

Nuevos retrotransposones de naranjo.  
Desarrollo de marcadores basados en  
retrotransposones para la evaluación de  
la biodiversidad de los cítricos.

Laura Rico Cabanas  
Barcelona, octubre de 2005

## B. ANÁLISIS DE LA BIODIVERSIDAD EN EL GÉNERO *CITRUS* UTILIZANDO RTN-LTR

### B.1 VARIABILIDAD DE LOS RTN-LTR TIPO COPIA EN EL GENOMA DE ESPECIES DEL GÉNERO *CITRUS*

Para investigar la biodiversidad dentro del género *Citrus*, hemos trabajado con diez especies de cítricos que son: *Citrus sinensis* (naranja dulce), *Citrus aurantium* (naranja amarga), *Citrus clementina* (clementina), *Citrus grandis* (pummelo), *Citrus ichangensis* (papeda), *Citrus limettioides* (lima), *Citrus limon* (limón), *Citrus macroptera* (papeda melanesia), *Citrus medica* (cidro), *Citrus unshiu* (mandarina satsuma), así como con tres especies de géneros próximos de la misma familia como *Fortunella margarita*, *Microcitrus inodora* y *Poncirus trifoliata* (Figura 56)

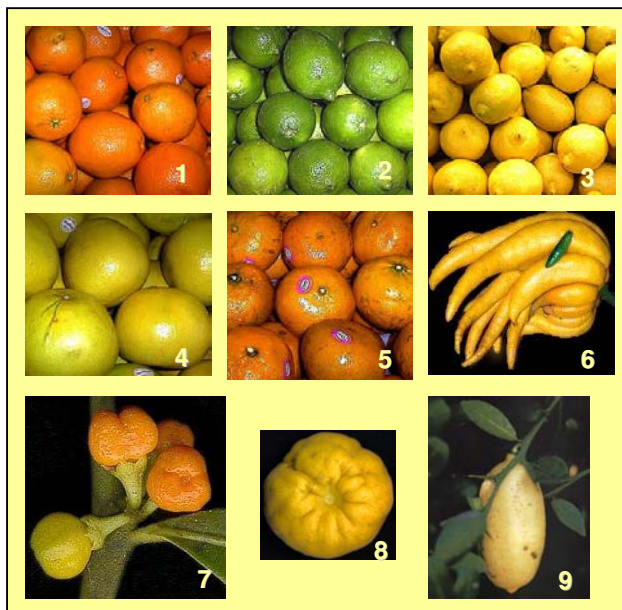


Figura 56. Frutos de las especies comerciales de cítricos y géneros próximos utilizadas en el estudio.

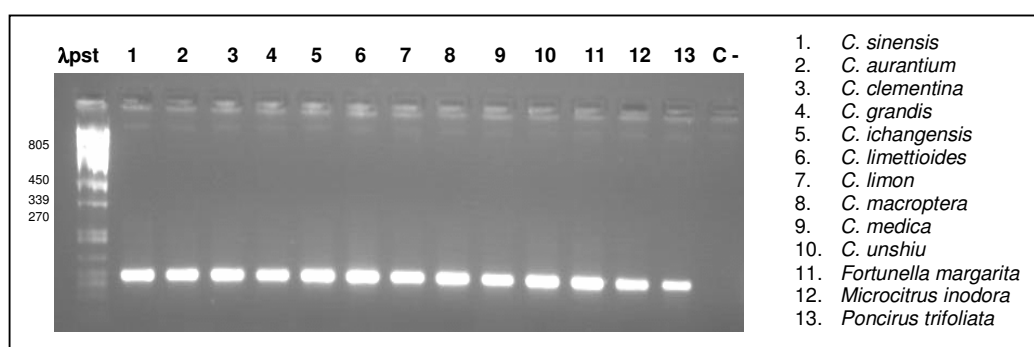
- (1) Naranja
- (2) Lima
- (3) Limón
- (4) Pummelo
- (5) Mandarinas
- (6) Cidro
- (7) Fortunella
- (8) Poncirus
- (9) Microcitrus

El estudio de la contribución de los RTN-LTR al genoma de los cítricos se ha iniciado con los RTN-LTR tipo  *copia*.

## Resultados

### B.1.1 Detección de fragmentos de RTN-LTR tipo copia en cítricos

A partir de DNA genómico extraído de hoja de las especies anteriormente citadas, se han amplificado por PCR fragmentos de DNA correspondientes al dominio conservado de la transcriptasa inversa (RT) de los RTN-LTR tipo *copia*. Para hacerlo se han utilizado como cebadores los oligonucleótidos degenerados específicos para este grupo de RTN-LTR, descritos en el apartado A.1.1. En la **Figura 57** se muestra el resultado de la amplificación.



**Figura 57. Resultado de la amplificación de RTN-LTR tipo copia en el genoma de distintas especies del género Citrus y especies de géneros próximos.** Imagen del gel al 1,15 % de agarosa tras la electroforesis de los productos de la amplificación sobre DNA genómico del dominio de la RT de RTN utilizando los cebadores degenerados específicos para RTN-LTR tipo *copia*. La PCR se ha realizado a 30 ciclos con Ta de 45°C (Apartado 7.2.1 de Material y Métodos). Carril λPst, marcador de peso molecular λPst, indicando algunos tamaños en pb. Carriles 1-13, DNAs amplificados de las especies listadas a la derecha de la imagen. Carril 14, control negativo de la reacción de PCR (sin DNA).

Hemos confirmado que los cebadores degenerados específicos de RTN-LTR *copia* son válidos para amplificar este tipo de elementos en todas las especies de cítricos analizadas. Los fragmentos generados, de un tamaño aproximado de 270 pb, se han clonado en un vector pGEMT y posteriormente se han secuenciado 9-10 clones para 5 especies. En este estudio incluimos también los fragmentos aislados de *Citrus sinensis* que habían sido secuenciados anteriormente y analizados en el apartado A.1. La nomenclatura utilizada para denominarlos ha sido: **CoSi#** (Copia-retrotransposon de *C.sinensis*), **CoCle#** (Copia de *C.clementina*), **CoGra#** (Copia de *C.grandis*), **CoLme#** (Copia de *C.limettioides*), **CoMed#** (Copia de *C.medica*), y **CoPo#** (Copia de *Poncirus trifoliata*).

El alineamiento por ClustalW de las secuencias aminoacídicas deducidas conceptualmente que son parecidas a RT, se muestra en la **Figura 58**. Se confirma la presencia en todas ellas de una secuencia consenso (SLYGLKQA) característica de secuencias de RT de RTN-LTR tipo *copia* (Voytas et al., 1992).

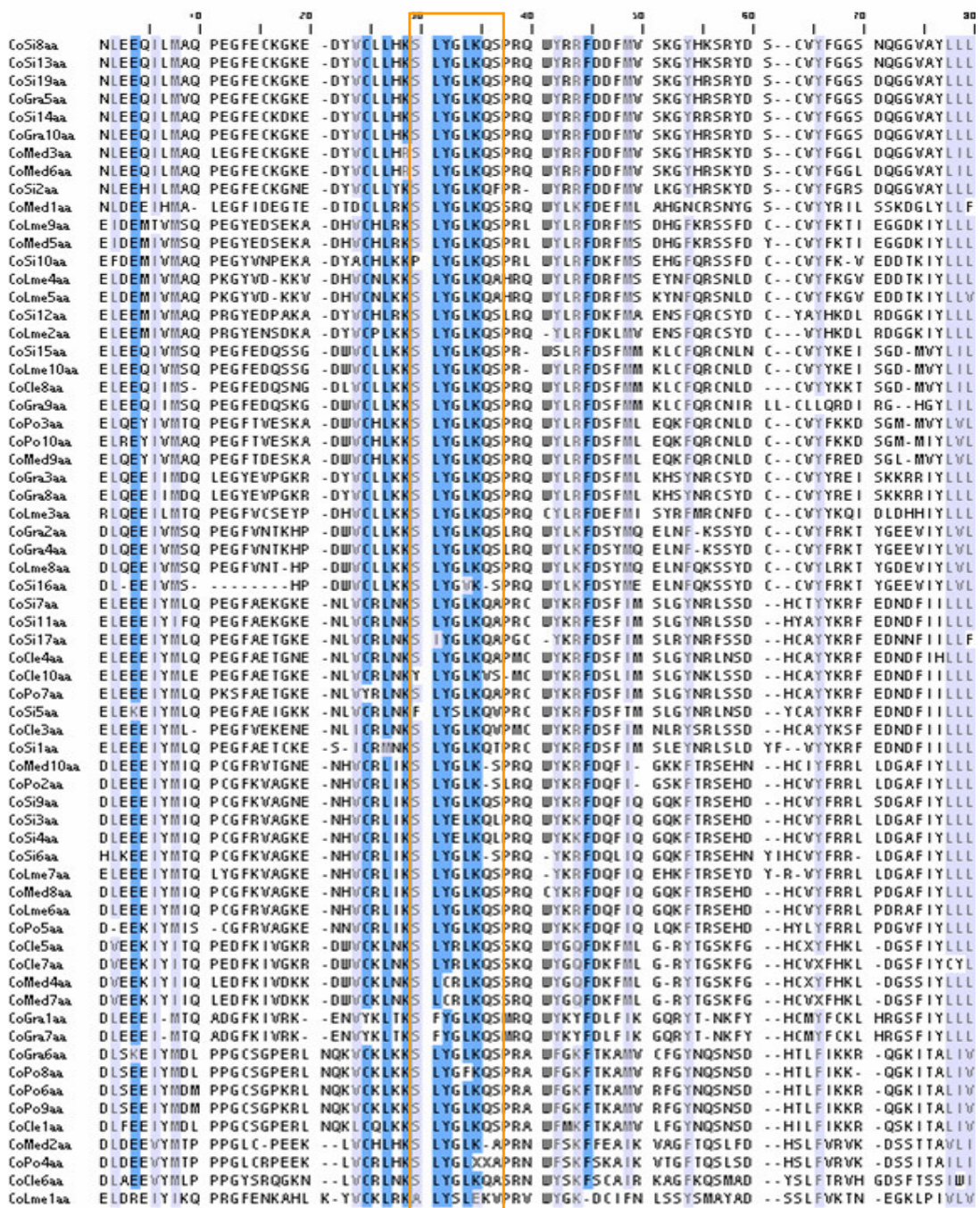


Figura 58. Alineamiento múltiple por ClustalW de las 66 secuencias aminoacídicas inferidas de los fragmentos de RT de RTN tipo *copia*, obtenidos de DNA genómico de distintas especies del género *Citrus* y especies de géneros próximos. El orden relativo de las secuencias está directamente relacionado con el nivel de similitud entre ellas. Los guiones indican ausencia de aminoácido en esa posición. El sombreado oscuro indica identidad de secuencia  $\geq 95\%$  y el más claro, elevada similitud. Se ha recuadrado el consenso SLYGLKQA típico de secuencias de RT de RTN tipo *copia*. No se muestran los dominios conservados correspondientes a los cebadores que flanquean las secuencias (ver pie Figura 15). CoSi# : clones de *C. sinensis*. CoCle#: *C. clementina*. CoGra#: *C. grandis*. CoLme#: *C. limettioides*. CoMed#: *C. medica*. CoPo# : *Poncirus trifoliata*.

## Resultados

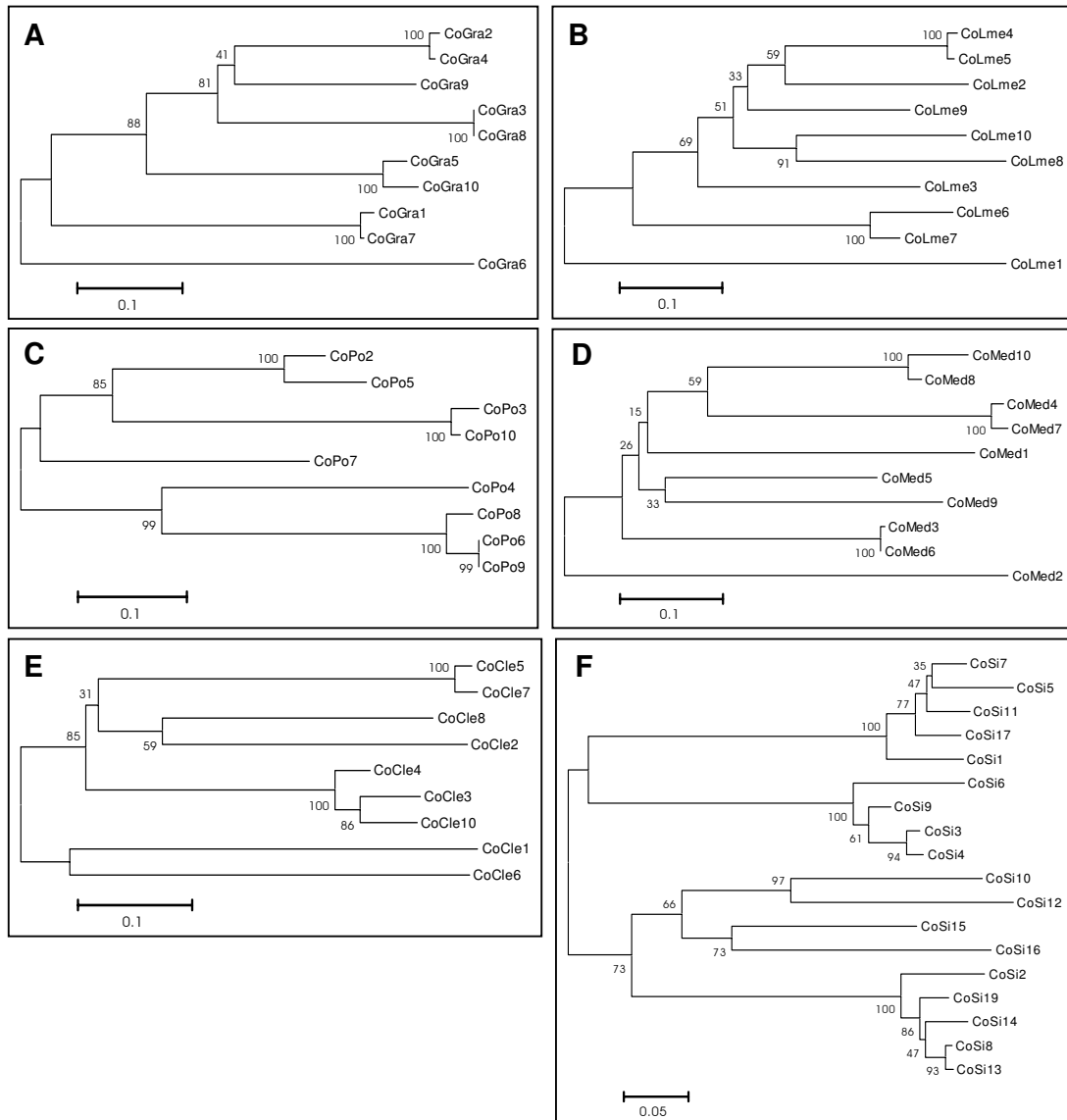
De un total de 66 clones secuenciados, 32 están interrumpidos por codones de parada (representan el 48% del total secuenciado) y 6 presentan alguna delección que hace que haya que cambiar de pauta de lectura para que las secuencias obtenidas de la traducción conceptual puedan alinearse (suponen el 9% del total), en 4 de estos 6 casos las secuencias presentan además codones de parada. Realizando el análisis por especies, vemos que las secuencias obtenidas de *C. clementina* son las que más presentan ambos fenómenos, ya que más de la mitad de los clones presentan codones de parada en su secuencia y en un 33% de los casos hay que realizar cambios en la pauta de lectura (**Tabla XVI**).

	CODONES PARADA		CAMBIOS PAUTA LECTURA	
	Total	%	Total	%
CoSi#	7 / 18	39	0 / 18	0
CoCle#	6 / 9	67	3 / 9	33
CoGra#	4 / 10	40	0 / 10	0
CoLme#	7 / 10	70	0 / 10	0
CoMed#	5 / 10	50	2 / 10	20
CoPo#	3 / 9	33	1 / 9	11
	32 / 66	48	6 / 66	9

**Tabla XVI.** Fracción de clones cuyas secuencias conceptuales de aminoácidos están interrumpidas por codones de parada o bien en las que son necesarios cambios de pauta de lectura. Se indica en porcentajes referidos al total de clones correspondientes a dominios de la RT de los RTN tipo copia obtenidos del genoma de diferentes cítricos. CoSi#: clones de *C.sinensis*, CoCle#: *C.clementina*, CoGra#: *C.grandis*, CoLme#: *C.limettioides*, CoMed#: *C.medica*, CoPo#: *Poncirus*.

### B.1.2 Análisis comparativo de las secuencias de RTN-LTR tipo copia en Citrus

Se han realizado análisis filogenéticos mediante árboles *Neighbor joining* (NJ) de las secuencias, tanto nucleotídicas como aminoacídicas, obtenidas para cada especie. En la **figura 59A** se muestra el árbol filogenético de los fragmentos de RT en *C. grandis* donde se forman 4 grupos bastante homogéneos. Los miembros de cada grupo comparten identidades de secuencia del 94 - 99%. Algo más heterogénea se muestra la población de RTN-LTR identificada en *C. limettioides* (**B**) donde aparecen varios grupos de un sólo miembro cada uno. En la figura **59C** se muestra el árbol correspondiente a las 9 secuencias nucleotídicas de *Poncirus*. Estas secuencias son más homogéneas que las obtenidas de *C. limettioides* ya que la mayoría se sitúan en 3 grupos con identidades del 90-100% entre sus miembros. Situaciones parecidas nos encontramos en *C. medica* (**D**) y *C. clementina* (**E**), donde el 50% de las secuencias quedan situadas dentro de grupos claros (con valores de *bootstrap* de 100) y homogéneos (identidades de secuencia  $\geq 90\%$ ), mientras que el resto de secuencias quedan sin agrupar. Por último, en *C. sinensis* (**F**) se forman 3 familias claras y el resto de secuencias formarán parte de familias con un solo miembro, tal y como se ha comentado en el **apartado A.1.3**.



**Figura 59.** Árboles filogenéticos tipo Neighbour joining de secuencias nucleotídicas de fragmentos de la RT de RTN tipo *copia* obtenidos de DNA genómico de (A) *C.grandis*, (B) *C.limettioides*, (C) *Poncirus trifoliata*, (D) *C.medica*, (E) *C.clementina* y (F) *C.sinensis*. La longitud de las ramas horizontales es proporcional a la distancia genética. Están indicados en cada bifurcación los valores de *bootstrap* para 1000 réplicas.

En lo que respecta a la distancia genética de las secuencias, que en la **Figura 59** está representada por la longitud de las ramas de cada árbol filogenético, se observa que las secuencias CoSi# son las que se muestran más próximas y CoCle# las que muestran una distancia mayor entre si.



## Resultados

---

En la **Tabla XVII** se muestran los valores de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) (a partir de Kimura-2 parámetros) entre el conjunto de secuencias obtenidas de los diferentes genomas. Las secuencias nucleotídicas correspondientes a RTN-LTR de *C. clementina* presentan el valor de  $\pi$  más elevado y las secuencias obtenidas de *C. sinensis* son las más homogéneas.

<b>CoGra#</b>	0,563 $\pm$ 0,043
<b>CoLme#</b>	0,542 $\pm$ 0,037
<b>CoPo#</b>	0,597 $\pm$ 0,045
<b>CoMed#</b>	0,583 $\pm$ 0,041
<b>CoCle#</b>	0,612 $\pm$ 0,044
<b>CoSi#</b>	0,499 $\pm$ 0,035

**Tabla XVII. Diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) entre las secuencias de RTN copia obtenidas de los genomas de especies del género *Citrus* y especies de géneros próximos.** Calculado por kimura-2 parámetros con bootstrap de 1000 réplicas con el programa MEGA2. CoGra#: clones de *C. grandis*. CoLme#: de *C. limettioides*. CoPo#: de *Poncirus*. CoMed#: de *C. medica*. CoCle#: de *C. clementina*. CoSi#: de *C. sinensis*.

Seguidamente se compararon entre si todas las secuencias obtenidas en las seis especies del estudio (**Figura 60**).

Se puede observar que gran parte de las secuencias presentan poca variabilidad en las distintas especies. Vemos por ejemplo, que las secuencias nucleotídicas de CoSi14 y CoGra10 son un 97% idénticas o CoSi8 y CoCle2 un 95%.

También se observa que algunas secuencias que no quedaban definidas en ningún grupo concreto en el árbol de las secuencias de una especie, sí se agrupan en una rama del árbol general con secuencias de otra especie, este es el caso de CoGra6 que no se agrupaba de forma clara con ninguna de las 10 secuencias CoGra pero en cambio presenta una identidad de secuencia nucleotídica del 95% al compararla con CoPo6.

Además, todas las familias CIRE1-CIRE7 definidas en *C. sinensis* están presentes en los diferentes genomas del género *Citrus* aunque también aparecen como mínimo 7 grupos nuevos que nos permiten definir, siguiendo el mismo criterio utilizado en el **apartado A.1.3** (en que se considera miembros de una misma familia cuando la identidad nucleotídica entre ellos es superior al 85%), 7 nuevas familias CIRE8-CIRE14 sin representantes entre las secuencias clonadas previamente del genoma de *C. sinensis*.

Todos los grupos están apoyados por valores de *bootstrap* muy altos (100) y pueden ser considerados monofiléticos, exceptuando CIRE4 con *bootstrap* de 75. A partir del cálculo de la distancia nucleotídica entre los diferentes grupos formados, estimada por el método de Kimura-2 parámetros, podemos definir que familias son más próximas entre si, como CIRE10 y CIRE6, CIRE4 y CIRE5 o CIRE9 y CIRE13, o bien cuales son las más distantes entre si como por ejemplo CIRE14 y CIRE12.

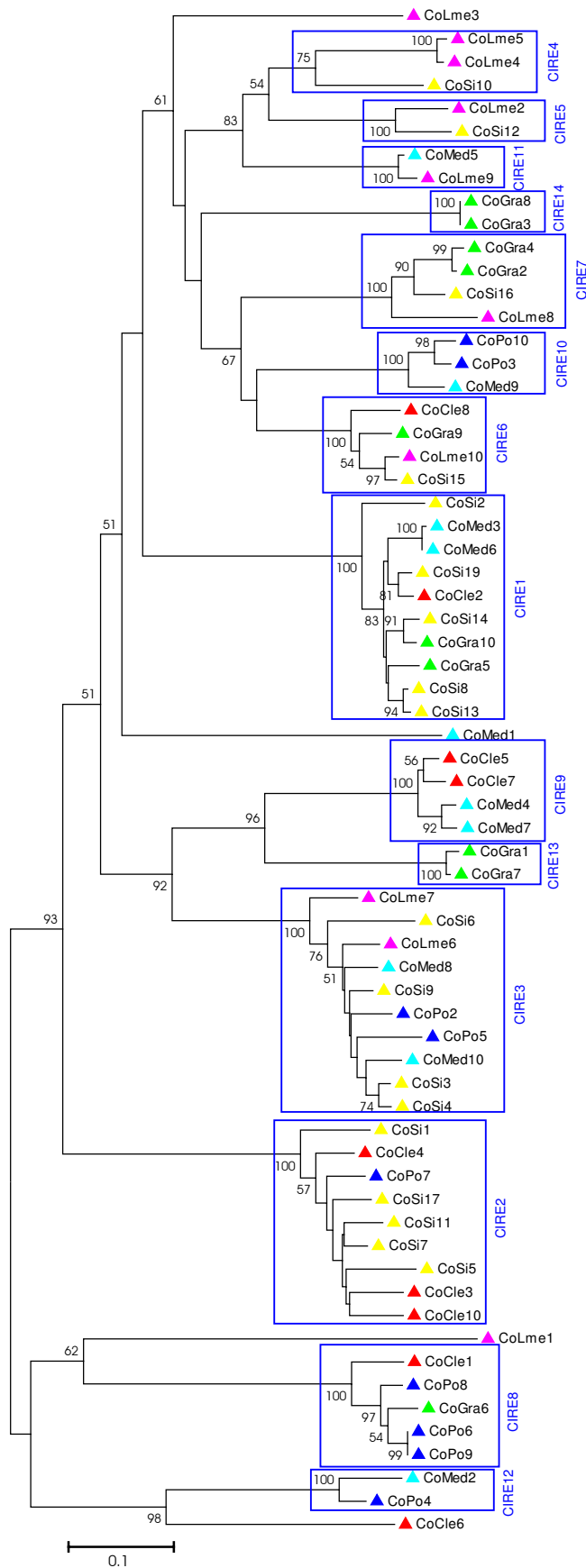


Figura 60. Análisis filogenético basado en el alineamiento de 66 secuencias nucleotídicas de fragmentos de la RTN tipo *copia*, obtenidos de DNA genómico de 5 especies del género *Citrus* y 1 especie del género próximo *Poncirus*. Árbol filogenético tipo Neighbour joining (NJ) generado con el programa MEGA2. La divergencia de las secuencias en unidades de distancia genética viene definida por la longitud de las ramas horizontales. Están indicados en cada bifurcación los valores de *bootstrap* superiores al 50%. Se han recuadrado las diferentes familias en qué quedan divididas las secuencias, el nombre de cada subfamilia está indicado a la derecha de la figura. ( ) CoSi#: clones de *C. sinensis*. ( ) CoCle#: *C. clementina*. ( ) CoGra#: *C. grandis*. ( ) CoLme#: *C. limettioides*. ( ) CoMed#: *C. medica*. ( ) CoPo#: *Poncirus trifoliata*.



## Resultados

Se ha estudiado también la variabilidad de las secuencias dentro de cada familia de RTN-LTR tipo *copia*, calculando el valor de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) tal y como se muestra en la **Tabla XVIII**. La diversidad nucleotídica es muy baja para CIRE14, CIRE13 y CIRE11 (valores de  $\pi$  de  $0,001 \pm 0,0007$ ;  $0,015 \pm 0,007$  y  $0,023 \pm 0,009$ , respectivamente) y algo más elevada para otros grupos de secuencias como son CIRE2, CIRE5 y CIRE4 (valores de  $\pi$  de  $0,101 \pm 0,010$ ;  $0,103 \pm 0,021$  y  $0,155 \pm 0,023$ , respectivamente). Se observa que hay grupos que aún teniendo muy pocos miembros muestran variabilidad alta, como CIRE5. Se observa también que de las tres familias mayoritarias en *C. sinensis* (CIRE1-CIRE3) CIRE1 es la más homogénea. La mayoría de las secuencias obtenidas de *C. medica* se sitúan en familias bastante homogéneas como son CIRE11, CIRE9, CIRE10 y CIRE1, al igual que *C. clementina* en CIRE9, CIRE1, CIRE8 y CIRE6, aunque en ésta se han encontrado también secuencias del grupo más heterogéneo CIRE2. Igualmente las secuencias obtenidas de *C. grandis* se sitúan en grupos muy homogéneos como CIRE14 y CIRE13, pero también tienen representantes en otros mucho más heterogéneos como CIRE7. En el caso de *C. limettioides*, la mayoría de las secuencias pertenecen a los grupos más heterogéneos: CIRE4, CIRE5 y CIRE2.

Familia	$\pi$	Clones secuenciados
CIRE1	$0,066 \pm 0,010$	CoSi2, CoSi8, CoSi13, CoSi14, CoSi19, CoCle2, CoGra5, CoGra10, CoMed6, CoMed3
CIRE2	$0,101 \pm 0,010$	CoSi1, CoSi5, CoSi7, CoSi11, CoSi17, CoCle3, CoCle4, CoCle10, CoPo7
CIRE3	$0,092 \pm 0,011$	CoSi3, CoSi4, CoSi6, CoSi9, CoLme6, CoLme7, CoMed8, CoMed10, CoPo2, CoPo5
CIRE4	$0,155 \pm 0,023$	CoSi10, CoLme4, CoLme5
CIRE5	$0,103 \pm 0,021$	CoSi12, CoLme2
CIRE6	$0,070 \pm 0,013$	CoSi15, CoCle8, CoGra9, CoLme10
CIRE7	$0,096 \pm 0,015$	CoSi16, CoGra2, CoGra4, CoLme8
CIRE8	$0,066 \pm 0,011$	CoCle1, CoGra6, CoPo6, CoPo8, CoPo9
CIRE9	$0,050 \pm 0,011$	CoCle5, CoCle7, CoMed4, CoMed7
CIRE10	$0,063 \pm 0,013$	CoMed9, CoPo3, CoPo10
CIRE11	$0,023 \pm 0,009$	CoMed5, CoLme9
CIRE12	$0,085 \pm 0,019$	CoMed2, CoPo4
CIRE13	$0,015 \pm 0,007$	CoGra1, CoGra7
CIRE14	$0,001 \pm 0,0007$	CoGra3, CoGra8

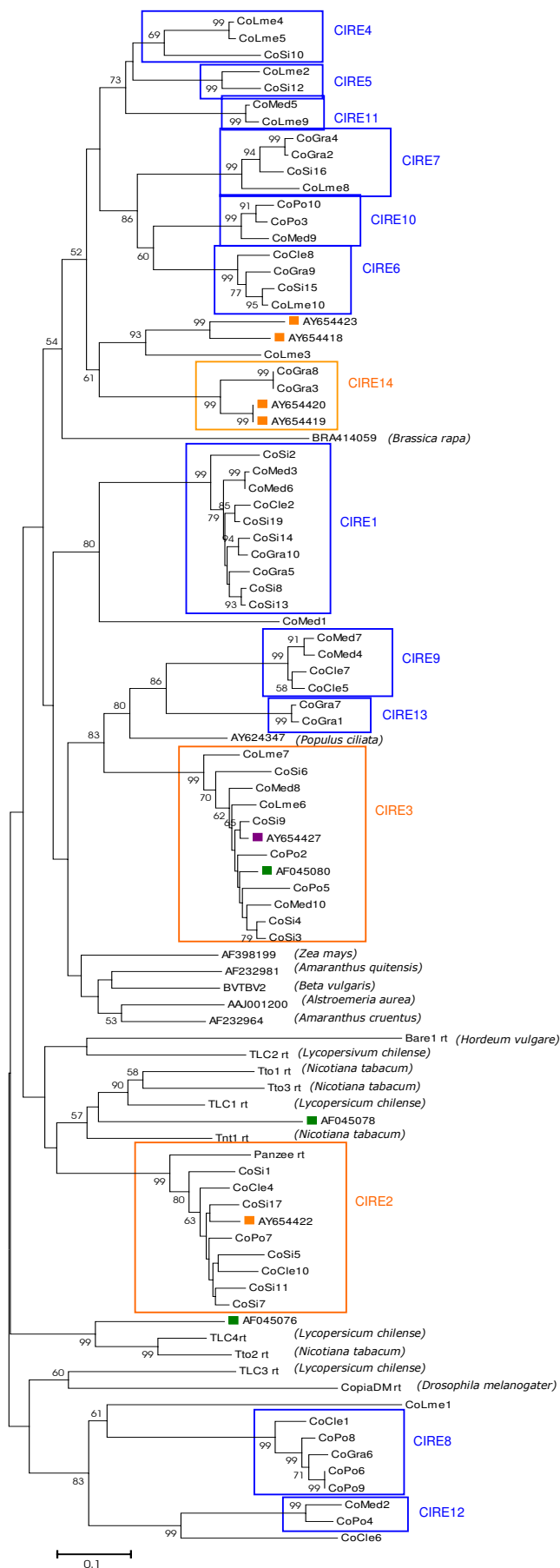
**Tabla XVIII. Variabilidad de las secuencias dentro de las distintas familias de RTN-LTR tipo *copia* de los genomas de especies del género *Citrus* y especies de géneros próximos.** Diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) calculada por kimura-2 parámetros con *bootstrap* de 1000 réplicas con el programa MEGA2. CoGra#: clones de *C. grandis*. CoLme#: de *C. limettioides*. CoPo#: de *Poncirus*. CoMed#: de *C. medica*. CoCle#: de *C. clementina*. CoSi#: de *C. sinensis*.

Se observan secuencias que no quedan incluidas en ningún grupo concreto, como son CoLme3, CoMed1, CoCle6 y CoLme1, lo que puede ser debido probablemente a que el número de secuencias clonadas en este estudio es insuficiente para definir nuevas familias. En este sentido, hemos realizado una búsqueda en las Bases de Datos (NCBI) de fragmentos de RT de RTN-LTR tipo *copia* que se hayan obtenido de genomas de cítricos para aumentar la población de secuencias. Así, secuencias obtenidas de *C. sinensis* (Nº Acc.: AY654418, AY654419, AY654420, AY654422, AY654423), *C. limon* (Nº Acc.: AF045076, AF045078, AF045080) y *Poncirus trifoliata* (Nº Acc.: AY654427) se han comparado con las 66 secuencias de este estudio mediante árboles NJ. Asimismo se han unido al estudio secuencias parciales de la RT de RTN-LTR tipo *copia* de diferentes organismos, descritos en el capítulo 16 de Material y Métodos. Los resultados se muestran en la **Figura 61**.

Tres de las secuencias de *C. sinensis* presentes en las bases de datos quedan agrupadas con valores de *bootstrap* de 100 dentro de grupos definidos en este estudio. Así, AY654419 y AY654420 se sitúan en la familia CIRE14 con una identidad nucleotídica media del 90%. Curiosamente, CIRE14 era una de las familias sin representantes entre las secuencias que hemos obtenido del genoma de *C. sinensis*. Otra secuencia de *C. sinensis*, AY654422 presenta también identidad nucleotídica media del 90% con miembros de la familia CIRE2. Las otras dos secuencias de *C. sinensis* de las bases de datos, muy similares entre si, no quedan situadas en ninguna familia definida pero se muestran próximas (73% identidad nucleotídica) a CoLme3.

Una de las secuencias de *C. limon* de las bases de datos, AF045080, es idéntica como media en un 92% a los miembros de la familia CIRE3, al igual que la secuencia de *Poncirus* AY654427. El resto de secuencias de *C. limon* no presentan ninguna similitud clara con las secuencias de este estudio. En lo referente al resto de secuencias de fragmentos de RT de RTN-LTR de tipo *copia* obtenidas de especies fuera de la familia de las rutáceas, no vemos en ningún caso que éstas se agrupen dentro de las familias CIRE, a excepción de la región RT del RTN-LTR *panzee* de *Cajanus cajan* (Nº Acc.: AJ000893) que presenta una identidad nucleotídica media del 84% con miembros de la familia CIRE2.

## Resultados



**Figura 61. Análisis filogenético basado en el alineamiento de 92 secuencias nucleotídicas de fragmentos de la RT de RTN-LTR tipo copia.** A las 66 secuencias obtenidas del genoma de especies del género *Citrus* y *Poncirus* en este estudio se le han añadido secuencias del mismo dominio RT de RTN-LTR tipo copia presentes en las bases de datos (para referencia ver capítulo 16 de Material y Métodos). Se han remarcado las secuencias de *C.sinensis* ( ), *C.limon* ( ) y *Poncirus* ( ) extraídas de las bases. Árbol filogenético tipo Neighbour joining generado con el programa MEGA2. La divergencia de las secuencias en unidades de distancia genética viene definida por la longitud de las ramas horizontales. Están indicados en cada bifurcación los valores de bootstrap superiores al 50%.

### **B.1.3 Estimación del número de copias de RTN-LTR tipo copia en Citrus**

Se ha estimado el número de copias total por genoma haploide en las especies del género *Citrus* y géneros próximos que aparecen en la figura 62, mediante reconstrucción genómica a partir del análisis por hibridación *Slot-blot*, tal y como ha descrito anteriormente (**Apartados A.1.4 y A.2.4**).

Como contenido de DNA nuclear utilizamos los datos obtenidos por Ollitrault et al. (1995) para *C. clementina* (0,73pg/2C), *C. sinensis* (0,76pg/2C), *C. aurantium* (0,75pg/2C), *C. limon* (0,78pg/2C), *C. limettioides* (0,77pg/2C), *C. grandis* (0,78pg/2C) y *C. medica* (0,81pg/2C). Para el resto de especies, se asume el contenido estándar medio aceptado para el género *Citrus* de 0,78pg/2C (Plant Molecular Biology Reporter, 91).

Las sondas utilizadas son el conjunto de fragmentos de DNA producto directo de la PCR con cebadores degenerados para amplificar RTN-LTR tipo *copia* en *C. sinensis*. En esta aproximación se ha utilizado una misma sonda obtenida en *C. sinensis* para todas las especies ya que, tal y como se ha visto al realizar el estudio de las poblaciones de RTN-LTR tipo *copia* presentes en los diferentes genomas de cítricos, gran parte de las secuencias son bastante similares independientemente de la especie donde provenga. De todas maneras, tal como se discutirá más adelante, este método experimental para el cálculo del número de copias es aproximado ya que puede resultar en una sobrestimación o infravaloración en alguna de las especies.

Dicha sonda se marca radiactivamente y se hibrida con diferentes cantidades conocidas del DNA genómico así como del DNA de la misma sonda sin marcar. Como el tamaño del genoma es un valor conocido, la comparación entre la señal de hibridación sobre el DNA genómico y la que se obtiene sobre las diferentes cantidades del fragmento de DNA utilizado como sonda, permite calcular el número de copias de estos fragmentos de DNA dentro del genoma, y por extrapolación el número de copias de RTN tipo *copia* en el genoma (ver Material y Métodos).

En la **figura 62** se muestran las estimaciones del número de copias determinado bajo condiciones de hibridación y lavados concretas (ver Material y Métodos).

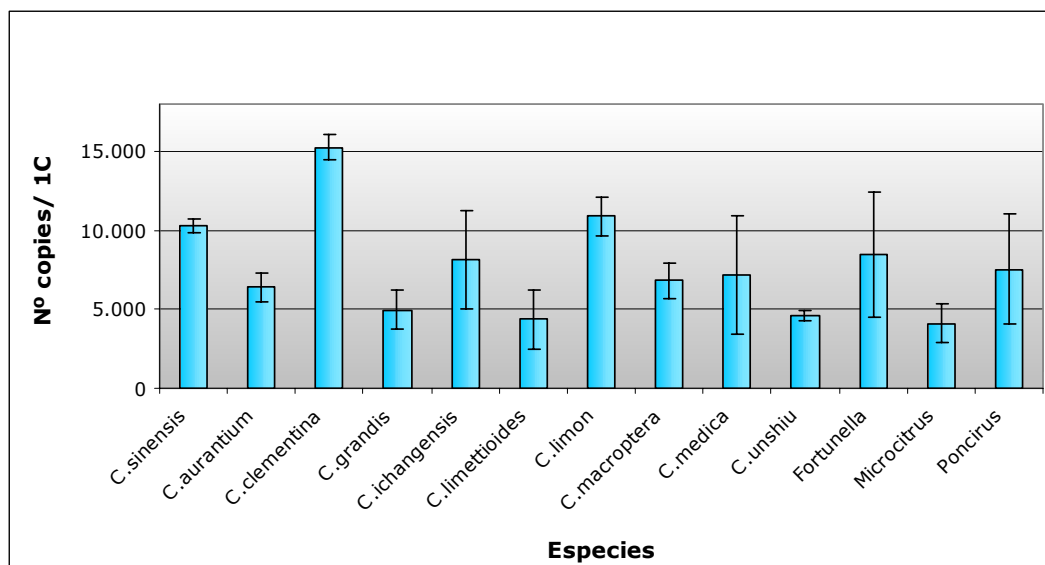
Se obtienen valores dentro del rango de 4.000 y 15.000 copias por genoma haploide. Las especies incluidas en el estudio pueden clasificarse así según su contenido en RTN-LTR tipo *copia* total: contenido bajo ( $4-7 \cdot 10^3$  copias) como *C. aurantium*, *C. grandis*, *C. limettioides*, *C. macroptera*, *C. unshiu* y *Microcitrus inodora*; contenido medio ( $7-11 \cdot 10^3$  copias) como *C. sinensis*, *C. ichangensis*, *C. limon*, *C. medica*, *Poncirus trifoliata* y *Fortunella margarita*; y contenido alto ( $\sim 1,5 \cdot 10^4$  copias) como *C. clementina*.

