

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

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

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

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

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

3

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

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

Discusión General	137
Conclusiones Generales	142
Bibliografía	143