

INTRODUCCIÓN

1. Los cítricos.....	1
1.1. El género <i>Citrus</i> y su importancia económica.....	1
1.2. Desarrollo vegetativo de los cítricos	3
1.2.1. Aspectos generales.....	3
1.2.2. Control del desarrollo vegetativo.....	4
1.2.3. Influencia del patrón.....	5
1.3. Mejora genética en cítricos	6
2. Genómica funcional de plantas	7
2.1. Colecciones de ESTs: herramientas para la identificación de genes, el análisis de la expresión génica y el desarrollo de marcadores moleculares	8
2.2. Micromatrices de DNA: la revolución del análisis de la expresión génica	11
2.3. El Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos (CFGP)	13
3. Aproximación genómico-funcional a diversos aspectos del desarrollo vegetativo en cítricos	15
3.1. Biosíntesis de isoprenoides y flavonoides	15
3.1.1. Biosíntesis de isoprenoides	15
3.1.2. Biosíntesis de flavonoides.....	18
3.2. Mapas de expresión génica en plantas	20
3.3. Control del desarrollo vegetativo: giberelinas	21
3.3.1. Metabolismo de giberelinas (GAs).....	21
3.3.2. Modificación de la arquitectura de las plantas mediante cambios en los niveles de GA 20-oxidasas.....	23
3.3.3. Identificación de genes de respuesta temprana a GAs	25
OBJETIVOS	29

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal y tratamientos hormonales	31
1.1. Material de campo	31
1.2. Material de invernadero	32
2. Extracción de RNA y RNA poli(A ⁺) de plantas.....	32
2.1. Protocolo general de extracción de RNA total	33
2.1.1. Purificación adicional del RNA para los experimentos con micromatrices.....	33

2.1.2. Purificación adicional del RNA para los experimentos de RT-PCR.....	33
2.2. Extracción de RNA poli(A ⁺).....	34
3. Construcción y manipulación de una genoteca de cDNA	34
3.1. Genoteca primaria	34
3.2. Genoteca amplificada	35
3.3. Escisión masiva	36
4. Generación de una colección de ESTs	36
4.1. Obtención de DNA plasmídico y secuenciación	36
4.1.1. Cultivos bacterianos.....	36
4.1.2. Obtención de DNA plasmídico	37
4.1.3. Secuenciación.....	37
4.2. Pre-procesado y ensamblaje de ESTs	38
4.3. Anotación funcional de los unigenes	39
4.3.1. Metodología para la anotación básica de los unigenes: base de datos EST2uni.....	39
4.3.2. Métodos para la anotación adicional de los unigenes	39
4.4. Análisis de expresión génica según la frecuencia de ESTs	41
5. Construcción de la micromatriz de cDNA de cítricos CIT1	42
6. Experimentos de micromatrices de cDNA.....	43
6.1. Diseño de experimentos	44
6.2. Preparación de muestras de cDNA marcadas.....	46
6.2.1. Marcaje mediante el método indirecto	46
6.2.2. Caracterización de las propiedades del cDNA marcado.....	47
6.3. Hibridación de las micromatrices	47
6.3.1. Protocolo de hibridación A	48
6.3.2. Protocolo de hibridación B	49
6.4. Adquisición y análisis de la imagen	50
6.5. Pre-procesado y normalización de los datos	51
6.6. Evaluación de la calidad de los datos obtenidos con micromatrices	53
6.6.1. Parámetros de calidad de GenePix	53
6.6.2. Validación técnica de la micromatriz CIT1	54
6.7. Identificación de los genes expresados diferencialmente.....	55
6.7.1. Test de la <i>t</i> de Student.....	55
6.7.2. Análisis SAM.....	55
6.7.3. El problema de las pruebas múltiples	56
6.8. Análisis de agrupamiento y análisis funcional de los datos	56

7. Análisis de expresión de mRNA	57
7.1. Análisis Northern.....	57
7.1.1. Electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante	57
7.1.2. Transferencia de RNA a membranas de nylon	57
7.1.3. Obtención de las sondas de DNA	58
7.1.4. Hibridación con sondas radiactivas.....	58
7.2. RT-PCR semicuantitativa.....	59
8. Medidas de fotosíntesis	60

