



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**FACULTAD DE CIENCIAS
EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE
BIOLOGÍA MOLECULAR Y
CELULAR**

TESIS DOCTORAL

**GENES EXPRESADOS EN LA RAÍZ DEL
OLIVO CULTIVADO Y POSIBLE IMPLICACIÓN
EN LA TRANSICIÓN DE FASE JUVENIL A
ADULTO**

**PRESENTADA POR:
JAIME JIMÉNEZ RUIZ**

**DIRIGIDA POR:
DR. D. FRANCISCO LUQUE VÁZQUEZ
DRA. DÑA. ANA M^a FERNÁNDEZ OCAÑA**

JAÉN, 28 DE MARZO DE 2014

ISBN 978-84-8439-873-8



Área de Genética
Departamento de Biología Experimental
Facultad de Ciencias Experimentales
Universidad de Jaén

**“Genes expresados en la raíz del olivo cultivado y
posible implicación en la transición de fase juvenil a
adulto”.**

Jaime Jiménez Ruiz

Tesis Doctoral

2014



Área de Genética
Departamento de Biología Experimental
Facultad de Ciencias Experimentales
Universidad de Jaén

El Dr. Francisco Luque Vázquez, Catedrático del Área de Genética de la Universidad de Jaén, y la Dra. Ana M^a Fernández Ocaña, Profesora Titular del Área de Fisiología Vegetal de la Universidad de Jaén, informan que la Tesis Doctoral titulada: **“Genes expresados en la raíz del olivo cultivado y posible implicación en la transición de fase juvenil a adulto”**, que presenta el Licenciado en Biología Jaime Jiménez Ruiz para optar al Grado de Doctor con Mención Internacional, ha sido realizado bajo su dirección, reuniendo a su juicio, los requisitos exigidos para su presentación.

Jaén, a 24 de enero de 2014

Director de la Tesis Doctoral
D. Francisco Luque Vázquez.

Co-directora de la Tesis
Dña. Ana M^a Fernández Ocaña



Área de Genética
Departamento de Biología Experimental
Facultad de Ciencias Experimentales
Universidad de Jaén

Este trabajo ha sido posible gracias a la siguiente financiación; Ayuda de Personal Investigador en Formación (Acción 16 del 2009) del Plan de Apoyo a la Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación (Universidad de Jaén), del Proyecto OLEAGEN (Genoma España), de la Corporación Tecnológica de Andalucía y del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera de Córdoba (IFAPA).



UNIVERSIDAD DE JAÉN



oleagen



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y PESCA

Jaén, Enero 2014
Jaime Jiménez Ruiz

Índice

SUMMARY.....	1
INTRODUCCIÓN.....	11
EL OLIVO (<i>Olea europaea</i> L.).	
<i>Historia y dispersión por el Mediterráneo</i>	
<i>Importancia actual: Aceite, aceitunas de mesa y otros productos del olivo.</i>	
<i>Dieta Mediterránea, Aceite de Oliva Virgen Extra y Salud.</i>	
<i>Trazabilidad del Aceite de Oliva Virgen Extra.</i>	
DESARROLLO Y CICLO DE VIDA DE LAS PLANTAS.	
TRANSICIÓN JUVENIL-ADULTO EN EL OLIVO.	
OBJETIVOS / AIMS.....	52
MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
1. MUESTRAS VEGETALES.	
2. MANEJO Y MANIPULACIÓN BACTERIANA.	
2.1	Estirpes de <i>Escherichia coli</i> .
2.2	Cultivos bacterianos de <i>E.coli</i> .
2.3	Criopreservación.
2.4	<i>E. coli</i> competentes y transformación bacteriana.
2.4.1	<u>Preparación química de bacterias competentes para choque térmico.</u>
2.4.2	<u>Transformación por choque térmico.</u>
3. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ADN.	
3.1	Extracción de ADN plasmídico.
3.1.1	<u>Lisis alcalina.</u>
3.1.2	<u>Lisis rápida.</u>
3.1.3	<u>Kits comerciales.</u>
3.2	Extracción de ADN genómico.
3.3	Cuantificación y pureza del ADN.
3.4	Purificación de ADN en geles de agarosa.
3.4.1	<u>Filtración en papel o "pirindolo".</u>

3.4.2 Kits comerciales.

- 3.5 Purificación de los productos de PCR.
- 3.6 Secuenciación de ADN.

4. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ARN.

- 4.1 Extracción de ARN total.
- 4.2 Cuantificación y pureza del ARN.

5. MANIPULACIÓN ENZIMÁTICA DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

- 5.1 Digestión de ADN con enzimas de restricción.
- 5.2 Ligación de fragmentos de ADN.
- 5.3 Retrotranscripción de ARN.

6. VISUALIZACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE ELECTROFORESIS.

7. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

- 7.1 PCR y RT-PCR.
- 7.2 Q-RT-PCR.
- 7.3 Cálculo de la eficiencia de amplificación de los cebadores utilizados en Q-RT-PCR.
- 7.4 Diseño de cebadores y oligonucleótidos utilizados.
- 7.5 Análisis de colonias recombinantes mediante PCR.
- 7.6 Síntesis de productos de PCR flanqueados por dianas de restricción.

8. PLÁSMIDOS UTILIZADOS.

9. AISLAMIENTO Y MANIPULACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS.

- 9.1 Obtención de homogenados.
- 9.2 Determinación de la concentración de proteínas.
- 9.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).
- 9.4 Transferencia semiseca de proteínas.

10. DETECCIÓN INMUNOLÓGICA.

- 10.1 Western Blot.
- 10.2 Deshibridación de las membranas de Western Blot.
- 10.3 Inmunohistoquímica frente a JAT.

10.3.1 Procesado de las muestras.

10.3.2 Corte con criostato.

10.3.3 Inmunodetección.

11. TRANSCRIPTÓMICA.

- 11.1 Diseño experimental.
- 11.2 Muestras.
- 11.3 Procesado de las muestras de ARN.
- 11.4 Datos de partida o Raw data.
- 11.5 Pre-procesamiento de los datos y análisis de calidad.
- 11.6 Ensamblaje.
- 11.7 Anotación funcional.
 - 11.7.1 Blast2GO.
 - 11.7.2 Trinotate.
- 11.8 Análisis de expresión.
- 11.9 Data mining.

CAPÍTULO I: JAT.	99
<i>Estudio del gen JUVENIL TO ADULT TRANSITION (JAT)</i>	101
RESULTADOS	102
Análisis de secuencias.	
Análisis de expresión.	
Localización tisular.	
El gen JAT en Arabidopsis.	
DISCUSIÓN	127
CAPÍTULO II: Genes de la raíz.	133
TRANSICIÓN, RAÍCES Y GENES	135
RESULTADOS	137
DISCUSIÓN	148
CAPÍTULO III El transcriptoma de la raíz del olivo.	155
ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO	157
RESULTADOS	158
DISCUSIÓN	173
CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	179
BIBLIOGRAFÍA	183

CURRICULUM VITAE.....	211
PUBLICACIONES.....	219

Resumen

Summary

Resumen

El desarrollo de las plantas se puede resumir en tres fases post-embionarias; una fase juvenil vegetativa, una fase adulta vegetativa y una fase adulta reproductiva. Los procesos de transición entre estas fases son bastante conocidos en herbáceas, al contrario de lo que sucede en leñosas, en las que su menor tasa de crecimiento y la mayor duración de las fases, dificultan su estudio. En este trabajo nos hemos centrado en la transición de la fase juvenil a la fase adulta, en la que el árbol adquiere la competencia necesaria para la reproducción. La repercusión de explorar y revelar los mecanismos genéticos que controlan este cambio de fase radica en la importancia económica de los árboles frutales, ya que la existencia de un periodo juvenil improductivo largo ha ralentizado tradicionalmente los programas de mejora vegetal. En el olivo (*Olea europaea* L.), este periodo juvenil es incluso más prolongado que en otros árboles frutales, aunque recientemente se ha conseguido, mediante métodos de crecimiento forzado, acortar a unos tres o cuatro años la primera floración tras la germinación de la semilla (Lavee et al. 1996, Santos-Antunes et al. 2005). Una producción más temprana, además de la importancia económica, supone una arquitectura de menor tamaño, que facilita una cosecha de forma mecanizada y un menor coste de la recolección.

La transición de juvenil a adulto en plantas leñosas está más relacionada con la adquisición de cierto tamaño que con la edad (Hackett 1985), este fenómeno ocurre cuando las ramas apicales y laterales alcanzan una distancia suficiente a las raíces (Robinson y Wareing 1969, Zimmerman 1971), formando lo que se conoce como un cono de juvenilidad (Hartmann et al. 2002). En el olivo se ha constatado que la distancia media mínima, para que ocurra la floración, es de 200 cm desde la raíz a los meristemas (Moreno-Alías et al. 2010a). Además, se sabe que los cambios genéticos responsables de la transición ocurren mucho antes de que puedan observarse los cambios morfológicos característicos de la fase adulta, como es la floración. Estudios más recientes datan estos cambios en el perfil de expresión génica de los meristemas durante los meses 12 a 15 tras la germinación, acotando alrededor de los 45 el número de nudos necesario. Estos cambios en los perfiles de expresión ocurrirían en los meristemas muchos meses antes de que se observe la primera floración, probablemente debido a que una vez que se pone en marcha la transición de fase, se necesita bastante tiempo para generar las nuevas estructuras adultas y alcanzar la competencia reproductiva (García-López et al. Aceptado).

La hipótesis que se postula es el papel de las raíces en la transición juvenil a adulto en el olivo, por lo que en esta tesis nos hemos centrado en el estudio de las diferencias de expresión génica en raíces juveniles y adultas, así como la identificación de genes potencialmente implicados en la transición de fase juvenil a adulta en el olivo cultivado.

El presente trabajo se divide en tres capítulos que abordan tres aspectos diferentes pero relacionados en el estudio de la raíz y su relación con la transición de fase juvenil a adulta. Un estudio para caracterizar el gen *JUVENIL TO ADULT TRANSITION (JAT)*, un gen que parece estar implicado en la transición juvenil a adulto, se muestra en el primer capítulo. La expresión génica en raíces juveniles y adultas se analiza a nivel transcripcional en el capítulo dos, con el objetivo de identificar posibles genes implicados en el cambio de fase. Para obtener una visión más amplia del papel de las raíces, en el tercer capítulo se realiza un análisis de los genes que se expresan en la raíz, mediante el ensamblado de un transcriptoma, utilizando la tecnología del RNA-seq.

El gen *JAT* fue descrito por nuestro grupo de investigación (Fernández-Ocaña et al. 2010) como un gen necesario para que la transición en olivo ocurriera sin retraso. Se detectó por poseer una expresión diferencial entre ápices de plantas juveniles y adultas y una elevadísima expresión en raíces juveniles. Se ha realizado una caracterización completa del gen *JAT* a diferentes niveles; el estudio de su estructura genómica ha revelado la existencia de una familia de genes *JAT*, de la que se han descrito tres parálogos (*JAT1*, *JAT2* y *JAT3*), con una organización análoga en 5 exones y 4 intrones, cuya secuencia genómica y extremos flanqueantes se han estudiado individualmente. Los análisis de las secuencias peptídicas traducidas, muy semejantes entre los parálogos, revelaban la conservación parcial de un dominio fosforilasa, la presencia de un péptido señal y de una posible zona hidrofóbica interna, pero no aclaran ni su función, ni su localización celular. Desde un punto de vista filogenético aparecen posibles ortólogos en otras plantas, incluso mantienen la misma estructura genómica, por lo que su función o su papel podría estar conservado. Analizando la expresión de los parálogos por acumulación de ARNm, hemos comprobado que *JAT2* es el que posee una expresión mayor en varios tejidos, siendo el tallo el que presenta datos más elevados sobre la raíz, el meristemo apical y la hoja, en ese orden. El estudio de la proteína mediante detección por anticuerpos específicos, reveló dos señales de peso molecular parecido que parecen corresponderse con la proteína con y sin el péptido señal,

apareciendo diferencialmente una u otra en los distintos tejidos y observándose la mayor señal en meristemo. La localización tisular de la proteína, también por inmunodetección y tecnología confocal, mostró una asociación a los haces vasculares, sobre todo a floema y una acumulación marcada en tejidos en crecimiento, como son los meristemos y los ápices radiculares. Los análisis en mutantes de *Arabidopsis* para este gen mostraron un retraso en el crecimiento inicial de las raíces y un anormal crecimiento de las hojas de la roseta, descrito como un fenotipo asociado a retraso en la floración. La caracterización completa del gen *JAT* amplía el conocimiento en uno de los genes relacionados con la transición juvenil a adulto.

Además de las funciones de sujeción y de captación de agua que tradicionalmente se han atribuido a la raíz, el papel que posee en la transición parece ser crucial para que ésta ocurra normalmente. Para proporcionar una visión más completa de los cambios genéticos producidos en la raíz en la transición juvenil-adulto, en el segundo capítulo se abordó un análisis transcripcional en raíces, derivado de la hibridación de distintas muestras de raíces juveniles y raíces adultas frente a un microarray desarrollado en parte por nuestro grupo de investigación (García-López et al. Aceptado), que incluye unos 40.000 genes de olivo. El análisis de los datos obtenidos con un “fold change” de 8 y 95% de confianza se correspondía con 253 genes expresados diferencialmente entre raíces juveniles y raíces adultas. La anotación de las secuencias reveló que las raíces juveniles comprenden un amplio abanico de procesos biológicos, mientras que en las adultas se concentran en cinco procesos de metabolismo y biosíntesis de compuestos.

La transición de fase juvenil a fase adulta en el olivo está relacionada con la adquisición de cierta distancia a las raíces, que parece estar directamente relacionada con el número de nudos a lo largo del crecimiento. Para explicar cómo se determina por parte de la planta esta distancia a las raíces, se puede postular la existencia de una señal raíz-meristemo apical que forme un gradiente de concentración que disminuya al alejarse de la raíz y que ejerza un control sobre el desarrollo de la planta. Para identificar genes específicos de raíz, potencialmente implicados en la producción y transmisión de la señal hacia la parte aérea, se realizó un filtrado de los datos del microarray, seleccionando genes expresados en las raíces y no lo hiciesen a lo largo del desarrollo de los meristemos. El análisis de expresión por Q-RT-PCR de los 30 genes obtenidos de esta forma en distintos tejidos, confirmó la especificidad en raíces de 16 de ellos. La anotación manual de 10 de los genes específicos de raíces mostraba posibles candidatos a estar involucrados en la vía

secretoria planteada, además de apuntar a aquellos genes no anotados como posibles responsables directos de la señal o la señal en sí mismos.

Con el desarrollo en los últimos años de las tecnologías de última generación, las secuenciaciones genómicas y los estudios a gran escala, la mayor parte de las investigaciones en el campo de la ciencia han tornado a “ómicas”. Este tipo de estudios amplía enormemente el horizonte y la capacidad del investigador de abarcar un gran rango de situaciones y factores que hasta no hace mucho eran inconcebibles. En el tercer capítulo se aborda un estudio transcriptómico en el olivo usando para ello la tecnología del RNAseq. Para ello se hace necesaria una base frente a la que analizar los datos de expresión, el olivo no tiene todavía disponible un genoma de referencia, por lo que la solución es el ensamblaje de un transcriptoma *de novo* a partir de los datos de la secuenciación.

Con el objetivo de obtener un transcriptoma de raíces lo más completo posible se utilizaron distintas muestras de raíces de olivo en condiciones normales y de estrés, tanto biótico, cómo abiótico a las que se sumaron algunas muestras de hoja. Se ensamblaron 730 M de lecturas paired-end aproximadamente, con varias herramientas de uso libre; *SOAPdenovo-Trans*, *ABYSS* y *Trinity*. Tras el análisis de los resultados, se llegó a la conclusión de que con la plataforma Trinity habíamos conseguido los mejores resultados. Se realizó una limpieza de contaminantes y una selección de secuencias de plantas del ensamblaje elegido, quedando el transcriptoma final del olivo compuesto por 68.259 secuencias a nivel de genes y 254.252 secuencias a nivel de transcritos. La anotación del transcriptoma se llevó a cabo usando dos plataformas; *Blast2GO* y *Trinotate*, que completan la información necesaria para los análisis posteriores de expresión. Para conocer qué genes y en qué proporción se expresan en las raíces, se realizó el análisis de la expresión en las muestras de raíces control usando el transcriptoma generado como referencia.

Summary

Plants undergo several developmental phases during their life cycle. After germination, the seedling passes through a juvenile vegetative phase, where it is not competent to flower. This is followed by the transition to the adult vegetative phase where it can respond to floral inductive signals. With the transition to flowering, the plant starts the adult reproductive phase. Transitions between phases are well known in herbaceous, conversely to what happens in woody plants, where their lower growth rate and amplitude of the phases, hinder their study. In the current work we have focused on the juvenile to adult transition, in which the tree achieves the competence to reproduction. The impact of exposing the genetic mechanisms that control this phase change resides in the economic importance of fruit trees, since the existence of a long juvenile unproductive juvenile period has traditionally slowed down plant breeding programs. In olive tree (*Olea europaea* L.), this juvenile period is even longer than other fruit trees, although recently it has been got by forced growth methods, shortening to three or four years the first flowering after seed germination (Lavee et al. 1996, Santos-Antunes et al. 2005). An earlier production, as well as economic relevance, represents a smaller architecture which enables a mechanized harvesting and lower cost of collection.

