

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS SUPLEMENTARIAS	1
ÍNDICE DE TABLAS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	11
1. Introducción al problema experimental	13
1.1 Necesidad de almacenamiento en frío de los frutos cítricos. El periodo de cuarentena	13
1.2 Sistema experimental empleado para estudiar la sensibilidad y tolerancia a bajas temperaturas en frutos cítricos	14
2. Daños por frío y sensibilidad a las bajas temperaturas en las plantas	15
2.1 Daños por frío durante el desarrollo de las plantas	17
2.2 Síntomas de DF durante la postcosecha de productos vegetales (frutos y hortalizas)	18
2.3 Desarrollo fisiológico del DF	19
3. Cascada de señalización del frío para la respuesta adaptativa en plantas	21
3.1 Mecanismos moleculares de tolerancia al frío	24
4. Efecto de las bajas temperaturas en frutos cítricos	25
4.1 Sensibilidad de los frutos cítricos al frío en la postcosecha	25
4.2 DF característicos de frutos cítricos	26
Daños por frío en frutos Fortune	26

4.3 Principales fitohormonas implicadas en el control hormonal de la respuesta al frío en frutos cítricos	27
4.4 Conservación postcosecha de frutos cítricos	29
4.4.1 Consideraciones generales	29
4.4.2 Estrategias para reducir el daño por frío en los frutos cítricos durante su almacenamiento postcosecha	30
5. Aproximación al estudio de los efectos del frío en los frutos cítricos	32
5.1 Antecedentes	32
5.2 Aproximación genómico-funcional al estudio de la biología de los cítricos	35
OBJETIVOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	41
1. Material biológico	43
1.1 Material vegetal	43
1.2 Cepas bacterianas, vectores y medios de cultivo	43
a) Cepas bacterianas de <i>Escherichia coli</i>	43
b) Vectores plasmídicos	44
c) Medios de cultivo	44
2. Tratamiento de almacenamiento en frío y preparación de muestras: Clemenules y Fortune	44
3. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos	45
3.1 Extracción y purificación de RNA total de flavedo	45
3.2 Extracción y purificación de RNA mensajero	46
3.3 Aislamiento y purificación de DNA plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	46
En placas de 96 pocillos	46
En tubo de 1,5 mL	47
4. Análisis de ácidos nucleicos	47
4.1 Análisis de RNA mediante <i>Northern blot</i>	47
4.2 Síntesis de sondas radiactivas	48

4.3 Electroforesis de ácidos nucleicos	48
5. Métodos de transformación de cepas bacterianas	49
5.1 Transformación por choque térmico	49
5.2 Transformación por electroporación	49
6. Secuenciación de DNA, búsqueda de homologías y alineamientos de ácidos nucleicos	49
7. Construcción y caracterización de una genoteca de fragmentos de cDNA de flavedo de frutos de <i>Clemenules</i> almacenados a 2°C	50
7.1 Obtención de cDNA	50
7.2 Ligación de adaptadores	51
7.3 Ligación al vector y empaquetamiento	51
7.4 Comprobación de tamaños de los insertos mediante por amplificación por PCR	52
7.5 Escisión masiva <i>in vivo</i>	52
8. Análisis genómico	54
8.1 Primera generación de micromatrices del CFGP	54
8.2 Diseño experimental	54
8.3 Marcaje de muestras de cDNA con fluoróforos	56
8.4 Hibridación de las micromatrices	57
8.5 Análisis de los resultados de las micromatrices	58
Obtención de imágenes	58
Filtrados de calidad de las hibridaciones	58
Normalización de los datos de expresión	58
Análisis de Componentes Principales	60
Identificación de genes expresados diferencialmente	60
Análisis funcional de los datos	61
CAPÍTULO 1: ELABORACIÓN DE UNA GENOTECA QUE INCLUYA CLONES DE RESPUESTA/ADAPTACIÓN MOLECULAR DE MANDARINAS A BAJAS TEMPERATURAS	63
Introducción	65
Resultados y Discusión:	71
1. Obtención de la genoteca	71
2. Resumen de la genoteca obtenida	73