RESULTADOS Y DISCUSIÓN I: Análisis funcional de ESTs de cítricos

1. Genes implicados en el desarrollo vegetativo en cítricos.....	61
1.1. Obtención de una genoteca de tejidos vegetativos	61
1.2. Colección de ESTs: secuenciación y agrupamiento.....	62
1.3. Anotación funcional de los unigenes	64
1.4. Ontologías génicas enriquecidas en Veg1	65
1.4.1. Fotosíntesis.....	69
1.4.2. Fotosíntesis: proteínas de la antena.....	70
1.4.3. Fijación de carbono.....	73
2. Genes implicados en el metabolismo de isoprenoides y flavonoides en cítricos	74
2.1. Biosíntesis de isoprenoides	75
2.1.1. Biosíntesis de isopentenil difosfato y dimetilalil difosfato.....	75
2.1.2. Prenildifosfatos: precursores de los distintos tipos de terpenoides	79
2.1.3. Biosíntesis de monoterpenos y sesquiterpenos: aceites esenciales	83
2.1.4. Biosíntesis de triterpenos: brasinosteroides y limonoides	88
2.1.5. Biosíntesis de diterpenos: giberelinas.....	92
2.2. Biosíntesis de flavonoides	94

RESULTADOS Y DISCUSIÓN II: Mapas transcripcionales en cítricos

1. Caracterización de la micromatriz de cDNA de cítricos, CIT1, generada en el CFGP	99
1.1. Caracterización técnica de la micromatriz CIT1	99
1.1.1. Rango dinámico y niveles de sensibilidad	100
1.1.2. Reproducibilidad <i>intra-array</i>	101
1.1.3. Reproducibilidad <i>inter-array</i>	103

1.2. Validación de la micromatriz CIT1 como herramienta para identificar cambios en la expresión génica en cítricos	104
2. Caracterización de diferentes tejidos de cítricos mediante el análisis global de la expresión génica.....	108
2.1. Identificación de los genes comúnmente expresados en diversos tejidos de cítricos.....	108
2.2. Relación entre los tejidos estudiados según los perfiles de expresión génica	110
2.3. Identificación de los genes preferentemente expresados en la raíz.....	111
2.4. Identificación de los genes preferentemente expresados en los tejidos reproductivos	114
2.5. Identificación de los genes preferentemente expresados en los tejidos vegetativos.....	118

RESULTADOS Y DISCUSIÓN III: Regulación del transcriptoma de cítricos por giberelinas

1. Cambios en la expresión génica de entrenudos de plantas transgénicas de cítricos que sobre-expresan una GA 20-oxidasa	121
1.1. La sobre-expresión en sentido y en antisentido del gen <i>CcGA20ox1</i> modifica los niveles de transcritos endógenos de <i>CcGA20ox1</i>	121
1.2. La sobre-expresión en sentido del gen <i>CcGA20ox1</i> causa un remodelado substancial del transcriptoma	122
1.3. La sobre-expresión en sentido del gen <i>CcGA20ox</i> implica la sobre-representación de diversas ontologías génicas.....	127
1.3.1. Fotosíntesis y Utilización de Carbono.....	129
1.3.2. Biosíntesis de Proteínas	131
1.4. La activación transcripcional de los genes relacionados con la fotosíntesis conduce a un aumento en la capacidad fotosintética de las plantas <i>CcGA20ox</i>	132
1.5. La sobre-expresión en sentido del gen <i>CcGA20ox1</i> provoca cambios en los niveles de expresión de genes específicos.....	134
1.5.1. Metabolismo de GAs.....	134
1.5.2. Biosíntesis y modificación de la pared celular	134
1.5.3. Biosíntesis de lignina	136
1.5.4. Estrés de origen abiótico.....	137
1.5.5. Estrés de origen biótico.....	140

1.5.6. Factores de transcripción.....	140
2. Cambios en la expresión génica de entrenudos de explantes tratados con GA ₃ ...	142
2.1. La aplicación de GA ₃ a tiempos cortos altera el transcriptoma de los entrenudos de explantes de cítricos	142
CONCLUSIONES	147
BIBLIOGRAFÍA	149
ANEJOS	
Anejo I.....	173
Anejo II.....	193
Anejo III.....	201