## Resultados

**A**

Especie	Nº copias - Exp1	Nº copias - Exp2	Nº copias - Exp3	NÚMERO COPIAS
<i>C.sinensis</i>	9.928 ± 972	10.601 ± 1.809	-	<b>9.928 ± 972,9</b>
<i>C.aurantium</i>	6.800 ± 511	5.300 ± 430	7.087 ± 689	<b>6.396 ± 911,3</b>
<i>C.clementina</i>	15.851 ± 2.369	14.268 ± 1.405	15.637 ± 1.186	<b>15.252 ± 815,6</b>
<i>C.grandis</i>	5.914 ± 508	4.039 ± 387	-	<b>4.977 ± 1.542,1</b>
<i>C.ichangensis</i>	11.328 ± 1.465	8.314 ± 635	4.790 ± 272	<b>8.144 ± 3.107,6</b>
<i>C.limettioides</i>	2.957 ± 231	6.615 ± 313	3.480 ± 287	<b>4.351 ± 1.878,7</b>
<i>C.limon</i>	9.951 ± 817	11.802 ± 1.269	-	<b>10.877 ± 1.522,3</b>
<i>C.macroptera</i>	6.843 ± 736	8.526 ± 912	-	<b>6.843 ± 736</b>
<i>C.medica</i>	4.577 ± 534	5.287 ± 434	11.713 ± 1.327	<b>7.192 ± 3.733,1</b>
<i>C.unshiu</i>	4.387 ± 536	4.999 ± 475	4.487 ± 437	<b>4.624 ± 311,7</b>
<i>Fortunella</i>	4.104 ± 373	12.460 ± 748	8.789 ± 736	<b>8.451 ± 3.977,4</b>
<i>Microcitrus</i>	3.183 ± 611	5.061 ± 504	-	<b>4.122 ± 1.544,5</b>
<i>Poncirus</i>	4.940 ± 311	10.167 ± 1.298	-	<b>7.554 ± 4.298,8</b>

**B**



**Figura 62.** Número de copias total de RTN-LTR tipo *copia* en el genoma de distintas especies del género *Citrus* y especies de géneros próximos. **(A)** Tabla que recoge los valores estimados en las distintas réplicas del experimento de *Slot-blot* y la media ± error estándar de la media calculadas (como mínimo dos experimentos independientes para cada especie). **(B)** Representación gráfica de estos valores donde las barras representan las medias calculadas y el error estándar de la media para p 0.1.

## **B.2 DESARROLLO DE MARCADORES MOLECULARES BASADOS EN RTN-LTR: TÉCNICA SSAP APLICADA A ESTUDIOS FILOGENÉTICOS**

El SSAP (*Sequence-Specific Amplification Polymorphism*) es una derivación de la técnica AFLP, donde se amplifica una región comprendida entre un cebador complementario a una secuencia del RTN (**cebador específico**) y un cebador complementario a un oligonucleótido adaptador unido a un sitio de restricción cercano (**cebador selectivo**) (Vaughn et al., 1997; Kumar et al., 2001).

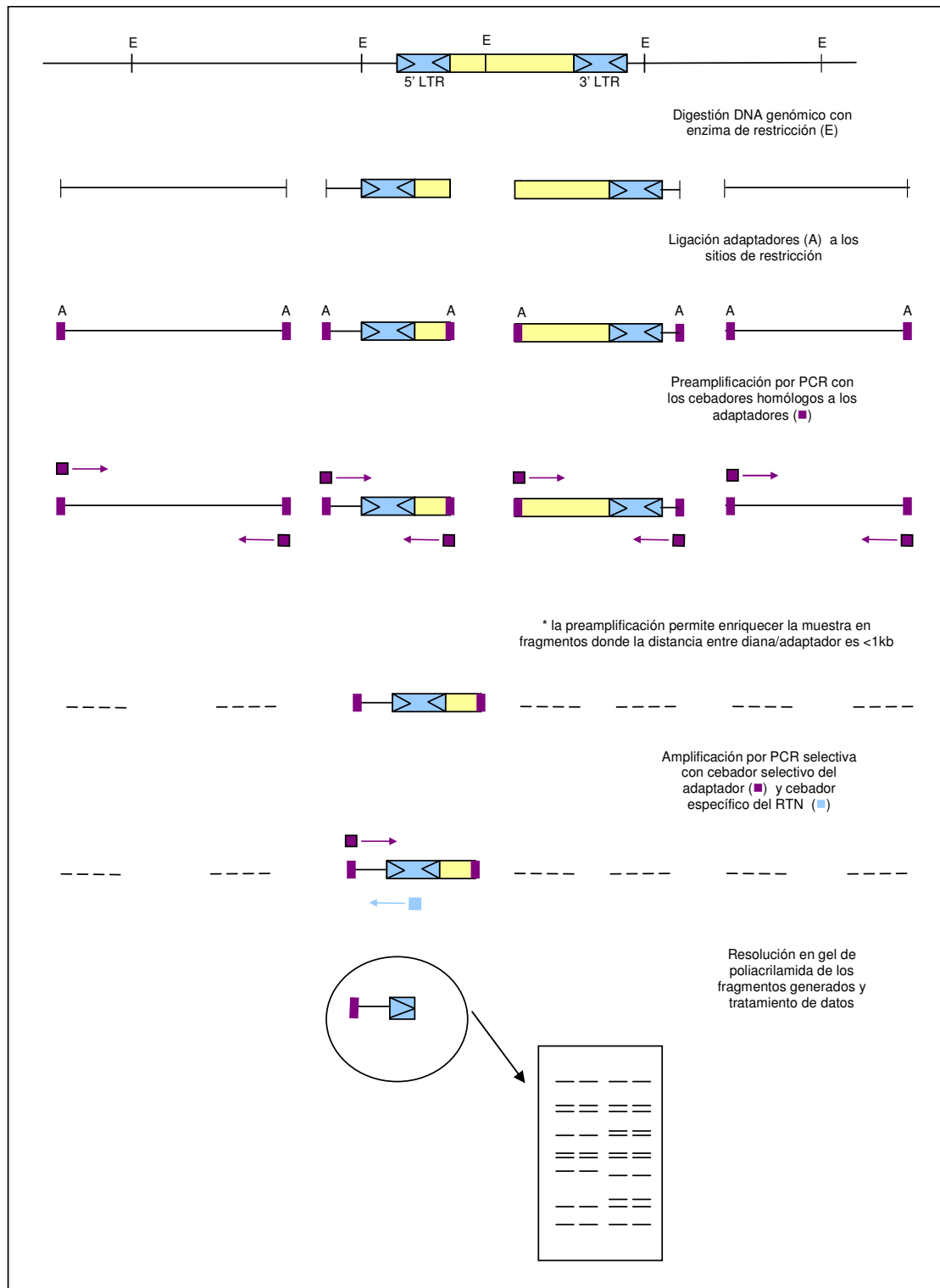
Hemos utilizado el RTN-LTR tipo  *copia* CIRE1 caracterizado en *Citrus sinensis* para poner a punto la técnica de SSAP en este sistema y así desarrollar marcadores moleculares basados en RTN-LTR para estudiar la biodiversidad dentro del género *Citrus* y géneros próximos de la misma familia Rutaceae.

Para el estudio se han seleccionado las mismas especies de cítricos de las que hemos determinado la contribución de los RTN-LTR tipo  *copia* en el apartado anterior (**apartado B.1**) y que sabemos contienen elementos CIRE1 en su genoma (ver **apartado A.3.6**) esto es, *C. sinensis*, *C. aurantium*, *C. clementina*, *C. grandis*, *C. ichangensis*, *C. limettioides*, *C. limon*, *C. macroptera*, *C. medica*, *C. unshiu*, *Fortunella margarita*, *Microcitrus inodora* y *Poncirus trifoliata*. También incluimos en el análisis una muestra de DNA genómico de tabaco (*Nicotiana tabacum*) como especie externa o *outgroup*.

El SSAP es una técnica experimentalmente compleja cuyo procedimiento a grandes rasgos consiste en: (1) Digestión del DNA genómico, (2) Ligación al DNA digerido de las secuencias adaptadoras correspondientes a los sitios de restricción anteriores, (3) Preamplificación por PCR con los cebadores homólogos a los adaptadores (este paso es opcional), (4) Amplificación selectiva con el cebador específico y el cebador selectivo del RTN-LTR escogidos, (5) Resolución de los fragmentos generados en un gel de poliacrilamida del 6%, (6) Revelado posterior, (7) Tratamiento de datos. En la **Figura 63** se muestra a modo de esquema los diferentes pasos a seguir, que son desarrollados detalladamente en el apartado 12 de Material y Métodos.



## Resultados



**Figura 63. Esquema de la metodología experimental de la técnica SSAP (*Sequence-Specific Amplified Polymorphism*).** El DNA genómico se digiere con un enzima de restricción, se ligan los adaptadores a todos los fragmentos generados y el producto se utiliza en la preamplificación por PCR con los cebadores homólogos a los adaptadores. Seguidamente se realiza la PCR selectiva con un cebador complementario a los adaptadores (cebador selectivo) y un cebador complementario a una secuencia del RTN (cebador específico). Las bandas obtenidas son visualizadas en un gel de poliacrilamida de alta resolución.

En nuestro caso como cebador específico del RTN-LTR hemos diseñado un oligonucleótido (oligo13) complementario a una secuencia de la LTR de CIRE1, orientado para amplificar cadena arriba (o *upstream*) en el genoma. La secuencia de dicho cebador está descrita en Material y Métodos. Como cebador selectivo se han probado diferentes combinaciones de enzimas de restricción / adaptadores. La elección del enzima de restricción y el número de bases selectivas que se le añaden al cebador selectivo, depende de cada genoma a analizar y necesita ensayarse previamente. En nuestro caso, dado que hay aproximadamente 2.200 RTN-LTR CIRE1 en el genoma de *Citrus sinensis*, y para reducir la cantidad de bandas específicas de CIRE1 hasta un número manejable, nos decidimos a utilizar diferentes bases que añadimos al cebador selectivo. El objetivo final es conseguir el equilibrio entre un número de bandas manejable y con suficiente número de bandas polimórficas entre las muestras comparadas.

### **B.2.1 Aproximaciones experimentales utilizadas**

- **Detección de bandas SSAP en geles poliacrilamida mediante tinción con plata**

Los primeros geles SSAP los realizamos mediante esta aproximación porque nos permitía tantear y ajustar las diferentes condiciones del experimento sin usar radiactividad en exceso.

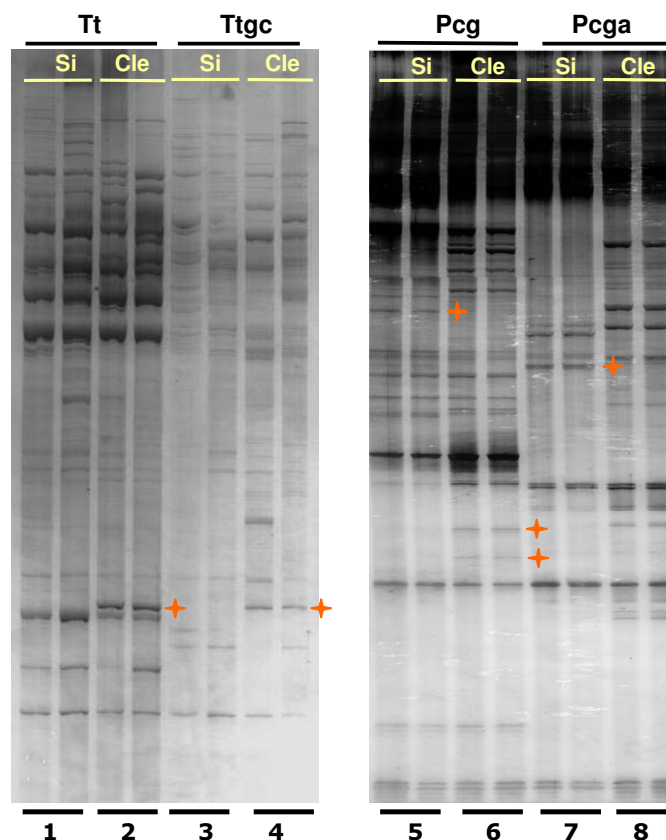
Para poner a punto la técnica de SSAP en cítricos iniciamos los experimentos buscando polimorfismos únicamente entre dos DNA genómicos diferentes: *C. sinensis* y *C. clementina*. Realizamos pruebas en paralelo con dos enzimas de restricción, TaqI (qué reconoce la secuencia 5'-T\*CGA-3') y PstI (qué reconoce la secuencia 5'-CTGCA\*G-3') para seleccionar aquel que diera un patrón de digestión mejor. Tras la ligación de los adaptadores correspondientes, en nuestro caso realizamos siempre el paso de preamplificación pues permite reducir mucho el número de bandas de interés. La preamplificación se realiza con cebadores homólogos a la secuencia de los adaptadores del sitio de restricción concreto del enzima con el que se ha digerido el genómico. En nuestro caso, hemos utilizado bien el cebador P<sub>0</sub> (homólogo al adaptador de PstI) o T<sub>0</sub> (homólogo al adaptador de TaqI), cuyas secuencias se muestran en Material y Métodos. El subíndice 0 nos indica que en este caso no se le añade ninguna base selectiva a la secuencia del cebador. Los tiempos de extensión de la PCR en la preamplificación (las condiciones concretas se describen en Material y Métodos) permiten enriquecer la muestra de fragmentos amplificados en aquellos de tamaño inferior a 1kb, que es a su vez el límite de resolución de los geles de poliacrilamida utilizados en pasos posteriores.

Una vez tenemos la preamplificación, realizamos la PCR selectiva utilizando en todos los casos como cebador específico de RTN-LTR el oligo13 (secuencia de la LTR de CIRE1).

## Resultados

Como cebador selectivo realizamos varias pruebas añadiendo 1, 2 o 3 bases selectivas a  $P_0$  y  $T_0$  para determinar que combinación daba mejor resultado.

Una de las principales críticas al método por tinción de plata en relación al marcaje radiactivo en geles SSAP, es que la tinción de plata hace visible cualquier fragmento de DNA amplificado mientras que en los geles radiactivos, tal y como se detalla en Material y Métodos, se marca selectivamente el cebador específico por tanto únicamente son visibles las bandas debidas a amplificaciones de RTN-LTR. Por ello, y para confirmar que las bandas que vemos en los geles de plata son realmente específicas, siempre realizamos una PCR control (en paralelo a la PCR selectiva) para cada combinación diferente (DNA/enzima restricción/cebador selectivo). La PCR control se prepara exactamente igual que la PCR selectiva pero sin añadir el cebador específico (oligo13); así las bandas que aparezcan en la PCR selectiva pero que también lo hagan en la PCR control sabremos que no son específicas del RTN y podremos descartarlas.



**Figura 64. Detección de bandas SSAP en geles de poliacrilamida 6% mediante tinción con plata.** Se indica en la figura las muestras de la PCR selectiva cargadas en cada carril. En negro, se muestran los diferentes cebadores selectivos utilizados (Tt, Ttgc para *TaqI* y Pcg, Pcgga para *PstI*). En amarillo, se indica el origen del DNA genómico siendo Si: *C.sinensis* y Cle: *C.clementina*. Cada muestra DNA se somete en paralelo a dos PCR selectivas que se cargan en carriles consecutivos en el gel. Se han señalado algunas bandas diferenciales (➕) entre las especies comparadas.

En la **Figura 64** se resumen algunos de los resultados obtenidos tras resolver la PCR selectiva en gel de poliacrilamina 6% y realizar la tinción de plata. Todas las muestras

se tratan por duplicado y en paralelo desde el paso de la ligación de los adaptadores para comprobar la reproductibilidad de la técnica. Sólo son consideradas como válidas aquellas bandas presentes en ambas réplicas de cada muestra.

Observamos que en las muestras digeridas con *PstI* hay una gran proporción de fragmentos grandes que se quedan en la parte alta del gel [**carriles 5-8, Figura 64**]. El hecho que se generen mayor número de bandas SSAP utilizando el cebador selectivo Ttg, puede deberse simplemente a que *TaqI* es un enzima de corte más frecuente que *PstI*. Además, la actividad del enzima *PstI* está afectada por el nivel de metilación del sitio de restricción, lo cual por ejemplo se ha visto que afecta al patrón de bandas AFLP en cebada (Knox et al., 2001). El DNA utilizado para la amplificación derivado de la digestión con *PstI* está mayoritariamente representando las regiones menos metiladas del genoma. Se sabe también que el genoma de *Citrus* contiene abundante DNA metilado (Liou et al., 1996; Cai et al., 1996) y que la presencia de RTN está asociada a niveles elevados de hipermetilación del DNA (Ferschotte et al., 2002). Asimismo se conoce que las secuencias de RTN están metiladas en algunas especies de cítricos (Asíns et al., 1999). Es de esperar que el patrón de bandas SSAP también esté afectado al utilizar un enzima sensible a la metilación como *PstI*, favoreciendo la obtención de un número más bajo y por tanto manejable de bandas.

Estos primeros geles resultaron muy útiles porque nos permiten ver ya bandas diferenciales entre *C. sinensis* y *C. clementina* (**Figura 64**). También nos permiten concluir que tres bases selectivas añadidas al cebador selectivo resultan en una amplificación demasiado restrictiva y con pocas bandas [**carriles 3 y 4, Figura 64**] mientras que dos bases selectivas parece ser la elección más conveniente en nuestro caso [**carriles 5 y 6, Figura 64**]. Pero en general, mediante esta aproximación hemos generado geles poco resolutivos para el conteo de bandas polimórficas.

- **Detección de bandas SSAP en geles poliacrilamida mediante marcaje radiactivo**

Mediante la aproximación con tinción de plata hemos puesto a punto la técnica SSAP en cítricos y nos ha permitido seleccionar los cebadores selectivos más adecuados que hemos aplicado a la segunda aproximación utilizada.

Hemos realizado PCR selectivas con los catorce DNA genómicos del estudio (DNA de diez especies de cítricos, DNA de tres especies de géneros próximos a *Citrus* y DNA de tabaco) y utilizando dos cebadores selectivos diferentes: Ttg (digiriendo el DNA con *TaqI*) o Pcg (digiriendo el DNA con *PstI*). Ambas combinaciones (con dos bases selectivas añadidas a la secuencia del cebador) generan un número discreto y suficiente de bandas SSAP. En esta aproximación, el cebador específico de CIRE1 (oligo13) se marca radiactivamente con  $\gamma$ -p<sup>33</sup> y las bandas SSAP específicas son visibles tras realizar la autoradiografía del gel. La resolución de los geles se mejora mucho como puede verse en las **Figuras 65-68**.

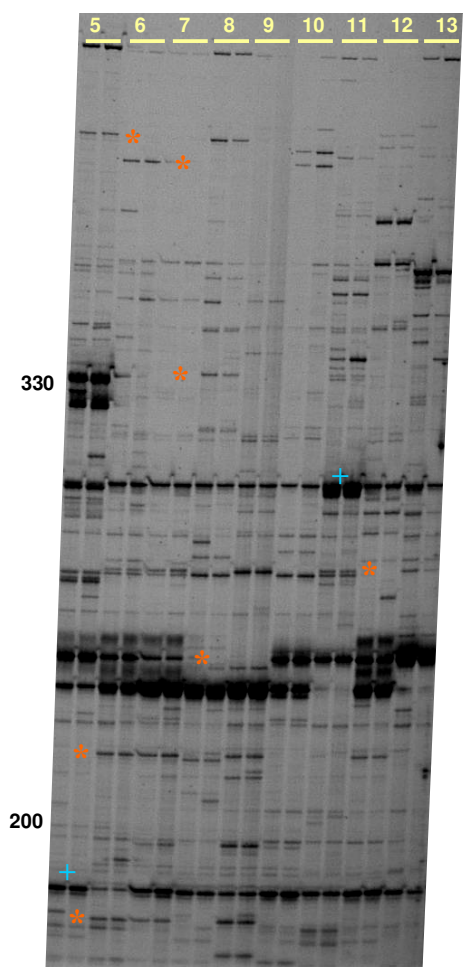
## Resultados

### B.2.2 Análisis de los geles SSAP marcados con $\gamma$ -p<sup>33</sup> obtenidos

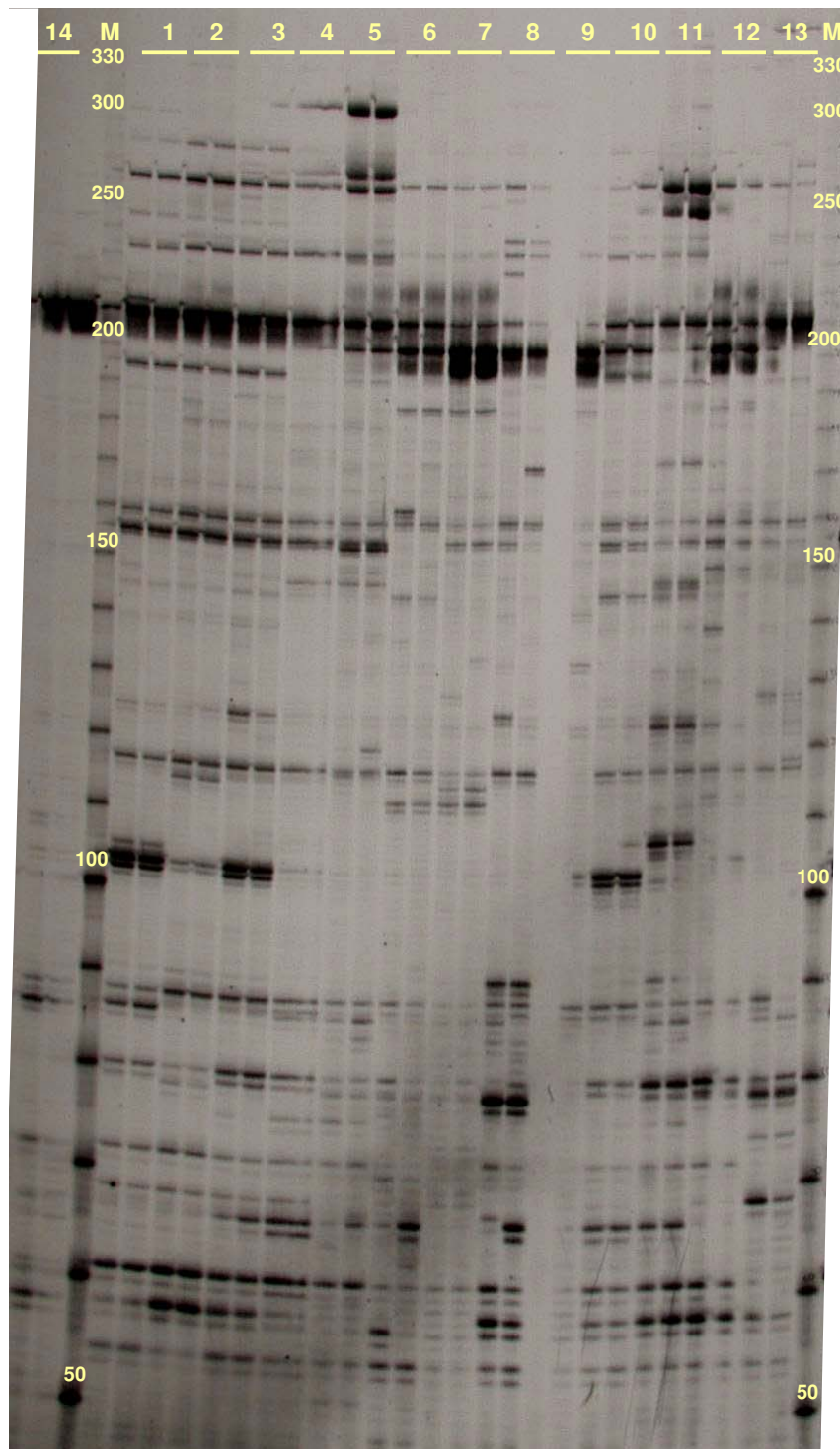
#### PCR selectiva con el cebador Pcg

En la **Figura 65** se muestran las bandas SSAP marcadas con  $\gamma$ -p<sup>33</sup> resueltas en un gel de poliacrilamida al 6% y generadas en la PCR selectiva con el cebador específico de la LTR de CIRE1 y el cebador selectivo Pcg. Aunque hay bandas que son compartidas por todas las especies (+) también observamos que muchas bandas son diferenciales (\*). La amplificación con este cebador resulta altamente polimórfica e informativa, y los diferentes marcadores en cada especie están validados como específicos al estar presentes en ambas réplicas de la PCR.

Observamos también, que no todo el gel resulta igualmente informativo, pues en la parte alta del gel prácticamente no encontramos bandas. Por ello nos decidimos a cargar un segundo gel con las mismas muestras pero acortando el tiempo de electroforesis, para favorecer la correcta separación de las bandas de menor tamaño. En la **figura 66** se muestra este segundo gel, donde el nivel de resolución nos permite ver bandas de hasta 50 pb. Efectivamente resulta ser más informativo y a la vez complementario al anterior. La muestra de *N. tabacum* (**carril 14, figura 66**) no comparte la mayoría de las bandas SSAP presentes en las otras muestras, confirmando su condición de grupo externo o *outgroup*.



**Figura 65. SSAP del RTN CIRE1 con el cebador selectivo Pcg.** Autorradiografía de la resolución en un gel de poliacrilamida del 6% de los fragmentos obtenidos en la PCR selectiva marcada con  $\gamma$ -p<sup>33</sup>. Las condiciones del gel y el tiempo que dura la electroforesis favorecen la separación correcta de los fragmentos generados de tamaño inferior a 1 kb y superior a 150 pb. Cada muestra de DNA se somete en paralelo a dos PCR selectivas independientes que se cargan en carriles consecutivos en el gel. Se han cargado las siguientes muestras: (5) *C. ichangensis*, (6) *C. limettioides*, (7) *C. limon*, (8) *C. macroptera*, (9) *C. medica*, (10) *C. unshiu*, (11) *Fortunella margarita*, (12) *Microcitrus inodora*, (13) *Poncirus trifoliata*. A la izquierda de la imagen se muestran algunos tamaños de banda orientativos en pb. Se han señalado algunas de las muchas bandas SSAP polimórficas (\*) (diferenciales) y monomórficas (+) (que están en todos los individuos) presentes.



**Figura 66. SSAP del RTN CIRE1 con el cebador selectivo Pcg.** Autorradiografía de la resolución en un gel de poliacrilamida del 6% de los fragmentos obtenidos en la PCR selectiva marcada con  $\gamma\text{-p}^{33}$ . Las condiciones del gel y el tiempo que dura la electroforesis favorecen la separación correcta de los fragmentos generados de menor tamaño: entre 330 pb y 50 pb. Cada muestra de DNA se somete en paralelo a dos PCR selectivas independientes que se cargan en carriles consecutivos en el gel. Se han cargado las siguientes muestras: (1) *C. sinensis*, (2) *C. aurantium*, (3) *C. clementina*, (4) *C. grandis*, (5) *C. ichangensis*, (6) *C. limettioides*, (7) *C. limon*, (8) *C. macroptera*, (9) *C. medica*, (10) *C. unshiu*, (11) *Fortunella margarita*, (12) *Microcitrus inodora*, (13) *Poncirus trifoliata*, (14) *Nicotiana tabacum*. M, marcador de peso molecular de 10 pb, se indican algunos tamaños en pb. En este gel ha quedado sin cargar una de las réplicas del carril 9.

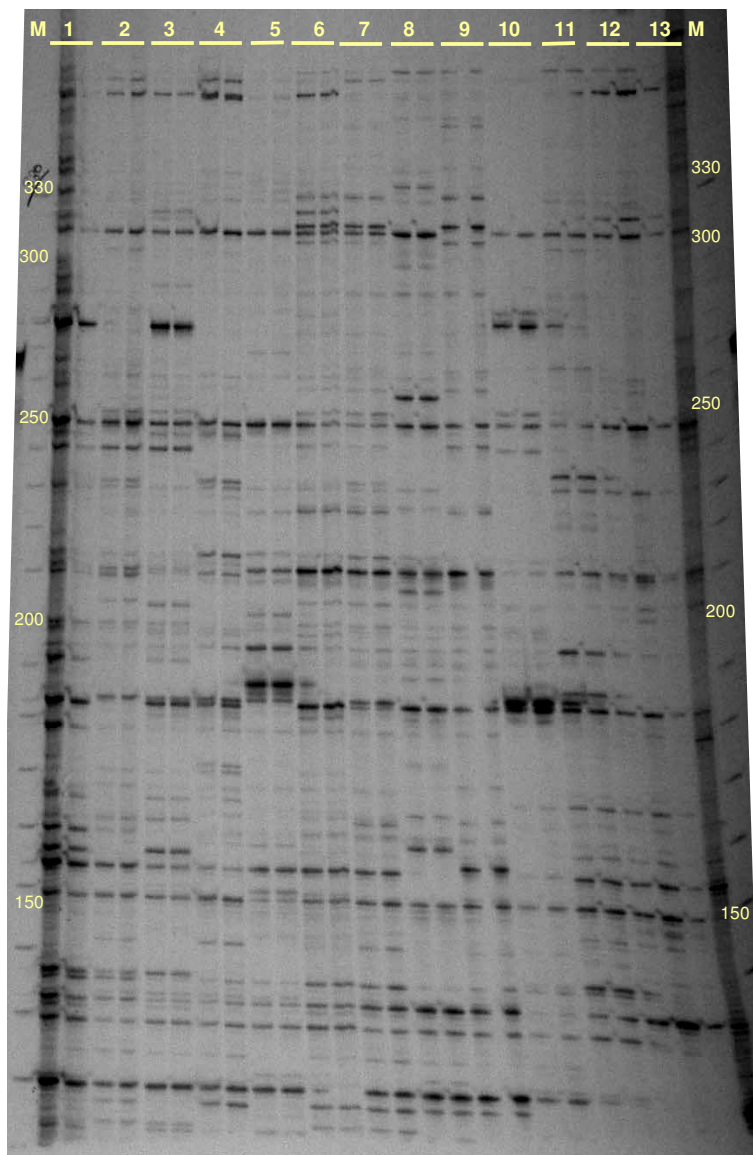


## Resultados

### PCR selectiva con el cebador Ttg

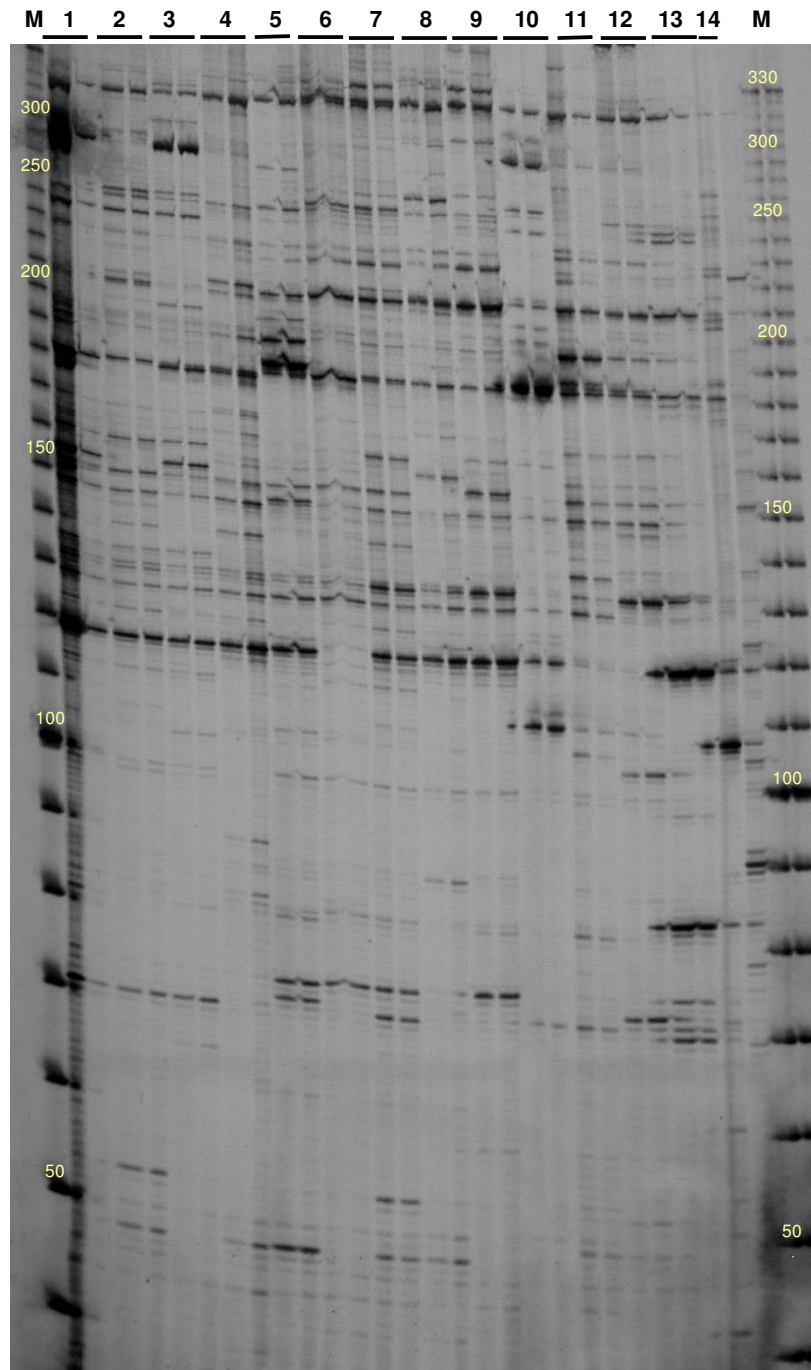
En la **figura 67** se muestran las bandas SSAP marcadas con  $\gamma\text{-p}^{33}$  resueltas en un gel de poliacrilamida del 6% y generadas en la PCR selectiva con el cebador específico de la LTR de CIRE1 y el cebador selectivo Ttg. Nuevamente se demuestra que la técnica utilizada es específica ya que se obtiene el mismo resultado para ambas réplicas de una misma muestra.

En este caso, el gel resulta informativo en toda su extensión, observando bandas bien resueltas y separadas de tamaños incluidos entre los 330 pb y los 120 pb. Nos decidimos de nuevo a cargar un segundo gel, priorizando la correcta separación de las bandas más pequeñas (**Figura 68**), pero en este caso la amplificación selectiva con el cebador Ttg genera pocas bandas polimórficas de entre 100 y 50 pb, a diferencia de lo que observábamos en la amplificación con Pcg.



**Figura 67. SSAP del RTN CIRE1 con el cebador selectivo Ttg.**

Autoradiografía de la resolución en un gel de poliacrilamida del 6% de los fragmentos obtenidos en la PCR selectiva marcada con  $\text{p}^{33}$ . Las condiciones del gel y el tiempo que dura la electroforesis favorecen la separación correcta de los fragmentos generados de tamaño inferior a 1kb y superior a 120 pb. Cada muestra de DNA se somete en paralelo a dos PCR selectivas independientes que se cargan en carriles consecutivos en el gel. Se han cargado las siguientes muestras: (1) *C. sinensis*, (2) *C. aurantium*, (3) *C. clementina*, (4) *C. grandis*, (5) *C. ichangensis*, (6) *C. limettioides*, (7) *C. limon*, (8) *C. macroptera*, (9) *C. medica*, (10) *C. unshiu*, (11) *Fortunella margarita*, (12) *Microcitrus inodora*, (13) *Poncirus trifoliata*. M, marcador de peso molecular de 10 pb, se indican algunos tamaños en pb.



**Figura 68. SSAP del RTN CIRE1 con el cebador selectivo Ttg.** Autoradiografía de la resolución en un gel de poliacrilamida del 6% de los fragmentos obtenidos en la PCR selectiva marcada con  $\gamma\text{-p}^{33}$ . Las condiciones del gel y el tiempo que dura la electroforesis favorecen la separación correcta de los fragmentos generados de menor tamaño: entre 330 pb y 50 pb. Cada muestra de DNA se somete en paralelo a dos PCR selectivas independientes que se cargan en carriles consecutivos en el gel. Se han cargado las siguientes muestras: (1) *C. sinensis*, (2) *C. aurantium*, (3) *C. clementina*, (4) *C. grandis*, (5) *C. ichangensis*, (6) *C. limettioides*, (7) *C. limon*, (8) *C. macroptera*, (9) *C. medica*, (10) *C. unshiu*, (11) *Fortunella margarita*, (12) *Microcitrus inodora*, (13) *Poncirus trifoliata*, (14) *Nicotiana tabacum*. M, marcador de peso molecular de 10 pb, se indican algunos tamaños en pb.

## Resultados

Aunque conseguimos aumentar el número de fragmentos generados en la PCR selectiva utilizando el cebador Ttg, el nivel de polimorfismo con ambos cebadores selectivos es similar, tal y como vemos en la **Tabla XIX**. Para calcular el nivel de polimorfismo no hemos considerado a *N. tabacum* porque no comparte la mayoría de las bandas SSAP presentes en las otras muestras pertenecientes a la familia Rutaceae y el valor del nivel de polimorfismo sería directamente 1, resultando poco representativo. Considerando las trece especies de *Citrus* y géneros próximos, el nivel de polimorfismo resulta muy elevado también, siendo 0,91 para la PCR selectiva con el cebador Pcg y 0,86 para el cebador Ttg **(A)**. Si el recuento de bandas polimórficas lo realizamos comparando entre si únicamente las especies que *a priori* aparecen más próximas en los estudios taxonómicos publicados, como por ejemplo el grupo de las naranjas-mandarinas o el grupo de limones-lima (Herrero et al., 1996), vemos que el nivel de polimorfismo disminuye mucho. Así, *C. sinensis*, *C. aurantium*, *C. clementina* y *C. unshiu* presentan un nivel de polimorfismo SSAP del 0,22 para Pcg y 0,32 para Ttg **(B)**, mientras que *C. limon*, *C. limettioides* y *C. medica* presentan un nivel de polimorfismo SSAP del 0,32 para Pcg y 0,22 para Ttg **(C)**.

