y Dupree, P. (2012). Structural Characterization of *Arabidopsis* Leaf Arabinogalactan Polysaccharides. *Plant Physiology*, 160: 653-666.
- Tsuwamoto, R. y Takahata, H. (2008). Identification of genes specifically expressed in androgenesis-derived embryo in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Breeding Science*, 58: 251-259.
- Tsuwamoto, R., Fukuoka, H. y Takahata, Y. (2007). Identification and characterization of genes expressed in early embryogenesis from microspores of *Brassica napus*. *Planta*, 225: 641-652.
- Tuteja, N. (2007). Abscisic Acid and Abiotic Stress Signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 2(3): 135-138.
- Tuvesson, I. K. D., Pedersen, S. y Andersen, S. B. (1989). Nuclear genes affecting albinism in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Theor. Appl. Genet.*, 78: 879-883.
- Tuvesson, S., Christophe Dayteg, C., Hagberg, P., Manninen, O., Tanhuanpaa, P., Tenhola-Roininen, T., Kiviharju, E., Weyen, J., Forster, J., Schondelmaier, J., Lafferty, J., Marn, M. y Fleck, A. (2007). Molecular markers and doubled haploids in European plant breeding programmes. *Euphytica*, 158: 305-312.
- van Bergen, S. y Wang, M. (2002). MICROSPORE REGENERATION AS A TOOL FOR PLANT BREEDING: BARLEY MICROSPORE REGENERATION AS A MODEL SYSTEM. En: *Proc. XX EUCARPIA Symp. on New Ornamentals II*. Van Huylbroeck, J. y col. (eds.). *Acta Hort.* 572, ISHS 2002.
- van Bergen, S., Kottenhagen, M. J., Van der Meulen, R. M y, Wang, M. (1999). The role of abscisic acid in induction of androgenesis: a comparative study between *Hordeum vulgare* L cvs. Igri and Digger. *J Plant Growth Regul.*, 18: 135-143.
- van Hengel A. J., Van Kammen, A. y Vries, S. C. (2002). A relationship between seed development, arabinogalactan-proteins (AGPs) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis. *Physiol Plant*, 114: 637-644.

- van Hengel, A. J., Tadese, Z., Immerzeel, P., Schols, H., van Kammen, A. y de Vries, S. C. (2001). N-Acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiol*, 125: 1880-1890.
- Varshney, R. K., Hoisington, D. A. y Tyagi, A. K. (2006). Advances in cereal genomics and applications in crop breeding. *TRENDS in Biotechnology*, 24: 490-499.
- Vergne, P., Delvallee, I. y Dumas, C. (1987). Rapid assessment of microspore and pollen development stage in wheat and maize using DAPI and membrane permeabilization. *Stain Technol*, 62: 299-304.
- Von Schaewen, A., Frank, J. y Koiwa, H. (2008). Role of complex N-glycans in plant stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior*, 3 (10): 871-873.
- Vrinten, P. L., Nakamura, T. y Kasha, K. J. (1999). Characterization of cDNAs expressed in the early stages of microspore embryogenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Molecular Biology*, 41: 455-463.
- Walker, J. C. (1993). Receptor-like protein kinase genes of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 3(3): 451-456.
- Wang, A., Xia, Q., Xie, W., Dumonceaux, T., Zou, J., Datla, R. y Selvaraj, G. (2002). Male gametophyte development in bread wheat (*Triticum aestivum* L.): molecular, cellular, and biochemical analyses of a sporophytic contribution to pollen wall ontogeny. *Plant J*, 30: 613-623.
- Wang, M., Hoekstra, S., van Bergen, S., Lamers, G. E. M., Oppedijk, B. J., van der Heijden, M. W., de Priester, W. y Schilperoort, R.A. (1999). Apoptosis in developing anthers and the role of ABA in this process during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. *Plant Mol Biol*, 39: 489-501.
- Wang, X. y Hu, H. (1984). The effect of potato II medium for *Triticale* anther culture. *Plant. Science. Letters*, 36: 237-239.
- West, M., Yee, K. M., Danao, J., Zimmerman, J. L., Fischer, R. L., Goldberg, R. B. y Harada, J. J. (1994). LEAFY COTYLEDON1 is an essential regulator of late embryogenesis and cotyledon identity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 6: 1731-1745.
- Whittle, C. A., Malik, M. R., Li, R y Krochko, J. E. (2010). Comparative transcript analyses of the ovule, microspore, and mature pollen in *Brassica napus*. *Plant Mol Biol*, 72: 279-299.
- Wilens, R. W., van Rooijen, G. J. H., Pearce, D. W., Pharis, R. P., Holbrook, L. A. y Moloney, M. M. (1991). Effects of Jasmonic Acid on Embryo-Specific Processes in *Brassica* and *Linum* Oilseeds. *Plant Physiol*, 95: 399-405.

- Wilkinson, P. A., Winfield, M. O., Barker, G. LA., Allen, A. M., BurrIDGE, A., Coghill, J. A. y Edwards, K. J. (2012). CerealsDB 2.0: an integrated resource for plant breeders and scientists. *BMA Bioinformatics*, 13: 219.
- Wise, R. P., Caldo, R. A., Hong, L., Shen, L., Cannon, E. K., Dickerson, J. A. (2007). Plant Bioinformatic Methods and Protocols. En *Methods in Molecular Biology*, vol 406, Edwards, D. (ed). Humana Press, Totowa, NJ, pp. 347-363.
- Xie, Z., Li, X., Glover, B. J., Bai, S., Rao, G-Y., Luo, J. y Yang, J.(2008). Duplication and Functional Diversification of HAP3 Genes Leading to the Origin of the Seed-Developmental Regulatory Gene, LEAFY COTYLEDON1 (LEC1), in Nonseed Plant Genomes. *Mol Biol Evol*, 25(8): 1581-1592.
- Xing, Q., Creff, A., Waters, A., Tanaka, H., Goodrich, J. y Ingram, G. C. (2013). ZHOUP1 controls embryonic cuticle formation via a signaling pathway involving the subtilisin protease ABNORMAL LEAFSHAPE1 and the receptor kinases GASSHO1 and GASSHO2. *Development*, 140: 770-779.
- Xu, X. H., Chen, H., Sang, Y. L., Wang, F., Ma, J. P., Gao, X. y Zhang, X. S. (2012a). Identification of genes specifically or preferentially expressed in maize silk reveals similarity and diversity in transcript abundance of different dry stigmas. *BMC Genomics*, 13: 294.
- Xu, Z-Y., Kim, D. H. y Hwang, I. (2013). ABA homeostasis and signaling involving multiple subcellular compartments and multiple receptors. *Plant Cell Rep*, 32: 807-813.
- Yang, S., Jiang, L., Puah, C. S., Xie, L., Zhang, X. y Chen L., Yang, W. y Ye, D. (2005). Overexpression of TAPETUM DETERMINANT1 Alters the Cell Fates in the Arabidopsis Carpel and Tapetum via Genetic Interaction with EXCESS MICROSPOROCTES1/EXTRA SPOROGENOUS CELLS1. *Plant Physiology*. 139: 186-191.
- Yang, S., Johnston, N., Talideh, E., Mitchell, S., Jeffree, C., Goodrich, J. y Ingram, G. (2008). The endosperm-specific ZHOUP1 gene of *Arabidopsis thaliana* regulates endosperm breakdown and embryonic epidermal development. *Development*, 135: 3501-3509.
- Yang, S-L., Xie, L-F., Mao, H-Z., Puah, Ch. S., Yang, W-C., Jiang, L., Sundaresan, V. y Ye, D. (2003). TAPETUM DETERMINANT1 is required for cell specialization in the *arabidopsis* anther. *Plant Cell*, 15: 2792-2804.
- Zarsky, V., Garrido, D., Eller, N., Tupy, J., Vicente, O., Schöffl, F. y Heberle-Bors E. (1995). The expression of a small heat shock gene is activated during induction of tobacco pollen embryogenesis by starvation. *Plant Cell and Environment*, 18: 139-147.

- Zhao, L., Liu, B., Zhang, K. P., Tian, J. C. y Deng, Z. Y. (2009). Detection of QTLs with Additive Effects, Epistatic Effects, and QTL x Environment Interactions for Zeleny Sedimentation Value Using a Doubled Haploid Population in Cultivated Wheat. *Agricultural Sciences in China*, 8(9): 1039-1045.
- Zhao, T., Ni, Z., Dai, Y., Yao, Y., Nie, X. y Sun, Q. (2006a). Characterization and expression of 42 MADS-box genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol. Gen. Genom.*, 276: 334-350.
- Zhao, X. Y., Cheng, Z. J. y Zhang, X. S. (2006b). Overexpression of *TaMADS1*, a *SEPALLATA*-like gene in wheat, causes early flowering and the abnormal development of floral organs in Arabidopsis. *Planta*, 223: 698-707.
- Zhao, X., de Palma, J., Oane, R., Gamuyao, R., Luo, M., Chaudhury, A., Herve, P., Xue, Q. y Bennett, J. (2008). OsTDL1A binds to the LRR domain of rice receptor kinase MSP1, and is required to limit sporocyte numbers. *The Plant Journal*, 54: 375-387.
- Zheng, M. Y., Weng, Y., Liu, W. y Konzak, C. F. (2002). The effect of ovary-conditioned medium on microspore embryogenesis in common wheat (*Triticum aestivum* L.) *Plant Cell Rep*, 20: 802-807.
- Zhou, H. y Konzak, C. F. (1992). Genetic control of green plant regeneration from anther culture of wheat. *Genome*, 35: 957-961.
- Zhou, H., Zheng, Y. y Konzak, C. F. (1991). Osmotic potential of media affecting green plant percentage in wheat anther culture. *Plant Cell Reports*, 10: 63-66.
- Zohary, D. y Hopf, M. (1988). *Domestication of plants in the old world*. Clarendon, Oxford.
- Zur, I., Dubas, E., Krzewska, M., Sánchez-Díaz, R. A., Castillo, A. M. y Vallés, M. P. (2013). Changes in gene expression patterns associated with microspore embryogenesis in hexaploid triticale (*xTriticosecale* Wittm.). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, DOI 10.1007/s11240-013-0399-7.
- Zur, I., Krzewska, M., Dubas, E., Gołbiowska-Pikania, G., Janowiak, F. y Stojalowski, S. (2012). Molecular mapping of loci associated with abscisic acid accumulation in triticale (*xTriticosecale* Wittm.) anthers in response to low temperature stress inducing androgenic development. *Plant Growth Regul*, 68: 483-492.

8. Anexos

Publicaciones:

Sánchez-Díaz, R.A., Castillo, A. M. y Vallés, M. P. (2013). Microspore embryogenesis in wheat: new marker genes for early, middle and late stages of embryo development. *Plant Reprod*, 26: 287-296.

Zur, I., Dubas, E., **Sánchez-Díaz, R. A.**, Castillo, A. M., Krzewska, M., Vallés, M. P. (2013). Changes in gene expression pattern associated with microspore embryogenesis in triticale (xTriticosecale Wittm). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, DOI 10.1007/s11240-013-0399-7.

Tabla 25: Valores de expresión de los 1797 genes (Probe set) (datos de “fold change” normalizados con log₂), en los puntos Odi, 4di, 4dc y 8dc. Homologías de secuencia de los genes establecidas mediante el programa HarVEST Barley v. 1.74, y valores de similitud (“e-value”).

Probe Set	Odi	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
Contig3480_at	-6.34	-6.04	6.05	6.25	LOC_Os07g41410	3,00E-17	protein EGG APPARATUS-1
Contig21354_at	-5.94	-5.78	5.85	6.11	UniRef90_Q6YNJ7	2,00E-20	HAP3 transcriptional-activator
Contig13727_at	-5.10	-4.56	5.56	4.58	UniRef90_Q2R3F9	8,00E-16	LGC1, putative
Contig15557_at	-4.47	-3.89	5.56	3.95			
Contig4507_at	-4.22	-4.16	5.04	4.13	LOC_Os10g14020	3,00E-32	protein TPD1
Contig19162_at	-5.67	-4.62	4.52	4.68	UniRef90_Q2QM38	3,00E-78	CCAAT-binding transcription factor subunit B protein (HAP2)
EBpi01_SQ002_O17_at	-3.87	-5.39	3.64	4.45			
HK06N02r_s_at	-4.26	-4.48	4.37	4.08	LOC_Os03g61150	3,00E-28	expressed protein
Contig11431_at	-4.95	-4.40	4.43	4.31			
Contig11232_at	-4.13	-4.59	4.16	4.52	LOC_Os04g33860	2,00E-50	expressed protein
Contig4058_s_at	-3.88	-3.77	4.82	3.79	LOC_Os04g44470	2,00E-12	protein KUN1 - Kunitz-type trypsin inhibitor precursor
Contig6278_at	-3.76	-5.89	2.61	2.84	LOC_Os01g21590	8,00E-56	protein homeodomain
Contig22399_at	-3.56	-3.12	5.28	3.19	LOC_Os02g53570	8,00E-13	protein DEFL74 - Defensin and Defensin-like DEFL family
Contig13708_s_at	-3.97	-3.48	4.85	3.58			
Contig19785_at	-3.66	-3.53	4.71	3.55	AT2G02140	9,00E-10	LCR72 (LOW-MOLECULAR-WEIGHT CYSTEINE-RICH 72); peptidase inhibitor
Contig5348_s_at	-3.69	-5.90	2.25	3.00	AT4G10270	5,00E-21	wound-responsive family protein
HA28D17r_s_at	-3.78	-3.57	4.54	3.70	AT1G44191	6,00E-19	Encodes a ECA1 gametogenesis related family protein
Contig19958_at	-3.29	-3.18	4.87	3.19	LOC_Os01g52770	2,00E-29	protein GDLS-like lipase/acylhydrolase
Contig8349_at	-3.56	-3.44	4.56	3.50	LOC_Os08g04740	2,00E-13	protein expressed protein
HA09g16r_at	-3.82	-3.59	4.33	4.96	LOC_Os11g11680	6,00E-21	protein LGC1
Contig2587_at	-5.90	-4.37	3.50	4.87	LOC_Os12g38140	2,00E-48	expressed protein
Contig12818_at	-3.56	-3.40	4.42	3.50	LOC_Os02g15710	4,00E-35	plastocyanin-like domain containing protein
HB30P16r_at	-5.93	-4.37	3.37	3.97			
Contig11592_x_at	-4.17	-3.89	3.84	3.64			
Contig14073_at	-3.53	-4.44	3.25	3.98	LOC_Os05g08800	8,00E-60	DUF581 domain containing protein
Contig17901_at	-4.24	-3.86	3.77	3.98	LOC_Os05g10830	2,00E-83	protein proteophosphoglycan ppg4
Contig11594_at	-3.77	-3.54	4.07	3.64	LOC_Os01g40750	8,00E-14	expressed protein
HA03C08u_at	-3.18	-2.91	4.60	3.10	UniRef90_Q2R3F9	5,00E-20	LGC1, putative
Contig16272_at	-3.34	-3.95	3.51	4.40	LOC_Os06g15600	2,00E-41	plastocyanin-like domain containing protein
Contig14215_at	-3.78	-3.44	4.00	3.47	LOC_Os05g45460	6,00E-54	protein POE152 - Pollen Ole e I allergen and extensin family
Contig1429_at	-3.81	-2.89	4.50	2.94	LOC_Os02g36690	2,00E-08	hypothetical protein
Contig12979_s_at	-4.31	-3.63	3.69	4.51	AT1G31810	4,00E-05	actin binding protein
EBro03_SQ001_C05_at	-3.78	-3.61	3.63	4.14	LOC_Os10g22050	4,00E-11	expressed protein
Contig11448_at	-4.26	-3.79	3.42	3.76	Contig13701_at	2,00E-46	AP2 domain containing protein
Contig3597_at	-3.42	-3.99	3.21	3.09	AT1G44191	6,00E-19	Encodes a ECA1 gametogenesis related family protein
HVSMEI0013G22r2_at	-4.48	-3.46	3.70	2.96	UniRef90_Q4W1F8	1,00E-146	Expansin EXPB11 protein
Contig3693_at	-3.43	-3.63	3.50	3.47	UniRef90_Q2R3F8	3,00E-22	LGC1, putative
Contig23976_at	-3.47	-3.25	3.75	4.14	LOC_Os02g13450	8,00E-05	MEGL7 - Maternally expressed gene MEG family protein
Contig12232_at	-4.30	-3.43	3.55	3.96	UniRef90_Q01I22	2,00E-82	OSIGBa0102D10.1 protein (H0823A09.7 protein)
Contig23211_at	-3.00	-3.77	3.07	2.93	LOC_Os01g10080	2,00E-20	expressed protein
HA27E07r_at	-3.30	-3.14	3.65	3.22			
Contig26125_at	-3.24	-2.94	3.72	2.95			
Contig13817_s_at	-2.94	-3.67	2.93	3.84	LOC_Os02g53620	8,00E-91	nuclear transcription factor Y subunit
Contig775_x_at	-3.18	-3.00	3.56	3.16	UniRef90_B2C4K0	1,00E-51	Endosperm transfer cell specific PR60
Contig14187_at	-3.61	-3.28	3.27	4.00	LOC_Os05g50940	5,00E-20	conserved hypothetical protein
Contig21737_at	-3.42	-2.88	3.66	2.84	LOC_Os06g28124	4,00E-30	protein glycosyltransferase
Contig22553_at	-3.62	-3.27	3.22	4.53	LOC_Os03g09200	1,00E-28	protein domain of unknown function DUF966
Contig17489_at	-3.01	-3.42	3.05	3.46	UniRef90_Q0DLG0	1,00E-115	Formin-like protein 14
Contig25269_at	-3.32	-3.17	3.19	3.80	LOC_Os05g28350	1,00E-21	AP2 domain containing protein
EBed02_SQ002_O17_at	-3.25	-2.95	3.39	3.44			
Contig15167_at	-3.03	-2.73	3.44	3.66	AT4G18670	5,00E-16	protein binding / structural constituent of cell wall
Contig18254_at	-3.34	-3.04	3.13	2.98			
Contig16695_at	-4.12	-3.62	2.54	3.00	LOC_Os02g53870	2,00E-30	expressed protein
Contig3735_at	-4.42	-3.24	2.83	3.47	UniRef90_Q8L698	2,00E-25	Defensin
Contig17447_at	-3.13	-2.86	2.97	3.73	UniRef90_Q6Z4E7	8,00E-85	Putative pectin-glucuronyltransferase
Contig9939_at	-3.14	-2.69	2.92	4.41	LOC_Os06g50080	2,00E-34	DUF581 domain containing protein
Contig10396_at	-3.08	-2.63	2.82	4.65	LOC_Os01g12070	6,00E-91	protein endoglucanase precursor
rbags13f02_at	-2.84	-2.63	2.81	4.19			
EBro07_SQ003_G24_s_at	-2.75	-2.49	2.64	4.75	LOC_Os02g37490	3,00E-18	glycine-rich cell wall structural protein
Contig4506_at	-2.04	-1.53	6.30	1.35	LOC_Os10g14020	2,00E-32	protein TPD1
Contig151_at	-1.89	-1.57	5.28	1.68	LOC_Os01g04730	1,00E-16	protein ribosomal protein L24
HA04g14r_at	-0.12	-0.09	6.45	0.14	LOC_Os02g07495	3,00E-05	hypothetical protein
Contig25447_at	-1.41	-1.28	4.05	1.85	LOC_Os12g29590	4,00E-08	expressed protein
Contig1858_at	-0.38	-0.24	4.62	0.38	LOC_Os07g44550	1,00E-133	protein peroxidase precursor
Contig19759_at	-0.15	0.00	4.65	0.04	LOC_Os06g11210	2,00E-37	protein 12-oxophytodiene reductase
HA2418r_at	-1.76	-1.24	3.28	1.14	LOC_Os03g16300	1,00E-10	protein OsSub29 - Putative Subtilisin homologue
Contig16415_at	0.58	-0.07	4.08	-0.20	LOC_Os04g43650	1,00E-173	protein L-allo-threonine aldolase
EBro04_SQ004_O07a_at	-0.94	-0.67	3.02	0.73	LOC_Os01g11790	2,00E-22	protein GDLS-like lipase/acylhydrolase
Contig21047_at	-0.99	-0.92	2.64	1.18	LOC_Os02g07440	2,00E-09	protein DEFL78 - Defensin and Defensin-like DEFL family

Probe Set	Odi	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
Contig15279_s_at	-0,33	0,02	3,56	0,00			
Contig14932_at	-0,57	-0,69	2,46	0,55	LOC_Os08g31340	4,00E-76	heavy metal-associated domain containing protein
HVSMEI0011N07r2_at	-0,18	0,18	3,33	-0,15			
HV14J05u_x_at	-1,17	-0,58	2,41	0,83			
Contig18187_at	-0,66	-0,56	2,41	0,63	LOC_Os04g43300	1,00E-103	BRCA1 C Terminus domain containing protein
Contig9239_s_at	-0,10	-0,75	2,11	0,29	UniRef90_Q0UDA6	8,00E-06	Putative uncharacterized protein-Phaeosphaeria nodorum
Contig14704_at	-0,34	-0,06	2,62	0,49	AT1G49770	1,00E-31	RGE1 (RETARDED GROWTH OF EMBRYO 1)
Contig23940_at	-0,51	-0,53	2,06	0,60	LOC_Os07g02280	1,00E-119	protein pentatricopeptide
Contig3457_x_at	-0,79	-1,90	0,78	0,79	LOC_Os05g08360.1	1,00E-151	protein rRNA 2-O-methyltransferase fibrillarin 2
HVSMEb0007O01f_at	6,20	-3,91	-1,23	1,24	LOC_Os04g16874.1	0,0	protein photosystem II 44 kDa reaction center protein
Contig7946_at	-0,61	-2,13	0,55	0,63	LOC_Os03g44010.2	4,00E-98	protein nucleolar protein NOP5
Contig902_x_at	-0,22	-1,88	0,80	0,20	LOC_Os11g14220.1	0,0	protein tubulin/FtsZ domain containing protein
Contig8770_at	-3,30	-1,33	1,34	1,18	LOC_Os12g02970.1	2,00E-18	protein RNA binding protein, putative
HY04I03T_at	-1,00	-1,69	0,98	0,99	LOC_Os01g71960.1	1,00E-22	protein endonuclease
Contig10819_at	-2,46	-1,38	1,29	1,26	LOC_Os02g45250.1	1,00E-13	protein homeobox and START domains containing protein
Contig9882_at	-0,30	-2,32	0,35	0,34	LOC_Os07g31270.1	7,00E-68	protein cupin 2, conserved barrel domain protein
Contig14049_at	-0,87	-1,43	1,24	0,70	LOC_Os01g01350.1	1,00E-115	protein SNF7 domain containing protein
Contig7069_at	0,69	-2,25	0,42	-0,44	LOC_Os06g20320.1	0,0	protein peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type
Contig14606_at	-1,99	-1,30	1,37	1,47	LOC_Os09g28060.1	6,00E-43	protein MORN repeat domain containing protein
Contig9814_at	-0,87	-1,71	0,96	1,35	LOC_Os04g36660.1	0,0	protein calmodulin binding protein
Contig2504_at	3,21	-3,39	-0,73	0,50	LOC_Os03g53150.1	1,00E-102	protein OsIAA13 - Auxin-responsive Aux/IAA gene family member
Contig9183_at	0,01	-2,76	-0,09	0,37	LOC_Os06g06770.1	1,00E-177	protein OsPOP11 - Putative Prolyl Oligopeptidase homologue
Contig18666_at	-1,20	-1,51	1,15	1,28	LOC_Os12g33090.1	2,00E-66	protein zinc finger family protein
Contig8959_at	-0,63	-2,21	0,45	0,53	LOC_Os10g41030.2	2,00E-75	protein agenet domain containing protein
Contig5344_at	2,53	-2,68	-0,01	0,00	LOC_Os07g01030.1	0,0	protein glycosyl transferase, group 1 domain containing protein
HVSMEb0003G21r2_s_at	4,12	-3,44	-0,78	0,92	LOC_Os05g13940.1	1,00E-162	protein retrotransposon protein, putative, unclassified
Contig26531_at	-5,27	-1,41	2,05	1,16	LOC_Os03g08620.1	9,00E-11	B3 DNA binding domain containing protein
HS18B10u_s_at	1,62	-9,61	-0,63	0,52	LOC_Os03g55350.1	0,0	protein OsSub31 - Putative Subtilisin homologue
Contig1689_at	0,26	-10,31	-0,68	1,80	LOC_Os01g60740.2	2,00E-46	protein LTP16 - Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein precursor
Contig5523_s_at	0,66	-9,67	-0,32	0,31	LOC_Os04g20280.1	1,00E-103	protein expressed protein
Contig3257_at	0,29	-9,98	-0,44	0,75	LOC_Os01g14850.1	1,00E-34	protein MFS18 protein precursor
Contig3259_at	-0,02	-10,07	0,26	1,99	LOC_Os12g02290.1	5,00E-41	protein LTP23 - Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein precursor
HM04L20u_at	1,14	-8,83	-0,97	0,64	LOC_Os06g46680.1	0,0	protein cytochrome P450
Contig1881_s_at	0,01	-9,54	-0,16	0,58	LOC_Os05g43690.1	1,00E-68	protein glucan endo-1,3-beta-glucosidase-like protein 3 precursor
Contig2263_s_at	4,78	-4,48	-0,10	0,08	LOC_Os01g17170.1	0,0	protein magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase, chloroplast
Contig12038_at	1,28	-7,81	-0,54	0,47	LOC_Os12g01770.1	6,00E-91	protein protein phosphatase 2c
Contig15518_s_at	0,11	-8,48	-0,02	1,79	LOC_Os10g28060.1	0,0	protein 3-ketoacyl-CoA synthase
Contig9814_at	-0,23	-8,63	0,34	1,09	LOC_Os04g48160.1	0,0	protein IQ calmodulin-binding motif family protein
Contig3081_at	0,83	-7,50	0,19	-0,07	LOC_Os04g35570.1	0,0	protein Regulator of chromosome condensation domain containing protein
Contig12086_at	0,25	-8,05	-0,05	0,04	LOC_Os05g41030.1	3,00E-55	protein LTP67 - Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein precursor
Contig13334_at	0,16	-8,01	-0,12	0,72	LOC_Os07g37810.2	1,00E-139	protein STRUBBELIG-RECEPTOR FAMILY 1 precursor
Contig5523_at	0,95	-7,13	-0,21	0,19	LOC_Os04g20280.1	1,00E-103	protein expressed protein
HY07112u_s_at	1,45	-6,53	-0,04	0,23	LOC_Os02g51040.1	1,00E-135	protein expansin precursor
basd23g06_s_at	3,42	-4,54	-1,68	1,56	LOC_Os01g53240.1	1,00E-177	protein BURP domain containing protein
Contig5420_at	1,21	-6,72	-0,38	0,26	LOC_Os01g06490.1	0,0	protein OsSCP1 - Putative Serine Carboxypeptidase homologue
Contig6704_at	-0,23	-8,11	0,02	0,80	LOC_Os04g44610.1	0,0	protein white-brown complex homolog protein 11
Contig4811_s_at	0,38	-7,29	0,14	-0,12	LOC_Os04g48230.2	0,0	protein dehydration response related protein
Contig3479_at	0,41	-7,21	-0,02	0,07	LOC_Os10g39440.1	0,0	protein transporter family protein
Contig5275_at	-0,25	-7,87	0,25	0,55			
Contig5362_at	-0,54	-8,12	0,52	1,18	LOC_Os10g25780.1	0,0	protein FAD-linked oxidoreductase protein
Contig10928_at	3,15	-4,36	-0,79	0,61	LOC_Os07g44710.1	1,00E-82	protein - CAMK includes calcium/calmodulin dependet protein kinases
Contig9621_s_at	-1,04	-8,40	1,12	2,16	LOC_Os03g59300.2	4,00E-90	protein expressed protein
rbags1d23_s_at	0,50	-6,73	-0,10	0,15	LOC_Os03g21080.1	8,00E-83	protein guanine nucleotide exchange factor
Contig12179_at	-0,22	-7,26	0,34	0,20	LOC_Os06g10660.1	1,00E-176	protein lysM domain-containing GPI-anchored protein 1 precursor
Contig5492_at	-0,37	-7,33	0,46	0,27	LOC_Os02g57670.1	1,00E-83	protein ribosomal L9
Contig8002_at	0,00	-6,93	0,01	0,26	LOC_Os03g07590.1	6,00E-14	protein hypothetical protein
Contig5004_at	-0,01	-6,92	0,65	0,01	LOC_Os07g38300.1	1,00E-120	protein ribosome recycling factor
Contig7987_at	1,80	-5,06	-0,27	0,45	LOC_Os02g17920.1	1,00E-166	protein glyoxalase family protein
Contig8458_at	1,71	-5,12	0,35	-0,08	LOC_Os08g44870.1	1,00E-151	protein MATE efflux family protein
Contig12144_s_at	-0,13	-6,82	0,09	0,02	LOC_Os03g14210.1	3,00E-87	protein glycosyl hydrolases family 17
Contig10526_at	-0,45	-7,07	0,41	0,65	LOC_Os04g58470.1	0,0	protein choline transporter-related
Contig21617_at	-0,24	-6,85	0,33	1,39	LOC_Os11g10460.1	1,00E-147	protein peroxidase precursor
Contig11923_at	-1,23	-7,83	0,74	1,93	LOC_Os04g54280.1	2,00E-35	protein retrotransposon protein, putative, Ty1-copia subclass
Contig12256_at	-0,17	-6,66	0,12	0,35	LOC_Os01g70160.1	1,00E-117	protein zinc finger, C3HC4 type domain containing protein
Contig5189_at	-0,49	-6,97	0,49	1,18	LOC_Os03g16230.2	1,00E-123	protein oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family protein
Contig3513_at	-1,58	-7,88	1,30	2,27	LOC_Os02g06560.1	3,00E-23	protein wound induced protein
Contig11115_at	-0,07	-6,31	0,17	0,94	LOC_Os10g33960.2	0,0	protein START domain containing protein
Contig15786_at	-0,78	-6,96	1,25	0,58	LOC_Os09g35940.1	1,00E-109	protein cytochrome P450
Contig5884_at	0,00	-6,16	-0,05	0,53	LOC_Os04g38310.1	1,00E-147	protein expressed protein
HO13O09S_s_at	0,00	-6,14	0,29	0,00	LOC_Os06g48950.1	1,00E-169	protein auxin response factor 19

Probe Set	Odi	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
Contig18064_at	-0,63	-6,69	0,62	0,49	LOC_Os04g51680.1	8,00E-28	protein hypothetical protein
Contig5768_at	-0,35	-6,37	0,43	0,39	LOC_Os03g22430.1	1,00E-162	protein OsCip5 - Putative Cip protease homologue
Contig5659_at	-0,76	-6,73	0,92	0,75	LOC_Os11g34940.1	2,00E-36	protein plastid-specific 50S ribosomal protein 6, chloroplast precursor
Contig6623_s_at	-0,03	-5,93	0,12	0,05	LOC_Os08g20660.2	0.0	protein sucrose-phosphate synthase
Contig2876_at	-0,16	-6,01	0,00	1,14	LOC_Os10g40730.1	1,00E-115	protein expansin precursor
Contig19815_at	-0,53	-6,30	0,84	0,44	LOC_Os11g31090.1	1,00E-109	protein transferase family protein
Contig13701_at	-0,87	-6,58	0,76	1,12	LOC_Os07g04190.1	0.0	protein receptor protein kinase CLAVATA1 precursor
Contig17317_at	-1,59	-7,30	1,03	1,71	LOC_Os04g54300.1	1,00E-32	protein wound induced protein
HV_CEa0013O20r2_s_at	-0,40	-6,09	0,43	0,18	LOC_Os12g39420.9	0.0	protein nucleobase-ascorbate transporter
Contig13879_at	-1,56	-7,22	1,52	2,23	LOC_Os07g43580.1	1,00E-121	protein MYB family transcription factor
Contig14170_at	0,00	-5,61	0,30	-0,02	LOC_Os06g48950.1	1,00E-169	protein auxin response factor 19
Contig14370_at	2,41	-3,17	-0,76	0,50	LOC_Os06g13830.1	7,00E-76	protein endoglucanase
Contig7275_at	-0,89	-6,41	1,14	2,13	LOC_Os01g16140.1	9,00E-16	protein expressed protein
Contig3514_at	-1,94	-7,42	1,40	2,24	LOC_Os04g54280.1	3,00E-33	protein retrotransposon protein, putative, Ty1-copia subclass
Contig5748_at	-0,23	-5,69	0,13	0,65	LOC_Os06g40450.2	1,00E-143	protein targeting protein for Xklp2
Contig16059_at	-0,58	-5,93	0,67	0,43	LOC_Os09g09360.1	1,00E-83	protein esterase/lipase/thioesterase
Contig6578_at	2,24	-3,05	0,13	-0,06	LOC_Os10g37520.1	0.0	protein major facilitator superfamily domain-containing protein 5
Contig10306_s_at	-0,66	-5,91	0,88	0,42	LOC_Os05g27100.1	6,00E-48	protein expressed protein
Contig15715_at	-1,34	-6,58	1,38	1,53	LOC_Os02g54360.1	6,00E-61	protein enzyme of the cupin superfamily protein
Contig10408_at	-1,02	-6,23	0,91	1,10	LOC_Os05g34150.1	1,00E-117	protein glutathione S-transferase
Contig19106_at	-0,79	-5,99	0,78	3,91	LOC_Os07g48910.1	1,00E-21	protein retrotransposon protein, putative, unclassified
Contig3512_s_at	-2,40	-7,58	1,73	2,41	LOC_Os04g54280.1	9,00E-36	protein retrotransposon protein, putative, Ty1-copia subclass
Contig7678_at	0,32	-4,83	-0,46	0,44	LOC_Os02g38820.1	1,00E-100	protein expressed protein
Contig1192_s_at	0,17	-4,92	0,08	-0,05	LOC_Os11g07020.1	0.0	protein fructose-bisphosphate aldolase isozyme
Contig14515_at	-1,87	-6,90	2,17	1,84	LOC_Os01g67110.1	5,00E-74	protein expressed protein
Contig10074_at	-1,08	-6,05	1,28	1,01	LOC_Os07g41720.2	2,00E-98	protein nuclear transcription factor Y subunit
Contig19828_at	-1,07	-6,03	0,98	1,83	LOC_Os09g09980.1	1,00E-127	protein glucan endo-1,3-beta-glucosidase precursor
Contig18984_s_at	-0,10	-5,00	0,13	0,87	LOC_Os03g03990.1	5,00E-50	protein signal recognition particle 43 kDa protein, chloroplast precursor
Contig17002_at	-0,76	-5,59	0,77	0,78	LOC_Os03g27770.1	8,00E-41	protein heme oxygenase 2
Contig15376_at	-1,90	-6,68	1,68	2,34	LOC_Os08g04190.1	2,00E-98	protein homeobox and START domains containing protein
Contig11109_at	-1,17	-5,91	1,13	1,25	LOC_Os03g02960.1	4,00E-88	protein nascent polypeptide-associated complex subunit alpha
HY10B05u_x_at	-0,62	-5,36	0,64	0,76			
Contig3659_at	-0,62	-5,16	1,01	0,65	LOC_Os12g35630.1	4,00E-77	protein elongation factor TS family protein
Contig21692_at	-0,01	-4,55	2,58	0,01	LOC_Os12g06260.1	9,00E-29	protein harpin-induced protein 1 domain containing protein
Contig4380_at	-0,28	-4,82	0,60	0,35			
rbags21b15_at	0,89	-3,63	0,64	-0,68	LOC_Os07g05720.1	1,00E-05	protein TCP family transcription factor
Contig1510_at	-0,57	-5,07	0,53	0,44	LOC_Os03g01530.1	0.0	protein tubulin/FtsZ domain containing protein
Contig4490_s_at	-0,21	-4,61	0,52	0,22	LOC_Os04g59494.1	6,00E-49	protein transportin-2
Contig15031_at	-1,19	-5,58	1,63	1,10	LOC_Os01g03180.1	1,00E-05	protein retrotransposon protein, putative, unclassified
Contig18354_at	-0,26	-4,61	0,38	0,48	LOC_Os01g52170.1	0.0	protein expressed protein
Contig8243_at	-1,31	-5,66	1,65	1,32	LOC_Os09g03750.1	1,00E-119	protein ankyrin
Contig14649_s_at	0,17	-4,14	0,00	-0,05	LOC_Os02g49770.1	1,00E-96	protein NHL repeat-containing protein
Contig1943_s_at	0,29	-3,99	0,00	0,00	LOC_Os03g17580.1	1,00E-103	protein ribosomal protein L10
HVSMEg0001H24r2_s_at	0,16	-4,11	0,47	-0,04	LOC_Os01g32730.1	1,00E-122	protein tetratricopeptide repeat containing protein
HV05C10u_s_at	0,04	-4,18	0,26	-0,08	LOC_Os04g38750.1	8,00E-73	protein plastid-specific 30S ribosomal protein 3, chloroplast precursor
Contig10313_at	0,02	-4,15	-0,02	0,34	LOC_Os10g10170.2	0.0	protein PPR repeat domain containing protein
Contig5341_at	1,10	-3,01	0,16	-0,14	LOC_Os03g36540.1	0.0	protein magnesium-chelatase subunit chlI, chloroplast precursor
HVSMEb0002N13r2_at	-1,45	-5,53	1,63	1,76	LOC_Os04g47480.1	2,00E-21	protein DUF630/DUF632 domains containing protein
Contig4777_at	-0,81	-4,84	0,78	1,37	LOC_Os10g42110.1	0.0	protein protein kinase family protein
Contig25313_at	-1,67	-5,69	1,52	1,90	LOC_Os01g61180.1	2,00E-51	protein exo70 exocyst complex subunit domain containing protein
Contig18416_s_at	-1,46	-5,45	1,76	1,35	LOC_Os08g45030.1	2,00E-28	protein multidrug resistance protein
Contig11825_at	-1,54	-5,52	1,34	1,21	LOC_Os03g08940.1	1,00E-28	protein conserved hypothetical protein
Contig8954_at	-0,81	-4,75	0,65	1,03	LOC_Os07g33650.3	3,00E-47	protein expressed protein
Contig7136_at	0,58	-3,35	-0,27	0,21	LOC_Os07g38530.1	0.0	protein - STE kinases include homologs to sterile 7, sterile 11 and sterile 20
Contig10268_at	-0,19	-4,11	0,35	0,18	LOC_Os10g39930.2	0.0	protein cytochrome P450 97B2
Contig15689_at	-0,08	-3,99	0,48	0,08			
Contig12113_at	0,30	-3,56	1,47	-0,06	LOC_Os12g38750.2	0.0	protein nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase
HV14C07u_at	-0,35	-4,17	0,35	0,49	LOC_Os03g61620.2	3,00E-38	protein expressed protein
Contig13899_at	-0,16	-3,96	0,17	0,27	LOC_Os03g16890.1	4,00E-90	protein N-acetylglucosaminyltransferase
Contig20858_at	-1,86	-5,57	1,75	2,09	LOC_Os11g20360.2	1,00E-166	protein expressed protein
Contig8473_at	0,05	-3,57	0,00	0,67	LOC_Os02g57710.1	0.0	protein signal peptide peptidase-like 2B
Contig14976_at	0,04	-3,53	-0,01	0,22			
Contig16088_at	-2,44	-5,99	2,57	2,30	LOC_Os05g43820.3	1,00E-109	protein ras-related protein
Contig16978_at	-0,50	-4,02	0,17	0,28	LOC_Os07g46340.1	1,00E-102	protein methyltransferase
Contig26366_at	-0,18	-3,70	0,17	0,50	LOC_Os08g10550.1	1,00E-100	protein potassium transporter
Contig18085_at	-1,47	-4,97	1,56	3,03	LOC_Os03g21730.1	1,00E-157	protein receptor-like protein kinase precursor
HZ65E19r_at	-0,11	-3,60	0,09	0,08	LOC_Os09g02660.1	2,00E-06	protein retrotransposon protein, putative, unclassified
Contig10939_at	-1,49	-4,95	1,47	1,35	LOC_Os12g37530.2	1,00E-159	protein expressed protein
Contig9976_at	-1,91	-5,30	1,61	1,57	LOC_Os01g16530.1	1,00E-127	protein OsCip1 - Putative Cip protease homologue
Contig23110_at	-1,55	-4,91	1,24	2,56	LOC_Os03g16350.1	1,00E-35	protein DNA binding protein

