

Índice

| | |
|--|-----------|
| Resúmenes..... | 1 |
| Resumen..... | 3 |
| Resum..... | 7 |
| Abstract..... | 11 |
| Abreviaturas..... | 15 |
| I. Introducción general..... | 21 |
| 1.1. Los cítricos..... | 23 |
| 1.1.1. Origen y difusión..... | 23 |
| 1.1.2. Caracterización botánica y agronómica..... | 23 |
| 1.1.2.1. Taxonomía..... | 23 |
| 1.1.2.2. Características agronómicas..... | 23 |
| 1.1.3. Importancia económica..... | 24 |
| 1.1.3.1. Producción de cítricos..... | 25 |
| 1.1.3.2. Superficie destinada al cultivo..... | 26 |
| 1.2. La abscisión es un proceso de separación celular..... | 26 |
| 1.2.1. La separación celular..... | 26 |
| 1.2.2. La abscisión..... | 27 |
| 1.2.2.1. Etapas de la abscisión..... | 27 |
| 1.2.2.2. Diferenciación de la zona de abscisión..... | 28 |
| 1.2.2.3. Factores desencadenantes de la abscisión..... | 32 |
| 1.2.2.3.1. Factores fisiológicos..... | 32 |
| 1.2.2.3.2. Factores ambientales..... | 32 |
| 1.2.2.3.3. Factores hormonales..... | 34 |
| 1.2.2.4. Cambios anatómicos asociados a la abscisión..... | 36 |
| 1.2.2.5. Cambios bioquímicos y moleculares asociados a la abscisión..... | 37 |
| 1.2.2.5.1. Enzimas hidrolíticas..... | 37 |
| 1.2.2.5.2. Enzimas relacionadas con la defensa frente a patógenos..... | 39 |
| 1.2.2.5.3. Otras enzimas implicadas en el proceso de abscisión..... | 40 |
| 1.2.3. La abscisión en los cítricos..... | 42 |
| 1.2.3.1. Zonas de abscisión en hojas y frutos de cítricos..... | 44 |
| 1.2.3.2. Control hormonal de la abscisión en los cítricos..... | 45 |

| | |
|---|-----------|
| 1.2.3.3. Cambios en la expresión génica y en la actividad enzimática durante la abscisión en cítricos..... | 47 |
| 1.2.3.4. Estudio de la abscisión en cítricos: finalidad y perspectivas..... | 48 |
| II. Objetivos..... | 51 |
| III. Análisis de la expresión génica en la zona de abscisión C de frutos cítricos durante la abscisión inducida por etileno..... | 57 |
| 3.1. Introducción..... | 59 |
| 3.2. Materiales y métodos..... | 62 |
| 3.2.1. Material vegetal y tratamientos..... | 62 |
| 3.2.1.1. Tratamiento <i>in vitro</i> con etileno a frutos de la variedad ‘Washington Navel’..... | 62 |
| 3.2.1.2. Tratamiento <i>in vitro</i> con ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) a frutos de la variedad ‘Navel Ricalate’..... | 62 |
| 3.2.2. Determinación de la fuerza de retención de los frutos..... | 63 |
| 3.2.3. Muestreo de material vegetal..... | 63 |
| 3.2.3.1. Muestras de ‘Washington Navel’..... | 63 |
| 3.2.3.2. Muestras de ‘Navel Ricalate’..... | 64 |
| 3.2.4. Morfología e histología de la ZAC..... | 64 |
| 3.2.5. Microscopía..... | 65 |
| 3.2.5.1. Criomicroscopía electrónica de barrido (Cryo-SEM)..... | 65 |
| 3.2.5.2. Microscopía óptica..... | 65 |
| 3.2.5.2.1. Método A..... | 65 |
| 3.2.5.2.2. Método B..... | 66 |
| 3.2.6. Microdissección asistida por láser (MAL)..... | 67 |
| 3.2.6.1. Crioinclusión del material vegetal y montaje de los portaobjetos..... | 67 |
| 3.2.6.2. Aislamiento de células mediante MAL..... | 67 |
| 3.2.7. Extracciones de RNA..... | 69 |
| 3.2.7.1. Extracción de RNA de las muestras que componen la referencia..... | 69 |
| 3.2.7.2. Microextracción de RNA a partir de muestras obtenidas mediante microdissección asistida por láser (MAL)..... | 69 |