	Cebador selectivo	Nº total de bandas	Nº de bandas polimórficas	Nivel de polimorfismo *
<b>A</b>	Pcg	71	65	0,91
	Ttg	82	71	0,86
<b>B</b>	Pcg	71	16	0,22
	Ttg	82	26	0,32
<b>C</b>	Pcg	71	22	0,31
	Ttg	82	18	0,22

\* Proporción de bandas polimórficas en relación al número de bandas total

**Tabla XIX. Niveles de polimorfismo SSAP para el RTN CIRE1 en diversas especies de cítricos y especies de géneros próximos, utilizando dos cebadores selectivos diferentes. (A)** Calculado para todas las especies del estudio, excluyendo *N. tabacum*. **(B)** Calculado únicamente para las especies del grupo de naranjas-mandarinas: *C. sinensis*, *C. aurantium*, *C. clementina* y *C. unshiu*. **(C)** Calculado únicamente para las especies del grupo de limón-lima: *C. limon*, *C. limettioides* y *C. medica*

En conclusión, estos resultados muestran niveles de polimorfismo muy altos entre las especies del estudio utilizando como cebador específico una secuencia de la LTR de CIRE1, junto a dos combinaciones diferentes de cebadores selectivos (con dos bases selectivas cada uno). La calidad de los geles generados es satisfactoria y con una

resolución suficiente como para proceder a contabilizar bandas SSAP polimórficas. Para cada especie, únicamente hemos considerado como válidas aquellas bandas presentes en ambas réplicas de la PCR y que estén situadas en una zona del gel donde sean perfectamente claras y definidas.

Es además una técnica reproducible, ya que para una especie en concreto el patrón de bandas SSAP específicas de CIRE1 obtenido con cada combinación enzima restricción/cebador selectivo, se mantiene aun partiendo de extracciones de DNA diferentes.

### **B.2.3 Tratamiento de los datos SSAP**

A partir del patrón de bandas obtenido en cada especie podemos inferir las relaciones filogenéticas entre ellas. El procedimiento es el siguiente: para cada entrada de DNA se genera una matriz binaria que refleja la presencia (1) o ausencia (2) de una banda específica (marcador SSAP) a partir de la cual se pueden obtener valores de similitud entre pares de genotipos comparados (Ellis et al., 1998; Pearce et al., 2000; García-Martínez et al., 2003; Queen et al., 2004).

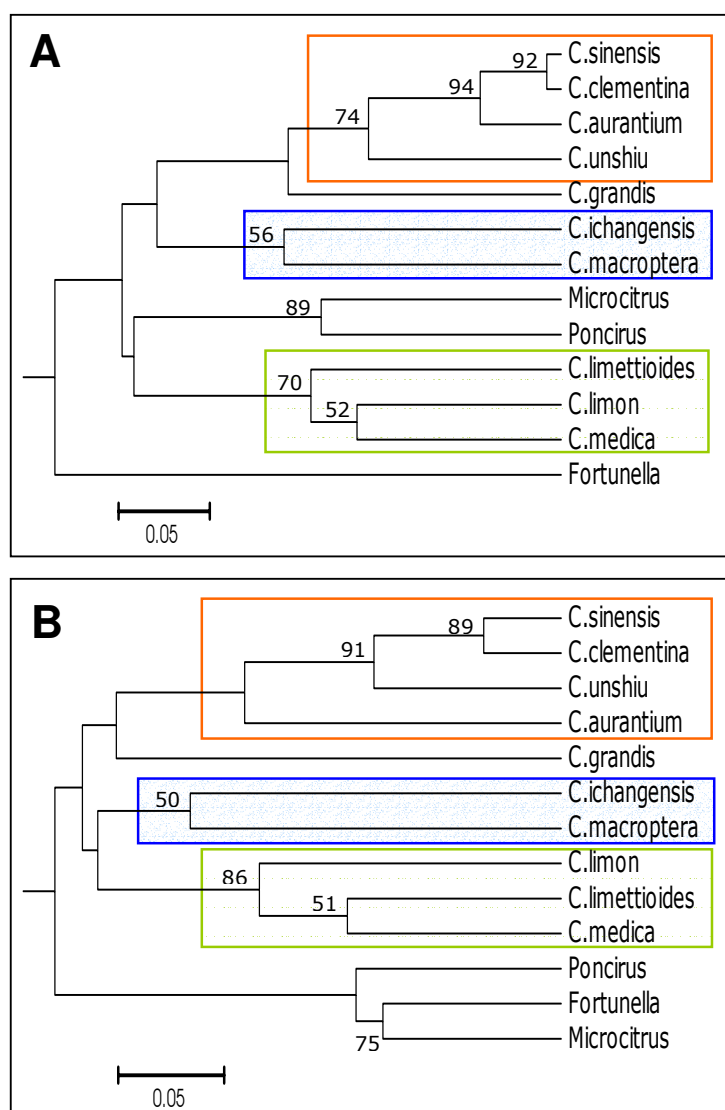
Se han escogido un total de 71 bandas polimórficas en el caso del cebador selectivo Ttg y un total de 65 bandas polimórficas para el cebador Pcg, con las que se han generado dos matrices de presencia/ausencia (una por cada combinación de cebadores) que han permitido calcular las distancias genéticas entre las distintas especies mediante el programa TFGA versión 1.3, según se explica en Material y Métodos. A partir de estas distancias genéticas se han generado dos árboles UPGMA diferentes (uno por cada combinación de cebadores) validados por el test de *bootstrap* para 1000 réplicas. Se han generado también otros árboles filogenéticos (tipo *Neighbour joining*) obteniéndose el mismo tipo de topología o agrupaciones que en el caso de los árboles UPGMA (resultados no mostrados), que son los que nosotros consideramos para inferir las relaciones filogenéticas entre cítricos basándonos en marcadores SSAP.

Se han utilizado un número similar de marcadores para generar cada árbol para asegurar que la precisión de los árboles es comparable. La media de las distancias genéticas (Neis, 1972-1978) están dentro del rango de 0,016 entre *C. sinensis* y *C. clementina* y 0,709 entre *C. limon* y *Fortunella* (para Pcg) o del rango de 0,073 *C. sinensis* y *C. clementina* y 0,625 entre *C. aurantium* y *Poncirus* (para Ttg).

## Resultados

### B.2.4 Relaciones filogenéticas entre cítricos inferidas a partir de marcadores SSAP

A continuación se muestran los dos árboles filogenéticos UPGMA derivados de marcadores SSAP de la LTR de CIRE1. Ambos árboles de la **Figura 69** resultan en agrupaciones entre las especies muy similares, que son a su vez consistentes con las relaciones filogenéticas del género ya publicadas, basadas igualmente en otros marcadores moleculares como son los isozimas (Herrero et al., 1996), RFLP y RAPD (Federici et al., 1998), RAPD y SCAR (Nicolosi et al., 2000) o ISSR (Sankar et al., 2001) (**ver Figura 12 de la Introducción**).



**Figura 69.** Análisis filogenético derivado de marcadores SSAP utilizando en la PCR selectiva un cebador específico de la LTR de CIRE1 en combinación con el cebador selectivo Pcg (A) o el cebador selectivo Ttg (B). Árbol filogenético tipo UPGMA generado con el programa TFGA versión 1.3. La divergencia de las secuencias en unidades de distancia genética viene definida por la longitud de las ramas horizontales. Está indicado en cada bifurcación los valores de *bootstrap* 50%. Se han recuadrado las principales agrupaciones que se forman en cada árbol.

Los árboles derivados de marcadores SSAP de este estudio reflejan que:

(1) Las especies *C. sinensis*, *C. clementina*, *C. unshiu* y *C. aurantium*, pertenecientes al grupo de naranjas-mandarinas descrito en Herrero et al., 1996, se agrupan siempre juntas; mirando más en detalle, la agrupación de *C. sinensis* (naranja dulce) y *C. clementina* (clementina) está apoyada por valores de *bootstrap* muy elevados (89 y 92 %) en ambos árboles mientras que, en el gel SSAP con el cebador selectivo Pcg (**Figura 69A**) es *C. aurantium* (naranja amarga) quien está filogenéticamente más próxima a estas dos y en el gel SSAP con el cebador selectivo Ttg (**Figura 69B**) lo es *C. unshiu* (mandarina) con un valor de *bootstrap* del 91%.

(2) Las especies *C. limon*, *C. limettioides* y *C. medica*, pertenecientes al grupo de lima-limón-cidro-pummelo descrito en Herrero et al., 1996, se sitúan en un mismo grupo apoyados por valores de *bootstrap* > 70%, aunque el orden relativo que ocupan dentro de su grupo varía un poco de un árbol a otro.

(3) La especie *C. grandis* (pummelo) no queda incluida en ningún grupo con claridad aunque sí en la misma rama que las naranjas-mandarinas con valores de *bootstrap* menores de 50.

(4) Los cítricos denominados raros como *C. ichangensis* o *C. macroptera*, se agrupan en una rama común aunque la posición respecto al resto de especies cambia de un árbol a otro, dado que los valores de *bootstrap* son muy bajos.

(5) Los géneros próximos a *Citrus*, como son *Fortunella*, *Microcitrus* y *Poncirus*, comparten bandas SSAP con los cítricos pero se sitúan claramente en ramas más separadas que el resto.



## Resultados

---

## C. TÉCNICA SSAP PARA LA DETECCIÓN DE LA MOVILIDAD DE RTN-LTR

Además de la aplicación para estudios filogenéticos, tal y como queda demostrado en el apartado anterior, la técnica SSAP también denominada *Transposon Display* (Casa et al., 2000) permite detectar la actividad transposicional de RTN-LTR en forma de inserciones recientes (Melayah et al., 2001).

Como hay una serie de condiciones que activan a nivel transcripcional a CIRE1 (**Apartado A5**), se plantearon diferentes experimentos para saber si también se observa transposición del elemento CIRE1 en condiciones de incremento de la transcripción, ya que para muchos RTN la transposición está controlada por el nivel transcripcional (Boeke, 1989; Melayah et al., 2001).

La determinación de la posible actividad transposicional de un RTN-LTR puede realizarse bien buscando un incremento en el número de copias mediante experimentos de *Southern-blot* o de *Slot-blot*, o bien buscando nuevas inserciones en forma de nuevas bandas a través de la técnica SSAP, entre otras.

Dado el elevado número de copias en que está CIRE1 en el genoma de *C. sinensis* (aproximadamente 2.200 copias por genoma haploide) es muy difícil detectar movilización en forma de nuevas copias por *Southern-blot* o *Slot-blot*, en cambio la técnica SSAP o *Transposon display* permite detectar sitios de inserción múltiples en el genoma para elementos muy repetidos (Casa et al., 2000; Queen et al., 2004). La transposición de nuevas copias del elemento puede detectarse como nuevas bandas polimórficas en los perfiles SSAP conocidos a nivel de especie, línea, tejido o situación.

### C.1 Estudio de la actividad transposicional de RTN-LTR tipo copia en naranjo

Hemos comprobado en el **apartado B.2** que el patrón de bandas SSAP derivado de CIRE1 en hojas de *C. sinensis* es propio de la especie y reproducible experimentalmente.

Se ha probado también en el **apartado A.5.2** que CIRE1 muestra mayor actividad transcripcional en raíz que en hoja, y también en hoja sometida a daño mecánico o frío, o tras la adición de hormonas vegetales como el ácido jasmónico (JA) o el ácido naftalenacético (NAA).

Queremos averiguar si en muestras de raíz u hoja tratada con las citadas hormonas aumenta la actividad de CIRE1 a un nivel transposicional, donde la movilización del elemento se manifieste en forma de nuevas copias insertadas en el genoma visibles como nuevas bandas en el patrón conocido de bandas SSAP de *C. sinensis*.

## Resultados

---

En esta parte del trabajo se ha utilizado la técnica SSAP para detectar y recuperar bandas con el DNA de los lugares de inserción de nuevas transposiciones así como de inserciones preexistentes de CIRE1, en plantas de naranjo sometidas a diferentes condiciones.

En concreto, se cortaron hojas en pequeños trozos (~ 1 cm<sup>2</sup>), se agruparon en diferentes subgrupos, se infiltraron durante 1 hora con tampón 0,05% MES sólo o añadiéndole 50 µM JA o bien 1mg/L NAA, y se incubaron durante 7h a 28°C. Posteriormente se aisló el DNA genómico de cada muestra. Asimismo se obtuvo el DNA genómico de hoja y raíz de naranjo crecido bien en invernadero o en condiciones *in vitro*.

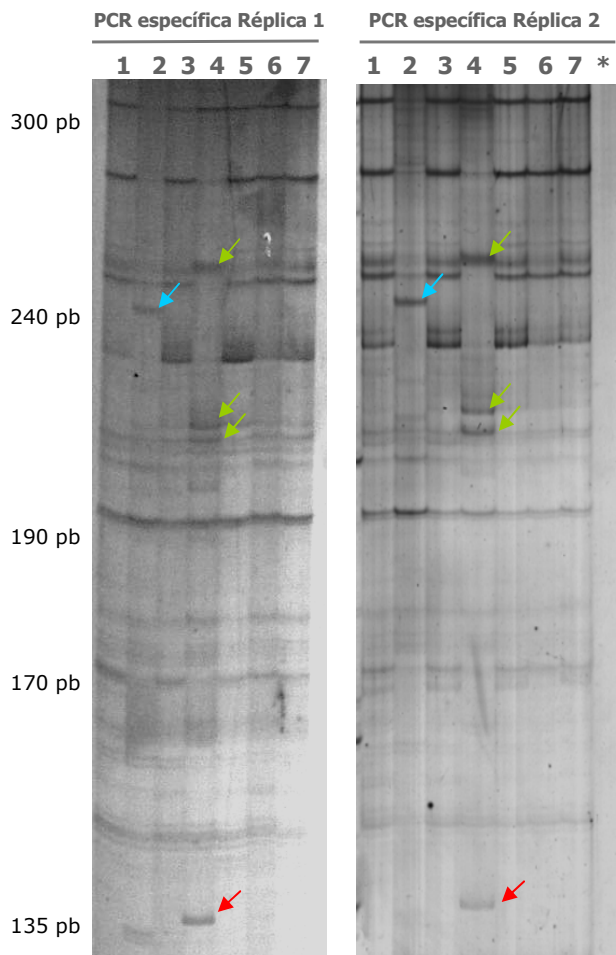
Para realizar el experimento de SSAP se ha procedido de la misma manera que en el **apartado B.2**. Así, el DNA genómico se ha digerido con *TaqI* y se ha realizado la preamplificación con el cebador T<sub>0</sub> (sin bases selectivas añadidas a la secuencia del adaptador). Como cebador específico del RTN-LTR se ha utilizado de nuevo el Oligo13, cuya secuencia es complementaria a una zona de la LTR de CIRE1, y como cebador selectivo se ha utilizado el Ttg (con dos bases selectivas), ya que como se ha descrito en el apartado B.2.2 esta combinación de cebadores genera geles con muchas bandas informativas.

En la **Figura 70** se muestra el resultado obtenido tras resolver la PCR selectiva en gel de poliacrilamina al 6% y realizar la tinción de plata. Todas las muestras se tratan por duplicado y en paralelo desde el paso de la ligación de los adaptadores para comprobar la reproductibilidad de la técnica. Sólo son consideradas como válidas aquellas bandas presentes en ambas réplicas de la PCR para cada muestra. Asimismo se realizan PCR control para cada condición, exactamente igual que la PCR selectiva pero sin añadir el cebador específico, para descartar aquellas bandas que no sean específicas del RTN-LTR (**carril\***, **Figura 70**). En la PCR control se esperan bandas amplificadas que corresponden a regiones del genoma entre dos dianas de restricción para *TaqI*. Aunque al realizar la PCR control se amplificaron bandas, el tamaño obtenido resultó ser superior a 300 pb, por ello se seleccionó como específica del RTN y por tanto informativa la parte inferior del gel, que es la que se muestra en la Figura 70.

No se observan diferencias significativas entre el patrón de bandas SSAP sobre hoja de las muestras control (**carril 1, Figura 70**) y las muestras de hoja sometidas a diferentes condiciones de cultivo, estrés o tratamiento de hormonas (**carriles 3, 5, 6 y 7, Figura 70**). Se puede concluir que las condiciones del experimento no permiten ver la aparición de nuevas bandas SSAP de CIRE1 en las muestras de hoja sometidas a los tratamientos indicados.

En las muestras que corresponden a raíz de plantas independientes se observan bandas SSAP específicas del RTN-LTR CIRE1 diferentes a las vistas en muestras de hoja.

Es más, se observan patrones diferentes dependiendo si el DNA de la muestra proviene de raíz de planta crecida en invernadero (**Figura 70, carril 2**) o en condiciones *in vitro* (**Figura 70, carril 4**). En concreto, la muestra mantenida en un medio *in vitro*, suplementada por tanto con hormonas vegetales (ver Material y Métodos) presenta como mínimo la aparición de una banda nueva clara que se repite en ambas réplicas del experimento indicada con una flecha roja en la Figura 70, así como bandas que aun estando presentes también en las otras muestras, tienen una mayor intensidad en la muestra de DNA extraído de raíz *in vitro* y que están indicadas con flechas verdes en Figura 70. Resaltar también la aparición de una nueva banda en la muestra de raíz de planta crecida en invernadero que no aparece en ninguna de las otras muestras y que está indicada con una flecha azul en Figura 70.



**Figura 70. SSAP del RTN CIRE1 con el cebador selectivo Ttg en DNA genómico de *C. sinensis* sometido a diferentes tratamientos para ver actividad transposicional.**

Visualización de las bandas SSAP en geles de poliacrilamida 6% mediante tinción con plata. Cada muestra de DNA genómico se somete en paralelo a dos PCR selectivas independientes, indicadas como Réplica 1 y 2 en la figura. Se han cargado las siguientes muestras de DNA procedentes de: (1) Hoja de planta crecida en invernadero (2) Raíz de planta crecida en invernadero (3) Hoja de planta crecida *in vitro* (4) Raíz de planta crecida *in vitro* (5) Hoja infiltrada con tampón MES (6) Hoja infiltrada con tampón MES + 50mM JA (7) Hoja infiltrada con tampón MES + 1mg/L NAA. (\*) PCR control de muestra escogida al azar. Las flechas azules indican bandas SSAP sólo presentes en muestras de raíz de planta de invernadero. Las flechas rojas indican banda SSAP específica de raíz *in vitro*. Las flechas verdes indican bandas presentes en todas las muestras pero con mayor intensidad en raíz *in vitro*. Se indica a la izquierda algunos tamaños en pb.

### **C.2 Análisis de las zonas flanqueantes a CIRE1**

Aunque en general en las muestras procedentes de hoja no observamos bandas diferenciales entre ellas producto de una movilización reciente de CIRE1, el DNA de las bandas que aparecen en todas las condiciones nos aporta también información de las regiones adyacentes al elemento insertado. Por tanto el estudio de estas secuencias nos puede dar información acerca de si existe preferencia de inserción de este RTN-LTR en ciertas secuencias o regiones del genoma. Se quiere saber si las copias de CIRE1 están localizadas en regiones codificantes o bien en zonas repetitivas o insertadas en otros RTN. Por ejemplo, analizando una región de 282 kb alrededor del locus *Ctv* (resistencia al virus de la tristeza de cítricos) en *Poncirus* se han predicho hasta 8 RTN agrupados en sólo 119 kb (Yang et al., 2003).

En concreto, las bandas son recuperadas del gel de poliacrilamida teñido con plata (ver Material y Métodos), y el DNA contenido en ellas se clona, secuencian y analiza en busca de similitudes con secuencias conocidas. Se confirma por análisis de secuencia la autenticidad de 9 DNAs, de 11 recuperados, como específicos de CIRE1 y por tanto pertenecientes a eventos de transposición, mediante PCR directa con los cebadores complementarios a la LTR de CIRE1 (Oligo13) y a la secuencia del adaptador (cebador Ttg), diseñados para el experimento de SSAP.

El análisis de estas secuencias muestra un contenido nucleotídico medio de 60% AT y 40% GC, especialmente alto en T. En general, los genes presentan un alto porcentaje en GC por tanto podría hipotetizarse que la secuencia flanqueante al elemento no pertenece a una secuencia codificante. Al realizar comparaciones de secuencias con las bases de datos (GenBank) mediante BLASTN y BLASTX no obtenemos similitudes claras con ninguna secuencia, por lo cual no hemos podido identificar la naturaleza de la región de inserción de CIRE1.

## **1. CARACTERIZACIÓN DE RTN-LTR EN EL GENOMA DE CITRUS SINENSIS**

Tanto en animales como en plantas, los RTN son los componentes mayoritarios del DNA repetitivo disperso en su genoma (Kumar y Bennetzen, 1999). Estos elementos tienen el potencial para alcanzar un número de copias muy elevado dado el tipo de transposición replicativa que presentan (Pearce y Harrison, 1996; SanMiguel et al., 1998), llegando a ocupar en ocasiones hasta el 60% del DNA nuclear de algunas plantas, como en maíz. Diversos estudios han demostrado la ubicuidad de los RTN-LTR (Voytas et al., 1992; Flavell et al., 1992; Suoniemi et al., 1998) caracterizados en multitud de especies abarcando todo el reino vegetal.

### **1.1 Amplificación eficaz de poblaciones de RTN-LTR en *Citrus sinensis* usando cebadores degenerados**

En plantas, la caracterización de poblaciones de varias familias de RTN-LTR tipo *copia* se ha realizado siguiendo la estrategia de amplificación por PCR con cebadores degenerados y análisis de secuencia de fragmentos del gen *rt* (Voytas et al., 1992; Flavell et al., 1992). Así por ejemplo, se ha descrito la amplificación selectiva de RTN-LTR tipo *copia* en cebada (*Hordeum vulgare*) y trigo (*Triticum aestivum*) (Gribbon et al., 1999), en coníferas (Friesen et al., 2001), en el género *Vicia* (Pearce et al., 1996), en *Ipomoea batatas* L. (Villordon et al., 2000), en tomate (*Lycopersicum chilense*) (Yañez et al., 1998), entre muchos otros.

De la misma manera, se aplica también la técnica de PCR mediante cebadores degenerados complementarios a dominios de la RT y de la integrasa, en este orden concreto, para la amplificación selectiva de RTN-LTR tipo *gypsy* (Suoniemi et al., 1998), habiendo ejemplos en tomate (*Lycopersicum spp.*) (Su & Brown, 1997), pino (*Pinus spp.*) (Kossack et al., 1999), arroz (*Oryza sativa*) (Kumekawa et al., 1999), *Lilium* (Smyth et al., 1989), entre otros.

En este trabajo se ha probado la eficacia de estos cebadores degenerados para amplificar específicamente elementos tipo *copia* o *gypsy* del genoma de *Citrus sinensis*. Se han elegido cebadores degenerados para amplificar el máximo número posible de RTN-LTR diferentes de ambos tipos. En nuestro caso, mientras que la amplificación selectiva por PCR de elementos *copia* da una banda única clara, la amplificación de RTN-LTR tipo *gypsy* en el genoma del naranjo resulta en un patrón de bandas múltiple, igual al observado en *Citrus clementina* (Bretó et al., 2003). Vemos también que la diversidad nucleotídica en la región de la RT en los RTN-LTR tipo *gypsy* ( $\pi$ : 0,38) es un poco más elevada que en los tipo *copia* (0,34). Se ha visto que la amplificación de elementos *gypsy* en *C. sinensis* resulta en general menos eficiente en relación a la



amplificación de elementos *copia*. Esto mismo han observado otros grupos al aplicar esta aproximación de amplificación por PCR sobre otras especies, y consideran que la mayor heterogeneidad de las secuencias pertenecientes al tipo *gypsy* dificulta mucho el diseño de cebadores degenerados y por tanto su aplicación para amplificar un gran número de este tipo de elementos (RTN-LTR *gypsy*) diferentes (Friesen et al., 2001; Su & Brown, 1997). Comentar también que el menor tamaño de los fragmentos amplificados con los cebadores tipo *copia* (270 pb) favorece su amplificación en relación a los fragmentos más largos de tipo *gypsy* (1500 pb) que se amplificarán menos eficientemente.

### **1.2 Conservación a nivel de secuencia de los dominios funcionales en los fragmentos de retroelementos amplificados**

Se confirma claramente que los fragmentos de RTN obtenidos del genoma de *C. sinensis* cumplen los estándares de conservación de los motivos estructurales esperados para RTN-LTR típicos y que presentan elevadas similitudes con las secuencias de RTN-LTR ya descritos y presentes en las bases de datos. Observamos que el 61% de los clones CoSi (Copia RTN C.sinensis) presentan una pauta de lectura continua y con motivos funcionales conservados en el fragmento del gen *rt* secuenciado. En aproximaciones similares realizadas en *Ipomoea batatas* (L.) Poir. se observa que sólo el 42% de los clones obtenidos presentan una pauta de lectura única no interrumpida (Villordon et al., 2000). El porcentaje encontrado en *C. sinensis* confirma el alto grado de conservación de secuencia de esta región en los RTN-LTR tipo *copia* de su genoma, reforzando la posibilidad de que puedan ser activos de forma autónoma.

En lo que respecta a RTN-LTR tipo *gypsy*, en todos los clones GySi (Gypsy RTN C.sinensis) secuenciados se ve una clara conservación a nivel de secuencia, preferentemente en los dominios funcionales de la integrasa o la RT, pues presentan los motivos conservados descritos en la literatura como esenciales para la actividad de estos RTN (Suoniemi et al., 1998) sin embargo, la mayoría presentan alguna mutación del tipo inserción/delección por lo que fue necesario hacer cambios en la pauta de lectura para que las secuencias aminoacídicas deducidas conceptualmente se pudieran alinear con secuencias de RTN-LTR tipo *gypsy*. Únicamente GySi9 presenta una hipotética pauta de lectura continua y no interrumpida por codones de parada en las 1600 pb secuenciadas (supone el 11% de los clones GySi), lo cual sugiere que es el único candidato a ser un elemento funcional autónomamente de los clones tipo *gypsy* obtenidos. El resto corresponden a copias con mutaciones que derivan en proteínas no funcionales y que podrían actuar sólo como elementos no autónomos. Destacar que muchas de las secuencias nucleotídicas de RTN-LTR obtenidas de genomas vegetales presentan también más de un salto en la pauta de lectura para ser traducidas conceptualmente a secuencias aminoacídicas típicas de RTN (Flavell et al., 1992; Hirochika y Hirochika, 1993; Gribbon et al., 1999).

Mediante la estimación de la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) de los dominios funcionales de los elementos GySi clonados, utilizando el método de kimura 2-parametros entre pares de secuencias comparadas, se ha confirmado que la región de la RT está más conservada a nivel de secuencia que la integrasa, tal y como está descrito en la literatura (Dootlitt et al., 1989).

### **1.3 Descripción de las poblaciones de RTN-LTR presentes en *Citrus sinensis***

Del análisis de las secuencias obtenidas pertenecientes a RTN-LTR podemos concluir que la población de retroelementos en *C. sinensis* se divide en como mínimo 7 familias de RTN-LTR tipo *copia* (CIRE1-CIRE7) y 6 familias de tipo *gypsy* (GySiA-GySiF) diferentes. El número de familias tipo *copia* obtenidas es similar al visto en aproximaciones similares en *Iponema batatas* (5 familias, IBRT1-IBRT5) (Villordon et al., 2000) o *Lycopersicum chilense* (4 familias, TLC1-TLC4) (Yañez et al., 1998). Los niveles de divergencia de las secuencias aminoacídicas entre las familias tipo *copia* definidas en este trabajo van desde el 28% (entre CIRE4 y CIRE5) hasta el 55,6% (entre CIRE2 y CIRE7), valores similares a los vistos en *L. chilense* donde TLC1 y TLC2 presentan un nivel de heterogeneidad aminoacídica del 33,3%, mientras que TLC2 y TLC3 tienen un nivel de diversidad mayor (57,3%) (Yañez et al., 1998). El número de familias tipo *gypsy* definidas en experimentos similares en tomate es de 6, con niveles máximos de identidad nucleotídica del 63% (Su y Brown, 1997). En *C. sinensis* también son 6 las familias *gypsy* definidas pero en este caso, son algo más heterogéneas (identidad nucleotídica máxima del 30% entre GySiD y GySiB en la región de la RT). Los niveles de diversidad observados son lo suficientemente altos como para indicar que no es una variabilidad artefactual debida a errores de la propia técnica, sino fruto de la presencia de diferentes familias en el genoma.

También se observa que ciertas familias de RTN-LTR de *C. sinensis* [Eucariota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; rosids; eurosids II; Sapindales; Rutaceae; Citrus] se muestran más próximas a elementos de especies diferentes que a elementos de familias de la propia especie. Por ejemplo, elementos de CIRE2 presentan una identidad nucleotídica media del 85% con *panzee* de *Cajanus cajan* [Eucariota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; rosidae; eurosids I; Fabales; Fabaceae; Papilionoideae; Phaseoleae; Cajanus] y del 63% con elementos de CIRE7. Que CIRE2 se parezca más a *panzee* que a otros RTN-LTR tipo *copia* de naranjo, se podría explicar por la presencia de un antecesor común de ambos antes de la divergencia de *C. cajan* y *C. sinensis*. La comparación entre CIRE2 y *panzee* se trata de una comparación ortóloga (cuando la similitud deriva de una ascendencia común, por relación vertical) que nos indica que los RTN-LTR existían en pasos muy tempranos de la evolución.

## Discusión

---

El análisis de las secuencias obtenidas refleja cierta heterogeneidad entre los RTN-LTR presentes en el genoma del naranjo. Esta variabilidad de secuencia es típica entre los RTN-LTR de plantas (Friesen et al., 2001; Gribbon et al., 1999; Pearce et al., 1996), así que *Citrus sinensis* no es una excepción. En *Drosophila* o levadura en cambio los grupos de RTN-LTR son mucho más homogéneos (Flavell et al., 1992).

En general, el diseño de los cebadores para la reacción de PCR determina la población de RTN-LTR que se van a obtener. Estarán desfavorecidos en la amplificación aquellos elementos poco abundantes o aquellos cuya secuencia de unión al cebador haya divergido de la secuencia escogida para el diseño de los cebadores. Pero, teniendo en cuenta que la misma combinación de cebadores utilizada en este trabajo ha permitido amplificar selectivamente poblaciones de RTN-LTR tipo *copia* o de tipo *gypsy*, respectivamente, y en especies muy dispares tanto de angiospermas como gymnospermas (Flavell et al., 1992; Suoniemi et al., 1998), podemos confiar en que la amplificación realizada en este trabajo aun siendo no óptima (ya que el número de secuencias analizadas podría ser mayor sobretodo en el caso de elementos tipo *gypsy*) es global y que el conjunto de elementos de ambos tipos es representativa de los RTN-LTR presentes en el genoma de *C. sinensis*. No obstante, en este estudio no se ha pretendido realizar un análisis exhaustivo de las secuencias de los retroelementos presentes en el genoma de *C. sinensis*, sino una aproximación al tipo de representación que tienen los RTN-LTR en naranjo.

### 1.4 Contribución de los RTN-LTR al genoma de *Citrus sinensis*

Para conseguir una visión lo más global posible de la importancia a nivel cuantitativo de los RTN-LTR en el genoma de *C. sinensis* se ha estimado mediante análisis por hibridación *Slot-blot* el número de copias total de RTN-LTR tipo *copia* y *gypsy*, tal y como se describe en la bibliografía (Aledo et al., 1995; Pearce et al., 1996; García-Martínez y Martínez-Izquierdo, 2003).

Los valores experimentales dan una estimación total de aproximadamente 15.000 copias de RTN-LTR que corresponden alrededor del 23% del genoma de *C. sinensis*. Este cálculo se ha realizado considerando tamaños medios para los RTN-LTR tipo *copia* de 5 kb y para *gypsy* de 8 kb. Si consideramos solamente el fragmento amplificado y no extrapolamos al elemento entero, la población total de fragmentos de la RT de 270 pb de RTN-LTR tipo *copia* (estimado en aproximadamente 10.000 copias) representa el 0,71% del genoma de *C. sinensis* mientras que la población total de fragmentos de 1500 pb que comprenden una zona entre la RT y la INT de RTN-LTR tipo *gypsy* (estimado en 5.000 copias) ocupan el 1,96% del genoma de naranjo. Esto nos da un valor de 2,67% del genoma ocupado únicamente por fragmentos de la RT o RT-integrada, valor por si mismo también elevado. En *Vicia faba* el 2% del genoma lo ocupan fragmentos de 250 pb de la RT de RTN-LTR tipo *copia* (Pearce et al., 1996).

En la determinación del número de copias total de RTN-LTR se han utilizado unas condiciones experimentales que permiten llegar a un equilibrio entre la posible sobreestimación debida a que las regiones amplificadas usadas como sonda están muy conservadas en los diferentes retroelementos, y la posible infravaloración del número de copias debida al caso de que copias que hayan acumulado mutaciones en esta región no estén siendo consideradas en la estimación.

En *Saccharomyces cerevisiae* el 3% del genoma lo ocupan 5 familias de RTN-LTR (Kumar y Bennetzen, 1999), en *Arabidopsis* el 4% del genoma está constituido por RTN-LTR divididos en un total de 70 familias (EUROPEAN UNION ARABIDOPSIS GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 1999) y en maíz hay hasta 100 familias de RTN-LTR que llegan a ocupar más del 60% del genoma de la especie (SanMiguel et al., 1998). Los elementos *gypsy* representan el 3% del genoma de cebada, distinguiéndose 4 familias de elementos, estando presente el más abundante en 7.000 copias (Vershinin et al., 2002), mientras que el 5-10% del genoma lo ocupa la familia *BARE1* de RTN-LTR tipo *copia* (Vicient et al., 1999). El 8% del genoma de tomate (*L. esculentum*) está constituido por elementos tipo *gypsy* agrupados en 6 familias diferentes (Su y Brown, 1997). Dos familias de elementos *gypsy* (IRRE) constituyen el 6-10% del genoma de *Iris* (Kentner et al., 2002). En este trabajo se ha visto que el 13,2% del contenido genómico de *Citrus sinensis* son elementos *copia* y hemos identificado como mínimo 7 familias diferentes, mientras que el 10,5% del genoma está ocupado por elementos *gypsy* divididos en como mínimo 6 familias diferentes.

Por tanto aunque la contribución de los RTN-LTR (porcentaje del genoma y número de familias) en las diferentes especies es muy particular de cada vegetal, los resultados obtenidos en este trabajo en *Citrus sinensis*, muestran un porcentaje del genoma correspondiente a RTN-LTR elevado y un número de familias tipo *copia* y *gypsy*, equiparable a estudios realizados en otras especies vegetales (Navarro-Quezada et al., 2002).

Se confirma que los RTN-LTR están altamente repetidos en el genoma de *C. sinensis*, y que los tipo *copia* son más abundantes que los *gypsy* en esta especie, lo contrario sucede por ejemplo en *Cumumis melo* (melón) (Ramallo, 2005). Por la bibliografía se conoce que el número de bandas IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*) obtenidas a partir de elementos *copia* (Bretó et al., 2001) es 2 y 4 veces superior al número de bandas IRAP obtenidas de elementos *gypsy* en *C.aurantium* y *Poncirus* respectivamente (Bernet et al., 2003) lo cual sugiere también que los elementos *gypsy* son menos abundantes que los *copia* en estas especies de la misma familia Rutaceae.

### **2. UN NUEVO RTN-LTR TIPO COPIA DEL GENOMA DE NARANJO: CIRE1**

Se ha conseguido secuenciar un nuevo elemento CIRE1 a partir de una secuencia parcial de 266 pb combinando PCR inversa y PCR directa sobre DNA genómico de hoja de *Citrus sinensis* variedad "Valencia late". De una manera similar se ha obtenido también, por ejemplo, la secuencia del RTN-LTR tipo *gypsy RIRE3* (Kumekawa et al., 1999a).

La denominación de CIRE (CITrus RETrotransposon) se ha realizado siguiendo el mismo criterio aplicado para nombrar otros RTN-LTR de plantas, como RIRE de arroz (rice) (Nakajima et al., 1996), BARE de cebada (barley) (Manninen et al., 1993) o OARE de avena (oat) (Kimura et al., 2001). CIRE1 pertenece a una de las familias mayoritarias de RTN-LTR tipo  *copia* de naranjo descritas en este trabajo siendo además la familia que muestra una variabilidad nucleotídica ( $\pi$ ) más baja entre sus miembros.

Se ha conseguido amplificar diferentes fragmentos de CIRE1. El porcentaje de divergencia de las secuencias correspondientes al dominio interno es menor al porcentaje de divergencia de las secuencias de las LTR correspondientes. Este hecho es normal ya que las LTR son una de las regiones más variables de los RTN-LTR al no estar sometidas a presiones selectivas funcionales tan fuertes como las regiones codificantes (Vernettes et al., 1998). Los valores de porcentaje de divergencia encontrados (mayor de 0,3%) son superiores a los que encontraríamos por cambios atribuidos a la técnica de PCR (0,16%). Esto significa que los fragmentos obtenidos no derivan de una única copia, sino que se han originado de diferentes copias del RTN-LTR CIRE1 presentes en el genoma de naranjo. Por otra parte, las LTR5' de los clones difieren como máximo en un 3,2%. Este porcentaje de divergencia es tan bajo que permite asegurar que efectivamente se trata de copias diferentes de un mismo RTN. Para RTN-LTR como *BARE1* se ha visto que la divergencia entre las LTR de clones diferentes es del 6-8% (Manninen y Shulman, 1993).

#### **2.1 Análisis de los motivos estructurales y funcionales de CIRE1**

Para analizar extensamente la secuencia de CIRE1, se han considerado dos clones que contienen largos segmentos de CIRE1 que son contiguos, y que por si solos incluyen toda la longitud del RTN-LTR, incluidas las dos LTR. No ha sido posible obtener y clonar a partir de una única amplificación todo el elemento entero, con la diana duplicada a ambos lados del mismo. Se ha podido definir el inicio de la LTR5' dada la presencia de repeticiones invertidas cortas típicas de las LTR de RTN-LTR en los extremos de 3 pb (TGT..ACA), aunque si no se tiene en cuenta el cuarto nucleótido, la repetición invertida llegaría a ser de hasta 8 pb (TGTGAAGA....TCTTAACA).

La secuencia del PBS (12 nucleótidos) de CIRE1 es 100% complementaria a la secuencia 3'OH terminal del tRNA para metionina, que se utiliza como cebador de la primera cadena de cDNA en gran parte de los RTN-LTR caracterizados (**Tabla IV de Introducción**).