The juvenile to adult transition in woody plants is more related to the acquisition of certain size that with age (Hackett 1985), this phenomenon occurs when the apical and lateral branches reach enough distance to the roots (Robinson y Wareing 1969, Zimmerman 1971), forming what is known as cone of juvenility (Hartmann et al. 2002). In olive tree has been found that the minimum average distance to flowering happens is 200 cm from the root to meristem (Moreno-Alías et al. 2010a). Furthermore it is known that the genetic changes responsible for the transition occurs long before the distinctive morphological traits of the adult phase can be observed, such as flowering. Recent studies dating these changes in the gene expression profile of meristems during 12-15 months after germination, noting about 45 the number of nodes required (García-López et al. Aceptado). These expression changes would take place in meristems several months before the first flowering is observed, probably because once the phase transition starts up, considerable time is needed to generate new adult structures to reach reproductive competence (García-López et al. Aceptado).

For this reason, the hypothesis postulated is the role played by the roots in juvenile to adult phase transition in the olive tree. In this thesis we have focused on the study of the differences in

gene expression in juvenile and adult roots, and identification of potentially genes involved in the transition from juvenile to adult phase in the olive tree.

The present work is divided into three main chapters which have been consecutive along time and effort that have resulted in this Doctoral Dissertation. A study to characterize the *JUVENILE TO ADULT TRANSITION (JAT)* gene, that appears to be involved in juvenile to adult phase transition, is shown in the first chapter. Gene expression in juvenile and adult roots at transcriptional level is discussed in chapter two, with the goal of identifying potential genes involved in the phase change. To obtain a broader view of the role of roots, the third chapter analyzes the gene expression at the root level, by assembling a transcriptome using RNA-seq technology.

The *JAT* gene was described by our research group (Fernández-Ocaña et al., 2010) as a necessary gene for a non-delayed transition in olive tree. It was detected by having a differential expression between juvenile and adult olive shoots. Full characterization of the *JAT* gene was performed at different levels, the study of its genomic structure has revealed the existence of a *JAT* gene family, of which three paralogous are described (*JAT1*, *JAT2* and *JAT3*), with a similar organization on 5 exons and 4 introns, the genomic sequence and flanking ends have been studied individually. The analysis of translated peptide sequences analysis showed partial preservation of a phosphorylase domain, the presence of a signal peptide and a possible internal hydrophobic area, but did not elucidate or function, nor its cellular localization. From a phylogenetic perspective other plants present potential orthologous, they even keep the same genomic structure, so its function or its role might be conserved. Paralogs mRNA expression analysis showed that is *JAT2* gene which has increased expression in several tissues, being the stem the one with higher values, followed by the root, apical meristem and leaf, in that order.

Protein detection studies using a specific antibody, revealed two signals of similar molecular weight, which seemed to correspond to the protein with or without the signal peptide, either appearing differentially over the tissues, being the strongest signal observed in meristem. Tissular protein localization, by immunodetection and confocal technology, displayed protein association to the vascular bundles, particularly phloem and marked accumulation in active growing tissues, such as meristems and root tips. The study of Arabidopsis *JAT* mutants plants showed a delay in the root initial growth and an abnormal growth in the rosette leaves, described as a phenotype associated with delayed in flowering. The complete characterization of *JAT* gene family, related to

juvenile to adult transition in olive tree, expands our understanding in development processes that occur in woody plants.

Besides the functions of anchorage and water catchment traditionally attributed to the root, it owns a role in the juvenile to adult transition seems to be crucial for this normally occurs. In order to provide a more comprehensive picture of the genetic changes occurring in the root at the juvenile to adult transition, in the second chapter is approached a transcriptional analysis in roots, derived from the hybridization of different samples of juvenile and adult roots against a microarray developed in our research group (García-López et al. Aceptado), which included about 40,000 olive genes. Analysis of the data obtained with an 8-fold change and 95% confidence corresponded to 253 genes differentially expressed between juvenile and adult roots. Annotation of the sequences revealed that juvenile root comprising a wide range of biological processes, while adult were concentrated in five processes of compounds metabolism and biosynthesis.

The transition from juvenile to adult phase in the olive tree is related to the acquisition of a certain distance to the roots, which seems to be directly related to the number of nodes along the growth. In order to explain how this distance to the roots is determined by the plant, it can be postulated the existence of a root-to-meristem signal, forming a concentration gradient that decreases with distance from the root and to exercise control over the plant development. To identify specific root genes, potentially involved in the production and transmission of the signal to the aerial part, a filtering of microarray data was performed by selecting expressed genes in roots and failed to do so throughout meristems development. Expression analysis in different tissues by Q-RT-PCR of the 30 genes thus obtained, confirmed the root specificity of 16 of them. Manual annotation of 10 root specific genes showed potential candidates to be involved in the referred secretory pathway, in addition to score them as potential genes directly or indirectly responsible for the signal or the signal themselves.

In recent years, with the development of next generation technologies, genomic sequencing and large-scale studies, most of the research in science have turned to “omics.” Such studies greatly increase the possibilities and the researcher's ability to cover a broad range of situations and factors that not long ago have been inconceivable. In the third chapter, a transcriptomic study is addressed in olive tree, using these new technologies for RNA-seq analysis. For this purpose, a reference is needed to analyze expression data, the olive tree genome is not available yet, so the

solution is the assembly of a *de novo* transcriptome from data sequencing. In order to obtain a root transcriptome as complete as possible, different samples of olive roots under normal and stress conditions, both biotic and abiotic stress, and some leaf samples were added. About 730 M paired-end reads were assembled with multiple free use tools; *SOAPdenovo-Trans*, *Abyss* and *Trinity*. Following analysis of the results, it was concluded that we had achieved the best results with the Trinity platform. Cleaning of contaminants and selection of plant sequences was performed, leaving the final olive tree transcriptome composed of 68,259 gene sequences and 254,252 transcript sequences. Transcriptome annotation was performed using two platforms; *Blast2GO* and *Trinotate*, which completed the necessary information for subsequent expression analysis.

To determine which genes and what level are expressed in roots, expression analysis was performed on control root samples using the transcriptome as reference. Three groups of genes were established; low, medium and high expression genes using the expression values obtained. A discussion of the generated groups' annotation is displayed.

Introducción

EL OLIVO (*Olea europaea* L.)

Antes de introducirnos en el desarrollo de esta Tesis Doctoral, dentro de las diferentes partes y capítulos en las que se divide, cabe presentar al cultivo que nos ocupa, el olivo y describir de una forma somera sus características principales.



Figura 1. El olivo; detalle de una planta adulta, florescencias en dos etapas y fruto, sobre un fondo de un paisaje típico de cultivo.

El **olivo** es un árbol perennifolio, longevo, que puede alcanzar hasta 15 m de altura, con copa ancha y tronco grueso, retorcido y a menudo corto. Hojas opuestas, de 2 a 8 cm de largo, lanceoladas con el ápice ligeramente puntiagudo, enteras, coriáceas, glabras y verdes-grises oscuras por el haz, más pálidas y densamente escamosas por el envés, más o menos sésiles o con un peciolo muy corto. Las flores son bisexuales o polígamas, en panículas axilares multifloras, con corola blanca. El fruto, la aceituna, es una drupa succulenta y muy oleosa de 1 a 3,5 cm de largo, ovoide o algo globosa, verde al principio, que precisa de unos seis meses para adquirir un color negro-morado en su madurez (Fig.1). El periodo de floración está comprendido entre mayo y julio y el periodo de fructificación entre septiembre y diciembre (Linnaeus 1753, Valdés et al. 1987, Green 2002).

Historia y dispersión por el Mediterráneo

El olivo fue uno de los primeros árboles frutales cultivados por el hombre. Los primeros olivos cultivados se fechan en la zona de Israel en la Edad de Cobre (4000 a.C.), aunque los estudios botánicos concluyen que no es posible distinguir entre olivos silvestres y cultivados de entre los restos de polen y madera encontrados en prospecciones arqueológicas de la época (Liphshitz et al. 1991). Se cree que la gran dispersión del cultivo en la zona de Israel ocurrió un poco más tarde, en la Edad de Bronce temprana (3000 a.C.) por la cantidad de restos de utensilios relacionados con el uso y la extracción de aceite, como vasijas y lámparas de aceite.

Existen diferencias básicas entre el cultivo de herbáceas (cereales y leguminosas) y el cultivo de árboles frutales. La selección de variedades de los cereales por la mano del hombre se ha realizado históricamente en base a una serie de características que han alejado a las variedades cultivadas de las silvestres, como son un tallo largo y erguido, una semilla de mayor tamaño y que se mantenga más tiempo en la planta, mientras que la supervivencia de la especie silvestre dependía de la dispersión de las semillas. Por otro lado, el cultivo de árboles frutales significó un salto de la reproducción sexual a la reproducción vegetativa, siendo esta la única forma de mantener los fenotipos elegidos, mientras que la especie silvestre mantenía una reproducción sexual por semillas, lo que permitió la aparición de poblaciones con una gran variabilidad y un alto nivel de heterocigosidad.

El olivo (*O. europaea* L.), perteneciente al género *Olea*, es una de las 600 especies de la familia *Oleaceae*, con 30-35 especies silvestres distribuidas por Europa, Asia, Oceanía y África (Green 2002). Ha sido ampliamente estudiado y se ha denominado complejo del olivo (Green y Wickens 1989) a un grupo de 6 subespecies; *laperrinei*, presente en los macizos del Sáhara; *cuspidata*, distribuida desde Sur África hasta el sur de Egipto y desde Arabia al norte de la India y suroeste de China; *guanchica*, en las Islas Canarias; *maroccana*, presente en el sureste de Marruecos; *cereasiformis* en Madeira y *europaea* presente en la Cuenca Mediterránea (Green 2002). Se han descrito dos variedades en el olivo mediterráneo (*O. europaea* ssp. *europaea*), el olivo silvestre o acebuche (*O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*) y el olivo cultivado (*O. europaea* ssp. *europaea* var. *europaea*) (Zohary y Hopf 2000, Green 2002), las cuales coexisten compartiendo la misma zona geográfica y climática, la cuenca Mediterránea.

Durante las dos últimas décadas ha habido un intenso debate entre distintos grupos de investigación de diversos países para dilucidar el verdadero origen del olivo cultivado en la zona Mediterránea, dicho debate ha estado guiado por el desarrollo de la ciencia en general y de nuevas técnicas de análisis en particular.

Tradicionalmente sólo se habían usado rasgos morfológicos y fenotípicos para identificar los distintos cultivos de *O. europaea*. En los últimos años, con el desarrollo de nuevas técnicas y distintos marcadores moleculares, hemos sido testigos de una gran cantidad de estudios enfocados a discernir la variabilidad e identidad de los cultivos, la filogenia y al desarrollo de mapas de ligamiento entre otros (Tabla 1).

Tabla 1. Aplicaciones de los marcadores moleculares desarrollados en el olivo (*O. europaea*).

Marcador Molecular	Aplicaciones en <i>Olea europaea</i> L.	Referencias
Isoenzimas	Análisis de variabilidad.	(Trujillo et al. 1990).
Alozimas	Análisis de variabilidad.	(Ouazzani et al. 1993).
	Estudios filogenéticos.	(Lumaret et al. 2004).
RAPD	Huella genética ADN de cultivos.	(Bogani et al. 1994), (Fabbri et al. 1995), (Wiesman et al. 1998), (Belaj et al. 2002), (Guerin et al. 2002).
	Correspondencia genética del material de vivero.	(Rubio y Arús 1997), (Trujillo et al. 1999).
	Análisis de variabilidad.	(Gemás et al. 2000), (Belaj et al. 2004).
	Mapa de ligamiento.	(De La Rosa et al. 2004).
	Estudios filogenéticos.	(Hess et al. 2000), (Bronzini et al. 2002), (Belaj et al. 2002).
AFLP	Huella genética ADN de cultivos.	(Angiolillo et al. 1999), (Owen et al. 2005).
	Análisis de variabilidad.	(Belaj et al. 2004).
	Estudios filogenéticos.	(Baldoni et al. 2006), (Rubio de Casas et al. 2006).
	Mapa de ligamiento.	(De la Rosa et al. 2003).
SCAR	Huella genética ADN de cultivos.	(Busconi et al. 2006).
	Análisis de variabilidad.	(Reale et al. 2006)

Marcador Molecular	Aplicaciones en <i>Olea europaea</i> L.	Referencias
SSR	Huella genética ADN de cultivos.	(Sefc et al. 2000), (Cipriani et al. 2002), (Gil et al. 2006), (Donini et al. 2006), (Baldoni et al. 2009).
	Análisis de variabilidad.	(De La Rosa et al. 2002), (Carriero et al. 2002)
	Mapa de ligamiento.	(De la Rosa et al. 2003), (Wu et al. 2004).
	Análisis parentales.	(De la Rosa et al. 2004), (Díaz et al. 2006), (Díaz et al. 2007), (Díaz et al. 2007), (Mookerjee et al. 2005).
	Estudios filogenéticos.	(Rallo et al. 2000), (Belaj et al. 2007), (Erre et al. 2010).
ISSR	Estudios filogenéticos.	(Hess et al. 2000), (Vargas y Kadereit 2001).
	Análisis de variabilidad.	(Gemias et al. 2004).
SNP	Huella genética ADN de cultivos.	(Reale et al. 2006), (Muleo et al. 2009), (Santos Macedo et al. 2009), (Hakim et al. 2009).
DArT	Análisis de variabilidad.	(Domínguez-García et al. 2012)
Polimorfismos del ADN ribosomal.		
Secuenciación directa	Estudios filogenéticos.	(Hess et al. 2000), (Besnard et al. 2007), (Baldoni et al. 2009).
RFLP	Estudios filogenéticos.	(Besnard et al. 2001), (Besnard et al. 2007).
Polimorfismos de cloroplastos y mitocondrias.		
Secuenciación directa	Efecto de una prolongada propagación vegetativa.	(García-Díaz et al. 2003).
RFLP	Estudios filogenéticos.	(Besnard y Berville 2002), (Besnard et al. 2002), (Besnard et al. 2002), (Baldoni et al. 2009).
	Análisis de androsterilidad.	(Besnard et al. 2000).

El interés del agricultor a lo largo de los siglos ha venido marcado por la búsqueda de nuevas variedades más productivas y de mejores características frente a enfermedades o condiciones climáticas. El desarrollo del germoplasma ha estado influenciado por la propagación vegetativa de variedades durante siglos por las poblaciones locales, mientras que en la actualidad, el correcto avance de los programas de mejora se ha visto impedido por la prolongada juvenilidad que presenta el olivo (Cipriani et al. 2002).

Hasta hace poco tiempo, los estudios se habían centrado en el agrupamiento sin más de los cultivos, pero no había sido posible esclarecer los orígenes de los mismos. Estudios recientes usando RAPDs para localizar polimorfismos de ADN en mitocondrias (Besnard y Berville 2000), RFLPs para localizarlos en cloroplastos (Besnard et al. 2002) y estudios de SSRs (Carriero et al. 2002) concluyen que dichos orígenes sí se pueden evidenciar en contra de los estudios de anteriores (Fabbri et al. 1995), proponiendo diversos orígenes para las especies del género *olea* del Oeste de la cuenca Mediterránea.

Estudios más amplios a nivel del complejo del olivo (*O. europaea* L.), agrupan en cinco ramas las especies del género *Olea* distribuidos en distintos ámbitos geográficos (Besnard et al. 2002), dos de los cuales se localizan en la cuenca Mediterránea con fuertes diferencias en los marcadores cloroplastídicos, las cuales indican que sus orígenes representan diferentes refugios glaciares. Los humanos han dispersado predominantemente el clorotipo que está representado en la actualidad en el Este, preponderante en los cultivos a lo largo de toda la Cuenca Mediterránea. Combinando datos de marcadores de mitocondrias y cloroplastos, estudios posteriores discuten la existencia de hasta cinco refugios durante las glaciaciones del Cuaternario en el Mediterráneo (Besnard et al. 2002), cuya situación no ha sido establecida todavía, pero que sería de gran interés para la preservación de la diversidad genética de la especie. Por tanto, la estructura génica del olivo no sólo está relacionada con la existencia de zonas de refugio glaciares, sino que también está fuertemente influenciada por las condiciones biogeográficas de la cuenca Mediterránea y la influencia humana.

La dispersión más reciente del olivo cultivado se ha visto siempre relacionada con intercambios comerciales, además debido a su forma de reproducción alógama, se ha mantenido un alto nivel de heterocigosidad y la domesticación ha sido debida principalmente a la multiplicación vegetativa de individuos con una combinación de alelos favorable. La conclusión que deducimos de este hecho se puede resumir en que la organización de la diversidad genética del olivo mediterráneo tiene una compleja historia biogeográfica, con un importante factor humano añadido en la época reciente.

Estudios posteriores abarcando una mayor representatividad de la diversidad de los cultivos (Belaj et al. 2002), generan unos niveles mayores de polimorfismos y agrupan a los cultivos cercanos geográficamente. Esto confirma la hipótesis de un origen autoclonal y de una difusión

limitada en las zonas de cultivo (Belaj et al. 2002) y concluye con que existe suficiente variabilidad entre los cultivos de un mismo país para el diseño de programas de mejora eficientes.

Otras aproximaciones que facilitan el trabajo de los mejoradores han sido el desarrollo de marcadores basados en SSRs (Rallo et al. 2000), SNPs (Reale et al. 2006), el desarrollo de mapas de ligamiento usando diferentes marcadores moleculares; RAPD, AFLP, RFLP y SSR para dar cobertura al genoma por completo (De la Rosa et al. 2003). Además de estudios que abarquen al mismo tiempo caracteres morfológicos y marcadores moleculares, para describir variedades de cultivo de menor repercusión (D'Imperio et al. 2011) y para generar una colección representativa de la diversidad conservada en el Banco Mundial de Germoplasma del Olivo (World Olive Germplasm Bank, WOGB), situado en Córdoba, que contenga tanto marcadores moleculares cómo características agronómicas (Belaj et al. 2012). La importancia de generar estas colecciones está justificada ya que la mayor parte de las zonas cultivadas en la actualidad están cubiertas sólo con algunas variedades comerciales y es necesario preservar la diversidad genética existente en el olivo frente a la introducción y dominancia de estas nuevas variedades. Aunque el control genético de las características más importantes, como son el desarrollo o la resistencia a enfermedades, es aún desconocido y está bajo estudio.