Probe Set	Odi	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
Contig3659_s_at	-0.50	-3.84	0.51	0.48	LOC_Os12g35630.1	1,00E-141	protein elongation factor TS family protein
Contig9442_at	-1.06	-4.39	1.08	1.22	LOC_Os02g58450.1	4,00E-75	protein uncharacterized ACR, COG1399 family protein
HVSMEd0005B05r2_at	-0.53	-3.79	0.72	0.64			
Contig25923_at	-0.57	-3.76	0.60	2.19	LOC_Os03g50140.1	2,00E-43	protein plastocyanin-like domain containing protein
Contig2056_x_at	-1.70	-4.78	2.03	4.28	LOC_Os06g04950.1	7,00E-43	protein early nodulin 93 ENOD93 protein
HVSMEd0013I22f_s_at	-0.66	-3.68	0.65	0.97	LOC_Os05g02130.1	0.0	protein ankyrin repeat domain-containing protein 28
Contig20303_at	-1.14	-4.14	1.18	1.42	LOC_Os01g56320.1	2,00E-43	protein OsSub4 - Putative Subtilisin homologue
Contig5630_at	-0.69	-3.67	0.84	0.74	LOC_Os04g31820.1	2,00E-30	protein hypothetical protein
Contig10242_at	0.29	-2.66	-0.32	1.47	LOC_Os06g35900.1	3,00E-11	protein BES1/BZR1 homolog protein
Contig11234_at	-0.04	-2.91	0.07	0.81	LOC_Os12g39620.3	0.0	protein disease resistance protein
HE01B10u_s_at	-0.53	-3.40	0.88	0.53	LOC_Os08g44210.1	1,00E-53	protein dihydroneopterin aldolase
Contig18416_at	-2.16	-4.98	2.43	1.99	LOC_Os08g45030.1	2,00E-28	protein multidrug resistance protein
Contig19614_at	-0.63	-3.44	0.69	1.00	LOC_Os07g36910.2	1,00E-14	protein OsFBX254 - F-box domain containing protein
Contig16163_at	-0.83	-3.57	2.50	0.93	LOC_Os04g52920.2	1,00E-146	protein remorin family protein
Contig14882_at	-1.70	-4.45	1.55	1.86	LOC_Os02g58120.1	1,00E-126	protein oxidoreductase/ transition metal ion binding protein
Contig9078_at	-0.61	-3.30	0.57	0.62	LOC_Os06g04560.1	0.0	protein kinesin motor domain containing protein
Contig21171_at	-1.15	-3.70	1.01	1.47	LOC_Os10g41230.1	2,00E-89	protein homeobox associated leucine zipper
Contig16427_at	-2.10	-4.56	2.02	2.92	LOC_Os04g38570.2	6,00E-80	protein multidrug resistance protein
Contig19707_at	-1.05	-3.46	1.39	0.76	LOC_Os12g32280.1	2,00E-55	protein SWIB/MDM2 domain containing protein
Contig6805_at	-2.36	-4.69	2.30	3.12	LOC_Os01g65830.1	0.0	protein acyl-desaturase, chloroplast precursor
Contig4206_at	0.11	-9.44	-0.07	0.41	LOC_Os03g08360.1	0.0	protein 3-ketoacyl-CoA synthase 10
Contig5665_at	-1.48	-7.50	1.54	1.49	LOC_Os03g25480.1	0.0	protein cytochrome P450
Contig1244_s_at	-0.27	-8.56	0.23	0.34	LOC_Os07g48490.2	1,00E-178	protein stress responsive protein
HS17D15r_s_at	-3.69	-6.21	2.45	3.14	LOC_Os03g52470.1	0.0	protein WD domain, G-beta repeat domain containing protein
Contig4362_at	0.75	-8.34	0.08	-0.12	LOC_Os12g34890.1	1,00E-55	protein acyl carrier protein
Contig8900_at	-0.86	-7.37	0.93	0.84	LOC_Os09g32550.2	0.0	protein glucan endo-1,3-beta-glucosidase precursor
Contig7632_at	2.46	-8.16	0.11	-0.07	LOC_Os02g40784.1	0.0	protein WAX2
Contig7499_at	-0.89	-7.35	0.80	1.34	LOC_Os01g05060.1	3,00E-96	protein mitochondrial glycoprotein
HVSMEd0002D22r2_s_at	-0.39	-7.58	0.19	0.86	LOC_Os04g44610.1	0.0	protein white-brown complex homolog protein 11
Contig2314_at	0.53	-7.99	-0.32	0.24	LOC_Os02g03330.1	2,00E-99	protein expressed protein
Contig10147_s_at	-1.49	-6.26	1.41	1.92	LOC_Os03g56270.2	0.0	protein receptor protein kinase CLAVATA1 precursor
Contig6218_at	1.97	-8.63	-0.98	0.74	LOC_Os08g42040.2	1,00E-60	protein LTP180 - Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein precursor
Contig18518_at	-0.65	-6.95	0.71	2.84	LOC_Os07g48910.1	8,00E-22	protein retrotransposon protein, putative, unclassified
S000200079C09F1_s_at	0.04	-7.77	-0.12	0.40	LOC_Os06g02370.1	0.0	protein expressed protein
Contig10393_at	-0.27	-7.33	0.24	0.87	LOC_Os03g43420.1	1,00E-128	protein single-stranded DNA-binding protein
Contig5655_at	0.05	-7.55	-0.07	0.24	LOC_Os04g31700.1	1,00E-156	protein methylisocitrate lyase 2
Contig15302_at	0.09	-7.18	0.29	-0.13	LOC_Os04g39100.1	1,00E-152	protein peroxidase precursor
Contig19970_at	-7.08	-4.47	2.97	3.14	LOC_Os05g02630.1	3,00E-33	protein lysine-rich arabinogalactan protein 19 precursor
Contig8986_at	-0.83	-6.43	0.85	1.44	LOC_Os10g42230.2	1,00E-111	protein AT hook motif domain containing protein
Contig8226_at	0.55	-7.73	-0.66	0.43	LOC_Os03g10030.1	3,00E-95	protein membrane associated DUF588 domain containing protein
Contig14436_at	-0.15	-6.89	0.15	0.09	LOC_Os12g40750.1	1,00E-51	protein pectinesterase inhibitor domain containing protein, putative
Contig12158_at	-1.26	-5.71	1.33	2.31	LOC_Os09g24820.1	2,00E-54	protein ZF-HD protein dimerisation region containing protein
Contig7824_at	-0.37	-6.54	0.47	1.49	LOC_Os12g05040.1	1,00E-116	protein heavy-metal-associated domain-containing protein
EBma04_SQ002_G23_at	-2.38	-2.07	4.94	2.08			
Contig19853_at	-1.59	-5.33	1.67	1.62	LOC_Os07g32590.1	9,00E-53	protein peptidase, M24 family protein
Contig19336_at	-2.44	-2.28	4.64	2.45			
Contig9763_s_at	-0.31	-6.57	0.34	0.29	LOC_Os07g33660.1	2,00E-65	protein expressed protein
Contig10096_at	-1.62	-5.63	1.27	1.85	LOC_Os03g02300.1	8,00E-25	protein expressed protein
Contig23344_at	-1.44	-5.12	1.78	1.40	LOC_Os10g32540.1	6,00E-52	protein SAP domain containing protein
HVSMEd0015C10r2_at	-1.50	-4.20	2.70	1.45	LOC_Os01g59350.1	8,00E-60	protein transcription factor
Contig8459_at	-1.47	-5.85	1.02	1.42	LOC_Os01g32770.1	6,00E-82	protein DUF260 domain containing protein
Contig3258_at	-0.04	-6.72	0.13	1.06			
Contig12953_at	-1.56	-5.31	1.50	1.65	LOC_Os12g37370.1	5,00E-65	protein DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB9
Contig18852_at	0.49	-7.03	-0.23	0.23	LOC_Os05g48150.1	8,00E-23	protein transposon protein, putative, unclassified
HU12N23u_s_at	-6.36	-3.56	3.22	3.28	LOC_Os07g41340.1	3,00E-36	protein B12D protein
Contig5255_at	1.11	-7.00	-0.24	0.27	LOC_Os03g07570.4	0.0	protein aminotransferase
Contig8508_at	-0.07	-6.67	0.08	0.10	LOC_Os03g21370.1	3,00E-86	protein expressed protein
EBem05_SQ004_K20_at	-0.99	-5.77	0.96	1.11	LOC_Os10g42280.1	9,00E-90	protein cyclase/dehydrase family protein
Contig17992_at	-1.18	-5.88	0.84	1.66	LOC_Os06g38970.1	0.0	protein expressed protein
Contig4278_at	-3.05	-4.37	2.24	2.50	LOC_Os08g25720.1	0.0	protein pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha
Contig12587_at	-0.83	-5.80	0.77	0.72	LOC_Os03g01830.1	2,00E-74	protein DEAD-box ATP-dependent RNA helicase
Contig16702_s_at	-2.41	-3.78	2.76	2.27	LOC_Os06g51110.2	2,00E-38	protein cyclin
Contig12278_at	-2.89	-2.64	3.84	2.70			
Contig9418_at	-0.14	-6.19	0.29	0.48	LOC_Os01g41550.1	0.0	protein aspartic proteinase
Contig21321_at	-2.20	-2.99	3.47	1.57	LOC_Os02g08310.1	1,00E-55	protein tubby
Contig8293_at	-2.81	-3.61	2.85	2.81	LOC_Os03g58890.2	1,00E-145	protein oxidoreductase
Contig2500_at	-0.68	-5.94	0.50	2.04	LOC_Os05g08570.2	1,00E-81	protein OslAA15 - Auxin-responsive Aux/IAA gene family member
Contig9438_s_at	-0.37	-6.13	0.30	0.48	LOC_Os07g09140.1	1,00E-86	protein expressed protein
Contig1878_at	0.75	-7.15	-0.71	0.72	LOC_Os03g41438.1	1,00E-169	protein serpin domain containing protein
rbags17d18_s_at	-2.47	-3.66	2.77	2.28	LOC_Os07g31430.1	1,00E-56	protein phosphate-induced protein 1 conserved region domain

Probe Set	Odi	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
Contig20059_at	-2,92	-2,62	3,81	2,47	LOC_Os02g09620.1	1,00E-162	protein GDSL-like lipase/acylhydrolase
Contig13687_at	-2,27	-3,76	2,66	1,62	LOC_Os02g07180.1	1,00E-109	protein expressed protein
EBed01_SQ003_C19_at	-2,72	-2,63	3,76	2,77	LOC_Os10g20540.1	1,00E-07	protein DEFL69 - Defensin and Defensin-like DEFL family
HA28J12r_s_at	-0,20	-6,08	0,31	0,24	LOC_Os02g04460.1	1,00E-127	protein ribosomal protein L3
Contig9841_at	0,64	-6,44	-0,05	0,06	LOC_Os04g56740.1	0.0	protein IQ calmodulin-binding motif family protein
Contig24718_at	-2,98	-2,66	3,71	2,72			
Contig8978_at	0,53	-6,58	-0,21	0,14	LOC_Os05g28200.1	0.0	protein prenyltransferase
Contig10583_at	-2,40	-2,21	4,16	2,24	LOC_Os08g04740.1	9,00E-18	protein expressed protein
Contig7834_at	-0,77	-5,66	0,70	0,76	LOC_Os07g06450.1	1,00E-120	protein RNA recognition motif containing protein
Contig12817_at	-0,44	-6,01	0,34	1,50	LOC_Os05g06990.1	0.0	protein TKL_IRAK_CrRLK1L-1.10
HVSMeg0001123r2_at	-2,72	-3,02	3,31	2,50			
HVSMEm0012J09r2_at	-1,76	-4,71	1,62	1,26	LOC_Os10g34350.1	0.0	protein aminotransferase, classes I and II, domain containing protein
HVSMEl0002P14r2_s_at	-2,23	-4,32	2,00	2,38	LOC_Os02g58120.1	1,00E-126	protein oxidoreductase/ transition metal ion binding protein
Contig9436_at	0,24	-6,11	0,20	-0,17	LOC_Os09g10760.1	2,00E-93	protein RNA recognition motif containing protein
Contig10148_at	-1,90	-4,42	1,88	2,45	LOC_Os03g56270.2	0.0	protein receptor protein kinase CLAVATA1 precursor
Contig10481_at	2,64	-6,91	-0,61	0,68	LOC_Os01g59870.1	6,00E-60	protein LTPL65 - Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein precursor
Contig24931_at	-2,15	-4,07	2,23	2,45	LOC_Os02g06910.1	7,00E-84	protein auxin response factor 6
Contig15471_at	-0,58	-5,78	0,50	1,86	LOC_Os06g49100.1	1,00E-64	protein retrotransposon protein, putative, unclassified
HVSMEm0015M15r2_s_at	1,72	-6,97	-0,69	0,24	LOC_Os02g41630.2	0.0	protein phenylalanine ammonia-lyase
Contig9255_at	-1,32	-4,99	1,28	1,85	LOC_Os01g16146.1	1,00E-122	protein phenazine biosynthesis protein
Contig7396_at	-0,67	-5,62	0,64	0,89	LOC_Os04g44920.1	3,00E-97	protein oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family domain
Contig1510_s_at	-0,50	-5,71	0,55	0,48	LOC_Os03g01530.1	0.0	protein tubulin/FtsZ domain containing protein
HY02C22u_x_at	-0,40	-5,99	0,25	0,37			
Contig20713_at	0,57	-6,02	0,22	-0,17	LOC_Os01g33160.1	9,00E-37	protein stress responsive A/B Barrel domain containing protein
Contig13384_at	-2,62	-3,79	2,44	2,14	LOC_Os08g04400.1	1,00E-162	protein pentatricopeptide repeat domain containing protein
Contig16579_at	-2,97	-2,87	3,34	2,73	LOC_Os02g19990.2	1,00E-104	protein reticulon domain containing protein
Contig13508_at	0,81	-6,26	-0,04	0,10	LOC_Os11g48070.1	1,00E-131	protein GDSL-like lipase/acylhydrolase
Contig7509_at	-0,76	-5,24	0,96	0,65	LOC_Os08g04450.3	1,00E-103	protein DAG protein, chloroplast precursor
Contig6132_at	0,71	-6,45	-0,27	0,19	LOC_Os02g13560.4	0.0	protein transporter family protein
Contig5526_s_at	0,07	-5,96	0,21	-0,07	LOC_Os03g49710.1	1,00E-85	protein ribosomal protein S13p/S18e
Contig26354_at	-0,90	-5,21	0,94	0,77	LOC_Os02g10650.2	8,00E-09	protein CRAL/TRIO domain containing protein
Contig10648_at	-0,06	-5,65	0,50	0,99	LOC_Os05g34320.2	0.0	protein beta-hexosaminidase precursor
Contig7469_at	-2,77	-3,34	2,81	2,32	LOC_Os08g04740.1	8,00E-13	protein expressed protein
HF11019r_at	1,67	-6,37	-0,22	2,20	LOC_Os06g12280.1	2,00E-41	protein glycosyl transferase 8 domain containing protein
Contig8125_at	0,78	-6,03	0,11	-0,07	LOC_Os01g47330.1	7,00E-69	protein ribosomal protein L7/L12 C-terminal domain containing protein
Contig13602_at	-0,29	-5,54	0,58	0,33	LOC_Os12g43590.1	1,00E-148	protein FAD dependent oxidoreductase domain containing protein
HX02O04u_at	-3,08	-3,10	3,02	3,07	LOC_Os09g37040.1	5,00E-17	protein DUF630/DUF632 domains containing protein
rbags22m24_s_at	0,65	-6,24	-0,12	0,11	LOC_Os04g45720.1	0.0	protein aldehyde dehydrogenase
Contig6715_at	3,01	-7,18	-1,07	0,84	LOC_Os01g63580.1	0.0	protein glycerol-3-phosphate acyltransferase
Contig2766_s_at	3,06	-6,12	-0,01	0,08	LOC_Os10g35370.2	2,00E-96	protein oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family domain
Contig10154_at	-0,05	-6,07	0,03	0,01	LOC_Os01g71280.1	1,00E-157	protein glycerol-3-phosphate dehydrogenase
Contig20744_at	-3,01	-2,78	3,31	2,91	LOC_Os12g05380.1	2,00E-47	protein glycosyltransferase
Contig11896_at	0,14	-6,17	-0,09	0,74	LOC_Os06g20370.1	3,00E-60	protein microtubule associated protein
Contig10901_at	-0,64	-5,48	0,58	0,84	LOC_Os08g41340.1	1,00E-110	protein ras-related protein
HVSMEc0015B20r2_at	-0,62	-5,46	0,59	0,88	LOC_Os04g57360.1	6,00E-07	protein expressed protein
Contig5645_at	1,38	-6,52	-0,48	0,38	LOC_Os01g07250.1	1,00E-84	protein saposin-like type B, region 1 family protein
EBees01_SQ004_K24_at	-2,01	-1,89	4,15	2,12			
Contig10822_at	-0,81	-5,17	0,86	0,72	LOC_Os03g45400.1	8,00E-82	protein antitermination NusB domain-containing protein
Contig12924_at	-5,89	-2,85	3,15	3,14			
Contig7279_at	0,12	-5,07	0,92	-0,07	LOC_Os01g32730.1	1,00E-122	protein tetratricopeptide repeat containing protein
HY06D12u_s_at	1,12	-5,97	0,00	0,04	LOC_Os05g49430.1	1,00E-150	protein aldose 1-epimerase
Contig24809_at	-2,72	-2,02	3,94	2,03	LOC_Os01g03410.1	1,00E-20	protein ubiquitin, putative
Contig20404_at	-0,33	-5,71	0,25	2,28	LOC_Os08g44000.1	3,00E-48	protein uncharacterized protein ycf39
Contig14569_at	-0,17	-5,61	0,35	0,21	LOC_Os07g38930.5	0.0	protein glucan endo-1,3-beta-glucosidase precursor
Contig4330_at	-2,46	-4,04	1,91	2,25	LOC_Os03g19270.3	6,00E-68	protein universal stress protein domain containing protein
Contig11335_s_at	0,19	-6,05	-0,11	0,25	LOC_Os08g16130.1	4,00E-92	protein fiber protein Fb34
Contig20523_at	-0,23	-5,53	0,41	0,42	LOC_Os01g04160.1	4,00E-37	protein expressed protein
Contig4497_at	-0,62	-5,30	0,63	0,56	LOC_Os06g04530.1	1,00E-154	protein OsCip9 - Putative Cip protease homologue
HY05O16u_s_at	0,12	-6,03	-0,10	0,03	LOC_Os10g39440.1	0.0	protein transporter family protein
Contig19976_at	0,11	-5,66	0,25	-0,05	LOC_Os04g58750.4	1,00E-93	protein protein kinase family protein
Contig2265_at	0,02	-5,97	-0,05	0,91	LOC_Os09g19930.1	0.0	protein HOTHREAD precursor
Contig21684_at	0,19	-5,91	0,00	0,21	LOC_Os04g53950.2	1,00E-165	protein glycosyl hydrolases family 16 protein, protein
Contig12845_at	0,05	-5,77	0,13	0,05	LOC_Os04g57610.3	1,00E-119	protein auxin response factor
Contig14263_at	-0,44	-5,46	0,44	0,75	LOC_Os07g41850.1	6,00E-20	protein C1-like domain containing protein
Contig5240_at	0,05	-5,60	0,29	0,00	LOC_Os02g04460.1	1,00E-127	protein ribosomal protein L3
Contig10761_at	0,58	-6,20	-0,30	0,36	LOC_Os03g16010.1	0.0	protein BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-associated receptor kinase 1
Contig16747_at	-0,21	-5,60	0,30	0,32	LOC_Os07g30810.1	1,00E-73	protein nucleobase-ascorbate transporter
Contig1247_at	0,62	-5,75	0,14	-0,12	LOC_Os03g21040.2	0.0	protein stress responsive protein
Contig13773_at	-1,29	-4,94	0,94	1,57	LOC_Os01g67180.1	2,00E-17	protein ribonuclease T2 family domain containing protein
Contig6864_at	2,16	-6,75	-0,88	0,80	LOC_Os04g47250.1	4,00E-60	protein cytochrome P450

Probe Set	Odi	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
Contig4380_s_at	0,00	-5,78	0,09	-0,01	LOC_Os05g01110.1	4,00E-53	protein ribosomal protein L28 protein
Contig20443_at	0,40	-6,13	-0,26	0,43	LOC_Os10g21910.1	0,0	protein acetyl-CoA carboxylase
Contig25611_at	-1,55	-4,23	1,64	1,51	LOC_Os08g09270.1	2,00E-70	protein pentatricopeptide
Contig1225_s_at	5,32	-5,60	0,26	-0,14	LOC_Os02g44630.2	1,00E-158	protein aquaporin protein
Contig19923_at	-1,79	-3,72	2,14	1,46	LOC_Os10g42660.1	1,00E-28	protein expressed protein
Contig3515_x_at	-1,76	-4,25	1,60	2,41	LOC_Os04g54280.1	9,00E-36	protein retrotransposon protein, putative, Ty1-copia subclass
Contig19292_at	-0,25	-5,47	0,37	0,32	LOC_Os05g26890.1	1,00E-170	protein G-protein alpha subunit
Contig6333_at	0,00	-5,65	0,20	0,00	LOC_Os03g04260.1	1,00E-110	protein glutathione S-transferase
Contig10224_at	-0,63	-5,16	0,68	0,78	LOC_Os05g04180.1	1,00E-131	protein agenet domain containing protein
Contig3135_at	0,57	-6,45	-0,62	0,63	LOC_Os03g49990.1	0,0	protein GRAS family transcription factor domain containing protein
Contig20306_at	-0,89	-5,04	0,79	1,40	LOC_Os03g18970.1	8,00E-65	protein protein phosphatase protein
HK06118r_at	0,41	-5,72	0,07	0,00	LOC_Os09g12720.2	7,00E-33	protein zinc finger, C3HC4 type domain containing protein
Contig18643_at	-0,32	-5,01	0,78	0,41	LOC_Os02g20490.1	9,00E-99	protein expressed protein
Contig15125_at	0,86	-6,25	-0,47	0,30	LOC_Os02g57250.1	1,00E-88	protein OsIAA10 - Auxin-responsive Aux/IAA gene family member
Contig15719_at	-0,01	-5,65	0,13	1,09	LOC_Os09g25090.1	6,00E-77	protein CAMK_KIN1/SNF1/Nim1_like.34
Contig8664_at	1,18	-6,20	-0,42	0,31	LOC_Os09g12750.1	1,00E-117	protein Myb-like DNA-binding domain containing protein
Contig15872_at	-0,23	-5,45	0,33	1,03	LOC_Os03g11890.1	8,00E-10	protein potyvirus VPg interacting protein
Contig2941_at	1,33	-5,59	0,18	-0,10	LOC_Os02g43600.1	2,00E-89	protein 50S ribosomal protein L19, chloroplast precursor
Contig5734_at	0,51	-5,79	-0,02	0,02	LOC_Os03g50270.1	2,00E-74	protein expressed protein
Contig14405_at	-1,57	-3,04	2,73	1,54	LOC_Os04g41110.1	1,00E-77	protein Rad21 / Rec8 like protein
EBem05_SQ002_D05_s_at	-2,75	-2,87	2,90	3,83	LOC_Os06g51060.1	1,00E-152	protein CHIT8 - Chitinase family protein precursor
Contig7097_s_at	1,48	-5,37	0,39	-0,02	LOC_Os12g44020.1	0,0	protein Ser/Thr protein phosphatase family protein
Contig14899_at	0,99	-5,84	-0,10	0,02	LOC_Os10g37850.1	0,0	protein armadillo
Contig2347_at	2,81	-6,06	-0,32	0,28	LOC_Os03g49600.2	0,0	protein Os3bglu7 - beta-glucosidase, exo-beta-glucanase
HW09L19u_at	-1,18	-3,49	2,24	1,15	LOC_Os07g05470.1	2,00E-80	protein AIR9 protein
HY08K16V_s_at	-2,56	-2,61	3,11	2,49			
HZ50B12r_s_at	-0,27	-5,27	0,45	0,94	LOC_Os04g32650.1	0,0	protein tRNA synthetase class II core domain containing protein
Contig4852_at	0,16	-5,90	-0,18	1,09	LOC_Os07g39620.2	0,0	protein C2 domain containing protein
HA26C03r_at	-2,90	-2,45	3,27	2,96	LOC_Os03g59440.1	7,00E-33	protein dirigent
Contig19193_at	0,80	-5,63	0,08	-0,07	LOC_Os02g50320.1	2,00E-88	protein ATMAP70 protein
HB24E05r_s_at	-1,13	-4,97	0,73	0,70	LOC_Os03g07590.1	3,00E-11	protein hypothetical protein
Contig13424_at	-2,20	-3,33	2,38	2,18	LOC_Os03g50420.1	1,00E-124	protein expressed protein
Contig12961_at	-0,76	-5,02	0,68	0,87	LOC_Os08g14770.1	1,00E-139	protein aminotransferase
Contig20128_at	0,13	-5,41	0,28	-0,01	LOC_Os09g39220.1	5,00E-88	protein delta14-sterol reductase
Contig12168_at	-0,23	-5,50	0,19	0,58	LOC_Os02g26370.1	1,00E-73	protein wiskott-Aldrich syndrome protein family member 2
Contig10869_s_at	-0,84	-4,66	1,02	0,51	LOC_Os05g05480.2	2,00E-73	protein OsDegp6 - Putative Deg protease homologue
Contig19701_at	-1,46	-4,78	0,90	1,08	LOC_Os01g32770.1	2,00E-14	protein DUF260 domain containing protein
Contig11697_at	-1,22	-4,46	1,23	1,21	LOC_Os07g11280.2	1,00E-172	protein pentatricopeptide containing protein
Contig17318_at	-7,40	-2,27	3,42	1,92	LOC_Os04g38550.1	3,00E-13	protein expressed protein
Contig8817_at	0,99	-5,88	-0,20	0,29	LOC_Os06g50370.1	1,00E-110	protein zinc finger, C3HC4 type, domain containing protein
HVSMEb0005M02r2_at	-2,87	-2,86	2,82	3,48			
Contig7403_s_at	-1,32	-4,12	1,54	2,22	LOC_Os01g47430.2	1,00E-130	protein protein of unknown function DUF1296 domain containing protein
Contig7283_at	-1,64	-3,72	1,94	1,26	LOC_Os01g59120.1	1,00E-169	protein cyclin
Contig14056_at	-0,51	-4,88	0,76	0,52	LOC_Os01g43580.1	0,0	protein kinesin motor domain containing protein
Contig14397_at	-1,61	-4,01	1,62	2,19	LOC_Os06g35630.1	2,00E-65	protein reticuline oxidase-like protein precursor
Contig11308_at	3,09	-6,61	-0,98	0,86	LOC_Os11g35400.3	1,00E-135	protein AMP-binding enzyme
Contig13277_at	-2,49	-3,19	2,44	2,59	LOC_Os12g01950.1	2,00E-66	protein expressed protein
Contig12579_at	-0,18	-5,01	0,61	0,16	LOC_Os09g24670.1	1,00E-159	protein CAAX amino terminal protease family protein
Contig7969_at	0,18	-5,71	-0,09	0,11	LOC_Os03g21080.1	0,0	protein guanine nucleotide exchange factor
Contig19521_at	-1,75	-3,25	2,37	1,80	LOC_Os05g33460.2	2,00E-94	protein mTERF domain containing protein
HI04I05u_at	-1,73	-3,44	2,18	1,72	LOC_Os12g17530.1	1,00E-13	protein expressed protein
Contig5253_at	-1,93	-3,56	2,04	2,34	LOC_Os06g45440.2	1,00E-132	protein haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 3
Contig16172_at	-1,08	-4,58	1,02	1,02	LOC_Os07g07310.1	1,00E-11	protein polynucleotide phosphorylase
HVSM Ea0012C22f_at	-2,18	-3,26	2,34	2,17	LOC_Os04g44320.1	1,00E-147	protein transposon protein, putative, unclassified
Contig21348_at	-2,60	-2,68	2,91	2,45			
Contig7016_s_at	0,94	-6,34	-0,75	1,27	LOC_Os09g31000.1	3,00E-62	protein EF hand family protein
Contig2747_s_at	0,91	-5,88	-0,29	0,26	LOC_Os01g67054.1	0,0	protein calreticulin precursor protein
Contig26322_at	0,00	-5,49	0,10	0,92	LOC_Os03g35920.1	3,00E-62	protein expressed protein
HK06N02r_at	-2,32	-2,02	3,55	2,20	LOC_Os03g61150.2	2,00E-08	protein expressed protein
Contig4869_s_at	-2,53	-1,99	3,58	1,98	LOC_Os11g32070.1	2,00E-23	protein conserved hypothetical protein
Contig17131_at	0,00	-5,61	-0,04	0,63	LOC_Os01g68540.1	1,00E-42	protein rho GDP-dissociation inhibitor 1
Contig12350_at	-2,49	-2,04	3,53	1,98			
Contig16920_at	0,49	-5,63	-0,07	0,01	LOC_Os01g47200.1	1,00E-120	protein retrotransposon protein, putative, unclassified
S000020005D09F1_s_at	-0,61	-4,45	1,10	0,56	LOC_Os03g43510.1	0,0	protein expressed protein
Contig8958_at	-0,09	-5,28	0,28	0,22	LOC_Os10g38710.1	6,00E-79	protein glutathione S-transferase
HVSM E0022L04r2_s_at	0,73	-5,82	-0,27	0,27	LOC_Os03g12360.2	0,0	protein trehalose-6-phosphate synthase
Contig3134_s_at	0,39	-5,81	-0,27	0,25	LOC_Os06g02420.1	3,00E-31	protein ATOZ1
HVSM E0023D17f_s_at	0,48	-5,35	0,18	-0,26	LOC_Os04g41810.1	1,00E-148	protein expressed protein
Contig1247_s_at	0,25	-5,41	0,11	-0,15	LOC_Os03g21040.2	0,0	protein stress responsive protein
Contig5775_at	0,16	-5,39	0,13	-0,10	LOC_Os03g03360.1	1,00E-129	protein ribosomal protein L5

Probe Set	0di	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
HU13M08u_at	-2,58	-2,52	2,99	3,67			
Contig17155_at	-0,87	-4,41	1,10	0,89	LOC_Os12g02380.1	1,00E-106	protein elongation factor P
Contig16504_at	-0,80	-4,72	0,78	1,06	LOC_Os12g01360.1	1,00E-152	protein expressed protein
Contig322_at	1,75	-5,57	-0,07	0,15	LOC_Os01g13030.2	1,00E-107	protein OsIAA3 - Auxin-responsive Aux/IAA gene family member
Contig14133_at	-1,26	-4,39	1,10	1,25	LOC_Os03g12140.3	1,00E-145	protein glucan endo-1,3-beta-glucosidase precursor
Contig2737_at	-0,72	-4,35	1,14	2,88	LOC_Os09g33680.1	0,0	protein Os9bglu31
Contig12536_at	0,26	-5,40	0,07	-0,05	LOC_Os01g42870.1	0,0	protein transferase family protein
Contig20686_at	-0,89	-4,74	0,72	1,11	LOC_Os07g01710.1	6,00E-20	protein phytoulokine receptor precursor
HVSMEa0009F12r2_s_at	-2,87	-2,67	2,77	2,72	LOC_Os08g25720.1	0,0	protein pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase
Contig10209_at	0,22	-5,79	-0,34	0,48	LOC_Os12g32992.1	2,00E-68	protein expressed protein
Contig5679_at	-0,32	-5,09	0,36	0,49	LOC_Os07g33110.4	0,0	protein CAMK_CAMK_like.33 - CAMK includes calcium/calmodulin depeudent
Contig24078_at	-2,49	-3,10	2,34	2,35	LOC_Os06g49930.3	4,00E-11	protein OsFBX207 - F-box domain containing protein
Contig14490_at	-2,36	-3,02	2,42	2,16	LOC_Os03g58540.1	0,0	protein spoB-associated GTP-binding protein
EBro08_SQ003_A06_at	0,32	-4,22	1,22	-0,12	LOC_Os01g01450.2	1,00E-28	protein stress responsive protein
Contig15381_at	-1,12	-4,22	1,21	1,11	LOC_Os03g15690.1	1,00E-148	protein phosphate carrier protein, mitochondrial precursor
Contig14748_at	-0,35	-5,14	0,28	0,44	LOC_Os10g38080.1	2,00E-83	protein OsSub61 - Putative Subtilisin homologue
Contig10978_at	-0,44	-4,96	0,46	1,17	LOC_Os04g52100.1	1,00E-161	protein peptidase, M24 family protein
Contig11326_at	0,19	-5,49	-0,07	0,28	LOC_Os10g21910.2	1,00E-114	protein acetyl-CoA carboxylase
Contig18750_at	-4,23	-2,37	3,05	2,23	LOC_Os04g34970.1	3,00E-47	protein AP2 domain containing protein
HA31N01r_at	-2,82	-2,55	2,86	3,87	LOC_Os12g09465.1	6,00E-09	protein hypothetical protein
Contig8535_s_at	0,05	-5,59	-0,18	1,38	LOC_Os02g30600.1	6,00E-27	protein conserved hypothetical protein
Contig16389_at	-2,76	-2,64	2,76	2,81	LOC_Os06g26234.3	3,00E-95	protein 1,4-alpha-glucan-branching enzyme
Contig96_s_at	-1,60	-3,86	1,54	1,40	LOC_Os03g17100.1	8,00E-63	protein Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein
Contig12060_at	-1,52	-3,68	1,71	4,20	LOC_Os03g51970.1	1,00E-171	protein growth-regulating factor
Contig14222_at	-1,87	-3,18	2,22	1,89	LOC_Os03g44890.1	2,00E-93	protein anthranilate phosphoribosyltransferase
Contig9681_at	2,61	-6,10	-0,71	0,64	LOC_Os10g42870.1	0,0	protein peptide transporter PTR2
rbags36a18_s_at	-0,49	-4,72	0,67	0,23	LOC_Os12g17910.1	0,0	protein T-complex protein
Contig5376_at	0,93	-5,39	0,00	0,00	LOC_Os04g45720.1	0,0	protein aldehyde dehydrogenase
Contig11229_at	-0,22	-4,54	0,85	0,12	LOC_Os07g01820.2	1,00E-119	protein OsMADS15 - MADS-box family gene with MIKCC type-box
Contig9094_at	0,36	-5,66	-0,29	0,92	LOC_Os01g62260.1	1,00E-124	protein thaumatin
Contig4240_s_at	2,53	-5,59	-0,23	0,23	LOC_Os03g62620.4	1,00E-149	protein late embryogenesis abundant protein
Contig12144_at	0,05	-4,84	0,52	-0,08			
Contig11034_at	-0,69	-4,44	0,91	0,66	LOC_Os10g31820.1	1,00E-141	protein fluG
Contig7681_s_at	3,48	-6,20	-0,85	0,87	LOC_Os01g66110.2	0,0	protein methyltransferase
Contig10850_at	-0,20	-5,07	0,27	0,22	LOC_Os01g37130.2	0,0	protein protein phosphatase 2C
Contig1335_at	-3,59	-2,50	2,84	2,34			
rbah36c02_s_at	-0,81	-4,46	0,88	1,63	LOC_Os05g32110.3	7,00E-82	protein COBRA
HA20L20r_at	-2,66	-2,34	3,00	3,78	LOC_Os11g34990.1	3,00E-11	protein DEFL79 - Defensin and Defensin-like DEFL family
Contig4873_s_at	0,22	-5,25	0,09	-0,02	LOC_Os03g63950.1	1,00E-100	protein plastid-specific 30S ribosomal protein 1, chloroplast precursor
Contig9457_at	-2,59	-3,28	2,05	2,67	LOC_Os10g39770.1	1,00E-100	protein zinc finger, C3HC4 type, domain containing protein
HVSMEa0004I10f2_s_at	0,87	-5,68	-0,35	0,25	LOC_Os02g13560.4	0,0	protein transporter family protein
Contig17136_at	2,93	-5,82	-0,50	0,44	LOC_Os01g08260.2	2,00E-57	protein pleiotropic drug resistance protein 4
HO04F17S_at	-0,55	-4,04	1,27	0,45	LOC_Os12g28750.1	3,00E-19	protein TPD1
Contig9343_s_at	0,35	-5,62	-0,31	0,24	LOC_Os05g48590.1	1,00E-102	protein OsIAA19 - Auxin-responsive Aux/IAA gene family member
rbags1k09_s_at	-0,29	-4,50	0,80	0,41	LOC_Os08g39420.2	1,00E-149	protein uncharacterized protein yeiN
Contig2348_s_at	2,78	-5,60	-0,31	0,18	LOC_Os03g49600.2	0,0	protein Os3bglu7 - beta-glucosidase, exo-beta-glucanase
Contig17319_at	-0,47	-4,81	0,48	0,99	LOC_Os01g31110.1	3,00E-41	protein CRS2-associated factor 1, chloroplast precursor
EBes01_SQ002_E05_at	0,04	-5,28	0,00	0,09			
HF14N13r_at	-0,91	-4,24	1,04	0,91			
Contig14528_at	-0,91	-4,24	1,02	1,11			
Contig4958_at	-1,69	-3,21	2,05	1,26	LOC_Os05g41390.1	2,00E-79	protein cyclin
HV06O09u_at	-2,51	-2,60	2,66	3,30	LOC_Os05g41400.1	4,00E-44	protein indole-3-acetate beta-glucosyltransferase
Contig99579_at	2,64	-5,69	-0,43	0,40	LOC_Os03g54084.1	0,0	protein phytochrome C
Contig13722_at	0,29	-5,35	-0,11	0,75	LOC_Os03g14900.1	2,00E-70	protein NB-ARC/LRR disease resistance protein
Contig9157_at	-0,25	-4,43	0,81	0,37	LOC_Os08g39420.2	1,00E-149	protein uncharacterized protein yeiN
Contig2747_x_at	1,00	-5,61	-0,37	0,39	LOC_Os01g67054.1	0,0	protein calreticulin precursor protein
Contig15559_at	-0,73	-4,47	0,76	1,40	LOC_Os01g65380.1	2,00E-77	protein patellin protein
Contig10471_at	-1,40	-3,67	1,55	1,28	LOC_Os11g02480.2	7,00E-89	protein OsWRKY46 - Superfamily of TFs having WRKY and zinc finger domains
rbags36i03_s_at	0,20	-5,11	0,10	-0,10	LOC_Os03g21040.2	0,0	protein stress responsive protein
HA10F18u_at	-5,89	-2,29	2,93	2,25			
Contig7979_at	1,14	-5,89	-0,68	0,62	LOC_Os05g04610.1	0,0	protein ABC transporter, ATP-binding protein
Contig20612_at	0,20	-5,37	-0,16	0,60	LOC_Os01g60270.2	1,00E-107	protein homeobox domain containing protein
HA14H17r_at	-2,55	-2,35	2,85	2,42			
Contig6728_at	1,55	-5,23	-0,02	0,05	LOC_Os05g03140.1	1,00E-148	protein tetraspanin family protein
Contig15377_at	-0,63	-4,55	0,65	0,77	LOC_Os01g55340.1	8,00E-70	protein dof zinc finger domain containing protein
Contig7281_at	-0,20	-5,13	0,06	0,77	LOC_Os03g58480.1	1,00E-148	protein seed specific protein Bn15D14A
Contig15634_at	-2,30	-2,57	2,62	2,18	LOC_Os04g12980.1	1,00E-128	protein UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase
HVSMEg0016J19r2_s_at	2,67	-5,83	-0,65	0,70	LOC_Os09g28690.1	1,00E-167	protein gibberellin receptor GID1L2
Contig6321_at	0,32	-5,31	-0,13	0,16	LOC_Os08g04620.1	1,00E-110	protein MSP domain containing protein
Contig14290_at	2,60	-3,74	1,44	-1,52	LOC_Os01g39960.1	1,00E-143	protein lycopene epsilon cyclase, chloroplast precursor