Estructuralmente CIRE1 es un RTN-LTR tipo *copia* típico (**Figura 35 de Resultados**). Presenta en una misma pauta de lectura la región del gen *gag* con dominio de unión al RNA, y la región del gen *pol* que codifica los dominios de proteínas funcionales 5'-PR, INT, RT, RH-3', en este orden concreto. Estos dominios están en el mismo orden en los RTN-LTR tipo *copia* (Voytas et al., 1992). Comparaciones de la secuencia de CIRE1 con *Tnt1* (Grandbastien et al., 1989), *BARE1* (Manninem y Shulman, 1993), *Tto1* (Hirochika et al., 1996), *RIRE1* (Sasaki et al., 2002), *Ta13* (Komieczny et al., 1991), *Tlc1* (Ruiz-Lara et al., 1999), y *copiaDM* (Mount et al., 1985), reflejan un elevado grado de identidad aminoacídica indicando que CIRE1 presenta regiones estructurales y funcionales comunes a los RTN-LTR tipo *copia*, similitudes que incluyen diversos dominios altamente conservados en RTN y retrovirus. Por regiones, la identidad de secuencia aminoacídica de CIRE1 respecto a otros RTN-LTR como *Tnt1* es mayor en el dominio de la RT (53%), disminuye para la INT (48%), algo menor para la PR (38%) y es más baja en la zona que codifica para el gen *gag* (36%). Este resultado es consistente con la bibliografía que describe el gen *gag* como el dominio menos conservado entre distintos RTN (Vershinin et al., 1999; Jääskeläinen et al., 1999) y la RT como el que presenta mayor similitud en distintos RTN (Xiong y Eickbush, 1990).

CIRE1-1 conserva en su secuencia y en una única pauta de lectura, sin interrupciones por codones de parada, todos los motivos considerados importantes para cada una de las regiones típicas de los dominios proteicos de un RTN-LTR tipo *copia*. Observamos sin embargo, que algunos de los otros clones del RTN-LTR secuenciados a lo largo de este trabajo presentan en la región del elemento que codifica para la integrasa una mayor proporción de codones de parada en su secuencia, así como alguna mutación puntual en el motivo DD<sub>35</sub>E del centro activo enzimático (Suoniemi et al., 1998). Estos datos indican que algunas de las copias del RTN-LTR CIRE1 presentes en el genoma de naranjo habrían perdido la capacidad para codificar una integrasa funcional. Las enzimas implicadas en la replicación de los RTN-LTR (RNA polimerasa y Transcriptasa inversa, RT) no tienen capacidad de reparación de errores, por lo que la replicación de un RTN-LTR puede generar una población de secuencias muy parecidas pero diferentes entre si, que asemejan las poblaciones de "quasispecies" descritas para virus de RNA (Casacuberta et al., 1995), además cada copia concreta del RTN acumula mutaciones en el genoma a una tasa neutra tras su integración. Es de esperar entonces, que la variabilidad debida a estas mutaciones sea al azar y se distribuya por igual por todo el elemento, pero nuestros resultados indican una mayor concentración de cambios no sinónimos en una región del elemento en concreto (la integrasa). Se ha descrito en el

caso de *BARE1* una situación similar donde la acumulación de mutaciones que dan lugar a codones de parada se localizan en un dominio del RTN-LTR, en este caso la zona del gen *gag* (Vicient et al., 2005).

El análisis filogenético de CIRE1 realizado a partir del alineamiento de las secuencias aminoacídicas de todo el dominio interno de diferentes RTN-LTR (**Figura 38 de Resultados**) sitúa a CIRE1 claramente dentro de los RTN-LTR tipo *copia*. Este análisis ha permitido observar la separación en dos grupos de los elementos tipo *copia* de especies monocotiledóneas (arroz, cebada y maíz) y dicotiledóneas (tabaco, tomate, arabidopsis y naranjo), demostrando ser mejor sistema, aunque no el óptimo, para inferir relaciones filogenéticas a nivel de clones entre las especies que contienen los RTN-LTR, que utilizar en el alineamiento únicamente la región de la RT, altamente conservada en todos los RTN-LTR tipo *copia*.

### 2.2 Contribución de CIRE1 al genoma de *Citrus sinensis*

Se ha confirmado por PCR utilizando diferentes combinaciones de cebadores, que las copias de CIRE1 están en su mayoría íntegras en el genoma de *C. sinensis* y que no presentan inserciones o deleciones importantes en su secuencia. Este resultado es consistente con el de número de copias por genoma haploide estimadas por *Slot blot*, pues se obtienen un número de copias equivalente de las diferentes regiones del elemento (**Figura 39 de Resultados**), aunque con el dominio *gag* se obtiene un menor número de copias (más representativo del número de copias del elemento) que con la RT, al estar la región de la RT más conservada en los diferentes RTN-LTR.

Según nuestras estimaciones la familia de CIRE1 presenta aproximadamente 2.200 copias por genoma haploide en *C. sinensis*, lo que representa el 2,9% del contenido genómico del naranjo, valor similar aunque menor al 5-10% del genoma que ocupa la familia *BARE1* en cebada (Vicient et al., 1999). CIRE1 no comparte sin embargo con *BARE1* su elevado número de solo-LTR (*BARE1* sobrepasa en 7-42 veces la esperada relación LTR:dominio interno de 2:1) (Vicient et al., 1999) pues la mayor parte de los elementos CIRE1 en *C. sinensis* tienen 2 LTR por dominio interno para todas las sondas utilizadas: *gag*, INT y RT. Tal y como se deduce de la relación entre las copias de LTR y dominio interno (que para CIRE1 es prácticamente 2:1) en el genoma de naranjo no se habrían producido de una manera significativamente importante reordenamientos y recombinaciones homólogas desiguales entre las LTR de CIRE1, procesos que dan paso a la formación de solo-LTR. Una pequeña pérdida de elementos por recombinación homóloga entre las LTR nos podría estar indicando que éstos están localizados en zona heterocromática, donde la recombinación es mínima (es más frecuente que el dominio interno de los elementos se pierda por recombinación si ocupan regiones ricas en genes, pues aquí la transcripción es más activa y también la recombinación). También se ha visto que genomas de cebada sometidos a condiciones altas de sequedad son menos

eficientes en eliminar los elementos *BARE1* mediante recombinación, habiendo un menor número de solo-LTR en estas condiciones estresantes (Wendel y Wessler., 2000). Una situación similar a la de CIRE1 es la descrita para el RTN-LTR *Grande1* de maíz (García-Martínez y Martínez-Izquierdo, 2003), en el que la relación LTR:dominio interno es también 2:1, y donde se concluye que la actividad de recombinación homóloga entre las LTR del RTN podría ser dependiente de genoma y/o retrotransposón. En este sentido, puede ser que CIRE1, con un elevado número de copias en el genoma de naranjo, haya sido un RTN que se ha expandido recientemente y que no haya habido tiempo a que se elimine el dominio interno por recombinación homóloga entre LTR.

### **2.3 Presencia de CIRE1 en otras especies vegetales**

La presencia de CIRE1 se ha investigado en otras especies vegetales además de naranjo, especie donde fue obtenido. Se ha detectado por *Southern blot* la presencia de CIRE1 en otras especies de *Citrus* así como en otras rutáceas como *Fortunella margarita* o *Poncirus trifoliata*. Estos experimentos sugieren que CIRE1 estaba presente en la familia Rutaceae en estadios tempranos de su especiación. No se ha detectado en cambio hibridación cruzada con los genomas de otras especies de monocotiledóneas y dicotiledóneas como *Arabidopsis thaliana*, *Cucumis melo*, *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum*, *Oryza sativa* o *Zea mays*. De la misma manera que CIRE1, el RTN-LTR tipo copia de tabaco *Tnt1* está presente también en otras solanáceas como patata y tomate pero no en especies de otras familias (Grandbastien et al., 1989). También se ha detectado la presencia del RTN-LTR tipo *gypsy Grande1* de maíz en otras especies de género *Zea* y también en géneros próximos como *Tripsacum* (Vicent, 1995; Gómez, 2002).

La eficiencia de la amplificación por PCR selectiva de las secuencias pertenecientes a CIRE1 en los distintos genomas de especies vegetales fuera de la familia Rutaceae (**Figura 41 de Resultados**), indican tanto la abundancia del RTN-LTR como la relativa elevada conservación de las secuencias de los distintos dominios que corresponden a los cebadores utilizados en la PCR. Así, los cebadores utilizados para amplificar la región de la INT y RT son complementarios a zonas altamente conservadas en los distintos RTN-LTR (Voytas et al., 1992; Flavell et al., 1992; Suoniemi et al., 1998) y por ello no es extraño que se de amplificación, originando un fragmento de tamaño algo diferente que puede corresponder a un elemento distinto a CIRE1, de manera que aunque las regiones que corresponden a los cebadores están conservadas, el resto de elemento sea diferente de unas especies a otras. Apoyando esta interpretación estaría la no amplificación con los cebadores del gen *gag* debido a la baja similitud que se espera de esta región dado que este gen es, junto al gen *env*, uno de los que cambia más rápidamente dentro de los que codifican proteínas retrovirales (Dootlitt et al., 1989). Para confirmar este punto, se haría necesario secuenciar los fragmentos generados para determinar el nivel de similitud con CIRE1.



### 2.4 Funcionalidad del Promotor de la LTR de CIRE1

Los RTN-LTR se transcriben a partir de un promotor interno presente en la región U3 de los LTR, en concreto de la LTR5', donde se encuentran secuencias reguladoras en *cis* que controlan los patrones de expresión del elemento en el genoma huésped (Kumar y Bennetzen, 1999).

La región comprendida en los primeros 240 pb del dominio U3 de la LTR en *Tnt1* contiene la mayoría de elementos responsables para la expresión asociada a defensa (Casacuberta y Grandbastien, 1993; Mhiri et al., 1997; Vernhettes et al., 1997; Grandbastien et al., 1997). En el dominio U3 de la LTR5' de CIRE1 existen motivos de secuencia que se han descrito como señales de respuesta a factores ambientales (*PlantCARE*database y *PLACE*database). Tanto el resto del dominio U3, que contiene las cajas estándares (como la caja TATA) descritas para los promotores de genes de plantas, como todos los motivos mencionados arriba, están altamente conservados en los diferentes clones del RTN CIRE1 obtenidos en este trabajo (**Figura 32 de Resultados**).

Se ha analizado la funcionalidad del promotor de CIRE1 mediante experimentos de expresión transitoria. Para ello se han bombardeado diferentes sistemas vegetales con una construcción que contiene el gen informador *gus* bajo la secuencia completa de la LTR5' que contiene el hipotético promotor de CIRE1. Se observa que la LTR5' es capaz de dirigir la expresión del gen *gus* al bombardear células de cebolla en todas las condiciones probadas (medio MS control; MS + 50  $\mu$ M o 0,3mM de ácido jasmónico (JA); MS + 1mg/L ácido naftalenacético (NAA); MS + 2,5 mg /L 2,4 D; MS + 2mM ácido salicílico) aunque a niveles muy bajos. La baja inducción observada en el medio MS control podría deberse al proceso de bombardeo en si mismo que induce una respuesta a herida en las células vegetales (Beguiristain et al., 2001). En el tratamiento con la auxina NAA se observa un incremento claro de la actividad GUS respecto a las células mantenidas en el medio MS control, probablemente debido a una inducción del promotor de CIRE1 en respuesta a la hormona.

También se observa actividad de GUS dirigida por el promotor de la LTR5' de CIRE1 al bombardear suspensiones de tabaco W38. Para realizar las suspensiones de tabaco, las células se mantienen en medio líquido suplementado con fitohormonas (NAA y kinetina). Existen ejemplos de otros RTN-LTR cuyo promotor se activa en cultivos celulares (Pouteau et al., 1991; Beguiristain et al., 2001; Hirochika, 1993; Takeda et al., 1999; Hirochika et al., 1996). Según estos datos se puede deducir que la auxina NAA efectivamente incrementa la expresión dirigida por el promotor de la LTR5' de CIRE1, de la misma manera que se ha observado que algunas fitohormonas incrementan también la expresión de *Tnt1* (Casacuberta et al., 1995) y *Tto1* (Hirochika, 1993). Este incremento de la expresión transitoria del gen informador *gus* en medio

suplementado con NAA está en consonancia también con los resultados obtenidos en la RT-PCR de secuencias de transcritos de CIRE1 tras infiltrar discos de hoja de naranjo con esta misma hormona, tal y como se discute en el siguiente apartado.

Se ha mostrado también que la construcción que contiene la secuencia de la LTR5' de CIRE1 de naranjo también dirige la expresión en sistemas heterólogos como cebolla y tabaco, de igual manera que el promotor de *Tnt1* (de *Nicotiana tabacum*) es activo también en tomate y *Arabidopsis* (Mhiri et al., 1997) y el promotor de *panzee* (de *Cajanus cajan*) lo es en tabaco (Lall et al., 2002). Por tanto, parece ser que los factores involucrados en el control de la transcripción en RTN-LTR de plantas superiores son funcionales en otras especies vegetales independientemente del RTN de qué se trate.

### **2.5 Actividad transcripcional de RTN-LTR tipo copia en naranjo**

Para determinar la posible actividad transcripcional de elementos CIRE (Retrotransposones tipo *copia* de *Citrus*) se ha analizado por RT-PCR el RNA total de diferentes muestras de plantas de *C. sinensis*. Se han detectado transcritos correspondientes a la zona de la RT de RTN-LTR tipo *copia* en raíz de plantas jóvenes crecidas en invernadero pero no en hoja, situación similar a la vista en *Tnt1* de tabaco (Pouteau et al., 1991) u *Opie* de maíz (SanMiguel et al., 1996). Al analizar las secuencias de las familias de RTN-LTR tipo *copia* que se expresan en la raíz del naranjo, se ve que, ni todas las familias tipo *copia* definidas en este trabajo a partir de las secuencias genómicas tienen representantes transcripcionalmente activos en dicho tejido, ni todas las secuencias de transcritos analizados se corresponden con familias de secuencias genómicas definidas previamente en esta tesis. Estos resultados no son inesperados si se tiene en cuenta el elevado número de RTN-LTR tipo *copia* presentes en naranjo (unas 10.000 copias por genoma haploide) y el número de clones secuenciados al azar, necesariamente limitado en un trabajo de estas características.

El estudio de la variabilidad de las secuencias de los transcritos obtenidos en la RT-PCR sobre RNA de raíz y de las secuencias de DNA genómico muestra valores de variabilidad nucleotídica ( $\pi$ ) muy similares en ambos casos, aunque ligeramente mayor para el DNA genómico. Para *Tnt1* por ejemplo, también se observa una variabilidad de las secuencias genómicas superior a la variabilidad de las secuencias de los transcritos de elementos expresados en protoplastos (Casacuberta et al., 1995).

En las secuencias de los transcritos se observa un incremento en el porcentaje de codones de parada que interrumpen las ORF que codifican la RT, en relación a las secuencias de la misma zona amplificadas de DNA genómico. Una posible regulación a nivel post-transcripcional para controlar la cantidad de proteínas del RTN-LTR en la célula huésped podría explicar la elevada presencia de codones de parada en las secuencias de RNA. De todas maneras, la existencia y conservación de RTN no autónomos como los TRIM (Witte et al., 2001) y los LARD (Kalendar et al., 2004)

## Discusión

---

indican que la posesión de un dominio proteico funcional no es necesario para el éxito replicativo de un RTN-LTR.

La búsqueda realizada en las colecciones de EST de *C. sinensis* no detecta similitudes con ninguna secuencia de RTN-LTR. Este resultado no necesariamente se debe a un bajo nivel de transcripción de los RTN-LTR en dicha especie sino más bien a la baja representación que tienen las secuencias de transcritos de naranjo en las bases de datos. También es posible además que la colección de EST se haya obtenido secuenciando bibliotecas de cDNA generadas en tejidos, órganos, estados de desarrollo o de estrés biótico o abiótico diferentes a los tratados en este estudio (Rossi et al., 2001).

De los resultados obtenidos se deduce que hay una familia mayoritariamente activa en raíz (CIRE7) y que el 13% de los clones de RTN-LTR tipo *copia* secuenciados al azar corresponden a transcritos de la familia CIRE1. Resultaba interesante conocer si CIRE1, además de expresarse en raíz, es capaz de activarse también en hoja en otras circunstancias. Por ejemplo, *Tnt1* se expresa en raíces adultas a niveles bajos y aunque su RNA no se detecta en hojas su transcripción se activa con fuerza en protoplastos derivados de hoja (Pouteau et al., 1993; Casacuberta y Grandbastien, 1993). Esta activación bajo factores ambientales concretos o condiciones estresantes (como pueden ser la formación de protoplastos) es una característica común a la mayoría de RTN-LTR (Grandbastien et al., 1998; Wessler et al., 1996). Las condiciones de estrés pueden incrementar hasta 3 o 4 veces la proporción de RTN-LTR en poblaciones de RNA (Echenique et al., 2002). Dado que los resultados obtenidos en los ensayos de expresión transitoria señalan a las fitohormonas y la herida mecánica como posibles inductores de la activación de la transcripción de CIRE1, se investigó mediante RT-PCR la presencia de transcritos en muestras sometidas a estos mismos tratamientos.

Los transcritos de CIRE1 no se detectan en hoja en condiciones normales, en cambio la activación de su transcripción es patente en este tejido en respuesta a herida y tras la adición de las fitohormonas NAA y JA. Otros RTN-LTR caracterizados que aumentan también su transcripción en respuesta a herida son: *Tnt1* (Beguiristain et al., 2001), *OARE-1* (Kimura et al., 2001) o *Tto1* (Takeda et al., 1999). Asimismo, *Tnt1* (Beguiristain et al., 2001), *Tto1* (Hirochika et al., 1993) y *Tos17* (Hirochika et al., 1996) incrementan también su transcripción en cultivos celulares y *BARE1* (Suoniemi et al., 1996) en callo. Parece ser que en estos últimos casos (cultivos celulares y callo) lo que está activando la expresión del RTN-LTR son las hormonas vegetales suplementadas durante el proceso de cultivo. Se conoce que el estrés y los cambios ambientales son factores que pueden activar la expresión de los RTN (Grandbastien, 1998). El significado de esta modulación de la transcripción no está claro, pero si asumimos que el nivel de transcripción es el factor principal en el control de la transposición (Melayah et al., 2001), los RTN pueden jugar un papel en la generación de plasticidad genética de la

planta huésped en respuesta a estreses ambientales, a través de su amplificación por retrotransposición en el genoma vegetal produciendo por tanto diversidad genética.

No se ha podido detectar por *northern* la presencia de transcritos de CIRE1, lo cual indica que el nivel de transcritos de CIRE1 es normalmente bajo en esta especie bajo las condiciones ensayadas.

La correlación obtenida entre los resultados de RT-PCR y los de transformación, con la construcción que contiene el gen *gus* bajo el control del promotor de la LTR5' de CIRE1, sugieren que los motivos de la región del promotor que controla la transcripción de los elementos CIRE1, en respuesta a la aplicación exógena de auxinas (como el NAA) están efectivamente en su LTR5'; que por cierto contiene motivos que se han propuesto como de respuesta a auxinas (**Figura 44 de Resultados**). Por otra parte, la respuesta a herida y a la aplicación exógena de jasmonato de metilo que resulta en un incremento en el nivel de transcritos de CIRE1 en los experimentos de RT-PCR, es consistente con que la respuesta a herida depende de un complejo sistema de transducción de señales que implica interacciones entre diferentes moléculas, entre las que juega un papel importante el jasmonato de metilo (Reymond y Farmer, 1998). No obstante, es necesario confirmar estos resultados con experimentos, entre otros, de análisis funcional del promotor en plantas transgénicas sometidas a herida o tratamientos hormonales.

Este es el primer estudio que describe la presencia de RTN-LTR tipo  *copia* transcripcionalmente activos y también que la actividad transcripcional se incrementa en respuesta a factores ambientales y hormonas en el genoma de naranjo.

### **3. ANÁLISIS DE LA BIODIVERSIDAD EN EL GÉNERO CITRUS UTILIZANDO RTN-LTR**

Los cítricos tienen una biología reproductiva muy compleja que dificulta mucho los análisis taxonómicos del género. La aportación al conocimiento de los cítricos en esta segunda parte del trabajo, es la realización de un análisis de la biodiversidad dentro del género *Citrus* basándonos en el contenido de RTN-LTR de las diferentes especies. Análisis que incluye el estudio de las poblaciones de RTN-LTR presentes, en lo que se refiere a la heterogeneidad de secuencia de sus elementos y el porcentaje de genoma que ocupan. Asimismo, se procede al desarrollo y utilización de marcadores basados en RTN-LTR para inferir relaciones filogenéticas dentro de este género y géneros relacionados como *Fortunella*, *Microcitrus* y *Poncirus*.

#### **3.1 Descripción de las poblaciones RTN-LTR tipo copia presentes en cítricos**

Se ha investigado la presencia de RTN-LTR tipo *copia* en diez especies de cítricos comerciales y tres especies de géneros de la misma familia, tanto por PCR como por *Southern*. A partir del análisis de las secuencias de DNA de fragmentos de la RT amplificados por PCR se ha realizado el análisis filogenético de las familias CIRE (Citrus Retrotransposon) presentes en el genoma de diversas especies del género *Citrus* y *Poncirus*.

La filogenia a partir de la RT de los elementos CIRE no es consistente con la filogenia del género, sino que gran parte de las secuencias muestran poca variabilidad en todas las especies, aunque efectivamente algunos grupos de elementos se amplifican más eficientemente en unas especies que en otras (**Figura 60 de Resultados**). Este resultado nos estaría indicando que el ancestro común de estas especies de cítricos contenía ya una población heterogénea de RTN-LTR tipo *copia*, es decir que los RTN-LTR estaban presentes y se expandieron y diversificaron en diferentes familias antes de la separación del género *Citrus* en las distintas especies, tal y como se ha visto en otros géneros como *Nicotiana* (Vernhetes et al., 1998) o *Vicia* y *Pisum* (Pearce et al., 2000). El tipo de estudio realizado nos permite comparar y distinguir entre RTN de una misma familia que han evolucionado en paralelo en especies diferentes mediante relación vertical (comparaciones ortólogas), por tanto los identificamos como elementos similares en especies diferentes (podría ser el caso de CoSi14 de *Citrus sinensis* y CoMed3 de *Citrus medica* pertenecientes ambos a CIRE1) o bien elementos que habrían divergido en familias diferentes y que están presentes en una misma especie vegetal (comparaciones parálogas) (por ejemplo, CoSi14 perteneciente a CIRE1 y CoSi10 perteneciente a CIRE4, ambos de *Citrus sinensis*.). Este estudio en cambio, no es válido para inferir la filogenia del género *Citrus* pues de esta manera estaríamos realizando comparaciones en especies diferentes pero también entre familias de RTN-LTR

diferentes, haciendo por tanto comparaciones ortólogas y parálogas indistintamente. Además, la RT es una región muy conservada, incluso en elementos aislados de especies *a priori* alejadas, siendo por consiguiente una región poco adecuada para hacer estudios taxonómicos.

Por otra parte, las relaciones filogenéticas de un RTN-LTR en concreto y de su familia a lo largo del tiempo sí resultan válidas para inferir filogenias en el genoma huésped (Queen et al., 2004; García-Martínez y Martínez-Izquierdo, 2003; Pearce et al., 2000; Gribbon et al., 1999;). La filogenia del RTN-LTR refleja la historia evolutiva del retroelemento, que se explica tanto por transmisión vertical como horizontal. En lo que respecta a la transmisión vertical, hay que tener en cuenta que los cítricos comerciales utilizados en el estudio son especies muy jóvenes des del punto de vista evolutivo y por tanto habrá que escoger en el estudio regiones del RTN más variables que la RT que permitan una diversificación suficiente como para definir diferencias. Además, el género *Citrus* presenta una elevada hibridación inter- e intraespecífica, dato a tener en cuenta para valorar posibles transmisiones horizontales de los RTN-LTR entre genomas. Con todo, se ha utilizado la técnica SSAP a partir de una secuencia específica de la LTR hacia el genoma flanqueante para ver si la filogenia deducida a partir de los marcadores SSAP es concordante o no con la filogenia propuesta para el género, tal y como se discute más adelante.

Los resultados del *Southern* muestran que los elementos tipo *copia* CIRE1 están distribuidos por los genomas de *Citrus* y *Poncirus*, indicando nuevamente que posiblemente estos elementos estaban presentes ya antes de la divergencia entre ambos géneros y evolucionaron de forma independiente a partir de entonces; los datos aportados por Bernet et al. (2003) apoyan esta misma conclusión.

En el análisis filogenético de las secuencias obtenidas por PCR con cebadores degenerados se observa que la familia CIRE1 únicamente tiene representantes en los genomas de *C. clementina*, *C. aurantium* y *C. medica*, además de *C. sinensis* (**Figura 60 de Resultados**), y en cambio la presencia de CIRE1 está probada también en las demás especies tanto por *Southern* como por amplificación selectiva por PCR de las distintas regiones del elemento (**Apartado A.3.8 de Resultados**). Esta diferencia es, probablemente, consecuencia del número limitado de fragmentos secuenciados en el muestreo al azar, correspondientes al gen *rt* amplificado con cebadores degenerados en los diferentes genomas de cítricos. Además, la familia CIRE1 detectada por *Southern* o por cebadores específicos en todas las especies de cítricos analizadas, podría estar diferentemente representada entre el global de RTN-LTR tipo *copia* en los diferentes cítricos, lo que resultaría en un número diferente (para cada especie) de fragmentos amplificados por cebadores no específicos de la familia de RTN-LTR, como son los cebadores degenerados.

### 3.2 Contribución de los RTN-LTR tipo copia al genoma de especies del género *Citrus*

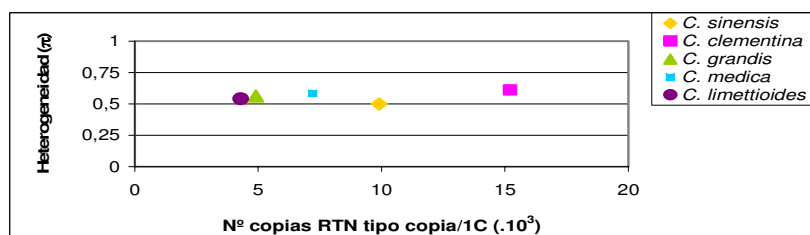
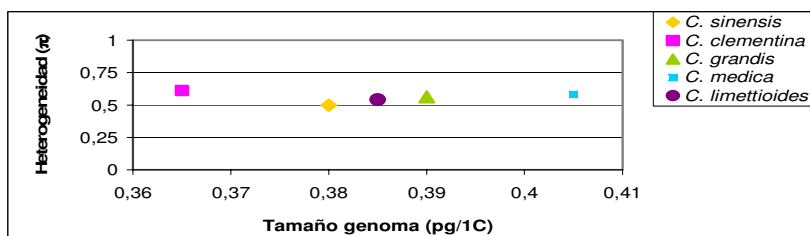
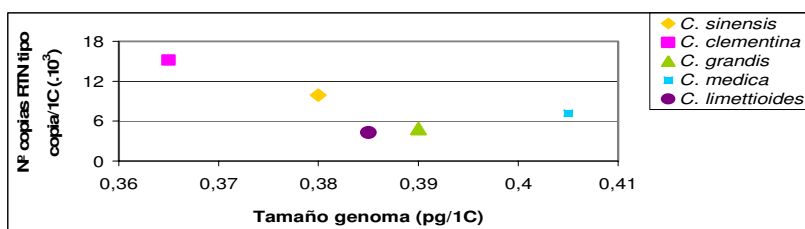
En la aproximación utilizada para el cálculo del número de copias total de RTN-LTR tipo copia en las distintas especies del género *Citrus* y especies de géneros próximos, se ha utilizado una misma sonda en la hibridación *Slot-blot* para todas las especies ya que, tal y como se ha visto al realizar el estudio de las poblaciones de RTN-LTR tipo copia presentes en los diferentes genomas, gran parte de las secuencias están conservadas en las distintas especies. Aun así, hay que tener en cuenta que la distancia genética del naranjo (divergencia de secuencia en relación a la sonda) puede generar números de copias artefactualmente bajos cuando es utilizada para estimar este dato en otras especies de *Citrus spp.* o géneros próximos. Este hecho explicaría la variabilidad observada en el cálculo de número de copias en algunas de las especies con el método utilizado. En este sentido, se ha observado una variabilidad parecida en la estimación del número de copias de IRRE al estimarlo en diferentes especies del género *Iris* (Kentner et al., 2003).

A pesar de esta variabilidad en la estimación del número de copias, por otra parte común cuando se calcula el número total de secuencias muy repetidas en los genomas, los resultados mostrados en este trabajo confirman efectivamente que los genomas de las trece especies del estudio contienen un elevado número de copias de RTN-LTR tipo copia incluidos en el rango de 4.000 copias (*Microcitrus inodora*) y 15.000 copias (*Citrus clementina*) por genoma haploide, que en *Citrus sinensis* suponen alrededor del 13% del genoma (**Figura 62 de Resultados**). Este elevado contenido en RTN-LTR tipo copia ha sido confirmado también mediante experimentos de *Southern blot*, que generan patrones de bandas con colas de hibridación (*smear*) muy claros (resultados no mostrados). Estudios previos sugieren ya que la elevada inestabilidad y heterogeneidad del género *Citrus* puede estar vinculada a una elevada contribución de los RTN al genoma (Liou et al., 1996).

Se postula que plantas con grandes genomas pueden albergar mayor número de RTN sin ver su supervivencia afectada (Smyth et al., 1993). Nuestros resultados, tal y como se ve en la siguiente **figura**, muestran que no hay una correlación clara entre el tamaño del genoma del huésped y el número de copias de RTN-LTR tipo copia que contienen, pues *Citrus clementina* que presenta el contenido más alto en RTN-LTR tipo copia es uno de los cítricos con menor contenido en DNA nuclear, mientras que *Citrus medica* que presenta el tamaño de genoma mayor tiene un contenido medio en RTN-LTR tipo copia. Sin embargo, aparte de la variabilidad comentada anteriormente inherente al método utilizado, hay que tener en cuenta que el estudio realizado es sólo sobre el contenido en RTN-LTR tipo copia así que, podría ocurrir que aunque el número de copias de este grupo en concreto no estuviera correlacionado con el tamaño del genoma, sí lo estuviera el número de copias total de los RTN-LTR (Pearce et al., 1996).

No observamos tampoco que haya una correlación clara entre el grado de heterogeneidad de las secuencias nucleotídicas del grupo de RTN-LTR tipo *copia* (definido por el valor  $\pi$ ) y el tamaño del genoma del huésped, igual que pasa en *Vicia spp.* (Pearce et al., 1996) o *Gossypium spp.* (Algodón) (Vanderwiel et al., 1993), pero sí vemos una correlación entre el número de copias y el valor de  $\pi$ , principalmente en *C. clementina*. No siempre hay una correlación directa entre la variabilidad de secuencia y el número de copias pues, tal y como se ha visto en *Arabidopsis*, hay también familias de elementos como *Tal* que aun siendo muy numerosos son muy homogéneas (Flavell et al., 1992).

	Tamaño del genoma (pg/1C)	Heterogeneidad ( $\pi$ )	Nº copias/1C ( $\cdot 10^3$ )
<i>C. sinensis</i>	0,38	0,499	9,9
<i>C. clementina</i>	0,365	0,612	15,2
<i>C. grandis</i>	0,39	0,563	4,9
<i>C. medica</i>	0,405	0,583	7,2
<i>C. limettioides</i>	0,385	0,542	4,3



Hasta el momento, no existía ningún dato publicado sobre el número de RTN-LTR tipo *copia* del genoma de cítricos, únicamente se había sugerido que eran especies con un contenido especialmente alto en estos elementos (Asíns et al., 1999).



### 3.3 Aplicación de la técnica SSAP basada en RTN-LTR para estudios filogenéticos dentro del género *Citrus*

La aplicación de los sistemas de marcadores basados en RTN-LTR en estudios filogenéticos vegetales está claramente demostrada en la literatura. Los métodos IRAP y REMAP a partir del RTN-LTR tipo *copia BARE1* generan suficientes polimorfismos como para distinguir incluso entre variedades de cebada así como para generar patrones diferenciales entre varias especies del género *Hordeum* (Kumar et al., 1999). La técnica SSAP consigue aumentar el nivel de polimorfismo genético en relación a los AFLP en *Pisum*, pues se ha visto que los marcadores basados en aproximaciones multi-RTN parecen estimar mejor las relaciones filogenéticas en el género *Pisum* que los AFLP, porque al basarse los cebadores en secuencias específicas de los RTN, son de esta manera altamente informativos, pues cada elemento tiene su propia historia transposicional (Pearce et al., 2000; Vershinim et al., 1999). Los SSAP demuestran ser mejor sistema que los AFLP o SSR también para detectar diversidad genética entre líneas comerciales de *Solanum lycopersicum* (tomate) y *Capsicum annuum* (guindilla) (Tam et al., 2005).

En lo que respecta al género *Citrus*, polimorfismos tipo IRAP basados en elementos tipo *copia* han demostrado ser útiles para distinguir entre variedades de *Citrus sinensis* (Asíns et al., 1999), *Citrus clementina* (Bretó et al., 2001) y *Citrus limon* (Bernet et al., 2003), demostrando ser más polimórficos que marcadores basados en SSR en estas especies (Bretó et al., 2001).

La detección en este trabajo de fragmentos de diferentes regiones del RTN-LTR tipo *copia* CIRE1 en otras especies de *Citrus* diferentes a la especie de la cual se ha obtenido el RTN-LTR (*Citrus sinensis*), indica el potencial para utilizar CIRE1 en estudios filogenéticos en cítricos. Se ha demostrado en la resolución de filogenias mediante SSAP, utilizando como cebador específico una región de la LTR de CIRE1, que los marcadores obtenidos generan mejores filogenias que los SSAP basados en una región de la RT obtenidos por Bretó et al. (2001), ya que la región amplificada con el cebador de la LTR es mucho más variable por ser genoma del huésped flanqueante al RTN-LTR que la región de la RT, y por tanto más informativa. Además, la técnica SSAP derivada de secuencias de RT resulta poco reproducible al contrario que en nuestro caso, aunque hay que puntualizar que el material vegetal del estudio y el análisis filogenético que se realiza en ambos casos es diferente.

Las diferentes agrupaciones que se obtienen en árboles derivados de marcadores tipo RAPD y SCAR (Nicolosi et al., 2000) son a grandes rasgos las mismas que se reflejan en nuestros árboles SSAP. La mayor diferencia es la inclusión o no de *Fortunella* dentro del género *Citrus*. El trabajo de Nicolosi et al. (2000) considera *Microcitrus* y *Poncirus* como géneros relacionados pero distantes del género *Citrus*, pero no puede separar a

*Fortunella* de *Citrus*, al igual que se concluye en Herrero et al. (1996) y Federici et al. (1998), en cambio en los árboles obtenidos a partir de marcadores SSAP en este trabajo *Fortunella* se sitúa separado del género *Citrus*. Este mismo resultado también se consigue con árboles filogenéticos basados en CpDNA (DNA cloroplástico) por Nicolosi et al. (2000). En lo que respecta *Microcitrus* y *Poncirus*, se sitúan separados de *Citrus* en uno de los árboles y no en el otro (**Figura 69 de Resultados**).

Barret y Rhodes (1976) sugieren que todas las variedades de cítricos cultivados derivan de tres especies "verdaderas". Nuestros resultados apuntan también en este sentido, ya que el cidro (*Citrus medica*), el pummelo (*Citrus grandis*) y el mandarino (*Citrus clementina* / *Citrus reticulata*) se sitúan en tres grupos diferentes dentro de ambos árboles UPGMA basados en marcadores SSAP derivados de zonas flanqueantes a la LTR de CIRE1.

El origen de los diferentes cítricos comerciales también suscita diversas hipótesis. El naranjo amargo (*Citrus aurantium*) está considerado un híbrido entre el pummelo (*Citrus grandis*) y el mandarino (*Citrus reticulata*/*Citrus clementina*). También el naranjo dulce (*Citrus sinensis*) está considerado un híbrido de estas dos especies, pero datos moleculares (Nicolosi et al., 2000) indican que provendrían de cruces diferentes. Los resultados aportados en este trabajo apoyan el parentesco de estas especies, dado que se agrupan muy próximas en los árboles derivados de marcadores SSAP, aunque el número de muestras analizadas no es suficiente para revelar relaciones de parentesco a niveles más profundos. Basándose en características morfológicas, Swingle (1943) consideró el limonero (*Citrus limon*) como un híbrido del cidro (*Citrus medica*) y la lima (*Citrus limettioides*). Más tarde, estudios moleculares determinan que posiblemente se originaron a partir del cidro y la naranja amarga (*C. aurantium*) (Nicolosi et al., 2000). Por otra parte, Barret y Rhodes (1976) sugirieron que la lima tiene un origen trihíbrido a partir del cidro, el pummelo (*Citrus grandis*) y alguna especie de *Microcitrus* pero con mayor proporción de genes del cidro debido a una introgresión adicional de esta especie. En este trabajo se confirma la estrecha relación entre *Citrus limon*, *Citrus limettioides* y *Citrus medica* pues se sitúan claramente en el mismo grupo con valores de *bootstrap* muy elevados en los árboles derivados de marcadores SSAP, en cambio nuestros resultados no apoyan la naturaleza trihíbrida de la lima ni el parentesco de *C. aurantium* con el limonero.

Como los árboles filogenéticos a partir de SSAP se basan en la actividad transposicional de RTN-LTR, estos elementos dan una elevada resolución en linajes donde han estado activos y relativamente baja resolución en aquellos donde han mantenido una baja actividad. En este punto sería muy informativo realizar nuevos experimentos SSAP utilizando un segundo elemento con el fin de comparar las relaciones filogenéticas inferidas y extraer conclusiones, tal y como se ha realizado en diversos genomas de cereales mirando la actividad de *BARE1* y *Thv20* (Gribbon et al., 1999).

### **4. APLICACIÓN DE LA TÉCNICA SSAP PARA LA DETECCIÓN DE LA MOVILIDAD DE RTN-LTR.**

Los RTN-LTR constituyen una parte significativa de los genomas de las plantas, pero su actividad transposicional en las especies actuales no está clara. El análisis de las secuencias de RTN-LTR descritas en la literatura muestra que una gran proporción de las secuencias de los RTN-LTR presentan cambios nucleotídicos que predicen proteínas no funcionales, sugiriendo que son elementos defectivos (Flavell et al., 1992; Voytas et al., 1992; Hirochika, 1993). Pero, hay RTN-LTR que se transcriben en tejidos de la planta huésped (Pouteau et al., 1991; Hirochika et al., 1996; Suoniemi et al., 1996; Pearce et al., 1997) e incluso hay elementos de arroz y tabaco que se movilizan en el genoma en cultivos celulares o protoplastos (*Tnt1*: Melayah et al., 2001; *Tto1*: Hirochika, 1993; *Tos17*: Hirochika et al., 1997). Polimorfismos de inserción (por SSAP) han permitido demostrar la existencia de una serie de RTN-LTR activos transposicionalmente en un pasado reciente en algunas especies de los géneros *Pisum* (Ellis et al., 1998; Pearce et al., 2000), *Hordeum* (Vaugh et al., 1997), *Avena* (Yu y Wise, 2000) o diversos cereales (*Triticum aestivum*, *Aegilops*, *Secale cereale* y *Avena sativa*) (Gribbon et al., 1999).

