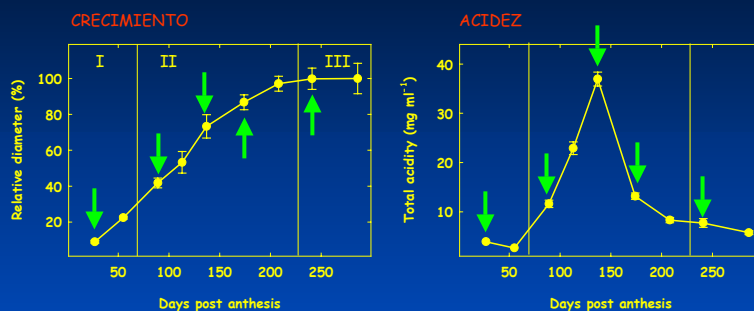


ANALISIS GLOBAL DE LA EXPRESION GENICA DURANTE EL DESARROLLO Y MADURACION INTERNA DEL FRUTO DE LOS CITRICOS

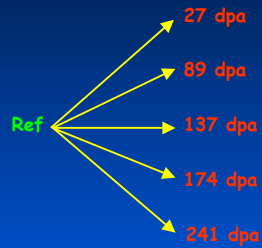
Manuel Cercós, Guillermo Soler y Manuel Talón

Centro de Genómica
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias

DESARROLLO DEL FRUTO



DISEÑO EXPERIMENTAL



REPLICAS BIOLOGICAS: 4 por muestra

MARCAJE

- Extracción RNA total
- Amplificación en presencia de aa-UTP
- Conjugación con los fluoróforos:
 - Muestras: Cy5
 - Referencia: Cy3
- Evaluación del marcaje: 20-50 moléculas fluoróforo/kb de RNA

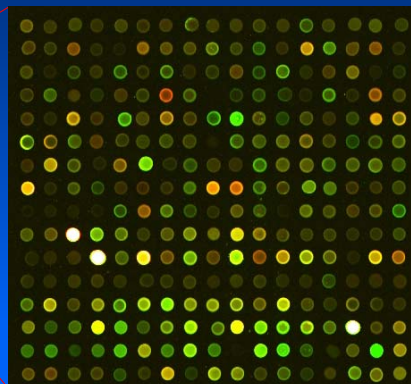
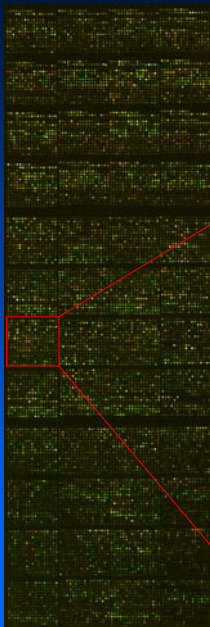
-HIBRIDACION

- Mezcla de 60 pmoles de cada fluoróforo
- Fragmentación de los cRNAs
- Concentración final: 1 pmol/ μ l
- Hibridación a 42 °C con formamida

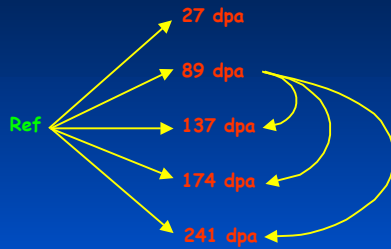
CHIP DE cDNA DE CITRICOS

Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos

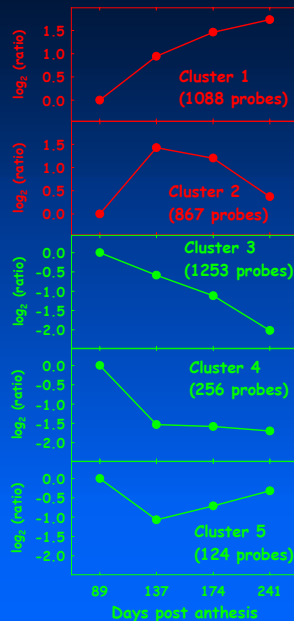
12672 productos de PCR
6875 unigenes



PERFILES DE EXPRESION



- Pre-procesamiento de los datos:
 - Filtrado de spots con señales bajas y saturadas
 - Normalización por estabilización de la varianza
- Comparaciones de las muestras de 137, 174 y 241 dpa con la muestra de 89 dpa.
- Identificación de genes diferencialmente expresados mediante análisis de diferencias de medias (LIMMA)
- Cambios significativos:
 - $p < 0.001$
 - Inducción o represión de al menos 2 veces
- Selección de los spots que muestran cambios significativos en al menos uno de los contrastes
 - 3588 spots significativos
 - Corresponden a 2243 unigenes
- Clustering con el algoritmo SOTA
 - 5 patrones de expresión
- Significación biológica: categorías funcionales MIPS de los ortólogos de Arabidopsis (1580 unigenes)



- Proteolytic degradation ($p = 1.6 \cdot 10^{-5}$)
- Protein fate ($p = 1.3 \cdot 10^{-3}$)
- Transcription ($p = 1.0 \cdot 10^{-3}$)
- Cellular communication/Signal transduction mechanisms ($p = 6.2 \cdot 10^{-5}$)
- Transposable elements, viral and plasmid proteins ($p = 2.0 \cdot 10^{-5}$)
- Systemic regulation of/ interaction with environment ($p = 5.8 \cdot 10^{-7}$)
- Systemic regulation of/ interaction with environment ($p = 3.2 \cdot 10^{-3}$)