Probe Set	Odi	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
Contig2873_s_at	4,70	-5,31	-0,14	0,06	LOC_Os10g40730.1	1,00E-142	protein expansin precursor
EBma03_SQ003_L08_at	2,53	-5,57	-0,39	0,35	LOC_Os08g06100.1	1,00E-128	protein O-methyltransferase
Contig19806_at	0,03	-4,62	0,54	-0,07	LOC_Os03g07310.2	1,00E-58	protein growth regulator related protein
Contig12768_at	2,01	-6,05	-0,88	0,82	LOC_Os09g02729.1	0,0	protein phospholipase C
Contig2975_s_at	-2,58	-1,98	3,18	1,64	LOC_Os01g27260.1	2,00E-79	protein glutathione S-transferase
Contig3132_at	0,81	-5,43	-0,27	0,30	LOC_Os06g02420.1	4,00E-31	protein ATOZ1
Contig7510_at	2,49	-5,37	-0,21	0,19	LOC_Os09g32320.1	1,00E-177	protein growth regulator related protein
Contig11408_at	1,04	-5,67	-0,53	0,58	LOC_Os04g52164.1	1,00E-178	protein transferase family protein
Contig11718_at	0,97	-5,94	-0,79	0,56	LOC_Os07g31840.1	1,00E-174	protein leucine-rich repeat family protein
EBem09_SQ004_B23_s_at	0,03	-5,19	-0,05	0,71	LOC_Os01g09620.2	1,00E-157	protein zinc finger/CCCH transcription factor
Contig9114_at	-1,50	-3,63	1,50	1,56	LOC_Os03g31510.1	2,00E-35	protein cysteine proteinase inhibitor 8 precursor
S0000700025G01F1_s_at	-5,31	-2,89	2,25	2,84	LOC_Os12g38140.1	2,00E-48	protein expressed protein
HVSMa0011H12r2_x_at	-0,50	-4,39	0,74	0,44			
Contig8533_s_at	-1,50	-3,11	2,03	1,33	LOC_Os03g07880.1	4,00E-95	protein nuclear transcription factor Y subunit
HVSMEn0015M01r2_s_at	1,46	-4,69	0,44	-0,13	LOC_Os08g44870.1	1,00E-151	protein MATE efflux family protein
Contig22762_at	-1,05	-4,14	0,98	0,98	LOC_Os05g37930.3	3,00E-15	protein expressed protein
Contig5573_at	-0,13	-4,69	0,43	0,12	LOC_Os03g24020.1	1,00E-118	protein ribosomal protein L6
Contig11988_at	0,18	-5,25	-0,14	0,37	LOC_Os01g04710.1	3,00E-78	protein aspartic proteinase
Contig16099_at	-2,07	-2,51	2,60	1,73	LOC_Os03g56700.1	9,00E-87	protein expressed protein
Contig9274_s_at	0,24	-4,63	0,48	-0,11	LOC_Os06g43900.1	4,00E-48	protein ribosomal protein L35
Contig8950_at	-1,12	-3,20	1,90	1,16	LOC_Os10g35980.1	1,00E-120	protein tetraspanin family protein
Contig14330_at	-0,78	-4,42	0,67	0,61	LOC_Os02g05890.1	6,00E-56	protein EMB1303
HU01E06w_at	-0,80	-4,31	0,78	1,26			
HY08H18V_at	-1,14	-4,00	1,09	2,00	LOC_Os06g04370.1	2,00E-23	protein expressed protein
Contig11129_at	3,24	-2,99	2,10	-1,81	LOC_Os07g42250.1	1,00E-148	protein strictosidine synthase
Contig18901_at	-0,85	-3,87	1,22	0,78	LOC_Os05g11990.1	4,00E-28	protein TTL1
rbasd15h01_s_at	0,57	-5,30	-0,23	0,06	LOC_Os06g02180.1	0,0	protein CSLD2 - cellulose synthase-like family D
Contig16632_at	0,27	-4,34	0,74	-0,24			
Contig5704_at	3,33	-5,83	-0,76	0,79	LOC_Os09g28690.1	1,00E-167	protein gibberellin receptor GID1L2
Contig17574_at	-0,99	-4,22	0,84	1,01	LOC_Os05g32680.1	1,00E-131	protein PAC
Contig12780_at	-0,54	-4,57	0,47	2,29			
Contig11181_at	-0,56	-4,37	0,67	0,54	LOC_Os01g01040.3	1,00E-178	protein expressed protein
Contig24054_at	-1,10	-3,62	1,41	1,13	LOC_Os08g05790.1	2,00E-89	protein coffeoyl-CoA O-methyltransferase
Contig6411_at	1,83	-5,09	-0,05	0,11	LOC_Os03g14170.1	0,0	protein 3-ketoacyl-CoA synthase
Contig5688_at	0,29	-5,05	-0,02	0,80	LOC_Os01g09620.2	1,00E-157	protein zinc finger/CCCH transcription factor
Contig19803_at	-0,32	-4,87	0,15	0,56	LOC_Os09g39690.1	1,00E-83	protein protein binding protein
Contig13240_s_at	-5,62	-2,53	2,49	3,02	LOC_Os01g27210.1	5,00E-81	protein glutathione S-transferase
Contig2080_at	3,68	-4,86	0,15	-0,13	LOC_Os07g32880.1	1,00E-171	protein ATP synthase gamma chain
Contig25699_at	1,86	-4,58	0,43	-0,43	LOC_Os09g23300.1	4,00E-56	protein integral membrane protein
Contig5087_at	-0,82	-4,17	0,84	1,48	LOC_Os05g51180.1	1,00E-116	protein hyaluronan/mRNA binding family domain containing protein
Contig406_at	-0,86	-3,85	1,16	1,43	LOC_Os08g38900.1	1,00E-112	protein coffeoyl-CoA O-methyltransferase
Contig3051_s_at	-1,10	-3,75	1,25	1,63	LOC_Os07g47620.1	3,00E-62	protein universal stress protein domain containing protein
HVSMeg0016M04r2_s_at	-0,24	-4,90	0,08	0,68	LOC_Os12g44150.2	0,0	protein plasma membrane ATPase
Contig14691_at	-2,49	-2,64	2,34	2,35	LOC_Os09g19850.1	3,00E-41	protein chloroplastic group IIA intron splicing facilitator CRS1
Contig26412_at	-1,73	-3,15	1,83	1,62	LOC_Os05g03120.3	9,00E-16	protein retrotransposon protein, putative, unclassified
Contig21477_at	-3,66	-2,31	2,67	1,99	LOC_Os01g08330.1	3,00E-62	protein aspartic proteinase nepenthesin-1 precursor, putative
Contig18015_at	-1,47	-3,14	1,83	1,40	LOC_Os11g34390.1	4,00E-71	protein glycosyltransferase
Contig20695_at	-1,88	-2,61	2,35	1,84	LOC_Os01g62070.1	2,00E-80	protein cation efflux family protein
AF109193_at	-5,80	-2,16	2,80	4,32	LOC_Os03g18530.1	3,00E-40	protein ECAGL1 - ECA1 gametogenesis related family protein precursor
Contig361_s_at	-1,80	-3,76	1,20	2,44	LOC_Os06g09450.8	0,0	protein sucrose synthase
Contig11249_at	1,69	-5,14	-0,18	0,20	LOC_Os05g33270.1	0,0	protein GDLS-like lipase/acylhydrolase
HU10109u_at	-0,58	-4,32	0,63	0,77	LOC_Os08g44760.2	9,00E-23	protein domain of unknown function DUF966 domain containing protein
Contig5564_s_at	-2,88	-2,20	2,76	2,77			
Contig3927_s_at	0,01	-4,96	-0,01	0,07	LOC_Os01g71300.1	1,00E-153	protein S-formylglutathione hydrolase
Contig8360_at	-0,28	-4,63	0,32	0,64	LOC_Os09g39680.1	0,0	protein transporter, major facilitator family
Contig14937_at	-1,96	-2,40	2,55	1,78	LOC_Os10g06710.1	1,00E-157	protein amidase
Contig16821_at	-0,78	-4,24	0,71	1,16	LOC_Os01g22640.1	4,00E-24	protein GDLS-like lipase/acylhydrolase
Contig10686_s_at	3,04	-4,29	0,65	-0,67	LOC_Os06g47600.1	1,00E-120	protein thaumatin family domain containing protein
Contig16971_at	0,10	-4,88	0,06	-0,05	LOC_Os08g34370.1	2,00E-15	protein SET domain containing protein
Contig11685_at	1,49	-4,63	0,31	-0,32	LOC_Os01g08320.1	3,00E-81	protein OsIAA1 - Auxin-responsive Aux/IAA gene family member
Contig13755_at	-2,27	-2,92	2,01	2,73	LOC_Os04g44910.1	0,0	protein receptor like protein kinase
HV04H12r_at	-0,84	-4,29	0,65	0,87	LOC_Os01g71770.1	2,00E-12	protein RNA recognition motif containing protein
Contig15271_at	-1,81	-2,83	2,10	1,81	LOC_Os02g50280.1	5,00E-99	protein pentatricopeptide
Contig6920_at	1,27	-4,09	0,83	-0,76	LOC_Os04g32920.5	0,0	protein potassium transporter
Contig13784_at	0,12	-5,07	-0,14	0,16	LOC_Os11g29700.2	1,00E-73	protein expressed protein
Contig4124_s_at	0,61	-6,07	-1,15	3,82	LOC_Os04g34170.3	1,00E-106	protein retrotransposon protein, putative, unclassified
Contig7327_at	3,97	-6,45	-1,53	1,17	LOC_Os03g60380.1	1,00E-159	protein cinnamoyl CoA reductase
Contig6938_at	-2,94	-2,34	2,58	2,75	LOC_Os07g41340.1	3,00E-36	protein B12D protein
Contig10724_at	1,02	-5,08	-0,16	0,08	LOC_Os10g35850.1	2,00E-82	protein cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain containing protein
rbal18p14_at	-2,99	-2,33	2,59	2,40	LOC_Os10g36848.1	2,00E-38	protein cytochrome P450

Probe Set	0di	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
Contig17794_at	-0,41	-4,49	0,42	0,58	LOC_Os10g38980.1	0,0	protein expressed protein
Contig14587_s_at	-2,04	-3,17	1,73	1,71	LOC_Os03g11310.1	1,00E-92	protein PPR repeat domain containing protein
Contig19088_at	-2,09	-3,08	1,82	1,37	LOC_Os04g52370.2	3,00E-08	protein UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase
Contig17769_at	-1,06	-3,45	1,45	1,14	LOC_Os01g49770.2	9,00E-49	protein zinc finger, C3HC4 type domain containing protein
Contig10274_at	-3,80	-2,44	2,46	3,02	LOC_Os09g39410.1	2,00E-89	protein male sterility protein
Contig24418_at	-2,90	-2,30	2,60	2,52	LOC_Os03g39650.1	9,00E-60	protein cytochrome P450
Contig16789_at	-1,88	-3,23	1,66	2,60	LOC_Os08g38330.1	5,00E-16	protein OsFBX297 - F-box domain containing protein
Contig14132_at	-2,08	-2,87	2,03	2,06	LOC_Os03g12140.3	1,00E-145	protein glucan endo-1,3-beta-glucosidase precursor
Contig11913_at	-0,95	-3,33	1,56	0,63	LOC_Os03g27590.1	0,0	protein OsSCP18 - Putative Serine Carboxypeptidase homologue
EBpi03_SQ003_J22_at	0,30	-5,51	-0,62	1,27	LOC_Os12g05420.1	0,0	protein calmodulin-binding protein
Contig8341_at	0,31	-4,88	0,00	0,82	LOC_Os03g50810.1	0,0	protein receptor protein kinase TMK1 precursor
Contig24571_at	-0,54	-4,09	0,79	0,44	LOC_Os04g13170.1	4,00E-45	protein OsFBD10 - F-box and FBD domain containing protein
Contig8282_at	-1,66	-3,51	1,37	1,46	LOC_Os05g35460.1	0,0	protein patellin protein
Contig22530_at	-2,50	-2,70	2,17	2,83	LOC_Os01g11460.1	6,00E-58	protein zinc finger, C3HC4 type domain containing protein
Contig5580_s_at	1,01	-4,76	0,11	-0,13	LOC_Os01g60230.4	0,0	protein auxin efflux carrier component
Contig6348_at	-0,10	-4,75	0,12	1,08	LOC_Os06g01500.3	6,00E-42	protein IQ calmodulin-binding motif family protein
Contig7055_at	1,30	-4,92	-0,06	0,13	LOC_Os02g51040.1	1,00E-135	protein expansin precursor
Contig16340_at	2,54	-4,76	0,10	-0,17	LOC_Os04g42340.1	7,00E-53	protein expressed protein
Contig8877_s_at	-0,57	-4,50	0,35	0,46	LOC_Os03g63110.1	1,00E-100	protein prefoldin
Contig10342_at	4,50	-6,10	-1,25	0,95	LOC_Os03g52300.1	5,00E-38	protein SCP-like extracellular protein
Contig12824_at	1,28	-5,52	-0,68	0,70	LOC_Os02g50860.1	1,00E-115	protein ras-related protein
HX01F12w_at	-2,33	-2,42	2,42	2,13	LOC_Os06g51110.2	2,00E-38	protein cyclin
Contig20673_at	1,05	-4,17	0,67	-0,62	LOC_Os10g33920.3	1,00E-163	protein transporter-related
HU09H07u_at	-2,31	-2,80	2,03	2,35			
Contig18520_at	-0,39	-4,47	0,37	0,98	LOC_Os02g49332.4	1,00E-91	protein CSLE2 - cellulose synthase-like family E
Contig391_at	-0,92	-3,65	1,18	0,81	LOC_Os05g49880.1	1,00E-167	protein lactate/malate dehydrogenase
HV12A17u_s_at	0,15	-4,83	-0,01	0,07	LOC_Os01g71300.1	1,00E-153	protein S-formylglutathione hydrolase
Contig9074_at	-0,62	-3,93	0,89	0,63	LOC_Os02g13100.1	1,00E-155	protein protein phosphatase 2C
Contig10306_at	-0,61	-4,10	0,72	0,49	LOC_Os05g27100.1	6,00E-48	protein expressed protein
Contig18590_at	-0,34	-4,55	0,26	0,63	LOC_Os06g08110.1	1,00E-134	protein nodulin
Contig11761_at	-1,12	-3,66	1,15	1,17	LOC_Os09g22450.1	0,0	protein lipase
HV_CEa0005A05r2_s_at	0,43	-4,85	-0,05	1,45	LOC_Os05g37520.1	1,00E-107	protein expressed protein
Contig24099_at	0,15	-4,84	-0,03	0,23	LOC_Os03g43670.1	2,00E-41	protein TKL_IRAK_CR4L.1 - The CR4L subfamily has homology with Crinkly4
HVSME0001J08r2_s_at	-1,35	-3,69	1,11	1,05	LOC_Os03g40670.1	1,00E-180	protein glycerophosphoryl diester phosphodiesterase family protein
Contig20916_at	-2,85	-2,35	2,45	3,56			
Contig21333_at	-2,13	-1,94	2,86	1,91	LOC_Os05g41390.1	6,00E-11	protein cyclin
Contig4335_at	2,22	-4,73	0,07	0,00	LOC_Os11g07670.1	5,00E-68	protein dirigent
Contig11023_at	2,01	-4,29	0,50	-0,57	LOC_Os03g48040.2	2,00E-15	protein 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain containing protein
Contig6346_at	-1,76	-3,26	1,54	0,87	LOC_Os01g55220.1	1,00E-12	protein hypothetical protein
Contig7047_at	0,10	-3,70	1,09	-0,09	LOC_Os07g18750.1	8,00E-33	protein LTPL42 - Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein precursor
Contig15532_at	1,99	-6,46	-1,67	1,27	LOC_Os05g49900.1	9,00E-80	protein 3-ketoacyl-CoA synthase
Contig16868_at	-2,29	-1,90	2,89	2,08	LOC_Os06g45920.1	3,00E-64	protein ZmEBE-1 protein, putative
Contig9216_at	0,31	-4,81	-0,03	0,08	LOC_Os03g41460.1	0,0	protein CAMK_CAMK_like.20 - CAMK includes calcium/calmodulin dependent
Contig16930_at	-0,74	-3,95	0,82	0,92	LOC_Os02g35560.1	7,00E-09	protein OsFBX53 - F-box domain containing protein
Contig12607_at	0,87	-5,12	-0,34	0,32	LOC_Os04g40930.1	6,00E-97	protein MYB family transcription factor
HVSMEg00151f5r2_at	0,83	-4,88	-0,11	0,16	LOC_Os10g35870.1	4,00E-12	protein cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain containing protein
HS06A14u_s_at	-1,92	-2,29	2,49	4,82	LOC_Os06g04950.1	7,00E-43	protein early nodulin 93 ENOD93 protein
Contig16954_at	-0,83	-3,50	1,28	0,83	LOC_Os01g20110.1	8,00E-61	protein expressed protein
Contig9589_at	-2,60	-2,67	2,10	2,05	LOC_Os03g36080.1	4,00E-86	protein expressed protein
Contig18426_at	0,87	-4,57	0,20	-0,16	LOC_Os07g46300.1	0,0	protein expressed protein
HW06H20u_at	-1,74	-1,97	2,79	1,36	LOC_Os02g06340.1	1,00E-91	protein EH domain-containing protein 1
HB32E08r_at	-1,25	-3,57	1,19	1,34	LOC_Os11g40610.5	1,00E-06	protein EARLY flowering protein
Contig8533_at	-1,12	-3,14	1,62	1,01	LOC_Os03g07880.1	4,00E-95	protein nuclear transcription factor Y subunit
Contig10067_s_at	-1,98	-2,99	1,75	3,93	LOC_Os02g32860.1	9,00E-84	protein poly synthetase 3
HVSMEg0007i24r2_at	-1,55	-2,85	1,89	1,50	LOC_Os01g70220.1	7,00E-94	protein histone-lysine N-methyltransferase
Contig19139_at	0,24	-5,06	-0,33	0,47	LOC_Os04g49610.1	4,00E-88	protein expressed protein
Contig14656_at	-1,64	-2,57	2,16	1,49	LOC_Os04g50960.1	2,00E-07	protein expressed protein
HVSME00017F07i2_at	-0,15	-4,29	0,44	0,14	LOC_Os04g31210.1	1,00E-63	protein bile acid sodium symporter family protein
Contig14510_at	-7,41	-2,85	1,88	2,76	LOC_Os08g02230.1	0,0	protein FAD-binding and arabino-lactone oxidase domains containing protein
Contig22128_at	-0,66	-4,06	0,67	0,66	LOC_Os10g38900.1	1,00E-67	protein erythronate-4-phosphate dehydrogenase
HA11J15u_s_at	-0,26	-4,41	0,31	1,08	LOC_Os06g07030.1	1,00E-60	protein AP2 domain containing protein
Contig15047_at	-1,54	-3,35	1,37	1,41	LOC_Os02g04810.1	1,00E-151	protein auxin response factor 5
Contig20267_at	1,49	-5,48	-0,76	0,46	LOC_Os12g04480.1	2,00E-43	protein cytochrome P450
HVSMEc0007N02r2_at	-0,69	-4,19	0,52	1,42	LOC_Os10g41030.3	3,00E-07	protein agenet domain containing protein
Contig6936_at	0,30	-4,63	0,08	-0,13	LOC_Os01g54540.1	1,00E-116	protein ribosomal protein L13
HVSMEc0011A03f_at	3,00	-5,63	-0,92	0,78			
Contig6063_s_at	-0,20	-4,33	0,35	0,05	LOC_Os05g49060.1	1,00E-132	protein uncharacterized protein ycf23
Contig18499_at	1,37	-4,57	0,11	-0,20	LOC_Os03g43430.1	7,00E-22	protein mttA/Hcf106 family protein
Contig12302_at	0,11	-4,81	-0,13	0,48	LOC_Os03g58790.1	1,00E-149	protein ATPase
Contig15142_at	-0,91	-3,66	1,02	2,09	LOC_Os01g42030.1	1,00E-165	protein mitochondrial chaperone BCS1

Probe Set	Odi	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
Contig12252_at	-0,80	-2,96	1,71	0,82	LOC_Os06g09420.1	1,00E-66	protein B3 DNA binding domain containing protein
Contig13808_at	-1,17	-3,69	0,98	1,36	LOC_Os08g23430.1	0.0	protein starch binding domain containing protein
HVSMEE0001C18f2_s_at	0,75	-5,26	-0,59	0,54	LOC_Os03g49990.1	0.0	protein GRAS family transcription factor domain containing protein
baak46p14_s_at	4,98	-4,89	-0,23	0,24	LOC_Os01g17170.1	0.0	protein magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase
Contig14323_at	-2,21	-1,77	2,89	1,63	LOC_Os01g72460.1	5,00E-91	protein NADPH quinone oxidoreductase
Contig4676_at	2,12	-5,00	-0,34	0,21	LOC_Os02g08100.1	0.0	protein AMP-binding domain containing protein
Contig4579_s_at	-1,91	-2,43	2,22	1,91	LOC_Os04g06770.2	0.0	protein argonaute
Contig10778_s_at	0,06	-4,93	-0,27	0,83	LOC_Os08g29200.1	8,00E-44	protein BURP domain containing protein
HVSMEEg0007G16r2_s_at	-0,82	-3,37	1,28	0,82	LOC_Os05g49880.1	1,00E-167	protein lactate/malate dehydrogenase
HA24G18r_at	-2,08	-1,80	2,85	1,95			
Contig4250_s_at	0,02	-4,65	0,00	1,06	LOC_Os04g50120.1	1,00E-121	protein zinc-binding protein
Contig9342_at	0,49	-5,02	-0,38	0,24	LOC_Os05g48590.1	1,00E-102	protein OsIAA19 - Auxin-responsive Aux/IAA gene family member
Contig12946_at	-0,37	-4,35	0,29	0,32	LOC_Os11g11960.1	0.0	protein disease resistance protein RPM1
Contig12362_s_at	-1,88	-2,17	2,47	1,70	LOC_Os04g52504.1	6,00E-24	protein adhesive/proline-rich protein
Contig10093_s_at	0,82	-4,43	0,20	-0,18	LOC_Os03g55930.1	4,00E-91	protein ribosomal protein
Contig8876_at	-0,31	-4,47	0,16	0,11	LOC_Os03g63110.1	1,00E-100	protein prefoldin
Contig15036_at	-0,45	-3,87	0,75	0,48	LOC_Os03g59080.1	1,00E-156	protein AMP-binding enzyme
Contig12665_at	-1,52	-2,97	1,64	1,54			
Contig3853_s_at	0,00	-4,13	0,48	0,00	LOC_Os01g44210.1	2,00E-63	protein 50S ribosomal protein L31
Contig5673_at	-2,42	-2,17	2,44	3,89	LOC_Os05g48650.1	3,00E-96	protein transcription factor HBP-1b
Contig17813_at	-2,09	-2,11	2,50	2,01	LOC_Os09g37700.1	2,00E-69	protein proteophosphoglycan ppg4
Contig14875_at	-0,82	-3,76	0,84	1,51	LOC_Os12g36910.1	1,00E-26	protein calmodulin binding protein
Contig9277_s_at	0,13	-4,60	0,00	0,95	LOC_Os05g02130.1	0.0	protein ankyrin repeat domain-containing protein 28
Contig8371_at	1,84	-4,22	0,37	-0,68	LOC_Os01g54860.1	0.0	protein enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein
Contig15509_at	-0,99	-3,76	0,83	0,87	LOC_Os09g21460.1	4,00E-73	protein expressed protein
Contig23856_at	-1,02	-3,58	1,01	1,26	LOC_Os07g26610.1	0.0	protein phosphoglucomutase
Contig9093_at	1,37	-5,98	-1,39	1,47	LOC_Os08g41290.1	3,00E-98	protein AIR12
Contig13794_at	-0,87	-3,55	1,04	0,80	LOC_Os07g06440.1	1,00E-171	protein deoxyribonuclease tatD
Contig24888_at	-0,74	-3,17	1,41	0,64	LOC_Os03g46920.1	4,00E-24	protein expressed protein
Contig4859_at	1,60	-4,82	-0,24	0,22	LOC_Os02g21280.1	1,00E-66	protein POE130 - Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein precursor
HV03G03u_at	-2,56	-2,29	2,29	2,47	LOC_Os03g62790.2	5,00E-50	protein pirin
Contig19862_at	-1,98	-2,53	2,04	2,48	LOC_Os01g70110.1	5,00E-06	protein No apical meristem protein
Contig12096_at	-0,16	-3,90	0,66	0,19	LOC_Os02g15970.3	6,00E-52	protein alpha-hemolysin
Contig20669_at	-1,55	-3,20	1,36	1,52	LOC_Os12g34880.1	1,00E-58	protein expressed protein
Contig7114_at	-0,57	-4,02	0,54	0,78	LOC_Os02g04050.1	0.0	protein chromosome segregation protein
rbaal1k11_s_at	-0,92	-3,60	0,95	1,61	LOC_Os10g30450.1	1,00E-123	protein heavy-metal-associated domain-containing protein
Contig14789_at	-1,18	-3,30	1,24	2,34			
HVSMEEa0011N23r2_at	-1,62	-3,19	1,35	2,35	LOC_Os08g39590.1	8,00E-56	protein inactive receptor kinase At2g26730 precursor
Contig21339_at	-1,86	-3,09	1,45	1,83	LOC_Os09g08620.1	1,00E-45	protein OsFBX309 - F-box domain containing protein
HV_CEb0020D05r2_s_at	2,46	-5,07	-0,53	0,55	LOC_Os03g32314.1	1,00E-105	protein allene oxide cyclase 4, chloroplast precursor
Contig15877_at	-2,20	-2,28	2,25	2,47	LOC_Os03g53970.1	1,00E-58	protein expressed protein
Contig2262_at	5,00	-4,62	-0,09	0,10	LOC_Os01g17170.1	0.0	protein magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase
Contig13874_at	6,46	-5,40	-0,87	1,72	LOC_Os08g38810.2	4,00E-39	protein BURP domain containing protein
Contig6640_at	-0,49	-3,89	0,64	0,59	LOC_Os11g37990.1	1,00E-156	protein chloroplastic group IIA intron splicing facilitator CRS1
Contig18514_at	-0,09	-4,52	0,00	0,60	LOC_Os02g57080.2	4,00E-71	protein serine/threonine-protein kinase
Contig12085_at	-0,01	-4,52	0,00	0,24	LOC_Os12g18120.1	0.0	protein zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type family protein
Contig23070_at	-0,60	-3,90	0,61	0,56	LOC_Os07g09670.1	2,00E-71	protein galactosyltransferase family protein
Contig4192_at	-0,23	-4,08	0,42	1,91	LOC_Os08g43190.2	0.0	protein dehydrogenase
Contig4476_at	-0,25	-4,21	0,30	0,49	LOC_Os08g01760.1	0.0	protein dehydrogenase
Contig20433_at	-1,85	-3,03	1,46	1,69	LOC_Os12g18630.1	2,00E-36	protein expressed protein
Contig20647_at	-0,20	-4,32	0,17	0,37	LOC_Os03g05710.1	6,00E-54	protein acetyltransferase, GNAT family
HVSMEEg0007G16r2_at	-1,20	-2,80	1,69	1,21			
Contig19372_at	-0,11	-4,39	0,10	0,23	LOC_Os01g08950.1	2,00E-55	protein expressed protein
Contig24266_at	-0,92	-3,65	0,84	0,93	LOC_Os04g44110.1	1,00E-74	protein hydrolase
Contig18928_at	-2,70	-2,18	2,31	3,50	LOC_Os07g15540.1	7,00E-23	protein ethylene receptor
Contig5776_s_at	0,01	-4,09	0,40	0,00	LOC_Os03g03360.1	1,00E-129	protein ribosomal protein L5
Contig5581_at	1,20	-4,36	0,12	-0,02	LOC_Os01g60230.4	3,00E-62	protein auxin efflux carrier component
Contig1899_at	3,60	-4,97	-0,50	0,39	LOC_Os07g44070.1	0.0	protein pectinacylesterase domain containing protein
rbaal1119_s_at	-0,05	-4,43	0,05	0,04	LOC_Os02g21630.1	6,00E-18	protein SEC14 cytosolic factor family protein
Contig6675_at	0,19	-4,05	0,41	-0,22	LOC_Os04g38750.1	8,00E-73	protein plastid-specific 30S ribosomal protein 3, chloroplast precursor
EBro08_SQ006_D12_s_at	2,30	-4,76	-0,30	0,31	LOC_Os09g29460.1	1,00E-111	protein homeobox associated leucine zipper
EBes01_SQ004_M24_at	-1,36	-2,87	1,59	1,27	LOC_Os05g50750.3	2,00E-18	protein AAA family ATPase
Contig8084_at	-0,17	-3,87	0,58	0,15	LOC_Os03g03020.1	1,00E-100	protein L11 domain containing ribosomal protein
Contig10356_at	1,10	-3,95	0,51	-0,38	LOC_Os03g60100.1	2,00E-75	protein 50S ribosomal protein L17
Contig19745_s_at	-1,40	-2,46	2,00	1,29			
HV14K04u_s_at	-1,79	-2,10	2,35	1,45	LOC_Os03g11540.1	0.0	protein RPA1B - Putative single-stranded DNA binding complex subunit 1
Contig5544_at	2,20	-4,55	-0,11	0,11	LOC_Os01g07310.1	0.0	protein transporter-related
Contig2747_at	1,03	-4,86	-0,42	0,44	LOC_Os01g67054.1	0.0	protein calreticulin precursor protein
Contig19387_at	-3,74	-2,25	2,17	2,69			
Contig22279_at	-0,71	-3,60	0,83	0,97	LOC_Os09g29370.1	5,00E-31	protein RING-H2 finger protein ATL5F

Probe Set	0di	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
Contig16570_at	-1,61	-1,46	2,97	1,73	LOC_Os02g35230.1	5,00E-50	protein expressed protein
Contig12417_at	2,41	-4,97	-0,55	0,60	LOC_Os03g02750.1	1,00E-146	protein OsSub25 - Putative Subtilisin homologue
Contig11031_at	0,79	-4,65	-0,23	0,22	LOC_Os07g39920.1	1,00E-147	protein formin
Contig14176_at	0,02	-4,57	-0,15	0,41	LOC_Os02g48590.1	1,00E-109	protein expressed protein
Contig6339_s_at	0,70	-4,14	0,27	-0,31	LOC_Os01g08660.1	1,00E-118	protein aquaporin protein
Contig15972_at	-2,28	-2,12	2,29	3,13	LOC_Os01g63310.1	4,00E-34	protein DUF740 domain containing protein
Contig10514_at	2,42	-5,25	-0,84	0,63	LOC_Os03g55350.1	0,0	protein OsSub31 - Putative Subtilisin homologue
rbah25c12_s_at	-1,19	-2,98	1,43	1,61	LOC_Os03g52640.2	1,00E-128	protein expressed protein
Contig10606_at	-1,03	-3,41	0,99	1,20	LOC_Os03g55620.3	1,00E-145	protein CAMK_CAMK_like_Aur_like.2
Contig10078_at	-1,03	-3,42	0,98	1,49	LOC_Os10g25770.2	1,00E-138	protein transcription initiation factor IIE subunit beta
Contig12515_at	0,92	-4,41	-0,02	0,04	LOC_Os08g43130.1	1,00E-155	protein NAP1
Contig17340_at	-0,88	-3,55	0,85	1,09	LOC_Os12g37570.1	0,0	protein protein kinase family protein
Contig8478_at	-0,09	-4,34	0,06	0,49	LOC_Os06g02370.1	0,0	protein expressed protein
Contig13100_at	-0,78	-3,58	0,81	1,25	LOC_Os05g30750.7	0,0	protein anthranilate phosphoribosyltransferase
Contig7018_at	0,21	-4,14	0,25	0,00	LOC_Os09g31000.1	2,00E-61	protein EF hand family protein
Contig12022_at	-0,20	-4,00	0,39	0,50	LOC_Os11g05556.2	1,00E-99	protein signal recognition particle 54 kDa protein
HVSMEg0009N05r2_s_at	-1,56	-2,78	1,60	1,86	LOC_Os06g45440.2	1,00E-132	protein haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 3
Contig7481_at	1,98	-5,39	-1,01	0,89	LOC_Os01g49830.1	1,00E-30	protein B3 DNA binding domain containing protein
Contig3699_s_at	-1,53	-2,41	1,97	1,40	LOC_Os06g47200.1	4,00E-51	protein LTP/L85 - Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein precursor
Contig15197_at	-0,29	-3,83	0,54	2,14	LOC_Os12g05420.1	3,00E-91	protein calmodulin-binding protein
Contig7404_at	-1,39	-2,84	1,52	2,08	LOC_Os01g47430.2	1,00E-124	protein protein of unknown function DUF1296 domain containing protein
Contig154_s_at	-3,20	-2,36	2,01	1,76	LOC_Os06g06440.1	0,0	protein ABC transporter, ATP-binding protein
Contig8301_at	1,23	-5,02	-0,66	0,64	LOC_Os01g25820.1	1,00E-110	protein respiratory burst oxidase
HVSMEk0023G08r2_at	-0,57	-3,41	0,94	0,58			
HY10C23u_at	2,69	-3,43	0,93	-0,99	LOC_Os06g51370.1	2,00E-36	protein OsSCP38 - Putative Serine Carboxypeptidase homologue
Contig14969_at	0,60	-4,35	0,00	0,03	LOC_Os01g70320.1	1,00E-132	protein expressed protein
HVSME10007E14r2_s_at	3,63	-5,56	-1,21	0,91	LOC_Os03g06940.1	0,0	protein beta-galactosidase
Contig14892_at	-0,34	-3,94	0,40	0,99	LOC_Os07g37700.1	3,00E-38	protein expressed protein
HVSME0019B10f2_s_at	-1,08	-3,50	0,85	1,41	LOC_Os01g65380.1	2,00E-77	protein patellin protein
Contig24680_at	2,38	-5,42	-1,07	1,12	LOC_Os02g56860.1	1,00E-98	protein 3-ketoacyl-CoA synthase
Contig2748_at	-0,87	-3,39	0,95	0,70	LOC_Os05g50980.1	1,00E-155	protein SET domain containing protein
Contig8374_at	-0,75	-3,51	0,83	1,36	LOC_Os05g33300.1	1,00E-94	protein tat pathway signal sequence family protein
Contig9357_at	1,33	-4,55	-0,22	0,20	LOC_Os12g39660.1	0,0	protein calcium-transporting ATPase, plasma membrane-type
Contig6347_s_at	-0,18	-4,19	0,12	0,96	LOC_Os06g01500.1	1,00E-156	protein IQ calmodulin-binding motif family protein
Contig5274_s_at	-0,32	-4,00	0,32	0,41	LOC_Os03g59240.1	0,0	protein carboxyl-terminal peptidase
Contig9380_at	-1,08	-3,13	1,18	1,54	LOC_Os08g40150.2	6,00E-98	protein AT hook motif domain containing protein
Contig23613_at	0,09	-3,79	0,52	0,00	LOC_Os04g58750.4	1,00E-93	protein protein kinase family protein
HA15K23r_s_at	1,31	-4,07	0,24	-0,26	LOC_Os01g08320.1	3,00E-81	protein OsIAA1 - Auxin-responsive Aux/IAA gene family member
Contig13417_at	-0,40	-3,43	0,87	0,45	LOC_Os08g37700.3	6,00E-99	protein RNA recognition motif containing protein
rbags18k24_s_at	1,01	-3,80	0,49	-0,45	LOC_Os03g60100.1	2,00E-75	protein 50S ribosomal protein L17
HV_CEA0014H05r2_at	-1,35	-2,48	1,81	1,30	LOC_Os10g40130.1	1,00E-32	protein Mur ligase family protein
HU05K13u_at	0,35	-4,05	0,24	-0,03	LOC_Os01g48270.1	6,00E-88	protein AAA-type ATPase family protein
Contig6325_at	0,72	-4,32	-0,03	0,00	LOC_Os06g25294.1	9,00E-63	protein 60S ribosomal protein L18a-1
Contig8774_at	-0,06	-4,11	0,16	1,08	LOC_Os04g32650.1	0,0	protein tRNA synthetase class II core domain containing protein
Contig1124_x_at	-1,21	-3,06	1,21	1,14	LOC_Os01g05630.1	2,00E-63	protein Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein
Contig3935_s_at	-0,24	-3,92	0,34	0,27	LOC_Os06g30750.1	1,00E-121	protein reticulon domain containing protein
Contig9574_at	-0,15	-3,94	0,32	0,30	LOC_Os10g34470.1	1,00E-107	protein HD domain containing protein 2
EBem10_SQ001_I05_at	0,79	-5,33	-1,07	1,89	LOC_Os08g41290.1	3,00E-98	protein AIR12
Contig7479_at	1,28	-3,62	0,64	-0,62	LOC_Os04g39980.1	1,00E-141	protein gibberellin 20 oxidase 2
Contig9029_at	0,95	-4,86	-0,61	0,52	LOC_Os05g41440.2	1,00E-168	protein cytochrome P450
Contig2169_at	2,22	-4,44	-0,18	0,29	LOC_Os03g02514.1	0,0	protein hydrolase, alpha/beta fold family protein
HS06C20u_s_at	-0,14	-4,01	0,24	0,15	LOC_Os06g30750.1	1,00E-121	protein reticulon domain containing protein
HVSME0003G18r2_s_at	0,11	-4,23	0,02	0,12	LOC_Os05g41810.1	0,0	protein OsDegp8 - Putative Deg protease homologue
HVSMEH0086A12r2_s_at	-1,55	-2,49	1,76	1,43	LOC_Os04g06770.2	0,0	protein argonaute
Contig8863_at	-0,34	-3,91	0,34	0,41	LOC_Os09g10910.3	3,00E-92	protein fiber protein Fb34
Contig21836_at	-1,72	-1,33	2,90	1,41	LOC_Os06g04480.1	2,00E-31	protein expressed protein
Contig14780_at	-0,71	-3,33	0,90	0,66	LOC_Os03g53640.1	2,00E-51	protein expressed protein
EBma03_SQ003_L08_s_at	2,07	-4,91	-0,68	0,53	LOC_Os08g06100.1	1,00E-128	protein O-methyltransferase
HV11B08u_at	-2,20	-1,94	2,29	1,77	LOC_Os02g58380.1	1,00E-07	protein conserved hypothetical protein
HV02P01u_at	-0,74	-3,44	0,78	0,94	LOC_Os02g45600.1	7,00E-38	protein rhoGAP domain containing protein
Contig6515_at	-2,32	-2,07	2,15	3,36	LOC_Os11g02130.1	1,00E-139	protein peroxidase precursor
Contig25737_at	-0,66	-2,97	1,25	0,75	LOC_Os05g43920.1	7,00E-14	protein auxin response factor 14
HVSMEa0007F09r2_at	-1,44	-1,60	2,62	1,45	LOC_Os02g52360.1	8,00E-23	protein peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP40
Contig13600_at	-1,42	-2,94	1,27	1,06	LOC_Os09g30466.1	1,00E-137	protein nuclear ribonuclease Z
Contig19158_at	-0,36	-3,67	0,54	0,23	LOC_Os02g14790.1	1,00E-127	protein WD domain, G-beta repeat domain containing protein
Contig12788_at	1,80	-4,13	0,08	0,00	LOC_Os02g47010.1	1,00E-138	protein secretory carrier-associated membrane protein
HVSMEg0016P19f_x_at	2,79	-5,72	-1,52	1,45	LOC_Os04g59330.1	1,00E-136	protein expressed protein
Contig10590_at	0,30	-4,34	-0,14	0,06	LOC_Os04g55730.1	1,00E-99	protein alpha-N-acetylglucosaminidase
Contig5030_at	0,00	-4,08	0,12	0,17	LOC_Os05g29760.3	0,0	protein ferredoxin-like-2, chloroplast precursor
Contig14272_at	-1,66	-2,64	1,55	1,18	LOC_Os04g41900.1	1,00E-100	protein expressed protein