En este trabajo se han obtenido varias evidencias experimentales que apuntan a una posible actividad reciente de CIRE1. Por un lado, su secuencia nucleotídica presenta una única ORF sin interrupciones por codones de parada y la traducción conceptual a aminoácidos se realiza sin ningún cambio de pauta de lectura. Además los motivos estructurales y funcionales de CIRE1 están conservados cuando se compara su secuencia con otros RTN-LTR tipo  *copia* haciendo factible que, en el caso que se tradujeran, las proteínas de CIRE1 fueran funcionales. La mayoría de copias de CIRE1 están aparentemente íntegras en el genoma y se encuentra en un número de copias elevado. Asimismo, la LTR5' de CIRE1 es funcional en sistemas heterólogos y se observa incremento de la actividad GUS en el caso de la aplicación exógena de NAA. También se ha comprobado que CIRE1 es activo transcripcionalmente. Como se considera que la activación de muchos RTN está regulada fundamentalmente a nivel transcripcional (Okamoto et al., 2000) y dadas las evidencias mostradas para CIRE1, se planteó en este trabajo visualizar si había habido movilización reciente de algunos de sus elementos.

Se ha visto que es difícil detectar nuevas inserciones de *BARE1* y *OARE1* dado el elevado número de inserciones preexistentes en el genoma de cebada y avena, respectivamente (Kimura et al., 2001). De la misma manera, el elevado número de copias en que está CIRE1 en el genoma de *Citrus sinensis* (aproximadamente 2.200 copias por genoma haploide) hizo plantearnos la detección de la movilización del elemento no por *Southern blot* sino a partir de los perfiles conocidos de SSAP para esta

especie, ya que las nuevas copias insertadas tras la transposición del elemento se visualizarán como nuevas bandas SSAP en el gel (Ellis et al., 1998; Pearce et al., 2000; Yu y Wise, 2000; Casa et al., 2000).

El patrón de bandas SSAP basado en CIRE1 que se observa en DNA procedente de tejido de hoja es diferente que el de raíz. Mientras que el patrón en hoja permanece constante (tanto en muestras procedentes de planta cultivada en invernadero, *in vitro* u hojas sometidas a diversos tratamientos), el patrón de bandas SSAP en raíz cambia en las diferentes muestras analizadas, ya provengan de planta de naranjo crecida en invernadero o en condiciones *in vitro* (**Figura 70 de Resultados**). Sorprendentemente, tanto en el patrón de bandas SSAP de la muestra de raíz de planta crecida en invernadero como de planta cultivada *in vitro*, aparecen bandas nuevas. Resultado que se puede interpretar como un polimorfismo de inserción, secundario a un evento de transposición de CIRE1 a una nueva localización.

En este trabajo, se ha probado que CIRE1 de *Citrus sinensis* muestra cierta actividad transcripcional en raíz y hoja sometida a daño mecánico o tras adición exógena de hormonas vegetales (50 $\mu$ M de JA y 1mg/L de NAA). Asimismo la LTR5' de CIRE1 presenta un promotor funcional que es capaz de activar la transcripción del gen informador *gus* en experimentos de expresión transitoria a un nivel superior al basal y mostrar cierta inducción en presencia de niveles de 1mg/L de la hormona vegetal NAA, siendo ésta una fitohormona del enraizamiento. También se sabe que la secuencia de la LTR de CIRE1 contiene como mínimo un hipotético dominio de expresión específica en raíz así como motivos de respuesta a auxinas. Por lo tanto, la mayor actividad transcripcional detectada en raíz haría más probable una mayor actividad transposicional, que se vería plasmada en nuevas bandas polimórficas SSAP, cuando se compara con otros tejidos con menor actividad de CIRE1.

La capacidad de CIRE1 para movilizarse en raíz lo convierte en una herramienta potencialmente útil para generar diversidad genética en este sistema.



Las principales conclusiones extraídas de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral quedan reflejadas a continuación:

1. Se han obtenido múltiples secuencias de dominios relevantes de los dos tipos de retrotransposones con LTR: *copia* y *gypsy*, mediante amplificación por PCR con cebadores degenerados del DNA genómico de *Citrus sinensis* (naranja dulce) de la variedad "Valencia late". Del análisis de las secuencias pertenecientes a ambos tipos de retrotransposones se han podido identificar en *C. sinensis*, en base a estudios filogenéticos, 7 familias de tipo *copia* (CIRE1-CIRE7) y 6 familias de *gypsy* (GySiA-GySiF) diferentes.
2. Se ha estimado por reconstrucción genómica en *C. sinensis* el número total de retrotransposones tipo *copia* y *gypsy* en 10.000 y 5.000 copias, respectivamente. Asumiendo que la mayoría de estos elementos estuvieran intactos ocuparían alrededor del 23% del genoma haploide del naranja. Se confirma por tanto, como en otros genomas de plantas, que los retrotransposones son elementos altamente repetidos del genoma de *C. sinensis*, siendo los tipo *copia* más abundantes que los tipo *gypsy* en esta especie.
3. Se ha determinado la secuencia entera de un nuevo retrotransposón tipo *copia* perteneciente a la familia CIRE1, a partir de una secuencia parcial de la región de la transcriptasa inversa de 270 pb, combinando PCR inversa y PCR directa sobre DNA genómico. CIRE1-1 tiene 5044 pb y contiene 2 LTR de alrededor de 460 pb. Este elemento presenta una pauta de lectura sin interrupciones por codones parada y la traducción conceptual a aminoácidos se realiza sin ningún cambio de pauta de lectura. Los motivos estructurales y funcionales están conservados comparando su secuencia con otros RTN-LTR tipo *copia* caracterizados, haciendo factible que, en el caso que se tradujeran, las proteínas sean funcionales.
4. CIRE1 representa el 2,9% del genoma del naranja con aproximadamente 2.200 copias por genoma haploide. Se observa un número de copias equivalente para diferentes regiones del elemento como son el gen *gag*, y los dominios de la integrasa y la transcriptasa inversa, indicando que la mayoría de las copias de CIRE1 en el genoma de *C. sinensis* estarían completas. Se ha descartado también una presencia significativamente importante de solo-LTR de CIRE1 en el genoma de *C. sinensis*.
5. CIRE1 está presente en todas las especies del género *Citrus* analizadas, así como en otras rutáceas como *Fortunella margarita* o *Poncirus trifoliata*, sugiriendo que CIRE1 estaría presente en estadios tempranos de la especiación de la familia Rutaceae. En cambio, CIRE1 no se ha detectado en otras especies de monocotiledóneas o dicotiledóneas fuera de las rutáceas.

## Conclusiones

---

6. La secuencia de la LTR5' de CIRE1 presenta las cajas típicas de los promotores eucariotas, así como hipotéticos elementos reguladores, entre ellos motivos descritos de respuesta a auxinas, ácido jasmónico y asociados a la expresión específica en raíz. Mediante experimentos de transformación de sistemas heterólogos se ha visto que la LTR5' de CIRE1 es capaz de dirigir la actividad GUS. Asimismo, se observa un incremento de la actividad GUS en el caso de la aplicación exógena de la auxina ácido naftalenacético (NAA).

7. La familia de elementos CIRE1 es activa transcripcionalmente. En condiciones normales, se detectan transcritos de CIRE1 en raíz aunque no en hoja. El nivel de transcritos se incrementa considerablemente en el tejido foliar en respuesta a herida y tras la adición de las fitohormonas ácido jasmónico y naftalenacético

8. El estudio de los retrotransposones tipo *copia* en diez especies del género *Citrus* y tres especies de géneros próximos de la familia Rutaceae, revela 7 nuevas familias (CIRE8-CIRE14), además de las 7 ya descritas en *C. sinensis*. Se concluye que el ancestro común de estas especies vegetales contenía ya una población heterogénea de retrotransposones tipo *copia* que se expandieron y diversificaron antes de la separación del género *Citrus*. Por otra parte, se ha podido estimar el número de elementos tipo *copia* en dichas especies en el rango de 4.000 – 15.000 copias por genoma haploide.

9. Se ha puesto a punto la técnica de SSAP (Polimorfismo de Amplificación Específica de Secuencia) con CIRE1 en cítricos. Nuestros resultados muestran polimorfismos entre las trece especies del estudio y los árboles filogenéticos derivados reflejan bien las taxonomías ya publicadas del género basadas en otros marcadores moleculares como RFLP o RAPDs. La técnica SSAP basada en una secuencia de la LTR de CIRE1 demuestra ser un sistema robusto, fiable, reproducible e informativo para discernir entre especies del género *Citrus*, lo que puede tener aplicaciones agronómicas de utilidad. Los árboles filogenéticos basados en SSAP con CIRE1 de este trabajo no apoyarían por ejemplo, la propuesta previa que la lima procede de un trihíbrido de *C. grandis*, *C. medica* y *Microcitrus*.

10. La técnica SSAP también se ha aplicado para la detección de polimorfismos de inserción de CIRE1 *in planta*, mostrando patrones de bandas SSAP diferentes en hoja y raíz. Sugiriendo mayor actividad de transposición de CIRE1 en raíz.

## 1. Material biológico

### 1.1 MATERIAL VEGETAL

Los estudios sobre caracterización de retrotransposones se han realizado utilizando material vegetal (hoja o raíz) extraído de planta joven de *Citrus sinensis* variedad "Valencia late" (naranja dulce) crecida, ya sea en invernadero o *in vitro*, a partir de semillas cedidas por el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS) de Murcia y el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (I.V.I.A) de Valencia. Ocasionalmente se han utilizado otras especies como *Zea mays ssp.mays* (líneas B73) (maíz) como control.

Para el estudio de la funcionalidad del promotor de la LTR de CIRE1 mediante transformación transitoria de naranjo, cebolla o suspensiones celulares de tabaco, se utilizó *Citrus sinensis*, *Allium cepa* y *Nicotiana tabacum* W38, respectivamente. Las suspensiones celulares de tabaco W38 se establecieron por transferencia de fragmentos de callos indiferenciados a medio de cultivo NK1 líquido (composición en Apartado 13.1) y fueron mantenidos en agitación durante todo el periodo de cultivo.

En los estudios sobre biodiversidad dentro del género *Citrus* realizados, se han utilizado diez especies comerciales de cítricos que son: *Citrus sinensis* (L.) Osb. (naranja dulce), *Citrus aurantium* (naranja amarga), *Citrus clementina* Hort. ex Tan [IVIA-22] (clementina), *Citrus grandis* (L.) Osb. [IVIA-275] (pummelo), *Citrus ichangensis* Swing [IVIA-235] (papeda), *Citrus limettioides* Tan [IVIA-305] (lima), *Citrus limon* (L.) Burm f. Verna [IVIA-50] (limón), *Citrus macroptera* Montr. [IVIA-279] (papeda melanesia), *Citrus medica* L [IVIA-170] (cidro), *Citrus unshiu* (Mak) Marc [IVIA-19] (mandarina satsuma), así como tres especies de géneros próximos como *Fortunella margarita* (Lour.) Swing. [IVIA-138], *Microcitrus inodora* (F.M.Bail.) Swing. [IVIA-314] y *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. [IVIA-217]. El material, en forma de hoja, nos ha sido facilitado en su mayoría por el banco de germoplasma del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (I.V.I.A) de Valencia.

Para determinar la presencia de CIRE1 en otras especies vegetales ajenas a cítricos se ha utilizado material (hoja) de *Nicotiana tabacum* (tabaco), *Solanum tuberosum* (patata), *Cucumis melo* (melón), *Arabidopsis thaliana* (arabidopsis), *Oryza sativa* (arroz) y *Zea mays* (maíz), crecidas en los invernaderos del Laboratori de Genètica Molecular del Consorci CSIC-IRTA.

### 1.2 CEPAS BACTERIANAS

En este trabajo se ha utilizado la cepa receptora de *E.coli* DH5  $\alpha$  para los clonajes.

## 2. Plásmidos y Construcciones

Como vectores de clonaje se han utilizado los siguientes plásmidos:

- pGEM-T *Easy vector* (Promega): plásmido utilizado para el clonaje de productos de PCR por el sistema *T/A cloning*, Amp<sup>R</sup>.



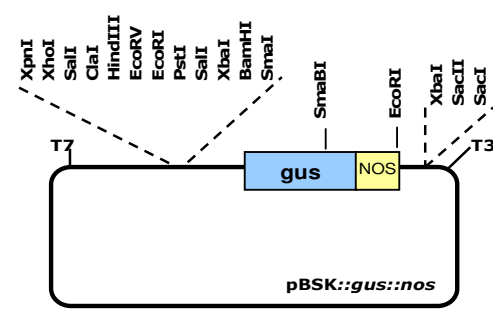
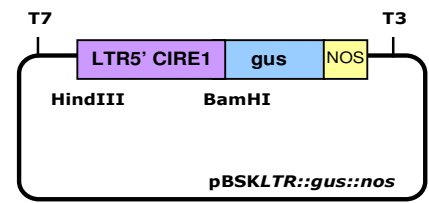
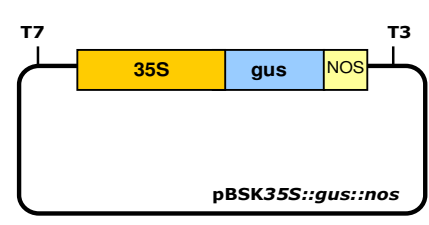
## Material y Métodos

- pTZ57R (Fermentas): plásmido utilizado para el clonaje de productos de PCR por el sistema *T/A cloning*, Amp<sup>R</sup>.
- pCR2.1TOPO (Invitrogen): plásmido utilizado para el clonaje de productos de PCR por el sistema *T/A cloning*, Amp<sup>R</sup>, Kam<sup>R</sup>.

Procedimiento: según la casa comercial.

Las construcciones utilizadas en este trabajo son:

<b>Descripción</b>	
<b>pBSK::gus</b>	<p>Plásmido de aproximadamente 5 kb que contiene el gen informador <i>gus</i> y el terminador NOS insertados en el plásmido pBSK.</p> <p>Codifica para la producción en células vegetales del gen informador <i>gus</i> bajo el promotor de la LTR5' de CIRE1 y el terminador NOS.</p> <p><u>Procedimiento:</u> Mediante oligos específicos (PR5' y PR3') se amplificaron 470 pb correspondientes a la 5'LTR de CIRE1. Estos cebadores tienen añadidas las dianas HindIII y BamHI en los extremos. Este fragmento fue insertado en el plásmido C90 previamente digerido con estas mismas enzimas.</p>
<b>pBSKLTR::gus::nos</b>	<p>Codifica para la producción en células vegetales del gen informador <i>gus</i> bajo el promotor 35S de CaMV (Cauliflower Mosaic Virus) y el terminador NOS,</p>

## 3. Obtención de DNA y RNA

### 3.1 OBTENCIÓN DE DNA GENÓMICO A PARTIR DE TEJIDOS VEGETALES

3.1.1 Extracción DNA genómico con *DNAeasy Plant Mini Kit* suministrado por la casa Qiagen

Método recomendado para la obtención de DNA genómico de alta calidad en poco tiempo. Se obtiene un rendimiento de 4-30 µg de DNA a partir de 100 mg de tejido.

Procedimiento: según la casa comercial.

### 3.1.2 Extracción de DNA genómico mediante solución MATAB

#### Procedimiento:

1. Triturar el tejido vegetal (sin descongelar) hasta que el pulverizado obtenido ocupe aprox. 2,5 ml en un falcon
2. Añadir 5 ml de *Tampón de extracción* y mezclar con vórtex
3. Mantener durante 20 min. – 1h. a 74°C
4. Dejar atemperar a T.A y añadir 6 ml de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)
5. Centrifugar 20 min. a 3.000 r.p.m
6. Transferir sobrenadante a un nuevo falcon
7. Añadir 15 µl RNAsa (0,5 µg/µl) y mantener a 37°C durante 30 min.
8. Añadir 6 ml de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)
9. Centrifugar 20 min. a 3.000 r.p.m
10. Transferir el sobrenadante a un nuevo falcon
11. Añadir 5 ml de isopropanol. Centrifugar 30 min. a 14.000 r.p.m Descartar sobrenadante
12. Lavar con etanol 70%. Centrifugar 30 min. a 14.000 r.p.m. Descartar sobrenadante
13. Secar el pellet al aire o con liofilizador
14. Resuspender en volumen adecuado con H<sub>2</sub>OmilliQ o TE

#### **Tampón extracción** (pH 8)

Tris-HCl	100 mM
NaCl	1,4 M
MATAB	2%
PEG6000	1%
EDTA	20 mM
Sulfito de sodio	0,5%

### 3.1.3 Extracción de DNA genómico ultra-rápida

#### Procedimiento:

1. Triturar un trozo de hoja (sin descongelar) en un tubo Eppendorf
2. Añadir 400 µl de *Tampón de extracción* y mezclar con vórtex durante 5 seg.
3. Centrifugar 1 min. a 13.000 r.p.m
4. Transferir 300 µl a un tubo nuevo y añadir 300 µl de isopropanol. Mantener 10 min. a T.A
5. Centrifugar 5 min. a 13.000 r.p.m
6. Descartar sobrenadante. Lavar con etanol 70%
7. Centrifugar 5 min. a 13.000 r.p.m
8. Descartar sobredandante y secar el pellet al aire o con liofilizador
9. Resuspender en volumen adecuado con H<sub>2</sub>OmilliQ o TE

#### **Tampón extracción** (pH 7,5)

Tris-HCl	200 mM
NaCl	250 mM
EDTA	25 mM
SDS	0,5%

## 3.2 OBTENCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

### 3.2.1 Minipreparación mediante lisis alcalina

Método utilizado para la comprobación de clonajes y secuenciación de muestras.

## Material y Métodos

---

### Procedimiento:

1. Inocular una colonia aislada en 4ml de medio con el antibiótico adecuado, incubar a 37°C en agitación ON
2. Transferir 1,5 ml del cultivo a un tubo Eppendorf y centrifugar durante 10 s a 14.000 r.p.m. Descartar el sobrenadante y añadir 300 µl del *Tampón P1*. Resuspender bien con ayuda del vórtex
3. Añadir 300 µl del *Tampón P2* y agitar suavemente por inversión del tubo (unas 5 veces). Incubar a TA durante 5 min.
4. Añadir 300 µl del *Tampón P3* y agitar inmediatamente con suavidad. Centrifugar a 4°C durante 10 min.
5. Pasar 700-800 µl del sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf, añadir 400µl de isopropanol y centrifugar 10 min. a TA
6. Descartar el sobrenadante, añadir 1ml de etanol 70%, agitar por inversión y centrifugar a TA durante 3 min.
7. Descartar el etanol y secar el DNA en estufa a 37° C durante 15-30 minutos o al aire. Resuspender en un volumen adecuado con TE

#### **Tampón P1** (pH 8)

Tris-HCl	50 mM
EDTA (pH 8,0)	10 mM
RNasa A	100 µg/ml

#### **Tampón P2** (Almacenar a 4°C) (pH 8)

NaOH	200 mM
SDS	200 mM

#### **Tampón P3** (pH 5,5)

Acetato potasio	3M
-----------------	----

### 3.2.2 Minipreparación con *NucleoSpin Plasmid* suministrado por la casa Macherey-Nagel

Método utilizado para la obtención de DNA plasmídico de alta calidad. Se obtiene un rendimiento de 10-30 µg de DNA plasmídico a partir de 1-5 ml de cultivo.

Procedimiento: según la casa comercial.

### 3.2.3 Midipreparación con *Qiagen Plasmid Midi kit* suministrado por la casa Qiagen

Método utilizado para la obtención de DNA plasmídico de alta calidad y en grandes cantidades. Se obtiene un rendimiento de hasta 100 µg de DNA plasmídico a partir de 100 ml de cultivo.

Procedimiento: según la casa comercial.

## 3.3 OBTENCIÓN DE RNA TOTAL A PARTIR DE TEJIDOS VEGETALES

### 3.3.1 Extracción RNA total con *RNAeasy Plant Mini Kit* suministrado por la casa Qiagen

Método recomendado para la obtención rápida de RNA total de alta calidad. Permite obtener hasta 100 µg de RNA total (fragmentos >200pb) a partir de 100 mg de tejido vegetal.

Procedimiento: según la casa comercial.

### 3.3.2 Extracción de RNA con TRIZOL<sup>R</sup>

Método recomendado para la obtención rápida de RNA total de elevada calidad. Asimismo, permite la extracción simultánea del DNA genómico e incluso de la fase proteica, a partir del mismo material de partida.

Procedimiento: según la casa comercial.

### 3.3.3 Extracción de RNA mediante el Tampón Z6

Procedimiento:

1. Triturar el tejido vegetal (sin descongelar) hasta que el pulverizado obtenido ocupe aprox. 1 ml en un Eppendorf
2. Añadir 200  $\mu$ l de *Tampón Z6* frío y 20  $\mu$ l de  $\beta$ -Mercaptoetanol. Homogeneizar bien
3. Añadir 200  $\mu$ l más de tampón Z6 frío. Volver a homogeneizar
4. Añadir 400  $\mu$ l de Fenol:Cloroformo:Isoamílico (25:24:1). Agitar con vórtex
5. Centrifugar 30-45 min. a 13.000 r.p.m a 4°C
6. Recuperar sobrenadante en un tubo nuevo
7. Añadir 0,1 volúmenes de Ácido Acético 1M y 1 volumen de EtOH Absoluto. Mezclar con vórtex. Dejar 20 min. a -80°C (o bien ON a -20°C)
8. Centrifugar 10 min. a 13.000 r.p.m. Descartar sobredanante
9. Lavar el pellet con EtOH 70%. Centrifugar 5 min. a 13.000 r.p.m. Descartar sobrenadante
10. Lavar el pellet con 200  $\mu$ l Acetato sódico 3M. Centrifugar 5 min. a 13.000 r.p.m. Descartar sobrenadante
11. Lavar el pellet dos veces más con EtOH 70%. Centrifugar 5 min. a 13.000 r.p.m. Descartar sobrenadante. Secar el pellet
12. Resuspender en 50-100  $\mu$ l con H<sub>2</sub>O milliQ RNAsa Free. Agitar 15-20 min.
13. Mantener a 65°C durante 5 min. Centrifugar 2 min. a 13.000 r.p.m. Recuperar sobrenadante

#### **Tampón Z6** (Almacenar a TA)

Guanidin-HCl	8 M
EDTA	20 mM
MES pH 7	20 mM

### 3.3.4 Tratamiento del RNA con DNasa

Se ha utilizado la *RQ1 RNase-Free DNase* suministrada por la casa Promega para limpiar el RNA de restos de DNA.

Procedimiento: según la casa comercial.

## 4. Modificaciones generales del DNA

### 4.1 DIGESTIONES CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y LIGACIONES

En este trabajo, únicamente detallaremos el protocolo de este tipo de reacciones generales, si se utilizan en experimentos concretos con modificaciones sobre el protocolo inicial. Los protocolos originales están descritos en manuales de biología molecular como Sambrook et al., 2001, entre otros.

## Material y Métodos

---

### 4.2 DESFOSFORILACIÓN DE EXTREMOS

Los fragmentos de DNA obtenidos tras digestión con enzimas de restricción tienen un grupo fosfato en posición 5', que es necesario eliminar para evitar una religación del DNA mediante T4-DNA ligasa, ya que los extremos desfosforilados no son susceptibles de ligación por esta enzima. Para eliminar el grupo fosfato se utiliza el enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP), preferible a la fosfatasa bacteriana ya que puede ser inactivada totalmente por calor en presencia de SDS.

#### Procedimiento:

- Mezclar en tubo Eppendorf:

DNA	concentración máxima: 2 pmol extremos/ $\mu$ l
5 $\mu$ l <i>Tampón CIP 10x</i>	
1-5 $\mu$ l CIP	cantidad mínima: 50 mU CIP/pmol extremos
hasta 50 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	
- Incubar durante 30 minutos:
  - a 37° C si se trata de extremos 5' protuberantes
  - a 56° C si se trata de extremos romos
- Añadir la misma cantidad de CIP y repetir el paso 2
- Añadir 2,5  $\mu$ l de SDS 10%. Mezclar
- Incubar durante 15 minutos a 68° C
- Extraer una vez con 1 volumen de fenol:cloroformo:isoaminoalcohol y una vez con 1 volumen de cloroformo:isoaminoalcohol
- Añadir 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) y 2,5 volúmenes de EtOH 100%. Mezclar
- Centrifugar durante 20 minutos, lavar el precipitado de DNA con EtOH 70% y secar
- Disolver en TE, o bien en el tampón necesario para la siguiente manipulación

#### **Tampón CIP 10x** (Almacenar a -20° C)

Tris-HCl pH 9,0	500 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
ZnCl <sub>2</sub>	1 mM
Espermidina	10 mM

## 5. Purificación de fragmentos de DNA

### 5.1 EXTRACCIÓN CON FENOL:CLOROFORMO

#### Procedimiento:

- Añadir 1 volumen de fenol:cloroformo y agitar en vórtex durante 20 s. (si el volumen inicial es muy pequeño, ajustarlo a 200  $\mu$ l con TE)
- Centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 2 min para separar las fases. Recoger la fase acuosa
- Añadir 1 volumen de cloroformo y repetir el paso anterior
- Precipitar el DNA y resuspender en la disolución adecuada

## **5.2 PRECIPITACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

### Procedimiento:

1. Añadir 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M (pH 5,2) y 2 volúmenes de etanol 100%, agitar y mantener 20 min. a -80°C (o 2h a -20°C)
2. Centrifugar a 13.000 r.p.m. a 4°C durante 10 min.
3. Descartar el sobrenadante, añadir 1 ml de etanol 70% y agitar por inversión. Centrifugar 3 min. a 13.000 r.p.m y descartar el sobrenadante
4. Dejar secar hasta evaporar el etanol. Resuspender en H<sub>2</sub>O milliQ o en el tampón adecuado

## **5.3 PURIFICACIÓN DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA O DE SOLUCIÓN**

Se han utilizado indistintamente los kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* suministrado por la casa Amersham, *Nucleospin extract* suministrado por la casa Macherey-Nagel o *QIAquick PCR Purification Kit* suministrado por la casa Qiagen. Permiten recuperar entre un 70 y 95% del DNA de la banda en un estado muy puro y obtener fragmentos de DNA de cadena sencilla o doble de entre 100 pb y 10 kb.

Procedimiento: según la casa comercial.

## **6. Subclonaje de fragmentos de DNA en plásmidos**

### **6.1 PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E.coli* DH5 $\alpha$**

Modificación del método descrito por Dagert y Ehrlich (1979), que permite una eficiencia de transformación de 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> colonias/ $\mu$ g DNA.

### Procedimiento:

1. A partir de glicerinado (u otro tipo de cultivo almacenado) de *E.coli* DH5  $\alpha$  , estriar en una placa con medio LB para obtener colonias aisladas. Incubar a 37°C durante toda la noche
2. Inocular una colonia aislada en 5 ml de LB. Agitar (250 rpm) a 37°C durante toda la noche
3. Transferir 1 ml del precultivo anterior en 100 ml de LB e incubar a 37°C hasta que la densidad óptica a 590 nm se encuentre entre 0,3 y 0,4 (2-3 h)
4. Dividir el cultivo en volúmenes de 50 ml en botellas de polipropileno de 250 ml (previamente enfriadas) y centrifugar a 1000 g (2000 r.p.m.) durante 6 minutos a 4°C
5. Decantar el sobrenadante, mantener la botella invertida durante 1-3 minutos para secar mejor su interior y resuspender las células en 10 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM frío (4°C). Dejar en hielo de 30 a 60 minutos
6. Centrifugar a 1000 g durante 6 minutos a 4° C, decantar el sobrenadante y resuspender las células en 2 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM con glicerol al 15% (4°C)
7. Dividir en partes alícuotas de 200  $\mu$ l en tubos Eppendorf. Excepto si las células se van a utilizar inmediatamente, congelar en nitrógeno líquido y almacenar a -80°C

### **6.2 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES**

### Procedimiento:

1. Descongelar en hielo el número necesario de alícuotas de células competentes
2. Añadir el DNA (no más de 50 ng), en un volumen máximo de 1/10 respecto a las células. Mezclar agitando el tubo con cuidado

## Material y Métodos

---

- 3
  - a. Mantener en hielo durante 20-40 minutos. Someter las células a un choque térmico de 90 segundos a 42° C. Transferir nuevamente al hielo con rapidez, dejando atemperar durante 1-2 minutos
  - b. Congelar las células con N<sub>2</sub> líquido. Someter a un choque térmico de 5 min. a 37°C
4. Añadir 0,8 ml de medio de cultivo LB e incubar durante 45-60 minutos a 37°C en agitación
5. Plaquear 200 µl de la transformación en placas con medio LB y el antibiótico adecuado. Incubar a 37° C durante ON
6. Para seleccionar las colonias positivas:
  - (A) Realizar PCR de colonias (Apartado 7.2.3). Seleccionar los plásmidos recombinantes correctos. Establecer cultivos líquidos de las colonias escogidas. Preparar DNA plasmídico a partir de ellos
  - (B) Establecer cultivos líquidos de algunas colonias. Preparar DNA plasmídico a partir de ellos. Verificar por digestión con enzimas de restricción si se trata de plásmidos recombinantes correctos

### OBSERVACIONES GENERALES

Los cultivos sólidos se realizan sobre placas con medio solidificado con agar (Almacén a 4°C)

Los cultivos permanentes de cepas y clones bacterianos se realizan al 20% glicerol (Almacén a -80°C)

**Medio LB** (pH 7,5 con NaOH). Autoclavar 20 min. Las placas de LB sólido tienen 1,5% de Agar

Triptona	10g/L
Extracto de levadura	5g/L
NaCl	50mM

## 7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

### 7.1 OBSERVACIONES GENERALES SOBRE LA PCR

- Las reacciones de PCR se hicieron con el aparato PTC-200 Peltier Thermal Cycler de la casa comercial MJ Research.
- La mayoría de los cebadores utilizados en las PCR fueron elaborados por MWG Biotech.
- La temperatura de anillamiento (Ta) de los cebadores se obtiene a partir de la siguiente fórmula:  
$$Ta = [2 \cdot (AT) + 4 \cdot (GC)] - 4$$
siendo AT y GC, el número de adeninas y timinas, y guanosinas y citosinas de los cebadores, respectivamente.
- Se ha utilizado como polimerasa mayoritariamente la *Expand High Fidelity* de Roche ya que presenta una tasa de error del  $8,5 \cdot 10^{-6}$ , por tanto 3 veces menor que la Taq polimerasa (Tasa error:  $2,6 \cdot 10^{-5}$ ). Además, es capaz de amplificar fragmentos de PCR de hasta 12 kb.
- La comprobación de los fragmentos amplificados se realiza cargando una décima parte del volumen obtenido en un gel de agarosa de entre el 0.8% y el 2% dependiendo del tamaño de las bandas esperadas.
- En la siguiente Tabla se muestran las secuencias y las Ta de los diferentes cebadores utilizados en este trabajo.

**Cebadores degenerados:** oligos diseñados para amplificar poblaciones totales de elementos tipo *copia* (Flavell et al., 1992) y *gypsy* (Suoniemi et al., 1998). Nomenclatura IUPAC: Y=C/T, R=A/G, W=A/T, K=G/T, S=C/G, N=A/T/C/G, I:inositol

NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'
<b>CRTu'</b>	ACN GCN TTY YTN CAY GG
<b>CRTI'</b>	ARC ATR TCR TCN ACR TA
<b>Ty3rt</b>	GTI TWY KTI GAY GAY RTI YTI RT
<b>Ty3int</b>	ICK YTC ISW YTG ICC RTC IST YTG IGG

**Cebadores de uso general**

NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'
<b>Universal</b>	GCA AGC TTT GTG AAG ATA TGT GTA TAT G
<b>Reverse</b>	GCG GAT CCT GTT AAG ATT TTA AGT TTA A

**Cebadores para las construcciones:** oligos complementarios a secuencias de los extremos de LTR5' de CIRE1 con dianas HindIII y BamHI añadidas para el clonaje y posterior bombardeo. Se indica la Ta calculada [Ta utilizada]

NOMBRE	Ta (°C)	SECUENCIA 5'-3'
<b>PR5'</b>	76 [60]	GCA AGC TTT GTG AAG ATA TGT GTA TAT G
<b>PR3'</b>	74 [60]	GCG GAT CCT GTT AAG ATT TTA AGT TTA A

**Cebadores de CIRE1:** oligos diseñados a partir de la secuencia de CIRE1 y los diferentes productos de PCR pertenecientes al elemento

NOMBRE	Ta (°C)	SECUENCIA 5'-3'	REGIÓN DE CIRE1
<b>Oligo1</b>	48	TTA GGT GCT GTA TTA TTG	extremo 3' no codificante
<b>Oligo4</b>	62	TGG CTT CAG AGA AGT TAG CAG	RT
<b>Oligo5</b>	64	ATC CTT ACA CTC AAA TCC TTC AG	RT
<b>Oligo6</b>	64	TTT GGT GGA TCA GAT CAA GGT G	RT
<b>Oligo7</b>	60	TGC AAG ACT GTA AAC CTG TTC	RT
<b>Oligo8</b>	56	TGC CAT ACA CTT GGT GAA G	RH
<b>Oligo9</b>	54	GAG CTG TTG TGC AGA TTG	LTR
<b>Oligo12</b>	50	CAG TTG ATT CAG TTG ATC	extremo 3' no codificante
<b>Oligo13</b>	54	CAA TCT GCA CAA CAG CTC	LTR
<b>Oligo15</b>	54	CTC TCC TTG TGC ATC AAG	gag
<b>Oligo16</b>	54	CAC TGG TGC TCT TAC TTC	RT
<b>Oligo17</b>	52	AGA AGA TTA TGC ACA GAT C	LTR
<b>Oligo18</b>	58	CTT GAA GAT GTT AAA GCA TCC	gag
<b>Oligo19</b>	56	AGC TTT GAA TTA TCA GCA TAC	INT
<b>Oligo20</b>	52	GTA GAA GCC TCT GGA TC	gag
<b>Oligo21</b>	52	CAA AGT GTG AAG ATA TGT G	LTR
<b>Oligo23</b>	52	GAT AGA ATC CAG CAA CTG	INT
<b>Oligo26</b>	52	GAA GGT GTA GAT TTC AAT G	RT
<b>Oligo27</b>	54	ATC AGA ACC ATC ATC AGA G	gag
<b>Oligo29</b>	56	CTG ACT TGT ATT TGC TTG CA	RT
<b>Oligo30</b>	64	CAG CAA GAC TCA CGA ATC	LTR
<b>Oligo33</b>	52	ATA TCA AAT AGA CCC CAT C	LTR



## Material y Métodos

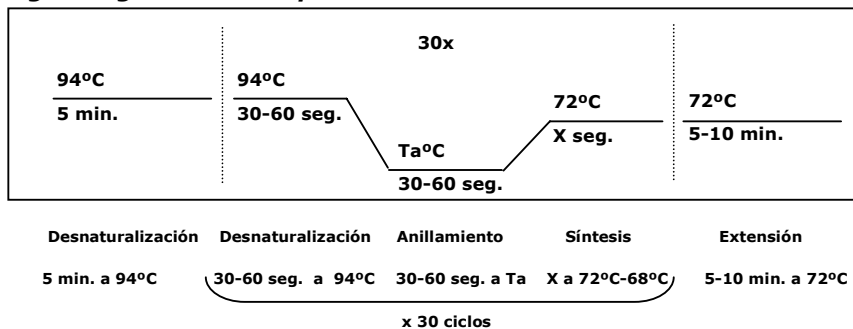
A continuación, se muestran las condiciones generales de la reacción de PCR, las cuales se han modificado en cada caso para optimizar la reacción.

### Condiciones generales de la reacción de PCR

DNA genómico	20-200ng
PCR buffer(10X) Roche	1X
DNTPs	200 $\mu$ M
Cebador directo	100-500 nM
Cebador inverso	100-500 nM
Taq High Fidelity (Roche)	0,5-2 unidades
MgCl <sub>2</sub>	1,5-3 mM

Es importante realizar siempre, en paralelo a las muestras de interés, **controles negativos de la PCR**, en los que no se añade el DNA genómico. De esta manera, pueden descartarse posibles contaminaciones por DNA en los diferentes componentes de la reacción que invalidarían el resultado.

### Programa general de amplificación



Siendo el tiempo de síntesis (X) de 1 min. por cada 1 kb a amplificar.

#### ▪ PCR en gradiente de temperatura

Esta técnica permite realizar varias PCR a la vez en las que se usan diferentes Ta. Esto facilita la unión de los cebadores a secuencias que hayan variado ligeramente.

#### ▪ PCR anidada (*nested PCR*)

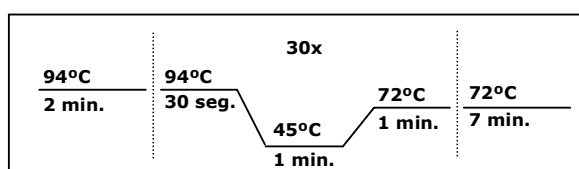
Esta técnica consiste en realizar una nueva reacción de PCR a partir del producto de una PCR anterior utilizando cebadores más internos de la secuencia amplificada.

## 7.2 CONDICIONES Y PROGRAMAS ESPECÍFICOS DE PCR UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO

### 7.2.1 Amplificación específica de RTN-LTR tipo *Ty1-copia* con cebadores degenerados

El diseño de los cebadores degenerados se basa en el alineamiento de las secuencias aminoácídicas de dos dominios de la región de la RT separados unos 270 pb altamente conservados en retrotransposones del tipo *copia* como *copiaDm* (de *Drosophila melanogaster*) y RTN-LTR de plantas como *Ta1*, *Ta2*, *Ta3* (de *Arabidopsis thaliana*) y *Tnt1* (de *Nicotiana tabacum*) (Flavell et al., 1992).

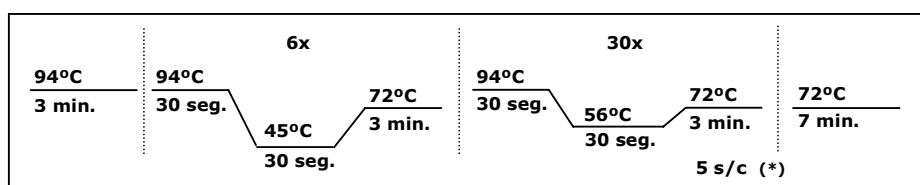
DNA genómico	100 ng
PCR buffer(10X) Roche	1X
dNTPs	200 µM
Cebador CRTu'	200 nM
Cebador CRTI'	200 nM
Taq High Fidelity (Roche)	1 unidad
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM



### 7.2.2 Amplificación específica de RTN-LTR tipo *Ty3-gypsy* con cebadores degenerados

El diseño de los cebadores degenerados se basa en la búsqueda de dominios conservados en una región RT-INT de unos 1600 pb teniendo como referencia al elemento *Del1* de *Lilium*, *Ty3* de levadura, *gypsyDm* de *Drosophila* y retrovirus como FELV y HIV-1. Se tiene en cuenta para el diseño el orden concreto que la RT y INT ocupan en el dominio interno, que es 5'RT-INT3' para RTN tipo *gypsy* y 5'INT-RT3' para tipo *copia*. Además, el dominio de la RT utilizado para el cebador está más conservado entre los elementos *gypsy* que en los *copia* (Suoniemi et al., 1998)

DNA genómico	100 ng
PCR buffer(10X) Roche	1X
dNTPs	200 µM
Cebador Ty3rt	300 nM
Cebador Ty3int	300 nM
Taq High Fidelity (Roche)	2 unidades
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM



(\*) Añadir 5 segundos en cada ciclo de amplificación

## Material y Métodos

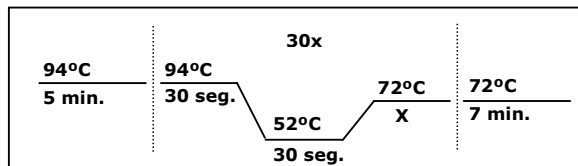
### 7.2.3 PCR de colonias de *E. coli* transformadas

Método utilizado para seleccionar plásmidos recombinantes correctos.