FACTORES DE TRANSCRIPCION

- AGRIIS (Arabidopsis Gene Regulatory Information Server): Agrupa los factores transcripcionales de Arabidopsis en 42 familias
- El chip de cDNA de cítricos incluye 197 sondas de ortólogos de factores transcripcionales de Arabidopsis, que pertenecen a 30 familias
- El conjunto de genes significativos incluye 61 sondas de factores transcripcionales distribuidos en 22 familias:

Sólo inducidos

NAC
CCAAT-HAP5
WRKY
G2C2-YABBY
G2H2
TUB
AG13YF1
WSP
VOT-9

Sólo reprimidos

ARF
bZIP
C2C2-CO-like
TCP
C2C2-Gata

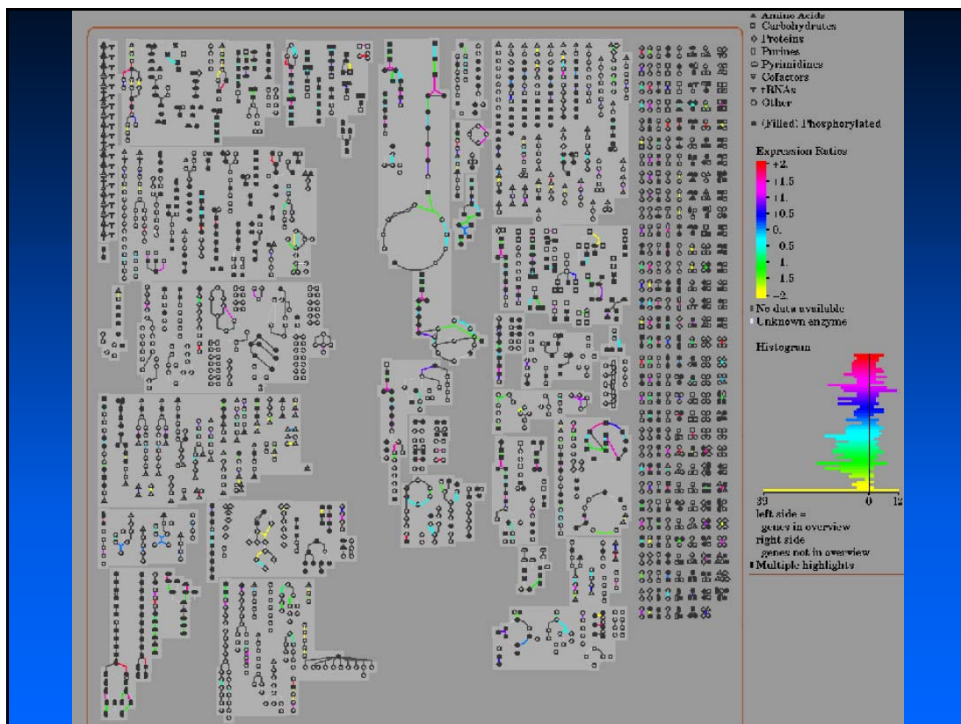
Inducidos y Reprimidos

MADS
MYB
C3H
BHLH
HB
GRAS
AP2-EREBP
MYB-related

FACTORES NAC

- Familia de factores transcripcionales específicos de plantas
- Caracterizadas por un dominio N terminal conservado
- Función desconocida. Asociados con muchos procesos fisiológicos
- En tomate, se ha demostrado que se inducen durante el desarrollo del fruto

Cluster	Ortólogo Arabidopsis	Nombre	Proceso Biológico
1	At3g15510	AtNAC2	Desarrollo del meristemo apical
1	At1g69490	NAP	Desarrollo floral (transición de división a expansión celular)
1	At3g04070		Desarrollo (sin evidencia experimental)
1	At4g27410	RD26	Respuesta a ABA, estrés hídrico y estrés salino
2	At1g01720	ATAF1	Respuesta a patógenos y daño mecánico
2	At5g08790	ATAF2	Respuesta a patógenos y daño mecánico
2	At4g35580		Desconocido



PRINCIPALES CAMBIOS METABOLICOS

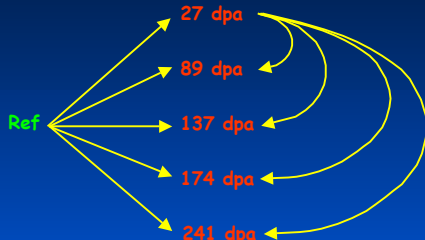
RUTAS INDUCIDAS

Síntesis de carotenoides
 Síntesis de celulosa
 Oxidación de ácidos grasos
 Hidrólisis de conjugados de auxinas

RUTAS REPRIMIDAS

Síntesis de almidón
 Hidrólisis de sacarosa
 Glicolisis
 Ruta de las pentosas fosfato
 Ciclo de Calvin
 Síntesis de ácidos grasos
 Síntesis de ácido ascórbico
 Síntesis de lignina
 Síntesis de suberina
 Síntesis de antocianinas
 Síntesis de flavonoides

GENES IMPLICADOS EN LA REDUCCION DE ACIDEZ



- Comparaciones frente a la muestra de 27 dpa
- Estudio de los perfiles de expresión de genes concretos implicados en la eliminación del ácido cítrico
- Selección de los genes a partir de la base de datos KEGG
- Comprobación mediante Real-Time RT-PCR

