

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN 1

1. Los hongos como patógenos de plantas. 4
- 1.1. Proceso de infección de hongos patógenos de plantas. 4
- 1.2. Mecanismos de defensa de las plantas. 5
- 1.3. Etileno: biosíntesis y ruta de señalización 20
- 1.4. Respuesta de los frutos frente a la infección. 25
2. Podredumbres postcosecha de frutos cítricos. 28
- 2.1. Hongos fitopatógenos de frutos cítricos. 28
- 2.2. Medidas de control de enfermedades en frutos cítricos. 32
- 2.3. Respuestas de los frutos cítricos. 35
3. Herramientas genómicas en la caracterización de la interacción planta-patógeno. 39
- 3.1. Desarrollo de proyectos de genómica funcional en plantas. 39
- 3.2. El Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos 42

OBJETIVOS 47

MATERIALES Y MÉTODOS 51

1. Organismos: 53
- 1.1. Material vegetal. 53
- 1.2. Microorganismos. 54
2. Inoculaciones y toma de muestra 55
- 2.1. Inoculaciones. 55
- 2.2. Toma de muestra. 56
3. Tratamientos y medida de etileno. 57
- 3.1. Tratamiento con etileno, 1-metilciclopropano (1-MCP) y aire. 57
- 3.2. Determinación de la producción de etileno y estudio del desarrollo de la infección. 57
4. Purificación y cuantificación de RNA total y mRNA 59
- 4.1. Extracción de RNA total de tejido de naranja. 59
- 4.2. Medida de la cantidad y calidad del RNA. 60
- 4.3. Purificación de mRNA 60
5. Análisis Northern 60
- 5.1. Electroforesis y transferencia del RNA a membranas de nailon. 60
- 5.2. Síntesis y marcaje de las sondas 61
- 5.3. Hibridación y análisis de datos. 61
6. Construcción de bibliotecas génicas y análisis de sus secuencias: 62
- 6.1. Biblioteca de ESTs (RindPdig24). 62
- 6.2. Biblioteca de cDNAs de longitud completa (PostharvP1). 64
- 6.3. Análisis de las secuencias de las bibliotecas. 67
7. Análisis de expresión génica mediante el empleo de macromatrices de cDNA. 68
- 7.1. Descripción de la macromatriz. 68
- 7.2. Marcaje con ³²P de la primera cadena de cDNA por transcripción reversa. 69
- 7.3. Hibridación de la macromatriz de cDNA y análisis informático de las imágenes. 70
- 7.4. Secuenciación de una selección de clones de la macromatriz. 71
8. Análisis global de expresión génica mediante el empleo de micromatrices de cDNA. 71