Como resultado, el tamaño del germoplasma es un tema polémico y ampliamente discutido: alrededor de 1250 variedades, cultivadas en 54 países y conservadas en alrededor de 100 colecciones fueron incluidas en la base de datos de germoplasma FAO (Bartolini 2008), la mayor parte de los cuales provienen del sur de Europa como Italia (538 variedades), España (183), Francia (88) y Grecia (52) (Baldoni y Belaj 2010). Esta variabilidad y riqueza del germoplasma es inusual en plantas hortícolas y puede representar un recurso para la mejora genética del cultivo del olivo (Bracci et al. 2011).

En la actualidad existen tres colecciones internacionales de germoplasma, la primera en Córdoba (España), con unas 800 variedades, la segunda en Marrakech (Marruecos), con unas 570 variedades y la tercera que se encuentra en construcción en Kamelbecha (Turquía) con el objetivo de evitar las pérdidas y garantizar la supervivencia frente a posibles catástrofes de diversas índoles.

Es tal la repercusión del cultivo en la actualidad que se han realizado estudios para prever la expansión futura de los cultivos en relación con el cambio climático (Moriondo et al. 2013). La fuerte correlación entre el clima Mediterráneo y las zonas de cultivo del olivo, la ausencia de especies que interactúen de forma competitiva y el papel de la intervención humana, hacen de las zonas de cultivo un bio-indicador sensible en la Cuenca Mediterránea (Moriondo et al. 2008). Este hecho ha permitido el desarrollo de un modelo predictivo de zonas de cultivo, tanto en épocas pasadas como en un futuro próximo, basado en datos climáticos, datos inferidos de la literatura, investigaciones arqueo-botánicas y análisis fósiles de polen. Basados en este modelo se describen tres épocas donde los cambios fueron más evidentes, el Período Romano (300 a.C.-400 d.C.), la Anomalía del Clima Medieval, en la que los inviernos fueron templados (900-1200 d.C.) y la Pequeña Era Glacial, con inviernos severos (1400-1900 d.C.). En las primeras ocurrió una expansión del cultivo mientras en la última se produjo una reducción considerable (Moriondo et al. 2013). El modelo predice un desplazamiento de la franja latitudinal que ocupan los cultivos en la Cuenca Mediterránea hacia el centro y norte de Europa, debido en su mayor parte al cambio climático.

Importancia actual: Aceite, aceitunas de mesa y otros productos del olivo.

El cultivo del olivo es uno de los cultivos más antiguos de la cuenca Mediterránea (Zohary y Spiegel-Roy 1975) siendo de gran importancia para las poblaciones humanas de la región durante milenios. Evidencias fósiles sitúan el olivo silvestre en los bosques Mediterráneos durante el Paleolítico (Lipshchitz et al. 1991) pero, según las evidencias que han llegado hasta nosotros, es durante la Edad de Bronce Temprana en la zona de Mesopotamia donde encontramos claros signos de domesticación. Actualmente está ampliamente asumido que aquellos olivos silvestres que mostraban un fruto de mayor tamaño y con mayor contenido en aceite fueron propagados vegetativamente mediante estaquillas, esquejes o injertos, y que han sido dispersados por sucesivas migraciones humanas a lo largo de la zona Mediterránea durante siglos. El proceso de domesticación del olivo es un proceso largo y continuo, conectado al desarrollo de la tecnología de extracción del aceite y a las migraciones humanas, ocurriendo en general estas de este a oeste con una fuerte selección y expansión posterior de forma local (Kaniewski et al. 2012).

Dada la importancia del cultivo del olivo en toda la cuenca del Mediterráneo, el aceite de oliva constituye un componente básico en la dieta de los países que lo bordean, estando el debate de su origen geográfico todavía abierto y ampliamente discutido, cómo se ha comentado en el apartado anterior.

La aceituna, el aceite y la madera han sido, desde la Prehistoria, productos característicos de las costas del Mar Mediterráneo, ligados siempre a la economía tradicional de los países que bañan sus aguas, desde la primera extracción hasta una producción actual de 3 millones de toneladas al año. Es tal la importancia del olivo en la vida de las civilizaciones antiguas que lo convirtieron en un símbolo sagrado, ampliamente citado en la Biblia, el Corán y la literatura antigua.

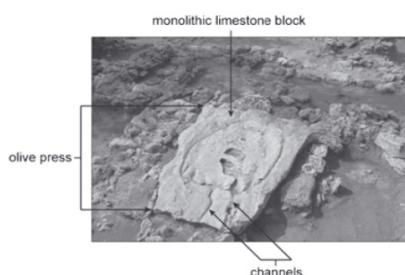


Figura 2. Prensa de aceituna de la Edad de Hierro.

Desde un punto de vista histórico, la evidencia más temprana del uso de las aceitunas salvajes se data hace 19.000 años en el mar de Galilea (Kislev et al. 1992) y de la producción de aceite a partir de olivos silvestres se fecha en el Neolítico tardío hace 6.500 años en las costas de Israel (Galili et al. 1989, Galili et al. 1997). Desde este momento y hasta la Edad de Bronce Temprana (3.000 a.C.), la extracción

de aceite se llevaba a cabo a partir de frutos de olivos silvestres, fechando la domesticación del olivo en esta época en la que empezó a ser uno de los cultivos más importantes de las regiones secas. Durante la Edad de Bronce el aceite pasó a ser de uso primario para la alimentación y la cocina, además debido a la posibilidad del mantenimiento durante largos periodos de tiempo se utilizó como moneda de intercambio (Zohary y Hopf 2000). Algunos documentos cuneiformes de Siria de hace 4000 años fijan el valor del aceite cinco veces por encima del valor del vino y dos veces y media por encima del valor de otros aceites. (Vossen 2007). La Edad de Hierro, con la estructuración de poblaciones rurales organizadas, supuso un avance inmenso en el desarrollo de la tecnología de extracción del aceite con la elaboración de prensas extractoras (Fig.2) (Marinova et al. 2011). Aunque el período cumbre del cultivo del olivo ocurrió desde el Imperio Aqueménida-Persa hasta la era Bizantina (500 a.C. – 650 d.C.) dónde la importancia económica que presentaba el aceite de oliva convirtió al olivo en un icono. Escritos del Imperio Romano indican un

uso bastante amplio tanto de su fruto como del aceite en diversos ungüentos, medicamentos, perfumes, cosméticos, lubricantes y cómo recurso energético en las lámparas de aceite (Mattingly 1996). La expansión de su cultivo y sus usos hacia el oeste de la cuenca Mediterránea fue un proceso continuo que tuvo un gran auge en épocas posteriores (Kaniewski et al. 2012).

Los productos que generaban en aquella época por presión a partir de la aceituna eran el aceite y dos subproductos, un residuo sólido que usaban como fuel, alimento para animales o fertilizante y un líquido pegajoso oscuro que se usaba como fertilizante, insecticida y lubricante que se aplicaba a heridas (Mattingly 1996). Comparando estos productos y subproductos con los obtenidos en la actualidad observamos varias similitudes. Con las técnicas modernas podemos extraer distintos tipos de aceites (Fig.3); de oliva virgen, refinados, de oliva y de orujo y varios subproductos como el orujo sólido, el alpechín y el alperujo (una mezcla de los dos anteriores).

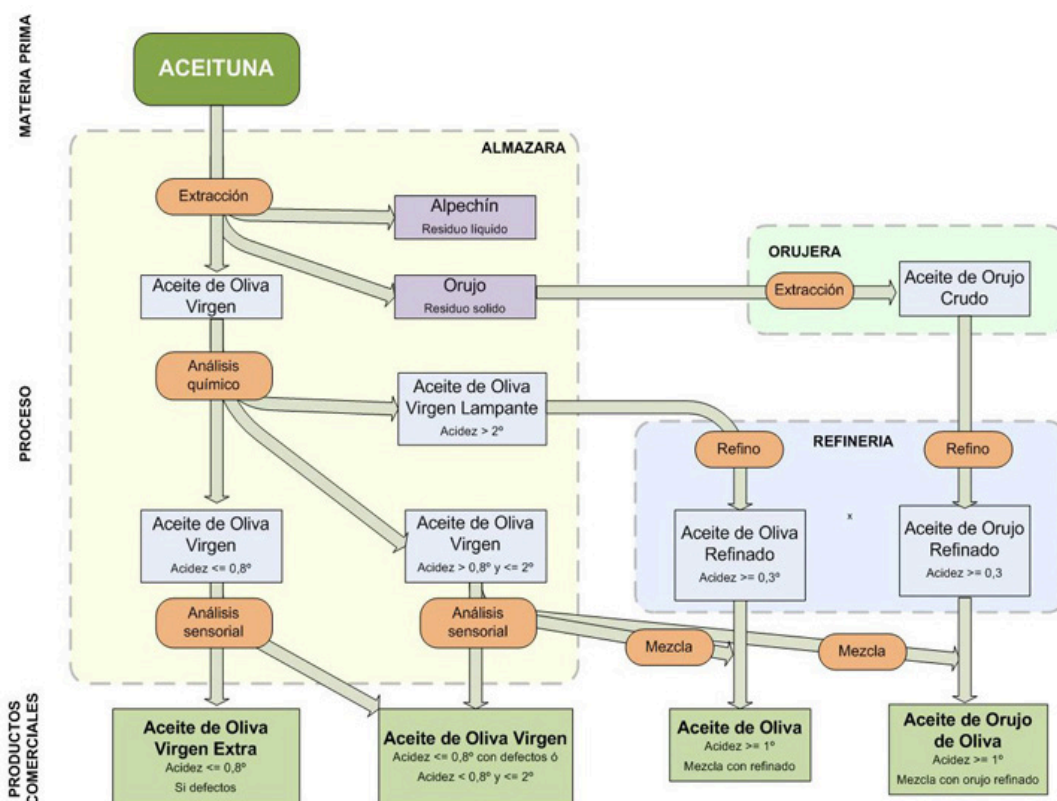


Figura 3. Distintos tipos de aceite obtenidos a partir de aceituna según el método de extracción utilizado.

En el Reglamento nº 1234/2007 del Consejo de 22 de octubre de 2007 de la Comunidad Europea, por el que se crea una Organización Común de Mercados agrícolas (OCM), en su Anexo XVI, se establecen designaciones y definiciones de los aceites de oliva y de orujo (C.E._nº_1234/2007). En resumen, los **aceites de oliva vírgenes** serán aquellos obtenidos exclusivamente por medios mecánicos y procedimientos físicos excluyendo toda alteración del producto y se dividen en; aceite de oliva virgen extra, aceite de oliva virgen y aceite de oliva lampante (este último no apto para el consumo) (Naciones Unidas Actualizado 2013), diferenciados por su acidez libre máxima además de por otras características organolépticas. El **aceite de oliva refinado** es aquel obtenido por el refinado de los aceites vírgenes. De la mezcla de ambos se obtiene el **aceite de oliva**. A partir del orujo, residuo sólido de la extracción física del aceite de oliva virgen, obtenemos distintos aceites de menor calidad, el **aceite de orujo crudo** y **aceite de orujo refinado**, y mezclando este último con aceite de oliva virgen se obtiene el **aceite de orujo**.

Haciendo referencia a la composición química del aceite de oliva virgen podemos diferenciar entre componentes mayores o fracción saponificable, que se corresponde con los glicéridos, con un 98-99% del peso total y componentes menores que cubren el 2% restante y que incluyen más de 230 compuestos químicos como alcoholes, esteroides, hidrocarburos, compuestos volátiles y antioxidantes (Servili et al. 2004).

Existe una marcada concentración de la producción y el consumo de frutos y aceite de oliva en la cuenca Mediterránea, siendo de esta zona 18 de los 30 países con cultivos de olivar y abarcando el 86% del consumo y el 98% de la producción a nivel mundial a finales de los noventa (Grigg 2001). España es uno de los primeros productores con un 51% de la producción mundial (Tabla 2), Andalucía abarca el 82-4% de la producción española y Jaén el 50-5% de la producción andaluza (denominada “Capital Mundial del Aceite de oliva”) (C.O.I.).

Tabla 2. Producción mundial de aceite de oliva por campañas 2011/12, 12/13 y 13/14 (datos estimados), a nivel mundial, en Europa, España, Andalucía y Jaén (C.O.I.).

PRODUCCIÓN DE ACEITE DE OLIVA POR ZONAS GEOGRÁFICAS (Miles T.)			
ZONA	Camp. 11/12	Camp. 12/13	Camp. 13/14 (est.)
MUNDO	3.321	2.425	3.098
U.E.	2.395	1.459	2.308
ESPAÑA	1.615	616,3	1.607
ANDALUCÍA	1.363	514	1.312
JAÉN	682	170	715
COMPARATIVA POR ZONAS GEOGRÁFICAS			
U.E./MUNDO	72%	60%	75%
ESPAÑA/U.E.	67%	42%	70%
ANDALUCÍA/ESPAÑA	84%	83%	82%
JAÉN/ANDALUCÍA	50%	33%	55%

Los datos públicos más recientes de los que se dispone se publican en la revista anual OLIVÆ o en su Newsletter mensual (C.O.I.), que prevé una producción a nivel mundial en la presente campaña 2013/14 de unas 3.098.000 t y que data la producción de la anterior (2012/13) en 2.425.000 t y el consumo en 3.041.000 t, un 27% y un 1,5% menos que en la campaña previa respectivamente, debido a nivel individual a la pérdida en la producción de un 62% en España y un 23% en Portugal, a causa de condiciones climáticas adversas. Comparando los precios medios en origen de los tres mercados representativos de la Unión Europea (Fig.4), que abarcan el 73% de la producción mundial de aceite de oliva (Bari (Italia), Heraklion/Mesenia (Grecia) y Jaén (España)), se observa una disminución del precio en las últimas campañas (hasta 2010/11) respecto a un aumento de los recursos mundiales de aceite a excepción de Italia, donde hay fuerte incremento del precio.

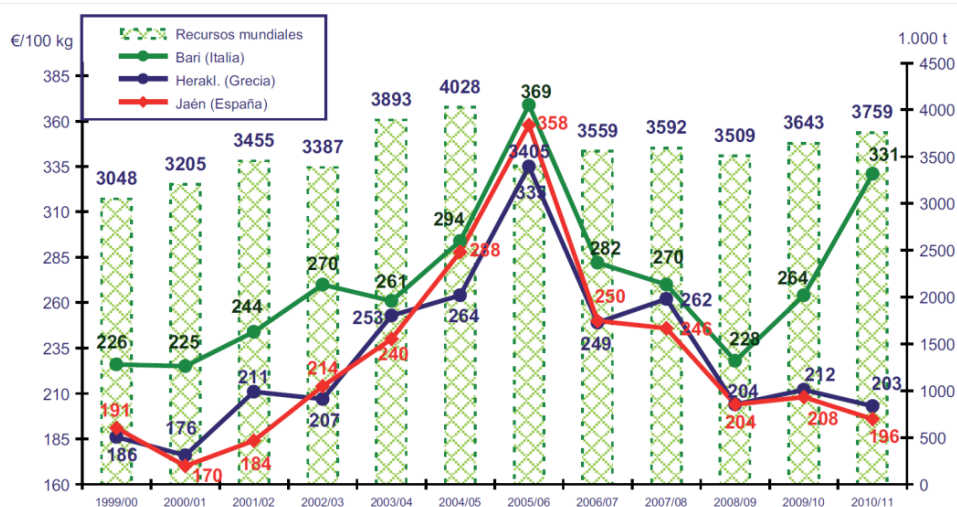


Figura 4. Precios medios en origen por campaña oleícola para la categoría virgen extra.

Teniendo en cuenta los datos mensuales de las últimas campañas y los más actuales (Fig.5) se observa una bajada del precio en Italia y una recuperación más o menos proporcional en los tres países representados, llegando los datos hasta Septiembre de 2013 (C.O.I.). En este caso los datos de Grecia son de la región de Chania.

El consumo de aceite se ha incrementado en los últimos años debido a su valor nutricional (Rugini et al. 2005), es el producto principal aunque también se consumen aceitunas de mesa y se ha extendido el uso de su madera.

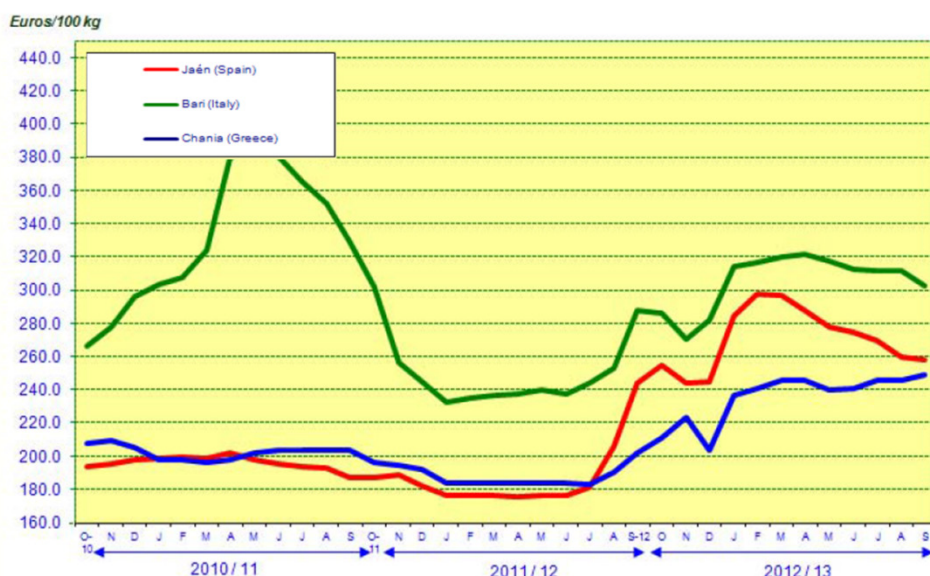


Figura 5. Variaciones mensuales del precio en origen del aceite de Oliva Virgen Extra durante las últimas campañas.