Probe Set	Odi	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
Contig6692_s_at	-1,08	-3,03	1,17	1,05	LOC_Os05g51450.1	0.0	protein OsCip8 - Putative Cip protease homologue
EBro08_SQ007_K24_at	-5,52	-1,93	2,26	1,95	LOC_Os01g10320.1	4,00E-17	protein class III HD-Zip protein 8
Contig3167_s_at	0,04	-4,30	-0,11	0,36	LOC_Os05g01480.1	3,00E-98	protein ras-related protein
Contig12778_at	-0,14	-4,09	0,10	0,23	LOC_Os12g07020.1	1,00E-128	protein 5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase
Contig20832_at	-2,19	-2,72	1,47	1,78			
Contig18335_at	-0,12	-4,18	0,00	0,86	LOC_Os02g43150.1	6,00E-53	protein GATA zinc finger domain containing protein
rbah59e19_s_at	2,24	-4,27	-0,09	0,14	LOC_Os04g58910.1	1,00E-136	protein receptor protein kinase TMK1 precursor
Contig23641_at	-0,82	-3,41	0,76	1,58	LOC_Os05g39090.1	2,00E-94	protein CAMK_CAMK_like.29
rbags18k24_x_at	0,90	-3,83	0,35	-0,24	LOC_Os03g60100.1	4,00E-15	protein 50S ribosomal protein L17
Contig4432_at	0,23	-3,91	0,26	-0,05	LOC_Os07g43810.1	1,00E-112	protein RNA recognition motif containing protein
Contig11163_at	1,51	-4,90	-0,73	0,76	LOC_Os10g42620.1	7,00E-63	protein dihydroflavonol-4-reductase
Contig10289_at	-0,51	-3,69	0,47	1,99	LOC_Os06g05700.1	1,00E-165	protein cysteine synthase
Contig19001_at	-0,03	-4,14	0,02	0,82	LOC_Os02g2190.1	4,00E-46	protein glycosyltransferase
HY07L14u_at	-0,50	-3,91	0,25	1,86	LOC_Os01g53420.1	5,00E-62	protein anthocyanidin 5,3-O-glucosyltransferase
Contig15472_at	3,17	-5,27	-1,12	1,12	LOC_Os06g49760.1	1,00E-79	protein invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein
EBro05_SQ003_D01_s_at	-0,52	-3,34	0,81	0,56	LOC_Os08g37700.3	6,00E-99	protein RNA recognition motif containing protein
Contig8700_s_at	2,31	-4,84	-0,69	0,54	LOC_Os05g32230.1	1,00E-137	protein expressed protein
Contig5560_at	0,78	-4,37	-0,23	0,29	LOC_Os03g21540.1	0.0	protein TKL_IRAK_CrRLK1L-1.8
Contig10235_at	-0,38	-3,58	0,56	0,27			
Contig3171_at	2,85	-4,38	-0,25	0,06	LOC_Os12g08730.1	6,00E-66	protein thioredoxin
Contig9839_at	1,67	-4,10	0,02	0,00	LOC_Os03g60240.1	3,00E-69	protein SCAR-like protein 1
rbags22e20_at	-1,01	-1,95	2,16	0,70			
Contig6603_at	0,43	-4,34	-0,24	0,20	LOC_Os08g23410.1	1,00E-72	protein rubredoxin family protein
Contig13271_at	1,64	-4,08	0,02	-0,01	LOC_Os10g42700.1	1,00E-173	protein CS domain containing protein
Contig10816_at	1,26	-5,37	-1,27	1,21	LOC_Os07g01860.1	0.0	protein expressed protein
Contig24198_at	5,03	-1,57	2,52	-2,99	LOC_Os03g53790.1	1,00E-84	protein periplasmic beta-glucosidase precursor
Contig18451_at	-1,04	-2,78	1,30	2,26	LOC_Os06g02410.1	9,00E-07	protein expressed protein
HVSMEg0009L10r2_at	3,28	-3,60	0,49	-0,27	LOC_Os04g52670.1	7,00E-07	protein OsSAUR21 - Auxin-responsive SAUR gene family member
Contig13776_at	-2,37	-1,89	2,20	1,95	LOC_Os08g36500.1	0.0	protein nitrate reductase
Contig8075_at	-1,06	-3,03	1,06	1,66	LOC_Os09g11520.1	3,00E-68	protein DUF565 domain containing protein
HW01E20u_x_at	-1,37	-2,69	1,39	1,21			
Contig5422_at	0,17	-4,15	-0,08	0,10	LOC_Os04g38480.1	0.0	protein BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1
Contig11261_at	-0,72	-3,14	0,93	0,77	LOC_Os04g55860.1	1,00E-110	protein peptidyl-HRNA hydrolase
HVSMEk0006G12r2_s_at	0,26	-4,24	-0,18	0,39	LOC_Os03g50810.1	0.0	protein receptor protein kinase TMK1 precursor
Contig26584_at	-1,92	-1,78	2,28	1,75	LOC_Os07g31430.1	1,00E-56	protein phosphate-induced protein 1 conserved region domain
Contig481_s_at	-2,07	-2,25	1,81	1,86	LOC_Os03g28330.4	0.0	protein sucrose synthase
Contig5561_at	1,64	-4,44	-0,38	0,38	LOC_Os01g56330.1	0.0	protein TKL_IRAK_CrRLK1L-1.5
Contig3685_at	-2,29	-1,77	2,28	4,14	LOC_Os07g24000.1	3,00E-73	protein AWP19-like membrane family protein
HV14K05u_s_at	0,11	-4,05	0,00	-0,01	LOC_Os01g45274.3	1,00E-112	protein carbonic anhydrase, chloroplast precursor
HS06012u_at	1,79	-4,22	-0,17	0,29	LOC_Os02g07960.4	7,00E-07	protein STRUBBELIG-RECEPTOR FAMILY 3 precursor
Contig179_s_at	2,23	-5,13	-1,08	0,96	LOC_Os07g40130.1	1,00E-60	protein retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy subclass
HVSMEg0006G02r2_s_at	0,20	-4,03	0,01	-0,03	LOC_Os11g32260.1	0.0	protein lysosomal alpha-mannosidase precursor
Contig8790_at	-0,16	-3,75	0,29	0,21	LOC_Os01g71000.1	0.0	protein protein kinase APK1B, chloroplast precursor
Contig7034_at	1,97	-5,20	-1,16	0,78	LOC_Os06g16170.1	1,00E-123	protein expressed protein
Contig2147_at	0,66	-4,18	-0,14	0,06	LOC_Os03g40830.1	0.0	protein OsSub30 - Putative Subtilisin homologue
Contig10782_at	-0,13	-3,87	0,17	0,62	LOC_Os07g30774.1	0.0	protein calmodulin-binding transcription activator 5
Contig24714_at	-2,15	-2,07	1,97	2,03	LOC_Os01g74330.1	3,00E-12	protein pectinacetyltransferase domain containing protein
Contig689_s_at	-1,19	-3,24	0,80	1,83	LOC_Os06g09450.8	0.0	protein sucrose synthase
Contig15447_at	0,00	-3,00	1,04	0,07	LOC_Os03g38740.1	0.0	protein Dicer
Contig8658_at	0,36	-4,43	-0,39	0,90	LOC_Os03g55670.1	1,00E-90	protein expressed protein
HVSMEI0002L04r2_s_at	-1,61	-2,22	1,81	2,03	LOC_Os09g30300.1	3,00E-28	protein expressed protein
Contig717_x_at	4,35	-4,69	-0,66	0,93	LOC_Os04g49980.1	2,00E-17	protein late embryogenesis abundant group 1
Contig9846_at	-1,04	-3,14	0,88	1,25	LOC_Os10g04700.2	1,00E-63	protein OsFBX361 - F-box domain containing protein
Contig9773_at	-0,43	-3,85	0,17	0,93	LOC_Os04g33500.3	0.0	protein protein kinase
EBpi01_SQ005_J19_at	-0,52	-3,58	0,43	0,75			
Contig3042_at	0,24	-4,22	-0,20	0,02	LOC_Os06g40190.1	6,00E-94	protein phospholipase D
Contig807_s_at	-0,27	-3,66	0,35	0,28	LOC_Os06g02380.2	0.0	protein T-complex protein
Contig4215_at	0,54	-3,84	0,16	-0,09	LOC_Os01g48690.1	2,00E-79	protein ribosomal protein rpS20
Contig12372_at	-0,14	-3,52	0,49	0,27	LOC_Os01g42770.1	2,00E-63	protein expressed protein
Contig19722_at	0,05	-3,75	0,25	0,16	LOC_Os01g40630.1	1,00E-112	protein uncharacterized protein PA4923
Contig9294_at	0,50	-4,55	-0,54	0,45	LOC_Os02g22130.1	4,00E-73	protein expressed protein
Contig9878_at	2,97	-3,77	0,23	-0,13	LOC_Os09g10750.1	1,00E-100	protein rhodanese-like
Contig6889_at	2,14	-4,27	-0,27	0,03	LOC_Os03g57420.1	7,00E-55	protein ML domain protein
Contig5885_at	2,34	-4,82	-0,83	0,69	LOC_Os01g09010.1	0.0	protein transferase family protein
Contig8145_at	0,00	-4,03	-0,05	0,42	LOC_Os02g13270.1	1,00E-101	protein Mpv17 / PMP22 family domain containing protein
Contig11524_s_at	0,07	-4,30	-0,31	0,52	LOC_Os07g37290.1	3,00E-24	protein hypothetical protein
HB08A04r_at	-0,15	-3,82	0,17	2,86			
HVSMEa0004F18f2_s_at	4,50	-3,36	0,62	-0,45	LOC_Os04g56400.1	0.0	protein glutamine synthetase, catalytic domain containing protein
Contig2528_x_at	2,49	-4,75	-0,77	0,55	LOC_Os08g06100.1	1,00E-128	protein O-methyltransferase
Contig9749_at	-0,60	-3,37	0,60	1,54	LOC_Os01g01410.1	0.0	protein TKL_IRAK_C-LEC.1 - TKL_IRAK_C-LEC has homology to C-type lectin

Probe Set	Odi	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
rbasd16a13_s_at	0,81	-4,65	-0,67	2,79	LOC_Os11g24070.1	1,00E-35	protein LTPL10 - Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein precursor
Contig16154_at	-1,08	-2,83	1,15	1,26	LOC_Os03g52640.2	1,00E-128	protein expressed protein
Contig16012_at	-0,92	-2,16	1,81	0,80	LOC_Os07g44400.1	1,00E-137	protein POK1
HU03G20u_at	-4,21	-2,03	1,94	1,84	LOC_Os06g12030.2	1,00E-53	protein glutaredoxin domain containing protein
Contig21713_at	-0,39	-3,62	0,35	0,99			
Contig12420_at	0,77	-4,40	-0,43	0,32	LOC_Os05g45210.3	2,00E-84	protein respiratory burst oxidase
Contig15416_at	-0,09	-3,65	0,32	2,26			
Contig9809_at	2,97	-4,20	-0,24	0,21	LOC_Os06g22690.1	2,00E-46	protein bundle sheath defective protein 2
Contig11702_at	-2,00	-2,07	1,89	2,04	LOC_Os12g06335.1	1,00E-142	protein expressed protein
Contig19361_at	-0,36	-3,43	0,53	0,32	LOC_Os03g20640.1	5,00E-31	protein expressed protein
Contig7851_s_at	-0,28	-3,78	0,18	0,23	LOC_Os03g38010.1	1,00E-139	protein nuf2 family protein
Contig23926_at	-3,03	-1,87	2,08	1,90	LOC_Os08g03560.2	5,00E-65	protein chloroplast unusual positioning protein
Contig619_at	1,35	-4,16	-0,22	0,16	LOC_Os06g06980.1	1,00E-132	protein coffeyl-CoA O-methyltransferase
HY04H14u_at	-2,60	-1,80	2,15	1,44	LOC_Os12g42860.1	2,00E-06	protein 2-aminoethanethiol dioxygenase
rbags12121_at	-1,31	-2,65	1,29	1,47	LOC_Os05g04330.2	1,00E-72	protein DNA methyltransferase protein
Contig7556_s_at	-0,68	-3,23	0,71	1,07	LOC_Os05g50220.1	1,00E-68	protein pex14
Contig5737_s_at	2,64	-5,40	-1,46	1,14	LOC_Os04g59330.1	1,00E-136	protein expressed protein
Contig12502_at	-0,15	-3,74	0,20	1,04	LOC_Os08g34050.1	0,0	protein phosphofructokinase, putative
Contig414_at	-1,70	-1,93	2,01	1,68	LOC_Os03g17100.1	4,00E-68	protein Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein
Contig16196_at	-1,61	-1,94	1,99	1,22	LOC_Os04g15800.1	2,00E-55	protein expressed protein
HX02B17u_at	0,69	-5,44	-1,51	0,81	LOC_Os12g38400.2	7,00E-55	protein MYB family transcription factor
Contig6672_s_at	4,29	-4,23	-0,30	0,06	LOC_Os04g1970.1	0,0	protein endoglucanase
EBro08_SQ003_119_s_at	1,18	-4,92	-0,98	1,60	LOC_Os04g55850.1	1,00E-117	protein nuclease PA3
Contig23281_at	-1,08	-2,73	1,20	1,08	LOC_Os01g51640.1	9,00E-46	protein expressed protein
Contig12360_at	-0,79	-3,22	0,71	0,95	LOC_Os02g46962.3	2,00E-94	protein VHS and GAT domain containing protein
Contig1641_at	-3,42	-2,16	1,76	1,82	LOC_Os01g71380.1	1,00E-121	protein glycosyl hydrolases family 17
rbaal1m15_s_at	0,30	-3,51	0,42	-0,30	LOC_Os01g51410.1	0,0	protein glycine dehydrogenase
Contig11649_at	-0,44	-3,45	0,46	1,76	LOC_Os04g43670.1	1,00E-48	protein expressed protein
Contig9437_at	0,16	-3,58	0,33	-0,09	LOC_Os02g51790.1	2,00E-63	protein ribosomal protein L29
Contig14695_at	-1,20	-2,61	1,30	1,04	LOC_Os01g55280.1	6,00E-42	protein expressed protein
Contig1483_at	0,51	-3,56	0,35	-0,28	LOC_Os01g51410.1	0,0	protein glycine dehydrogenase
rbaal1ff18_at	-1,74	-2,38	1,53	2,29	LOC_Os07g35260.1	2,00E-77	protein DUF26 kinases have homology to DUF26 containing loci
Contig2056_at	-1,47	-2,31	1,60	4,02	LOC_Os06g04950.1	7,00E-43	protein early nodulin 93 ENOD93 protein
Contig17921_at	2,15	-4,11	-0,21	0,23	LOC_Os08g44400.1	2,00E-85	protein glutathione S-transferase, N-terminal domain containing protein
Contig9948_at	-0,73	-3,34	0,56	1,20	LOC_Os02g58790.1	1,00E-143	protein cell division inhibitor
Contig19231_at	-1,32	-2,73	1,17	1,47	LOC_Os03g42280.2	5,00E-17	protein B3 DNA binding domain containing protein
Contig414_x_at	-2,07	-1,93	1,96	1,73	LOC_Os03g17100.1	4,00E-68	protein Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein
Contig602_at	-1,65	-2,34	1,55	1,55	LOC_Os03g28330.4	0,0	protein sucrose synthase
Contig21345_at	0,78	-4,78	-0,90	1,19			
Contig9847_s_at	-1,11	-2,82	1,06	1,36	LOC_Os10g04700.2	1,00E-63	protein OsFBX361 - F-box domain containing protein
Contig9026_at	-1,23	-2,62	1,25	1,22	LOC_Os01g16110.1	0,0	protein la domain containing protein
HW06H04u_at	-1,72	-1,23	2,65	1,19	LOC_Os01g42070.1	5,00E-45	protein kinesin motor domain containing protein
Contig21909_at	-2,73	-1,64	2,24	1,30	LOC_Os07g32390.1	3,00E-80	protein targeting protein-related
Contig21011_at	0,30	-4,30	-0,43	0,53	LOC_Os01g14890.1	5,00E-73	protein expressed protein
Contig5710_at	0,20	-4,04	-0,17	0,34	LOC_Os08g22149.1	2,00E-89	protein CBS domain containing membrane protein
Contig7474_at	-1,13	-2,96	0,90	1,21	LOC_Os03g05320.2	1,00E-110	protein expressed protein
Contig16020_at	-0,92	-2,93	0,93	1,02	LOC_Os11g16560.1	1,00E-138	protein expressed protein
Contig14415_at	-0,73	-2,46	1,39	0,88	LOC_Os05g50190.1	1,00E-160	protein protein kinase domain containing protein
Contig12522_at	-0,09	-3,83	0,02	1,22	LOC_Os01g36090.1	1,00E-157	protein DNA-damage-repair/tolerance protein DRT102
Contig6958_s_at	-1,42	-2,44	1,40	1,81	LOC_Os07g35260.1	4,00E-81	protein DUF26 kinases have homology to DUF26 containing loci
Contig15613_at	-1,92	-1,59	2,25	1,41	LOC_Os11g31950.1	1,00E-127	protein expressed protein
rbags22g19_at	0,19	-4,01	-0,18	0,49	LOC_Os01g49510.1	1,00E-133	protein OsPOP3 - Putative Prolyl Oligopeptidase homologue
Contig3058_at	-0,51	-3,41	0,42	1,19	LOC_Os10g30450.1	1,00E-123	protein heavy-metal-associated domain-containing protein
HVSMEa0019D10r2_at	1,90	-4,05	-0,23	0,13	LOC_Os02g39710.1	1,00E-35	protein CCT/B-box zinc finger protein
Contig14308_at	0,19	-3,96	-0,14	0,51	LOC_Os08g17400.1	4,00E-59	protein WRKY DNA-binding domain containing protein
Contig10499_at	1,62	-4,46	-0,65	0,60	LOC_Os06g22810.1	0,0	protein TKL_IRAK_CrRLK1L-1.14
Contig7850_at	-0,24	-3,50	0,32	0,41	LOC_Os03g38010.1	1,00E-139	protein nuf2 family protein
Contig9455_at	-2,30	-2,10	1,71	2,88	LOC_Os03g04310.2	2,00E-61	protein BHLH transcription factor
Contig12170_at	-2,14	-1,92	1,89	1,84	LOC_Os12g10184.1	0,0	protein pentatricopeptide
rbaal20n01_s_at	-0,46	-3,37	0,44	0,59	LOC_Os01g32660.1	0,0	protein - STE kinases include homologs to sterile 7, sterile 11 and sterile 20
Contig7241_at	-0,48	-3,25	0,56	0,46	LOC_Os03g61220.1	0,0	protein DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 3
HV_CEA0015H07r2_s_at	1,10	-3,83	-0,02	0,19	LOC_Os02g29530.1	0,0	protein glycosyl transferase 8 domain containing protein
Contig21289_at	-1,26	-2,42	1,39	1,34	LOC_Os07g05960.1	9,00E-75	protein conserved hypothetical protein
Contig24175_at	1,69	-3,83	-0,03	0,03	LOC_Os05g37820.1	0,0	protein transporter, major facilitator family
Contig366_at	0,02	-3,80	0,00	0,82	LOC_Os11g05050.1	1,00E-114	protein stem-specific protein TSJ1
HVSMEf0015P21r2_s_at	-5,21	-1,78	2,02	1,39	LOC_Os01g03549.1	0,0	protein multi-copper oxidase type I family protein
Contig11710_at	-1,44	-2,65	1,14	2,45			
HS05J08u_s_at	-2,06	-1,78	2,01	2,96			
Contig8468_at	1,54	-3,96	-0,17	0,24	LOC_Os01g38980.2	1,00E-128	protein calmodulin-binding protein
HVSMEm0004N19r2_s_at	0,25	-3,83	-0,05	0,04	LOC_Os01g48690.1	2,00E-79	protein ribosomal protein rpS20

Probe Set	Odi	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
Contig18913_at	0,06	-3,22	0,56	-0,11	LOC_Os09g27450.1	1,00E-70	protein homeobox associated leucine zipper
Contig8345_at	-0,12	-3,60	0,18	0,44	LOC_Os04g58720.1	0,0	protein anthranilate phosphoribosyltransferase
Contig4633_at	-6,32	-1,67	2,10	1,45	LOC_Os01g71080.1	3,00E-73	protein xylanase inhibitor
Contig18481_at	-1,55	-1,80	1,97	1,45	LOC_Os02g56540.1	3,00E-22	protein kinesin motor domain containing protein
Contig10874_at	5,52	-3,74	0,03	-0,21	LOC_Os05g44900.1	3,00E-38	protein expressed protein
Contig18569_at	5,07	-4,90	-1,14	0,86	LOC_Os03g06705.1	9,00E-61	protein 3-ketoacyl-CoA synthase
Contig15225_at	-1,10	-2,67	1,08	0,91	LOC_Os06g13050.1	1,00E-156	protein peroxidase family protein
Contig14258_at	-0,27	-3,27	0,49	0,19	LOC_Os08g19610.3	6,00E-90	protein peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
Contig10710_at	-1,32	-2,53	1,23	1,35	LOC_Os01g12560.1	1,00E-178	protein 3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase
HV14K24u_at	-0,50	-3,34	0,41	0,69	LOC_Os03g60710.1	0,0	protein protein kinase domain containing protein
Contig18676_at	-0,57	-3,10	0,64	0,51	LOC_Os04g59580.1	1,00E-49	protein zinc finger, C3HC4 type domain containing protein
Contig21442_at	-0,68	-2,73	1,02	0,79	LOC_Os01g59510.1	2,00E-75	protein chloroplast ribonuclease III domain protein
Contig23628_at	-0,33	-3,34	0,39	1,35	LOC_Os08g12780.4	1,00E-158	protein chloroplast envelope membrane protein
Contig6059_at	-0,92	-2,89	0,84	2,08	LOC_Os10g33830.1	2,00E-64	protein MATH domain containing protein
Contig6093_s_at	-0,52	-2,42	1,31	0,39	LOC_Os03g56900.1	1,00E-108	protein reticulation domain containing protein
HW0911u_s_at	3,38	-3,73	0,00	0,00	LOC_Os02g44630.2	1,00E-158	protein aquaporin protein
rbags13e05_s_at	0,23	-3,87	-0,14	0,53	LOC_Os12g34460.2	5,00E-60	protein auxin-binding protein 4 precursor
HV11H02u_at	0,56	-3,90	-0,17	0,00	LOC_Os06g44840.2	8,00E-29	protein prenilyltransferase
Contig12787_at	-0,83	-2,79	0,93	1,82	LOC_Os02g53340.2	1,00E-102	protein cyclic nucleotide-gated ion channel
Contig9696_s_at	1,65	-3,95	-0,23	0,32	LOC_Os03g62370.1	1,00E-120	protein WD40-like Beta Propeller Repeat family protein
Contig24433_at	-0,25	-3,34	0,38	0,31	LOC_Os01g53600.2	1,00E-55	protein farnesyltransferase subunit beta
Contig9274_at	0,34	-3,22	0,50	-0,36			
Contig6875_at	-0,11	-3,60	0,12	0,05	LOC_Os07g40620.1	1,00E-167	protein saccharopine dehydrogenase
HVSMEI0013P0412_s_at	-0,49	-3,21	0,50	1,37	LOC_Os03g51640.1	1,00E-118	protein expressed protein
HDD04D15u_at	-1,46	-2,44	1,27	1,16			
HVSMEI0017H19r2_s_at	-1,01	-2,68	1,03	1,22	LOC_Os04g47280.1	2,00E-55	protein ATFUC1
Contig13138_at	-0,70	-2,94	0,77	1,05	LOC_Os05g45720.2	7,00E-54	protein starch synthase
Contig7684_at	-4,07	-1,51	2,19	3,49	LOC_Os01g08330.1	1,00E-139	protein aspartic proteinase nepthesin-1 precursor, putative
EBma05_SQ002_M06_at	-3,15	-1,35	2,35	1,49			
Contig19031_at	-1,54	-2,31	1,39	1,53			
Contig9276_at	-0,46	-3,28	0,41	0,87	LOC_Os05g02130.1	0,0	protein ankyrin repeat domain-containing protein 28
Contig3920_at	-0,71	-2,90	0,80	0,99	LOC_Os07g01020.1	1,00E-156	protein SOR/SNZ family protein
Contig5929_at	-1,13	-2,57	1,13	1,39	LOC_Os12g02040.1	2,00E-25	protein hypoxia-responsive family protein
Contig16580_at	-1,35	-1,09	2,60	1,21	LOC_Os05g07240.1	3,00E-58	protein expressed protein
Contig15159_s_at	-1,28	-2,38	1,31	1,30	LOC_Os06g30380.1	4,00E-93	protein GTP binding protein
Contig6843_at	0,96	-3,73	-0,05	0,00	LOC_Os02g09740.1	0,0	protein STRUBBELIG-RECEPTOR FAMILY 7 precursor
Contig18600_at	0,16	-3,79	-0,11	0,73	LOC_Os03g08220.1	2,00E-88	protein lipoxigenase protein
Contig15840_at	0,04	-3,56	0,13	-0,08	LOC_Os03g24460.2	1,00E-49	protein aminotransferase domain containing protein
Contig21807_at	0,37	-4,16	-0,48	0,55	LOC_Os07g41140.1	8,00E-78	protein receptor-like protein kinase precursor
Contig21680_at	-2,52	-1,91	1,77	1,60	LOC_Os05g25060.1	2,00E-24	protein PPR repeat domain containing protein
EBpi01_SQ004_K18_at	0,45	-4,15	-0,48	0,69			
Contig14094_at	-0,23	-3,15	0,52	0,04	LOC_Os02g50700.1	1,00E-24	protein expressed protein
Contig21185_at	-0,37	-2,99	0,68	0,21	LOC_Os03g19920.1	4,00E-18	protein expressed protein
ChlorContig17_s_at	0,15	-3,66	0,00	1,55			
HVSMEg0007B23r2_at	-1,97	-2,22	1,44	2,01	LOC_Os06g44060.2	1,00E-105	protein phospholipase D. Active site motif family protein
Contig10284_at	1,51	-3,77	-0,11	0,08	LOC_Os07g48160.1	0,0	protein alpha-galactosidase precursor
Contig7768_s_at	-0,19	-3,49	0,17	0,10	LOC_Os01g72800.1	1,00E-176	protein signal recognition particle receptor
Contig14999_at	1,74	-3,49	0,17	-0,19	LOC_Os04g57020.2	1,00E-130	protein expressed protein
Contig14469_at	-0,37	-3,38	0,27	1,62	LOC_Os06g36650.1	1,00E-141	protein ABC transporter family protein
Contig8292_at	-0,01	-3,64	0,01	0,20	LOC_Os05g45930.1	0,0	protein IQ calmodulin-binding motif family protein
Contig10699_at	-0,13	-3,36	0,29	0,09	LOC_Os03g59640.1	0,0	protein magnesium-chelatase subunit chLD, chloroplast precursor
Contig16606_at	-1,90	-1,74	1,92	3,62	LOC_Os08g02520.1	2,00E-31	protein OsSAUR31 - Auxin-responsive SAUR gene family member
HVSMEen0019B10f_s_at	-0,75	-2,97	0,68	1,14	LOC_Os01g65380.1	2,00E-77	protein patellin protein
Contig11580_at	-0,46	-3,09	0,56	0,80	LOC_Os09g37610.1	1,00E-161	protein MATE efflux protein
Contig17860_at	0,37	-3,89	-0,24	0,95	LOC_Os10g41310.1	0,0	protein DUF630/DUF632 domains containing protein
Contig4728_at	-1,53	-2,25	1,40	1,31	LOC_Os01g45910.1	0,0	protein plastidic ATP/ADP-transporter
Contig19395_at	-2,20	-1,81	1,82	3,35	LOC_Os06g50040.1	1,00E-22	protein OsSAUR29 - Auxin-responsive SAUR gene family member
Contig5352_at	1,13	-4,03	-0,39	0,28	LOC_Os12g35670.1	1,00E-42	protein RALFL4 - Rapid Alkalinization Factor RALF family protein precursor
Contig17093_at	-2,30	-1,76	1,87	2,10	LOC_Os08g30770.1	1,00E-108	protein ABC transporter, ATP-binding protein
Contig1739_s_at	-4,38	-1,63	2,00	3,10	LOC_Os12g42860.1	2,00E-91	protein 2-aminoethanethiol dioxygenase
Contig2878_at	-1,94	-1,54	2,09	1,58	LOC_Os10g40710.1	1,00E-114	protein expansin precursor
Contig18702_at	0,35	-2,09	1,54	-0,10	LOC_Os06g14540.1	1,00E-45	protein endoglucanase
Contig8436_s_at	0,79	-3,25	0,37	-0,25	LOC_Os01g69950.1	2,00E-81	protein ribosomal protein L27
Contig14590_at	0,31	-4,15	-0,53	0,95	LOC_Os01g42960.1	3,00E-07	protein TTL1
Contig11449_at	-1,37	-2,20	1,42	1,78	LOC_Os11g04460.1	0,0	protein calcium-transporting ATPase, plasma membrane-type
Contig8090_at	0,83	-3,52	0,09	-0,01	LOC_Os12g36810.1	0,0	protein polygalacturonase
Contig16511_at	0,07	-3,48	0,13	0,00	LOC_Os01g45370.1	4,00E-89	protein radical SAM enzyme
HZ65P03r_at	-0,75	-2,93	0,68	0,69	LOC_Os10g11830.1	9,00E-06	protein expressed protein
Contig12927_at	-1,24	-1,72	1,89	1,23	LOC_Os08g06620.1	6,00E-39	protein DNA polymerase delta subunit 4 family
EBpi01_SQ001_I04_s_at	0,00	-3,34	0,26	0,00	LOC_Os02g35500.1	1,00E-154	protein NAD binding domain of 6-phosphogluconate dehydrogenase

Probe Set	Odi	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
Contig7012_at	0,33	-3,05	0,55	-0,28	LOC_Os03g10860.1	1,00E-35	protein expressed protein
Contig12695_at	2,43	-3,32	0,28	-0,19	LOC_Os08g42850.1	3,00E-90	protein peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type
Contig116333_at	-0,07	-3,48	0,11	0,29	LOC_Os07g16130.1	1,00E-102	protein acetyltransferase, GNAT family
HY08M06u_x_at	-0,57	-2,87	0,73	0,53			
Contig1162_at	-1,58	-1,74	1,86	1,63	LOC_Os01g05630.1	1,00E-72	protein Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein
Contig5585_s_at	0,56	-3,38	0,21	-0,15	LOC_Os03g61260.1	8,00E-74	protein ribosomal L18p/L5e family protein
Contig12303_at	0,70	-3,74	-0,14	0,15	LOC_Os02g34884.1	0,0	protein SacI homology domain containing protein
Contig10845_at	-0,22	-2,96	0,63	0,25	LOC_Os02g44520.1	0,0	protein OsSub19 - Putative Subtilisin homologue
EBro04_SQ004_L16a_at	-1,24	-2,36	1,23	1,24			
Contig16159_at	-0,42	-3,15	0,44	0,86	LOC_Os02g13950.1	2,00E-53	protein NHL repeat-containing protein
HVSMIEI0009B19r2_s_at	-0,31	-3,28	0,31	0,79	LOC_Os03g08550.2	0,0	protein STRUBBELIG-RECEPTOR FAMILY 6 precursor
Contig23806_at	0,21	-3,60	-0,01	2,44	LOC_Os02g35870.2	7,00E-65	protein galactosyltransferase
Contig7643_at	-0,40	-3,23	0,35	0,63	LOC_Os12g43970.1	2,00E-78	protein hydrolase, alpha/beta fold family domain containing protein
Contig6300_at	1,84	-3,43	0,15	-0,14	LOC_Os03g29350.1	0,0	protein von Willebrand factor type A domain containing protein
Contig8147_at	-0,60	-2,92	0,66	2,83	LOC_Os06g46410.2	0,0	protein auxin response factor
Contig8750_s_at	-0,42	-3,17	0,41	0,96	LOC_Os03g61570.2	9,00E-50	protein expressed protein
Contig938_s_at	1,74	-3,61	-0,04	0,04	LOC_Os11g18947.2	6,00E-88	protein zinc finger, C3HC4 type domain containing protein
Contig12940_at	2,53	-4,19	-0,62	0,66	LOC_Os02g51670.1	3,00E-49	protein ethylene-responsive transcription factor
Contig146333_at	0,82	-3,63	-0,07	0,07	LOC_Os01g71220.1	1,00E-141	protein zinc finger protein
Contig5403_at	-0,46	-2,68	0,88	0,40	LOC_Os03g57120.1	0,0	protein ferredoxin-NADP reductase, chloroplast precursor
Contig11177_at	1,53	-3,74	-0,18	0,24	LOC_Os03g14250.1	1,00E-128	protein plant protein of unknown function DUF869 domain containing protein
Contig8258_s_at	-1,82	-1,42	2,13	2,49	LOC_Os03g31510.1	3,00E-20	protein cysteine proteinase inhibitor 8 precursor
HVSMIEa0006D18r2_s_at	1,01	-4,37	-0,82	0,78	LOC_Os07g47620.1	3,00E-60	protein universal stress protein domain containing protein
Contig14349_at	-0,67	-2,48	1,07	0,76	LOC_Os04g39160.1	1,00E-124	protein RNA-dependent RNA polymerase
Contig11250_s_at	1,70	-3,66	-0,12	0,11	LOC_Os05g33270.1	0,0	protein GDSL-like lipase/acylhydrolase
Contig23309_at	-0,96	-2,88	0,64	0,76	LOC_Os07g36930.1	2,00E-06	protein expressed protein
rbags12k11_s_at	-0,74	-2,81	0,71	0,81	LOC_Os02g37080.1	2,00E-95	protein ASC1
Contig6309_at	-3,89	-2,10	1,42	2,78	LOC_Os02g15700.1	1,00E-31	protein expressed protein
Contig23719_at	0,91	-4,22	-0,70	0,58	LOC_Os01g56330.1	3,00E-61	protein TKL_IRAK_CrRLK1L-1.5
Contig8562_at	0,57	-3,75	-0,23	0,25	LOC_Os10g23100.1	1,00E-112	protein ras-related protein
HW01F06u_at	-0,79	-2,74	0,77	1,15	LOC_Os01g19760.1	2,00E-75	protein expressed protein
Contig20068_at	-0,93	-1,74	1,77	0,70	LOC_Os06g08790.1	0,0	protein ORC1 - Putative origin recognition complex subunit 1
Contig6870_at	-2,18	-1,55	1,95	1,17	LOC_Os03g58040.3	0,0	protein glutamate dehydrogenase protein
Contig4633_x_at	-6,13	-1,61	1,90	1,45	LOC_Os01g71080.1	3,00E-73	protein xylanase inhibitor
HVSMIEa0005E13r2_s_at	0,04	-3,34	1,17	0,00	LOC_Os07g43810.1	1,00E-112	protein RNA recognition motif containing protein
Contig5708_at	-0,02	-3,24	0,26	0,02	LOC_Os05g09400.3	8,00E-44	protein 30S ribosomal protein S31, chloroplast precursor
Contig24914_at	-1,07	-2,38	1,12	1,02	LOC_Os02g01440.1	2,00E-74	protein nitric oxide synthase 1
HY0324u_s_at	-0,72	-2,76	0,75	1,10	LOC_Os05g51180.1	1,00E-116	protein hyaluronan/mRNA binding family domain containing protein
Contig1154_s_at	-1,46	-2,07	1,44	1,43	LOC_Os01g05630.1	2,00E-63	protein Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein
Contig8894_at	-1,71	-1,84	1,66	1,70	LOC_Os03g51230.2	0,0	protein SNF2 family N-terminal domain containing protein
HVSMIEg0007O05r2_at	-2,03	-1,69	1,81	2,79			
Contig7443_at	-0,16	-3,18	0,32	0,21	LOC_Os01g59740.1	1,00E-138	protein expressed protein
Contig145_x_at	-2,77	-1,54	1,96	1,54	LOC_Os05g38640.1	1,00E-58	protein Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein
Contig1671_s_at	1,85	-3,83	-0,34	0,14	LOC_Os06g04250.1	1,00E-162	protein phosphate-induced protein 1 conserved region domain
Contig460_s_at	-1,02	-2,92	0,57	1,08	LOC_Os06g09450.7	0,0	protein sucrose synthase
Contig19089_at	0,32	-3,81	-0,31	0,37	LOC_Os11g14420.1	1,00E-137	protein inactive receptor kinase At1g27190 precursor
Contig14271_at	-0,84	-2,60	0,89	1,03	LOC_Os06g48610.1	1,00E-77	protein CCT motif family protein
Contig393_at	-6,28	-1,77	1,71	1,92	LOC_Os11g10510.1	0,0	protein dehydrogenase
Contig6481_at	3,78	-4,92	-1,43	1,04	LOC_Os03g06940.1	0,0	protein beta-galactosidase
Contig118_at	-2,42	-1,54	1,94	1,47	LOC_Os03g17100.1	7,00E-68	protein Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein
Contig6093_at	-0,60	-2,21	1,27	0,59	LOC_Os03g56900.1	1,00E-108	protein reticulon domain containing protein
Contig16645_at	-0,05	-3,41	0,06	0,11			
Contig13522_at	0,19	-3,47	0,00	0,03	LOC_Os04g35080.1	1,00E-168	protein protein kinase domain containing protein
Contig5438_s_at	-0,89	-2,83	0,63	0,85	LOC_Os01g04900.1	0,0	protein peptidase M50 family protein
EBem05_SQ004_C15_at	-0,62	-2,94	0,52	0,49	LOC_Os01g07490.1	2,00E-31	protein RST1
Contig5813_at	0,94	-3,54	-0,08	0,06	LOC_Os05g28630.1	0,0	protein leaf senescence related protein
EBro03_SQ004_A01_s_at	0,30	-3,55	-0,09	0,24	LOC_Os04g33390.1	0,0	protein prephenate dehydratase domain containing protein
Contig28_s_at	-2,49	-1,63	1,82	1,76	LOC_Os03g17100.1	1,00E-67	protein Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein
Contig15468_at	-1,19	-2,24	1,21	1,91	LOC_Os05g34670.1	1,00E-128	protein KH domain containing protein
Contig12253_at	0,15	-3,51	-0,07	0,66	LOC_Os12g34460.2	5,00E-60	protein auxin-binding protein 4 precursor
Contig23889_at	0,50	-3,13	0,32	-0,16	LOC_Os04g30490.1	4,00E-48	protein MATE efflux family protein
HT09B07u_s_at	0,82	-4,00	-0,55	1,72	LOC_Os09g31000.1	3,00E-62	protein EF hand family protein
EBma01_SQ005_B17_at	-1,04	-2,16	1,29	0,93			
HVSMIEf0021O19r2_s_at	0,22	-3,21	0,24	-0,27	LOC_Os01g70300.1	1,00E-121	protein aspartokinase 3, chloroplast precursor
Contig16238_at	-0,05	-3,23	0,21	0,00	LOC_Os01g66300.1	3,00E-43	protein KH domain containing protein
HU08P15u_s_at	-0,49	-2,41	1,03	0,42	LOC_Os03g57120.1	0,0	protein ferredoxin-NADP reductase, chloroplast precursor
Contig11882_at	-0,20	-3,36	0,07	0,87	LOC_Os08g15278.1	1,00E-69	protein chloroplast 30S ribosomal protein S8, putative
Contig4893_at	-0,42	-2,44	0,98	0,38	LOC_Os07g36190.1	1,00E-125	protein hydrolase, NUDIX family, domain containing protein
Contig9981_at	3,81	-3,13	0,29	-0,18	LOC_Os09g25460.1	0,0	protein transferase family protein
Contig17600_at	-1,64	-1,97	1,44	1,62	LOC_Os01g63220.3	1,00E-34	protein kinase, ptkB family