#### Procedimiento:

1. Picar con una punta p10 una colonia aislada y disolverla en 50  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O MilliQ estéril
2. Paralelamente con esa misma punta p10 tocar una placa de LB (de esta manera se realiza una réplica de la colonia a partir de la cual se realizará el cultivo líquido, en el caso que resulte positiva).
3. Preparar la mix de PCR según:

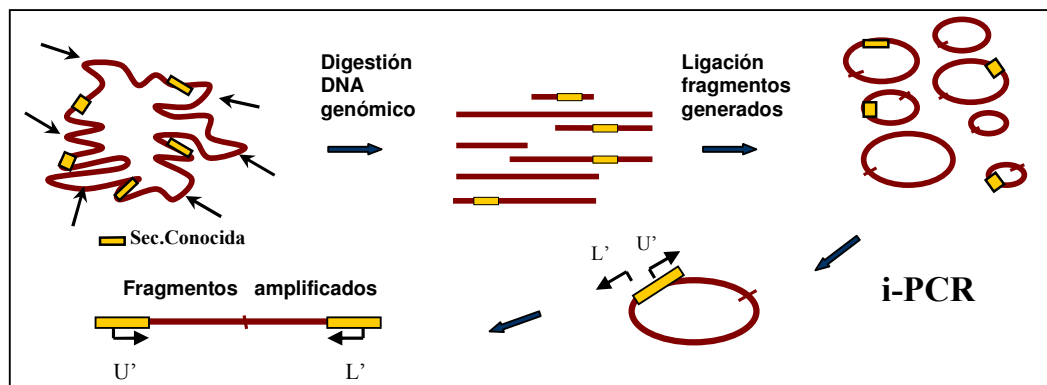
	Concentración final	Concentración stock
2 $\mu\text{l}$ Mezcla paso1		
4 $\mu\text{l}$ Buffer PCR	1x	10x
0,5 $\mu\text{l}$ Cebador <i>universal</i>	230 nM	18,2 $\mu\text{M}$
0,5 $\mu\text{l}$ Cebador <i>reverse</i>	230 nM	18,2 $\mu\text{M}$
3,2 $\mu\text{l}$ MgCl <sub>2</sub>	2 mM	25 mM
5 $\mu\text{l}$ dNTPs	250 $\mu\text{M}$	2 mM
0,5 $\mu\text{l}$ Taq polimerasa		
24,3 $\mu\text{l}$ H <sub>2</sub> O	Hasta Volumen de 40 $\mu\text{l}$	



Los cebadores *universal* y *reverse* están presentes uno a cada lado del sitio de clonaje del plásmido utilizado como vector. Con esta PCR se detecta presencia o ausencia de fragmento clonado, según si hay o no amplificación de banda. El tiempo de síntesis (X) dependerá del fragmento que se está clonando.

## 8. PCR inversa (*inverse PCR*, iPCR)

Esta técnica permite amplificar fragmentos de DNA adyacentes en el genoma a una secuencia conocida. El método puede resumirse mediante el siguiente esquema:



### 8.1 DIGESTIÓN SIMPLE DEL DNA GENÓMICO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Hay que elegir el enzima de restricción a utilizar de manera que no presente ninguna diana de restricción en la secuencia interna conocida. Para la amplificación mediante i-PCR de CIRE1, se escogió HindIII tras realizar el mapa de restricción del fragmento conocido de CoSi14.

Procedimiento:

1. Mezclar en tubo Eppendorf:

	Concentración final	Concentración stock
DNAg	Aprox. 2 µg	
2 µl HindIII (Roche)	20 u	10 u/µl
5 µl Buffer (Roche sure/cut B)	1x	10x
Hasta 50 µl H <sub>2</sub> O		

2. Incubar a 37°C durante 3h.
3. Extracción del DNA digerido mediante Fenol:Cloroformo (1:1)
4. Precipitar con 0,1 volúmenes de AcNa 3M (pH 5,2) y 2,5 volúmenes de EtOH 100%
5. Resuspender con tampón TE a una concentración de 0,1 µg/µl

### 8.2 LIGACIÓN

La reacción de ligación se diseña de manera que se favorezca la circularización de las moléculas en contra de la formación de concatenados, por tanto se utilizan concentraciones de DNA bajas.

Procedimiento:

1. Mezclar en tubo Eppendorf:

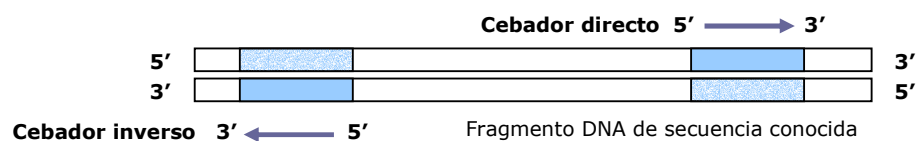
	Concentración final	Concentración stock
0,5 µl DNAg digerido	2,5 ng/µl	0,1 µg/µl
1 µl T4 DNA ligasa (Roche)	1 u	1 u/µl
2 µl Buffer (Roche)	1x	10x
15,5 µl H <sub>2</sub> O	Hasta 20 µl	

2. Incubar de 3h-O.N a T.A.
3. Extracción del DNA digerido mediante Fenol:Cloroformo (1:1)
4. Precipitar con 0,1 volúmenes de AcNa 3M (pH 5,2) y 2,5 volúmenes de EtOH 100%
5. Resuspender con tampón TE a una concentración de 10 ng/µl

### 8.3 AMPLIFICACIÓN POR I-PCR

#### 8.3.1 Diseño cebadores para la amplificación

Han de diseñarse cebadores internos encarados hacia fuera y complementarios a las zonas más externas de la secuencia conocida.





## **9.2 REACCIÓN DE PCR SOBRE cDNA (RT-PCR)**

Las amplificaciones por PCR se montan a partir del 10% del volumen de la reacción de RT.

Se siguen las condiciones y el programa general de PCR pero se adopta la temperatura de anillamiento ( $T_a$ ) de los cebadores concretos y el tiempo de síntesis ( $x$ ) de la longitud del fragmento a amplificar en cada caso.

Además del control negativo de PCR, se realiza también un **control negativo de la RT**. En este control, se impide la transcripción inversa al no añadir el enzima RT, de esta forma si hay amplificación en la reacción de PCR ésta procederá de restos de DNA.

## **10. Marcaje radiactivo de DNA**

### **10.1 MARCAJE POR RANDOM PRIMING**

Se ha utilizado el kit *Random Primed DNA Labeling Kit* suministrado por la casa Boehringer-Mannheim. Permite la obtención de fragmentos de DNA marcados uniformemente y con una elevada actividad específica (hasta  $3 \cdot 10^9$  cpm/ $\mu$ g DNA). Se basa en la hibridación del DNA a marcar (previamente desnaturalizado) con una mezcla de hexanucleótidos al azar, para realizar después una elongación de la cadena con una polimerasa (típicamente la *Klenow*) en presencia de un desoxinucleótido marcado.

Procedimiento: según la casa comercial.

### **10.2 MARCAJE POR PCR**

Procedimiento:

1. Preparar en un tubo Eppendorf la siguiente mezcla:  

---

5 ng	DNA a marcar
4 $\mu$ l	PCR buffer (10X)
1 $\mu$ l	dATP, dGTP, dTTP 2 mM
1 $\mu$ l	dCTP 20 $\mu$ M
2 $\mu$ l	MgCl <sub>2</sub> 50 mM
1 $\mu$ l	Cebador directo 20 $\mu$ M
1 $\mu$ l	Cebador complementario 20 $\mu$ M
0,5 $\mu$ l	Taq polimerasa (2,5 u)
Hasta 38 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O

---
2. Añadir 2  $\mu$ l de  $\alpha^{32}$  p-dCTP (3000 Ci/mmol)
3. Realizar la PCR bajo las condiciones más adecuadas según los cebadores
4. Realizar en paralelo una reacción de PCR con dCTP frío

# 11. Transferencia e Hibridación de ácidos nucleicos

## 11.1 HIBRIDACIÓN SOUTHERN BLOT

### 11.1.1 Preparación, electroforesis y tratamiento del gel de DNA

#### Procedimiento:

1. Preparar un gel grande (300 ml) de agarosa al 0,8 % con TAE 1% y bromuro de etidio
2. Calentar las muestras de DNA digerido (aprox. 10 µg) con *Tampón de carga de DNA 6x* (relación 6:1) durante 5 min. a 65°C
3. Cargar las muestras en el gel. Electroforesis en TAE 1x a 30 v. ON (o 90 v. durante 4-5h.)

#### TAE 1x

---

Tris	0,04 M
EDTA	2 mM

---

#### Tampón de carga de DNA 6x

---

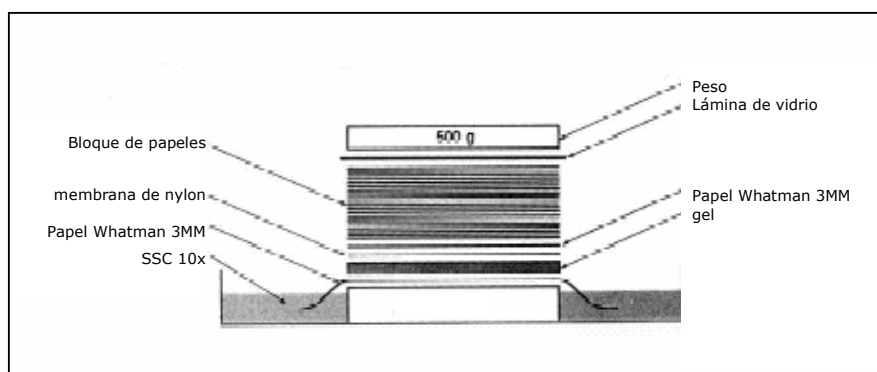
Glicerol	30%
Azul bromofenol	0,25%
Xileno Iyarole FF	0,25%
EDTA	0,5 M pH 8

---

### 11.1.2 Transferencia del gel de DNA

#### Procedimiento:

1. Despurinizar el gel con HCl 0,25N durante unos 10 min. en agitación
2. Lavar con agua
3. Mantener en *Solución desnaturalizante* durante 15 min. en agitación. Repetir 2 veces
4. Lavar con agua
5. Mantener en *Solución Neutralizante* durante 15 min. en agitación. Repetir 2 veces
6. Equilibrar el gel manteniéndolo en SSC 2x hasta el momento de la transferencia
7. Equilibrar el filtro de Nylon (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech) en SSC 2x hasta el momento de la transferencia
8. Transferir con SSC 10x al un filtro de Nylon durante ON según el siguiente modelo:



- Tras la transferencia, lavar la membrana durante 2 min. con SSC 2x
- Fijar la membrana con U.V durante 5 min. o bien a 80°C durante 2 h.
- Si no se hibrida al momento, almacenar la membrana a 4°C

### **Solución Desnaturalizante**

---

NaOH	0,5 M
NaCl	1,5 M

---

### **Solución Neutralizante pH 8**

---

Tris HCl	0,5 M
NaCl	1,5 M

---

### **SSC 20x (pH 7)**

---

Citrato trisódico	0,3 M
NaCl	3 M

---

#### 11.1.3 Prehibridación e Hibridación de la membrana

##### Procedimiento:

- Añadir 20 ml de *Solución de Prehibridación* por membrana y mantener mínimo 4h. a 65°C en agitación
- Añadir 12 ml *Solución de Hibridación* por membrana y mantener a 65°C en agitación ON

### **Solución "madre"**

---

2 ml	Tris HCl 1M pH 8
0,8 ml	EDTA 0,5M pH 8
10 ml	SSC 20x
26 ml	H <sub>2</sub> O

---

### **Solución Prehibridación**

---

19,4 ml	<i>Solución "madre"</i>
0,2 ml	<i>Denhardt's 100x</i>
0,2 ml	DNA de esperma de salmón (*) 10 mg/ml
0,2 ml	SSC 20x

---

### **Solución Hibridación**

---

9,7 ml	<i>Solución "madre"</i>
0,1 ml	<i>Denhardt's 100x</i>
0,1 ml	DNA de esperma de salmón (*) 10 ml/ml
0,1 ml	SSC 20x
2 ml	Dextran Sulfate 50%
20-40 µl	DNA marcado radiactivamente

---

(\*) Desnaturalizar el DNA de esperma de salmón a 100°C durante 10 min. antes de añadir a la solución

### **Denhardt's 100x** (Almacenar a -20°C)

---

20 g/L	Ficoll
20 g/L	Polivinilpirrolidona (PVP)
20 g/L	BSA

---



## Material y Métodos

---

### 11.1.4 Lavados

#### Procedimiento:

1. Lavar la membrana con la *Solución 1* durante 5 min. en agitación a 65°C
2. Lavar la membrana con la *Solución 2* durante 30 min. en agitación a 65°C. Repetir 2 veces
3. Lavar la membrana con la *Solución 3* durante 30 min. en agitación a 65°C. Repetir 2 veces

	<b>Sol. 1 (SSC 2x-SDS 0,5%)</b>	<b>Sol. 2 (SSC 0,5x-SDS 0,1%)</b>	<b>Sol. 3 (SSC 0,1x-SDS 0,1%)</b>
SSC 20x	100 ml	25 ml	5 ml
H <sub>2</sub> O	875 ml	970 ml	990 ml
SDS 20%	25 ml	5 ml	5 ml

### 11.1.5 Exposición

#### Procedimiento:

1. Exponer a -80°C en un film de autoradiografía (35x43, Kodak Scientific Imaging Film XAR-5)

## 11.2 HIBRIDACIÓN NORTHERN BLOT

### 11.2.1 Preparación, electroforesis y tratamiento del gel de RNA

#### Procedimiento:

1. Preparar un gel grande (300 ml) de agarosa al 1,5 % con *MEN 1%* según:  

---

  - 4,5 g Agarosa
  - 254 ml H<sub>2</sub>O
  - 30 ml *MEN 10x*Calentar, hasta disolver la agarosa  

---

  - 16,2 ml Formaldehído 37%
2. Calentar las muestras de RNA (aprox. 10 µg) con *Tampón de carga de RNA 2x* (relación 1:1) durante 15 min. a 65°C
3. Cargar las muestras en el gel. Electroforesis en *MEN 1x* a 90 v. durante 3-4h.

#### **MEN 10x** pH 7 (Almacenar a 4°C)

---

MOPS	200 mM
NaAc	50 mM
EDTA	10 mM

---

#### **Tampón de carga de RNA 2x** (Almacenar a -80°C)

---

Tampón carga DNA 6x	20 %
Formamida desionizada	50 %
Formaldehído	6,4 %
MEN 10x	10 %
Bromuro de etidio	200 µg

---

### 11.2.2 Transferencia del gel de RNA

#### Procedimiento:

1. Lavar el gel con H<sub>2</sub>O a 65°C durante unos 5 min. en agitación. Repetir 3 veces
2. Lavar el gel con SSC 10x durante 30 min. en agitación. Repetir 2 veces
3. Equilibrar el filtro de Nylon (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech) en SSC 2x hasta el momento de la transferencia
4. Transferir con SSC 10x al un filtro de Nylon durante ON según el modelo del apartado 11.1.2
5. Tras la transferencia, lavar la membrana durante 2 min. con SSC 2x
6. Fijar la membrana con U.V durante 5 min. o bien a 80°C durante 2 h.
7. Si no se híbrida al momento, almacenar la membrana a 4°C

### 11.2.3 Prehibridación e Hibridación de la membrana

#### Procedimiento:

1. Añadir 20 ml de *Solución de Prehibridación* por membrana y mantener mínimo 4h. a 42°C en agitación
2. Añadir 12 ml *Solución de Hibridación* por membrana y mantener a 42°C en agitación ON

#### **Solución Prehibridación/Hibridación(+)**

Formamida	40 %
SSPE	5x
SDS	0,5 %
Denhardt's	5x
DNA de esperma de salmón (*)	100 µg/ml

(\*) Desnaturalizar el DNA de esperma de salmón a 100°C durante 10 min. antes de añadir a la solución

(+) A la solución de Hibridación se le añade también 20-40 µl del DNA marcado radiactivamente

#### **Denhardt's 100x** (Almacenar a -20°C)

20 g/L	Ficoll
20 g/L	Polivinilpirrolidona (PVP)
20 g/L	BSA

### 11.2.4 Lavados

#### Procedimiento:

1. Lavar la membrana con la *Solución 1* durante 5 min. en agitación a 65°C
2. Lavar la membrana con la *Solución 2* durante 30 min. en agitación a 65°C. Repetir 2 veces
3. Lavar la membrana con la *Solución 3* durante 30 min. en agitación a 65°C. Repetir 2 veces

	<b>Sol. 1 (SSC 2x-SDS 0,5%)</b>	<b>Sol. 2 (SSC 0,5x-SDS 0,1%)</b>	<b>Sol. 3 (SSC 0,1x-SDS 0,1%)</b>
SSC 20x	100 ml	25 ml	5 ml
H <sub>2</sub> O	875 ml	970 ml	990 ml
SDS 20%	25 ml	5 ml	5 ml

### 11.2.5 Exposición

#### Procedimiento:

1. Exponer a -80°C en un film de autoradiografía (35x43, Kodak Scientific Imaging Film XAR-5)

### 11.3 HIBRIDACIÓN SLOT-BLOT

Permite realizar transferencias directas de ácidos nucleicos en solución a filtros mediante la filtración de la solución por aplicación de una presión negativa (vacío).

Procedimiento:

1. Llevar las muestras de DNA a un volumen final de 100 µl y añadir 400 µl de NaOH 0,5 N
2. Humedecer con H<sub>2</sub>O estéril la membrana de Nylon (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech)
3. Montar el aparato PR 600 SlotBlot (Hoefer Scientific Instruments) siguiendo las instrucciones del fabricante
4. Conectar el aparato a una bomba y aplicar el vacío. Desconectar el vacío y cargar los pocillos con las muestras (es importante que no se formen burbujas). Hay que cargar todos los pocillos para que la fuerza de succión sea la misma en toda la membrana. Conectar el vacío
5. A medida que las muestras se vayan filtrando, lavar los pocillos con 500 µl de NaOH 0,4 N. Repetir 2 veces
6. Aplicar el vacío hasta que los pocillos estén secos. Desmontar el aparato (sin desconectar el vacío) y retirar la membrana
7. Lavar la membrana durante 2 min. con SSC 2x
8. Fijar el DNA a la membrana con U.V durante 5 min. o bien a 80°C durante 2 h.
9. Hibridación igual que en Apartado 11.1.3
10. Lavados igual que en Apartado 11.1.4
11. Exposición en pantalla y posterior escáner con PhosphorImager (Personal Molecular Imagen FX System, BIORAD).
12. Tratamiento de los datos según el [Apartado 16.3](#)

### 11.4 DESHIBRIDAR UN FILTRO HIBRIDADO CON DNA/RNA

Procedimiento:

1. Lavar la membrana con SSC 2x durante 5 min.
2. Calentar SDS 1% hasta su ebullición y tirar sobre la membrana
3. Mantener 30 min. a 65°C en agitación
4. Dejar enfriar durante 30 min. en agitación
5. Lavar la membrana 5 min. con SSC 2x y volver a prehibridar o bien almacenar a TA

## 12. Técnica SSAP de Marcadores Moleculares

El SSAP (*Sequence- Specific Amplification Polymorphism*) es una derivación de la técnica AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), donde se amplifica una región comprendida entre un cebador complementario a una secuencia del RTN-LTR (cebador específico) y un sitio de restricción cercano donde se le ha unido un oligonucleótido adaptador (cebador selectivo) (Waugh et al., 1997; Kumar et al., 2001).

En la **Figura 63 de Resultados** se muestra un esquema de la técnica SSAP que consiste en:

## 12.1 DIGESTIÓN SIMPLE DEL DNA GENÓMICO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

En este trabajo se han testado dos digestiones simples en paralelo, utilizando TaqI (enzima de corte frecuente) y PstI (enzima de corte poco frecuente) como enzimas de restricción.

Procedimiento:

1. Mezclar en tubo Eppendorf:

<b>TaqI</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Concentración stock</b>
DNAg	Aprox. 1 µg	
0,25 µl TaqI (Biolabs)	5 u	20 u/µl
2 µl Buffer (Biolabs)	1x	10x
0,2 µl BSA (Biolabs)	1x	100x
H <sub>2</sub> O	Hasta Volumen de 20 µl	

Incubar a 65°C durante 2h.

<b>PstI</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Concentración stock</b>
DNAg	Aprox. 1 µg	
0,5 µl PstI (Roche)	5 u	10 u/µl
2 µl Buffer (Roche sure/cut H)	1x	10x
H <sub>2</sub> O	Hasta Volumen de 20 µl	

Incubar a 37°C durante 2h.

## 12.2 LIGACIÓN DE LOS ADAPTADORES

### 12.2.1 Preparación de los adaptadores

Se prepara una combinación de adaptadores ligados entre si para cada enzima de restricción. En nuestro caso, utilizamos adaptadores para *TaqI* y *PstI*.

**TaqI**    Secuencia cadena *forward* : 5' GAT GGA TCC TGA G            3'  
               Secuencia cadena *reverse* : 3' TA CCT AGG ACT CGC            5'

**PstI**    Secuencia cadena *forward* : 5' CTC GTA GAC TGC GTA CAT GCA    3'  
               Secuencia cadena *reverse* : 3' CAT CTG ACG CAT GT            5'

Procedimiento:

1. Mezclar en tubo Eppendorf:

25 µg	secuencia cadena <i>forward</i>
25 µg	secuencia cadena <i>reverse</i>
Hasta 100 µl	H <sub>2</sub> O

2. Incubar a 65°C durante 10 min.
3. Mantener en hielo
4. Incubar a 37°C durante 10 min.
5. Incubar a Temperatura ambiente 10 min.
6. Mantener en hielo
7. Almacenar a -20°C

## Material y Métodos

### 12.2.2 Ligación de los adaptadores

#### Procedimiento:

1. Añadir a los 20 µl de la digestión:

		Concentración final	Concentración stock
20 µl	DNA digerido		
0,5 µl	Adaptadores ligados entre si	20 pmol	
0,5 µl	T4 DNA Ligasa (Fermentas)	0,5 u	1 u/µl
2 µl	Buffer (Fermentas)	1x	10x

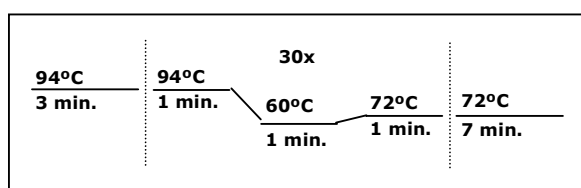
2. Incubar a TA durante ON.

### 12.3 PREAMPLIFICACIÓN

Este paso es opcional. Es deseable en aquellos casos donde el RTN-LTR está presente en un número de copias elevado, generando en la SSAP- PCR un número de bandas demasiado abundante y poco manejable. Con la preamplificación se reduce el número de bandas para pasos posteriores y se enriquece la muestra con secuencias de tamaño inferior a 1 kb.

	Concentración final	Concentración stock
1 µl	DNAg digerido + ligado Adaptadores	
2,5 µl	Buffer PCR	1x
1 µl	Cebador To (*)	50 ng
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
2,5 µl	DNTPs	200 µM
0,2 µl	Taq polimerasa High Fidelity	1 u
16,3 µl	H <sub>2</sub> O	Hasta Volumen de 25 µl

- (\*) **Cebador To**, secuencia complementaria al adaptador de *TaqI*: 5' GATGGATCCTGAGCGA 3'  
**Cebador Po**, secuencia complementaria al adaptador de *PstI*: 5' GACTGCGTACATGCAG 3'



A partir de este paso, el protocolo varía según la aproximación experimental utilizada: marcaje no radioactivo (a) o marcaje radioactivo (b):

#### APROXIMACIÓN NO RADIATIVA

##### 12.4a SSAP-PCR NO RADIATIVA

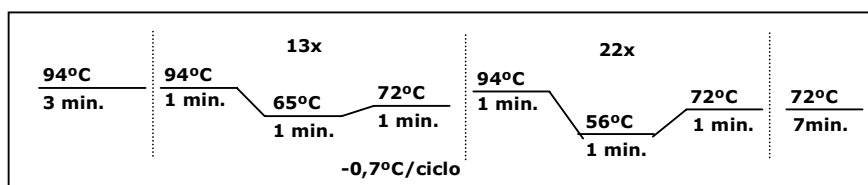
En la SSAP-PCR se ha utilizado como cebador específico de RTN-LTR el oligo13, cuya secuencia es complementaria a una zona de la LTR de CIRE1. Como cebadores selectivos se

## Material y Métodos

han utilizado Tt, Ttg, Ttgc (para *TaqI*) y Pc, Pcg, Pcga (para *PstI*), con diferentes bases selectivas (1, 2 o 3) para testar aquella combinación que genera una cantidad de bandas específicas de CIRE1 suficiente y manejable.

	Concentración final	Concentración stock
2 µl Preamplificación		
2 µl Buffer PCR	1x	10x
1 µl Cebador específico (Oligo13)	50 ng	50 ng/µl
1 µl Cebador selectivo (*)	50 ng	50 ng /µl
1,2 µl MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	25 mM
2 µl dNTPs	200 µM	2 mM
0,1 µl Taq polimerasa High Fidelity	0,35 u	3,5 u/µl
10,7 µl H <sub>2</sub> O	Hasta Volumen de 20 µl	

- (\*) **Cebador Tt**, complementario adaptador *TaqI* con 1 base selectiva: 5' GATGGATCCTGAGCGAT 3'  
**Cebador Ttg**, complementario adaptador *TaqI* con 2 bases selectivas: 5' GATGGATCCTGAGCGATG 3'  
**Cebador Ttgc**, complementario adaptador *TaqI* con 3 bases selectivas: 5' GATGGATCCTGAGCGATGC 3'  
**Cebador Pc**, complementario adaptador *PstI* con 1 base selectiva: 5' GACTGCGTACATGCAGC 3'  
**Cebador Pcg**, complementario adaptador *PstI* con 2 bases selectivas: 5' GACTGCGTACATGCAGCG 3'  
**Cebador Pcga**, complementario adaptador *PstI* con 3 bases selectivas: 5' GACTGCGTACATGCAGCGA 3'



### 12.5a ELECTROFORESIS EN GEL POLIACRILAMIDA 6%

#### 12.5a.1 Limpieza de vidrios (tamaño 20cm x 50cm)

##### Procedimiento:

- Lavar ambos vidrios con un paño suave siguiendo este orden: H<sub>2</sub>O con jabón, H<sub>2</sub>O destilada, EtOH, H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O destilada
- En campana, poner en uno de los vidrios la *Solución Binding* frotando con un papel. Dejar secar 5 min. Frotar con un papel con EtOH 95% (2 veces). Frotar con un papel con H<sub>2</sub>O destilada
- En campana, siliconizar el otro vidrio con la *Solución Repelente* frotando con un papel. Dejar secar 5 min. Frotar con un papel con EtOH 95% (2 veces). Frotar con un papel con H<sub>2</sub>O destilada

##### Solución *binding*

3 µl <i>Binding</i>
950 µl EtOH
5 µl Acido acético glacial [PANREAC]
45 µl H <sub>2</sub> O

##### Solución *repelente*: dichlordimethylsilan (MERCK)

#### 12.5a.2 Montaje de los vidrios

## Material y Métodos

---

### Procedimiento:

1. Colocar los separadores de 4mm en los laterales de uno de los vidrios, y situar el otro vidrio encima y uniéndolos con pinzas a lo largo de todo el lateral

### 12.5a.3 Preparar el gel de poli(acrilamida) 6%

#### Procedimiento:

1. Mezclar en un vaso de precipitado

---

50 ml	PAGE 6% acrilamida
270 $\mu$ l	Persulfato de amonio (APS) 15% [AMRESCO]
40 $\mu$ l	TEMED [PHARMACIA]

---
2. Añadir la solución entre los dos vidrios. Colocar el peine (4 mm). Dejar que solidifique
3. Cuando haya solidificado, marcar los pocillos en el vidrio y sacar el peine. Vaciar bien de acrilamida los pocillos utilizando una jeringa Hamilton
4. Llenar la cubeta con TBE 1x y realizar *pre-running*: electroforesis durante 30min. a 95w. (Constante); 2900-2300 v; 50-65 mA.

#### **PAGE 6% acrilamida** (almacenar a 4°C en oscuridad)

---

100 ml	TBE 10x (Concentración final 1x)
294,5 g	Urea (Concentración final 5 M)
400 ml	H <sub>2</sub> O
	Disolver (podría calentarse para facilitar la disolución, pero sin que nunca llegue a hervir)
150 ml	Acrilamida 40% (19:1), 38% acrilamida-2% bisacrilamida [APPLICHEM] (Concentración final 6%)
Hasta 1L	H <sub>2</sub> O

---

#### **TBE 10x** (almacenar a TA)

---

108 g	Tris [BOEHRINGER]
55 ml	Ácido bórico [MERCK]
40 ml	EDTA (0,5 M pH 8)
Hasta 1L	H <sub>2</sub> O

---

### 12.5a.4 Electroforesis en TBE 1x

#### Procedimiento:

1. De cada muestra de SSAP-PCR, coger 5  $\mu$ l de PCR y añadir 5  $\mu$ l de *Tampón de Carga*
2. Desnaturalizar durante 5 min. a 95°C. Mantener en hielo
3. Cargar en el gel 4  $\mu$ l de la mezcla. Electroforesis a 95w. (constante); 2900-2300 v; 50-65 mA. (durante 2-3 h.)

#### **Tampón de carga**

---

EDTA	10mM
Bromophenol blue	0,025 %
Xilècianol	0,025 %
Formamida	Hasta 23 ml

---

### 12.5a.5 Fijación y Tinción con plata

Dado el gran tamaño del gel, para facilitar el proceso se utilizan alternativamente dos cubetas (A y B).

#### Procedimiento:

1. Desmontar con cuidado de manera que el gel quede unido al vidrio al que se le ha aplicado la solución *binding*
2. Poner este vidrio con el gel en la cubeta A y añadir 1L de Ácido acético glacial 10% (solución fijadora) y mantener en agitación suave desde 20 min. hasta ON.
3. Recuperar el ácido acético glacial 10% para pasos posteriores. Realizar 3 lavados con 1L de H<sub>2</sub>O destilada en la cubeta A en agitación suave durante 2 min.
4. Añadir 1L de *Solución de tinción* a la cubeta B. Pasar el vidrio con el gel a la cubeta B y mantener en agitación suave durante 30 min.
5. Lavado rápido de 5 seg. con H<sub>2</sub>O destilada en la cubeta A. Sacar el vidrio con el gel. Dejar a parte mientras se vacía la cubeta A y se le añade la *Solución reveladora*
6. Poner el vidrio con el gel en la cubeta A y dejar en agitación hasta que el marcaje sea el deseado (máximo 5 min.)
7. Poner en la cubeta B el ácido acético glacial 10% recuperado. Pasar rápidamente el vidrio con el gel a la cubeta B cuando se quiera parar la reacción
8. Realizar 2 lavados con 1L de H<sub>2</sub>O destilada en agitación suave durante 2 min.
9. Dejar secar el gel y escanear

#### Solución de tinción

---

1 g	Nitrato de plata (AgNO <sub>3</sub> ) [MERCK]
1 L	H <sub>2</sub> O destilada
1,5 ml	Formaldehído 37% (*)

---

(\*) El formaldehído ha de añadirse justo antes de utilizar la solución

#### Solución reveladora (mantener en frío)

---

30 g	Carbonato de sodio (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) [MERCK]
200 µl	Solución de <i>Tiosulfato de sodio 1x</i>
1 L	H <sub>2</sub> O destilada
1,5 ml	Formaldehído 37% (*)

---

(\*) El formaldehído ha de añadirse justo antes de utilizar la solución

#### Solución de Tiosulfato de sodio 10x

---

0,04 g	tiosulfato sodio (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O) [PANREAC]
400 µl	H <sub>2</sub> O destilada

---

Para obtener la solución a 1x a utilizar, diluir 100 µl de solución 10x en 900 µl de H<sub>2</sub>O destilada mantener en oscuridad y a 4°C hasta su utilización

## 12.6a PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE PCR A PARTIR DE GELES DE POLIACRILAMIDA TEÑIDOS CON PLATA

El método utilizado se basa en el trabajo descrito en Stumm B. et al., 1997.

#### Procedimiento:



## Material y Métodos

1. Preparar la mix de PCR según:

	Concentración final	Concentración stock
2 µl Buffer PCR	1x	10x
1,5 µl Cebador directo	750 nM	20 µM
1,5 µl Cebador complementario	750 nM	20 µM
2,4 µl MgCl <sub>2</sub>	3 mM	25 mM
2 µl dNTPs	200 µM	2 mM
0,4 µl Taq polimerasa		
9,6 µl H <sub>2</sub> O	Hasta Volumen de 20 µl	

2. Mojar una aguja estéril en el tubo que contiene los 20 µl de mix de PCR
3. Rascar con la aguja la banda de interés directamente sobre el gel de poliacrilamida teñido con plata
4. Mantener la aguja de nuevo en el tubo con la mix de PCR durante 5 min.
5. Reamplificar siguiendo el mismo programa de PCR que se ha utilizado para obtener el producto
6. Coger 10 µl del producto de PCR para realizar un gel de agarosa de comprobación
7. Realizar una dilución 1:10 del producto de la PCR (4 µl de PCR en 36 µl de H<sub>2</sub>O)
8. De estos 40 µl, coger 6,25 µl y añadir 3,75 µl de H<sub>2</sub>O. Sobre estos 10 µl realizar la siguiente reacción de PCR utilizando de nuevo el mismo programa que en el paso 5

	Concentración final	Concentración stock
10 µl DNA molde		
2 µl Buffer PCR+ 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>	1x	10x
3,75 µl Cebador directo	750 nM	20 µM
3,75 µl Cebador complementario	750 nM	20 µM
0 µl MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	25 mM
5 µl dNTPs	200 µM	2 mM
0,2 µl Taq polimerasa		
22,3 µl H <sub>2</sub> O	Hasta Volumen de 50 µl	

### APROXIMACIÓN RADIATIVA

#### **12.4b MARCAJE RADIATIVO CON $\gamma$ -P<sup>33</sup>**

Se ha utilizado el kit *T4 Polynucleotide Kinase* suministrado por la casa Fermentas.

##### 12.4b.1 Marcaje radiactivo con $\gamma$ -P<sup>33</sup> del cebador específico de la LTR de CIRE1

Se necesita 1 µl de cebador marcado radiactivamente para cada reacción de PCR.

##### Procedimiento:

1. Mezclar en un tubo Eppendorf:

	1x
0,2 µl $\gamma$ -P <sup>33</sup> -ATP	
0,13 µl Oligo13 (50 ng/µl)	
0,1 µl 10x Kinase Buffer A (FERMENTAS)	
0,025 µl T4 PN Kinase (FERMENTAS)	
Hasta 1 µl H <sub>2</sub> O	

2. Incubar a 37°C durante 30 min.
3. Incubar a 70°C durante 10 min.
4. Pasar a 4°C. Centrifugar a 13.000 r.p.m durante 5 seg.
5. Mantener a 4°C hasta su utilización inmediata o almacenar a -20°C.

### 12.4b.2 Marcaje radiactivo con $\gamma$ -P<sup>33</sup> del marcador de peso molecular (10 pb)

Se ha utilizado como marcador de peso molecular el *10 bp DNA Ladder* suministrado por la casa Invitrogen, que determina diferencias de 10 pb en un rango de 330 pb-10 pb.

Procedimiento:

1. Mezclar en un tubo Eppendorf:

1x
3 $\mu$ l $\gamma$ -P <sup>33</sup> -ATP 1 $\mu$ l DNA ladder (1 pg/ $\mu$ l) 2 $\mu$ l 10x Kinase Buffer B (FERMENTAS) 4 $\mu$ l PPEG 6000 0,5 $\mu$ l T4 PN Kinase (FERMENTAS) Hasta 20 $\mu$ l H <sub>2</sub> O

2. Incubar a 37°C durante 30 min.
3. Incubar a 70°C durante 10 min.
4. Pasar a 4°C. Centrifugar a 13.000 r.p.m durante 5 seg.
5. Mantener a 4°C hasta su utilización inmediata o almacenar a -20°C.

### 12.5b SSAP-PCR

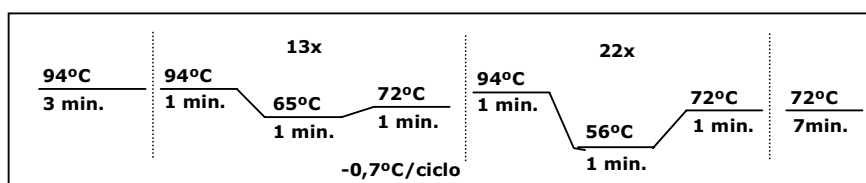
En esta aproximación se ha utilizado también como cebador específico de RTN-LTR el oligo13, que ha sido marcado radiactivamente. Como cebadores selectivos se han utilizado Ttg (para *TaqI*) y Pcg (para *PstI*), ambos con dos bases selectivas para reducir la cantidad de bandas específicas de CIRE1 hasta un número manejable.