En cuanto a la aceituna de mesa, es una drupa que contiene 50% de agua, 22% de aceite, 19,1% de carbohidratos, 5,8% de celulosa, 1,6% de proteínas y 1,5% de minerales (Haumann 1996). Además posee un principio amargo, la oleuropeína y un bajo contenido en azúcares en contraste con el resto de las drupas, que alcanzan el 12%. El contenido de aceite depende de su estado de madurez y variedad, pudiendo variar entre 12 y un 28% (Vossen 2005). En España se comercializan varias variedades siendo las principales; Manzanilla, Gordal, Hojiblanca, Cacereña o Manzanilla Cacereña y Carrasqueña. Atendiendo a la calidad y a la época de cosecha se clasifican en verdes, de color cambiante y negras.

España posee el 30,3% de la producción de aceitunas de mesa a nivel mundial y un 11,9% del consumo, por lo que es uno de los principales países importadores a aquellos no productores o productores secundarios, cómo países del norte de Europa con un 18% del consumo, o países productores menores distribuidos a nivel global con un 30% del consumo (C.O.I.).

Además de los productos de consumo alimenticio, cómo resultado de la extracción del aceite y de la labranza de los cultivos, se obtienen otros subproductos que están aumentando su valor en los últimos años. Tal es el caso de su **madera**, con un alto poder calorífico, usándose la de mayor tamaño para la artesanía y la de menor tamaño, obtenida regularmente debido a la poda, como

combustible y uso doméstico en forma de carbón o picón. Los restos más pequeños de la poda se han usado tradicionalmente como comida para el ganado por poseer una composición parecida al heno y en los últimos años, desde el punto de vista del aprovechamiento, se trocean mecánicamente y se adicionan a suelos pobres como sustratos y abonos naturales. Las **hojas** que provienen de la limpieza en la recogida se usan del mismo modo que los restos de la poda de pequeño tamaño, aunque también se recogen para su uso terapéutico, ya que están indicadas en el tratamiento de la hipertensión, la arteriosclerosis y la diabetes. El resto de la pulpa y el hueso tras la extracción del aceite es conocido como **orujo** y se utiliza como combustible (**orujillo**), como abono y como alimentación animal mezclado con salvado. El **hueso** también se usa por separado como combustible. El agua utilizada durante la extracción y la decantación del aceite se denomina **alpechín** y se usa como abono natural. La evolución de los nuevos sistemas de extracción dan como resultado nuevos productos de desecho, como el **alperujo** (alpechín + orujo) que se usa como combustible y abono.

Importancia actual: Dieta Mediterránea, Aceite de Oliva Virgen Extra y Salud.

El concepto **Dieta Mediterránea** fue promovido por los estudios realizados en la década de los 70 por el científico americano Ancel Keys, en uno de sus estudios conocido como el estudio de los siete países (Finlandia, Italia, Grecia, Yugoslavia, Países-Bajos, Japón y Estados Unidos), relacionó la dieta con una menor incidencia de enfermedades cardíacas, distintos tipos de cáncer y otras enfermedades en los países de la cuenca Mediterránea (Keys et al. 1986, Kromhout et al. 1989). En general los alimentos de la Dieta Mediterránea (Fig.6) que la hacen distinta a la de otras partes de Europa son; frutas, vegetales, legumbres, frutos secos, pan integral, pescado, aceite de oliva y vino, aunque de entre ellos, son el aceite de oliva, especialmente el virgen extra, el vino y el pescado sobre los que recae la mayor responsabilidad de las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que se le atribuyen (Pauwels 2011).

La lista de enfermedades y desórdenes que se están relacionando con la Dieta Mediterránea y con el Aceite de Oliva Virgen Extra, tanto directa como indirectamente, es tan amplia en los últimos años, que constituye una ardua tarea intentar resumir en solo unos párrafos tanta información. Según la II Conferencia Internacional del Aceite de Oliva y Salud, que tuvo lugar en

Jaén y Córdoba en 2008, las evidencias crecientes sugieren que; los ácidos grasos monoinsaturados como nutrientes, el aceite de oliva como alimento y la Dieta Mediterránea como patrón alimenticio, están asociados a una disminución en el riesgo de sufrir cáncer, daño cardiovascular, obesidad, síndrome metabólico, diabetes tipo 2 e hipertensión. Los componentes fenólicos del aceite muestran propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, previenen la lipoperoxidación, inducen cambios favorables en el perfil lipídico, mejoran la función endotelial y revelan propiedades antitrombóticas. Algunos estudios de observación revelan que esta dieta puede ser preventiva en el deterioro cognitivo debido a la edad y en el Alzheimer, y se relaciona además con un envejecimiento saludable y un aumento de la longevidad (Lopez-Miranda et al. 2010).

Pirámide de la Dieta Mediterránea: un estilo de vida actual

Guía para la población adulta

Medida de la ración basada en la frugalidad y hábitos locales



Vino con moderación y respetando las costumbres



Edición 2010

© 2010 Fundación Dieta Mediterránea
El uso y la promoción de esta pirámide se recomienda sin ninguna restricción



Fundación
Dieta Mediterránea

ICAF
International Commission on the
Anthropology of Food and Nutrition



Predimed
Promoción de la Dieta Mediterránea



Universitat de València
Instituto de Investigación en
Ciencias de la Alimentación y el Medio Ambiente



H.H.F.
FOUNDATION



IUNS



CIHEAM
International Centre for
Mediterranean Agriculture Studies



fenS
European Federation of
Nutrition Societies

Figura 6. Pirámide de la Dieta Mediterránea actualizada para adaptarse al estilo de vida actual, Fundación Dieta Mediterránea (FDM), creada en 1996 para conservar el estilo de vida que compartimos los pueblos mediterráneos. (<http://dietamediterranea.com/>) (Bach-Faig et al. 2011).

De todas ellas son el cáncer y las enfermedades cardiovasculares las más estudiadas, por ser dos de las enfermedades con más repercusión y trascendencia en la poblaciones de los países desarrollados.

Aunque más del 40% de las muertes por **cáncer** se pueden evitar, sigue representando la segunda causa de mortalidad en Europa. En los próximos años las muertes por cáncer van a disminuir pero aumentará el número total de enfermos, principalmente por el aumento de la edad en la población y la mayor esperanza de vida (La Vecchia 2011). La prevención del cáncer consiste, según los expertos, en una dieta saludable y un control de la obesidad, además de una disminución en el consumo de tabaco. Una dieta modelo saludable en Europa es la Dieta Mediterránea por poseer un buen balance entre ácidos grasos omega 6 y omega 3, altas cantidades de fibra, antioxidantes, polifenoles y ácido oleico (Simopoulos 2001, Giacosa et al. 2013). Europa ofrece un “laboratorio” ideal para la formulación de hipótesis y la realización de test en el estudio del cáncer, por poseer un amplio rango de incidencia de los más comunes y situaciones muy distintas en cuanto a dietas, ambientes y características culturales.

El uso de aceite de oliva en lugar de mantequillas u otras grasas parece resultar en una disminución del riesgo de varios de los cánceres más comunes, sobre todo en aquellos que afectan al tracto digestivo y respiratorio superiores. Además de ser la fuente principal de grasa monoinsaturada, también lo es de micronutrientes y otros componentes menores implicados en la prevención del cáncer (Pelucchi et al. 2011). Siguiendo una dieta saludable y algunos consejos básicos como actividad física regular, descanso adecuado, etc. se podrían evitar más del 25% de cáncer de colon, 15% de pecho y 10% de próstata, además de ayudar en el mantenimiento del peso y evitar la obesidad, un objetivo prioritario en la prevención del cáncer (Gallus et al. 2006).

Dentro de las **enfermedades cardiovasculares**, las afecciones coronarias son la principal causa de mortalidad en los países industrializados, aunque tradicionalmente la Dieta Mediterránea haya sido asociada con la reducción de mortalidad por cáncer, los beneficios más importantes están relacionados con la morbilidad y la mortalidad por daños cardiovasculares (Covas 2007, Huang y Sumpio 2008). Los factores de riesgo más importantes relacionados con estas enfermedades son; arteriosclerosis, alta presión sanguínea e hipercolesterolemia. Podemos observar una relación inversa (Fig.7) entre el consumo de aceite de oliva y la mortalidad debida a enfermedades coronarias, con excepción de Francia y Japón, siendo la base de la dieta parecida a

la Mediterránea y añadiendo el uso de otros aceites vegetales. En la actualidad Creta y Japón poseen las cifras más bajas de mortalidad por este tipo de enfermedades.

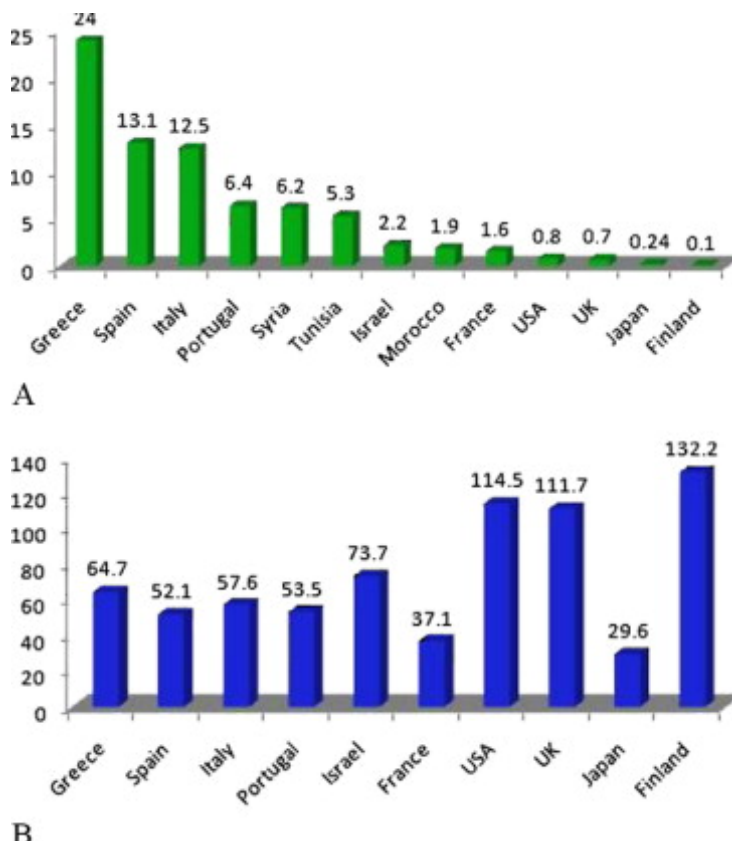


Figura 7. (A) Consumo per cápita de aceite de oliva en los países seleccionados (Olive Oil Council Data). (B) Cifras de mortalidad por daños coronarios (por cada 100,000 muertes) de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (Cardiovascular Disease Infobase) (Huang y Sumpio 2008).

Los beneficios del aceite de oliva van más allá de una mera reducción de los niveles de LDL (Low Density Lipoprotein), es sobre los más de 230 componentes minoritarios del Aceite de Oliva Virgen Extra sobre los que se centra la competencia de importantes efectos protectores cardiovasculares a diferentes niveles (oxidación lipídica, hemostasia, agregación de plaquetas, coagulación y fibrinólisis) y sobre el ácido oleico y los polifenoles (tocoferol, hidroxitirosol y oleuropeina) los efectos anti-ateroescleróticos (Huang y Sumpio 2008).

El aceite de oliva está implicado en mecanismos antiinflamatorios y antioxidantes (Tripoli et al. 2005, Lau et al. 2008), los compuestos fenólicos interactúan en la cascada inflamatoria con su acción antioxidante por su capacidad de capturar radicales libres evitando daño celular (Biesalski 2007). Por otro lado, también reduce las necesidades de insulina y disminuye los niveles de glucosa en plasma de diabéticos tipo 2 (Covas 2007). El ácido oleico, ácido graso mayoritario en las membranas fosfolipídicas, hace a la célula menos susceptible a la oxidación reduciendo la formación de moléculas proinflamatorias (Owen et al. 2004). Estas propiedades quimio-protectoras se traducen en una serie de mecanismos beneficiosos para la salud incluyendo defensa frente a infecciones virales, protección contra el desarrollo de cáncer y contra daños cardiovasculares.

La palabra “dieta” siempre genera una reacción negativa en los consumidores, lo cual no ocurre en el caso de la Dieta Mediterránea, ya que es una aproximación más apetitosa de realizar una dieta baja en grasas que otras modificaciones alimenticias que se llevan a cabo (Kok y Kromhout 2004).

Aunque la mayoría de las aportaciones del olivo al amplio campo de la salud son positivas, también posee su talón de Aquiles, la **alergia**. Esta afección está causada por el polen del olivo y la sufren miles de personas en primavera. Cursa con una sintomatología muy diversa, siendo los más usuales síntomas nasales (estornudos, secreción nasal acuosa, prurito nasal, congestión), oculares (prurito, lagrimeo, enrojecimiento), faríngeos (prurito, secreciones) y del oído (prurito).

El polen del olivo es uno de las mayores causas de alergia en la cuenca Mediterránea y la primera en algunas provincias de Italia y España donde su cultivo es muy intensivo (Bousquet et al. 1984) (D'Amato et al. 1988). El polen posee las condiciones idóneas para ser un alérgeno; es pequeño (alrededor de 18 μm), fácilmente esparcido por el viento (anemófilo), y sus balances diarios pueden llegar a alcanzar valores por encima de los 5000 granos/ m^3 de aire y mantenerse durante semanas (D'Amato et al. 1988) (Florido et al. 1999).

La alergia al polen del olivo está bien documentada en algunos países como España e Italia donde la temporada de polinización, desde mediados de abril hasta finales de junio produce un alto número de afectados con numerosos síntomas (Villalba et al. 2013). Los extractos de proteínas del polen del olivo presentan un complejo y variado alelograma; al menos veinte bandas reactivas aparecen en ensayos de inmunodetección y los pacientes pueden presentar sensibilidad

a diferentes combinaciones de los mismos. En la actualidad han sido identificadas doce proteínas alergénicas del polen (Ole e 1 – Ole e 12) con diferente incidencia clínica (Fig.8), aunque el uso de novedosas herramientas proteómicas parecen adelantar nuevo hallazgos. Por el contrario y a pesar de lo extendido que está el consumo de aceitunas, existen pocos o ningunos datos de alergia al fruto, excepto casos aislados (Palomares et al. 2008).

A lo largo de los últimos 15 años se han identificado otros alérgenos a partir del polen del olivo pero su relevancia no ha sido completamente demostrada, ya sea por su baja prevalencia en las poblaciones analizadas o por una caracterización incompleta. Sin embargo pueden tener una

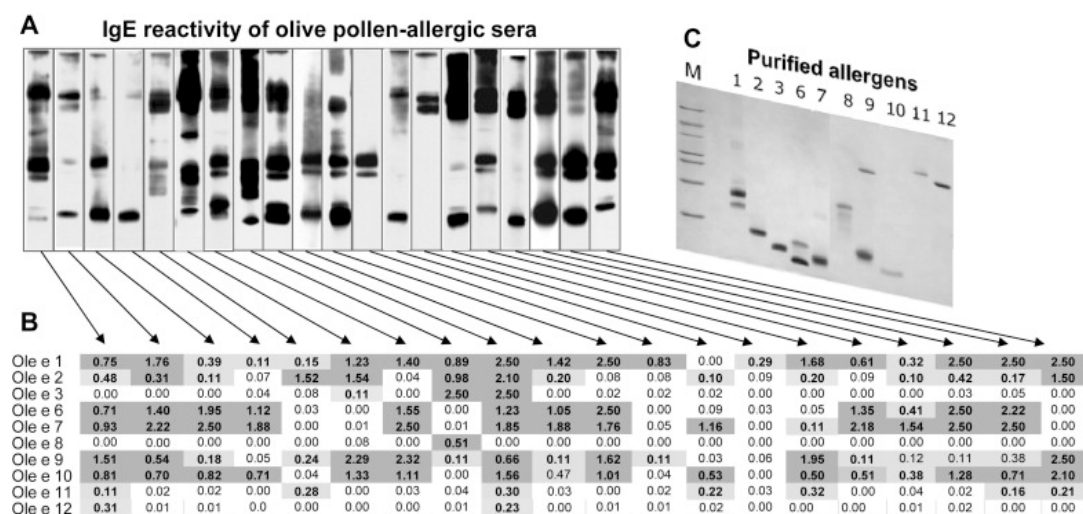


Figura 8. Perfiles alergénicos de pacientes alérgicos al polen del olivo. Perfiles de unión de IgE de veinte pacientes alérgicos (A), que se correlacionan con valores obtenidos de ELISA (B) y con los alérgenos purificados (C) (Villalba et al. 2013).

importancia mayor si se consideran en asociación con otras fuentes alergénicas, provocando reacciones cruzadas y dando lugar a nuevos síntomas.

