

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	4
ABSTRACT.....	5
ÍNDICE DE CONTENIDOS	6
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
1.- INTRODUCCIÓN	11
1.1.- Interacciones entre insectos fitófagos y plantas hospederas:	11
1.2.- Los áfidos como modelo de estudio:.....	11
1.3.- Interacción alimentaria entre áfidos y plantas hospederas:	13
1.4.- Papel de las OBP, CSP y OR en la identificación del hospedero:	15
1.5.- <i>Sitobion avenae</i> (pulgón del grano o pulgón verde oscuro de la espiga).....	17
1.6.- Transcriptómica y bioinformática aplicables en el estudio de expresión génica:	18
2.- HIPÓTESIS	20
3.- OBJETIVOS	20
3.1.- Objetivo general:.....	20
3.2.- Objetivos específicos:	20
4.- MATERIALES Y MÉTODOS	22
4.1.- Material Biológico.....	22
4.1.1.- Clones especialistas y generalistas de <i>Sitobion avenae</i>	22
4.1.2.- Crecimiento de bacterias para transformación con vector.....	22
4.2 Material Molecular	23
4.2.1.- Genotecas de expresión.....	23

4.2.2.- Anotación de genotecas e identificación de putativos genes ortólogos para proteínas quimiosensoras (CSP).....	24
4.2.3.- Diseño de partidores para amplificar genes de proteínas quimiosensoras (CSP) obtenidas desde la anotación de las genotecas de ESTs.....	25
4.2.4.- Extracción de ARN a partir de poblaciones sincronizadas de especialistas y generalistas de <i>S. avenae</i>	25
4.2.5.- Cuantificación y análisis de calidad de ARN total.....	26
4.2.6.- Amplificaciones de genes CSP mediante PCR a partir de ADN complementario y ADN genómico de clones especialista y generalista de <i>S. avenae</i>	27
4.2.7.- Reacciones de PCR	29
4.2.8.- Electroforesis en geles de agarosa para análisis de DNA.....	29
4.2.9.- Caracterización de la secuencia completa de genes CSPs mediante reacción RACE (Amplificación Rápida de Extremos de ADNc).	29
4.2.10.- Ligación de fragmentos RACE en vector y transformación de bacterias.....	30
4.2.11.- Minipreparaciones de DNA plasmidial para chequeo de bacterias transformantes.....	31
4.2.14.- Secuenciación de los fragmentos obtenidos.	32
5.- RESULTADOS.....	33
5.1.- Resultados del procesamiento y ensamble de ESTs.....	33
5.2.- Proceso de anotaciones de las genotecas ESTs de clones especialista y generalista de <i>S. avenae</i>	35
5.2.2.- Estadísticas de análisis y anotación correspondientes a la genoteca de expresión del clon generalista de <i>S. avenae</i>	39

5.2.3.- Comparación de anotaciones GO de genotecas de clones especialista y generalista de <i>S. avenae</i>	42
5.3.- Búsqueda de genes de función olfativa en la anotación de genotecas de expresión de clones especialista y generalista de <i>S. avenae</i>	43
5.3.1.- Análisis de la secuencia CSP1.....	45
5.3.2.- Análisis de la secuencia CSP2.....	47
5.4.- Extracción de ARN.....	49
5.5.- Síntesis de ADN complementario a partir de ARN y amplificación del gen CSP1.....	50
5.6.- Secuenciación de fragmentos CSP1 obtenidos a partir de ADN genómico de clones especialista y generalista de <i>S. avenae</i>	51
5.7.- Reconstrucción del gen CSP1 del clon generalista de <i>S. avenae</i>	55
5.8.- Reacción RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) a partir de ARN del clon generalista de <i>S. avenae</i> para amplificar CSP2.....	55
6.- DISCUSIÓN	61
7.- CONCLUSIONES	69
8.- REFERENCIAS.....	70
9.- ANEXOS	77
9.1.- Presentación a congresos.....	77
9.2.- Secuencias CSP de <i>S. avenae</i>	77
9.2.1.-Secuencias CSP de nucleótidos.....	77
9.2.2.- Secuencias de aminoácidos codificantes CSP.....	78
9.3.- Clasificación de unigenes comunes de especialistas y generalistas.....	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados del análisis de ESTs de especialistas.....	33
Tabla 2. Resultados del análisis de ESTs de generalistas.....	34