3. Anotación de los clones obtenidos en la genoteca	79
4. Distribución de los ESTs de la genoteca FlavFr1 en unigenes	83
CAPÍTULO 2: ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DEL FLAVEDO EN RESPUESTA AL FRÍO DE MANDARINAS SENSIBLES (FORTUNE) Y TOLERANTES (CLEMENULES)	
Introducción	89
Resultados y discusión:	95
1. Diseño experimental	95
2. Análisis de calidad de los datos de las micromatrices	96
3. Análisis transcriptómico de la serie de almacenamiento en frío en la variedad sensible Fortune	97
3.1 Identificación de genes con cambios de expresión significativos en el flavedo de mandarinas Fortune durante su almacenamiento en frío	97
3.1.1 Aproximación general a los cambios transcriptómicos del flavedo durante el almacenamiento de mandarinas Fortune en frío	97
3.1.2 Análisis funcional de los cambios transcriptómicos del flavedo durante el almacenamiento de mandarinas Fortune en frío	100
4. Identificación de genes con cambios de expresión significativos en el flavedo de mandarinas Clemenules durante su almacenamiento en frío	106
4.1 Identificación de genes con expresión significativamente diferencial en la serie temporal de Clemenules	106
4.1.1 Aproximación general a los cambios transcriptómicos del flavedo durante el almacenamiento en frío de mandarinas Clemenules	106
4.1.2 Análisis funcional de los cambios transcriptómicos del flavedo durante el almacenamiento en frío de mandarinas Clemenules	108
4.2 Identificación de genes de respuesta rápida al frío en Clemenules	114
4.2.1 Análisis de la respuesta transcripcional del flavedo de mandarinas Clemenules durante las primeras horas de almacenamiento en frío	114
4.2.2 Análisis de la respuesta transcripcional del flavedo de mandarinas Clemenules durante las primeras 24 horas de almacenamiento en frío	118

5. Análisis comparativo de los cambios de expresión en el flavedo durante el almacenamiento en frío entre mandarinas Clemenules y Fortune	122
5.1 Comparación de los genes diferenciales identificados en Clemenules (CNmclase) con los identificados en Fortune (Fmclase)	123
5.2 Identificación de genes con respuesta diferencial entre frutos de ambas variedades en series equivalentes y a lo largo de todo su almacenamiento en frío	129
5.2.1 Diferencias de expresión intravarietal potencialmente relacionadas con la tolerancia de Clemenules:	133
SOM 5 (perfil de represión en ambas variedades con niveles de expresión superiores en CN respecto F)	133
SOM 6 (perfil de inducción en ambas variedades con niveles de expresión superiores en CN respecto F)	139
Componentes de la membrana (CN0>2 F0)	139
Biosíntesis de lípidos	139
Proteínas integrales	139
Degradación de proteínas (CN0>2 F0)	139
Respuesta a estrés abiótico (CN0>2 F0)	140
Estrés por metales pesados	140
Estrés oxidativo	140
Estrés hídrico	141
Respuesta a estrés biótico/abiótico (CN0>2 F0)	142
Metabolismo de carbohidratos (CN0>2 F0)	143
Señalización	144
Metabolismo y componentes de la membrana plasmática	144
Degradación de lípidos	144
Proteínas integrales	145
Estrés abiótico	146
Estrés térmico	146
Estrés osmótico	147
Estrés biótico: Patógenos	148
Metabolismo de RNA/DNA	149
Degradación de proteínas	150
Respuesta hormonal	151
Metabolismo de carbohidratos	153
Acumulación de almidón y azúcares	153
Glucólisis	154

Fotosíntesis	155
5.2.2 Expresión de genes potencialmente relacionados con el desarrollo de daños por frío en Fortune:	155
SOM 3 (perfil de inducción temprana y mayores niveles de expresión en F respecto CN)	155
SOM 4 (perfil de inducción tardía y mayores niveles de expresión en F respecto CN)	161
SOM 8 (perfil de inducción en ambas variedades con niveles de expresión superiores en F respecto CN)	169
6. Regulación hormonal de las respuestas al frío en Clemenules y Fortune	173
6.1 Ácido Abscísico	173
6.2 Etileno	177
7. Expresión de genes de señalización y respuesta al frío	178
7.1 Percepción del frío	178
Fluidez de la membrana plasmática	179
Calcio	180
Fosfolipasas	181
7.2 Transducción de la señal del frío	182
Fosfatasas	182
Proteínas quinasas	184
Genes de respuesta al estrés oxidativo	185
Genes de respuesta al estrés por bajas temperaturas (comparación con otros trabajos)	187
DISCUSIÓN FINAL y perspectivas	189
CONCLUSIONES	197
BIBLIOGRAFÍA	201