8.1.	Diseño experimental.	72
8.2.	Síntesis y purificación de aminoalil-cDNA (AA-cDNA).	74
8.3.	Acoplamiento de los fluoróforos al AA-cDNA y purificación de los Cy's cDNA.	75
8.4.	Preparación de las sondas e hibridación de las micromatrices de cDNA.	75
8.5.	Adquisición y procesado de las imágenes.	76
8.6.	Ontologías génicas (GO).	78
RESULTADOS		81
1.	Estudio de la implicación del etileno en la respuesta de frutos cítricos a la infección por el hongo <i>P. digitatum</i> .	83
1.1.	Progreso de la podredumbre verde causada por <i>P. digitatum</i> en frutos de mandarina 'Clemenules'.	83
1.2.	Producción de etileno durante las fases iniciales de la infección de frutos de mandarina con <i>P. digitatum</i> .	85
1.3.	Cambios en la expresión de genes implicados en la biosíntesis de etileno durante la infección de frutos de mandarina con <i>P. digitatum</i> .	86
1.4.	Efecto del pretratamiento con un inhibidor de la acción del etileno (1-MCP) sobre el desarrollo de la infección y la producción de etileno.	88
2.	Análisis de una biblioteca sustractiva enriquecida en genes inducidos durante la infección de frutos de naranja 'Navelina' por el hongo <i>P. digitatum</i> .	91
2.1.	Utilización de una biblioteca de cDNA con expresión diferencial durante la infección elaborada mediante la técnica de Hibridación Sustractiva mediada por PCR Supresiva (SSH) y de una macromatriz de cDNA generada a partir de ella.	91
2.2.	Hibridación diferencial de la macromatriz con muestras de infección y de herida.	92
2.3.	Identificación de cambios en la expresión de genes relacionados con la respuesta de los frutos cítricos al etileno, la herida y/o la infección.	93
2.4.	Secuenciación y análisis de las secuencias de RindPdigS.	96
2.5.	Caracterización transcripcional de la respuesta de frutos de naranja 'Navelina' a la infección por <i>P. digitatum</i> .	99
3.	Generación de bibliotecas de cDNA de genes expresados durante la infección.	104
3.1.	Construcción de las bibliotecas de cDNA RindPdig24 y PostharvP1.	104
3.2.	Comparación de las bibliotecas de cDNA RindPdig24 y PostharvP1.	106
3.3.	Análisis de las bibliotecas PostharvP1, RindPdig24 y RindPdigS en el contexto del Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos.	112
4.	Análisis global de la expresión génica en frutos de mandarina 'Clemenules' en respuesta a la infección por <i>P. digitatum</i> mediante hibridación con una micromatriz de cDNA del Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos.	116
4.1.	Elaboración de la muestra de referencia.	116
4.2.	Hibridaciones.	117
4.3.	Expresión diferencial en las condiciones de estudio.	119
4.4.	Anotación funcional.	125
4.5.	Análisis de la expresión de genes relacionados con patogénesis, estrés oxidativo, transcripción y señalización.	137
5.	Análisis de la expresión génica en frutos cítricos en respuesta a herida, infección y etileno mediante hibridación Northern.	143

5.1.	Expresión diferencial de genes de frutos cítricos en respuesta a la infección.	
		144
5.2.	Implicación del etileno en la expresión de genes por la infección de frutos cítricos.	153
5.3.	Comparación de la respuesta de naranjas ‘Navelate’ a la infección con hongos patógenos y no patógenos del género <i>Penicillium</i> .	159
	DISCUSIÓN	167
1.	Caracterización molecular de la interacción fruto-patógeno.	169
1.1.	Infección de frutos cítricos por hongos del género <i>Penicillium</i> .	170
1.2.	Variabilidad experimental del patosistema fruto cítrico- <i>P. digitatum</i> .	171
2.	Aplicación de herramientas genómicas en el estudio de la interacción fruto cítrico- <i>P. digitatum</i> .	174
2.1.	Análisis de secuencias.	174
2.2.	Hibridaciones de matrices.	179
2.3.	Anotación funcional global de la respuesta del fruto cítrico a la infección por <i>P. digitatum</i> .	183
3.	Redireccionamiento del metabolismo celular del fruto en respuesta a la infección por <i>P. digitatum</i> . Implicación del metabolismo secundario.	191
3.1.	Biosíntesis de corismato/siquimato.	193
3.2.	Biosíntesis de Isopentenildifosfato (IPP).	195
3.3.	Metabolismo de fenilpropanoides.	198
3.4.	Metabolismo de alcaloides.	201
3.5.	Expresión de genes del metabolismo secundario en los frutos cítricos por la interacción con diferentes hongos del género <i>Penicillium</i> .	204
4.	Señalización de respuestas de defensa del fruto cítrico a la infección. Implicación del etileno.	206
4.1.	Producción de etileno en la respuesta del fruto a la infección.	209
4.2.	Estudio de la inducción de la síntesis de etileno durante la infección por anotación funcional	211
4.3.	¿Está implicado el etileno en la respuesta de defensa del fruto durante la infección?	213
	CONCLUSIONES	221
	BIBLIOGRAFÍA	227