	Concentración final	Concentración stock
2 $\mu$ l Preamplificación		
2 $\mu$ l Buffer PCR	1x	10x
1 $\mu$ l $\gamma$ -P <sup>33</sup> -ATP Oligo13	50 ng	50 ng/ $\mu$ l
0,5 $\mu$ l Cebador específico (Oligo13)	25 ng	50 ng / $\mu$ l
1 $\mu$ l Cebador selectivo (*)	50 ng	50 ng / $\mu$ l
1,2 $\mu$ l MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	25 mM
2 $\mu$ l DNTPs	200 $\mu$ M	2 mM
0,1 $\mu$ l Taq polimerasa High Fidelity	0,35 u	3,5 u/ $\mu$ l
10,2 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	Hasta Volumen de 20 $\mu$ l	

(\*)

**Cebador Ttg**, complementario adaptador *TaqI* con 2 bases selectivas: 5' GATGGATCCTGAGCGATG 3'

**Cebador Pcg**, complementario adaptador *PstI* con 2 bases selectivas: 5' GACTGCGTACATGCAGCG 3'



## Material y Métodos

---

### 12.6b ELECTROFORESIS EN GEL POLIACRILAMIDA 6%

#### 12.6b.1 Limpieza de vidrios (tamaño 30cm x 50cm)

Procedimiento:

1. Lavar ambos vidrios con un paño suave siguiendo este orden: H<sub>2</sub>O con jabón, H<sub>2</sub>O destilada, EtOH, H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O destilada.
2. En campana, siliconizar el vidrio más pequeño con la *Solución repelente* frotando con un papel. Dejar secar 5 min. Frotar con un papel con EtOH 95% (2 veces). Frotar con un papel con H<sub>2</sub>O destilada. Siliconizar los vidrios cada 5-6 geles

**Solución repelente:** dichlordimethylsilan [MERCK]

#### 12.6b.2 Montaje de los vidrios

Procedimiento:

1. Colocar los separadores de 4mm en el lateral del vidrio más grande, y colocar un trozo de papel Whatmann 3MM de 1,5 cm en la parte baja del vidrio para sellar el gel (Opcionalmente podría sellarse con 10 ml PAGE + 36µl APS 25% + 80 µl TEMED) y colocar el vidrio pequeño encima uniéndolos con pinzas a lo largo de todo el lateral.

#### 12.6b.3 Preparar el gel de poliacrilamida 6%

Procedimiento:

1. Mezclar en un vaso de precipitado

---

80 ml	PAGE 6% acrilamida
80 µl	APS 25% [AMRESCO]
80 µl	TEMED [PHARMACIA]

---
2. Añadir la solución entre los dos vidrios. Colocar el peine (4 mm). Dejar que solidifique
3. Cuando haya solidificado, marcar los pocillos en el vidrio y sacar el peine. Vaciar bien de acrilamida los pocillos utilizando una jeringa Hamilton.
4. Llenar la cubeta superior con TBE 0,5x y la cubeta inferior con *Acetato de amonio 1 M*. Realizar *pre-running*: electroforesis durante 30min. a 50w.

**PAGE 6% acrilamida** (almacenar a 4°C en oscuridad)

---

50 ml	TBE 10x (Concentración final 0,5x)
420 g	Urea (Concentración final 7M)
Hasta 800 ml	H <sub>2</sub> O

Disolver (podría calentarse para facilitar la disolución, pero sin que nunca llegue a hervir)

125 ml	Acrilamida 40% (19:1) [APPLICHEM] (Concentración final 6%)
Hasta 1L	H <sub>2</sub> O

---

**Acetato de amonio 5M**

---

385 g	Acetato de amonio (CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> ) [MERCK]
Hasta 1L	H <sub>2</sub> O

---

Al diluir 100 ml de Acetato de amonio 5M en 400 ml de agua, se obtiene la disolución 1M.

### 12.6b.4 Electroforesis en TBE 0,5x

#### Procedimiento:

1. De cada muestra de SSAP-PCR radiactiva  $\gamma$ -P<sup>33</sup>, coger 5  $\mu$ l y añadir 5  $\mu$ l de tampón de carga
2. Desnaturalizar durante 5 min. a 95°C. Mantener en hielo
3. Cargar en el gel 2  $\mu$ l de la mezcla. Electroforesis a 95 w.(constante), 2900-2300 v., 50-65 mA. (durante 2-3 h.)

#### **Tampón de carga**

EDTA	10mM
Bromophenol blue	0,025 %
Xilècianol	0,025 %
Formamida	Hasta 23 ml

### 12.6b.5 Tratamiento del gel SSAP radiactivo

#### Procedimiento:

1. Vaciar la cubeta superior que contiene el TBE 0,5x
2. Desmontar con cuidado quitando el vidrio pequeño y poner el otro vidrio con el gel en una cubeta. Fijar tirando directamente sobre el gel la *Solución Fijadora* y mantener como mínimo 20 min.
3. Una vez fijado, se saca de la cubeta la solución y después el vidrio con el gel (es importante seguir este orden para que no se rompa el gel)
4. Colocar un papel Whatmann 3MM de 30cmx50cm secuencialmente sobre el gel sin que se formen burbujas, de manera que quede enganchado en el papel y separar con delicadeza del vidrio. Tapar con un plástico transparente y colocarlo todo entre dos papeles de filtro. Recortarlo todo de manera que ocupe el mismo tamaño del secador de geles
5. Secar durante una 1 h. a 80°C en un secador de geles
6. Exponer a -80°C en un film de autoradiografía (35x43, Kodak Scientific Imaging Film XAR-5)

#### **Solución Fijadora**

Ácido acético glacial	10%
Metanol	10 %

## 13. Determinación de la expresión de GUS de muestras transformadas

### 13.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS VEGETALES PARA EL BOMBARDEO CON MICROPROYECTILES

#### 13.1.1 Preparación de Epidermis de Cebolla

Se recomienda utilizar cebollas muy frescas, y de tamaño pequeño. Se preparan justo antes del bombardeo.

## Material y Métodos

---

### Procedimiento:

1. Cortar la cebolla en 4 trozos
2. Con pinzas coger una zona interna de la capa epidérmica sin dañar el tejido. Colocar en placas de *medio MS* y mantener en oscuridad, como mínimo 1 hora antes de bombardear.

### 13.1.2 Preparación de Suspensiones de tabaco W38

#### Procedimiento:

1. Poner en placas de *medio sólido NK1* papel de filtro estéril y colocar encima las suspensiones celulares de tabaco mantenidas en *medio NK1 líquido*. Mantener a 26°C y en oscuridad durante 4 días
2. Unas 4 horas antes del bombardeo, pasar con pinzas el papel de filtro con las células a un nuevo medio NK1 con 0,2M de manitol

#### **Medio MS** pH5,8

---

MS 4.3 g/L; Sacarosa 30 g/l; MES 500mg/l; Agar 8 g/l

---

#### **Medio NK1** pH 5,8 (callos y suspensiones celulares W38 de tabaco)

---

MS 4.3 g/L; Sacarosa 50g/L; Piridoxina 1 mg/L; Ac.nicotinico 1 mg/L; Tiamina 10 mg/L; Inositol 100 mg/L; MES 533 mg/L; Gelrite 2 g/L; Kinetina 0.1 mg/L; NAA 1 mg/L

---

#### **Medio NK1 con manitol** pH 5,8

---

MS 4.3 g/L; Sacarosa 50g/L; Piridoxina 1 mg/L; Ac.nicotinico 1 mg/L; Tiamina 10 mg/L; Inositol 100 mg/L; MES 533 mg/L; Manitol 0.2 M; Gelrite 2 g/L; Kinetina 0.1 mg/L; NAA 1 mg/L

---

## 13.2 TRANSFERENCIA DE DNA MEDIANTE BOMBARDEO

### 13.2.1 Preparación de las Partículas de oro (1µm de diámetro)

#### Procedimiento:

1. Pesar 60 mg de partículas de oro en un Eppendorf y añadir 1 ml de EtOH absoluto (grado HPLC). Agitar en vórtex durante 10 min. y centrifugar durante 1 min. a 10.000 r.p.m. (o 10 s a 14000 r.p.m.). Descartar el sobrenadante
2. Lavar el pellet con H<sub>2</sub>O destilada estéril. Agitar en vórtex 1 min. y centrifugar durante 1 min. a 10.000 r.p.m. (Repetir 4 veces)
3. Resuspender el precipitado de partículas en 1 ml de glicerol al 50% (siguiendo la relación: 60% mg de partículas/1 ml glicerol 50%), agitando en vórtex durante 1 minuto.
4. Repartir en alícuotas (es importante vortear entre alícuota y alícuota para asegurar que reciben la misma cantidad de partículas). Almacenar a 4° C.

### 13.2.2 Recubrimiento de las partículas de oro con DNA

Es recomendable preparar el DNA máximo 2 h. antes de bombardear.

### Procedimiento:

1. Hacer la precipitación de cada muestra secuencialmente
2. Añadir en un tubo de 2ml (Sarstedt, Alemania) bajo agitación continua (vórtex durante 10 sec. entre componente y componente)

---

15  $\mu$ l Partículas de oro

10  $\mu$ l DNA (4  $\mu$ g)

1  $\mu$ l CaCl<sub>2</sub> 0,1 M

---

20  $\mu$ l Espermidina 0,1 M

3. Mezclar durante 30 seg. la mezcla. Mantener en hielo 15 min.
4. Centrifugar 8 seg. a 3.000 r.p.m. y eliminar el sobrenadante
5. Añadir 500  $\mu$ l de EtOH HLPC. Mezclar con vórtex 30 seg. Dejar reposar en hielo 15 min.
6. Centrifugar 8 seg. a 3.000 r.p.m. y eliminar el sobrenadante
7. Añadir 200  $\mu$ l de EtOH HLPC. Mezclar con vórtex 30 seg. Dejar reposar en hielo 15 min.
8. Centrifugar 8 seg. a 3.000 r.p.m. y eliminar el sobrenadante
9. Añadir 20  $\mu$ l de EtOH HLPC

### 13.2.3 Bombardeo

#### Procedimiento:

1. Poner en marcha la cabina de flujo laminar donde está el aparato de bombardeo. Esterilizar el aparato y las piezas sueltas con EtOH absoluto. En placas Petri, esterilizar brevemente con EtOH absoluto las membranas portadoras y las rejillas de parada, que se ponen a continuación a secar (es importante que todo esté bien seco para su uso correcto).
2. Encender la bomba de vacío. Abrir la llave de la bombona de helio. Ajustar la presión para que sea 200 psi mayor que la resistencia nominal de los discos de ruptura que se van a usar.
3. Poner la membrana portadora en el soporte de membrana que debe estar en una superficie horizontal (comprobar con el nivel). La membrana portadora debe quedar bien ajustada (plana) al soporte.
4. Justo antes de bombardear, sonicar secuencialmente cada muestra 3 veces durante 3-5 seg. cada vez. Añadir 8  $\mu$ l a cada uno de las membranas portadoras. Aguardar hasta que el etanol se evapore completamente (5 min son suficientes).
5. Esterilizar con EtOH absoluto ó con Isopropanol los discos de ruptura.
6. Poner una rejilla de parada en el soporte disparador y a continuación el soporte con la membrana, de manera que la cara con las partículas quede mirando a la rejilla. Cerrar con el tapón del disparador. La distancia entre la membrana portadora y la rejilla es de 6 mm.
7. Poner el disco de ruptura en su soporte. Enroscarlo en la extremidad del cilindro de gas hasta que quede fijo.
8. Poner el soporte disparador ya montado en el nivel 5 (considerando como 1 el más cerca de la base). Ajustar la distancia entre éste y el soporte de ruptura para que sea 8 mm.
9. Poner la placa de petri con el material a ser bombardeado en el nivel 3 y cerrar la cámara.
10. Accionar la bomba de vacío hasta que el manómetro llegue a 27 (0,1 atm). Accionar el botón de disparo hasta que se rompa la membrana. Abrir el vacío inmediatamente.
11. Una vez que la presión haya subido al nivel normal, abrir la cámara y sacar la muestra.
12. Para saber si el disparo ha sido perfecto se comprueba si el disco de ruptura se ha roto adecuadamente.

## **Material y Métodos**

---

El tejido bombardeado se mantiene en oscuridad y a TA. durante un determinado tiempo. El tratamiento a realizar después dependerá del tipo de determinación que se haga: histoquímica o fluorimétrica.

### **13.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD $\beta$ -GLUCURONIDASA**

#### 13.3.1 Preparación de Extractos Proteicos

Pasadas 24h. del bombardeo, las muestras fueron recolectadas, transferidas a tubos Eppendorfs, inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y finalmente almacenadas a  $-80^{\circ}$  C. En el momento de realizarse la extracción de proteínas se sacan las muestras del congelador, se ponen a temperatura ambiente durante 2 min. y se mantienen en hielo durante todo el proceso.

##### Procedimiento:

1. Añadir 150  $\mu$ l de *Tampón de Extracción de GUS* a cada tubo. Mantenerlos en hielo. Macerar vigorosamente el tejido en tubo Eppendorf acoplado a un embolo y devolver el tubo al hielo. Una vez maceradas todas las muestras, añadir 150  $\mu$ l más de Tampón cada tubo y mezclar con vórtex durante 5 seg.
2. Agitar con orbital durante 1 h. a  $4^{\circ}$ C
3. Mezclar con vórtex durante 5 seg.
4. Centrifugar a  $4^{\circ}$  C durante 15 min a 13.000 r.p.m. y pasar el sobrenadante a un nuevo tubo
5. Cuantificar (Apartado 13.3.2) y congelar las muestras a  $-80^{\circ}$ C hasta su utilización

#### **Tampón de extracción GUS (GEB)**

NaPO <sub>4</sub> (pH 7)	50 mM
$\beta$ -Mercaptoetanol	10 mM
EDTA (pH 8)	10 mM
SDS	0,1%
Triton X-100	0,1%

#### 13.3.2 Determinación de la concentración de proteína de los extractos

La reacción se basa en el trabajo original de Bradford (1976) utilizando el kit comercial de la casa Biorad.

##### Procedimiento:

1. Preparar para cada muestra una cubeta de plástico de 1,5 ml con 800  $\mu$ l de agua, menos el volumen de extracto proteico a ser analizado (usualmente 2-4  $\mu$ l).
2. Preparar patrones con proteína BSA de modo que contengan 0, 2, 4, 6 y 8  $\mu$ g de proteína.
3. Añadir 200  $\mu$ l de reactivo concentrado de Bradford y agitar en vórtex. Esperar 5 min. a TA.
4. Calibrar el aparato con uno de los blancos y medir la absorbancia a 595 nm de los patrones y de las muestras. Trazar una recta patrón con las absorbancias de los patrones de BSA y extrapolar la masa de proteína de las muestras de acuerdo con la absorbancia de cada una.

### 13.3.3 Ensayo de la actividad GUS por fluorimetría

La reacción fluorimétrica se ha hecho según lo descrito por Jefferson (1987). La adición de metanol se introdujo para disminuir la actividad GUS endógena de las células (Kosugi *et al.*, 1990).

#### Procedimiento:

1. Distribuir en tubos Eppendorff 400  $\mu$ l de *Tampón de reacción de GUS* con metanol (1 tubo/muestra).
2. Descongelar los extractos proteicos incubando en un baño a 25°C durante 1 minuto y transferir a hielo. Distribuir 100  $\mu$ l de extracto proteico a cada tubo e incubar a 37° C durante aproximadamente 10 min. para equilibrar la velocidad de la reacción.
3. Recolectar 100  $\mu$ l de la mezcla de reacción en un tubo Eppendorf de 2 ml conteniendo 1900  $\mu$ l de tampón de parada. Este será el tiempo cero.
4. Recolectar nuevas alícuotas de 100  $\mu$ l a intervalos de tiempo. Para actividades de GUS altas intervalos de 40 min suelen ser suficientes. Para actividades bajas es recomendable intervalos de 3 a 8 horas, o incluso 24 horas. En el caso que no se vaya a proceder a la lectura de las muestras, mantener las alícuotas a 4° C en la oscuridad (no más de 24 horas).
5. Encender el fluorímetro (TK1000, Hoefler) y esperar 15 min. Distribuir 1,9 ml de tampón de parada en 3 cubetas de fluorimetría (de 3 ml capacidad, casa Sarstedt, Alemania). Añadir 100  $\mu$ l de disolución 1  $\mu$ M de 4-MU a cada cubeta y agitar brevemente. Estas muestras corresponden a patrones de 50 nM de 4-MU (100 pmoles de 4-MU en los 2 ml).
6. Posicionar una cubeta con 2 ml de tampón de parada (sin 4-MU) en el fluorímetro y ajustar la lectura a cero. Posicionar una de las 3 cubetas con 4-MU (paso 5) en el fluorímetro y ajustar la lectura a 500. Repetir la lectura con las otras dos. La variación debe ser de 10-20 unidades de lectura como máximo. De esta forma 5 unidades de lectura corresponden a 1 pmol de 4-MU.
7. Proceder a la lectura de las muestras recolectadas en el tiempo cero y tiempo 1.
8. Calcular la actividad GUS utilizando la siguiente fórmula:  
$$AG = 10 \cdot (UL_{t1} - UL_{t0}) / (t1 \cdot cep)$$
 donde,
  - AG: actividad GUS en pmoles de 4-MU/min/mg
  - UL<sub>t0</sub>: unidades de lectura del fluorímetro de la primera alícuota recolectada (tiempo cero)
  - UL<sub>t1</sub>: unidades de lectura del fluorímetro de la segunda alícuota recolectada (tiempo uno)
  - t1: min transcurridos entre las dos tomas de alícuotas.
  - cep: concentración del extracto proteico en  $\mu$ g/ $\mu$ l

#### **Tampón de reacción para 10 muestras**

---

Tampón extracción GUS	3 ml
Metanol	1 ml
MUG	1,764 mg (10 mM)

---

#### **Solución 4-MU 100mM** (Almacenar a -20°C)

---

4-MU	1,982 mg
DMSO	10 ml

---



## **Material y Métodos**

---

### 13.3.4 Análisis histoquímico por tinción con X-GLUC

El ensayo histoquímico con tinción con X-Gluc detecta la actividad GUS por conversión del sustrato en un producto de color azul. Los protocolos están basados en el trabajo de Jefferson (1987), según modificaciones descritas por Kumashiro et al., (1994)

#### Procedimiento:

1. Las muestras de tejido bombardeado se han mantenido bien en medio MS control o en medio MS con hormonas (según el experimento) a TA y en oscuridad, de 24-48h.

2. Añadir a cada muestra la siguiente solución:

Para 10 ml:

---

8 ml *Tampón P* 50mM pH7

1 mM *X-Gluc* (10mg X-Gluc/100µl DMSO)

20% Metanol

---

3. Infiltrar al vacío durante 1h. e incubar ON a 37°C (en oscuridad)

4. Cuando empiece a verse la coloración azul, se lava con etanol 70% tantas veces como sea necesario para que quede desteñido

#### **Tampón P 50 mM pH 7**

1 ml Solución A (100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O)

4 ml Solución B (100mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 H<sub>2</sub>O)

5 ml H<sub>2</sub>O estéril

---

**X-Gluc:** X-GLCA-Sodium Salt [DUCHEFA]

## **14. Germinación y multiplicación *in vitro* de *Citrus***

### **14.1 GERMINACIÓN A PARTIR DE SEMILLA**

#### 14.1.1 Germinación a partir de semilla en invernadero

##### Procedimiento:

1. Preparar un volumen aproximado de 750 ml (para unas 50 semillas) de *Tampón de Desinfección* de semillas

2. Tapar el matraz con papel de plata y mantener las semillas en agitación continua durante 10 min. (No exceder ese tiempo)

3. Hacer 3 lavados en agitación con H<sub>2</sub>O estéril de 3 min., 10 min. y 10-15 min., en el mismo matraz

4. Dejar secar las semillas sobre papel de filtro

5. Sembrar de manera que la tierra (mezcla de turba y arena) las cubra, pero no demasiado

6. Dejarlas en el invernadero sin luz directa los primeros días (hasta que empiezan a sacar raíz) a 26°C

7. Las semillas que no se siembran, se conservan (una vez secas) envueltas en plástico a 4°C

### Tampón de Desinfección semillas

---

600 ml H<sub>2</sub>O estéril  
150 ml lejía 7%  
1 gota tween(80).

---

#### 14.1.2 Germinación a partir de semilla *in vitro*

##### Procedimiento:

1. Preparar un volumen aproximado de 25 ml (para unas 4 semillas por falcon) de *Tampón de Desinfección1*
2. Mantener las semillas en agitación manual durante 10 min. (No exceder este tiempo)
3. Hacer 3 lavados en agitación con H<sub>2</sub>O estéril de 3 min., 10 min. y 10-15 min.
4. Pelar las semillas bajo la lupa con pinzas y bisturí
5. Preparar un volumen aprox. de 25 ml (para unas 4 semillas por falcon) de *Tampón de Desinfección2*
6. Mantener las semillas en agitación manual durante 5 min.
7. Hacer 2 lavados en agitación con H<sub>2</sub>O estéril de 3 min., y 2 lavados de 10 min. y 10-15 min.
8. Secar las semillas sobre papel de filtro estéril
9. Sembrar en *Medio de Germinación* y mantenerlo a oscuras en la cámara de *in vitro* a 26°C
10. Cuando las semillas saquen raíz, pasarlas a condiciones de fotoperíodo de 16h de luz y 26°C
11. Pasado un mes, suplementar el medio con 1% de sacarosa. Refrescar el medio cada mes.

#### Tampón de Desinfección1

---

20 ml H<sub>2</sub>O estéril  
5 ml lejía 7%  
1 gotilla tween(80).

---

#### Tampón de Desinfección2

---

21 ml H<sub>2</sub>O estéril  
4 ml lejía 7%  
1 gotilla tween(80).

---

#### Medio Germinación *in vitro* de *C.sinensis* (\*)

---

MS (Micro. Macro. Vitaminas) [DUCHEFA] 4,3 g/L

Bacto™ Agar [BD] 6 g/L

---

(\*) Cuando las semillas ya han germinado:

añadir al medio 10 g/L Sacarosa

### 14.2 MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE *CITRUS*

Se han determinado las condiciones de cultivo *in vitro* adecuadas para la obtención de plantas de *Citrus* mediante multiplicación vegetativa. De esta manera se quiere testar la capacidad de regeneración de plantas *Citrus* a partir de tejido vegetativo, sin la formación de callo, ya que se ha visto que la formación de callo puede introducir variabilidad y tiende a disminuir su capacidad regenerativa (Edriss y Burger, 1983).

#### Procedimiento:

1. PASO 1: A partir de una plantita germinada *in vitro* (**Figura 71a**) cortar sobre un papel estéril la raíz y el epicotilo a 1 cm de los cotiledones. La sección del epicotilo y la raíz se realiza a 1 cm del nudo de los cotiledones pues se ha visto que la presencia de los cotiledones favorece la formación de yemas en *C. sinensis* (Burger y Hackett, 1986) (**Figura 71b**).
2. Sembrar en *Medio de Multiplicación* y mantener a 26°C. Refrescar el medio cada mes. Tras mantener las secciones de epicotilo y raíz en medio de multiplicación durante 30 días se observa ya la aparición de los primeros brotes en la parte aérea y callo en la raíz (**Figura 71c**).
3. PASO 2: Cuando han salido ya los nuevos brotes, cortar sobre un papel estéril el epicotilo a 3 mm del punto donde brotan los nuevos tallos (**Figura 71d**).
4. Sembrar en *Medio de Multiplicación* con cuidado que las hojas no toquen el medio, y mantener a 26°C. Refrescar el medio cada mes. Se obtienen gran multiplicación de los tallos de cada línea pasados unos 30 días (**Figura 71e**).
5. PASO 3: Separar los diferentes tallos que se han multiplicado a partir de una misma semilla (**Figura 71f**).
6. Sembrar independientemente en *Medio de Multiplicación* y mantener a 26°C. Refrescar el medio cada mes.
7. No se observan mutaciones fenotípicas en las plantas regeneradas *in vitro*, aunque no se llegó a realizar la aclimatación a tierra en los invernaderos. Este último paso sería pasar cada siembra individualmente a un medio que potencie el desarrollo de raíces y el alargamiento de tallo. Seguidamente habría un paso de aclimatación previo al paso definitivo a tierra.

#### **Medio Multiplicación *in vitro* de *C.sinensis***

---

MS (Micro. Macro) [DUCHEFA]	4,3 g/L
Sacarosa	50 g/L ó 30 g/L
Glicina	2mg/L
Piridoxina	10 mg/L
Ácido nicotínico	5 mg/L
Tiamina	10 mg/L
Inositol	100 mg/L
Bacto™ Agar [BD]	8g/L
BAP	2 mg/L
NAA	0,02 mg/L

---

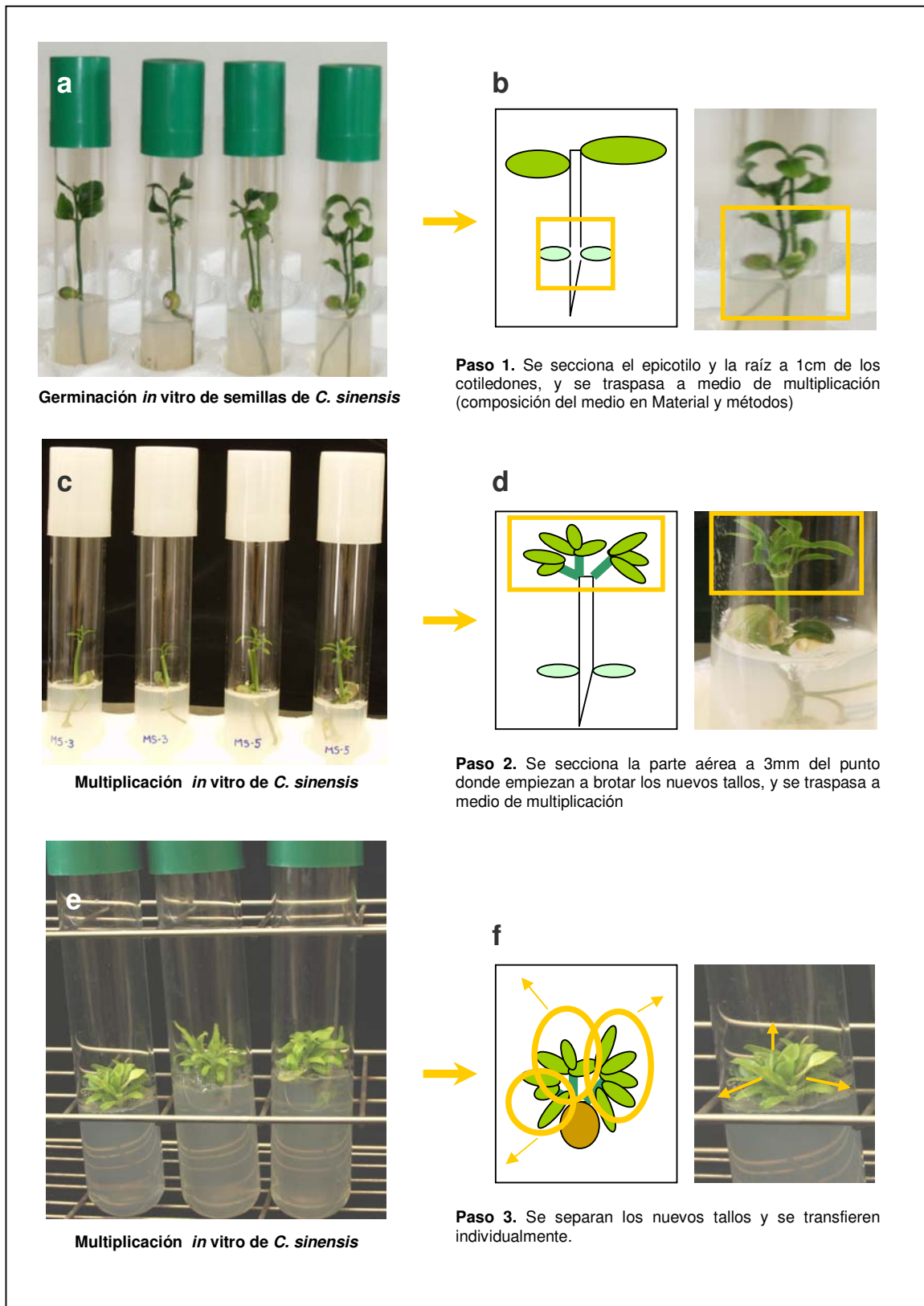


Figura 71. Multiplicación *in vitro* de plantas de *Citrus sinensis* a partir de semilla.

# 15. Análisis de datos

## 15.1 ANÁLISIS DE SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS Y AMINOACÍDICAS

La secuenciación se ha realizado mediante el secuenciador automático ABI PRISM 377 (Applied Biosystems) en el servicio de Secuenciación del Centro IBMB-CSIC.

Las comparaciones de secuencias con las bases de datos (GenBank) se han realizado mediante BLASTN (compara la secuencia nucleotídica con bases de datos nucleotídicas) y BLASTX (compara la secuencia nucleotídica traducida a todas las pautas de lectura con bases de datos proteicas) en la dirección <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>

Los alineamientos de secuencias se han realizado utilizando el programa ClustalW (Thompson et al., 1994) disponible en la dirección <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>

Se ha utilizado el programa GeneDoc versión 2.6.002 (Kart et al., 1997) disponible en la dirección [www.psc.edu/biomed/genedoc](http://www.psc.edu/biomed/genedoc) y el programa BioEdit versión 5.0.9 (Hall, 1999) para visualizar y editar los alineamientos de secuencias.

Se ha utilizado el programa MEGA versión 2.1 (Kumar et al., 2001) para realizar los árboles filogenéticos por el método *Neighbor-Joining* (NJ) (Saitou y Nei, 1987), usando la distancia genética de Kimura 2-parámetros en el caso de las secuencias nucleotídicas y la corrección de Poisson en el caso de las secuencias aminoacídicas. Los valores de Bootstrap se calcularon para 1.000 réplicas. También se ha utilizado el programa MEGA 2.1 para realizar análisis evolutivos moleculares como el cálculo del valor de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) (Nei, 1987) por kimura 2-parámetros con bootstrap para 1.000 réplicas.

Los parámetros de variabilidad genética de poblaciones de secuencias mostrados en el apartado A.5.1.3 de Resultados, se han obtenido utilizando el programa DNAsp3.14 (Rozas y Rozas, 1999) disponible en la dirección <http://www.bio.ub.es/~julio/DnaSP.html>

## 15.2 ANÁLISIS DE DATOS SSAP

A partir del recuento de las bandas SSAP polimórficas presentes en las diferentes especies se genera una matriz binaria que refleja la presencia (1) o ausencia (2) de una banda específica (se realiza una matriz para cada combinación de cebadores). A partir de las matrices se calculan las distancias genéticas entre las especies utilizando el programa TFGA versión 1.3 (Miller, 1997). Se considera que cada banda es un locus con dos posibles alelos (presencia/ausencia) en las 13 poblaciones (13 especies de cítricos en este trabajo) en un organismo diploide y como marcador dominante (estimador de frecuencia alélica de Taylor). Las distancias genéticas se han calculado según Nei's 1972. Las distancias obtenidas se han utilizado para generar árboles filogenéticos por el método NJ y UPGMA con el programa MEGA 2.1, con valores de bootstrap para 1.000 réplicas.

### 15.3 ESTIMACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS POR SLOT-BLOT

La estimación del número de copias de un fragmento de DNA en el genoma de diferentes especies vegetales del género *Citrus* y géneros próximos se ha calculado en base a la señal de hibridación radiactiva del DNA genómico comparada con el DNA del patrón.

El marcaje radiactivo de la pantalla de PhosphorImager se cuantifica mediante el programa QuantityOne.

En cada membrana de *Slot-Blot* se cargan por duplicado tres cantidades de DNA genómico (500 ng, 100 ng y 50 ng) y tres cantidades de la sonda para utilizarlas de patrón (2,5 ng, 0,5 ng y 0,1 ng). Dado que el tamaño del genoma es un valor conocido por la literatura [ejemplo: el genoma haploide de *C.sinensis* tiene 381 Mpb que corresponden a 0,395 pg de DNA (siendo 1 pg=965 Mpb)], conociendo el tamaño de la sonda utilizada se puede saber cual es su peso [ejemplo: 1 copia de la sonda *copia* de 270 pb pesa  $2,75 \cdot 10^{-7}$  pg]. A partir de aquí, se puede saber cuantas copias de la sonda hay en cada *slot* del patrón [ejemplo: en el *slot* de 2,5 pg hay  $9,07 \cdot 10^9$  copias]. Como todas las copias del DNA patrón van a hibridar con la sonda se puede definir una relación entre el marcaje (lectura del QuantityOne) y el número de copias (calculado para cada *slot* del DNA patrón), que permite, por comparación de señal, deducir el número de copias de sonda que hay en cada *slot* de DNA genómico y por extrapolación en el genoma entero.

## 16. Secuencias del EMBL

Las siguientes Tablas muestran los números de acceso a la Base de Datos (EMBL) de las secuencias nucleotídicas pertenecientes a retroelementos utilizadas en este trabajo para la comparación de secuencias y la elaboración de árboles filogenéticos:

\* RTN-LTR tipo *copia* cuya secuencia entera está en las bases de datos

nombre	Especie		Nº Acc. DNA	Nº Acc. Proteína
<b>Tnt1</b>	<i>Nicotinia tabacum</i>	(tabaco)	X13777	P10978
<b>Ta 1-3</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(arabidopsis)	-	S05465
<b>Tto1</b>	<i>Nicotinia tabacum</i>	(tabaco)	D83003	BAA11674.1
<b>TLC1</b>	<i>Lycopersicum chilense</i>	(tomate)	AF279585.2	AAK29467
<b>Sto4</b>	<i>Zea mays</i>	(maíz)	-	T17429
<b>RIRE1</b>	<i>Oryza sativa</i>	(arroz)		BAB21127
<b>BARE1</b>	<i>Hordeum vulgare</i>	(cebada)	Z17327	Z17327
<b>CopiaDM</b>	<i>Drosophila melanogaster</i>	(drosophila)		P04146
<b>Panzee</b>	<i>Cajanus cajan</i>	("guandú")	AJ000893	

## Material y Métodos

\* RTN-LTR tipo *gypsy* cuya secuencia entera está en las bases de datos

nombre	Especie		Nº Acc. DNA	Nº Acc. Proteína
<b>Del1</b>	<i>Lilium henryi</i>	(lirio)	X13886	1510387A
<b>Maggy</b>	<i>Magnaporthe grisea</i>	(hongo)	L35053	AAA33419/AAA33420
<b>Reina</b>	<i>Zea mays</i>	(maíz)	U69258	-
<b>RIRE8A</b>	<i>Oryza sativa</i>	(arroz)	AB014740	BAA75233
<b>GypsyDm</b>	<i>Drosophila melanogaster</i>	(drosophila)		P10401
<b>Cyclops-2</b>	<i>Pisum sativum</i>	(guisante)	AJ000640	-

\* Fragmentos de RT de RTN-LTR tipo *copia* presentes en las bases de datos

nombre	Especie		Nº Acc. DNA	Nº Acc. Proteína
	<i>Citrus sinensis</i>	(naranja)	AY654418	AAT722464
	<i>Citrus sinensis</i>	(naranja)	AY654419	AAT722465
	<i>Citrus sinensis</i>	(naranja)	AY654420	AAT722466
	<i>Citrus sinensis</i>	(naranja)	AY654422	AAT722467
	<i>Citrus sinensis</i>	(naranja)	AY654423	AAT722468
	<i>Citrus limon</i>	(limón)	AF045080.1	AAC02552
<b>TLC1</b>	<i>Lycopersicon chilense</i>	(tomate)	AJ001211	CAA04613
<b>TLC2</b>	<i>Lycopersicon chilense</i>	(tomate)	AJ001212	CAA04614
<b>TLC3</b>	<i>Lycopersicon chilense</i>	(tomate)	AJ001213	CAA04615
<b>TLC4</b>	<i>Lycopersicon chilense</i>	(tomate)	AJ001214	CAA04616
<b>CopiaDM</b>	<i>Drosophila melanogaster</i>	(drosophila)	AAA03512	-
	<i>Alstroemeria aurea</i>	(orquídea silvestre)	AAJ001200	CAA04594
	<i>Amaranthus cruentus</i>	("amaranto")	AF232964	AAG44313
	<i>Beta vulgaris</i>	(acelga)	BVTBV2	CAA93148
	<i>Zea mays</i>	(maíz)	AF398199	AAK84849
	<i>Poncirus trifoliata</i>	(poncirus)	AY654427	AAT72470
	<i>Brassica rapa</i>	(colza)	BRA414059	CAD11830
	<i>Populus ciliata</i>	(chopo)	AY624347	AAT73704
	<i>Amaranthus quitensis</i>	("yuyo colorado")	AF232981	AAG44323
<b>Tto1</b>	<i>Nicotiana tabacum</i>	(tabaco)	D12827	BAA02259
<b>Tto2</b>	<i>Nicotiana tabacum</i>	(tabaco)	D12828	BAA02260
<b>Tto3</b>	<i>Nicotiana tabacum</i>	(tabaco)	D12829	BAA02261

- Alberola, T. M., and R. de Frutos. 1996.** Molecular structure of a *Gypsy* element of *Drosophila subobscura* (*GypsyDs*) constituting a degenerate form of insect retroviruses. *Nucleic Acids Res.* **24**:914-923.
- Aledo R., Raz R., Monfort A., Vicient CM., Puigdomènech P., Martínez-Izquierdo JA . 1995.** Chromosome localization and characterization of a family of long interspersed repetitive DNA elements from the genus *Zea*. *Theor. Appl. Genet.* **90**: 1094-1100.
- Arumuganathan, K. and Earle, E.D. 1991.** Nuclear DNA Content of Some Important Plant Species. *Plant Molecular Biology Reporter* **9**(3): 211-215.
- Asíns M, Monforte A, Mestre P, Carbonell E. 1999.** *Citrus* and *Prunus coccinea*-like retrotransposons. *Theor Appl Genet* **99**: 503-510.
- Bachmann AS., Corpuz G., Hareld WP., Wang G., Collier BA. 2004.** A simple method for the rapid purification of *copia* virus-like particles from *Drosophila* Schneider 2 cells. *Journal Virological Methods* **115**:159-165.
- Barret HC and Rodhes AM. 1976.** A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and close relatives. *Syst. Bot.* **1**:105-136.
- Beguiristain T., Grandbastien MA., Puigdomenech P., Casacuberta JM. 2001.** Three Tnt1 subfamilies show different stress-associated patterns of expression in tobacco. Consequences for retrotransposon control and evolution in plants. *Plant Physiology* **127** : 212-221.
- Bennetzen JL. and Kellogg EA. 1997.** Do plants have a one-way ticket to genomic obesity ? *The Plant Cell* : 1509-1514.
- Boeke, J. D., Corces, V. G. 1989.** Transcription and reverse transcription in retrotransposons. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**: 403-433.
- Bowles D. 1990.** Signals in the wounded plant. *Nature* **343** :314-315.
- Bretó MO., Ruiz C., Pina JA., Asins MJ. 2001.** The diversification of *Citrus clementina* Hort. Ex Tan., a vegetatively propagated crop species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **21**(2): 285-293.
- Bureau T., Wessler S. 1992.** *Tourist*: a large family of small inverted repeat elements frequently associated with maize genes. *The Plant Cell* **4**:1283-1294.
- Burger, D.W. and W.P. Hackett. 1986** Gradients of adventitious bud formation on excised epicotyl and root sections of citrus. *Plant Science* **43**:229-232.
- Cai Q., Guy CL., Moore GA. 1996.** Detection of cytosine methylation and mapping of a gene influencing cytosine methylation in the genome of *Citrus*. *Genome* **39**(2):235-242.
- Cai Q., Guy CL., Moore GA. 1994.** Extension of the linkage map in *Citrus* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of coldacclimation- responsive loci. *Theoretical and Applied Genetics* **89**:606-614.
- Capy P., Anxolabehere D., Langin T. 1994.** The strange phylogenies of transposable elements: are horizontal transfers the only explanation? *Trends Genet* **10**(1):7-12.
- Carr M., Soloway J., Robinson T., Bookfield. 2002.** Mechanisms regulating the copy number of six LTR retrotransposons in the genome of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **110**: 511-518.
- Casa AM., Brouwer C., Nagel A., Waang L., Zhang Q., Kresovich S. y Wessler S. 2000.** The MITE family *Heartbreaker (Hbr)*: Molecular markers in maize. *PNAS* **97**(18):10083-10089
- Casacuberta JM., Santiago N. 2003.** Plant LTR-retrotransposons and MITEs: control of transposition and impact on the evolution of plant genes and genomes. *Gene* **311**: 1-11.
- Casacuberta J.M., Vernhettes S., Audeon C y Grandbastien M.A. 1997.** Quasispecies in retrotransposons: a role for sequences variability in Tnt1 evolution. *Genetica* **100**: 109-117.
- Casacuberta JM., Vernhettes S., Grandbastien MA. 1995.** Sequence variability within the tobacco retrotransposon Tn1 population. *The EMBO J* **14**: 2670-2678.