Desde un punto de vista clínico uno de los aspectos más relevantes en el campo de la alergia es conseguir buenas muestras biológicas individualizadas para la diagnosis y los ensayos inmunoterapéuticos, además no se alcanzan los resultados deseados en todos los pacientes y pueden aparecer ataques anafilácticos y nuevas sensibilizaciones. Todo ello está dificultado por el elevado número de variedades y la gran cantidad y variabilidad de alérgenos e isoformas de los mismos que podemos encontrar en el polen (Duffort et al. 2006). Los estudios se han centrado en el

análisis de marcadores de sensibilización, alérgenos y en el establecimiento de correlaciones entre alérgenos y síntomas. En un futuro la investigación en este campo está abierta a nuevas terapias, como vacunas usando alérgenos modificados y el desarrollo de nuevos sistemas de administración y nuevas estrategias terapéuticas que mejoren el día a día del paciente (Villalba et al. 2013). Una de estas nuevas estrategias son las vacunas nasales, que proponen ventajas significativas como son la administración por vía respiratoria, simple y automática, dosis más reducidas y respuestas localizadas y potentes (Kiyono y Fukuyama 2004, Calderon et al. 2012).

Importancia actual: Trazabilidad del Aceite de Oliva Virgen Extra.

La trazabilidad se define, según el Comité de Seguridad Alimentaria de AECOC, como el conjunto de aquellos procedimientos preestablecidos y autosuficientes que permiten conocer el histórico, la ubicación y la trayectoria de un producto o lote de productos a lo largo de la cadena de suministros en un momento dado a través de unas herramientas determinadas. Permitiendo, por tanto, un control en la cadena de producción y el marketing del producto para que pueda ser localizado en todo momento. Por ello, es necesaria y requerida, tanto en prevención de malentendidos accidentales o deliberados, como para asegurar la salud pública.

En el caso del Aceite de Oliva, el incremento de la demanda de aceites de calidad dado su actual repercusión, ha provocado la aparición en el mercado de multitud de aceites con características específicas y bien definidas, desde aceites con denominación de origen hasta aceites monovarietales (Montealegre et al. 2010). Los estudios de trazabilidad en el olivo están centrados en el origen geográfico o botánico, siendo estos ligeramente distintos, mientras el primero trata de localizar el origen geográfico concreto de los cultivos, el segundo tiene como objetivo la variedad o variedades usadas para la producción. Ambos se estudian conjuntamente o por separado para lograr una serie de marcadores que permitan un control de calidad estricto que evite el fraude a los distintos niveles, productores y consumidores, de la producción del “oro líquido” (Contiñas et al. 2008).

Este hecho suscita interés en la actualidad por la aparición de casos en los que se han adulterado aceites de alta calidad con otros de calidad menor, cómo el aceite refinado, de orujo o el lampante (no indicado para el consumo) o incluso con aceites vegetales de otros cultivos

(girasol, soja o avellana), con el objetivo de abaratar su coste. Las aproximaciones que se han llevado a cabo para ponerlas de manifiesto son numerosas y diversas, entre ellas la espectrometría infrarroja (Lai et al. 1995), cromatografía de gases y líquida de alta resolución (Christopoulou et al. 2004), espectrometría de masas (Peña et al. 2005) y análisis de componentes principales (Mildner-Szkudlarz y Jeleń 2008). Los estudios que se llevan a cabo en la búsqueda y caracterización de marcadores que nos permitan mejorar dicha trazabilidad los dividen en estructurales (ácidos grasos, triglicéridos, esteroides, compuestos fenólicos, compuestos volátiles, pigmentos, hidrocarburos, tocoferoles...) y genéticos (RAPDs, SCARs, AFLPs, ISSRs, SSRs...) (Montealegre et al. 2010).

DESARROLLO Y CICLO DE VIDA DE LAS PLANTAS

En ciencia y tecnología siempre se han buscado modelos de estudio básicos, económicos, manejables y fácilmente manipulables para realizar los experimentos y los análisis necesarios, que permitieran el posterior traslado de los resultados a modelos más complejos. Como consecuencia de ello, en Biología numerosos procesos se estudian primero en organismos modelo y una vez conocido el proceso en el organismo modelo, se extienden esos conocimientos a organismos más complejos. Este es el caso de *Arabidopsis* en Biología Molecular y Genética de plantas. A pesar de que *Arabidopsis* no tiene ningún interés económico, la facilidad del estudio de los rasgos agrícolas más importantes y la facultad de transferirlos a otras especies de interés, ha hecho de ésta el modelo de estudio en plantas por excelencia. Durante las últimas dos décadas la comunidad que estudia *Arabidopsis* se ha incrementado enormemente (Somerville y Koornneef 2002), así fue la primera planta en tener el genoma secuenciado y se posee la mayor colección de plantas mutantes disponibles hasta la fecha. Los estudios en *Arabidopsis* han cubierto no solo el desarrollo, si no casi todos los aspectos de la biología de las plantas (Pua y Davey 2010).

Los avances y descubrimientos en desarrollo de plantas se han extrapolado a diversas especies de herbáceas, entre los que destacan; *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Solanum lycopersicum*, *Petunia hybrida*, *Antirrhinum majus* y también a diversas especies leñosas; *Heredia hélix*, *Picea abies*, *Malus domestica*, *Vitis vinífera*, *Populus trichocarpa*, entre otras, ya sea con un interés económico o comercial.

En los últimos años ha aumentado mucho el número de estudios relacionados con el desarrollo en plantas (Fig.9), revelando la importancia del conocimiento de los cambios que se producen con el objetivo de mejorar los cultivos a nivel de producción y de calidad.

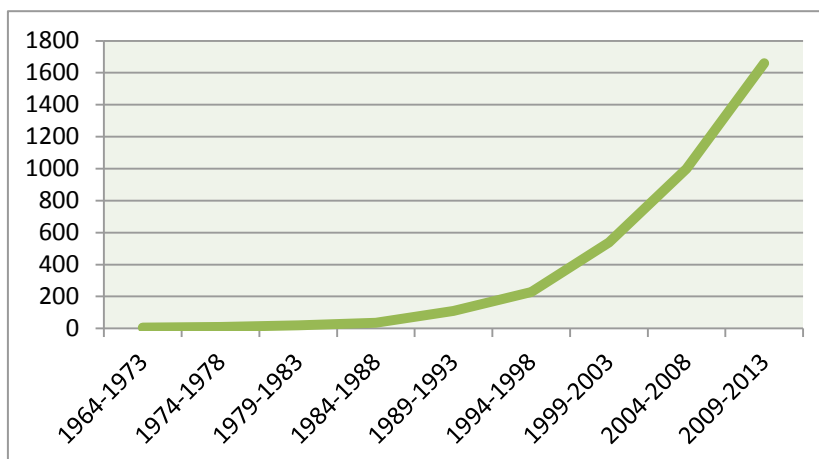


Figura 9. Estudios relacionados con el desarrollo en plantas. Se representan el número de estudios frente a las fechas en intervalos de 4 años. Datos procedentes del NCBI, búsqueda avanzada de “plant development” en títulos y resúmenes de artículos publicados entre 1964 y 2013.

En general todos los organismos maduran a través de una serie de fases en su desarrollo, en animales cada fase es un episodio en la vida de un organismo completo, en plantas estas fases son episodios en la vida de una parte del organismo, los **brotos** (Poethig 1990, Greenwood 1995).

Los brotes superan tres fases mayores distintas durante el desarrollo post-embionario; una fase juvenil vegetativa, una fase adulta vegetativa y una fase adulta reproductiva. La fase **juvenil vegetativa** comienza cuando el meristemo apical genera un tallo, se forman hojas verdaderas y comienzan a desarrollarse los primeros brotes axilares, se distingue por la adquisición de unos rasgos característicos y por la ausencia de estructuras reproductivas. La fase **adulta vegetativa** se basa fundamentalmente en el desarrollo completo de los brotes axilares y en la adquisición por parte de la planta de una competencia para introducirse en la siguiente fase o etapa reproductiva.

Aunque se han relacionado la formación y desarrollo de diversas estructuras con la transición entre fases; distribución de tricomas (Telfer et al. 1997), resistencia a patógenos y herbívoros (Zagory y Libby 1985, Karban y Thaler 1999), longitud y ángulo de crecimiento de los brotes laterales (Day et al. 1997), capacidad de formar raíces adventicias (Zimmerman et al. 1985) entre otras, es la formación de las estructuras reproductivas (inflorescencias, flores o conos) las que

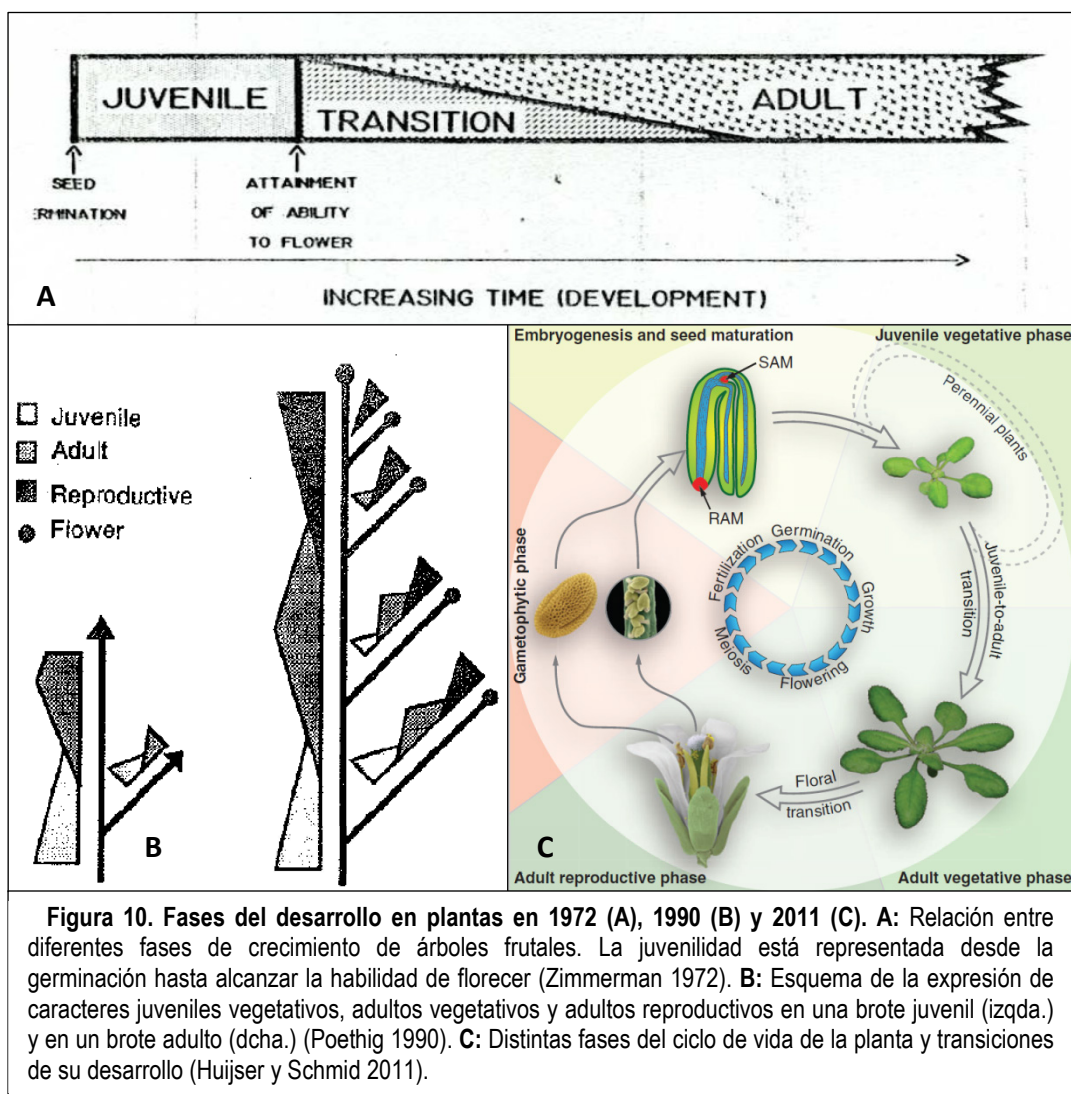
marcan el final del crecimiento vegetativo y el comienzo del reproductivo. Estos cambios no son exactamente los mismos entre especies; en algunas plantas la formación de estructuras florales marca también el final del desarrollo del brote y de la planta, en otras finaliza el desarrollo del meristemo, pero el crecimiento se perpetúa lateralmente y también puede ocurrir que el meristemo apical mantenga su crecimiento vegetativo y sólo los meristemos laterales formen estructuras reproductivas. Cualesquiera que sean las vías con las que se alcanzan la formación de estructuras reproductivas, estas son la única forma de ubicar a la planta en la fase **adulta reproductiva** (Greenwood 1987, Poethig 1990, Poethig 2010).

Durante el desarrollo los meristemos van produciendo nuevas estructuras y generan un gradiente de rasgos en el que los caracteres juveniles que se forman primero quedan en la base e interior y los formados más tarde en posiciones apicales y exteriores, dando lugar al fenómeno denominado **cono de juvenilidad** (Hartmann et al. 2002), resultado de una obvia transición entre fases durante el desarrollo (Allsopp 1967). El uso de los términos juvenil y adulto para diferentes fases implica una regulación temporal y el cono de juvenilidad supone una regulación espacial. Este patrón polarizado hace difícil distinguir de una forma específica los factores espacio-temporales responsables de los cambios de fase durante el desarrollo. Es interesante definir la **maduración**, parte integral del ciclo de vida de las plantas vasculares, como el conjunto de las fases anteriormente descritas, a través de las cuales se desarrolla la planta. En plantas leñosas se ha asociado la maduración con una disminución de los ratios de crecimiento, un aumento del plagiotropismo, cambios en la competencia reproductiva y las características de las ramas y diferencias en la morfología foliar (Greenwood 1995).

El ciclo de vida de las plantas en general y el desarrollo como transición de las fases en particular han sido estudiados ampliamente por infinidad de autores a lo largo de la historia reciente, aunque los cimientos sobre los que se sustentan no han cambiado demasiado (Fig.10).

En la década de los sesenta ya estaban definidos conceptos como juvenilidad o fase juvenil, fase adulta, cambio de fase (Zimmerman 1972) y se llevaban a cabo experimentos para ver la relación de la floración, directamente conectada con la fase adulta, con el crecimiento de la planta (Robinson y Wareing 1969) y la respuesta a estímulos hormonales (Dayton 1966) y ambientales (Brink 1962, Visser 1964). Se definía estrictamente la **juvenilidad** como la capacidad de las plantas de formar flores, la fase juvenil finalizaba con la obtención de dicha habilidad.

Por su parte, las plantas leñosas no florecen en un cierto periodo de tiempo tras la germinación, este retraso es un serio obstáculo al proceso de cultivo de las mismas, es característico de la juvenilidad y puede ser acortado controlando los factores ambientales de crecimiento de la planta. Alcanzar la facultad de florecer marca el final de la fase juvenil, así como las flores son la primera evidencia de la fase adulta. El final del periodo juvenil y la floración no tienen por qué coincidir, cuando no lo hacen dicho lapso de tiempo es denominado periodo de **transición** y no puede distinguirse de la fase juvenil (Fig.10-A) (Zimmerman 1972).



La fase juvenil y la fase adulta pueden diferenciarse en muchas otras características como son; la forma, el color, la filotaxia, el grosor y el retraso de la caída de las hojas, la presencia de espinas en el tallo, la capacidad de formar raíces adventicias o la resistencia a enfermedades entre otras, pero todos estos cambios ocurren gradualmente a lo largo del crecimiento y no parecen estar conectados directamente a la floración. En aquellos años ya remarcaban la importancia, para futuras investigaciones, de determinar los cambios metabólicos que ocurrían en la transición, entender la naturaleza de dichos cambios y obtener plantas con una floración más temprana.

Dos décadas después se definía un modelo de crecimiento en fases que implicaba un desarrollo de los brotes regulado independientemente, fase juvenil, fase adulta vegetativa y fase adulta reproductiva (Fig.10-B), en el que los rasgos que las diferenciaban aparecían solapados durante el crecimiento de las distintas partes de la planta y las etapas de transición entre fases parecían estar reguladas también de forma independiente (Wareing y Frydman 1975). En plantas leñosas dicha transición iba acompañada de la producción de patrones intermedios que combinaban rasgos celulares y morfológicos de cada fase implicada (Ahuja 1993).

En la actualidad se define el **ciclo de vida** de las plantas con flores como una sucesión de distintas fases de crecimiento, estando las transiciones entre ellas controladas por el desarrollo de complejos programas genéticos, activados y modulados por estímulos tanto exógenos como endógenos de la propia planta (Fig.10-C) (Huijser y Schmid 2011). Estamos comenzando a comprender los factores que determinan cada transición entre fases, siendo primordial el papel de las señales ambientales en la sincronización de las mismas (Bäurle y Dean 2006).

Las **transiciones** que experimenta una planta en su desarrollo comienzan con la germinación, en el que hay un cambio en el modo de crecimiento de embrionario a post-embrionario. La segunda de las transiciones ocurre entre la fase vegetativa juvenil y la fase vegetativa adulta en el que la planta adquiere la capacidad de responder a las señales de inducción de la floración. Con la transición floral la planta alcanza la fase adulta reproductiva y la meiosis posterior marca la transición a la fase gametofítica. Con la unión de los gametos durante la fertilización se comienza la fase embrionaria de la siguiente generación y se cierra el ciclo (Fig.11) (Bäurle y Dean 2006).