| | |
|---|----|
| 3.2.8. Análisis de expresión génica mediante la hibridación de micromatrices de cDNA de cítricos (20 Ks)..... | 69 |
| 3.2.8.1. Primera ronda de amplificación..... | 70 |
| 3.2.8.2. Segunda ronda de amplificación..... | 71 |
| 3.2.8.3. Acople de fluoróforos..... | 72 |
| 3.2.8.4. Hibridación de micromatrices..... | 73 |
| 3.2.8.4.1. Preparación de las micromatrices (prehibridación)..... | 73 |
| 3.2.8.4.2. Preparación de las muestras..... | 73 |
| 3.2.8.4.3. Hibridación..... | 73 |
| 3.2.8.4.4. Lavados..... | 74 |
| 3.2.8.5. Escaneado de las micromatrices y adquisición de datos..... | 74 |
| 3.2.9. Normalización, control de calidad y análisis de las micromatrices..... | 75 |
| 3.2.10. Agrupación en ‘clusters’ de los unigenes regulados por etileno en la ZAC..... | 75 |
| 3.2.11. Asignación de categorías funcionales a los unigenes regulados diferencialmente..... | 76 |
| 3.2.12. Análisis de metabolitos mediante HPLC acoplada a espectrometría de masas en tandem (HPLC-MS/MS)..... | 76 |
| 3.2.13. RT-PCR semicuantitativa..... | 77 |
| 3.3. Resultados..... | 79 |
| 3.3.1. Cinética de la abscisión de frutos..... | 79 |
| 3.3.2. Detección de lignina en la zona de abscisión C..... | 80 |
| 3.3.3. Caracterización morfológica de la zona de abscisión C de los frutos..... | 81 |
| 3.3.3.1. Caracterización morfológica de la ZAC mediante microscopía electrónica de barrido..... | 81 |
| 3.3.3.2. Caracterización anatómica de la ZAC mediante microscopía óptica..... | 83 |
| 3.3.4. Expresión génica regulada por etileno en la zona de abscisión C y en la corteza del fruto..... | 86 |
| 3.3.5. Perfiles de expresión de los genes regulados por etileno en la zona de abscisión C..... | 87 |

| | |
|--|------------|
| 3.3.6. Clasificación funcional de los unigenes regulados por etileno en la zona de abscisión C y en la corteza del fruto..... | 88 |
| 3.3.7. Clasificación funcional de los unigenes regulados por etileno exclusivamente en la zona de abscisión C..... | 90 |
| 3.3.8. Validación del análisis de expresión mediante micromatrices por RT-PCR semicuantitativa..... | 114 |
| 3.4. Discusión..... | 116 |
| 3.5. Conclusiones..... | 131 |
| IV. Identificación de genes relacionados con el tráfico intracelular de vesículas en la zona de abscisión C..... | 133 |
| 4.1. Introducción..... | 135 |
| 4.2. Materiales y métodos..... | 138 |
| 4.2.1. Material vegetal y tratamientos..... | 138 |
| 4.2.2. Clasificación y análisis de perfiles de expresión de genes relacionados con el transporte intracelular de vesículas..... | 138 |
| 4.3. Resultados..... | 139 |
| 4.3.1. Estudio de los perfiles de expresión de genes relacionados con el tráfico intracelular de vesículas en la ZAC y en la CF..... | 139 |
| 4.3.1.1. Proteínas implicadas en la formación de vesículas en los orgánulos donadores..... | 139 |
| 4.3.1.2. Proteínas implicadas en la fusión de membranas..... | 142 |
| 4.3.1.3. Otras proteínas implicadas en el tráfico intracelular de vesículas..... | 145 |
| 4.4. Discusión..... | 148 |
| 4.5. Conclusiones..... | 158 |
| V. Identificación de genes relacionados con la remodelación de la pared celular durante la abscisión de frutos cítricos..... | 159 |
| 5.1. Introducción..... | 161 |
| 5.2. Materiales y métodos..... | 166 |
| 5.2.1. Material vegetal y tratamientos..... | 166 |
| 5.2.2. Muestreo de material vegetal..... | 166 |