Tabla 3. Resultados de análisis de unigenes que presentan marco de lectura abierto (MLA).	34
Tabla 4. Número de unigenes anotados de clones especialista y generalista.	36
Tabla 5: Secuencias putativas de CSP encontradas en la genoteca correspondiente al clon generalista de <i>S. avenae</i>	44
Tabla 6: Cuantificación en espectrofotómetro de extracción de RNA total de individuos completos de clones especialista y generalista de <i>S. avenae</i>	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Individuos ápteros y alados (derecha) de <i>Sitobion avenae</i>	18
Figura 2. Unigenes comunes entre especialistas y generalistas.	35
Figura 3. Clasificación según taxones de los 243 hits de BlastX provenientes del clon especialista contra la base de datos no redundante de NCBI.	37
Figura 4. Clasificación GO de segunda jerarquía según función molecular correspondientes al clon especialista.	38
Figura 5. Clasificación GO de segunda jerarquía según proceso biológico correspondientes al clon especialista.	38
Figura 6. Clasificación GO de segunda jerarquía según componente celular correspondientes al clon especialista.	39
Figura 7. Clasificación según taxones de los 829 hits de BlastX provenientes del clon generalista contra la base de datos no redundante de NCBI.	40
Figura 8. Clasificación GO de segunda jerarquía según función molecular correspondientes al clon generalista.	41
Figura 9. Clasificación GO de segunda jerarquía según proceso biológico correspondientes al clon generalista.	41
Figura 10. Clasificación GO de segunda jerarquía según componente celular correspondientes al clon generalista.	42
Figura 11. Representación esquemática del gen codificante para la proteína quimiosensora 1 de <i>S. avenae</i> comparada con la secuencia de referencia tomada de <i>A. pisum</i>	46

Figura 12. Alineamiento múltiple de secuencia CSP1 de <i>S. avenae</i> contra ortólogos CSP de otras especies de áfidos..	47
Figura 13. Representación esquemática del gen codificante para la proteína quimiosensora 2 de <i>S. avenae</i> comparada con la secuencia de referencia tomada de <i>A. pisum</i> .	48
Figura 14. Alineamiento múltiple de secuencia CSP2 de <i>S. avenae</i> contra ortólogos CSP de otras especies de áfidos.	49
Figura 15. Electroforesis de ARN total en gel de agarosa denaturante al 1%.	50
Figura 16. Electroforesis de amplicones CSP1 en gel de agarosa al 1%.	51
Figura 17. Alineamiento conjunto de fragmentos de exones 1 y 2 CSP1 obtenidos a partir de ADN genómico de clones especialista y generalista de <i>S. avenae</i> .	52
Figura 18. Alineamiento de intrones de clones especialista y generalista	54
Figura 19. Reconstrucción de secuencia completa de gen CSP1 a partir de secuencia CSP1 de genoteca y secuencia CSP1 de ADN genómico.	55
Figura 20. Fragmento 5' RACE de CSP2.	56
Figura 21. Reconstrucción de secuencia CSP2 del clon generalista de <i>S. avenae</i> ..	57
Figura 22. Alineamiento global de secuencias codificantes CSP2 de <i>S. avenae</i> contra secuencia de referencia de <i>A. pisum</i> .	58
Figura 23. Alineamiento múltiple de secuencia CSP2 contra secuencias de aminoácidos de otras CSP de especies de áfidos..	59
Figura 24. Alineamiento global de secuencia CSP2 contra secuencia ADN genómico correspondiente a secuencia de referencia de <i>A. pisum</i> .	60
Figura 25. Clasificación GO según proceso biológico para los 42 unigenes comunes detectados entre especialistas y generalistas.	79