

Índice de Contenidos

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

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

VI. CONCLUSIONES.....	113
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	117
ANEXO I.....	141
ANEXO II.....	147