| | |
|---|-----|
| 5.2.3. Análisis filogenético y estudio de la estructura proteica de familias génicas relacionadas con la modificación de la pared celular..... | 166 |
| 5.2.4. Análisis de expresión génica según la frecuencia de ESTs..... | 167 |
| 5.2.5. Aislamiento y análisis de promotores..... | 168 |
| 5.2.5.1. Extracción de DNA genómico..... | 168 |
| 5.2.5.2. Construcción de genotecas de DNA genómico..... | 168 |
| 5.2.5.3. ‘DNA Walking’..... | 169 |
| 5.2.5.4. Ligación de productos de PCR, clonación en <i>Escherichia coli</i> y purificación de plásmidos..... | 171 |
| 5.2.5.5. Análisis <i>in silico</i> de promotores..... | 172 |
| 5.2.6. Análisis de la composición de monosacáridos de las paredes celulares de la ZAC mediante cromatografía gas-líquido (GLC)..... | 172 |
| 5.2.7. Inmunolocalización de polímeros pépticos en la ZAC..... | 173 |
| 5.3. Resultados..... | 175 |
| 5.3.1. Análisis filogenético y estudio de la estructura proteica de familias de proteínas relacionadas con la modificación de la pared celular..... | 175 |
| 5.3.1.1. Endo- β -(1 \rightarrow 4)-glucanasas o Celulasas (EGasas o CELs; familia GH9 de glicósido hidrolasas)..... | 175 |
| 5.3.1.2. Poligalacturonasas (PGs; familia GH28 de glicósido hidrolasas)..... | 179 |
| 5.3.1.3. β -xilosidasas (β -XYLs; familia 3 de glicósido hidrolasas), α -xilosidasas (α -XYLs; familia 31 de glicósido hidrolasas) y α -L-arabinofuranosidasas (ASDs; familia 51 de glicósido hidrolasas)..... | 184 |
| 5.3.1.4. Xiloglucano transglicosilasas/hidrolasas (XTHs; familia 16 de glicósido hidrolasas)..... | 188 |
| 5.3.1.5. β -galactosidasas (β -GALs; familias 2 y 35 de glicósido hidrolasas)..... | 192 |
| 5.3.1.6. Pectin metilesterasas (PMEs; familia 8 de carbohidrato esterasas)..... | 195 |
| 5.3.1.7. Pectin acetilesterasas (PAEs; familia 13 de carbohidrato esterasas)..... | 200 |

| | |
|--|------------|
| 5.3.1.8. Pectato liasas (PLs; familia 1 de polisacárido liasas)..... | 202 |
| 5.3.1.9. Expansinas..... | 205 |
| 5.3.2. Detección de expresión génica diferencial en zonas de abscisión según la frecuencia de ESTs..... | 209 |
| 5.3.3. Aislamiento y análisis <i>in silico</i> de los promotores de posibles genes específicos del proceso de abscisión..... | 210 |
| 5.3.4. Composición de monosacáridos de las paredes celulares de la ZAC durante la abscisión inducida por etileno..... | 212 |
| 5.3.5. Inmunolocalización de (1→4)-β-D-galactano, (1→5)-α-L-arabinano y homogalacturonano en la ZAC inducida por ACC..... | 213 |
| 5.4. Discusión..... | 215 |
| 5.5. Conclusiones..... | 234 |
| VI. Discusión general..... | 237 |
| VII. Conclusiones generales..... | 247 |
| VIII. Referencias bibliográficas..... | 253 |
| IX. Anexos (Ver CD) | |