Probe Set	Odi	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
Contig20157_at	-0.89	-2.45	0.97	0.76			
Contig12856_at	1.12	-3.42	-0.01	0.00	LOC_Os04g46750.1	0.0	protein glycosyl transferase 8 domain containing protein
EBma03_SQ003_L14_s_at	-0.95	-2.53	0.88	2.28	LOC_Os10g33830.1	2,00E-64	protein MATH domain containing protein
EBma01_SQ005_K17_at	-2.55	-1.67	1.74	1.91	LOC_Os02g13450.1	3,00E-09	protein MEGL7 - Maternally expressed gene MEG family protein precursor
Contig14563_at	0.00	-2.67	0.73	-0.08	LOC_Os10g33990.1	4,00E-39	protein DUF584 domain containing protein
Contig22556_at	-2.47	-1.69	1.71	2.47	LOC_Os02g04240.1	5,00E-71	protein wee1-like protein kinase
Contig14567_at	-3.62	-1.81	1.59	2.80	LOC_Os11g35030.1	1,00E-116	protein growth regulating factor protein
Contig14621_at	-0.78	-2.35	1.05	0.81	LOC_Os01g42710.1	1,00E-111	protein retrotransposon protein, putative, unclassified
Contig145_at	-2.67	-1.48	1.91	1.43	LOC_Os05g38640.1	1,00E-58	protein Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein
Contig20529_s_at	-1.42	-1.76	1.63	1.53	LOC_Os01g18850.4	8,00E-57	protein OsSPL1 - SBP-box gene family member
Contig5845_at	2.13	-5.38	-1.99	1.60	LOC_Os01g55190.1	0.0	protein expressed protein
Contig12438_at	0.00	-2.42	0.97	-0.04	LOC_Os06g11140.1	0.0	protein pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase domain containing protein
Contig8195_at	-2.40	-1.57	1.82	1.57	LOC_Os06g07210.1	0.0	protein ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit
Contig5903_s_at	5.62	-1.65	1.74	-1.27	LOC_Os03g03810.1	2,00E-32	protein DEF8 - Defensin and Defensin-like DEFL family
Contig15666_at	0.71	-3.51	-0.13	0.14	LOC_Os08g41110.1	1,00E-127	protein chaperone protein dnaJ 10
Contig25707_at	-1.64	-1.00	2.38	1.02	LOC_Os02g47130.1	1,00E-26	protein expressed protein
Contig17746_at	-0.55	-2.83	0.55	0.49	LOC_Os10g36880.1	1,00E-119	protein kinesin motor domain containing protein
Contig11481_at	-1.48	-1.33	2.05	1.54	LOC_Os08g35190.1	3,00E-38	protein auxin-repressed protein
Contig13143_s_at	0.85	-4.23	-0.85	0.58	LOC_Os02g04250.3	3,00E-72	protein glycosyltransferase
Contig7804_at	-0.79	-2.63	0.74	1.21	LOC_Os10g41360.1	0.0	protein ARABIDILLO-1
Contig10417_at	0.09	-3.29	0.08	0.00	LOC_Os05g33510.1	1,00E-88	protein peptide methionine sulfoxide reductase mrsB
Contig19696_at	0.34	-3.40	-0.03	0.08	LOC_Os07g42410.1	4,00E-95	protein expressed protein
Contig23882_at	1.13	-3.26	0.11	-0.09			
Contig6918_s_at	-0.81	-2.15	1.21	0.82	LOC_Os07g43040.1	8,00E-44	protein heavy metal-associated domain containing protein
Contig4724_at	0.00	-3.25	0.11	-0.04	LOC_Os02g35500.1	1,00E-154	protein NAD binding domain of 6-phosphogluconate dehydrogenase
Contig10218_at	0.43	-4.22	-0.86	2.05	LOC_Os08g10340.1	2,00E-41	protein OsFBX278 - F-box domain containing protein
Contig19872_at	-0.37	-3.06	0.30	0.61	LOC_Os07g30110.1	2,00E-20	protein expressed protein
Contig15138_at	-1.05	-2.21	1.15	1.07	LOC_Os10g43075.1	1,00E-122	protein expressed protein
HU05K13u_s_at	0.26	-3.22	0.14	-0.06	LOC_Os01g48270.1	6,00E-88	protein AAA-type ATPase family protein
rbags16e12_at	-0.22	-2.74	0.61	0.17	LOC_Os07g13590.1	6,00E-20	protein expressed protein
HS05D20u_s_at	-0.64	-1.98	1.37	0.64			
Contig8649_at	-0.20	-3.13	0.22	1.07	LOC_Os05g33040.3	2,00E-93	protein cyclin
Contig2594_s_at	0.54	-3.64	-0.29	0.08	LOC_Os03g52690.1	1,00E-101	protein CBS domain containing membrane protein
Contig14429_s_at	-0.83	-2.31	1.04	0.60	LOC_Os04g54940.1	1,00E-131	protein ATEB1A-like microtubule associated protein
Contig14836_at	-1.68	-1.88	1.46	1.79	LOC_Os06g13600.1	1,00E-122	protein HEAT repeat family protein
Contig23957_at	-1.79	-1.62	1.72	1.80	LOC_Os07g12640.1	5,00E-45	protein glycerol-3-phosphate dehydrogenase
Contig23170_at	-0.96	-2.47	0.87	1.20			
Contig5378_at	0.03	-2.46	0.88	0.00			
Contig6247_at	-0.52	-2.81	0.53	1.02	LOC_Os03g16740.1	0.0	protein protein kinase APK1A, chloroplast precursor
Contig11642_at	0.08	-3.39	-0.05	0.49	LOC_Os01g65720.1	0.0	protein expressed protein
Contig21170_at	0.02	-3.33	0.00	0.98	LOC_Os04g58470.1	0.0	protein choline transporter-related
HVSMeh0081C04r2_s_at	-5.74	-1.53	1.80	1.21	LOC_Os01g71080.1	3,00E-73	protein xylanase inhibitor
Contig20097_at	2.42	-2.50	0.83	-0.85	LOC_Os12g02589.3	3,00E-79	protein hydrolase, alpha/beta fold family protein
Contig17655_at	-0.50	-2.80	0.53	1.82	LOC_Os10g33970.2	1,00E-43	protein double-stranded RNA binding motif containing protein
Contig8699_at	2.84	-4.17	-0.85	0.80	LOC_Os05g32230.1	1,00E-137	protein expressed protein
Contig10075_at	-0.36	-2.55	0.77	0.31	LOC_Os10g26400.2	1,00E-98	protein uncharacterized oxidoreductase
Contig4131_at	-2.36	-1.62	1.70	1.93	LOC_Os04g35520.3	1,00E-159	protein OsAPx7 - Stromal Ascorbate Peroxidase encoding gene 5,8
Contig14270_s_at	-0.80	-2.53	0.78	0.84	LOC_Os06g48610.1	1,00E-77	protein CCT motif family protein
Contig130_at	-1.28	-1.87	1.45	1.20	LOC_Os04g34240.1	4,00E-71	protein histone H3
Contig9232_at	3.36	-2.38	0.93	-0.99	LOC_Os04g42520.1	4,00E-81	protein phosphoribosyl transferase
Contig1136_at	-2.24	-1.43	1.88	1.43	LOC_Os01g05630.1	6,00E-69	protein Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein
Contig10543_at	0.59	-3.26	0.05	0.00	LOC_Os01g66170.1	1,00E-160	protein SNARE associated Golgi protein
Contig22680_at	-1.80	-1.89	1.42	1.48	LOC_Os03g49940.1	6,00E-70	protein integral membrane protein
Contig175_x_at	-3.11	-1.31	2.00	1.32	LOC_Os10g39410.1	1,00E-52	protein Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein
Contig11363_at	-0.18	-3.09	0.21	0.15	LOC_Os03g55164.1	1,00E-169	protein OsWRKY4 - Superfamily of TFs having WRKY and zinc finger domains
Contig4439_at	0.25	-3.32	-0.02	0.04	LOC_Os03g34040.1	1,00E-137	protein ribosomal protein
Contig18449_at	-1.36	-1.62	1.68	1.33	LOC_Os08g25700.1	1,00E-113	protein expressed protein
Contig13188_at	1.56	-4.13	-0.83	0.66	LOC_Os07g49240.1	1,00E-170	protein MRH1
Contig4949_at	0.23	-3.52	-0.22	0.58	LOC_Os02g58560.3	0.0	protein 1,3-beta-glucan synthase component
Contig13817_at	-0.20	-3.16	0.13	0.80	LOC_Os02g53620.1	8,00E-91	protein nuclear transcription factor Y subunit
HW01F10u_s_at	-0.30	-2.45	0.84	0.23	LOC_Os01g49690.1	1,00E-177	protein Ser/Thr protein phosphatase family protein
HVSMeg0007D17r2_at	-2.08	-1.51	1.77	1.32			
Contig481_at	-1.40	-1.99	1.29	1.52	LOC_Os03g28330.4	0.0	protein sucrose synthase
Contig13137_s_at	-0.61	-2.78	0.50	1.11	LOC_Os05g45720.2	7,00E-54	protein starch synthase
HV03P03u_at	-1.50	-1.80	1.47	1.65			
Contig6817_at	1.27	-3.19	0.08	-0.10	LOC_Os01g17150.1	2,00E-42	protein plastid-specific 50S ribosomal protein 5, chloroplast precursor
Contig6592_at	-0.74	-1.82	1.45	0.64	LOC_Os02g55410.1	0.0	protein MCMS
HE01F04u_s_at	-0.13	-3.04	0.22	0.52	LOC_Os01g14720.1	5,00E-48	protein transcription regulator
Contig5003_at	-0.71	-2.20	1.07	0.71	LOC_Os03g19510.1	1,00E-142	protein OsClp4 - Putative Clp protease homologue
Contig3855_at	-2.02	-1.41	1.85	5.81	LOC_Os02g16540.2	5,00E-05	protein OsWRKY39Z

Probe Set	0di	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
HVSMEm0013103r2_at	-1,28	-1,91	1,36	1,52	LOC_Os05g51150.3	2,00E-57	protein RNA polymerase sigma factor
Contig16148_at	-1,83	-1,64	1,62	2,22	LOC_Os12g07880.1	7,00E-99	protein dynamin family protein
Contig11163_s_at	1,30	-3,90	-0,64	0,67	LOC_Os10g42620.1	7,00E-63	protein dihydroflavonol-4-reductase
Contig6085_at	0,16	-2,57	0,69	-0,20	LOC_Os03g51430.2	9,00E-73	protein SEC14 cytosolic factor family protein
Contig18000_at	-2,65	-1,72	1,54	1,31	LOC_Os07g03770.1	1,00E-155	protein Homeobox domain containing protein
Contig1064_at	-1,30	-2,05	1,21	1,37	LOC_Os05g44330.5	1,00E-138	protein DJ-1 family protein
Contig25088_at	-2,10	-1,72	1,54	2,33	LOC_Os06g11180.1	3,00E-99	protein OsPOP12 - Putative Prolyl Oligopeptidase homologue
Contig22133_at	-1,22	-2,13	1,12	1,16	LOC_Os03g11500.1	6,00E-39	protein DUF647 domain containing protein
Contig17766_at	0,98	-2,86	0,39	-0,45	LOC_Os04g33630.1	1,00E-53	protein 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain containing protein
Contig23354_at	-0,89	-2,28	0,96	0,94	LOC_Os05g45060.1	2,00E-62	protein RING-H2 finger protein ATL2M
Contig2018_at	1,47	-3,62	-0,38	0,44	LOC_Os04g59040.1	1,00E-112	protein soluble inorganic pyrophosphatase
Contig8486_at	3,92	-3,44	-0,19	0,18	LOC_Os05g43530.1	0,0	protein CSLC7 - cellulose synthase-like family C
Contig15470_at	-1,29	-1,65	1,60	0,96	LOC_Os10g01570.1	1,00E-108	protein C-5 cytosine-specific DNA methylase
Contig17568_at	1,46	-3,71	-0,47	0,51	LOC_Os06g02480.1	3,00E-55	protein expressed protein
Contig14931_at	1,13	-3,34	-0,09	0,09	LOC_Os01g48330.1	1,00E-127	protein protein kinase domain containing protein
Contig6671_at	5,37	-3,66	-0,42	0,17	LOC_Os04g41970.1	0,0	protein endoglucanase
HY03J09u_at	-0,81	-2,46	0,78	0,87			
Contig13577_at	1,44	-3,21	0,03	-0,03	LOC_Os02g32120.1	1,00E-131	protein cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial precursor
Contig4386_at	2,86	-4,15	-0,91	0,75	LOC_Os02g08440.1	1,00E-128	protein OsWRKY71 - Superfamily of TFs having WRKY and zinc finger domains
Contig6062_at	-0,79	-2,53	0,70	0,48	LOC_Os05g49060.1	1,00E-132	protein uncharacterized protein ycl23
HT12B06u_s_at	0,46	-2,56	0,68	-0,46	LOC_Os07g43070.1	1,00E-141	protein expressed protein
Contig10890_s_at	-1,03	-2,06	1,18	1,58	LOC_Os01g55450.1	1,00E-105	protein CAMK_KIN1/SNF1/Nim1_Like.11
Contig10249_at	-0,07	-3,14	0,09	0,76	LOC_Os05g34270.1	1,00E-70	protein inactive receptor kinase At1g27190 precursor
Contig15547_at	-0,78	-2,33	0,90	0,55	LOC_Os01g37510.1	1,00E-116	protein peptide deformylase
HVSMEm0008105r2_s_at	-1,23	-2,01	1,21	1,39	LOC_Os01g65350.1	0,0	protein deoxynucleoside kinase family
Contig25692_at	-0,44	-2,85	0,38	0,74	LOC_Os03g48450.4	1,00E-163	protein SCARECROW
Contig13623_at	-0,91	-1,45	1,77	1,10	LOC_Os11g03290.1	0,0	protein nucleoside-triphosphatase
Contig9141_at	-1,51	-1,66	1,57	1,62	LOC_Os03g40670.1	1,00E-180	protein glycerophosphoryl diester phosphodiesterase family protein
Contig9040_at	0,97	-3,76	-0,54	0,45	LOC_Os05g33730.1	1,00E-116	protein gibberellin receptor GID1L2
Contig13827_at	-0,43	-2,74	0,48	0,65	LOC_Os08g43090.1	4,00E-84	protein bZIP family transcription factor
Contig22282_at	-1,23	-1,75	1,47	1,47	LOC_Os03g17634.1	2,00E-91	protein PPR repeat domain containing protein
Contig5839_at	-2,32	-1,75	1,47	2,45	LOC_Os09g30300.1	3,00E-28	protein expressed protein
Contig1724_s_at	-3,91	-1,57	1,65	1,57	LOC_Os11g26790.1	5,00E-48	protein dehydrin
Contig17552_at	-0,19	-3,02	0,20	0,44	LOC_Os02g55150.2	1,00E-78	protein formin
Contig8181_at	-0,17	-3,11	0,10	0,47	LOC_Os02g47970.1	0,0	protein calpain
Contig11711_at	1,39	-2,85	0,37	-0,25	LOC_Os04g43070.1	1,00E-109	protein ammonium transporter protein
Contig11204_at	-1,64	-1,61	1,60	1,76	LOC_Os05g35520.1	1,00E-109	protein deoxynucleoside kinase family
Contig10599_at	0,07	-3,20	0,01	0,00	LOC_Os08g45180.1	1,00E-180	protein kinase, pIκB family
Contig175_at	-3,27	-1,35	1,86	1,40	LOC_Os10g39410.1	1,00E-52	protein Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein
Contig12640_at	-1,40	-2,01	1,20	1,28	LOC_Os01g69120.1	2,00E-47	protein uncharacterized RNA methyltransferase pc1998
HV_CEA0012B15f_s_at	0,52	-3,56	-0,35	0,29	LOC_Os02g38820.1	1,00E-100	protein expressed protein
Contig18503_at	-0,36	-2,85	0,36	0,39	LOC_Os05g04070.1	1,00E-116	protein expressed protein
HV_CEA0018D10f_s_at	0,04	-3,25	-0,05	0,69	LOC_Os11g05050.1	1,00E-114	protein stem-specific protein TSJ1
Contig13614_at	-1,21	-1,97	1,23	1,51	LOC_Os03g59750.1	1,00E-155	protein DNA gyrase subunit A, chloroplast/mitochondrial precursor
Contig12959_at	0,95	-4,23	-1,03	0,88	LOC_Os02g47420.3	0,0	protein ATROPGEF7/ROPGEF7
Contig20510_at	-6,08	-1,63	1,57	2,15	LOC_Os05g50090.1	2,00E-45	protein oxidoreductase, 2OG-Fell oxygenase domain containing protein
Contig2931_at	1,20	-3,39	-0,19	0,18	LOC_Os01g59440.1	1,00E-110	protein BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1
Contig16611_at	-2,09	-1,60	1,60	1,65	LOC_Os01g65660.2	1,00E-57	protein amino acid transporter
Contig11591_at	-1,15	-2,12	1,08	1,23	LOC_Os01g65350.1	0,0	protein deoxynucleoside kinase family
Contig19972_at	3,29	-4,10	-0,90	0,79	LOC_Os04g46110.1	4,00E-16	protein fibroin heavy chain precursor, putative
HVSMEm0024106r2_s_at	-0,79	-2,40	0,79	1,10	LOC_Os02g48390.1	1,00E-167	protein phosphoribosyl transferase
Contig8724_at	0,08	-3,17	0,02	0,02	LOC_Os04g32880.2	0,0	protein CBS domain containing membrane protein
Contig7480_at	-0,52	-2,89	0,29	0,21	LOC_Os04g39980.1	1,00E-143	protein gibberellin 20 oxidase 2
Contig5648_s_at	-0,89	-2,12	1,06	0,69	LOC_Os04g38540.1	1,00E-174	protein aldose 1-epimerase
Contig12382_at	-2,13	-1,50	1,68	4,91	LOC_Os01g71060.1	2,00E-36	protein xylanase inhibitor
Contig20794_at	-1,03	-2,11	1,07	0,98	LOC_Os04g49940.1	2,00E-50	protein expressed protein
Contig25256_at	-1,94	-1,51	1,66	2,17	LOC_Os10g17910.1	1,00E-33	protein OsWAK114 - OsWAK receptor-like cytoplasmic kinase OsWAK-RLCK
Contig7590_at	-2,65	-1,42	1,75	1,51	LOC_Os06g02530.1	2,00E-64	protein expressed protein
Contig15642_at	-1,09	-1,89	1,28	1,01	LOC_Os01g16290.1	0,0	protein DNA gyrase subunit B, chloroplast/mitochondrial precursor
Contig4462_at	2,08	-3,15	0,01	-0,09	LOC_Os12g37415.1	1,00E-61	protein expressed protein
Contig12945_at	-0,89	-1,80	1,37	0,70	LOC_Os03g11530.1	0,0	protein nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase
Contig24666_at	4,93	-3,74	-0,58	0,60			
HU04L22r_at	0,38	-3,41	-0,25	1,94	LOC_Os04g55240.1	2,00E-07	protein VQ domain containing protein
Contig5120_at	-0,95	-2,39	0,77	0,75	LOC_Os10g43050.1	1,00E-118	protein OsClp11 - Putative Clp protease homologue
Contig7798_at	0,23	-3,31	-0,15	0,27	LOC_Os04g51560.1	1,00E-137	protein OsWRKY68 - Superfamily of TFs having WRKY and zinc finger domains
Contig12805_at	0,67	-3,07	0,08	-0,01	LOC_Os08g29780.1	1,00E-120	protein expressed protein
EBpi01_SQ002_N15_at	-0,78	-2,22	0,93	0,59			
Contig20887_s_at	-0,93	-2,39	0,77	1,13	LOC_Os03g63910.1	1,00E-170	protein PPR repeat domain containing protein
rbags23005_x_at	-1,65	-1,25	1,91	1,45			
Contig13143_at	1,39	-4,17	-1,02	0,76	LOC_Os02g04250.3	3,00E-72	protein glycosyltransferase

Probe Set	Odi	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
Contig1616_at	-1,78	-1,62	1,53	2,14	LOC_Os10g39840.1	1,00E-134	protein glycosyl hydrolases family 16
Contig20783_at	-3,18	-1,52	1,63	2,76	LOC_Os10g32980.1	7,00E-46	protein CESAT7 - cellulose synthase
HT08O11u_at	-2,32	-1,39	1,76	1,99			
HM12H18r_at	-1,24	-1,55	1,60	1,15			
Contig14686_at	-0,08	-2,06	1,09	0,05	LOC_Os01g61320.2	2,00E-95	protein thioredoxin
Contig12204_s_at	3,60	-3,17	-0,02	0,00	LOC_Os07g40890.1	7,00E-31	protein igA FC receptor precursor
Contig20105_at	-1,36	-1,21	1,93	0,97	LOC_Os02g10640.1	1,00E-41	protein 26S protease regulatory subunit
Contig4690_at	2,26	-3,31	-0,17	0,20	LOC_Os01g02930.1	1,00E-157	protein glycosyltransferase protein
HU12J04u_at	-1,57	-1,88	1,26	1,40			
HA13E08r_s_at	0,25	-3,26	-0,12	1,02	LOC_Os01g42960.1	3,00E-07	protein TTL1
Contig9016_at	-0,04	-2,99	0,15	0,38	LOC_Os07g06490.1	1,00E-135	protein DNA binding protein
Contig10157_at	-1,34	-1,91	1,22	1,40	LOC_Os06g13000.1	1,00E-110	protein ankyrin repeat domain-containing protein, chloroplast precursor
Contig443_at	-1,16	-1,35	1,78	1,14	LOC_Os03g17100.1	7,00E-59	protein Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein
Contig2803_at	-7,12	-0,89	2,24	0,82	LOC_Os06g35540.1	0.0	protein aminotransferase, classes I and II, domain containing protein
HVSMek0005L21r2_s_at	0,43	-3,07	0,05	-0,08	LOC_Os04g1810.1	1,00E-148	protein expressed protein
Contig17386_at	-1,05	-2,12	1,01	1,20	LOC_Os09g11240.1	6,00E-57	protein expressed protein
HS06F14u_s_at	-1,12	-2,15	0,97	1,38	LOC_Os04g53540.4	0.0	protein homeobox and START domains containing protein
Contig10264_at	-0,17	-2,65	0,48	0,11	LOC_Os01g16940.1	1,00E-125	protein MazG nucleotide pyrophosphohydrolase domain containing protein
Contig10667_at	2,96	-3,12	0,00	0,09	LOC_Os01g15320.1	9,00E-52	protein RALFL9 - Rapid Alkalinization Factor RALF family protein precursor
HS06C04u_s_at	-0,64	-2,58	0,54	0,98	LOC_Os01g01280.1	2,00E-60	protein expressed protein
Contig22689_at	-0,07	-3,02	0,10	0,17	LOC_Os03g47760.1	8,00E-67	protein SAB
HO11E24S_s_at	1,80	-3,30	-0,18	0,21	LOC_Os02g08100.1	0.0	protein AMP-binding domain containing protein
HVSMeb0017O13f_at	0,03	-3,13	-0,02	0,29			
Contig1224_s_at	0,07	-3,16	-0,05	0,67	LOC_Os02g57450.2	1,00E-164	protein Ser/Thr protein phosphatase family protein
Contig15890_at	-0,18	-2,93	0,18	0,65	LOC_Os03g49170.1	1,00E-111	protein zinc finger family protein
Contig11338_at	-1,18	-2,01	1,09	1,89	LOC_Os09g31502.1	1,00E-136	protein dehydrogenase
Contig12795_at	0,72	-2,62	0,47	-0,61	LOC_Os01g04200.2	1,00E-44	protein metallo-beta-lactamase family protein
Contig5081_at	-0,72	-2,44	0,65	0,78	LOC_Os02g48390.1	1,00E-167	protein phosphoribosyl transferase
Contig9118_at	-1,22	-1,52	1,57	3,30	LOC_Os03g06390.1	2,00E-44	protein expressed protein
Contig10202_at	-1,40	-1,42	1,67	1,09	LOC_Os03g11540.0	0.0	protein RPA1B - Putative single-stranded DNA binding complex subunit 1
HT01M21w_at	-1,62	-1,53	1,56	1,45	LOC_Os03g02010.4	2,00E-46	protein DNA methyltransferase protein
Contig4518_at	2,85	-2,95	0,14	-0,04	LOC_Os07g06080.1	0.0	protein FAD dependent oxidoreductase domain containing protein
Contig14168_s_at	2,75	-2,69	0,39	-0,45	LOC_Os01g72950.1	1,00E-48	protein expressed protein
Contig19333_at	1,57	-3,05	0,03	-0,08	LOC_Os02g57020.1	2,00E-39	protein YCF37
Contig10435_at	2,85	-3,16	-0,09	0,04	LOC_Os03g17850.1	3,00E-29	protein glycosyltransferase family 43 protein
Contig26342_at	-0,51	-2,31	0,76	1,18	LOC_Os06g39640.1	0.0	protein PINHEAD
M58754_at	1,80	-2,84	0,23	-0,22	LOC_Os08g43580.1	1,00E-55	protein acyl carrier protein
HVSMeg0002E24r2_s_at	1,40	-4,78	-1,70	0,86	LOC_Os06g11660.1	1,00E-141	protein phosphate-induced protein 1 conserved region domain
Contig10952_at	1,05	-3,03	0,05	-0,09	LOC_Os04g36054.1	1,00E-102	protein auxin response factor 9
Contig4463_s_at	2,20	-3,03	0,04	-0,03	LOC_Os12g37415.1	1,00E-61	protein expressed protein
Contig9465_at	-1,26	-1,13	1,94	1,26	LOC_Os07g47090.2	1,00E-90	protein KIP1
Contig6664_at	-0,29	-2,47	0,60	0,22	LOC_Os07g05040.1	9,00E-89	protein cadmium-induced protein
Contig6305_at	1,88	-3,68	-0,61	0,52	LOC_Os01g63420.1	0.0	protein OsFBL4 - F-box domain and LRR containing protein
Contig4034_at	-2,52	-1,47	1,60	1,29	LOC_Os06g05120.2	2,00E-28	protein expressed protein
Contig1166_s_at	-4,90	-1,13	1,94	1,05	LOC_Os05g49860.1	4,00E-62	protein Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein
Contig23482_at	0,36	-3,18	-0,11	0,06			
Contig23196_at	-0,13	-2,98	0,08	0,66	LOC_Os01g45860.1	1,00E-156	protein GRAS family transcription factor domain containing protein
Contig14921_s_at	-1,02	-1,28	1,79	0,98	LOC_Os01g56880.1	4,00E-75	protein purple acid phosphatase precursor
Contig16556_at	-0,89	-2,16	0,91	1,92	LOC_Os10g33040.1	2,00E-42	protein receptor-like protein kinase precursor
Contig4368_at	-0,48	-2,47	0,59	0,40	LOC_Os04g36760.1	2,00E-52	protein enzyme of the cupin superfamily protein
Contig9155_s_at	-0,80	-2,27	0,80	1,04	LOC_Os03g07990.1	1,00E-133	protein acetyltransferase, GNAT family
Contig9660_at	0,95	-2,86	0,20	-0,34	LOC_Os02g38240.1	1,00E-135	protein rhodanese family protein
Contig23146_at	0,39	-3,29	-0,23	0,07	LOC_Os03g61240.1	1,00E-05	protein expressed protein
Contig17360_at	0,24	-2,98	0,08	-0,03	LOC_Os04g52100.1	3,00E-45	protein peptidase, M24 family protein
Contig3375_at	0,88	-3,76	-0,70	0,57	LOC_Os09g23350.1	0.0	protein trehalose synthase
HF18A22r_s_at	0,19	-3,04	0,02	0,04	LOC_Os06g29180.1	0.0	protein erythronate-4-phosphate dehydrogenase domain containing protein
HVSMek0018M19r2_at	-0,74	-1,40	1,65	0,65	LOC_Os03g51200.1	1,00E-61	protein Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein
Contig14078_at	0,00	-3,04	0,02	0,95	LOC_Os01g21820.1	2,00E-90	protein preprotein translocase subunit secA, chloroplast precursor
Contig845_s_at	1,53	-3,37	-0,32	0,46	LOC_Os11g24070.1	5,00E-33	protein LTPL10 - Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein precursor
Contig9922_s_at	-0,90	-2,22	0,83	2,82	LOC_Os05g38940.1	1,00E-09	protein hypothetical protein
rbags16i08_s_at	0,72	-3,31	-0,26	0,18	LOC_Os01g67054.1	0.0	protein calreticulin precursor protein
Contig14799_at	0,60	-2,73	0,32	-0,28	LOC_Os09g28730.1	2,00E-40	protein gibberellin receptor GID1L2
Contig9650_at	-0,80	-1,90	1,15	0,79			
Contig14428_at	-0,60	-2,07	0,97	0,63	LOC_Os04g54940.1	1,00E-131	protein ATEB1A-like microtubule associated protein
Contig8473_s_at	0,18	-3,14	-0,10	0,45	LOC_Os02g57710.1	0.0	protein signal peptide peptidase-like 2B
Contig4952_s_at	-6,26	-1,85	1,19	2,45	LOC_Os04g40410.1	6,00E-64	protein high affinity nitrate transporter
Contig19278_at	0,38	-3,68	-0,64	0,77	LOC_Os08g42440.1	1,00E-119	protein CCTB-box zinc finger protein
Contig7497_at	-1,35	-1,66	1,38	1,29	LOC_Os03g33580.1	0.0	protein mitotic checkpoint protein
HA14H04r_at	-1,81	-1,45	1,59	1,07	LOC_Os01g15480.1	1,00E-27	protein EMB3013
Contig9864_at	0,35	-2,98	0,06	-0,12	LOC_Os05g40260.1	1,00E-109	protein acetyltransferase, GNAT family

Probe Set	0di	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
HVSMEh0085O09r2_s_at	-0,51	-2,52	0,52	0,82	LOC_Os05g50220.1	1,00E-68	protein pex14
Contig16323_at	-0,76	-2,23	0,80	0,82	LOC_Os08g01420.1	1,00E-56	protein PHD-finger domain containing protein
Contig14344_at	-1,39	-1,36	1,67	1,21	LOC_Os05g41750.1	1,00E-175	protein RecF/RecN/SMC N terminal domain containing protein
rbags23o05_at	-1,59	-1,25	1,78	1,23			
Contig20025_at	0,69	-3,13	-0,10	0,05			
HB22D03r_at	-1,36	-1,55	1,47	1,29	LOC_Os01g43050.1	5,00E-76	protein CENP-C1
rbags29h17_s_at	-0,05	-2,49	0,53	0,09	LOC_Os02g47360.1	4,00E-37	protein PPR repeat domain containing protein
HVSMEk0011G17r2_at	-1,50	-1,18	1,84	1,19	LOC_Os06g14460.1	1,00E-24	protein chromosome condensation protein like
Contig2284_at	-0,02	-2,78	0,24	0,00	LOC_Os05g01820.1	3,00E-66	protein cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain containing protein
Contig10976_at	-0,15	-2,81	0,20	0,35	LOC_Os07g36180.2	1,00E-118	protein pentatricopeptide
Contig1664_at	0,53	-3,46	-0,45	0,54	LOC_Os01g70270.3	0,0	protein auxin response factor
HY10H19u_s_at	1,80	-6,19	-3,18	2,78			
HVSMEb0001J09r2_s_at	0,83	-2,99	0,02	0,00	LOC_Os12g01140.4	0,0	protein AGC_PVPK_like_kin82y.2
HY10N04u_s_at	-1,03	-1,30	1,70	1,01	LOC_Os10g01570.1	1,00E-108	protein C-5 cytosine-specific DNA methylase
Contig5709_at	0,42	-2,86	0,15	-0,15	LOC_Os03g18590.1	1,00E-171	protein malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase, mitochondrial precursor
HVSMEk0017G01f_s_at	-3,27	-1,56	1,44	1,97	LOC_Os02g40010.4	1,00E-101	protein phosphoribosyl transferase
Contig4227_at	-0,60	-2,45	0,55	0,62	LOC_Os05g42230.1	1,00E-115	protein universal stress protein domain containing protein
Contig12323_at	-0,31	-2,57	0,43	0,31	LOC_Os06g37610.1	0,0	protein Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase
Contig19202_at	0,77	-3,00	0,00	-0,05	LOC_Os06g49680.1	3,00E-43	protein expressed protein
Contig3822_at	2,00	-2,85	0,15	-0,13	LOC_Os02g39160.1	0,0	protein hydroxymethylbutenyl 4-diphosphate synthase
Contig7733_at	2,62	-2,27	0,73	-0,61	LOC_Os02g42350.1	0,0	protein nitrilase
Contig22223_at	-0,64	-2,39	0,60	0,90	LOC_Os03g20890.1	2,00E-10	protein transposon protein, putative, Mutator sub-class
Contig17419_at	-2,55	-1,42	1,58	2,03	LOC_Os04g11195.1	7,00E-05	protein gamma-thionin family domain containing protein
Contig8506_at	2,71	-2,93	0,06	-0,12	LOC_Os01g40710.1	8,00E-72	protein high light inducible protein
Contig7242_at	-0,31	-2,70	0,29	0,21	LOC_Os12g39420.9	0,0	protein nucleobase-ascorbate transporter
HVSMEk0022B10r2_s_at	-1,39	-1,70	1,29	1,21	LOC_Os02g50640.1	0,0	protein HEAT repeat family protein
Contig16311_at	-1,16	-1,16	1,83	0,60	LOC_Os08g08230.1	4,00E-52	protein kinesin-like protein, identical
Contig7721_at	0,79	-2,36	0,63	-0,53	LOC_Os07g43070.1	1,00E-141	protein expressed protein
HVSMEb0011P07r2_at	-1,50	-1,59	1,40	1,35	LOC_Os04g02780.1	3,00E-42	protein amidase family protein
rbah37c06_s_at	-0,55	-2,53	0,46	0,71			
HVSMEk0025C01f_at	2,69	-2,83	0,15	-0,09			
Contig8103_s_at	-0,40	-2,67	0,30	0,72	LOC_Os02g16000.1	5,00E-75	protein E1-BTB1
Contig1430_at	1,86	-4,06	-1,09	0,78	LOC_Os01g46926.1	9,00E-84	protein ubiquitin-conjugating enzyme
Contig167_x_at	-2,00	-1,48	1,50	1,22	LOC_Os03g17100.1	2,00E-58	protein Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein
HS16O08u_s_at	-0,31	-2,44	0,54	0,31			
Contig6113_at	-0,79	-2,07	0,90	0,71	LOC_Os03g19280.1	0,0	protein argininosuccinate lyase
Contig15122_at	-0,92	-2,01	0,96	0,97	LOC_Os07g35050.1	2,00E-57	protein OsFBX237 - F-box domain containing protein
Contig3756_at	-0,70	-2,31	0,66	0,68	LOC_Os03g22880.1	1,00E-177	protein nucleolar protein 5A
Contig4806_at	3,65	-3,56	-0,59	0,46	LOC_Os10g22590.1	2,00E-71	protein POE124 - Pollen Ole e I allergen and extensin family protein precursor
HVSMEb0005E07r2_s_at	1,79	-3,59	-0,62	0,44	LOC_Os02g46610.1	1,00E-126	protein zinc-binding protein
Contig20198_at	-1,13	-1,98	0,98	0,62			
Contig9358_at	0,67	-3,14	-0,17	0,16	LOC_Os03g01710.1	5,00E-76	protein expressed protein
Contig17749_at	-2,69	-1,55	1,41	2,35	LOC_Os04g40320.1	1,00E-20	protein expressed protein
Contig24094_at	-1,27	-1,23	1,73	1,42	LOC_Os04g37970.1	8,00E-47	protein transporter family protein, putative
Contig12132_s_at	-0,69	-2,25	0,71	0,79	LOC_Os08g07060.1	1,00E-100	protein CRR6
Contig13178_at	-0,09	-2,73	0,23	0,09	LOC_Os05g36090.1	0,0	protein zinc finger DHHC domain-containing protein
Contig1161_at	-1,13	-1,63	1,32	1,08	LOC_Os01g05630.1	2,00E-63	protein Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein
Contig13573_at	5,08	-2,04	0,91	-0,75	LOC_Os07g44780.1	1,00E-92	protein GDSL-like lipase/acylhydrolase
Contig10360_at	3,08	-2,65	0,30	-0,18	LOC_Os01g11230.1	1,00E-105	protein SOUL heme-binding protein
Contig11618_at	3,92	-2,40	0,55	-0,65	LOC_Os04g34170.3	9,00E-13	protein retrotransposon protein, putative, unclassified
HW06K22u_s_at	-0,06	-2,70	0,24	0,99	LOC_Os08g34050.1	0,0	protein phosphofructokinase, putative
HU05A05u_s_at	1,02	-3,84	-0,90	1,17	LOC_Os05g37690.1	0,0	protein OsFBL23 - F-box domain and LRR containing protein
Contig19879_at	-0,07	-2,94	0,00	0,88	LOC_Os09g35760.2	1,00E-106	protein homeobox and START domains containing protein
Contig21227_at	1,76	-3,19	-0,25	0,17	LOC_Os05g32530.1	4,00E-80	protein mannosylglycoprotein endo-beta-mannosidase
Contig9882_s_at	-0,18	-2,41	0,53	0,20	LOC_Os07g31270.1	1,00E-120	protein cupin 2, conserved barrel domain protein
Contig5503_s_at	-2,55	-1,46	1,48	2,49	LOC_Os01g65920.2	2,00E-72	protein F-box/LRR-repeat protein 2
Contig9877_at	4,56	-3,50	-0,57	0,68	LOC_Os03g02920.1	1,00E-141	protein peroxidase precursor
HW02G11u_s_at	-0,83	-2,17	0,76	1,14	LOC_Os05g36920.1	2,00E-59	protein histone deacetylase
Contig16523_at	0,61	-2,89	0,04	-0,10	LOC_Os01g41870.2	1,00E-145	protein protein kinase
Contig12718_at	-0,32	-2,72	0,20	0,11	LOC_Os06g13660.1	0,0	protein alanyl-tRNA synthetase
Contig14822_at	-1,02	-2,05	0,87	1,45	LOC_Os03g43440.1	5,00E-61	protein CAMK_KIN1/SNF1/Nim1_like.17
Contig16911_at	-2,27	-1,56	1,35	1,37	LOC_Os04g58630.2	6,00E-93	protein DNA mismatch repair protein MSH3
Contig14300_at	-0,34	-2,59	0,32	0,35	LOC_Os02g44780.3	1,00E-168	protein polyprenyl synthetase
Contig2458_s_at	0,24	-3,17	-0,26	0,58	LOC_Os05g41930.3	1,00E-160	protein N-rich protein
Contig5486_at	-0,02	-2,82	0,09	0,11	LOC_Os10g27340.2	1,00E-147	protein oxidoreductase
Contig18640_at	-0,71	-1,74	1,17	0,60	LOC_Os09g11510.1	1,00E-101	protein phosphoglycerate mutase
Contig653_at	2,64	-3,48	-0,58	0,57	LOC_Os03g21080.1	8,00E-83	protein guanine nucleotide exchange factor
Contig15405_s_at	-1,16	-1,24	1,67	0,87	LOC_Os12g44160.2	1,00E-149	protein oxidoreductase
Contig9121_at	-1,44	-1,56	1,35	1,78	LOC_Os05g07870.1	0,0	protein triose phosphate/phosphate translocator, non-green plastid, chloroplast
Contig13869_at	-0,51	-2,32	0,58	0,75	LOC_Os07g47180.1	1,00E-154	protein transposon protein, putative, unclassified