## **Bibliografía**

---

- Casacuberta JM., Grandbastien MA. 1993.** Characterisation of LTR sequences involved in the protoplast specific expression of the tobacco Tn1 retrotransposon. *Nucleic Acids Reseach* **21(9)**: 2087-2093.
- Chao YT et al. 2003.** TEOS1, a novel transposable element family from *Oryza sativa*. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **44**:1-11.
- Chavanne F., Zhang D.X., Liaud M.F. Cerff R. 1998.** Structured and evolution of *Cyclops*: a novel giant retrotransposon of the *Ty3/Gypsy* family highly amplified in pea and other legume species. *Plant Mol. Biol.* **37**: 363-375.
- Cho YG., Blair MW., Panaud O., McCouch SR. 1996.** Cloning and mapping of variety-specific rice genomic DNA sequences: amplified fragment length polymorphisms (AFLP) from sil.ver-stainer polyacrylamide gels. *Genome* **39**: 373-378.
- Deng, Z. and F.G. Gmitter Jr. 2003.** Cloning and characterization of receptor kinase class disease resistance gene candidates in citrus. *Theoretical and Applied Genetics* **108**:53-61
- Deng Z., Tao Q., Chang Y., Huang S., Ling p., Yu C., Chen C., Gmitter F., Zhang H. 2001.** Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library for citrus and identification of BAC contigs containing resistance gene candidates. *Theor Appl Genet.* **102**:1177-1184.
- Deng Z., Huang S., Ling p., Yu C., Tao Q., Chen C., Wendell M., Zhang H Gmitter F. 2001.** Fine genetic mapping and BAC contig development for the citrus tristeza virus resistance gene locus in *Poncirus trifoliata* (Raf.). *Mol Genet Genomics* **265**:739-747.
- Deng Z et al. 1997.** Development and characterization of SCAR markers linked to the tristeza virus resistance. *Genome* **40**: 697-704.
- Deng, Z. N.; Gentile, A.; Nicolosi, E.; Domina, F.; Vardi, A.; Tribulato, E. 1995.** Identification of *in vivo* and *in vitro* lemon mutants by RAPD markers. *Journal of Horticultural Sciences, Ashford Kent*, **70**:117- 125,.
- Deragon JM., Landry BS., Pélissier T., Tutois S., Tourmente S., Picard G. 1994.** An analysis of retroposition in plants based on a family of SINEs from *Brassica napus*. *J Mol Evol* **39**:378-386.
- Doolittle RF, Feng DF, Johnson MS, McClure MA. 1989.** Origins and evolutionary relationships of retroviruses. *Q Rev Biol* **64**(1):1-30.
- Edriss, M. H. and D. W. Burger. 1983.** Micro-grafting shoot-tip culture of citrus on 3 trifoliolate rootstocks. *Scientia Horticulturae* **23**(3): 255-260.
- Ellis, Poyser, Knox, Vershinin, Ambrose. 1998.** Polymorphism of insertion sites of Ty1-copia class retrotransposons and its use for linkage and diversity analysis in pea. *Mol Gen Genet* **260**: 9-19.
- Erfurth I., Cosson V., Eschstruth A., Lucas H., Kondorosi A., Ratet P. 2003.** Efficient transposition of the Tnt1 tobacco retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* **34**: 95-106.
- EUROPEAN UNION ARABIDOPSIS GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. 1999.** Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **402**:761-777.
- Fang DQ., Federici CT., Roose ML. 1998.** A high-resolution linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Genetics* **150**:883-890.
- Federici CT., Fang DQ., Scora RW., Roose ML. 1998.** Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis *Theor Appl Genet* **96**: 812-822.
- Fedoroff N. 2000.** Transposons and genome evolution in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97(13)**:7002-7007.
- Feschotte C., Jiang N., Wessler SR. 2002.** Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nature Reviews Genetics* **3**: 329-341.
- Feuerbach F., Drouaud J., Lucas H. 1997.** Retrovirus-ike end processing of the tobacco Tnt1 retrotransposon linear intermediates of replication. *Journal of Virology.* **71(5)**:4005-4015.

- Flavell A. 1999.** Long terminal repeat retrotransposons jump between species. *PNAS* **96** (22): 12211-12212.
- Flavell A.J., Knox MR., Pearce SR., Ellis TH. 1998.** Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis. *Plant J.* **16(5)**: 643-650.
- Flavell A.J., Smith J.B., Kumar, A. 1992.** Extreme heterogeneity of *Ty1-copia* group retrotransposons in plants. *Mol. Gen. Genet.* **231**:233-242.
- Friesen N., Brandes A., Heslop-Harrison. 2001.** Diversity, Origin and Distribution of retrotransposons (*gypsy* and *copia*) in conifers. *Mol. Bio. Evol.* **18(7)**:1176-1188.
- García-Martínez J., Martínez-Izquierdo J.A. 2003.** Study on the evolution of the *Grande* retrotransposon in the *Zea* genus. *Mol. Biol. Evol.* **20(5)**: 831-841.
- García R., Asíns MJ., Forner J., Carbonell EA. 1999.** Genetic analysis of apomixis in *Citrus* and *Poncirus* by molecular markers. *Theor Appl Genet* **99**:511-518.
- Gaut, B.S., M. Le Thierry dEnnequin, A.S. Peek, M.C. Sawkins. 2000.** Maize as a model for the evolution of plant nuclear genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **97**:7008-7015.
- GENOME INTERNATIONAL SEQUENCING CONSORTIUM. 2001.** Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860-921.
- Gmitter F et al. 1998.** Utilization of DNA markers in Citrus breeding programs. *Fruits* **53**:303-306.
- Gmitter junior, F. G.; Xiao, s. Y.; Huang, S.; Hu, X. L.; Garnsey, S. M.; Deng, Z. 1996** A localized linkage map of the virus tristeza virus resistance gene region. *Theoretical and Applied Genetics*, **92**: 688- 695.
- Gómez E. 2002.** Estudio del gen 23 del retrotransposón Grande de maíz. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona.
- Grandbastien MA. 1998.** Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends in Plant Science* **3(5)** : 181-187.
- Grandbastien, Luca, Morel, Mhiri, Verhettes, Casacuberta. 1997.** The expression of the tobacco *Tnt1* retrotransposon is linked to plant defense responses. *Genetica.* 100(1-3): 241-252.
- Grandbastien MA., Spielmann A., Caboche M. 1989.** *Tnt1*, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics. *Nature* **337**: 376-380.
- Greco et al. 2001.** Transposon insertional mutagenesis in rice. *Plant Physiology* **125** :1175-1177.
- Green, R. M., A. Vardi, et al. 1986.** The plastome of Citrus: Physical map, variation among Citrus cultivars and species and comparison with related genera. *Theoretical And Applied Genetics* **72(2)**:170-177.
- Gribbon BM. et al. 1999.** Phylogeny and transpositional activity of *Ty1-copia* group retrotransposons in cereal genomes. *Mol. Gen. Genet.* **261**: 883-891.
- Guerra M. 1993.** Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in Citrus species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity* **71**: 234-241.
- Gupta M., Chyi YS., Romero J y Owen JL. 1994.** Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using simple primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* **89**:998-1006.
- Hall, T.A. 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hansen C., Heslop-Harrison JC. 2004.** Sequences and phylogenies of plant pararetroviruses, viruses and transposable elements. *Advances in Botanical Research*.
- Havecker E., Gao X., Voytas DF. 2004.** The diversity of LTR retrotransposons. *Genome Biology* **5**:225
- Helentjaris, T.; King, G.; Slocum. M.; Siedenstrang, C. and Wegman, S. 1985.** Restriction fragment length polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. *Plant Mol. Biol.* **5**: 109-118.

## **Bibliografía**

---

- Herrero R., Asins MJ., Carbonell EA., Navarro L. 1996.** Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraespecies and intragenus genetic variability. *Theor. Appl. Genet.* **92**: 599-609.
- Herrero R., Asins MJ., Pina JA., Carbonell EA., Navarro L. 1996.** Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. II. Genetic relationships among genera and species. *Theor. Appl. Genet.* **93**: 1327-1334.
- Heslop-Harrison JS. 2000.** Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. *The Plant Cell* **12**:617-635.
- Heslop-Harrison JS. 1997.** The chromosomal distributions of Ty1-*copia* group retrotransposable elements in higher plants and their implications for genome evolution. *Genetica* **100**: 197-204.
- Hirochika H, Guiderdoni E, An G, Hsing YI, Eun MY, Han CD, Upadhyaya N, Ramachandran S, Zhang Q, Pereira A, Sundaresan V, Leung H. 2004.** Rice mutant resources for gene discovery. *Plant Mol Biol.Feb* **54**(3):325-34
- Hirochika H., Okamoto H., Kakutani T. 2000.** Silencing of retrotransposons in Arabidopsis and reactivation by the *ddm1* mutation. *The Plant Cell* **12**:357-368.
- Hirochika H. 1997.** Retrotransposons of rice: their regulation and use for genome analysis. *Plant Molecular Biology* **35**: 231-240
- Hirochika et al. 1996.** Autonomous transposition of the tobacco retrotransposon *Tto1* in rice. *The Plant Cell* **8**: 725-734.
- Hirochika, H. and H. Otsuki 1995.** Extrachromosomal circular forms of the tobacco retrotransposon *Tto1*. *Gene* **165**, 229-232
- Hirochika. 1993.** Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture. *The EMBO Journal* **12**(6):2521-2528
- Hirochika, H., A. Fukuchi and F. Kikuchi. 1992.** Retrotransposon families in rice. *Mol. Gen. Genet.* **233**: 209-216
- Jääskeläinen M., Mykkänen AH., Arna T., Vicient C., Suoniemi A., Kalendar R., Savilahti H. Schulman AH. 1999.** Retrotransposon BARE-1: expression of encoded proteins and formation of virus-like particles in barley cells. *The Plant Journal* **20**(4): 413-422.
- Jiang et al. 2003.** An active DNA transposon family in rice. *Nature* **421**:163-167.
- Jin Young-Kwan and Bennetzen J. L. 1989.** Structure and Coding Properties of Bs1, a Maize Retrovirus-Like Transposon *PNAS* **86**: 6235 - 6239.
- Jordan, I. K. and J.F. McDonald. 1999.** Evidence for the recent horizontal transfer of an LTR retrotransposon. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* **96**: 12621-12625.
- Joshi CP. 1987.** Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants: A compilation and analysis. *Nucleic Acids Research*, **15**:9627--9640
- Kalendar R., Vicient C., Peleg O., Anamthawat K., Bolshoy A., Schulman A. 2004.** Large Retrotransposons Derivatives: abundant, conserved but nonautonomous retroelements of barley and related genomes. *Genetics* **166**: 1437-1450.
- Kalendar R., Tanskanen J., Immonen S., Nevo E., Schulman A. 2000.** Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. *PNAS* **97**(12): 660003-6607.
- Kalendar et al. 1999.** IRAP and REMAP : two new retrotransposons-based DNA fingerprinting techniques. *Theor. Appl. Genet.* **98**: 704-711.
- Kart Nicholas and Hugh B Jr. Nicholas. 1997.** Genedoc: a tool for editing and annoting multiple sequence alignments. Version 2.6.002.
- Katsiotis A., Schmidt T., Heslop-Harrison JS. 1996.** Chromosomal and genomic organization of Ty1-*copia*-like retrotransposon sequences in the genus *Avena*. *Genome* **39**: 410-417.
- Kazuhiro et al. 2003.** The plant MITE *mPing* is mobilized in anther culture. *Nature* **421**:167-170.

- Kentner EK., Arnold ML., Wessler SR. 2003.** Characterization of high-copy-number retrotransposons from the large genomes of the Louisiana Iris species and their use as molecular markers. *Genetics* **164**:685-697.
- Kidwell M., Lisch D. 1997.** Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**:7704-7711.
- Kim J., Vanguri S., Boeke J., Gabriel A., Voytas D. 1998.** Transposable elements and genome organization: a comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. *Genome Research* **8**:. 464-478.
- Knox MR., Ellis THN. 2001.** Stability and inheritance of methylation states at *PstI* sites in *Pisum*. *Mol Genet Genomics* **265**:497-507.
- Komatsu M., Shimamoto K., Kyojuka J. 2003.** Two-step regulation and continuous retrotransposition of the rice LINE-type retrotransposon *Karma*. *The Plant Cell* **15**:1934-1944.
- Konieczny, Voytas, Cummings y Ausubel. 1991.** A superfamily of *Arabidopsis thaliana* retrotransposones. *Genetics* **127**(4):801-809.
- Kossack, D.S., and C.S. Kinlaw. 1999.** *IFG7*, a gypsy-like retrotransposon in *Pinus* (Pinaceae) has extensive history in pines. *Plant Mol. Biol.* **3**:417-426.
- Kumar A, Hirochika H. 2001.** Applications of retrotransposons as genetic tools in plant biology. *TRENDS in Plant Science.* **6**(3): 127-134.
- Kumar A., Benentzen JL. 1999.** Plant Retrotransposons. *Annu Rev Genet* **33**: 479-532.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, and Nei M. 2001.** MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Bioinformatics
- Kumekawa N., Ohtsubo H., Horiuchi T., Ohtsubo E. 1999.** Identification and characterization of novel retrotransposons of the *gypsy* type in rice. *Mol Gen Genet* **260**:593-602.
- Kumekawa N., Ohtsubo H., Ohtsubo E. 1999.** Identification and phylogenetic analysis of *gypsy*-type retrotransposons in the plant kingdom. *Genes Genet. Syst.* **74**:299-307.
- Lall IPS., Maneesha., Upadhyaya KC. 2002.** *Panzee*, a *copia*-like retrotransposons from the grain legume, pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Mol. Genet. Genomics* **267**: 271-280.
- Langdon et al. 2000.** Retrotransposon evolution in diverse plant genomes. *Genetics* **156**: 313-325.
- Laten H., Majumdar A., Gaucher E. 1998.** *SIRE1*, a *copia*/*Ty1*-like retroelement from soybean, encodes a retroviral envelope-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 6897-6902.
- Le Quang Hien, Melayah Delphine, Bonnard E., Grandbastien Marie-Angèle.** Distribution of the Tnt1 retrotransposon in tobacco varies with age of insertions. *ICPMB 2003*
- Le Quang Hien, Wright Stephen, Yu Zhihui, Bureau Thomas. 2000.** Transposon diversity in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* **97**(13):7376-7381
- Lee, D., T. H. N. Ellis, L. Turner, R. P. Hellens, and W. G. Cleary, 1990** A *copia*-like element in *Pisum* demonstrates the uses of dispersed repeated sequences in genetic analysis. *Plant Mol. Biol.* **15**:707-722
- Leeton and Smyth. 1993** An abundant LINE-like element amplified in the genome of *Lilium speciosum* *Mol Gen Genet* **237**:97-107.
- Leigh F., Kalendar R., Lea V., Lee D., Donini P., Schulman. 2003.** Comparison of the utility of barley retrotransposón families for genetic analysis by molecular marker techniques. *Mol Gen Genomics* **269**: 464-474.
- Lerat E., Rizzon C., y Biémont C. 2003.** Sequence divergence within transposable element families in the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Research* **13**:1889-1896.
- Linares C., Serna A. Fominaya A. 1999.** Chromosomal organization of a sequence related to LTR-like elements of *Ty1-copia* retrotransposons in *Avena* species. *Genome* **42**: 706-713.
- Liou PC., Gmitter FG., Moore GA. 1996.** Characterization of the *Citrus* genome through analysis of restriction fragment length polymorphisms. **92**: 425-435.

## **Bibliografía**

---

- Lippman et al. 2004.** Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature* **430** : 471-476.
- Macas,J., Meszaros,T., Nouzova,M. 2002.** PlantSat: a specialized database for plant satellite repeats. *Bioinformatics* **18**: 28-35.
- Malik H., Eickbush TH. 1999.** Modular Evolution of the integrase domain in the *Ty3/Gypsy* class of LTR retrotransposons. *Journal of Virology* **73**(6): 5186-5190.
- Manninen, O., Kalendar, R., Robinson, J., Schulman, A. H. 2000.** Application of *BARE-1* retrotransposon markers to the mapping of a major resistance gene for net blotch in barley. *Molecular Genetics and Genomics*, **264**: 325-334
- Manninen I., Schulman AH. 1993.** *BARE-1*, a *copia*-like retroelement in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Molecular Biology* **22**: 829-846.
- Marillonnet S., Wessler S. 1998.** Extreme structural heterogeneity among the members of a maize retrotransposon family. *Genetics* **150**:1245-1256.
- Marín I., Llorens C. 2000.** *Ty3/Gypsy* retrotransposons: description of new *Arabidopsis thaliana* elements and evolutionary perspectives derived from comparative genomic data. *Mol. Biol.Evol.* **17**(7): 1040-1049.
- Marlor RL., Parkhurst SM., Corces VG. 1986.** The *Drosophila melanogaster gypsy* transposable elements encodes putative gene products homologous to retroviral proteins *Mol Cell Biol* **6**:1129-1134.
- Marth Gt et al., 1999.** A general approach to single-nucleotide polymorphism discovery. *Nature Genetics* **23**:452-456.
- Martin. J. Lercher and L. D. Hurst. 2002.** Can mutation or fixation biases explain the allele frequency distribution of human SNPs? *Gene* **300**: 53 - 58
- Martínez-Izquierdo JA., García-Martínez J., Vicent C. 1997.** What makes *Grande1* retrotransposon different? *Genetica* **100**:15-28.
- Matsuyama T. et al. 1999.** Distribution of TGG repeat-related sequences in "Trovia" orange (*Citrus sinensis* Osbeck) chromosomes. *Genome* **42**: 1251-1254.
- Matsuyama T. et al. 1996.** Characterization of heterochromatic regions in "Trovia" orange (*Citrus sinensis* Osbeck) chromosomes by the fluorescent staining and FISH methods. *Genome* **39**: 941-945.
- Mayr E. 1991.** One Long Argument. Charles Darwin and the Genesis of Modern Evolutionary Thought. Harvard U.P, Cambridge (MA).
- Melayah D., Bonnard E., Chalhoub B., Audeon C., Grandbastien MA. 2001.** The mobility of the tobacco *Tnt1* retrotransposon correlates with its transcriptional activation by fungal factors. *The Plant Journal* **28**(2):159-168.
- Meksem K., Ruben E., Hyten D., Triwitayakorn K., Lightfoot DA. 2001.** Conversion of AFLP bands into high-throughput DNA markers. *Mol Genet Genomics* **265**:207-214.
- Meyers B., Tingey S., Morgante M. 2001.** Abundance, distribution and transcriptional activity of repetitive elements in the maize genome. *Genome Research* **11**:1660-1676.
- Mhiri C., Morel JB., Vernhettes S., Casacuberta JM, Lucas H., Grandbastien MA. 1997.** The promoter of the tobacco *Tnt1* retrotransposon is induced by wounding and by abiotic stress. *Plant Molecular Biology* **33** : 257-266.
- Miller MP. 1997.** Tools for population genetics analyses (TFPGA) version 1.3: a windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University.
- Miranda M, Ikeda F, Endo T, Moriguchi T, and Omura M. 1997.** Comparative analysis on the distribution of heterochromatin in *Citrus*, *Poncirus* and *Fortunella* chromosomes. *Chromosome Research* **5** (2):86-92

- Miyao A. et al., 2003.** Target site specificity of the *Tos17* retrotransposon shows a preference for insertion within genes and against insertion in retrotransposon-rich regions of the genome. *The Plant Cell* **15**:1771-1780.
- Moore G. 2001.** Orange and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. *Trends in Genetics* **17**(9): 536-540.
- Mount SM., Rubin GM. 1985.** Complete nucleotide sequence of the *Drosophila* transposable element *copia*: homology between copia and retroviral proteins *Mol Cell Biol* **5**:1630-1638.
- Mueller UG., Wolfenbarger L., 1999.** AFLP genotyping and fingerprinting. *TREE* **14**(10):389-394.
- McCarthy E., Liu J., Lizhi G., McDonald JF. 2002.** Long terminal repeat retrotransposons of *Oryza sativa*. *Genome Biology* **3**(10): research0053.1-0053.11.
- Nakazaki et al. 2003.** Mobilization of a transposon in the rice genome. *Nature* **421**: 170-172.
- Navarro-Quezada A., Schoen DJ. 2002.** Sequence evolution and copy number of Ty1-*copia* retrotransposons in diverse plant genomes. *PNAS* **99**(1): 268-273.
- Neumann P., Pozaárková D., Macas J. 2003.** Highly abundant pea LTR retrotransposon *Ogre* is constitutively transcribed and partially spliced. *Plant Molecular Biology* **53** :399-410.
- Neuvéglise C., Feldmann H., Bon E., Gaillardin C., Casaregola S. 2002.** Genomic evolution of the long terminal repeat retrotransposons in Hemiascomycetous yeasts. *Genome Research* **12**: 930-940.
- Nicolosi E. Deng ZN., Gentile A., La Malfa S., Continella G., Tribulato E. 2000.** Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor Appl Genet* **100**: 1155-1166.
- Noma K., Ohtsubo E., Ohtsubo H. 1999.** Non-LTR retrotransposons (LINEs) as ubiquitous components of plants genomes. *Mol Gen Genet* **261**(1):71-79.
- Ohtsubo H., Kumekawa N., Ohtsubo E. 1999.** *RIRE2*, a novel *gypsy*-type retrotransposon from rice. *Genes Genet. Syst.* **74**:83-91.
- Okamoto H y Hirochika H. 2000.** Efficient insertion mutagenesis of *Arabidopsis* by tissue culture-induced activation of the tobacco retrotransposon *Tto1*. *The Plant Journal* **23**(2):291-304.
- Oliveira, Roberto Pedroso de, Aguilar-Vildoso, Carlos Ivan and Machado, Marcos Antônio. 2003.** Selection processes in a citrus hybrid population using RAPD markers. *Pesq. agropec. bras.*, **38**(11):1297-1302.
- Ollitrault P., Dambier D., Luro F., Duperray C. 1995.** Nuclear Genome Size variations in Citrus. *Fruits* **49**(5-6): 390-393.
- Palmer KJ., Tichelaar W., Myers N., Burns NR., Butcher SJ., Kingsman AJ., Fuller SD., Saibil HR. 1997** Cryoelectron microscopy structure of yeast Ty retrotransposon virus-like particles. *J.Virol.* **71**: 6863-6868.
- Pardue, M. L., O. N. Danilevskaya, K. Lowenhaupt, F. Slot, and K. L. Traverse. 1996** *Drosophila* telomeres: new views on chromosome evolution. *Trends Genet.* **12**:48-52
- Pauls PK., Kunert K., Huttner E., Grandbastien MA. 1994.** Expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon promoter in heterologous species. *Plant Mol Biol* **26**(1): 393-402.
- Pearce S., Knox M., Ellis N., Flavell AJ., Kumar A. 2000** Pea Ty1-*copia* group retrotransposons: transpositional activity and use as markers to study genetic diversity in Pisum. *Mol Gen Genet* **263**: 898-907.
- Pearce S., Stuart-Rogers C., Knox M R., Kumar A., Ellis N., Flavell A. 1999.** Rapid isolation of plant Ty1-*copia* group retrotransposons LTR sequences for molecular marker studies. *The Plant Journal* **19**(6): 711-717.
- Pearce S, Harrison G. 1996.** The Ty1-*copia* group retrotransposons in *Vicia* species: copy number, sequence heterogeneity and chromosomal localisation. *Mol Gen Genet* **250**: 505-315.
- Pedrosa A., Schweizer D., Guerra M. 2000.** Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osberck]. *Theor Appl Genet* **100**:361-367

## **Bibliografía**

---

- Pelissier, T., S. Tutois, J. Deragon, S. Tourmente, and S. Genestier. 1995** *Athila*, a new retroelement from *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol. Biol. **29**:441-452
- Peña L. et al. 2000.** Posibilidades de la transformación genética para la mejora de los cítricos. Levante Agrícola. 297-306.
- Peschke, V.M., R.L. Phillips, and B.G. Gengenbach. 1991.** Genetic and molecular analysis of tissue culture-derived Ac elements. Theor. Appl. Genet. **82**:121-129.
- Peschke, V.M. and R.L. Phillips. 1991.** Activation of the maize transposable element Suppressor-mutator (Spm) in tissue culture. Theor. Appl. Genet. **81**:90-97.
- Peterson-Burch, B.D., Wright, D.A., Laten, H.M., and Voytas, D.F. 2000.** Retroviruses in plants? *Trends Genet.* **16**: 151-152
- PLANT MOLECULAR BIOLOGY REPORTER. 1991.** Vol 9, nº 3: 185-288.
- Pouteau S., Grandbastien MA., Boccara M. 1994.** Microbial elicitors of plant defense responses activate transcription of a retrotransposon. The Plant Journal **5**(4):535-542.
- Pouteau S, Huttner E, Grandbastien MA, Caboche M. 1991.** Specific expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon in protoplasts. EMBO Journal **10**: 1911-1918.
- Price Z., Schulman A., Mayers S. 2003.** Development of new markers methods- an example from oil palm. Plant Genetic Resources **1**(2-3):103-113.
- Provan J., Thomas WTB., Forster BP., Powell W. 1999.** *Copia*-SSR: a simple marker technique which can be used on total genomic DNA. Genome **42**: 363-366.
- Purugganan M. and Wessler S. 1994.** Molecular evolution of *magellan*, a maize Ty3/*gypsy*-like retrotransposon. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**:11674-11678.
- Queen RA., Gribbon BM., James C., Jack P., Flavell AJ. 2004.** Retrotransposon-based molecular markers for linkage and genetic diversity analysis in wheat. Mol Gen Genomics **271**:91-97.
- Rafalski A. 2002.** Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. Current Opinion in Plant Biology **5**:94-100.
- Ramallo E. 2005.** Retrotransposons de meló (*Cucumis melo*) i el seu ús com a marcadors moleculars pel mapa genètic. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.
- Ramsay L., M. Macaulay, L. Cardle, M. Morgante, S. Degli-Ivanissevich, E. Maestri, W. Powell, R. Waugh. 1999.** Intimate association of microsatellite repeats with retrotransposons and other dispersed repetitive elements in Barley Plant J **17**:415-423
- Robertson, HM. 1993.** The mariner transposable element is widespread in insects Nature **362**:241-245.
- Roose et al. 2000.** Mapping the Citrus genome. Acta Horticulturae **535**:25-32.
- Rozas J. and Rozas R. 1999.** DnaSP version 3.14: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. Bioinformatics **15**:174-175.
- Ruiz C., Asins MJ. 2003.** Comparison between *Poncirus* and *Citrus* genetic linkage maps. Theor Appl Genet. **106**(5):826-36.
- Ruiz-Lara, Bratti, Yañez, Verdugo y González. 1999.** Rxpresión específica de retrotransposones LTR en *Lycopersicon chilense* inducidas por herida y congelamiento. Bilo. Res **32**
- Sankar A, Moore G. 2001.** Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in Citrus and extension of the genetic linkage map. Theor Appl Genet. **102**: 206-214.
- SanMiguel P., Gaut BS., Tikhonov A., Nakajima Y., Bennetzen JL. 1998.** The paleontology of intergene retrotransposons of maize. Nature Genetics **20**: 43-45.
- SanMiguel P and Bennetzen JL. 1998.** Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons. Annals of Botany **82**:37-44
- SanMiguel P., Tikhonov A., Jin Y.K., Motchoulskaia N., Zakharov D., Melake-Berhan, y Bennetzen J.L. 1996.** Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. Science, **274**: 765-768.

- Sasaki, Matsumoto y Yamamoto 2002.** The genome sequence and structure of rice chromosome 1. *Nature* **420**:312-316.
- Schmidt R. 2002.** Plant genome evolution: lessons from comparative genomics at the DNA level. *Plant Molecular Biology* **48**: 21-37.
- Schmidt, T. 1999** LINES, SINEs, and repetitive DNA: Non-LTR retrotransposons in plant genomes. *Plant Mol. Biol.* **40**:903-910
- Schmidt T., Kubis S., Heslop-Harrison JS. 1995.** Analysis and chromosomal localization of retrotransposons in sugar beet (*Beta vulgaris* L.): LINES and Ty1-copia-like elements as major components of the genome. *Chromosome Research* **3**: 335-345.
- Scholes DT., Kenny AE., Gamache ER., Mou Z., Curcio MJ. 2003.** Activation of a LTR-retrotransposon by telomere erosion. *PNAS* **100**(26): 15736-15741.
- Schulman AH, Flavell AJ, Ellis TH. 2004.** The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants. *Methods Mol Biol.* **260**:145-73.
- Scora. 1975.** On the history and origin of Citrus. *Bull. Torrey Bot. Club* **102**: 369-375.
- Shcherban AB., Vaughan DA., Tomooka N., Taga A. 2001.** Diversity in the integrase coding domain of a *gypsy*-like retrotransposon among wild relatives of rice in the *Oryza officinalis* complex. *Genetica* **110**: 43-53
- Shirasu, K., Schulman, A.H., Lahaye, T., and Schulze-Lefert, P. 2000.** A Contiguous 66-kb Barley DNA Sequence Provides Evidence for Reversible Genome Expansion. *Genome Res.* **10**: 908-915
- Song SU, Gerasimova T, Kurkulus M, Boeke JD, Corces VG. 1994.** An *Env*-like protein encoded by *Drosophila* retroelement: evidence that *gypsy* is an infectious retrovirus. *Genes Dev.* **8**:2026-57
- Su PY., Brown TA. 1997.** *Ty3/gypsy*-like retrotransposon sequences in tomato. *Plasmid* **38**:148-157.
- Suoniemi A., Tanskanen J., Schulman A.H. 1998:** *Gypsy*-like retrotransposons are widespread in the plant kingdom. *Plant J.* **13**: 699-705.
- Suoniemi A., Narvanto A., Schulman AH. 1996.** The *BARE-1* retrotransposon is transcribed in barley from an LTR promoter active in transient assays. *Plant Molecular Biology* **31**:295-306.
- Swingle , W.T. 1943.** The botany of citrus and its wild relatives of the orange subfamily. In: WEBER, H.J., BATCHELLOR, L.D. (Ed.) *The citrus industry*. Berkeley: University of California, p.129-474.
- Syomin BV., Leonova TY., Ilyin YV. 2002.** Evidence for horizontal transfer of the LTR retrotransposon *mdg3* which lacks an *env* gene. *Mol Gen Genomics* **267**:418-423.
- Takeda S., Sugimoto K., Kakutani T., Hirochika H. 2001.** Linear DNA intermediates of the *Tto1* retrotransposon in Gag particles accumulated in stressed tobacco and *Arabidopsis Thaliana*. *The Plant Journal* **28**(3):307-317.
- Takeda S., Sugimoto K., Otsuki H., Hirochika H. 1999.** A 13-bp cis-regulatory element in the LTR promoter of the tobacco retrotransposon *Tto1* is involved in responsiveness to tissue culture, wounding, methyl jasmonate and fungal elicitors. *The Plant Journal* **18**(4):383-393.
- Takeda S., Sugimoto K., Otsuki H., Hirochika H. 1998.** Transcriptional activation of the tobacco retrotransposon *Tto1* by wounding and methyl jasmonate. *Plant Molecular Biology* **36**: 365-376.
- Tam SM, Mhiri C, Vogelaar A, Kerkveld M, Pearce SR, Grandbastien MA. 2005.** Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR. *Theor Appl Genet.* **110**(5):819-831
- Tautz, D. 1989.** Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* **17**: 6463-6471.
- Torres AM, soost RK., Lastovicka. 1982.** Citrus isozymes: Genetics and distinguishing nucellar from zygotic seedling *Heredity* **73**:335-339.
- Vazquez R., Hernandez M., Martinez MJ., de Frutos R. 2000.** Evolution of *gypsy* endogenous retrovirus in the *Drosophila obscura* species group. *Mol. Biol. Evol.* **17**(8):1185-1193.



## Bibliografía

---

- Vernhettes S., Grandbastien MA., Casacuberta JM. 1998.** The evolutionary analysis of the Tnt1 retrotransposon in *Nicotiana* species reveals the high variability of its regulatory sequences. *Mol. Biol. Evol.* **15**(7):827-836.
- Vernhettes S., Grandbastien MA., Casacuberta JM. 1997.** *In vivo* characterization of transcriptional regulatory sequences involved in the defence-associated expression of the tobacco retrotransposon Tnt1. *Plant Molecular Biology* **35**: 673-679.
- Vershinin A.V., Allnutt T.R., Knox M.R., Ambrose M.J. and Ellis T.H.N. 2003.** Transposable elements reveal the impact of introgression, rather than transposition, in *Pisum* diversity, evolution and domestication. *Molecular Biology and Evolution* **20**: 2067-2075
- Vershinin AV., Ellis THN. 1999.** Heterogeneity of the internal structure of *PDR1*, a family of *Ty1/copia*-like retrotransposons in pea. *Mol Gen Genet* **262**:703-713.
- Vicient C. Jääskeläinen MJ., Kalendar R., Schulman A. 2001.** Active retrotransposons are a common feature of grass genomes. *Plant Physiology* **125**: 1283-1292.
- Vicient C., Kalendar R., Shulman A. 2001.** *Envelope*-Class retrovirus-like elements are widespread, transcribed and spliced, and insertionally polymorphic in plants. *Genome Reseach* **11**:2041-2049.
- Vicient C et al. 1999.** Retrotransposon *BARE-1* and its role in genome evolution in the genus *Hordeum*. *The Plant Cell* **11**: 1769-1784.
- Vicient C. 1995.** Caracterización molecular de Grande1, un nuevo tipo de retrotransposón del género *Zea*. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.
- Villordon AQ., Jarret RL. LaBonte DR. 2000.** Detection of *Ty1-copia*-like reverse transcriptase sequences in *Ipomoea batatas* (L.) Poir. *Plant Cell Reports* **19**:1219-1225.
- Vos P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reinjans, M.; Van de Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995.** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**: 4407-4414
- Voytas D.F., Cummings M.P., Koniczny A., Ausubel F.M., Rodermeil S.R. 1992.** *Copia*-like retrotransposons are ubiquitous among plants. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **89**: 7124-7128.
- Waugh R. et al. 1997.** Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP) *Mol Gen Genet* **253**: 687-694.
- Wendel JF. Wessler SR. 2000.** Retrotransposon-mediated genome evolution on a local ecological scale. *PNAS* **97**(12):6250-6252.
- Wessler SR., Bureau TE., White SE. 1995.** LTR-retrotransposons and MITES : important players in the evolution of plant genomes. *Current Opinion in Genetics & Development* **5**: 814-821.
- White SE., Habera LF., Wessler SR. 1994.** Retrotransposons in the flanking regions of normal plant genes: A role for *copia*-like elements in the evolution of gene structure and expression. *PNAS* **91**:11792-11796.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.* **18**:6531-6535.
- Witte CP., Le QH., Bureau T., Kumar A. 2001.** Terminal-repeat retrotransposons in miniature (TRIM) are involved in restructuring plant genomes. *PNAS* **98**(24):13778-13783.
- Wolfe AD y Liston A., 1998.** Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: *Plant Molecular Systematics II* eds. D.E. Soltis, P.S. Soltis and J.J. Doyle. pp. 43-86. Kluwer.
- Wright D., Voytas D. 1998.** Potential retroviruses in plants: *Tat1* Is related to a group of *Arabidopsis thaliana* *Ty3/gypsy* retrotransposons that encode envelope-like proteins. *Genetics* **149**:703-715.
- Xiong Y, Eickbush TH. 1990.** Similarity of reverse transcriptase-like sequences of viruses, transposable elements, and mitochondrial introns. *Mol Biol Evol.* **5**(6):675-690.

**Yang ZN., Ye XR., Molina J., Roose ML., Mirkov TE. 2003.** Sequence analysis of a 282-Kilobase region surrounding the Citrus Tristeza Virus Resistance Gene (*Ctv*) locus in *Poncirus trifoliata* L.Raf. *Plant Physiology* **131**:482-492.

**Yañez M., Verdugo I., Rodríguez M., Prat S., Ruiz-Lara S. 1998.** Highly heterogeneous families of Ty1-copia retrotransposons in the *Lycopersicon chilense* genome. *Gene* **222**:223-228.

**Yu GX, Wise RP. 2000.** An anchored AFLP- and retrotransposons based map of diploid Avena. *Genome* **43**:736-749

<a href="http://www.tigr.org/">http://www.tigr.org/</a>	<i>The TIGR Plant Repeat Project</i>
<a href="http://harvest.ucr.edu/">http://harvest.ucr.edu/</a>	Base de datos EST (HarvEST:Citrus version 0.51)
<a href="http://int-citrusgenomics.org/">http://int-citrusgenomics.org/</a>	<i>International Citrus Genome Consortium</i>
<a href="http://citrusgenomics.ibmcp-ivia.upv.es/about-cfgrp/">http://citrusgenomics.ibmcp-ivia.upv.es/about-cfgrp/</a>	Proyecto de Genómica Funcional Citrus
<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/</a>	BLAST
<a href="http://www.ebi.ac.uk/clustalw/">http://www.ebi.ac.uk/clustalw/</a>	CLUSTAW
<a href="http://www.psc.edu/biomed/genedoc">www.psc.edu/biomed/genedoc</a>	GENEDOC
<a href="http://www.bio.ub.es/~julio/DnaSP.html">http://www.bio.ub.es/~julio/DnaSP.html</a>	DNASP
<a href="https://oberon.rug.ac.be:8443/care-bin/CallMat_IE55.html">https://oberon.rug.ac.be:8443/care-bin/CallMat_IE55.html</a>	<i>PLANTCARE : a database of plant cis-acting regulatory elements</i>
<a href="http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/">http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/</a>	<i>PLACE: plant cis-acting regulatory DNA elements database</i>