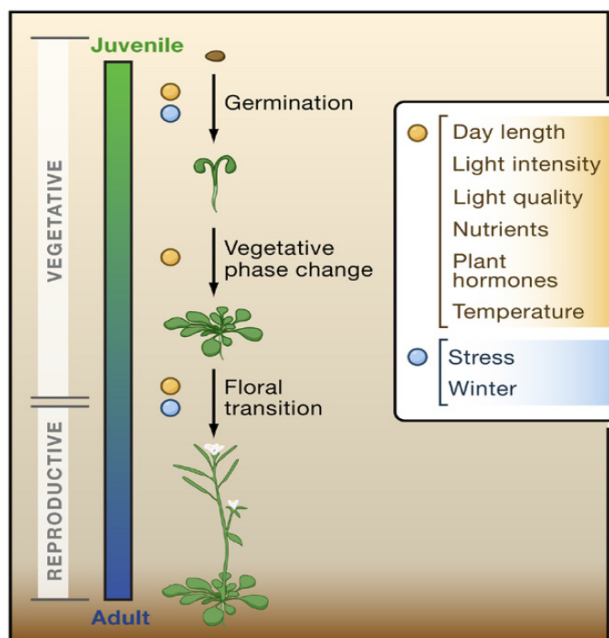


Figura 11. Transiciones del ciclo de vida de la planta y factores reguladores. La **germinación** es la transición entre el desarrollo embrionario y post-embrionario. En la fase vegetativa, la semilla progresa de un estado juvenil a un estado adulto mediante la **transición juvenil-adulto** (vegetative phase change). La tercera transición importante es la **transición floral** a la fase reproductiva. La progresión entre fases siempre es un proceso gradual, excepto la transición floral. Todas están reguladas por señales ambientales como disponibilidad de nutrientes, longitud de los días, intensidad de luz, temperatura, así como señales hormonales internas. Las bajas temperaturas y el estrés pueden afectar la germinación y la transición floral (Bäurle y Dean 2006).

La mayor parte de estas transiciones están reguladas por señales ambientales que sincronizan las condiciones externas con el desarrollo, maximizando el éxito reproductivo. En los últimos años se han producido avances significativos en el conocimiento de la regulación de estos cambios de fase, particularmente en la transición juvenil-adulto y en la transición floral, aunque las bases moleculares que tienen lugar en ambos procesos están todavía investigándose. Se conoce que ambas fases se producen bajo la regulación de condiciones ambientales y efectos hormonales, que existen factores involucrados que se originan fuera del meristemo y que las dos transiciones están controladas por mecanismos que evitan la transición de un modo precoz.

Muchos genes, como *HASTY* (*HST*), genes de la floración autónoma y dependientes del fotoperiodo están implicados en ambas transiciones. Mientras que *FLOWERING LOCUS T* (*FT*), *SQUINT* (*SN*), *TERMINAL FLOWER1* (*TFL1*) y la sobreexpresión de *LEAFY* (*LFY*) afectan sólo a una de ellas.

Será interesante ver si, a la vez que aumenta nuestra comprensión, ambas transiciones están reguladas a través de mecanismos similares, como la regulación por la producción de alguna sustancia difusible. Esta sustancia sería la encargada de dar la señal y su movimiento generaría procesos de activación y represión contra un conjunto de genes y factores responsables directos de que la transición se produjera en el ápice. Los cambios cuantitativos de una señal pueden provocar una respuesta gradual o una respuesta abrupta, dependiendo de si responde continuamente o sólo después de que la señal haya llegado a un cierto umbral. La modulación evolutiva de estas respuestas puede explicar la evolución de ambas transiciones y la variabilidad observada en diferentes especies de plantas (Willmann y Poethig 2005, Bäurle y Dean 2006).

TRANSICIÓN JUVENIL-ADULTO

En las últimas décadas han ocurrido infinidad de descubrimientos que nos han permitido desarrollar un nuevo y avanzado conocimiento en los mecanismos de regulación del ciclo de vida de las plantas. En los años sesenta se postulaba que en plantas leñosas, la transición de la condición juvenil a la condición adulta ocurría normalmente con una edad y un tamaño característicos de cada especie y la floración no sucedía hasta que estos cambios no habían tenido lugar (Robinson y Wareing 1969). En la actualidad, aunque no todos los procesos son totalmente conocidos, podemos relacionar cambios en el desarrollo de la planta con la expresión o el silenciamiento de ciertos mecanismos moleculares. Esta información, junto con los avances en la biología celular y molecular, es fundamental para la mejora de los cultivos y para el acortamiento del periodo no productivo juvenil usando aproximaciones biotecnológicas, ofreciendo grandes beneficios económicos.

Además, como ya se ha comentado, todos los antecedentes que existen sobre el tema a nivel del control genético del conjunto de caracteres que cambian durante la transición provienen de plantas no leñosas, especialmente de herbáceas anuales y concretamente de *Arabidopsis*. En este organismo modelo, los factores y genes previamente descritos como involucrados en ambas transiciones juvenil a adulto y floral, parecen estar bajo el control general de la expresión de varios microARNs.

Uno de ellos, el microARN *miR156* regula factores de transcripción SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) en *Arabidopsis* (Schwab et al. 2005, Wu y Poethig 2006, Fornara y Coupland 2009), sugiriendo que al menos algunos de estos genes promueven la transición a la fase adulta. La sobre-expresión de *miR156* prolonga la fase juvenil en *Arabidopsis* y en maíz (Wu y Poethig 2006, Chuck et al. 2007, Fornara y Coupland 2009). Dado que la expresión de *miR156* decrece con la edad en la planta y que actúa reprimiendo 10 de los 16 factores SPL, parece ser que retrasa la transición a la fase adulta. De hecho, la sobre-expresión de los factores SPL acorta el periodo juvenil y promueve la floración en *Arabidopsis* (Wu y Poethig 2006). También actúa reprimiendo genes que codifican para factores de transcripción del tipo MADS-box requeridos para la transición floral como *FRUITFUL (FUL)* y *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)*.

Otro microARN, *miR172* muestra un patrón de expresión complementario a *miR156* a lo largo del desarrollo de la planta, con la edad la expresión de *miR156* decrece y la expresión de *miR172* se induce, controlando la transición a la fase adulta. En *Arabidopsis* *miR172* reprime la expresión de seis miembros de la familia de factores de transcripción APETALA2 (AP2)-like, algunos de los cuales son represores de la fase adulta. Los patrones de expresión complementaria temporales de *miR156* y *miR172* están relacionados (Chuck et al. 2007) y tienen una relación mecanicista para controlar transición juvenil a adulto (Wu et al. 2009).

En otras especies de herbáceas se ha estudiado si estos microARNs tienen funciones similares y están implicados también en el desarrollo. En maíz, *Glossy15* promueve la expresión de rasgos juveniles a nivel de la epidermis y suprime la expresión de los adultos (Evans et al. 1994). Al igual que en *Arabidopsis*, *miR172* reprime genes de fenotipo juvenil, como *Glossy15* (Lauter et al. 2005), y dos genes *miR156* en tándem alterados en el mutante *Corngrass1* son responsables de reprimir genes que producirían el fenotipo adulto (Chuck et al. 2007). Los análisis por microarray de la transición juvenil a adulto en maíz también sugieren que ambos, maíz y *Arabidopsis* están regulados mediante mecanismos similares y tienen conservados los mecanismos del establecimiento de la fase adulta (Strable et al. 2008).

En plantas de arroz los patrones de expresión de ambos microARNs se mantienen inversos y complementarios, mientras que en mutantes *PETER PAN SYNDROME (PPS)*, (un ortólogo de

CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1 en *Arabidopsis*) que muestran una fase juvenil prolongada, la expresión de *miR156* y *miR172* ocurre de forma retrasada (Tanaka et al. 2011).

La soja también muestra patrones complementarios de expresión en el desarrollo de *miR156* y *miR172*, del mismo modo que en maíz, arroz y *Arabidopsis*, demostrando que el papel que juegan en la transición está mantenido y es indispensable (Yoshikawa et al. 2013). En todos los taxones principales de plantas se han encontrado factores de transcripción específicos de plantas regulados por *miR156* (Poethig 2010).

miR156 apareció antes en la evolución de las plantas terrestres, y el microARN maduro se ha encontrado en musgos, helechos y gimnospermas (Arazi et al. 2005, Axtell y Bartel 2005, Cuperus et al. 2011), aunque su papel en estas plantas está todavía por determinar. Por su parte, *miR172* parece ser específico de angiospermas y no ha sido clonado desde otras plantas (Axtell y Bowman 2008, Cuperus et al. 2011), aunque ha sido detectado por microarray en helechos (Axtell y Bartel 2005) y computacionalmente predicho en *Physcomitrella* (Fattash et al. 2007).

Ambos microARNs evolutivamente conservados, *miR156* y *miR172*, han emergido en los últimos años como puntos clave en la regulación de los procesos de transición entre fases en plantas, al igual que sus dianas principales y más conocidas, los factores de transcripción de las familias SPL y AP2-like. A pesar de su importancia, poco se sabe todavía de la regulación temporal y de la expresión espacial de los mismos (Huijser y Schmid 2011).

Estudios recientes relacionan los niveles de azúcar con la expresión de los microARNs y por consiguiente con la transición, confirmando que el azúcar reduce la expresión de dos de los ocho genes *miR156* que tiene *Arabidopsis* (*miR156A* y *miR156C*) mientras que la privación de la misma aumenta su expresión (Yang et al. 2013, Yu et al. 2013). La eliminación de las hojas aumenta la expresión de dichos genes y retrasa la transición juvenil a adulto, efecto que puede ser revertido con la adición de azúcar a la planta, ya que los azúcares que se producen en las hojas o alguno de sus metabolitos parecen desencadenar la transición vía reducción de los niveles de *miR156*. Además, también se ha confirmado este efecto del azúcar en tabaco, musgo y tomate (Yu et al. 2013) sugiriendo que es un mecanismo conservado. Estos trabajos parecen indicar que son señales derivadas de las hojas las que controlan el desencadenante de la transición a la fase adulta.

En plantas leñosas, en común con lo que ocurre en muchas especies de herbáceas, existen cambios de sus características morfológicas y fisiológicas durante la progresión de su ciclo de vida, a veces muy evidentes, como en el caso de *Heredia helix* y especies del género *Acacia* y *Eucalyptus*, y otras no tanto, aunque en general son obvios en la mayoría de ellas (Godley 1985) (Boland et al. 2006). Se han usado factores fisiológicos, moleculares y genéticos para identificar ambas fases y su duración (Massiah 2007), y la transición se ha estudiado en diferentes especies usando técnicas inmunológicas (Snowball et al. 1991), marcadores bioquímicos (Blake et al. 2000, Moncaleán et al. 2002) y parámetros de crecimiento vegetativos. Por ejemplo, es conocido que algunas especies de árboles frutales necesitan superar un número de divisiones celulares para entrar en la fase adulta (Robinson y Wareing 1969), en manzano el crecimiento vegetativo necesario se cuantifica como el número de nudos o divisiones del tallo principal (Zhang et al. 2007). Además, la influencia parental se ha descrito como uno de los factores más influyentes en la longitud del periodo juvenil, demostrándose en manzano y peral (Visser 1975, Bell y Zimmerman 1990), y en melocotonero (Hansche 1986). Dichos cambios nos permiten distinguir entre fases, aunque sigue siendo el más llamativo y fácil de reconocer la formación de estructuras reproductivas (Robinson y Wareing 1969, Bergonzi y Albani 2011).

Los mecanismos moleculares que parecen estar implicados en la transición en leñosas no parecen coincidir exactamente con los de *Arabidopsis* (Rottmann et al. 2000, Tan y Swain 2006, Bergonzi y Albani 2011), aunque si comparten algunas similitudes. Hasta ahora solo algunos genes se han relacionado con la transición juvenil a adulto. En abeto, el factor de transcripción *DEFICIENS-AGAMOUS-LIKE1 (DAL1)* (un gen MADS-box) está involucrado en la transición a la etapa adulta (Carlsbecker et al. 2004). El MADS-box gen *MdMADS12*, aislado en manzano, parece estar relacionado también en la transición a adulto, en la transición floral y en el desarrollo del meristemo (Van der Linden et al. 2002). En kiwi, se han caracterizado nueve genes MADS-box, y sus correspondientes mutantes en *Arabidopsis* parecen indicar que están también relacionados con esta etapa del desarrollo (Varkonyi-Gasic et al. 2011). La sobre-expresión de *CsTFL* en naranjo, que codifica para una proteína reguladora de la ruta de transducción Raf-1/MEK revierte la mutación *TFL* de *Arabidopsis* y parece estar relacionada en la transición en cítricos (Pillitteri et al. 2004). Al contrario, la sobre-expresión de los genes de *Arabidopsis* *LFY* y *APETALA1 (AP1)* en *Citrus* causa una drástica reducción de la fase juvenil (Peña et al. 2001). En álamo y *Poncirus*, la

expresión ectópica de *FT* o sus homólogos acelera la transición de meristemas con crecimiento vegetativo a meristemas florales (Endo et al. 2005). La expresión constitutiva del gen *FUL*-like *BpMADS4*, de *Betula pendula*, en cultivos *in vitro* de manzano, resultó en floración de algunos de los meristemas tras la transformación (Flachowsky et al. 2007). Recientemente, la sobre-expresión del *miR156* de *Arabidopsis* en álamo, resultó en una prolongada fase juvenil, sugiriendo el papel conservado del microARN en leñosas (Wang et al. 2011).

El olivo se ha confirmado que se ajusta a un patrón de crecimiento general propio de leñosas, que genera lo que se conoce como cono de juvenilidad (Fig.12.A) (Suárez et al. 2011), resultado de un desarrollo gradual de los meristemas apicales y laterales que viene controlado por la distancia de los mismos a las raíces y que se ajusta a lo que se describía hace décadas mediante la diferencia de expresión de caracteres juveniles vegetativos, adultos vegetativos y adultos reproductivos a lo largo del desarrollo de los brotes juveniles (Fig.12.B) (Poethig 1990).

A pesar de su relevancia, el control genético del cambio de fase en olivo y otras leñosas es todavía poco conocido. Recientemente se ha identificado un gen requerido para que la transición ocurra sin retraso en olivo (Fernández-Ocaña et al. 2010), pero todavía estamos lejos de entender los cambios a nivel genético que controlan el cambio de fase.

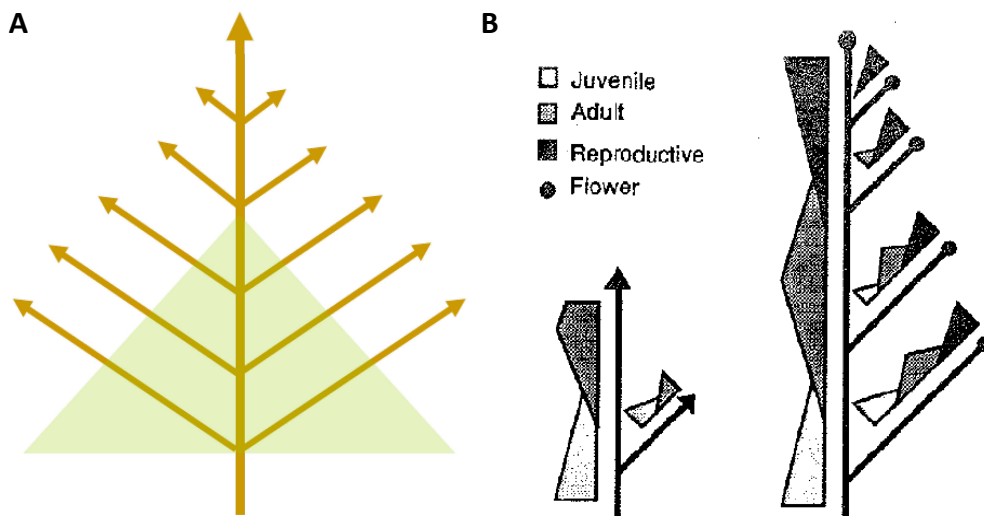


Figura 12. Esquema del cono de juvenilidad generado debido al gradiente de expresión diferencial que tienen los meristemas a lo largo del desarrollo en el olivo (A) comparado con el patrón de expresión descrito para plantas (B) (Poethig 1990).

La transición entre una planta juvenil y una planta adulta en el olivo podría definirse como una etapa indeterminada, pero necesaria para completar su desarrollo, que comenzaría con la adquisición de la competencia para la reproducción y que finalizaría con la aparición de las estructuras florales (Fig.13), cuya longitud varía entre 10 y 20 años de periodo no productivo (Fontanazza y Baldoni 1990). Este prolongado periodo claramente representa una de las mayores restricciones para los programas de mejora que buscan sus resultados a nivel del fruto, siendo muy amplios los periodos de tiempo entre distintas generaciones de plantas. Esta es una de las razones por las que en la actualidad se están realizando estudios con diversos programas de cruzamientos entre distintas variedades (De la Rosa y León 2009) y estableciendo los mejores métodos para el manejo de su cultivo (Moreno-Alías et al. 2010b).

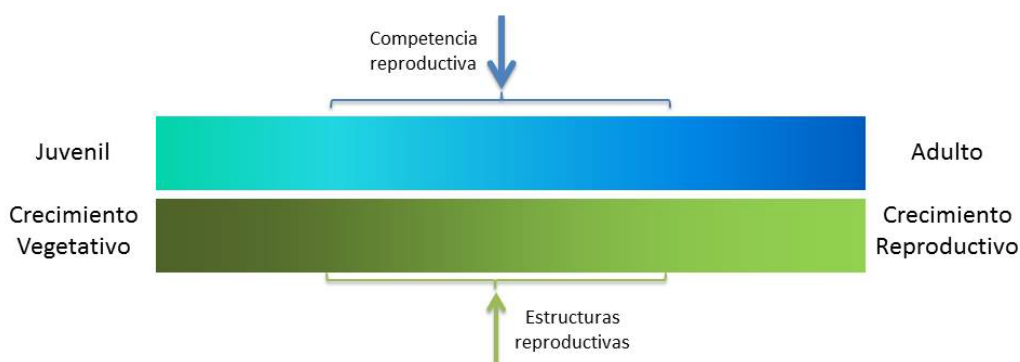


Figura 13. Esquema del proceso de transición en el olivo, como una etapa indefinida entre una planta juvenil y una adulta, marcado por la adquisición de la competencia reproductiva ligada al cambio de crecimiento vegetativo a un crecimiento reproductivo.