Probe Set	Odi	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
Contig4566_at	-1.51	-1.25	1.66	3.29	LOC_Os11g08100.1	2,00E-90	protein eukaryotic aspartyl protease domain containing protein
Contig14020_at	4.17	-3.96	-1.05	0.81	LOC_Os01g02940.6	2,00E-78	protein glycosyltransferase protein
HO04B16S_at	0,14	-3,07	-0,17	0,55	LOC_Os05g05830.1	1,00E-64	protein bifunctional protein fold
Contig1803_at	2,30	-4,07	-1,16	0,28	LOC_Os02g41630.2	0,0	protein phenylalanine ammonia-lyase
Contig6980_at	-0,49	-2,32	0,58	0,76	LOC_Os05g05950.1	0,0	protein TOC159
Contig4518_s_at	3,04	-2,74	0,17	-0,13	LOC_Os07g06080.1	0,0	protein FAD dependent oxidoreductase domain containing protein
Contig1881_at	0,00	-2,90	0,00	0,93	LOC_Os05g43690.1	1,00E-68	protein glucan endo-1,3-beta-glucosidase-like protein 3 precursor
Contig5121_s_at	-0,74	-2,21	0,69	0,71	LOC_Os10g43050.1	1,00E-118	protein OsClp11 - Putative Clp protease homologue
Contig7268_s_at	-0,75	-2,21	0,68	1,08	LOC_Os08g08820.2	1,00E-25	protein homeobox and START domains containing protein
Contig3640_at	-1,30	-1,66	1,24	1,51	LOC_Os07g27790.1	0,0	protein glutamate-cysteine ligase, chloroplast precursor
Contig13494_at	0,53	-2,84	0,05	-0,16	LOC_Os02g35190.2	0,0	protein chloride channel protein
Contig14612_at	0,92	-3,29	-0,40	0,38	LOC_Os01g11040.1	1,00E-119	protein SCAR-like protein 2
Contig6552_at	-0,09	-2,73	0,16	0,20	LOC_Os06g27770.1	1,00E-148	protein isoflavone reductase homolog IRL
Contig14920_at	-0,77	-1,05	1,84	0,85	LOC_Os01g56880.1	4,00E-75	protein purple acid phosphatase precursor
Contig9640_at	-0,29	-2,57	0,32	0,50	LOC_Os11g40510.1	0,0	protein RNA recognition motif containing protein
Contig6238_s_at	-2,98	-1,46	1,42	2,93	LOC_Os01g27210.1	1,00E-103	protein glutathione S-transferase
Contig16483_at	-1,76	-1,39	1,49	1,31	LOC_Os04g38450.1	1,00E-132	protein gamma-glutamyltranspeptidase 1 precursor
Contig26529_at	-0,68	-1,75	1,13	3,14	LOC_Os09g33460.2	2,00E-08	protein double-stranded RNA binding motif containing protein
Contig11415_at	2,31	-3,18	-0,30	0,23	LOC_Os06g13030.1	1,00E-146	protein OsLIM
Contig23598_at	2,95	-3,65	-0,77	0,56	LOC_Os08g44840.1	8,00E-42	protein transferase family protein
Contig5628_at	0,07	-2,78	0,09	0,01	LOC_Os03g32270.1	1,00E-147	protein hydrolase, alpha/beta fold family domain containing protein
Contig1741_at	-3,43	-1,27	1,60	2,62	LOC_Os12g42860.1	2,00E-91	protein 2-aminoethanethiol dioxygenase
Contig22576_at	-1,63	-1,14	1,73	1,03	LOC_Os10g41390.1	1,00E-143	protein protein kinase domain containing protein
HVSMEm0007K04r2_at	-1,11	-1,73	1,14	1,21	LOC_Os09g16330.2	9,00E-39	protein pleiotropic drug resistance protein
Contig6878_s_at	-0,85	-1,91	0,96	0,71	LOC_Os09g12290.1	1,00E-108	protein bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase
Contig16878_at	0,82	-3,69	-0,82	0,62	LOC_Os11g01200.2	1,00E-146	protein senescence-induced receptor-like serine/threonine-protein kinase
Contig20722_at	-0,81	-1,77	1,09	0,84	LOC_Os02g02500.1	1,00E-148	protein remorin family protein
Contig12308_at	-0,31	-2,24	0,63	0,11	LOC_Os07g29220.1	0,0	protein Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase
Contig10604_at	1,37	-3,11	-0,25	0,09	LOC_Os03g54910.1	2,00E-51	protein X8 domain containing protein
Contig15518_at	-0,06	-2,86	0,00	2,32	LOC_Os10g28060.1	0,0	protein 3-ketoacyl-CoA synthase
Contig25221_at	-2,62	-1,11	1,75	0,95	LOC_Os12g03130.1	4,00E-33	protein CDC45A - Putative DNA replication initiation protein
Contig4592_s_at	0,44	-3,12	-0,26	0,19	LOC_Os01g43410.1	0,0	protein CAMK_CAMK_like.9
Contig14_at	-2,11	-1,06	1,79	1,02	LOC_Os04g34240.1	4,00E-71	protein histone H3
Contig7592_at	-2,04	-1,28	1,57	1,26	LOC_Os06g02530.1	3,00E-62	protein expressed protein
HA22L21r_at	-3,09	-1,00	1,85	0,88			
HM02H10u_at	2,42	-2,84	0,00	0,00	LOC_Os06g13750.1	6,00E-05	protein expressed protein
Contig10468_at	-1,57	-1,32	1,52	1,24	LOC_Os02g47150.1	1,00E-125	protein DNA topoisomerase 2
Contig10362_at	-0,75	-2,17	0,68	0,74	LOC_Os09g26580.1	2,00E-17	protein expressed protein
Contig25090_at	-0,21	-2,27	0,57	0,25	LOC_Os08g10510.2	1,00E-96	protein aminotransferase
Contig9069_at	4,94	-3,27	-0,43	0,00	LOC_Os10g36170.1	1,00E-26	protein LTP160 - Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein precursor
Contig3398_at	-2,28	-1,37	1,46	1,07	LOC_Os10g28230.1	2,00E-69	protein Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein
Contig3573_s_at	-0,69	-1,70	1,14	0,49	LOC_Os05g33100.1	1,00E-112	protein endo-1,3;1,4-beta-D-glucanase precursor
Contig20263_at	-0,13	-2,67	0,16	0,26	LOC_Os10g42240.1	6,00E-57	protein kinase, pfkB family
Contig10203_at	0,00	-2,83	0,00	0,37	LOC_Os09g29380.2	2,00E-70	protein expressed protein
Contig5792_at	-0,56	-1,84	0,99	0,57	LOC_Os08g33190.1	1,00E-47	protein linker histone H1 and H5 family protein
Contig16466_at	-0,24	-2,53	0,30	0,11	LOC_Os10g36710.1	0,0	protein CAMK_CAMK_like.40
Contig5656_at	-2,85	-1,43	1,40	1,96	LOC_Os02g40010.4	1,00E-101	protein phosphoribosyl transferase
Contig12146_at	-2,04	-1,46	1,37	1,43	LOC_Os08g29110.1	8,00E-63	protein thioredoxin
HC108C09_SK_at	-0,35	-1,44	1,38	0,42	LOC_Os01g48790.3	1,00E-101	protein YT521-B-like family domain containing protein
Contig37_at	-2,76	-1,09	1,74	0,95	LOC_Os10g39410.1	3,00E-53	protein Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein
Contig24256_at	-0,39	-2,59	0,23	0,40	LOC_Os01g60700.1	2,00E-25	protein serine/threonine-protein kinase NAK
Contig9837_at	-1,34	-1,45	1,37	1,23	LOC_Os02g50010.1	0,0	protein APO
Contig26328_at	-4,83	-1,35	1,47	1,77	LOC_Os03g38800.1	2,00E-32	protein AAA family ATPase
Contig5629_at	1,82	-3,39	-0,57	0,49	LOC_Os02g30470.1	3,00E-30	protein expressed protein
Contig20819_at	0,28	-2,96	-0,15	0,59	LOC_Os03g20450.1	6,00E-45	protein expressed protein
HW08K02u_at	2,77	-1,77	1,04	-1,17	LOC_Os03g41390.1	2,00E-11	protein ZOS3-15 - C2H2 zinc finger protein
Contig14371_at	1,60	-3,25	-0,44	0,26	LOC_Os07g01240.1	3,00E-98	protein expressed protein
Contig13788_at	-0,51	-2,46	0,34	0,97	LOC_Os06g01320.1	1,00E-100	protein chromo domain containing protein
HO02E11S_s_at	1,09	-3,08	-0,27	0,19	LOC_Os01g48330.1	1,00E-127	protein protein kinase domain containing protein
Contig18665_at	-0,34	-2,64	0,17	0,32	LOC_Os08g39310.1	6,00E-67	protein SWIB/MDM2 domain containing protein
Contig14429_at	-0,69	-1,99	0,81	0,64	LOC_Os04g54940.1	1,00E-72	protein ATEB1A-like microtubule associated protein
Contig919_s_at	1,35	-2,84	-0,03	0,00	LOC_Os02g36940.1	2,00E-74	protein uncharacterized Cys-rich domain containing protein
Contig1459_at	-0,01	-2,78	0,02	0,01	LOC_Os06g29180.1	0,0	protein erythronate-4-phosphate dehydrogenase domain containing protein
Contig6917_at	-0,81	-2,05	0,75	1,25	LOC_Os07g43040.1	1,00E-43	protein heavy metal-associated domain containing protein
Contig4613_at	1,20	-2,58	0,22	-0,32	LOC_Os02g03100.2	1,00E-169	protein oxidoreductase, aldo/keto reductase family protein
Contig15384_at	-0,71	-1,60	1,19	0,66	LOC_Os07g39430.1	1,00E-109	protein mTERF family protein
EBpi07_SQ002_E23_s_at	-1,22	-1,04	1,75	0,81	LOC_Os01g16650.1	3,00E-87	protein ubiquitin-conjugating enzyme
Contig8590_at	0,13	-2,93	-0,14	0,54	LOC_Os02g47640.1	0,0	protein OsFBT4 - F-box and tubby domain containing protein
Contig12222_at	-0,09	-2,79	0,00	1,06	LOC_Os11g11990.1	1,00E-156	protein NB-ARC domain containing protein
Contig16567_at	2,69	-2,60	0,18	-0,21	LOC_Os01g67220.2	4,00E-35	protein Os1bglu4 - beta-glucosidase-like protein without signal sequence

Probe Set	Odi	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
EBro03_SQ005_P18_at	-1.57	-0.82	1.96	0.56			
Contig7748_at	-1.00	-1.67	1.11	1.42	LOC_Os01g55290.2	1,00E-127	protein PPR repeat domain containing protein
Contig9052_at	4.80	-2.91	-0.13	0.03	LOC_Os03g53950.1	1,00E-111	protein strictosidine synthase
EBro03_SQ005_P18_x_at	-1.93	-0.80	1.98	0.59			
Contig13888_at	3.18	-3.30	-0.52	0.39	LOC_Os04g51792.1	1,00E-102	protein PAP fibrillin family domain containing protein
Contig8932_s_at	-0.32	-2.44	0.34	0.47	LOC_Os03g62240.1	6,00E-87	protein expressed protein
HV_CEb0009O15r2_s_at	-1.82	-1.44	1.33	1.61	LOC_Os03g51390.1	5,00E-47	protein expressed protein
HZ47110r_at	-2.50	-1.35	1.42	1.72			
Contig4367_s_at	-0.39	-2.11	0.67	0.37	LOC_Os04g36760.1	2,00E-52	protein enzyme of the cupin superfamily protein
Contig8347_at	-0.05	-2.78	0.00	0.19	LOC_Os03g48000.1	0.0	protein CoRA-like magnesium transporter protein
Contig5244_at	-1.19	-1.67	1.11	0.99	LOC_Os01g48960.1	0.0	protein glutamate synthase, chloroplast precursor
Contig24024_at	-0.67	-2.01	0.77	1.28			
EBro02_SQ008_C08_at	-0.85	-1.63	1.14	0.89	LOC_Os02g26300.1	3,00E-06	protein expressed protein
HV08108u_at	-0.82	-1.97	0.80	0.76	LOC_Os06g01400.1	3,00E-38	protein glycyl-tRNA synthetase 2, chloroplast/mitochondrial precursor
Contig16273_at	-5.66	-1.18	1.59	1.03	LOC_Os05g34550.1	0.0	protein MLO domain containing protein
Contig9871_at	-1.15	-1.70	1.07	1.23	LOC_Os01g45640.1	5,00E-26	protein tat pathway signal sequence family protein
Contig13703_at	-0.30	-2.25	0.51	1.13	LOC_Os11g10050.1	1,00E-159	protein G-protein alpha subunit
Contig24813_at	-1.56	-1.09	1.67	1.07	LOC_Os03g41100.1	2,00E-25	protein cyclin
Contig20999_at	-0.79	-1.94	0.82	0.77	LOC_Os06g11180.1	1,00E-140	protein OsPOP12 - Putative Prolyl Oligopeptidase homologue
Contig11529_at	1.58	-3.76	-0.99	0.75	LOC_Os09g23350.1	1,00E-142	protein trehalose synthase
Contig16074_at	1.89	-3.23	-0.47	0.42	LOC_Os12g10720.2	2,00E-91	protein glutathione S-transferase
Contig17227_at	0.13	-1.46	1.30	-0.04	LOC_Os01g47350.1	6,00E-67	protein enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein
Contig17654_at	1.42	-2.86	-0.10	0.13	LOC_Os06g47310.1	1,00E-103	protein plant-specific domain TIGR01627 family protein
HS09O21u_at	-4.17	-1.51	1.25	1.49	LOC_Os01g64790.1	1,00E-80	protein AP2 domain containing protein
Contig5784_s_at	-3.27	-1.41	1.35	1.23	LOC_Os03g02670.2	1,00E-171	protein transporter family protein
Contig19848_at	-3.48	-1.08	1.68	0.94			
Contig5540_at	0.55	-2.85	-0.10	0.09	LOC_Os01g14860.3	0.0	protein CGMC_GSK.1 - CGMC includes CDA, MAPK, GSK3, and CLKC kinases
Contig9623_at	2.57	-2.87	-0.12	0.16	LOC_Os03g04430.1	0.0	protein protein phosphatase 2C
rbaal30a15_s_at	-0.47	-2.24	0.51	0.69	LOC_Os05g05950.1	0.0	protein TOC159
Contig24103_at	-0.78	-1.08	1.67	0.84	LOC_Os05g38480.1	8,00E-44	protein kinesin motor domain containing protein
Contig25757_at	4.50	-3.23	-0.49	0.46	LOC_Os01g21560.1	4,00E-54	protein esterase/lipase/thioesterase family protein
Contig16347_s_at	0.41	-3.07	-0.33	0.17	LOC_Os08g34060.4	8,00E-74	protein DUF1336 domain containing protein
Contig3112_at	0.19	-2.74	0.00	0.07	LOC_Os03g55850.1	8,00E-83	protein cold acclimation protein WCOR413
Contig2455_at	-1.37	-1.30	1.45	1.68	LOC_Os01g70770.1	3,00E-73	protein glutathione S-transferase
Contig26034_at	-0.76	-1.91	0.83	0.73	LOC_Os11g39670.1	0.0	protein seryl-tRNA synthetase
Contig684_s_at	-1.38	-1.39	1.35	1.19	LOC_Os04g34240.1	3,00E-71	protein histone H3
Contig701_x_at	-1.85	-1.17	1.56	1.15	LOC_Os06g06480.1	2,00E-50	protein Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein
Contig1141_s_at	-1.06	-1.31	1.42	0.95	LOC_Os01g05630.1	1,00E-71	protein Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein
Contig13652_at	2.68	-3.11	-0.37	0.47	LOC_Os10g42820.2	0.0	protein early-responsive to dehydration protein-related
Contig7823_at	0.08	-3.06	-0.33	1.16	LOC_Os12g05040.1	4,00E-74	protein heavy-metal-associated domain-containing protein
Contig576_s_at	-0.95	-0.98	1.75	0.95	LOC_Os10g39410.1	3,00E-53	protein Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein
Contig12975_at	-0.95	-1.25	1.48	0.93	LOC_Os01g07400.2	2,00E-72	protein WD40-like domain containing protein
Contig14251_at	-0.65	-1.90	0.83	0.59	LOC_Os06g27860.1	4,00E-42	protein poor homologous synapsis 1 protein, putative
Contig8053_at	-0.93	-1.29	1.43	0.93	LOC_Os07g49230.2	0.0	protein ubiquitin-activating enzyme
Contig3457_at	-0.78	-1.97	0.75	0.63	LOC_Os05g08360.1	1,00E-151	protein rRNA 2-O-methyltransferase fibrillarin 2
Contig119_at	-0.46	-1.85	0.88	0.48	LOC_Os12g34510.1	1,00E-59	protein Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein
HO08C10S_at	-0.79	-2.09	0.64	0.88	LOC_Os09g35690.1	3,00E-83	protein zinc RING finger protein
EBro07_SQ002_G23_s_at	-0.06	-2.59	0.13	0.03	LOC_Os04g46010.1	0.0	protein PPR repeat domain containing protein
Contig10173_at	-1.03	-1.68	1.04	1.24	LOC_Os04g36660.1	2,00E-72	protein calmodulin binding protein
HF04F14r_at	1.38	-1.67	1.05	-1.12			
Contig26491_at	-1.18	-1.22	1.50	1.23			
Contig9782_at	-1.56	-1.22	1.50	1.69	LOC_Os08g36530.1	4,00E-19	protein aspartic proteinase nepenthesin precursor, putative
Contig13490_at	1.40	-2.96	-0.24	0.14	LOC_Os03g06410.1	0.0	protein protein kinase domain containing protein
Contig13187_at	-2.03	-1.11	1.61	1.16	LOC_Os07g22400.2	0.0	protein POLA3 - Putative DNA polymerase alpha complex subunit
Contig1314_s_at	6.36	-3.87	-1.16	1.20	LOC_Os08g01380.1	2,00E-53	protein 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain containing protein
Contig15934_at	-0.42	-2.02	0.69	0.18	LOC_Os03g07960.1	4,00E-60	protein expressed protein
Contig6416_s_at	1.02	-2.71	0.00	0.07	LOC_Os05g35540.1	1,00E-169	protein GTPase of unknown function domain containing protein
Contig9632_at	-1.58	-1.61	1.10	2.43	LOC_Os10g38160.1	3,00E-72	protein glutathione S-transferase
Contig2456_at	-0.02	-2.66	0.04	0.05	LOC_Os01g70770.1	2,00E-82	protein glutathione S-transferase
HVSMF0016O08r2_s_at	2.15	-4.36	-1.66	1.30	LOC_Os02g04670.1	0.0	protein glucan endo-1,3-beta-glucosidase precursor
Contig12261_at	0.22	-3.02	-0.32	0.53	LOC_Os05g13780.1	0.0	protein C-5 cytosine-specific DNA methylase
Contig10899_at	-0.25	-2.40	0.30	0.44	LOC_Os03g07790.1	1,00E-137	protein zinc finger, C3HC4 type domain containing protein
Contig455_s_at	2.94	-2.83	-0.13	0.14	LOC_Os07g34570.1	1,00E-173	protein FAD dependent oxidoreductase domain containing protein
Contig7973_at	0.50	-2.87	-0.17	0.85	LOC_Os01g69920.2	0.0	protein histidine kinase
Contig20759_at	-0.78	-1.91	0.79	1.49	LOC_Os03g60650.1	1,00E-44	protein protein phosphatase 2C
Contig6166_at	2.70	-2.63	0.07	-0.02	LOC_Os08g43320.1	1,00E-162	protein OsRhmbd14 - Putative Rhomboid homologue
Contig16437_at	0.68	-2.42	0.28	-0.19	LOC_Os04g48490.1	2,00E-41	protein fasciclin-like arabinogalactan protein
Contig7876_at	1.20	-3.59	-0.89	0.65	LOC_Os04g58160.2	1,00E-67	protein fiber protein Fb34
Contig3066_at	-0.26	-2.25	0.44	1.34	LOC_Os05g30010.1	2,00E-18	protein WD domain, G-beta repeat domain containing protein
Contig4826_at	-0.60	-2.12	0.57	0.88	LOC_Os01g16870.4	0.0	protein argonaute

Probe Set	Odi	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
Contig8678_at	-0,65	-1,69	1,00	0,68	LOC_Os09g12290.1	1,00E-108	protein bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase, chloroplast
HZ59C04r_s_at	0,92	-2,88	-0,19	0,22	LOC_Os01g59440.1	1,00E-110	protein BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1
Contig4711_s_at	2,75	-3,24	-0,56	0,57	LOC_Os06g49430.1	0,0	protein CGMC_MAPKCMGC_2.11
Contig9283_at	-1,05	-1,79	0,89	1,93			
HVSMEn0012L05r2_at	-5,05	-1,01	1,68	0,85	LOC_Os05g49100.1	3,00E-30	protein OsWRKY49 - Superfamily of TFs having WRKY and zinc finger domains
Contig12847_at	-0,35	-2,37	0,32	0,54	LOC_Os03g19590.1	1,00E-31	protein phytochrome B
Contig9551_at	-1,08	-1,72	0,97	1,71	LOC_Os04g39210.1	1,00E-134	protein agmatine deiminase
Contig23134_at	-1,16	-1,37	1,29	2,69			
HF01O24T_at	0,34	-1,58	1,08	-0,25			
Contig25153_at	-0,81	-1,22	1,43	0,74	LOC_Os07g36250.3	3,00E-44	protein peptide chain release factor protein
Contig2400_at	0,62	-2,80	-0,14	0,11	LOC_Os02g01010.1	0,0	protein OsPDIL1-4 protein disulfide isomerase PDIL1-4
Contig24499_at	-1,52	-1,22	1,43	3,89	LOC_Os02g47810.1	1,00E-33	protein dof zinc finger domain containing protein
HVSMEn0019G06F_at	-0,96	-2,06	0,59	1,73	LOC_Os10g21354.1	1,00E-09	protein chloroplast 50S ribosomal protein L2, putative
Contig15363_at	-0,91	-1,45	1,20	0,86	LOC_Os03g15930.2	1,00E-103	protein OTU-like cysteine protease family protein
Contig9747_at	-0,83	-1,22	1,43	0,79	LOC_Os01g18210.1	1,00E-107	protein peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
Contig5969_at	-0,36	-2,24	0,41	0,43	LOC_Os02g47310.1	1,00E-159	protein Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase
Contig8088_at	-0,10	-2,56	0,08	0,75	LOC_Os03g06120.3	0,0	protein PLAC8 family protein
Contig4341_s_at	-0,28	-2,30	0,35	0,46	LOC_Os02g57040.1	0,0	protein dehydrogenase
Contig21196_at	4,72	-2,21	0,43	-0,35	LOC_Os06g43810.1	5,00E-33	protein expressed protein
HA03G23u_at	-2,00	-1,01	1,63	1,01	LOC_Os03g46640.1	3,00E-41	protein deoxyuridine 5-triphosphate nucleotidohydrolase
Contig17635_at	-2,76	-1,11	1,53	1,13			
Contig6732_at	0,13	-2,82	-0,19	0,19	LOC_Os04g33390.1	0,0	protein prephenate dehydratase domain containing protein
Contig721_s_at	0,64	-2,64	-0,02	0,00	LOC_Os01g45274.3	1,00E-112	protein carbonic anhydrase, chloroplast precursor
HA24C19r_s_at	4,77	-3,44	-0,82	0,70	LOC_Os07g45060.1	9,00E-91	protein uncharacterized GPI-anchored protein At5g19240 precursor
Contig11100_at	1,43	-2,84	-0,22	0,21	LOC_Os09g36600.1	1,00E-110	protein nodulin
Contig20728_at	-0,87	-1,73	0,89	1,60	LOC_Os02g50560.1	3,00E-65	protein DSHCT domain containing protein
Contig5754_s_at	6,34	-3,67	-1,05	0,84	LOC_Os07g27810.1	1,00E-89	protein fiber protein Fb34
HU11D20u_s_at	-0,11	-2,52	0,10	0,25	LOC_Os10g27340.2	1,00E-147	protein oxidoreductase
Contig135_at	-2,56	-1,07	1,54	1,04	LOC_Os11g05730.1	4,00E-70	protein histone H3
Contig25030_s_at	-1,39	-1,30	1,31	1,15	LOC_Os01g67740.1	9,00E-80	protein chromosome segregation protein
Contig24748_at	-0,71	-1,93	0,68	0,84	LOC_Os10g27990.1	1,00E-54	protein exocyst complex component 6
Contig17834_at	-0,89	-0,56	2,06	0,69	LOC_Os06g45250.1	2,00E-63	protein tRNA pseudouridine synthase family protein
Contig20681_at	-3,54	-0,86	1,76	0,91	LOC_Os01g54420.1	1,00E-48	protein dynamin family protein
Contig19502_at	1,96	-2,78	-0,17	0,14	LOC_Os09g29960.1	5,00E-36	protein dof zinc finger domain containing protein
Contig12960_at	-1,18	-1,40	1,21	1,04	LOC_Os02g16660.2	1,00E-127	protein cbxX, chromosomal
Contig13114_at	-1,13	-1,65	0,96	1,42	LOC_Os10g33270.1	6,00E-08	protein cyanate hydratase
Contig11869_at	-0,60	-1,63	0,98	0,56	LOC_Os02g05880.1	7,00E-25	protein RNA polymerase Rpb1, domain 2 family protein
HI04H23u_at	-0,02	-2,61	0,00	0,09	LOC_Os04g42840.1	2,00E-35	protein HEAT repeat family protein
Contig4811_at	0,67	-2,54	0,06	-0,04	LOC_Os04g48230.2	0,0	protein dehydration response related protein
Contig406_s_at	-0,68	-1,92	0,68	0,96	LOC_Os08g38900.1	1,00E-112	protein caffeoyl-CoA O-methyltransferase
Contig959_x_at	5,35	-3,35	-0,75	0,91	LOC_Os11g24070.1	5,00E-35	protein LTP10 - Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein precursor
HVSMEn0011H23r2_at	-0,51	-2,17	0,43	0,86	LOC_Os01g04880.1	3,00E-43	protein retrotransposon protein, putative, unclassified
Contig25010_at	-1,71	-1,36	1,23	1,43			
Contig18084_at	-0,94	-1,65	0,94	1,20	LOC_Os10g33940.1	7,00E-38	protein auxin response factor 18
EBem10_SQ001_P13_s_at	-0,99	-1,41	1,18	2,33	LOC_Os03g20680.1	1,00E-127	protein late embryogenesis abundant protein 1
Contig25912_at	-2,52	-1,40	1,19	1,27	LOC_Os03g58080.1	6,00E-51	protein BT1 family protein
Contig6691_at	0,68	-2,59	0,00	0,05	LOC_Os04g51240.1	2,00E-81	protein EF hand family protein
Contig9936_at	-0,85	-1,88	0,71	0,59	LOC_Os12g35630.3	3,00E-62	protein elongation factor TS family protein
Contig19735_at	0,12	-2,69	-0,10	0,39	LOC_Os05g44360.1	1,00E-59	protein oligosaccharyl transferase
Contig2425_s_at	0,76	-2,76	-0,17	0,19	LOC_Os01g55830.1	2,00E-96	protein glutathione S-transferase
Contig11651_at	-1,30	-1,63	0,96	1,01	LOC_Os01g53890.1	1,00E-142	protein RNA methyltransferase, TrmH family protein
Contig11270_at	-1,00	-1,05	1,54	4,82	LOC_Os03g44540.1	2,00E-86	protein nuclear transcription factor Y subunit
Contig11195_at	-2,02	-1,06	1,53	1,09	LOC_Os06g45330.1	4,00E-58	protein endonuclease V
Contig26594_at	-2,09	-0,64	1,95	0,36			
Contig23678_at	-0,39	-2,15	0,43	0,42	LOC_Os05g07210.1	1,00E-135	protein metal cation transporter
Contig6963_at	-0,15	-2,14	0,45	0,00	LOC_Os05g01970.5	1,00E-135	protein NAD dependent epimerase/dehydratase family protein
Contig15066_at	1,26	-2,84	-0,25	0,32	LOC_Os05g03190.1	2,00E-76	protein IQ calmodulin-binding motif domain containing protein
Contig8711_at	1,31	-2,91	-0,33	0,21	LOC_Os09g26660.1	0,0	protein ferric reductase
Contig19917_at	-1,63	-0,80	1,78	0,85			
Contig186_x_at	-1,85	-1,12	1,45	1,08	LOC_Os04g34240.1	2,00E-71	protein histone H3
Contig615_at	0,96	-2,56	0,02	-0,08	LOC_Os02g09750.1	1,00E-135	protein lycopene beta cyclase, chloroplast precursor
HVSMEn0083O16r2_s_at	0,96	-2,72	-0,15	0,28	LOC_Os01g55830.1	2,00E-96	protein glutathione S-transferase
Contig4344_at	-1,58	-1,27	1,30	1,01	LOC_Os08g31810.3	1,00E-102	protein RNA recognition motif containing protein
Contig3966_at	0,86	-3,10	-0,53	0,53	LOC_Os01g70190.1	0,0	protein exostosin family domain containing protein
Contig9761_at	0,46	-2,64	-0,07	0,15	LOC_Os01g72340.1	0,0	protein beta-galactosidase
Contig10595_at	-0,48	-2,03	0,54	1,32	LOC_Os09g28300.2	1,00E-158	protein remorin C-terminal domain containing protein
HI05D03u_at	0,01	-2,55	0,02	0,01	LOC_Os02g47030.1	2,00E-33	protein expressed protein
Contig12711_at	1,30	-2,73	-0,17	0,19	LOC_Os01g48220.1	1,00E-150	protein protein of unknown function DUF1421 domain containing protein
EBem05_SQ001_G16_at	-1,10	-1,06	1,51	1,25			
HF21B24r_s_at	-1,06	-1,31	1,25	1,03	LOC_Os10g40050.1	6,00E-72	protein tetratricopeptide repeat domain containing protein

Probe Set	Odi	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
Contig239_s_at	-1,25	-1,14	1,42	1,14	LOC_Os03g17100.1	2,00E-60	protein Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein
Contig16713_at	-1,02	-1,00	1,56	0,98	LOC_Os12g03960.1	1,00E-102	protein dehydrogenase-phosphopantetheinyltransferase
Contig3821_s_at	-0,77	-1,81	0,75	0,59	LOC_Os03g22730.1	0.0	protein nucleolar protein NOP5-1, putative
HV12H04u_at	-2,25	-1,33	1,22	1,61			
Contig11977_at	0,01	-2,57	-0,01	0,32	LOC_Os06g12220.1	2,00E-94	protein HVA22
Contig4618_at	0,71	-2,86	-0,31	0,31	LOC_Os01g05670.1	1,00E-175	protein 3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase
Contig6782_at	3,99	-2,83	-0,28	0,21	LOC_Os05g48900.1	2,00E-95	protein fasciclin domain containing protein
Contig4194_at	-0,79	-1,59	0,96	2,06	LOC_Os11g39990.1	0.0	protein patatin
EBem09_SQ004_H15_x_at	-0,79	-2,23	0,31	0,93			
Contig16557_at	0,47	-2,42	0,13	-0,13	LOC_Os06g27800.2	7,00E-69	protein tm-1GCR237 protein
Contig11447_at	-1,53	-1,23	1,31	1,05	LOC_Os04g44210.1	6,00E-53	protein expressed protein
Contig18674_at	-0,13	-2,44	0,10	0,38			
Contig22271_at	-1,79	-1,15	1,40	1,06	LOC_Os09g24220.1	1,00E-32	protein MSH-like DNA mismatch repair protein, putative
Contig21874_at	-0,83	-1,22	1,32	0,92	LOC_Os02g34570.2	6,00E-39	protein exosome complex exonuclease
Contig15736_s_at	1,13	-3,18	-0,64	0,51	LOC_Os02g56200.2	2,00E-21	protein ELMO/CED-12 family protein
Contig7966_at	-0,15	-2,39	0,15	0,20			
Contig15179_at	0,49	-2,82	-0,27	0,24	LOC_Os08g17870.1	3,00E-97	protein reticulon domain containing protein
HX10003r_at	2,95	-2,06	0,48	-0,29	LOC_Os03g57880.3	2,00E-54	protein glucan endo-1,3-beta-glucosidase precursor
Contig23673_at	-0,56	-1,91	0,62	0,98			
Contig8056_at	0,62	-2,36	0,18	-0,10	LOC_Os02g52720.1	4,00E-51	protein peroxisomal multifunctional enzyme type 2, putative
Contig17296_at	-0,53	-1,99	0,55	1,10	LOC_Os09g39740.4	2,00E-73	protein ACT domain containing protein
Contig17954_at	-0,03	-2,46	0,08	2,24	LOC_Os01g49380.1	2,00E-74	protein lipase
Contig4755_at	1,98	-5,39	-2,86	3,59	LOC_Os01g10490.1	9,00E-90	protein keratin, type I cytoskeletal 9
Contig15802_at	-0,64	-1,58	0,96	0,53	LOC_Os11g47320.2	9,00E-68	protein protein transporter
rbaal24b05_s_at	-2,20	-1,07	1,46	1,08	LOC_Os04g42784.1	1,00E-72	protein DNA mismatch repair protein
Contig26142_at	-1,14	-1,50	1,03	1,25			
HW07A15u_at	-1,91	-1,28	1,25	1,72	LOC_Os06g13020.2	2,00E-10	protein DNA polymerase lambda
Contig14945_at	-3,70	-0,40	2,13	0,27	LOC_Os03g54000.2	1,00E-80	protein oligopeptide transporter
Contig10866_at	-0,99	-1,49	1,05	0,83	LOC_Os07g10350.1	0.0	protein S1 RNA binding domain containing protein
Contig5234_at	-0,56	-1,89	0,64	0,88	LOC_Os03g22380.1	1,00E-141	protein RNA recognition motif containing protein
Contig10445_at	0,07	-2,54	-0,01	1,29	LOC_Os03g10800.3	1,00E-120	protein BTBN4
Contig12760_s_at	0,53	-2,58	-0,05	0,06	LOC_Os05g32140.1	1,00E-121	protein NAD dependent epimerase/dehydratase family protein
Contig11774_at	-1,56	-1,22	1,31	1,21	LOC_Os05g39850.1	0.0	protein MCM3
Contig12468_at	-0,92	-1,65	0,88	0,91	LOC_Os08g04270.3	3,00E-68	protein WD domain, G-beta repeat domain containing protein
Contig21107_at	-0,30	-1,78	0,74	0,30	LOC_Os02g03090.1	1,00E-75	protein expressed protein
Contig8437_at	0,60	-2,28	0,24	-0,27	LOC_Os01g69950.1	2,00E-81	protein ribosomal protein L27
Contig10341_at	-0,66	-1,94	0,59	1,29	LOC_Os01g01390.4	0.0	protein expressed protein
Contig3626_s_at	3,04	-2,99	-0,47	0,30	LOC_Os05g51420.2	1,00E-147	protein hypersensitive-induced response protein
Contig13842_at	0,08	-2,55	-0,02	0,25	LOC_Os02g30900.1	3,00E-51	protein protein kinase domain containing protein
Contig11745_at	-1,34	-1,05	1,47	1,53	LOC_Os02g50640.1	0.0	protein HEAT repeat family protein
Contig12713_at	-0,08	-2,33	0,19	0,27	LOC_Os05g04220.1	2,00E-67	protein nitrogen regulatory protein P-II
Contig10271_at	0,18	-2,73	-0,21	0,22	LOC_Os02g18450.1	1,00E-84	protein GTP-binding protein typA/bipA
Contig17611_at	-0,99	-1,44	1,08	0,94	LOC_Os03g12450.1	1,00E-100	protein nucleoporin
Contig8650_at	-1,65	-1,09	1,42	1,13	LOC_Os06g03910.1	6,00E-43	protein hydrolase, NUDIX family, domain containing protein
Contig5277_s_at	-2,78	-1,25	1,26	3,21	LOC_Os10g42610.1	3,00E-58	protein expressed protein
Contig11061_at	-0,77	-1,47	1,04	0,62	LOC_Os10g30640.1	1,00E-128	protein translin
Contig20809_at	-0,74	-1,26	1,25	0,75	LOC_Os01g71960.1	7,00E-90	protein endonuclease
Contig13686_at	2,46	-2,38	0,13	-0,17	LOC_Os07g40890.1	8,00E-25	protein IgA FC receptor precursor
Contig19663_at	0,49	-2,51	0,00	0,01	LOC_Os10g30600.2	5,00E-51	protein tyrosine protein kinase domain containing protein
Contig12129_at	0,74	-3,49	-0,98	1,39	LOC_Os06g48650.3	0.0	protein OsSub52 - Putative Subtilisin homologue
Contig13222_at	-1,53	-1,20	1,30	1,47	LOC_Os02g42230.1	1,00E-93	protein RPA2B - Putative single-stranded DNA binding complex subunit 2
Contig8600_at	-0,26	-2,21	0,30	0,66	LOC_Os01g25386.1	0.0	protein multidrug resistance-associated protein
HVSM Ea015E212_at	-1,37	-1,12	1,39	2,93			
Contig4238_at	1,30	-2,69	-0,19	0,20	LOC_Os01g43090.1	1,00E-175	protein oxidoreductase, aldo/keto reductase family protein
Contig3520_at	1,30	-2,51	-0,01	0,00	LOC_Os06g15990.1	0.0	protein aldehyde dehydrogenase
Contig24970_at	-2,60	-1,24	1,26	1,03	LOC_Os09g26999.1	5,00E-11	protein keratin-associated protein 5-4
HV05N08u_at	-0,27	-2,02	0,48	0,61	LOC_Os01g44310.2	1,00E-49	protein dnaJ domain containing protein
Contig9122_at	0,53	-2,76	-0,25	0,24	LOC_Os01g07370.2	1,00E-136	protein KIP1
Contig15448_at	-0,72	-1,88	0,62	0,98	LOC_Os01g42260.1	0.0	protein transcriptional corepressor LEUNIG
Contig14705_at	-0,59	-1,23	1,27	0,58	LOC_Os12g40190.1	1,00E-173	protein G-protein alpha subunit
Contig204_s_at	-1,18	-1,20	1,30	1,10	LOC_Os04g34240.1	8,00E-71	protein histone H3
Contig7916_at	5,07	-2,95	-0,45	0,08	LOC_Os07g01660.1	1,00E-66	protein dirigent
Contig7811_s_at	3,14	-3,30	-0,81	0,82	LOC_Os01g73580.1	0.0	protein glycosyl hydrolases
Contig23781_at	-0,72	-1,16	1,33	0,71			
EBro04_SQ002_l16_s_at	1,64	-3,43	-0,94	0,79	LOC_Os01g46926.1	9,00E-84	protein ubiquitin-conjugating enzyme
Contig17298_at	-0,98	-1,49	1,00	1,03	LOC_Os01g01780.1	3,00E-64	protein exostosin family protein
Contig487_s_at	-0,42	-1,91	0,58	0,97	LOC_Os08g09350.1	0.0	protein gar2
Contig16959_at	-0,86	-1,00	1,49	0,96	LOC_Os02g38680.1	0.0	protein EMB2423, putative
rbaal36n07_at	-1,60	-1,33	1,16	1,15	LOC_Os04g39410.1	2,00E-49	protein pentatricopeptide
Contig16987_at	-0,16	-2,44	0,05	0,13	LOC_Os11g36440.1	0.0	protein amine oxidase, flavin-containing, domain containing protein

Probe Set	Odi	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
Contig20382_at	0,64	-2,63	-0,15	0,13	LOC_Os04g10380.1	3,00E-24	protein glycine-rich protein
Contig15343_at	-0,71	-1,42	1,06	0,64	LOC_Os06g40740.1	6,00E-79	protein expressed protein
Contig12321_at	-4,17	-1,07	1,41	1,72	LOC_Os05g38040.4	8,00E-17	protein expressed protein
HF17J23r_at	-1,15	-1,64	0,84	0,92	LOC_Os08g37810.1	2,00E-24	protein transcription factor like protein
EBpi07_SQ0002_O14_at	-0,07	-2,30	0,18	0,18	LOC_Os03g15910.1	7,00E-05	protein membrane protein
Contig16509_at	-1,67	-1,26	1,22	1,11	LOC_Os01g66500.1	1,00E-154	protein phosphoribosylformylglycinamide synthase
Contig17516_at	-0,04	-2,41	0,07	0,12	LOC_Os08g16580.1	3,00E-24	protein Cf2/Cf5 disease resistance protein
Contig14860_at	-2,63	-1,11	1,37	1,15	LOC_Os05g19270.1	0,0	protein MSH-like DNA mismatch repair protein
Contig4830_at	1,64	-2,07	0,40	-0,40	LOC_Os11g08300.1	0,0	protein aldehyde dehydrogenase
Contig8654_at	-1,35	-1,29	1,19	1,09	LOC_Os01g27040.1	0,0	protein chromatin-remodeling complex ATPase chain
Contig6657_s_at	-1,43	-1,19	1,28	1,14	LOC_Os04g34240.1	1,00E-71	protein histone H3
Contig22652_at	-0,55	-1,86	0,61	0,76			
Contig125_at	-0,30	-2,03	0,44	0,99	LOC_Os01g11240.1	4,00E-69	protein DUF538 domain containing protein
Contig3250_at	0,08	-2,46	0,01	0,01	LOC_Os09g14670.1	0,0	protein phosphoenolpyruvate carboxylase
Contig338_at	-1,70	-1,16	1,31	1,12	LOC_Os04g34240.1	1,00E-71	protein histone H3
Contig2059_s_at	-1,01	-1,29	1,17	3,56	LOC_Os06g04950.1	1,00E-48	protein early nodulin 93 ENOD93 protein
HVSMa0012N07r2_at	0,09	-2,42	0,05	0,05	LOC_Os01g05080.1	2,00E-53	protein thylakoid luminal protein
Contig22799_at	-0,85	-1,64	0,82	0,90	LOC_Os01g42260.2	6,00E-41	protein transcriptional corepressor LEUNIG
Contig6032_s_at	-1,03	-1,19	1,28	0,96	LOC_Os09g28050.1	0,0	protein aspartate aminotransferase
Contig19784_at	-0,86	-1,70	0,77	1,96	LOC_Os12g41180.1	1,00E-123	protein LSTK-1-like kinase
HZ40B21r_s_at	1,46	-2,03	0,43	-0,30	LOC_Os06g49490.1	3,00E-65	protein ZOS6-10 - C2H2 zinc finger protein
Contig11632_at	-0,66	-1,71	0,75	1,54	LOC_Os09g17770.1	1,00E-104	protein retrotransposon protein, putative, unclassified
EBma03_SQ003_P07_at	-3,94	-0,75	1,71	0,44			
Contig13408_at	2,48	-3,99	-1,53	1,19			
Contig10803_s_at	0,36	-2,68	-0,23	0,57	LOC_Os07g09800.1	2,00E-91	protein expressed protein
Contig15094_at	-0,28	-2,09	0,37	0,23	LOC_Os07g31720.1	2,00E-70	protein GTPase activating protein
HA22C01r_s_at	-1,16	-1,01	1,44	0,90	LOC_Os04g34240.1	2,00E-70	protein histone H3
Contig7790_at	-1,12	-1,52	0,94	1,06	LOC_Os02g10810.1	2,00E-60	protein protein of unknown function domain containing protein
Contig8055_at	0,12	-2,45	0,00	0,06	LOC_Os05g41810.1	0,0	protein OsDegp8 - Putative Deg protease homologue
Contig1394_at	-0,38	-2,01	0,44	0,40	LOC_Os11g06390.6	0,0	protein actin
Contig15033_at	-0,26	-2,18	0,26	0,31	LOC_Os03g50390.1	0,0	protein AGC_AGC_other_GWLD.2
Contig10142_at	4,24	-1,36	1,08	-1,01	LOC_Os04g14150.1	1,00E-99	protein dehydration response related protein
Contig1132_s_at	-0,98	-1,41	1,03	0,93	LOC_Os01g05900.1	5,00E-60	protein Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein, putative
HVSMeg0005O19r2_at	-4,23	-0,30	2,14	0,33			
Contig19634_at	1,32	-3,89	-1,45	1,33	LOC_Os12g37840.1	1,00E-92	protein boron transporter protein
Contig7080_at	-6,35	-1,19	1,25	1,81	LOC_Os07g44499.1	1,00E-87	protein peroxidase
Contig9813_at	3,07	-3,41	-0,97	0,61	LOC_Os02g52040.1	1,00E-54	protein phosphate-induced protein 1 conserved region domain
Contig16757_at	3,75	-3,10	-0,65	0,78	LOC_Os05g38720.1	2,00E-68	protein Lung seven transmembrane receptor domain containing protein
Contig23204_at	-0,99	-0,97	1,47	0,77	LOC_Os05g33030.1	1,00E-34	protein kinesin motor domain containing protein
Contig6099_at	-1,00	-1,45	0,99	0,81	LOC_Os02g56130.1	1,00E-142	protein PCNA - Putative DNA replicative polymerase clamp
Contig1972_at	0,11	-2,53	-0,10	0,52			
Contig15069_at	-1,06	-1,41	1,02	0,97	LOC_Os12g08810.1	7,00E-85	protein VTC2
Contig13407_s_at	2,97	-4,68	-2,25	1,66	LOC_Os01g11710.1	2,00E-71	protein GDSL-like lipase/acylhydrolase
Contig16917_at	-0,58	-1,91	0,52	0,60	LOC_Os01g03020.1	2,00E-92	protein tRNA synthetase class I
Contig23306_at	-0,89	-1,58	0,85	1,63	LOC_Os03g28330.5	1,00E-137	protein sucrose synthase
Contig12185_at	-1,95	-0,54	1,89	0,59	LOC_Os02g18690.1	8,00E-52	protein BURP domain containing protein
Contig2784_at	1,15	-2,59	-0,16	0,19	LOC_Os05g11780.1	1,00E-160	protein mitochondrial carrier protein
Contig6542_at	1,42	-2,30	0,13	-0,17	LOC_Os01g27750.1	0,0	protein bifunctional 3-dehydroquinate dehydratase/shikimate dehydrogenase
Contig11350_at	-0,50	-1,88	0,55	0,53	LOC_Os05g13520.1	0,0	protein white-brown complex homolog protein 12
Contig59_x_at	-2,14	-0,98	1,45	0,80			
Contig8679_at	-0,64	-1,87	0,56	0,71	LOC_Os09g12290.1	1,00E-108	protein bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase
Contig10531_at	-0,06	-1,96	0,47	0,06	LOC_Os03g63860.1	4,00E-92	protein DANA2
Contig9504_at	0,31	-2,56	-0,14	0,00	LOC_Os10g35520.1	1,00E-156	protein hydrolase, alpha/beta fold family domain containing protein
EBro07_SQ0003_K04_s_at	-1,77	-1,32	1,11	1,74			
Contig9861_at	0,67	-2,44	-0,02	0,06	LOC_Os08g23140.1	1,00E-85	protein expressed protein
Contig13758_at	-3,29	-0,81	1,61	0,74	LOC_Os03g11400.2	1,00E-131	protein targeting protein-related
HVSMEl0003N16r2_at	-0,55	-1,71	0,72	0,55	LOC_Os01g43380.1	5,00E-57	protein glycosyltransferase family protein 1
Contig2792_s_at	-1,49	-1,10	1,32	2,13	LOC_Os12g43490.1	1,00E-101	protein thaumatin
Contig1643_s_at	-0,33	-2,13	0,29	0,38	LOC_Os05g49800.1	0,0	protein ketol-acid reductoisomerase, chloroplast precursor
HDO3D06r_at	-1,89	-1,04	1,38	0,99	LOC_Os08g44015.1	9,00E-18	protein growth regulator related protein
Contig7650_at	8,26	-3,01	-0,59	0,26	LOC_Os07g37850.1	1,00E-37	protein expressed protein
HA07J03r_at	-1,84	-0,24	2,18	0,12			
Contig12871_at	-0,74	-1,63	0,78	1,27	LOC_Os02g35690.1	1,00E-163	protein transcription factor like protein
Contig11158_at	-1,17	-1,20	1,21	1,63	LOC_Os09g33860.1	1,00E-174	protein protein kinase
Contig17698_at	-0,96	-1,16	1,25	0,83	LOC_Os06g12590.1	3,00E-36	protein protein kinase
Contig23874_at	0,76	-2,18	0,23	0,00	LOC_Os05g08930.1	9,00E-59	protein chloroplast lumen common family protein
Contig15129_at	0,00	-1,80	0,61	-0,01	LOC_Os06g39690.1	1,00E-172	protein SOUL heme-binding protein
Contig3449_s_at	1,72	-3,11	-0,70	0,63	LOC_Os01g53730.1	1,00E-50	protein expressed protein
Contig10389_at	-0,23	-2,02	0,39	0,22	LOC_Os09g33480.1	2,00E-52	protein DAG protein, chloroplast precursor
Contig7187_at	1,82	-3,08	-0,67	0,65	LOC_Os03g49500.2	0,0	protein ethylene receptor