La juvenilidad en el olivo se ha estudiado usando diferentes aproximaciones. La fase juvenil y la fase adulta son distinguibles examinando los fenoles totales y la actividad peroxidasa (Basheer-Salimina et al. 2004), el contenido proteico (Lavee et al. 1996, Garcia et al. 2000), el incremento en el tamaño y el ratio longitud-amplitud de la hoja y la distancia entre nudos (Lavee et al. 1996), cambios en la estructura foliar (Fig.14) (Moreno-Alías et al. 2009) y la capacidad de generar raíces adventicias (Therios 2009). La altura y el diámetro de las plantas a partir de semilla en sus primeras etapas de crecimiento son buenos indicadores de periodos juveniles más cortos (De la Rosa et al. 2006, Rallo et al. 2008) y se usan como criterio de selección en los programas de mejora. Además, se ha confirmado la fuerte influencia de los genotipos parentales en relación a la primera floración (Santos-Antunes et al. 2005, Suárez et al. 2011), consiguiendo mediante nuevos

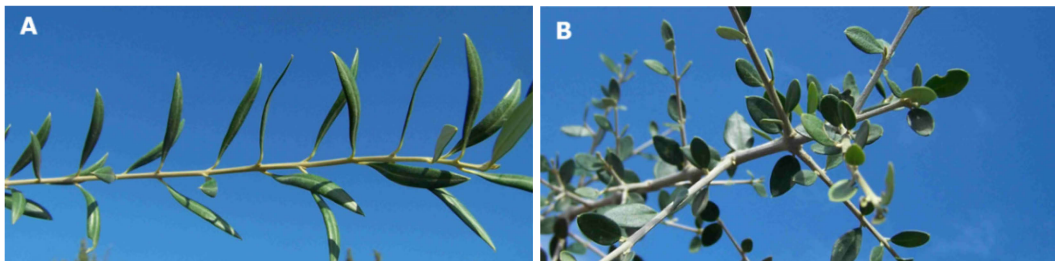


Figura 14. Detalle de la forma de la hoja entre plantas adultas (A) y plantas jóvenes (B). Nótese la diferencia en forma y tamaño además del patrón de disposición de las mismas a lo largo del tallo.

métodos de crecimiento forzado acortar el periodo juvenil a tres o cuatro años tras la germinación de la semilla (Lavee et al. 1996, Santos-Antunes et al. 2005), aunque se ha observado una gran variabilidad para este carácter entre la descendencia de distintas variedades (Bellini 1993, De la Rosa et al. 2006, Muñoz-Mérida et al. 2013). Una producción más temprana tiene importancia económica en sí mismo y además supone un menor tamaño de la planta, facilitando así, en el caso del olivo, una cosecha de forma mecanizada, la cual está muy ligada a la arquitectura de la planta y reduciría en gran medida el coste de producción del aceite.

Muchas de las preguntas sobre la transición juvenil a adulto en plantas están todavía sin responder; ¿Cómo miden las plantas el tiempo del desarrollo? ¿Dónde está localizado el “reloj” del cambio de fase y cómo reprime miR156? ¿Qué papel juegan los factores ambientales en la transición? ¿Cuáles son las bases de la estabilización de la fase adulta y juvenil? ¿Cuál es la significancia funcional de los rasgos fisiológicos y morfológicos asociados? Ahora que se conocen algunos de los principales reguladores y con las nuevas tecnologías genéticas desarrolladas se pueden realizar nuevos enfoques a diferentes niveles para responder a estas y otras preguntas que se mantienen todavía desconocidas, tanto en herbáceas como en leñosas.

Multitud de genes y de interacciones se han descrito para proporcionar una visión de los mecanismos implicados en el complejo de la transición en *Arabidopsis* y otras herbáceas. A pesar de ello, queda por determinar si un conjunto similar de genes controla la transición juvenil a adulto en el olivo y otras leñosas y el momento en el que suceden los cambios asociados a la transición durante el desarrollo.

LAS RAÍCES Y LA TRANSICIÓN

Las raíces en general y los meristemos radicales más concretamente, se han estudiado ampliamente como modelo general de una zona en crecimiento en plantas, por su plasticidad y su importancia en el desarrollo (Beemster et al. 2003, Harashima y Schnittger 2010), siendo junto con los meristemos apicales, la elección para el estudio del control del ciclo celular (Jager et al. 2005). En este caso, el estudio de las raíces se va a enfocar desde el punto de vista del desarrollo, en el cual las raíces parecen poseer un cometido especial.

Es conocido y ampliamente aceptado que la transición a la etapa adulta en leñosas está relacionada con la adquisición de un cierto tamaño (Hackett 1985). Este fenómeno sucede cuando los meristemos apicales o laterales alcanzan una distancia determinada al sistema radical (Robinson y Wareing 1969), vinculado también con un determinado número de divisiones celulares, medidas como el número de nudos del tallo principal (Poethig 1990). En el olivo se ha confirmado que la distancia media mínima necesaria para alcanzar la floración es de 200 cm totales, calculando esta distancia total como la suma de la distancia vertical del tallo principal o tronco, más la distancia lateral de la rama hasta llegar a la estructura reproductiva (Fig.15) (Moreno-Alías et al. 2010a). Se ha acotado en unos 45 el número de nudos necesarios para que ocurra la transición juvenil a adulto, basándonos en los patrones de expresión de los meristemos a lo largo del desarrollo (García-López et al. Aceptado).

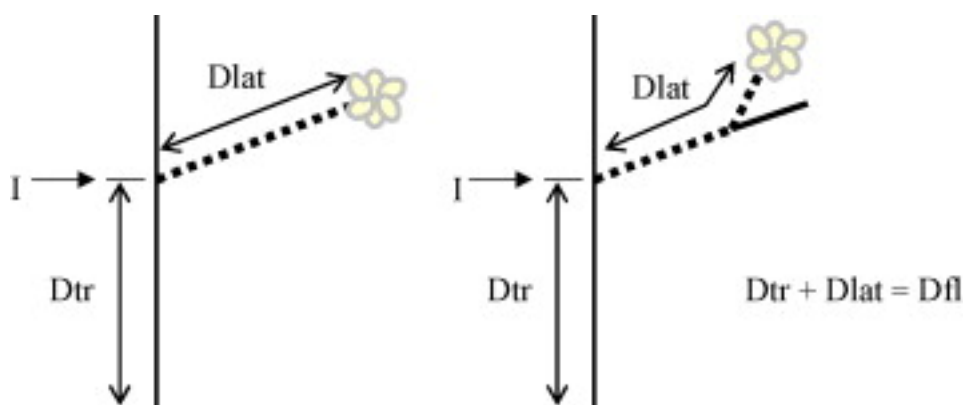


Figura 15. Diagrama de las medidas en la localización de la primera flor en plantas de olivo. Dtr; Distancia vertical del tallo o tronco; Dlat; Distancia lateral de la rama desde la primera flor hasta su punto de inserción en el tallo principal (I); Dfl; Distancia total desde el suelo a la inflorescencia (Moreno-Alías et al. 2010a).

El establecimiento de la distancia entre las raíces y las inflorescencias o aquella, medida en número de nudos, necesaria para que ocurra el cambio drástico en los patrones de expresión de los meristemas en la transición, está estrechamente relacionada y confirma la existencia de un cono de juvenilidad (Hartmann et al. 2002), descrito en el olivo (Suárez et al. 2011), como ya se había comentado en el apartado anterior y cuya existencia se ha confirmado también en otras leñosas, como *citrus* (Snowball et al. 1994).

A pesar de ello, se conoce poco del papel concreto que juegan las raíces, si es que lo tienen, en la transición juvenil a adulto. Entre otras características, se ha relacionado la aparición y distribución de tricomas con la transición juvenil a adulto (Evans y Poethig 1995) y algunos estudios vinculan la aparición y distribución de éstos en hojas de mutantes de *Arabidopsis* con la distancia a las raíces (Telfer et al. 1997). Usualmente la distancia al sistema radical se ha relacionado con la floración, con su consiguiente conexión con la etapa adulta vegetativa, pero no de una forma específica. Se atribuía el mérito del mantenimiento de la fase juvenil tanto a hojas como a raíces, aunque no se conocían las vías en las que éstas influyen en la transición.

Los ensayos se llevaban a cabo con plantas completas y se buscaba una señal procedente de las hojas, pero no permitían separar claramente si el estímulo floral procedía de las hojas o si por el contrario lo hacía de las raíces (McDaniel et al. 1992). Estudios más recientes a nivel genómico se han llevado a cabo en eucalipto, basándose en la variación de la capacidad de enraizamiento existente en distintos brotes dependiendo de la distancia entre las raíces y el punto de escisión del brote en cuestión. Comparando los cortados por debajo de 5 nudos con aquellos cortados por encima de 15 en el tallo principal (Abu-Abied et al. 2012), los análisis revelan que entre los genes expresados diferencialmente, los procesos biológicos más representados son aquellos con una actividad de oxidación/reducción, confirmando el potencial redox involucrado en el desarrollo de la raíz (Tsukagoshi et al. 2010).

Poethig ya postulaba que el tamaño, más que la edad de la planta, era el responsable del cambio de fase, independientemente de cómo se hubiese alcanzado (Poethig 1990). Este efecto parecía ser debido principalmente a factores producidos desde el sistema radical, ya que la floración se inhibía por el enraizamiento *de novo* de brotes adultos que ya habían alcanzado el tamaño crítico, injertando brotes en secciones cercanas a la raíz o induciendo la formación de raíces en secciones apicales del tallo. En todos los casos, la eliminación de las hojas cursó sin

efecto en el número de nudos necesario para la transición al crecimiento reproductivo (Robinson y Wareing 1969, Schwabe y Al-Doori 1973, McDaniel 1980). Estos estudios mostraban la capacidad del sistema radical de someter la transición a la etapa adulta, pero no se conoce cómo sucede. La identificación del factor difusible que promueve en primera instancia la iniciación floral era y es el Santo Grial (Poethig 1990) de la fisiología de plantas.

Por otro lado, esta hipótesis es compatible con el conocimiento que se tenía de que dicho estímulo procedía de las hojas. Estudios en tabaco afirmaban que las hojas exportan un estímulo floral continuo (Hopkinson y Ison 1982, McDaniel et al. 1989a, Gebhardt y McDaniel 1991), aunque postulaban que los ápices de las plantas jóvenes son menos competentes a responder a dichos estímulos que los meristemas de plantas con más edad (Singer et al. 1992), además las raíces parecían inhibir dicho estímulo floral (McDaniel 1980). Estos ensayos no eran capaces de relacionar cómo el número de nudos de separación al sistema radical era capaz de ser determinante en la aparición de flores (McDaniel et al. 1989b). Años después se vinculó la distancia a las raíces con la floración en tabaco (McDaniel et al. 1992) demostrando que la proximidad a las raíces podía desestabilizar el estado de floración previamente adquirido (Smith y McDaniel 1992).

Los nuevos avances en el estudio de la transición, como se ha introducido en el apartado anterior, relacionan dos microARNs, *miR156* y *miR172*, con la transición juvenil a adulto y la transición floral. Se ha comprobado que ambos juegan un papel central en la regulación de ambas fases mediante unos patrones opuestos y complementarios de expresión, la cuestión que subyace es; ¿qué factor o factores regulan la expresión de ambos?, y si este factor existe, ¿está la raíz implicada en esta regulación?

En herbáceas, concretamente en tabaco, *Arabidopsis* y maíz, las investigaciones indican que la señal que reduce la expresión del *miR156* proviene principalmente de las hojas y que la raíz y los cotiledones parecen no estar implicados en el proceso (Yang et al. 2011). Sin embargo, si extrapolamos este modelo a leñosas, asumiendo que necesitaríamos un número de hojas concreto para alcanzar el umbral necesario, no encajaría con la tremenda variabilidad en la duración de los cambios de fase que ocurren en diferentes árboles, inclusive dentro de la misma especie. Un ejemplo ocurre en acacias, la transición juvenil a adulto ocurre en un solo nudo de distancia a las

raíces en *Acacia confusa*, mientras que necesita un mínimo de 30 en *Acacia koa* (Daehler et al. 1999).

Algunos autores relacionan a los azúcares sintetizados en la hoja con el control de la expresión de *miR156* (Yu et al. 2013) y dejan entrever la relación de los niveles de C, procedentes de la hoja, con aquellos de N que proceden de la raíz, es decir, del ratio C/N como un posible factor a tener en cuenta, debido a la estrecha relación de este balance con el correcto desarrollo de la planta (Zheng 2009).

Sería interesante la aproximación a la transición juvenil a adulto en plantas desde su posible relación con las raíces, con la búsqueda del gen o genes implicados en el proceso.

No es la primera vez que se relaciona a un gen expresado en las raíces con lo que ocurre en los meristemas apicales, como es el caso de *XAL1*, un gen MADS-box emparentado con *AGAMOUS* (AG) que parece ser un importante regulador del desarrollo de la raíz y que a su vez induce genes relacionados con la floración como *SOC*, *FT* y *LFY* en *Arabidopsis* (Tapia-López et al. 2008).

Otra posible aproximación sería postular la existencia de una señal raíz-meristemo apical que usase el sistema vascular para su movimiento y distribución, al igual que ocurre en el caso del mutante *bypass1* (*bps1*) en *Arabidopsis*, en el cual se supone la existencia de una molécula o metabolito derivada/o de la raíz responsable de detener el crecimiento del meristemo apical de las plantas mutantes *bsp1* (Van Norman y Murphy 2011).

Algunos autores postulan que la raíz progresa, al igual que el meristemo apical, a través de una serie de fases durante su desarrollo, y que estos cambios de fase en el sistema radical podrían estar relacionados con aquellos que sufre la parte aérea de la planta (Trebbi y McGrath 2009).

Por este motivo, en esta Tesis nos hemos propuesto el estudio de la transición de fase desde una aproximación genética, con el análisis de las diferencias de expresión génica en raíces juveniles y adultas, así como la identificación de genes de la raíz potencialmente implicados en la transición de fase juvenil a adulta en el olivo cultivado.

El trabajo que se desarrolla a continuación se divide en tres capítulos bien diferenciados, pero conectados por un hilo conductor común; las raíces y la transición.

Un estudio para caracterizar uno de los genes que parece estar implicado en la transición juvenil a adulto se muestra en el primer capítulo. La expresión génica en raíces juveniles y adultas se analiza a nivel transcripcional en el capítulo dos, con el objetivo de identificar posibles genes implicados en el cambio de fase. Para obtener una visión más amplia del papel de las raíces, en el tercer capítulo se realiza un análisis de los genes que se expresan en la raíz, mediante el ensamblado de un transcriptoma completo, utilizando la tecnología del RNA-seq.

Objetivos

Aims

Los objetivos principales del trabajo que se presenta en esta Tesis Doctoral se encuadran dentro de un objetivo general que comprende el estudio de la transición juvenil a adulto en el olivo. En concreto, se abordan dos aspectos relevantes en esta transición como son el estudio del gen *JAT*, cuyo defecto produce un retraso en la transición y el estudio transcriptómico de las raíces, ya que sabemos que éstas tienen un papel esencial para que se produzca la transición, relacionado con la adquisición de cierto tamaño de la planta, aunque se desconoce cómo se lleva a cabo esta función. Para ello se realizará un estudio transcriptómico que permitirá determinar genes candidatos de estar enviando señales de juvenilidad a la parte aérea de la planta. El conocimiento de estos genes puede ser clave para identificar la señal emitida por las raíces. Los estudios transcriptómicos de las raíces podrán beneficiarse de un transcriptoma de olivo lo más completo posible, usando un amplio rango de muestras, especialmente de raíces.

Como consecuencia, este objetivo se divide en los siguientes objetivos parciales:

1. Estudio del gen *JUVENIL TO ADULT TRANSITION (JAT)* en el olivo cultivado.

Dentro del objetivo 1 se desglosan los siguientes objetivos secundarios:

- 1.1 *Secuenciación y estudio de secuencias a partir del gen JAT: estructura genómica; análisis de exones, intrones y zonas adyacentes, secuencia peptídica y análisis filogenético.*
- 1.2 *Análisis de expresión de JAT; ARNm y proteína.*
- 1.3 *Localización tisular de la proteína JAT.*
- 1.4 *El gen JAT en Arabidopsis.*

2. Análisis transcriptómico de las raíces de olivo.

El objetivo 2 se desglosa de la siguiente forma:

- 2.1 *Análisis de la expresión génica en raíces juveniles y adultas. Comparación de los transcriptomas.*
- 2.2 *Identificación de genes expresados de forma específica en las raíces, comparado con el resto de tejidos de la planta. Esto se realizará tanto en raíces juveniles como en adultas.*

3. Ensamblaje de un transcriptoma de olivo.

El objetivo 3 se puede dividir en los siguientes sub-objetivos:

- 3.1 *Evaluación de los datos y de los distintos ensambladores.*
- 3.2 *Análisis y contraste de los diferentes transcriptomas de novo generados.*
- 3.3 *Depurar el “transcriptoma del olivo”.*
- 3.3 *Anotación funcional del transcriptoma.*
- 3.4 *Análisis general de los genes expresados en la raíz del olivo.*

The main goals of the work presented in this Doctoral Thesis fall within a general objective that includes the study of juvenile to adult transition in cultivated olive trees. Specifically, two important aspects of this transition are addressed such as the JAT gene study, whose defect causes a delay in the phase transition and a transcriptomic study of the roots, as were known that they have an essential role in the transition to take place, related to the acquisition of a certain size of the plant, although how it performs this function is still unknown. For that purpose a transcriptional study will identify candidate genes to be sending juvenility signals to the aerial part of the plant. Knowledge of these genes might be a key to identifying the signal emitted by the roots. Transcriptomic root studies in olive tree may benefit from an assembling of a transcriptome as complete as possible, using a wide range of samples, especially roots.