Probe Set	0di	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
Contig4682_at	-0,41	-1,87	0,54	1,11	LOC_Os12g12360.1	0,0	protein transposon protein, putative, Mutator sub-class
Contig12966_at	0,08	-2,02	0,38	-0,15	LOC_Os02g02520.1	1,00E-154	protein expressed protein
HVSMa0006L09r2_s_at	-0,42	-1,96	0,44	1,99	LOC_Os03g61990.5	1,00E-91	protein glycine-rich RNA-binding protein 7
Contig24791_at	-0,75	-1,65	0,75	0,75	LOC_Os04g51280.1	3,00E-83	protein DAG protein, chloroplast precursor
Contig9068_at	-1,42	-1,30	1,10	1,09	LOC_Os08g33390.1	0,0	protein Regulator of chromosome condensation domain containing protein
Contig742_at	-0,46	-1,95	0,45	0,84	LOC_Os08g09350.1	0,0	protein gar2
Contig11577_at	-2,62	-0,64	1,76	0,63	LOC_Os01g54420.1	0,0	protein dynamin family protein
Contig14427_at	-4,24	-1,65	0,74	0,69	LOC_Os06g35650.1	1,00E-153	protein reticuline oxidase-like protein precursor
HS07005u_s_at	-0,81	-1,25	1,15	0,76	LOC_Os09g28050.1	0,0	protein aspartate aminotransferase
Contig11223_at	1,32	-2,73	-0,34	0,23	LOC_Os03g40930.1	1,00E-123	protein expressed protein
Contig2155_at	1,08	-2,39	0,01	-0,03	LOC_Os07g37250.1	1,00E-138	protein THYLAKOID FORMATION1, chloroplast precursor
Contig11582_at	-0,23	-2,15	0,24	0,13	LOC_Os02g50760.2	0,0	protein heat shock protein DnaJ
Contig15041_at	-3,25	-0,96	1,44	0,95	LOC_Os03g59480.1	6,00E-66	protein expressed protein
Contig15223_at	-0,58	-1,75	0,64	0,48	LOC_Os11g04180.1	1,00E-166	protein dual specificity protein phosphatase
Contig13285_at	0,77	-2,74	-0,35	0,13	LOC_Os01g07410.1	1,00E-109	protein growth regulator related protein
Contig2255_at	1,28	-3,76	-1,36	1,08	LOC_Os09g26420.5	7,00E-89	protein AP2 domain containing protein
Contig19188_at	-5,13	0,21	2,60	-0,17	LOC_Os09g02160.1	1,00E-06	protein DEFL47 - Defensin and Defensin-like DEFL family
Contig17771_at	-1,65	-1,17	1,22	1,11	LOC_Os05g01440.1	1,00E-101	protein phosphoribosylformylglycinamide synthase
Contig8788_at	-0,81	-1,65	0,74	0,77	LOC_Os03g14280.1	1,00E-101	protein ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit
Contig16267_at	0,25	-1,95	0,45	-0,23	LOC_Os02g37050.1	1,00E-177	protein phosphatidylinositolglycan class N family protein
Contig19812_at	-0,70	-0,76	1,63	0,49	LOC_Os07g37010.1	1,00E-50	protein cyclin
Contig2294_at	0,17	-2,55	-0,17	0,18	LOC_Os01g14860.3	0,0	protein CGMC_GSK.1 - CGMC includes CDA, MAPK, GSK3, and CLKC kinases
Contig18379_at	-0,65	-1,73	0,65	0,63	LOC_Os05g44786.1	2,00E-31	protein retrotransposon protein, putative, unclassified
Contig13112_at	-0,43	-1,98	0,40	0,44	LOC_Os04g39060.2	9,00E-77	protein CRS1/YhbY domain containing protein
Contig20409_at	-2,20	-0,91	1,47	0,84	LOC_Os08g44420.1	1,00E-149	protein kinesin-related protein
HW09A02u_at	-0,01	-2,28	0,10	1,23			
HU02C06u_at	0,18	-2,53	-0,15	0,38	LOC_Os02g18450.1	1,00E-88	protein GTP-binding protein tya/bipA
Contig22834_at	-0,70	-1,53	0,85	0,72	LOC_Os12g35350.2	2,00E-07	protein kelch repeat protein
Contig9422_at	0,80	-2,88	-0,51	0,55	LOC_Os01g07870.1	1,00E-141	protein ABC transporter family protein
HW08F07V_s_at	0,09	-2,36	0,01	0,01	LOC_Os09g14670.1	0,0	protein phosphoenolpyruvate carboxylase
Contig10878_at	-1,22	-0,92	1,46	0,92	LOC_Os05g43560.1	0,0	protein AGAP007115-PA
Contig13590_at	0,90	-3,28	-0,90	1,65	LOC_Os03g43930.2	2,00E-68	protein START domain containing protein
Contig10834_s_at	-1,31	-0,73	1,64	0,75	LOC_Os06g50360.1	1,00E-160	protein pseudouridine synthase family protein
Contig21045_at	-2,06	-1,11	1,27	0,93	LOC_Os01g63950.1	1,00E-92	protein expressed protein
Contig7219_at	-0,02	-2,22	0,15	0,00			
Contig20486_at	-0,58	-1,65	0,72	0,59	LOC_Os07g46710.3	8,00E-31	protein expressed protein
Contig12383_at	-1,50	-0,88	1,49	0,82	LOC_Os02g39390.2	2,00E-66	protein expressed protein
Contig26499_at	0,50	-2,31	0,06	-0,05			
HVSMeg0017N16r2_at	-0,20	-2,03	0,33	0,51	LOC_Os07g01940.1	2,00E-85	protein sister chromatid cohesion 2
Contig154_at	-1,37	-0,98	1,39	0,74	LOC_Os12g34510.1	1,00E-56	protein Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein
Contig8747_at	-1,08	-1,30	1,07	1,17	LOC_Os03g56800.1	0,0	protein CBS domain containing membrane protein
Contig15219_at	0,53	-2,92	-0,56	0,82	LOC_Os05g06320.3	1,00E-124	protein ethylene receptor
Contig18212_at	-0,67	-1,41	0,95	0,99	LOC_Os08g24390.1	2,00E-55	protein expressed protein
Contig19984_at	0,02	-2,32	0,04	0,01	LOC_Os07g38060.1	2,00E-96	protein expressed protein
Contig5623_at	-0,18	-1,94	0,42	0,15	LOC_Os02g53330.2	0,0	protein 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase
Contig11738_at	0,04	-2,36	0,00	0,20	LOC_Os08g15278.1	1,00E-69	protein chloroplast 30S ribosomal protein S8, putative
Contig12304_at	-1,44	-0,96	1,40	1,01	LOC_Os09g17850.1	0,0	protein acetyltransferase type B catalytic subunit
Contig12469_at	2,51	-2,93	-0,57	0,74	LOC_Os03g08940.1	7,00E-41	protein conserved hypothetical protein
Contig5065_at	-2,10	-0,89	1,47	0,85	LOC_Os02g40514.2	7,00E-30	protein hACA ribonucleoprotein complex subunit 3
Contig12726_at	-1,31	-1,02	1,34	1,03	LOC_Os01g64820.1	1,00E-178	protein POLA1 - Putative DNA polymerase alpha catalytic subunit
Contig1781_s_at	-1,52	-1,04	1,31	0,81	LOC_Os03g58470.1	4,00E-58	protein retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy subclass
Contig599_at	-0,45	-1,79	0,57	1,26	LOC_Os06g37020.1	8,00E-16	protein expressed protein
Contig6270_at	-0,22	-1,96	0,39	0,23	LOC_Os03g08270.6	0,0	protein ataxin-2 C-terminal region family protein
Contig835_s_at	5,20	-2,37	-0,02	0,00	LOC_Os02g37030.1	1,00E-119	protein protein binding protein
Contig2756_at	1,16	-2,54	-0,19	0,17	LOC_Os01g53520.1	1,00E-113	protein reticulon domain containing protein
Contig20680_at	-0,39	-2,05	0,30	0,85			
Contig20032_at	-1,63	-0,94	1,41	0,92	LOC_Os04g43230.1	3,00E-14	protein expressed protein
Contig9584_at	-0,43	-1,84	0,51	0,44	LOC_Os03g61600.1	1,00E-172	protein phosphoribosylformylglycinamide synthase
Contig152_at	5,29	-1,89	0,46	0,00	LOC_Os10g05970.1	2,00E-64	protein POE12 - Pollen Ole e I allergen and extensin family protein precursor
Contig12090_at	-0,57	-1,55	0,80	0,51	LOC_Os03g19930.3	1,00E-160	protein adenylosuccinate lyase
EBpi01_SQ005_J09_s_at	-0,69	-1,64	0,71	0,39	LOC_Os09g37860.1	4,00E-90	protein NOL1/NOP2/sun family protein
Contig971_at	-1,53	-1,02	1,33	1,04	LOC_Os04g34240.1	1,00E-70	protein histone H3
Contig318_at	1,22	-2,33	0,02	-0,01	LOC_Os03g58630.1	1,00E-51	protein thioredoxin
Contig9412_s_at	-1,11	-1,23	1,11	0,99	LOC_Os03g05806.1	1,00E-123	protein pseudouridine synthase family protein
Contig9927_s_at	-1,59	-1,19	1,15	0,90	LOC_Os02g02390.1	0,0	protein S1 RNA binding domain containing protein
HA28N02r_s_at	-0,88	-0,74	1,60	0,83	LOC_Os06g44310.1	1,00E-139	protein tetraspanin family protein
Contig8891_at	0,30	-2,64	-0,29	0,76	LOC_Os03g06510.1	0,0	protein KIP1
Contig17102_at	-0,95	-1,12	1,22	2,14	LOC_Os03g38800.1	1,00E-122	protein AAA family ATPase
Contig10878_s_at	-1,44	-1,03	1,31	0,87	LOC_Os05g43560.1	0,0	protein AGAP007115-PA
Contig11904_at	4,68	-2,97	-0,63	0,97	LOC_Os03g55800.1	1,00E-137	protein cytochrome P450

Probe Set	0di	4di	4dc	8dc	Número de entrada	e-value	Descripción
Contig9570_s_at	-0,33	-1,98	0,35	0,59	LOC_Os05g49610.1	1,00E-180	protein ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, family 1
Contig20154_at	0,84	-2,34	-0,01	0,01	LOC_Os12g29580.2	1,00E-34	protein AGC_PVPK_like_kin82y.19
Contig1512_at	-0,32	-2,06	0,27	0,40	LOC_Os01g18050.1	0,0	protein tubulin/FtsZ domain containing protein
Contig14819_at	-1,67	-1,13	1,21	1,11	LOC_Os12g37400.2	1,00E-150	protein MCM7
HVSMEm0021J24r2_s_at	-0,39	-1,96	0,37	0,77	LOC_Os11g10060.1	1,00E-145	protein transcriptional corepressor SEUSS, putative
Contig21046_at	-0,92	-1,28	1,05	0,97	LOC_Os05g45760.1	3,00E-18	protein EMB1796
Contig124_at	-2,62	-1,15	1,18	1,16	LOC_Os11g05730.1	2,00E-70	protein histone H3
Contig20148_s_at	-0,77	-0,61	1,72	0,79			
Contig3057_at	0,30	-2,23	0,09	-0,19	LOC_Os04g32030.1	1,00E-157	protein heavy metal-associated domain containing protein
Contig10982_at	-1,27	-1,02	1,31	0,81	LOC_Os01g67160.1	1,00E-157	protein cyclin-dependent kinase B1-1
Contig3057_s_at	0,27	-2,25	0,07	0,00	LOC_Os04g32030.1	1,00E-157	protein heavy metal-associated domain containing protein
Contig4741_s_at	2,33	-2,78	-0,46	0,25	LOC_Os06g43860.2	1,00E-120	protein homeobox protein knotted-1
Contig11563_at	-0,87	-1,23	1,09	0,90	LOC_Os06g44230.1	1,00E-121	protein DNA-directed RNA polymerase 3A, chloroplast precursor
Contig13763_at	-1,15	-1,32	1,00	0,99	LOC_Os06g12100.1	1,00E-62	protein mTERF family protein
Contig13378_at	0,00	-1,82	0,50	2,48	LOC_Os01g54010.1	4,00E-92	protein peptidase
Contig19110_at	-3,53	-3,26	4,06	8,23	LOC_Os03g19600.2	1,00E-29	protein retrotransposon protein, putative, unclassified
Contig4844_s_at	-3,75	-2,64	2,87	6,42	LOC_Os03g10110.1	2,00E-37	protein cupin domain containing protein
Contig13769_at	-2,37	-3,75	2,16	5,12	LOC_Os04g39110.1	3,00E-42	protein gibberellin-regulated protein 1 precursor
Contig13064_at	-1,96	-3,54	2,57	5,15	LOC_Os01g52680.1	3,00E-95	protein OsMADS32 - MADS-box family gene with MIKCC type-box
Contig3256_s_at	0,63	-9,80	-0,77	1,70	LOC_Os01g14850.1	1,00E-34	protein MFS18 protein precursor
Contig14015_s_at	-1,69	-1,54	5,05	1,58	LOC_Os09g32526.1	4,00E-17	protein peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type
Contig499_x_at	-0,68	-0,53	4,26	0,82			
HA03G12r_at	-0,95	-0,67	4,33	0,92	LOC_Os09g36900.1	7,00E-09	protein WD domain, G-beta repeat domain containing protein
Contig18194_at	-2,10	-1,75	5,28	1,96	LOC_Os02g56870.1	5,00E-12	protein DEFL38 - Defensin and Defensin-like DEFL family
Contig25195_at	-0,18	0,09	3,27	-0,03	LOC_Os05g33130.1	1,00E-147	protein CHIT17 - Chitinase family protein precursor
Contig15118_at	-0,07	0,03	3,12	-0,03	LOC_Os06g11840.1	1,00E-126	protein trehalose phosphatase
Contig77_s_at	-0,85	-0,55	3,78	0,71	LOC_Os02g15710.1	5,00E-39	protein plastocyanin-like domain containing protein, putative
Contig21899_at	-1,34	-1,03	4,39	1,32			
Contig22760_at	0,26	-1,38	2,76	-0,13	LOC_Os01g62990.1	3,00E-84	protein ATROPGEF7/ROPGEF7
Contig20866_at	-1,65	-1,51	4,65	1,77	LOC_Os02g07440.1	1,00E-05	protein DEFL78 - Defensin and Defensin-like DEFL family
Contig15886_at	-0,13	0,00	2,87	0,01	LOC_Os02g53590.1	2,00E-06	protein DEFL71 - Defensin and Defensin-like DEFL family
Contig14016_at	-1,50	-1,24	4,24	1,41	LOC_Os09g32526.1	4,00E-17	protein peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type
Contig20000_at	-1,36	-1,19	4,00	1,19	LOC_Os11g08285.1	6,00E-06	protein hypothetical protein
Contig15050_at	0,82	-1,49	2,42	-0,35	LOC_Os04g56930.2	1,00E-100	protein glycosyl hydrolases
Contig11699_at	0,77	-0,59	1,91	-0,84	LOC_Os07g07410.2	1,00E-146	protein oxidoreductase, 2OG-Fe oxygenase family protein
Contig17248_at	-0,52	-0,21	3,07	0,32			
Contig20000_s_at	-1,82	-1,75	4,76	2,07	LOC_Os11g08285.1	6,00E-06	protein hypothetical protein
Contig7855_s_at	-3,65	-2,33	5,20	2,54	LOC_Os01g03390.1	5,00E-31	protein BBT17 - Bowman-Birk type bran trypsin inhibitor precursor
EBes01_SQ004_F23_at	-0,66	-0,44	3,43	0,77			
Contig5257_at	-1,08	-0,11	2,72	0,12	LOC_Os05g47470.2	9,00E-47	protein VIP1 protein
Contig22186_at	-1,49	-1,37	4,26	1,69			
Contig7170_at	-1,12	-0,70	3,30	0,73	LOC_Os04g46630.1	1,00E-112	protein expansin precursor
Contig5270_x_at	-0,33	0,07	2,48	-0,07			
Contig561_x_at	-0,90	-0,75	3,44	0,90			
Contig14388_at	-0,71	-0,66	2,81	0,32			
Contig504_x_at	-0,78	-0,61	3,84	1,39			
HV05M17u_s_at	0,00	-0,13	2,21	-0,19	LOC_Os10g13850.1	2,00E-58	protein POE117 - Pollen Ole e I allergen and extensin family protein precursor

Tabla 26: Listado de los 1.797 genes (Probe set), de los 13 clústeres identificados en la embriogénesis de la microspora en cebada (Figura 11).

CLUSTER 1	CLUSTER 2	CLUSTER 3	CLUSTER 4	CLUSTER 5	
Contig1689_at	Contig6671_at	Contig2766_s_at	Contig15041_at	EBpi01_SQ002_O17_at	Contig20858_at
Contig15518_s_at	Contig9069_at	Contig4240_s_at	Contig8770_at	Contig19958_at	Contig18416_s_at
Contig7632_at	Contig13888_at	Contig7681_s_at	Contig20681_at	Contig3597_at	Contig25313_at
Contig2314_at	Contig13407_s_at	Contig17136_at	Contig14945_at	Contig25269_at	HVSMEb0002N13r2_at
Contig3259_at	Contig7650_at	Contig2348_s_at	EBma03_SQ003_P07_at	Contig3480_at	Contig19853_at
Contig3257_at	Contig152_at	Contig9579_at	HVSMEg0005O19r2_at	Contig21354_at	Contig9976_at
Contig1881_s_at	HVSMEa0004F18f2_s_at	HVSMEg0016J19r2_s_at	Contig13758_at	Contig13727_at	Contig10096_at
Contig4206_at	Contig10874_at	EBma03_SQ003_L08_at	Contig14427_at	Contig15557_at	Contig23344_at
Contig5523_s_at	HW09111u_s_at	Contig7510_at	Contig19188_at	Contig4507_at	Contig11825_at
Contig3256_s_at	Contig9981_at	Contig5704_at	EBma05_SQ002_M06_at	Contig19162_at	Contig12953_at
HS18B10u_s_at	Contig5903_s_at	Contig7327_at	Contig175_x_at	HK06N02r_s_at	Contig18085_at
Contig9814_at	Contig8486_at	HVSMEc0011A03f_at	Contig175_at	Contig11431_at	Contig10939_at
Contig1244_s_at	Contig19972_at	HV_CEB0020D05r2_s_at	HVSMEr0017G01f_s_at	Contig1232_at	HVSMEr0012J09r2_at
Contig5362_at	Contig24666_at	Contig10514_at	HS09O21u_at	Contig9255_at	Contig9255_at
Contig4362_at	Contig12204_s_at		Contig5784_s_at	Contig4058_s_at	Contig23110_at
Contig6704_at	Contig4806_at		Contig19848_at	Contig6278_at	Contig13773_at
Contig5275_at	Contig13573_at		HVSMEr0012L05r2_at	Contig22399_at	Contig20306_at
Contig12086_at	Contig9877_at		Contig12321_at	Contig13708_s_at	Contig14515_at
Contig13334_at	Contig14020_at		Contig1641_at	Contig19785_at	Contig16088_at
HM04L20u_at	Contig23598_at		Contig1724_s_at	Contig5348_s_at	Contig15376_at
Contig5492_at	basd23g06_s_at		Contig1166_s_at	HA28D17r_s_at	Contig10147_s_at
HVSMEg0002D22r2_s_at	Contig9052_at		Contig1741_at	Contig8349_at	Contig8243_at
Contig3081_at	Contig25757_at		Contig26328_at	HA09g16r_at	Contig15031_at
Contig6218_at	Contig1314_s_at		Contig16273_at	Contig12587_at	Contig12158_at
S000200079C09F1_s_at	HVSMEf0016C08r2_s_at		HU03G20u_at	Contig12818_at	Contig8459_at
Contig12179_at	HVSMEb0007O01f_at		HVSMEf0015P21r2_s_at	HB30P16r_at	Contig19106_at
Contig10393_at	Contig2504_at		Contig6309_at	Contig11592_x_at	Contig17992_at
Contig5004_at	HVSMEb0003G21r2_s_at		Contig26531_at	Contig14073_at	Contig7509_at
Contig10526_at	Contig21196_at		Contig14567_at	Contig17901_at	Contig26354_at
Contig5655_at	HA24C19r_s_at		HVSMEh0081C04r2_s_at	Contig11594_at	Contig10822_at
Contig15302_at	Contig5754_s_at		Contig2803_at	Contig7855_s_at	Contig3512_s_at
Contig4811_s_at	Contig959_x_at		Contig7080_at	HA03C08u_at	Contig11109_at
Contig12038_at	Contig6782_at		Contig21477_at	Contig16272_at	Contig19828_at
Contig3479_at	Contig7916_at		Contig4633_at	Contig14215_at	EBem05_SQ004_K20_at
Contig8226_at	Contig7811_s_at		Contig7684_at	Contig19970_at	Contig15715_at
Contig14436_at	Contig13408_at		Contig1739_s_at	Contig1429_at	Contig7275_at
Contig8002_at	Contig9813_at		Contig4633_x_at	Contig19110_at	Contig10074_at
Contig5523_at	Contig16757_at		Contig393_at	Contig12979_s_at	Contig17002_at
Contig12144_s_at	Contig835_s_at		Contig20510_at	EBro03_SQ001_C05_at	Contig15471_at
Contig9763_s_at	Contig11904_at		Contig4952_s_at	Contig11448_at	HVSMEc0015B20r2_at
Contig3258_at	Contig1225_s_at		Contig18750_at	HVSMEi0013G22r2_at	HY10B05u_x_at
Contig18852_at	Contig2873_s_at		EBro08_SQ007_K24_at	Contig3693_at	Contig3514_at
Contig12256_at	Contig2080_at		HA10F18u_at	Contig23976_at	Contig13879_at
Contig5255_at	Contig10342_at		Contig17318_at	Contig12232_at	Contig17317_at
Contig8508_at	baak46p14_s_at		S0000700025G01F1_s_at	Contig23211_at	Contig9886_at
rbags1d23_s_at	Contig2262_at		Contig13240_s_at	HA27E07r_at	Contig10408_at
Contig1878_at	Contig13874_at		Contig14510_at	HU12N23u_s_at	Contig12587_at
Contig8978_at	Contig1899_at			Contig26125_at	Contig7834_at
Contig5420_at	Contig12417_at			Contig13817_s_at	Contig7396_at
Contig10481_at	Contig2263_s_at			Contig775_x_at	Contig10901_at
HVSMEr0015M15r2_s_at	HVSMEf0007E14r2_s_at			Contig14187_at	Contig20404_at
Contig6715_at	Contig15472_at			Contig21737_at	Contig3513_at
Contig6864_at	Contig8700_s_at			Contig22553_at	Contig5665_at
	Contig3171_at			Contig17489_at	Contig18518_at
	Contig717_x_at			EBed02_SQ002_O17_at	Contig13701_at
	Contig5885_at			Contig15167_at	Contig10306_s_at
	Contig2528_x_at			Contig18254_at	Contig12817_at
	Contig9809_at			Contig16695_at	Contig2876_at
	Contig6672_s_at			Contig13064_at	Contig11923_at
	Contig18569_at			Contig3735_at	Contig5659_at
	Contig12940_at			Contig12924_at	Contig16059_at
	Contig10928_at			Contig13769_at	Contig9621_s_at
	Contig6481_at			Contig17447_at	Contig15786_at
	Contig8699_at			Contig9939_at	Contig7499_at
	Contig4386_at			Contig4844_s_at	Contig19815_at
	Contig2347_at			Contig10396_at	Contig7824_at
	Contig11308_at			rbags13f02_at	Contig2500_at
	Contig4986_at			EBro07_SQ003_G24_s_at	Contig8900_at
	Contig9681_at			AF109193_at	Contig5189_at
	Contig24680_at				Contig18064_at
	HVSMEg0016P19f_x_at				Contig5768_at
	Contig179_s_at				Contig21617_at
	Contig5737_s_at				Contig1510_s_at
	Contig5845_at				Contig18416_at
	Contig4755_at				Contig4497_at

CLUSTER 6	CLUSTER 7	CLUSTER 8	CLUSTER 8	CLUSTER 8	CLUSTER 8
Contig11710_at	Contig15634_at	Contig19759_at	Contig10264_at	Contig8181_at	HVSMEM0001J09r2_s_at
Contig8533_s_at	Contig2056_x_at	Contig15886_at	Contig16466_at	HV_CEA0018D10f_s_at	Contig5709_at
Contig18015_at	Contig14691_at	Contig5257_at	Contig18665_at	Contig8724_at	Contig16523_at
HVSMEM0007I24r2_at	Contig22530_at	Contig16415_at	EBro07_SQ002_G23_s_at	Contig9016_at	Contig13494_at
Contig12665_at	HX01F12w_at	Contig22760_at	HU11D20u_s_at	Contig22689_at	Contig4592_s_at
Contig21339_at	Contig9589_at	Contig25195_at	HI05D03u_at	HVSMEM0017O13f_at	Contig5540_at
Contig20433_at	Contig17813_at	HVSMEM0011N07r2_at	Contig18674_at	Contig1224_s_at	Contig16437_at
HVSMEM0009N05r2_s_at	Contig15877_at	Contig15118_at	Contig7966_at	HF18A22r_s_at	Contig7069_at
Contig7404_at	Contig24714_at	Contig18187_at	Contig13842_at	Contig8473_s_at	Contig2400_at
Contig18451_at	Contig21348_at	Contig14704_at	Contig12713_at	rbags29h17_s_at	Contig721_s_at
Contig14405_at	HV06O09u_at	Contig5270_x_at	Contig16987_at	Contig2284_at	Contig4811_at
Contig19521_at	Contig9455_at	HV05M17u_s_at	EBpi07_SQ002_O14_at	Contig2458_s_at	Contig4618_at
HI04I05u_at	Contig16606_at	HA04g14r_at	Contig17516_at	HO04B16S_at	Contig8056_at
Contig14222_at	HY08K16V_s_at	Contig14016_at	Contig3250_at	Contig20819_at	Contig8437_at
Contig4958_at	Contig15972_at	Contig21899_at	HVSMEM0012N07r2_at	Contig3112_at	Contig9122_at
Contig26412_at	Contig6515_at	Contig25447_at	Contig1972_at	Contig12261_at	Contig20382_at
Contig15271_at	HS05J08u_s_at	Contig20000_at	Contig2294_at	Contig7973_at	Contig9861_at
Contig14587_s_at	Contig19395_at	HA03G12r_at	HU02C06u_at	Contig12966_at	Contig23874_at
Contig19088_at	HVSMEM0007O05r2_at	Contig1858_at	HW08F07V_s_at	Contig16267_at	Contig15129_at
Contig16789_at	Contig12382_at	Contig499_x_at	Contig7219_at	Contig7768_s_at	Contig13285_at
Contig14656_at	Contig11270_at	HA24I18r_at	Contig19984_at	Contig10699_at	Contig9422_at
HVSMEM0011N23r2_at	HK06N02r_at	Contig504_x_at	Contig21185_at	Contig16511_at	Contig20154_at
Contig20832_at	HVSMEM0009F12r2_s_at	Contig77_s_at	Contig10845_at	Contig7012_at	Contig19722_at
Contig13687_at	Contig16389_at	Contig561_x_at	Contig19872_at	Contig11633_at	Contig1483_at
Contig19923_at	HA14I17r_at	Contig7170_at	rbags16e12_at	Contig16645_at	Contig5585_s_at
Contig5253_at	Contig21333_at	EBes01_SQ004_F23_at	Contig17552_at	HVSMEM0021O19r2_s_at	Contig12438_at
Contig361_s_at	Contig16868_at	EBro04_SQ004_O07a_at	Contig18503_at	HU05K13u_s_at	Contig15666_at
HVSMEM0002L04r2_s_at	HA24G18r_at	Contig21047_at	Contig7480_at	Contig11642_at	Contig2594_s_at
rbaa11f18_at	Contig5673_at	Contig15279_s_at	Contig15890_at	Contig4439_at	Contig10543_at
HVSMEM0015C10r2_at	HV03G03u_at	Contig14388_at	Contig23196_at	Contig6085_at	HV_CEA0012B15f_s_at
Contig24931_at	Contig18928_at	Contig17248_at	Contig10976_at	Contig7798_at	Contig12805_at
Contig4330_at	HV11B08u_at	Contig14932_at	Contig7242_at	HA13E08r_s_at	Contig12795_at
Contig13424_at	Contig13776_at	Contig4506_at	Contig11234_at	Contig23482_at	Contig7136_at
Contig14397_at	Contig3685_at	Contig151_at	Contig3178_at	Contig17360_at	rbags16i08_s_at
HVSMEM0012C22f_at	Contig22556_at	Contig14015_s_at	Contig12718_at	Contig9864_at	Contig20025_at
Contig12060_at	Contig5839_at	Contig20000_s_at	Contig5486_at	Contig16347_s_at	Contig19202_at
Contig20695_at	Contig9118_at	Contig20866_at	Contig8652_at	Contig6691_at	Contig7721_at
Contig14132_at	Contig24499_at	Contig22186_at	Contig5628_at	Contig9761_at	Contig9358_at
HVSMEM0007B23r2_at	Contig10583_at	Contig18194_at	Contig20263_at	Contig16557_at	Contig1881_at
Contig16702_s_at	HVSMEM0001I23r2_at	Contig9239_s_at	Contig1459_at	Contig15179_at	Contig6416_s_at
rbags17d18_s_at	Contig24809_at	Contig15050_at	Contig8590_at	Contig12760_s_at	HZ59C04r_s_at
HVSMEM0002P14r2_s_at	Contig4869_s_at	Contig11699_at	Contig8347_at	Contig19663_at	Contig2425_s_at
Contig10148_at	Contig12350_at	HV14J05u_x_at	Contig2456_at	Contig26499_at	Contig615_at
Contig13384_at	Contig2975_s_at	Contig23940_at	Contig9183_at	Contig15219_at	HVSMEM0083O16r2_s_at
Contig3515_x_at	Contig5564_s_at		Contig8088_at	Contig3057_at	Contig3966_at
Contig10067_s_at	Contig6938_at		Contig6732_at	rbaa11m15_s_at	HVSMEM0004N19r2_s_at
Contig4579_s_at	rbaa118p14_at		Contig19735_at	Contig9437_at	Contig8436_s_at
Contig19862_at	Contig24418_at		Contig11977_at	Contig8345_at	Contig8090_at
Contig481_s_at	Contig20916_at		Contig10271_at	Contig9274_at	Contig12303_at
Contig2056_at	Contig14323_at		Contig10803_s_at	Contig6875_at	Contig14633_at
Contig16427_at	Contig6154_s_at		Contig9504_at	HZ65E19r_at	Contig8562_at
Contig21321_at	Contig23926_at		Contig8891_at	Contig15840_at	Contig19089_at
Contig13277_at	Contig17093_at		Contig3057_s_at	Contig8292_at	Contig14563_at
Contig24078_at	Contig4566_at		Contig15447_at	Contig14976_at	Contig17766_at
Contig14490_at	Contig6238_s_at		Contig18913_at	Contig13522_at	Contig9660_at
Contig9457_at	Contig5277_s_at		Contig14258_at	EBro03_SQ004_A01_s_at	Contig7850_at
Contig16099_at	Contig8293_at		Contig24433_at	Contig12253_at	HVSMEM0003G18r2_s_at
Contig14937_at	HA26C03r_at		Contig14094_at	Contig23889_at	Contig8790_at
Contig13755_at	Contig1335_at		Contig5708_at	Contig19696_at	Contig3042_at
HU09H07u_at	HS06A14u_s_at		Contig7443_at	Contig4949_at	HVSMEM0001H24r2_s_at
Contig12362_s_at	Contig8258_s_at		Contig16238_at	HT12B06u_s_at	HV05C10u_s_at
Contig11702_at	Contig3855_at		Contig11363_at	HVSMEM0005L21r2_s_at	Contig10313_at
Contig6805_at	Contig20783_at		Contig13817_at	Contig14078_at	Contig2147_at
Contig4278_at	Contig17749_at		HE01F04u_s_at	Contig19278_at	Contig7851_s_at
Contig7469_at	Contig5503_s_at		Contig10249_at	Contig14612_at	Contig26366_at
HU13M08u_at	EBma04_SQ002_G23_at		Contig3853_s_at	Contig16878_at	HV_CEA0015H07r2_s_at
HA20L20r_at	Contig19336_at		Contig15689_at	Contig7823_at	Contig12113_at
Contig10274_at	Contig12278_at		HS06C20u_s_at	Contig12129_at	Contig7047_at
Contig20059_at	Contig24718_at		Contig12778_at	Contig2155_at	Contig807_s_at
EBed01_SQ003_C19_at	HX02O04u_at		Contig13899_at	Contig13590_at	Contig1943_s_at
Contig16579_at	EBem05_SQ002_D05_s_at		Contig19361_at	Contig10242_at	rbags18k24_s_at
Contig20744_at	Contig19387_at		HVSMEM0009B19r2_s_at	rbags21b15_at	Contig5422_at
EBes01_SQ004_K24_at			Contig23146_at	Contig7643_at	Contig11882_at
HVSMEM0005M02r2_at			Contig14799_at	Contig10203_at	Contig8649_at
HA31N01r_at			Contig1664_at	Contig16632_at	HU04L22r_at

CLUSTER 8	CLUSTER 9	CLUSTER 9	CLUSTER 9	CLUSTER 10	CLUSTER 10
rbags18k24_x_at	Contig14428_at	Contig15384_at	Contig25090_at	Contig10899_at	Contig19806_at
Contig4432_at	Contig902_x_at	HV08I08u_at	Contig13788_at	Contig11582_at	Contig10093_s_at
Contig4215_at	Contig15802_at	Contig13703_at	Contig6917_at	Contig16020_at	rbaal1119_s_at
rbags13e05_s_at	Contig11350_at	Contig20999_at	Contig24024_at	HVSMEI0017H19r2_s_at	Contig14176_at
Contig6843_at	HVSMEI0003N16r2_at	rbal30a15_s_at	EBro02_SQ008_C08_at	Contig13138_at	Contig12515_at
EBpi01_SQ001_I04_s_at	Contig15223_at	Contig26034_at	Contig20759_at	EBro04_SQ004_L16a_at	Contig6325_at
Contig5813_at	Contig18379_at	HO08C10S_at	HY04I03T_at	Contig460_s_at	Contig10590_at
Contig10417_at	Contig20486_at	Contig3066_at	Contig14705_at	EBem05_SQ004_C15_at	Contig5560_at
Contig4724_at	Contig9584_at	Contig4826_at	HF17J23r_at	Contig17655_at	Contig6603_at
Contig21170_at	Contig12090_at	Contig3457_x_at	Contig15033_at	Contig25692_at	HVSMEk0006G12r2_s_at
Contig10599_at	EBpi01_SQ005_J09_s_at	HF01O24T_at	Contig11738_at	Contig13233_at	Contig8658_at
Contig5341_at	Contig3573_s_at	Contig5969_at	Contig5403_at	Contig19879_at	Contig9294_at
Contig10952_at	Contig5792_at	Contig24748_at	Contig14349_at	Contig9882_s_at	Contig11524_s_at
Contig3375_at	HC108C09_SK_at	Contig406_s_at	EBma01_SQ005_B17_at	Contig9640_at	Contig12420_at
HO02E11S_s_at	Contig14429_at	HVSMEI0011H23r2_at	Contig20157_at	Contig24256_at	Contig21011_at
Contig3520_at	Contig4367_s_at	Contig23678_at	Contig14621_at	HI04H23u_at	Contig21807_at
Contig2784_at	Contig17227_at	Contig6963_at	Contig10075_at	Contig17954_at	EBpi01_SQ004_K18_at
Contig2756_at	Contig14251_at	Contig10595_at	Contig14270_s_at	Contig8055_at	Contig14590_at
Contig318_at	Contig3457_at	EBem09_SQ004_H15_x_at	Contig13137_s_at	Contig23281_at	HVSMEa0006D18r2_s_at
Contig6675_at	Contig119_at	Contig23673_at	Contig23354_at	Contig14695_at	Contig23719_at
HVSMEg0006G02r2_s_at	Contig15934_at	Contig17296_at	HY03J09u_at	Contig17474_at	Contig13143_s_at
Contig14308_at	Contig8678_at	Contig12468_at	HVSMEh0024I06r2_s_at	Contig5929_at	Contig12959_at
HV11H02u_at	Contig7946_at	Contig10341_at	Contig20794_at	HVSMEh0019B10f_s_at	Contig12579_at
Contig18600_at	Contig8959_at	Contig11061_at	Contig20887_s_at	Contig14300_at	Contig12144_at
Contig17860_at	Contig11869_at	Contig8600_at	Contig17386_at	Contig12252_at	HVSMEh0015M01r2_s_at
HVSMEa0005E13r2_s_at	Contig9936_at	Contig15448_at	Contig14822_at	Contig6692_s_at	Contig9274_s_at
Contig9040_at	Contig3821_s_at	Contig15343_at	Contig12222_at	Contig8075_at	Contig19803_at
HU05A05u_s_at	Contig5234_at	Contig22799_at	Contig12847_at	Contig16154_at	Contig1192_s_at
Contig4613_at	Contig21107_at	Contig11632_at	Contig9882_at		HVSMEg0016M04r2_s_at
Contig15736_s_at	HV05N08u_at	Contig15094_at	HVSMEc0019G06f_at		Contig3927_s_at
HU05K13u_at	Contig487_s_at	Contig10531_at	Contig4341_s_at		Contig16971_at
Contig5710_at	Contig22652_at	Contig1643_s_at	HVSMEa0006L09r2_s_at		Contig11685_at
rbags22g19_at	Contig125_at	Contig12871_at	HW09A02u_at		Contig8341_at
Contig6339_s_at	Contig1394_at	Contig10389_at	Contig14415_at		Contig5580_s_at
Contig7018_at	Contig16917_at	HVSMEg0017N16r2_at	Contig21442_at		HV12A17u_s_at
Contig5030_at	Contig8679_at	Contig18212_at	HZ65P03r_at		Contig24099_at
Contig14649_s_at	Contig4682_at	Contig599_at	Contig23309_at		Contig9216_at
Contig8145_at	Contig24791_at	Contig1512_at	rbags12k11_s_at		HVSMEg0015H15r2_at
Contig12856_at	Contig742_at	Contig6093_s_at	Contig24914_at		Contig18426_at
Contig23882_at	Contig8788_at	Contig18702_at	HY03I24u_s_at		Contig6936_at
Contig14931_at	Contig13112_at	Contig6093_at	Contig14271_at		Contig18499_at
Contig12372_at	Contig22834_at	Contig6918_s_at	Contig5438_s_at		Contig12302_at
	Contig5623_at	Contig14429_s_at	Contig7804_at		Contig10778_s_at
	Contig6270_at	Contig5378_at	Contig15138_at		Contig5581_at
	Contig20680_at	HW01F10u_s_at	Contig23170_at		Contig2747_at
	Contig9570_s_at	Contig6592_at	Contig6247_at		Contig11031_at
	HVSMEh0021J24r2_s_at	Contig5003_at	Contig22133_at		Contig7678_at
	HU08P15u_s_at	Contig6062_at	Contig11591_at		Contig9357_at
	Contig4893_at	Contig15547_at	HS06F14u_s_at		Contig9029_at
	HS05D20u_s_at	Contig5648_s_at	HS16O08u_s_at		Contig11163_at
	EBpi01_SQ002_N15_at	Contig12945_at	Contig8932_s_at		Contig21345_at
	Contig14686_at	Contig5120_at	Contig8614_at		HVSMEg0002E24r2_s_at
	Contig9650_at	HS06C04u_s_at	Contig18084_at		Contig7279_at
	Contig4227_at	Contig5081_at	Contig13378_at		Contig8458_at
	Contig6113_at	Contig26342_at	Contig25737_at		Contig5679_at
	Contig3756_at	Contig4368_at	Contig16012_at		Contig14748_at
	Contig12132_s_at	Contig9155_s_at	Contig15225_at		Contig10850_at
	Contig18640_at	HVSMEh00085O09r2_s_at	Contig3920_at		Contig4873_s_at
	Contig13869_at	Contig16323_at	HY08M06u_x_at		rbags36i03_s_at
	Contig6980_at	Contig22223_at	HW01F06u_at		Contig6728_at
	Contig5121_s_at	rbah37c06_s_at	Contig17746_at		Contig7281_at
	Contig8678_s_at	Contig15122_at	Contig13827_at		EBem09_SQ004_B23_s_at
	Contig20722_at	Contig20198_at	Contig6664_at		Contig18984_s_at
	Contig12308_at	HW02G11u_s_at	Contig16556_at		Contig11988_at
	Contig10362_at	Contig7268_s_at	Contig8103_s_at		Contig5688_at
	rbah25c12_s_at	HW01E20u_x_at	Contig9847_s_at		Contig3135_at
	Contig8147_at	rbags12i21_at	Contig9026_at		Contig15532_at
	Contig19784_at	Contig19231_at	HD04D15u_at		HY07I12u_s_at
	Contig9922_s_at	Contig6059_at	Contig15159_s_at		Contig5645_at
	Contig18676_at	EBma03_SQ003_L14_s_at	Contig15518_at		Contig3167_s_at
	Contig11580_at	Contig15642_at	Contig21289_at		Contig5573_at
	HW06K22u_s_at	Contig10866_at	Contig10710_at		Contig6348_at
	Contig10445_at	Contig6099_at	Contig12787_at		Contig18514_at
	Contig10890_s_at	HVSMEg0007G16r2_at	Contig1124_x_at		Contig14969_at
	EBes01_SQ004_M24_at	Contig13600_at	Contig20728_at		Contig19372_at

CLUSTER 10		CLUSTER 11			CLUSTER 12
Contig11249_at	Contig12824_at	Contig23628_at	Contig17340_at	HVSMEn0019B10f2_s_at	HF04F14r_at
Contig13784_at	HT09B07u_s_at	Contig14469_at	Contig12022_at	Contig9574_at	Contig11100_at
Contig10724_at	Contig6623_s_at	Contig23806_at	HVSMek0023G08r2_at	Contig19158_at	Contig8711_at
Contig7055_at	Contig21684_at	Contig15197_at	Contig3659_s_at	Contig10235_at	Contig12711_at
HV_CEA0005A05f2_s_at	Contig4380_s_at	Contig10289_at	Contig2748_at	HV14K05u_s_at	Contig4238_at
Contig12607_at	HK0618r_at	HY07L14u_at	Contig6347_s_at	Contig7241_at	Contig4830_at
Contig19139_at	Contig5734_at	HB08A04r_at	Contig5274_s_at	Contig11697_at	HZ40B21r_s_at
HVSMec0001C18f2_s_at	Contig14899_at	Contig9749_at	Contig13417_at	Contig14056_at	Contig6542_at
Contig9342_at	Contig8817_at	Contig15416_at	HE01B10u_s_at	Contig4777_at	Contig11223_at
Contig4859_at	Contig2747_s_at	Contig11649_at	Contig8774_at	Contig16172_at	Contig7479_at
Contig8301_at	HVSMek0022L04r2_s_at	Contig9948_at	Contig3935_s_at	EBro08_SQ003_A06_at	Contig20097_at
EBro08_SQ003_I19_s_at	Contig3134_s_at	Contig3058_at	Contig8863_at	Contig10978_at	Contig6817_at
Contig7097_s_at	Contig10209_at	HVSMec0013P04r2_s_at	Contig14780_at	rbags36a18_s_at	Contig13577_at
HZ50B12r_s_at	rbasd16a13_s_at	ChlorContig17_s_at	HV02P01u_at	Contig11229_at	Contig11711_at
Contig20128_at	Contig10218_at	Contig4192_at	Contig16978_at	Contig11913_at	Contig2931_at
Contig8958_at	HV_CEA0013O20r2_s_at	Contig13100_at	Contig18335_at	Contig19707_at	HO11E24S_s_at
HVSMec0023D17f1_s_at	HA28J12r_s_at	Contig25923_at	Contig19001_at	Contig18590_at	Contig19333_at
Contig1247_s_at	HY02C22u_x_at	Contig8374_at	EBro05_SQ003_D01_s_at	HVSMEm0001J08f2_s_at	M58754_at
Contig5775_at	Contig20713_at	HVSMeb0013l22f_s_at	Contig11261_at	HVSMEn0017F07r2_at	HVSMEn0017F07r2_at
Contig12536_at	Contig5526_s_at	Contig23641_at	Contig10782_at	Contig21171_at	Contig3822_at
EBes01_SQ002_E05_at	Contig8125_at	Contig19614_at	Contig12360_at	Contig12946_at	Contig7733_at
Contig13722_at	Contig210154_at	Contig21713_at	Contig9078_at	Contig12085_at	Contig12227_at
Contig20612_at	HY06D12u_s_at	Contig14875_at	rbaal20n01_s_at	Contig20647_at	Contig10604_at
Contig6321_at	Contig11335_s_at	rbaal1k11_s_at	HV14K24u_at	Contig9846_at	HW08K02u_at
Contig3132_at	HY05O16u_s_at	Contig12502_at	Contig16159_at	HB24E05r_s_at	Contig14371_at
rbasd15h01_s_at	Contig2265_at	Contig12522_at	Contig8473_at	Contig12961_at	Contig16074_at
Contig6411_at	Contig4852_at	Contig12780_at	Contig21692_at	Contig19701_at	Contig17654_at
Contig7987_at	Contig7979_at	Contig5087_at	Contig10869_s_at	Contig24054_at	Contig13490_at
Contig10816_at	Contig11718_at	Contig16821_at	S000200065D09F1_s_at	Contig18354_at	Contig19502_at
Contig13602_at	Contig7481_at	Contig16930_at	Contig17155_at	Contig8360_at	Contig13686_at
Contig14569_at	Contig7034_at	HVSMec0007N02r2_at	Contig16504_at	Contig6063_s_at	EBro04_SQ002_I16_s_at
Contig20523_at	Contig10499_at	Contig22279_at	Contig14133_at	Contig10078_at	Contig3449_s_at
Contig14263_at	Contig9418_at	Contig14892_at	Contig9442_at	Contig8478_at	Contig7187_at
Contig16747_at	Contig9438_s_at	Contig23613_at	Contig20686_at	Contig10224_at	Contig9839_at
Contig19292_at	HO13O09S_s_at	Contig9773_at	Contig15381_at	Contig1510_at	Contig13271_at
Contig15872_at	Contig9436_at	EBpi01_SQ005_J19_at	Contig8954_at	Contig4380_at	Contig24175_at
Contig2941_at	Contig5884_at	Contig7556_s_at	Contig11034_at	Contig4460_s_at	Contig8468_at
Contig19193_at	Contig11896_at	Contig386_at	rbah36c02_s_at	Contig8876_at	Contig9696_s_at
Contig12168_at	Contig10761_at	Contig9276_at	Contig20303_at	Contig3659_at	Contig10284_at
Contig26322_at	Contig20443_at	Contig8750_s_at	rbags1k09_s_at	Contig18643_at	Contig14999_at
Contig16920_at	Contig4676_at	HO04F17S_at	Contig17319_at	Contig17769_at	Contig6300_at
Contig11326_at	Contig9093_at	HF14N13r_at	Contig9157_at	HB32E08r_at	Contig938_s_at
Contig5376_at	EBma03_SQ003_L08_s_at	Contig14528_at	Contig15377_at	HY08H18V_at	Contig11177_at
Contig9343_s_at	Contig11115_at	Contig15559_at	HVSMec0011H12r2_x_at	Contig3051_s_at	Contig11250_s_at
Contig20267_at	Contig6132_at	Contig22762_at	Contig14330_at		Contig1671_s_at
EBem10_SQ001_I05_at		HU01E06w_at	Contig18901_at		Contig2018_at
HX02B17u_at		Contig17574_at	Contig11181_at		Contig17568_at
Contig10648_at		HU10I09u_at	Contig406_at		Contig6578_at
Contig19976_at		HV04H12r_at	Contig17794_at		Contig4462_at
Contig14170_at		Contig24571_at	Contig8877_s_at		Contig4690_at
Contig12845_at		Contig18520_at	Contig391_at		Contig14168_s_at
Contig5240_at		Contig9074_at	Contig11761_at		Contig4463_s_at
Contig1247_at		Contig10306_at	Contig16954_at		Contig6305_at
Contig6333_at		Contig22128_at	Contig13808_at		HVSMeb0005E07r2_s_at
Contig5748_at		HA11J15u_s_at	HVSMeg0007G16r2_s_at		Contig11415_at
Contig15719_at		Contig15036_at	Contig4250_s_at		HM02H10u_at
Contig7969_at		Contig15509_at	Contig9277_s_at		Contig5629_at
Contig17131_at		Contig13794_at	Contig23856_at		Contig16567_at
Contig322_at		Contig7114_at	Contig24888_at		Contig11529_at
Contig8535_s_at		Contig6640_at	Contig12096_at		Contig9623_at
Contig9094_at		Contig23070_at	HV14C07u_at		Contig6166_at
HVSMec0004I10f2_s_at		HVSMeb0005B05r2_at	Contig4476_at		Contig7876_at
Contig2747_x_at		Contig5630_at	Contig10268_at		Contig5344_at
Contig11408_at		Contig24266_at	Contig8084_at		HX10O03r_at
EBpi03_SQ003_J22_at		Contig5776_s_at	Contig10606_at		Contig2255_at
Contig13508_at		Contig7283_at	Contig2737_at		HVSMeg0009L10r2_at
rbags22m24_s_at		Contig8950_at	Contig10471_at		Contig9878_at
Contig15125_at		Contig20669_at	Contig16163_at		Contig1803_at
Contig8664_at		Contig9380_at	Contig96_s_at		Contig10686_s_at
Contig12768_at		Contig14882_at	Contig6346_at		Contig16340_at
HF11O19r_at		Contig8533_at	HW09L19u_at		Contig20673_at
Contig4124_s_at		Contig14789_at	Contig9114_at		EBro08_SQ006_D12_s_at
Contig9841_at		Contig8282_at	Contig15142_at		Contig4335_at
Contig7016_s_at		Contig15047_at	Contig689_s_at		Contig15066_at
HY10H19u_s_at		Contig7403_s_at	Contig25611_at		Contig919_s_at

CLUSTER 12	CLUSTER 13			
Contig12469_at	EBro07_SQ003_K04_s_at	Contig15613_at	Contig12304_at	Contig17611_at
Contig4741_s_at	Contig2792_s_at	Contig2878_at	Contig12726_at	Contig20809_at
Contig14290_at	HD03D06r_at	Contig1136_at	Contig1781_s_at	Contig17298_at
Contig11129_at	HA07j03r_at	Contig16148_at	Contig20032_at	Contig7790_at
Contig25699_at	Contig17771_at	Contig16611_at	Contig971_at	Contig1132_s_at
Contig6920_at	Contig20409_at	Contig25256_at	Contig9927_s_at	Contig15069_at
Contig11023_at	Contig21045_at	Contig4034_at	HA28N02r_s_at	Contig23306_at
Contig8371_at	Contig5065_at	Contig25221_at	Contig17102_at	Contig17698_at
Contig10356_at	Contig16196_at	Contig37_at	Contig10878_s_at	HS07O05u_s_at
HY10C23u_at	Contig18481_at	Contig17635_at	Contig14819_at	Contig8747_at
HA15K23r_s_at	Contig16580_at	HW06H20u_at	Contig20148_s_at	Contig9412_s_at
Contig12788_at	Contig17600_at	Contig26584_at	Contig10982_at	Contig21046_at
HS06O12u_at	Contig20529_s_at	Contig4728_at	rbags22e20_at	Contig11563_at
Contig619_at	Contig25707_at	Contig414_x_at	Contig12927_at	Contig13763_at
Contig17921_at	Contig11481_at	Contig11449_at	Contig130_at	Contig20068_at
HVSMEa0019D10r2_at	Contig22680_at	Contig15468_at	Contig18449_at	HVSMEk0018M19r2_at
Contig12695_at	HV03P03u_at	HZ47110r_at	HVSMEm0013I03r2_at	HY10N04u_s_at
Contig9232_at	Contig9141_at	Contig19031_at	Contig15470_at	Contig16311_at
Contig13188_at	Contig11204_at	Contig118_at	Contig13623_at	Contig1161_at
Contig11163_s_at	rbags23o05_x_at	Contig8195_at	Contig22282_at	
Contig4518_at	HT01M21w_at	HT08O11u_at	HM12H18r_at	
Contig8506_at	HA14H04r_at	Contig16570_at	Contig20105_at	
HVSMEa0025C01f_at	Contig167_x_at	Contig21836_at	HU12J04u_at	
Contig1430_at	Contig16483_at	Contig4131_at	Contig10157_at	
Contig10360_at	Contig14_at	Contig18000_at	Contig443_at	
Contig4518_s_at	Contig7592_at	HY04H14u_at	Contig10202_at	
Contig13652_at	Contig3398_at	Contig602_at	Contig9465_at	
Contig455_s_at	Contig12146_at	Contig21680_at	Contig14921_s_at	
Contig10142_at	HV_CEb0009O15r2_s_at	Contig28_s_at	Contig7497_at	
Contig19634_at	Contig13187_at	EBma01_SQ005_K17_at	Contig14344_at	
Contig14370_at	Contig14606_at	Contig145_at	rbags23o05_at	
rbah59e19_s_at	Contig23134_at	Contig7590_at	HB22D03r_at	
Contig24198_at	HA03G23u_at	Contig17419_at	HVSMEk0011G17r2_at	
Contig5561_at	Contig11195_at	Contig5656_at	HVSMEa0022B10r2_s_at	
Contig6889_at	rbaal24b05_s_at	Contig19745_s_at	HVSMEb0011P07r2_at	
Contig5352_at	HW07A15u_at	HV_CEA0014H05r2_at	Contig24094_at	
Contig13143_at	Contig11577_at	Contig14272_at	Contig9121_at	
Contig10667_at	HVSMEa0007F09r2_at	Contig21909_at	Contig3640_at	
Contig10435_at	HW06H04u_at	Contig145_x_at	Contig22576_at	
Contig11618_at	Contig1162_at	HA22L21r_at	Contig10468_at	
Contig653_at	Contig6870_at	HV14K04u_s_at	Contig9837_at	
Contig4711_s_at	Contig1154_s_at	Contig3699_s_at	EBro03_SQ005_P18_at	
Contig3626_s_at	Contig8894_at	HVSMEh0086A12r2_s_at	EBro03_SQ005_P18_x_at	
Contig5544_at	Contig14836_at	Contig6958_s_at	Contig24813_at	
Contig2169_at	Contig23957_at	Contig14049_at	Contig2455_at	
	HVSMEg0007D17r2_at	Contig26529_at	Contig576_s_at	
	Contig481_at	Contig12170_at	Contig12975_at	
	Contig1064_at	Contig2059_s_at	Contig8053_at	
	HVSMEc0008I05r2_s_at	Contig25088_at	Contig10173_at	
	Contig12640_at	Contig26142_at	Contig26491_at	
	Contig13614_at	Contig204_s_at	Contig9551_at	
	Contig1616_at	Contig23781_at	Contig18666_at	
	Contig11338_at	Contig16959_at	Contig25153_at	
	Contig16911_at	Contig8654_at	Contig15363_at	
	Contig9632_at	Contig657_s_at	Contig9747_at	
	Contig9283_at	Contig6032_s_at	Contig25030_s_at	
	Contig10819_at	HA22C01r_s_at	Contig12960_at	
	Contig135_at	Contig23204_at	Contig13114_at	
	Contig25912_at	Contig11158_at	Contig11651_at	
	HV12H04u_at	Contig6068_at	EBem05_SQ001_G16_at	
	HVSMEa0015E21r2_at	Contig19812_at	HF21B24r_s_at	
	Contig24970_at	Contig10878_at	Contig239_s_at	
	Contig14860_at	Contig10834_s_at	Contig16713_at	
	Contig124_at	Contig12383_at	Contig4194_at	
	Contig414_at	Contig154_at	Contig11447_at	
	Contig11774_at	Contig9782_at	Contig21874_at	
	Contig11745_at	Contig17834_at	HVSMEa0007K04r2_at	
	Contig8650_at	Contig25010_at	EBpi07_SQ002_E23_s_at	
	Contig13222_at	EBem10_SQ001_P13_s_at	Contig7748_at	
	rbaal36n07_at	Contig26594_at	Contig5244_at	
	Contig16509_at	Contig19917_at	Contig9871_at	
	Contig338_at	Contig186_x_at	Contig24103_at	
	Contig12185_at	Contig4344_at	Contig1141_s_at	
	Contig59_x_at	Contig684_s_at	Contig15405_s_at	
	Contig22271_at	Contig701_x_at	Contig14920_at	

Tabla 27: Valores de ΔCT , $\Delta\Delta CT$, $2^{-\Delta\Delta CT}$ y medias de cada réplica biológica y técnica de los genes de síntesis (ZEP2 y AO5a), degradación (ABA8'OH y BG3), y de los genes ABI1b, ABI5, FCA, VP1 y FUS3 de la línea DH6148 de cebada.

MUESTRAS	ZEP2				AO5a				ABA8'OH				BG3						
	ACT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$	MEDIAS	DE	EE	ACT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$	MEDIAS	DE	EE	ACT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$	MEDIAS	DE	EE	
DH6148 0dp	s/d	s/d	s/d	0,08	0,02	0,01	2,06	2,81	0,14	0,34	0,17	0,10	2,98	3,74	0,08	0,05	0,04	0,03	0,03
DH6148 0dp	2,73	3,49	0,09	0,52	1,27	0,41	0,38	1,13	0,46	0,22	0,16	4,98	5,74	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01
DH6148 0dp	3,14	3,90	0,07	0,38	1,13	0,46	0,38	1,13	0,46	0,22	0,16	4,98	5,74	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01
DH6148 2dp	8,05	8,80	0,00	0,01	0,01	0,00	0,48	1,24	0,42	0,58	0,22	0,16	6,30	7,06	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01
DH6148 2dp	5,36	6,12	0,01	-0,32	0,44	0,74	0,32	0,44	0,74	0,58	0,22	0,16	6,48	7,23	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01
DH6148 2dp	6,52	7,28	0,01	0,01	0,01	0,00	0,05	0,44	0,74	0,58	0,22	0,16	6,48	7,23	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01
DH6148 4dp	s/d	s/d	s/d	0,01	0,01	0,00	6,05	6,81	0,01	0,03	0,03	0,02	7,16	7,92	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00
DH6148 4dp	5,90	6,66	0,01	3,65	4,41	0,05	3,65	4,41	0,05	0,03	0,03	0,02	7,16	7,92	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00
DH6148 4dp	7,70	8,46	0,00	0,00	0,00	0,00	5,54	6,30	0,01	0,01	0,01	0,00	8,36	9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DH6148 1dc	s/d	s/d	s/d	0,00	0,00	0,00	6,19	6,95	0,01	0,01	0,01	0,00	5,05	5,81	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
DH6148 1dc	7,47	8,22	0,00	0,00	0,00	6,19	6,95	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	5,05	5,81	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
DH6148 1dc	7,04	7,79	0,00	0,00	0,00	8,12	8,88	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,94	7,70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DH6148 2dc	8,94	9,70	0,00	0,00	0,00	3,83	4,59	0,04	0,03	0,01	0,00	0,00	8,76	9,52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DH6148 2dc	7,12	7,88	0,00	0,00	0,00	4,56	5,32	0,03	0,03	0,01	0,00	0,00	8,29	9,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DH6148 2dc	7,38	8,13	0,00	0,01	0,01	4,16	4,91	0,03	0,03	0,01	0,00	0,00	8,29	9,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DH6148 4dc	s/d	s/d	s/d	0,01	0,01	0,01	3,00	3,76	0,07	0,16	0,12	0,08	6,62	7,38	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
DH6148 4dc	5,60	6,36	0,01	1,32	2,07	0,24	1,32	2,07	0,24	0,16	0,12	0,08	6,62	7,38	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
DH6148 8dc	5,72	6,47	0,01	0,01	0,00	0,10	0,86	0,55	1,01	0,65	0,46	0,00	3,98	4,73	0,04	0,05	0,02	0,01	0,00
DH6148 8dc	6,83	7,58	0,01	-1,31	-0,56	1,47	-1,31	-0,56	1,47	0,65	0,46	0,00	3,26	4,02	0,06	0,05	0,02	0,01	0,00
DH6148 12dc	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,26	2,01	0,25	0,25	0,00	0,00	4,60	5,36	0,02	0,02	0,01	0,00	0,00
DH6148 12dc	0,00	0,00	0,00	1,23	1,99	0,25	1,23	1,99	0,25	0,25	0,00	0,00	5,35	6,11	0,01	0,02	0,01	0,00	0,00
DH6148 12dc	0,00	0,00	0,00	1,23	1,99	0,25	1,23	1,99	0,25	0,25	0,00	0,00	5,35	6,11	0,01	0,02	0,01	0,00	0,00

MUESTRAS	ABIB			ABIS			FOA			VPI			FUS3																	
	ACT	ΔACT	2 ^{ΔACT}	MEDIAS	DE	EE	ACT	ΔACT	2 ^{ΔACT}	MEDIAS	DE	EE	ACT	ΔACT	2 ^{ΔACT}	MEDIAS	DE	EE												
DH6148 04p	1,05	1,80	0,29	0,18	0,11	0,06	3,08	3,83	0,07	0,05	0,03	0,02	1,23	1,99	0,25	0,09	0,14	0,08	6,15	6,91	0,01	0,00	0,00	0,00	0,47	1,22	0,43	0,24	0,16	0,09
DH6148 04p	1,68	2,43	0,19				4,33	5,08	0,03				4,86	5,62	0,02				s/d	s/d					1,79	2,55	0,17			
DH6148 04p	3,18	3,93	0,07				2,10	2,86	0,14				6,02	6,77	0,01				9,38	10,14	0,00				2,18	2,94	0,13			
DH6148 24p	0,47	1,22	0,43	0,52	0,13	0,10	2,10	2,86	0,14	0,10	0,05	0,03	2,94	3,70	0,08	0,07	0,01	0,01	5,09	5,85	0,02	0,03	0,02	0,01	-0,68	0,08	0,95	1,52	1,36	0,78
DH6148 24p	-0,06	0,69	0,62				2,22	2,98	0,13				2,95	3,70	0,08				3,49	4,25	0,03				-2,37	-1,62	3,07			
DH6148 24p				3,78	4,54	0,04							3,40	4,15	0,06				3,49	4,25	0,05				0,13	0,89	0,54			
DH6148 44p	2,61	3,36	0,10	0,08	0,03	0,02	2,51	3,27	0,10	0,10	0,01	0,00	3,34	4,10	0,06	0,07	0,01	0,01	2,89	3,45	0,09	0,07	0,02	0,01	-0,03	0,73	0,60	1,27	0,83	0,48
DH6148 44p	3,46	4,20	0,05				2,53	3,29	0,10				2,76	3,52	0,08				3,61	4,37	0,05				-0,76	0,00	1,00			
DH6148 44p				2,74	3,49	0,09							3,14	3,90	0,07				3,29	4,04	0,06				-1,89	-1,14	2,20			
DH6148 14c	5,33	6,09	0,01	0,01	0,01	0,00	5,77	6,52	0,01	0,03	0,03	0,02	3,38	4,13	0,06	0,06	0,01	0,01	3,70	3,93	0,07	0,08	0,04	0,02	1,60	2,36	0,20	0,34	0,27	0,16
DH6148 14c	6,13	6,88	0,01				6,08	6,83	0,01				3,39	4,15	0,06				3,70	3,93	0,07				1,79	2,55	0,17			
DH6148 14c	4,92	5,68	0,02				3,28	4,03	0,06				2,86	3,61	0,08				2,23	2,98	0,13				-0,15	0,60	0,66			
DH6148 24c	4,64	5,40	0,02	0,02	0,01	0,00	4,74	5,50	0,02	0,02	0,00	0,00	1,99	2,75	0,15	0,10	0,04	0,03	2,77	3,53	0,09	0,07	0,02	0,01	-0,30	0,45	0,73	0,77	0,39	0,22
DH6148 24c	5,93	6,69	0,01				5,21	5,96	0,02				2,87	3,63	0,08				3,48	4,24	0,05				0,56	1,32	0,40			
DH6148 24c	4,68	5,44	0,02				5,04	5,80	0,02				3,13	3,89	0,07				3,65	3,80	0,07				-0,99	-0,23	1,16			
DH6148 44c	3,68	4,43	0,05	0,06	0,02	0,01	4,68	5,43	0,02	0,05	0,03	0,02	3,80	4,55	0,04	0,11	0,10	0,07	2,27	3,02	0,12	0,12	0,00	0,00	-0,05	0,71	0,61	4,40	5,36	3,80
DH6148 44c	3,01	3,77	0,07				3,06	3,81	0,07				1,68	2,44	0,18				2,33	3,09	0,12				-3,79	-3,03	8,19			
DH6148 84c	2,51	3,27	0,10	0,19	0,13	0,09	1,57	2,33	0,20	0,19	0,01	0,01	-0,12	0,64	0,64	0,65	0,01	0,01	0,09	0,83	0,56	0,56	0,00	0,00	-5,33	-4,57	23,83	23,75	0,10	0,07
DH6148 84c	1,06	1,82	0,28				1,65	2,40	0,19				-0,14	0,61	0,65				0,09	0,85	0,56				-5,32	-4,57	23,88			
DH6148 124c	2,31	3,06	0,12	0,09	0,05	0,03	2,27	3,03	0,12	0,11	0,02	0,01	1,73	2,49	0,18	0,16	0,03	0,02	0,94	1,70	0,31	0,27	0,06	0,04	-3,07	-2,31	4,96	3,74	1,72	1,22
DH6148 124c	3,55	4,31	0,05				2,55	3,31	0,10				2,16	2,91	0,13				1,39	2,15	0,23				-2,09	-1,34	2,53			

Tabla 28: Valores de ΔCT , $\Delta\Delta CT$, $2^{-\Delta\Delta CT}$ y medias de cada réplica biológica y técnica de los genes *FLA26*, *TAA1b*, *FER* y *CGL1*, en ovarios jóvenes y maduros de los cultivares Pavon y Caramba.

MUESTRAS	Ta.1839.1					Ta.9528.1					Ta.14561.2					Ta.13696.1								
	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$	MEDIAS	DE	EE	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$	MEDIAS	DE	EE	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$	MEDIAS	DE	EE	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$	MEDIAS	DE	EE
POVJ0d	0.85	1.94	0.26	0.40	0.13	0.07	1.71	2.80	0.14	0.17	0.08	0.05	0.75	1.84	0.28	0.12	0.14	0.08	2.21	3.30	0.10	0.14	0.05	0.03
POVJ0d	-0.12	0.97	0.51	0.40	0.13	0.07	2.07	3.16	0.11	0.17	0.08	0.05	4.56	5.65	0.02	0.12	0.14	0.08	1.29	2.38	0.19	0.14	0.05	0.03
POVJ0d	0.09	1.18	0.44	0.99	0.06	0.04	0.81	1.90	0.27	0.27	0.17	0.10	2.92	4.01	0.06	0.13	0.16	0.09	1.86	2.95	0.13	0.31	0.24	0.14
POVJ5d	-1.09	0.00	1.00	0.99	0.06	0.04	1.59	2.68	0.16	0.27	0.17	0.10	0.58	1.67	0.31	0.13	0.16	0.09	1.89	2.98	0.13	0.31	0.24	0.14
POVJ5d	-1.16	-0.07	1.05	0.99	0.06	0.04	0.04	1.13	0.46	0.27	0.17	0.10	2.63	3.72	0.08	0.13	0.16	0.09	-0.30	0.79	0.58	0.31	0.24	0.14
POVJ5d	-0.98	0.11	0.93	0.99	0.06	0.04	1.33	2.42	0.19	0.27	0.17	0.10	5.18	6.27	0.01	0.13	0.16	0.09	1.00	2.09	0.24	0.31	0.24	0.14
POVJ10d	-0.55	0.54	0.69	0.79	0.14	0.10	-2.54	-1.45	2.73	4.03	1.84	1.30	1.11	2.20	0.22	0.23	0.01	0.01	0.22	1.31	2.09	0.40	0.40	0.00
POVJ10d	-0.92	0.17	0.89	0.79	0.14	0.10	-3.50	-2.41	5.33	0.33	0.22	0.13	1.02	2.11	0.23	0.23	0.01	0.01	0.23	1.32	1.32	0.40	0.40	0.00
POVJ15d	-2.40	-1.31	2.49	2.71	0.73	0.42	2.28	3.37	0.10	0.33	0.22	0.13	-0.41	0.68	0.62	0.61	0.43	0.25	-0.83	0.26	0.83	0.90	0.10	0.07
POVJ15d	-2.91	-1.82	3.52	0.40	0.13	0.07	0.40	1.49	0.36	0.33	0.22	0.13	-1.13	-0.04	1.03	0.61	0.43	0.25	-1.05	0.04	0.98	0.90	0.10	0.07
POVJ15d	-2.16	-1.08	2.11	0.82	0.41	0.24	-0.18	0.91	0.53	0.14	0.07	0.04	1.42	2.51	0.18	0.10	0.06	0.04	1.73	2.82	0.14	0.11	0.06	0.03
POVM0d	-0.63	0.46	0.73	0.82	0.41	0.24	1.13	2.22	0.21	0.14	0.07	0.04	1.44	2.53	0.17	0.10	0.06	0.04	3.41	4.50	0.04	0.11	0.06	0.03
POVM0d	-1.44	-0.36	1.27	0.90	0.19	0.11	2.72	3.81	0.07	0.318	0.69	0.40	3.08	4.16	0.06	0.16	0.16	0.12	1.75	2.84	0.14	0.37	0.23	0.13
POVM0d	-0.01	1.08	0.47	0.90	0.19	0.11	1.81	2.90	0.13	3.18	0.69	0.40	0.79	1.88	0.27	0.16	0.16	0.12	0.90	1.99	0.25	0.37	0.23	0.13
POVM5d	-1.05	0.04	0.97	0.90	0.19	0.11	-2.96	-1.87	3.66	0.82	0.95	0.55	0.79	1.88	0.27	0.16	0.16	0.12	-0.44	0.65	0.64	0.37	0.23	0.13
POVM5d	-0.54	0.55	0.68	0.90	0.19	0.11	-2.35	-1.26	2.39	0.82	0.95	0.55	3.59	4.68	0.04	0.22	0.11	0.07	1.03	2.12	0.23	0.30	0.06	0.04
POVM10d	-1.69	-0.60	1.52	1.95	0.61	0.43	-2.00	-0.91	1.88	0.82	0.95	0.55	0.75	1.84	0.28	0.22	0.11	0.07	0.91	1.99	0.25	0.30	0.06	0.04
POVM10d	-2.34	-1.25	2.38	0.90	0.61	0.43	-0.17	0.92	0.53	0.26	0.25	0.15	2.47	3.56	0.08	0.28	0.28	0.28	0.33	1.42	0.37	0.30	0.06	0.04
POVM10d	-2.49	-1.40	2.65	3.76	0.99	0.57	2.95	4.03	0.06	0.26	0.25	0.15	0.72	1.81	0.29	0.28	0.28	0.28	0.73	1.82	0.28	0.31	0.16	0.09
POVM15d	-3.12	-2.03	4.08	0.90	0.99	0.57	1.51	2.59	0.17	0.26	0.25	0.15	0.77	1.86	0.28	0.28	0.28	0.28	1.21	2.30	0.20	0.31	0.16	0.09
POVM15d	-3.27	-2.18	4.54	0.90	0.99	0.57	-0.22	0.87	0.55	0.26	0.25	0.15	-0.10	0.99	0.50	0.28	0.28	0.28	-0.08	1.01	0.50	0.31	0.16	0.09
POVM15d	-3.27	-2.18	4.54	0.90	0.99	0.57	2.76	3.85	0.07	0.26	0.25	0.15	3.22	4.31	0.05	0.28	0.28	0.28	0.97	2.05	0.24	0.31	0.16	0.09

MUESTRAS	Ta.1839.1				Ta.9528.1				Ta.14561.2				Ta.13696.1												
	ACT	Δ ACT	Z_{Δ ACT	MEDIAS	DE	EE	ACT	Δ ACT	Z_{Δ ACT	MEDIAS	DE	EE	ACT	Δ ACT	Z_{Δ ACT	MEDIAS	DE	EE							
COVJ0d	0,44	1,53	0,35	0,55	0,26	0,15	1,59	2,68	0,16	0,29	0,19	0,11	0,33	1,42	0,37	0,17	0,18	0,10	1,27	2,36	0,19	0,19	0,07	0,04	
COVJ0d	0,01	1,10	0,47	1,27	2,36	0,20	2,04	3,13	0,11	0,37	0,17	0,10	2,03	3,12	0,12	0,11	0,12	0,12	2,03	3,12	0,12	0,12	0,07	0,04	
COVJ0d	-0,83	0,26	0,84	-0,11	0,98	0,51	3,80	4,88	0,03	0,38	0,27	0,16	0,88	1,97	0,26	0,17	0,13	0,08	0,93	2,02	0,25	0,25	0,07	0,04	
COVJ5d	-0,40	0,69	0,62	0,65	0,15	0,08	-0,55	0,54	0,69	0,38	0,27	0,16	0,88	1,97	0,26	0,17	0,13	0,08	0,59	1,68	0,31	0,31	0,07	0,04	
COVJ5d	-0,78	0,31	0,80	0,73	1,82	0,28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,84	1,93	0,26	0,26	0,07	0,04	
COVJ5d	-0,13	0,96	0,51	1,35	0,29	0,17	1,51	2,60	0,16	0,58	0,39	0,22	2,59	3,68	0,08	0,11	0,01	0,00	1,42	2,51	0,18	0,18	0,08	0,05	
COVJ10d	-1,77	-0,68	1,60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22	2,00	3,09	0,12	0,12	0,12	0,00	0,67	1,76	0,29	0,29	0,08	0,05	
COVJ10d	-1,58	-0,49	1,40	1,34	0,39	0,78	0,25	1,34	0,39	0,14	0,11	0,06	2,11	3,20	0,11	0,11	0,12	0,07	0,28	1,37	0,39	0,39	0,21	0,12	
COVJ10d	-1,14	-0,06	1,04	2,63	1,20	0,69	-0,72	0,37	0,78	0,14	0,11	0,06	2,11	3,20	0,11	0,11	0,12	0,07	1,03	2,12	0,23	0,23	0,21	0,12	
COVJ15d	-2,22	-1,13	2,19	2,63	1,20	0,69	2,25	3,34	0,10	0,14	0,11	0,06	0,68	1,76	0,29	0,39	0,12	0,07	2,00	3,09	0,12	0,12	0,33	0,21	0,12
COVJ15d	-1,87	-0,78	1,72	2,04	0,36	0,21	2,86	3,95	0,06	0,29	0,07	0,04	0,42	1,51	0,35	0,25	0,22	0,13	-0,18	0,91	0,53	0,53	0,05	0,03	
COVJ15d	-3,08	-2,00	3,99	2,04	0,36	0,21	0,83	1,92	0,26	0,29	0,07	0,04	-0,14	0,95	0,52	0,25	0,22	0,13	0,51	1,60	0,33	0,33	0,05	0,03	
COVM0d	-1,80	-0,71	1,64	2,04	0,36	0,21	1,02	2,11	0,23	0,29	0,07	0,04	-0,03	1,06	0,48	0,25	0,22	0,13	1,99	3,08	0,12	0,12	0,17	0,05	0,03
COVM0d	-2,31	-1,22	2,32	1,46	0,36	0,21	0,37	1,46	0,36	0,29	0,07	0,04	3,88	4,97	0,03	0,03	0,03	0,03	1,30	2,39	0,19	0,19	0,17	0,05	0,03
COVM0d	-2,20	-1,11	2,16	1,89	0,27	0,27	0,80	1,89	0,27	0,77	0,24	0,14	0,91	2,00	0,25	0,24	0,26	0,15	1,19	2,28	0,21	0,21	0,15	0,16	0,09
COVM5d	-2,72	-1,63	3,09	1,60	1,30	0,75	-0,75	0,34	0,79	0,77	0,24	0,14	-0,22	0,87	0,55	0,24	0,26	0,15	-0,05	1,04	0,48	0,48	0,15	0,16	0,09
COVM5d	-0,68	0,41	0,75	1,10	-0,01	1,00	-1,10	-0,01	1,00	0,26	0,16	0,09	2,83	3,92	0,07	0,07	0,07	0,07	1,54	2,63	0,16	0,16	0,16	0,16	0,09
COVM5d	-1,01	0,08	0,95	2,48	0,88	0,51	-0,15	0,94	0,52	0,26	0,16	0,09	1,97	3,06	0,12	0,12	0,12	0,24	0,74	1,83	0,28	0,28	0,16	0,11	
COVM10d	-1,70	-0,61	1,52	2,48	0,88	0,51	0,08	1,17	0,44	0,26	0,16	0,09	-1,40	-0,31	1,24	0,76	0,41	0,24	0,42	1,51	0,35	0,35	0,16	0,11	
COVM10d	-2,80	-1,71	3,26	1,09	2,18	0,22	1,09	2,18	0,22	0,19	0,12	0,09	-0,28	0,81	0,57	0,57	0,57	-0,30	0,79	0,58	0,58	0,12	0,12	0,12	
COVM10d	-2,50	-1,41	2,66	1,90	2,98	0,13	1,90	2,98	0,13	0,19	0,12	0,09	-0,05	1,04	0,49	0,49	0,49	1,92	3,01	0,12	0,12	0,25	0,17	0,12	
COVM15d	-2,72	-1,63	3,10	3,99	1,26	0,89	2,22	3,31	0,10	0,19	0,12	0,09	-0,54	0,55	0,68	0,68	0,68	1,92	3,01	0,12	0,12	0,25	0,17	0,12	
COVM15d	-3,38	-2,29	4,88	1,85	0,28	0,28	0,76	1,85	0,28	0,17	1,26	0,42	0,17	1,26	0,42	0,42	0,42	0,34	1,43	1,43	0,37	0,37	0,17	0,12	0,12