Consequently, this objective is divided into the following sub-objectives:

1. Study of *JUVENIL TO ADULT TRANSITION (JAT)* gene in cultivated olive tree.

Under Objective 1, the following secondary objectives are broken down:

- 1.1 *Sequencing and sequence study from JAT gene: genomic structure, analysis of exons, introns and adjacent areas, peptide sequence and phylogenetic analysis.*
- 1.2 *JAT expression analysis, mRNA and protein.*
- 1.3 *Tissue localization of JAT protein.*
- 1.4 *JAT gene in Arabidopsis.*

2. Transcriptomic analysis of olive roots.

Objective 2 is broken down as follows:

- 2.1 *Genetic expression analysis in juvenile and adult roots. Transcriptome comparison.*
- 2.2 *Identification of specifically expressed genes in roots compared to other plant tissues. This will be done in both juvenile and adult roots.*

3. Assembling an olive tree transcriptome.

Objective 3 can be divided into the next sub-objectives:

- 3.1 *Data evaluation and assemblers assessment.*
- 3.2 *Analysis and contrasts of the de novo transcriptomes.*
- 3.3 *Debugging the olive tree transcriptome.*
- 3.3 *Functional annotation of the olive tree transcriptome.*
- 3.4 *General analysis of expressed root genes.*

Materialles y Métodos

1. MUESTRAS VEGETALES.

Las muestras vegetales utilizadas han sido distintas para cada uno de los tres capítulos que completan esta Tesis Doctoral.

Para el capítulo I, caracterización genómica y estructural del gen *JAT* y sus parálogos, se han utilizado diferentes tejidos de plantas de olivo (*O. europaea* L.) de la variedad Picual precedentes del centro de investigación IFAPA de Alameda del Obispo, en Córdoba.

El material vegetal para el capítulo II, el estudio de los genes de la raíz, provenía del cultivo de plantas de olivo segregantes de un cruce “Picual x Arbequina”, se seleccionaron 9 de ellas de dos meses de edad con patrones de crecimiento normales y similares entre sí. Además de las muestras juveniles, para su contraste con plantas adultas, se utilizaron tres plantas que procedían de la propagación vegetativa de árboles de la variedad Picual y tres de la variedad Arbequina cultivadas durante 6-8 meses en condiciones de vivero similares a las de cultivo de las plantas juveniles.

El transcriptoma del capítulo III está generado a partir de muestras que proceden de distintos tejidos (raíces y hojas), de olivos sometidos a diferentes tipos de estrés, tanto biótico, como abiótico, para conseguir generar una amplia gama de situaciones y perfiles de expresión génica, que den mayor valor a los datos obtenidos (ver 12.1).

Las muestras se recogieron con materiales estériles y fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido con el objetivo de no alterar sus características, este paso es extremadamente importante si las muestras están destinadas a la extracción de ARN o proteínas.

2. CULTIVO Y MANIPULACIÓN BACTERIANA.

2.1 Estirpes bacterianas.

Las distintas estirpes bacterianas usadas en esta Tesis, indicadas en la tabla 3, pertenecen a *Escherichia coli*, ampliamente utilizada en biología molecular por su fácil manipulación y cultivo, además de la gran cantidad de herramientas y modificaciones que podemos encontrar para su uso.

Tabla 3. Estirpes de *E. coli* utilizadas durante el desarrollo de esta Tesis.

ESTIRPE	GENOTIPO	REFERENCIA
XL1-blue lacIq	F' Tn10 proA+B+LacI ^q Δ(lacZ) M15recA1 end A1 gyrA96 (Nal ^r) thi hsdR17 (rk-mk-) supE44 relA1	(Bullock 1987)
NovaBlue Singles®	endA1 hsdR17 (rk12- mk12+) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA+B+ lacIqZΔM15::Tn10] (TetR)	(Merck KGaA, Darmstadt)
DH5α	F' endA1 hsdR17 (rk- mk-) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal ^r) relA1 Δ(LacIZYA-argF)u169 (M80LacZ Δm15)	(Woodcock et al. 1989)
REG-1	Mini-Tn5 (kanR nahR/Psal::xylS) mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) F80lacZ ΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG	(Biomedal®, Sevilla)

2.2 Cultivos bacterianos de *E.coli*.

Para el cultivo de *E. coli* se utilizó el medio de cultivo Luria-Bertani (LB) compuesto de bacto-triptona 1%, extracto de levadura 0,5% y NaCl 1%. Además se añade agar 2% si se desea preparar medio de cultivo sólido. Una vez disuelto se esterilizó por autoclave. Cuando sea necesario, el medio de cultivo se completa con antibióticos (ampicilina 100 µg/ml o kanamicina 50 µg/ml) para la selección de colonias resistentes. Las bacterias se cultivaron a 37°C con agitación fuerte para favorecer su aireación (180-220rpm). La manipulación se llevó a cabo en condiciones de esterilidad y partiendo siempre de colonias aisladas. El cultivo en medio líquido se puede almacenar a 4°C durante dos o tres días y el cultivo en medio sólido durante varias semanas.

2.3 Criopreservación.

Los cultivos bacterianos se pueden almacenar largos periodos de tiempo a bajas temperaturas (-80°C) empleando para ello agentes crioprotectores que eviten la formación de cristales de hielo que dañen la integridad de la célula. Se utiliza una mezcla estéril de LB y glicerol al 50% como medio de congelación. Para ello se centrifuga 1 ml de un cultivo saturado a 22000xG durante 1 minuto a 4°C en una microcentrífuga *Universal R32®* (Hettich Tuttlingen). Se retira el sobrenadante y el sedimento se resuspende en LB/glicerol al 50% frío. Para recuperar una estirpe

bacteriana almacenada de esta forma a -80°C , se raspa con un asa de siembra el cultivo congelado y se siembra en una placa de LB-agar con su respectivo antibiótico si fuese necesario. La placa se incuba a 37°C toda la noche hasta la aparición de colonias aisladas. Esta operación debe realizarse rápidamente para evitar que el resto de cultivo se descongele y se vuelve a almacenar a -80°C .

2.4 *E. coli* competentes y transformación bacteriana.

Se han utilizado dos tipos de cepas de *E. coli* en relación a la competencia celular, en algunos casos competentes de origen comercial (NovaBlue Singles®, Merck KGaA, Darmstadt) y en otros casos cepas con similares características preparadas para que fuesen competentes a la transformación (XL1-blue, DH5 α y REG-1). El objetivo de la técnica de preparación de bacterias competentes, es obtener una población de bacterias susceptibles de ser transformadas con un plásmido. Se utilizaron diferentes métodos para preparar bacterias competentes y de su elección dependerá del método de transformación posterior.

2.4.1 Preparación química de bacterias competentes para choque térmico.

Este método se basa en permeabilizar la membrana bacteriana usando sustancias químicas, de manera que se generen poros en la misma al someterla a un cambio brusco de temperatura. En este caso se han empleado dos protocolos diferentes con el mismo objetivo siempre en condiciones de esterilidad para evitar contaminaciones indeseadas.

Preparación de bacterias competentes por el método del CaCl_2 .

La estirpe que se pretende transformar se siembra en una placa de LB-agar sin antibiótico y se incuba a 37°C toda la noche hasta la aparición de colonias aisladas. Se inocula un cultivo de 3 ml de LB líquido sin antibiótico y se incuba a 37°C con agitación fuerte (180 rpm). Al día siguiente (14-16h), el cultivo se diluye 100 veces en LB y se incuba a 37°C con agitación en un matraz Erlenmeyer durante 2-4 horas hasta que el cultivo adquiera una densidad óptica a 600 nm de 0,5. En este momento, se frena el crecimiento del cultivo introduciendo el matraz en un baño de hielo durante 10 minutos. Tras este tiempo, las bacterias se pasan a tubos de centrifuga fríos de 50 ml de capacidad y se centrifugan a 8600xG durante 10 minutos a 4°C (2-16K® Sigma-Aldrich, St. Louis). Se retira el sobrenadante y el sedimento de cada tubo se resuspende suavemente en 25 ml

de CaCl_2 50 mM frío. Se incuban las bacterias con la solución de CaCl_2 durante 30 minutos en un baño de hielo. Transcurrido ese tiempo, la suspensión celular se vuelve centrifugar a 8600xG durante 10 minutos a 4°C y el sedimento de cada tubo se resuspende en 0,5 ml de una solución fría de CaCl_2 50 mM y glicerol 15%. Las bacterias se incuban a 4°C con esta solución al menos durante 2 horas y después se transforman directamente o se realizan alícuotas y se almacenan a una temperatura de -80°C.

Preparación de bacterias competentes por el método del TSS.

La estirpe que se pretende transformar se siembra en una placa de LB-agar sin antibiótico y se incuba a 37°C toda la noche hasta la aparición de colonias aisladas. Se inocula un cultivo de 3 ml de LB líquido sin antibiótico y se incuba a 37°C con agitación fuerte (180 rpm) durante 12-14 horas. Al día siguiente, el cultivo se diluye 100 veces en LB y se incuba a 37°C con agitación en un matraz Erlenmeyer durante 2-4 horas hasta que el cultivo adquiera una densidad óptica a 600 nm entre 0,4-6. Cuando el cultivo se encuentra a la densidad óptica adecuada se frena el crecimiento introduciendo el matraz en un baño de hielo durante 5 minutos. A continuación, el cultivo se pasa a tubos fríos de 50 ml de capacidad y se centrifugan a 8600xG durante 10 minutos a 4°C (2-16K® Sigma-Aldrich, St. Louis). Se retira el sobrenadante y el sedimento se resuspende suavemente en 3,75 ml de LB frío por cada tubo de 50 ml de cultivo. Se incuban las bacterias en hielo durante 5 minutos y se le añade 3,75 ml de TSS 2X por cada tubo de 50 ml de cultivo y se vuelve a incubar otros 5 minutos en hielo. Finalmente se hacen alícuotas y se pueden transformar directamente o bien almacenarlas a -80°C. Para almacenarlas a -80°C hay que añadir DMSO 2%, ya que se estima que las bacterias se encuentran resuspendidas en una solución que lleva un 5% de DMSO y para congelarlas se recomienda un 7% de DMSO.

Para cada lote de bacterias competentes se calculó el grado de competencia, transformando con un plásmido de concentración conocida y sembrando en placa diluciones seriadas de la transformación. Con estos métodos se obtenían del orden de 400-500 UFC/ μg ADN.

Reactivos

- TSS 2X: bacto-triptona 0,8% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 0,5% (p/v), PEG 8000 20% (p/v), DMSO 10% (v/v), SO_4Mg 1M 10% (v/v) y ajustar el pH a 6,5. Conservar a 4°C.

2.4.2 Transformación por choque térmico.

El método de transformación por choque térmico empleado fue el mismo para los dos protocolos de preparación de bacterias quimiocompetentes “caseras”, una versión reducida se usó para las competentes comerciales. La transformación por choque térmico se basa en la generación de poros en la membrana de las bacterias competentes (permeabilizadas por el tratamiento químico) tras exponerlas a 42°C durante un breve periodo de tiempo. El ADN pasa a través de los poros y posteriormente se obliga a que se cierren, sometiendo a las bacterias a una baja temperatura, evitando de este modo que el ADN vuelva a escapar.

Si se parte de una alícuota de bacterias competentes congelada a -80°C, en primer lugar se descongela en hielo antes de añadir el ADN. A continuación, se añade de 1-10 µl de ADN (plásmido o ligación) y se incuba en hielo durante 20 minutos. Tras este periodo, se someten a las bacterias al choque térmico introduciéndolas en un baño a 42°C durante 1,5 minutos y luego 2 minutos en hielo. Una vez introducido el ADN en la bacteria se añade 900 µl de LB y se incuba a 37°C durante una hora, para que las bacterias se recuperen y para que empiecen a expresar el gen de resistencia al antibiótico codificado por el plásmido y que permitirá *a posteriori* la selección de las bacterias recombinantes. Finalmente, las bacterias se centrifugan a 23000xG durante un minuto en una microcentrífuga. El sedimento se resuspende en 100 µl de LB y se siembra en una placa de LB-agar con el respectivo antibiótico. Las placas se incuban en estufa a 37°C toda la noche hasta la aparición de colonias.

En el caso de las bacterias competentes comerciales el proceso general era el mismo, pero requería de menos tiempos en los distintos pasos. De forma resumida; se añade de 1-5 µl de ADN a la alícuota de bacterias, 5 minutos en hielo a la vez que se descongela, 30 segundos de choque térmico a 42°C, 2 minutos en hielo y se añaden 250 µl de medio SOC atemperado. Se cultiva 1 hora en agitación a 37°C (opcional) y se siembra en una placa de LB-agar y se procede igual que en el caso anterior.

Reactivos

- SOC: bacto-triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 10 mM, KCl 2,5mM, MgCl₂ 10 mM y MgSO₄ 10 mM. Se esteriliza por autoclave y se le añade glucosa 20 mM esterilizada con filtros de 0,22 µm. Se conserva a -20°C.

3. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ADN.

3.1 Extracción de ADN plasmídico.

3.1.1 Lisis alcalina.

Este protocolo permite purificar ADN plasmídico de calidad media que puede ser usado en restricciones para el posterior análisis electroforético de los clones recombinantes.

Se toma una colonia y se inocula un cultivo de 3 ml de LB más el antibiótico para la selección. Se incuba toda la noche (14-16 horas) hasta saturación a 37°C en agitación (180 rpm). Cuando el cultivo está crecido, pasamos 1,5 ml a un tubo y lo centrifugamos a 23000xG durante 1 minuto en una microcentrífuga. Se retira el sobrenadante y se rellena el mismo tubo con otro 1,5 ml de cultivo. Se centrifuga de nuevo y se retira con cuidado todos los restos de LB. Ahora se añade 100 µl de la solución I (*solución de resuspensión*) más 2 µl de una solución de ARNasa 10 µg/µl y se resuspende el sedimento completamente con el vortex o con la pipeta. Una vez resuspendido se puede incubar durante 5 minutos en hielo, aunque este paso es opcional. A continuación, se añade 200 µl de la solución II recién preparada (*solución de lisis*) y se mezcla suavemente para que se produzca la lisis celular. Después de la lisis, se añade 150 µl de la solución III (*solución de neutralización*) y se mezcla con suavidad para que se forme un agregado con los restos de membrana y las proteínas desnaturalizadas. Se incuba 20-30 minutos en hielo. Transcurrido ese tiempo, se centrifuga todo el contenido a 23000xG durante 15 minutos a 4°C (microcentrífuga *Universal R32®* (Hettich Tuttlingen)) y el sobrenadante se transfiere a un tubo limpio. A continuación, se pueden seguir dos caminos dependiendo de la calidad del ADN que se quiera obtener. Si necesitamos un ADN más puro se optará por una extracción con fenol del ADN y posterior precipitación con sales y etanol. Si no necesitamos un ADN de mucha calidad se obvia la extracción con fenol y se precipita con sales y etanol directamente. Finalmente, el ADN purificado se resuspende en H₂O milliQ estéril o en TE pH=8.

Reactivos

- Solución I: glucosa 50 mM, tris-HCl 25mM pH=8, EDTA 10 mM pH=8. Esterilizar mediante autoclave.
- Solución II: NaOH 0,2N, SDS 1%.
- Solución III: acetato potásico 5 M, ácido acético glacial 11,5% (v/v) .

- TE: tris-HCl 1 M pH=8 1% (v/v), EDTA 0,5 M pH=8 0,2% (v/v), H₂O milliQ. Esterilizar mediante autoclave.

3.1.2 Lisis rápida.

Este método permite extraer de forma rápida, pero con baja calidad, el plásmido que se encuentra en el interior de los clones bacterianos que queremos analizar, para una vez separados por electroforesis identificar cualitativamente cuales son los clones positivos (plásmidos con inserto), ya que se van a encontrar retrasados en el gel con respecto a los que no lo llevan. Lo más recomendable es usar esta técnica para insertos con un tamaño superior a 400 pb y para plásmidos con un tamaño inferior a 6 kb. Además, también es muy útil contar en el experimento con un control negativo (una colonia bacteriana con plásmido vacío) y si es posible, con un control positivo (una colonia con un plásmido de un tamaño similar al que esperamos).

Se hace una réplica en una placa de LB-agar con antibiótico de las colonias recombinantes con los clones ordenados. Se incuba la placa en la estufa a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, se recoge un poco de cada clon y se resuspende en 25 µl de EDTA 10 mM. Una vez resuspendido, se añaden 25 µl de un tampón de lisis preparado en el mismo momento de usarlo. Se mezcla con vortex durante 30 segundos y se incuba a 70°C durante 5 minutos. Cuando se ha enfriado se añaden 9 µl de una mezcla de KCl 4 M más tampón de carga 6x en una proporción 2:1. Se incuba la mezcla 5 minutos en hielo. Por último, se centrifuga a 18000xG durante 3 minutos y el sobrenadante (aproximadamente 25 µl) se carga en un gel de agarosa al 1%. El resultado se visualizará tras teñir el gel con una solución de bromuro de etidio 10 mg/ml e iluminarlo con luz ultravioleta.

Reactivos

- Tampón de lisis: NaOH 5 M 4% (v/v), SDS 10% (p/v) añadir 5% (v/v), sacarosa 40% (p/v) añadir 50% (v/v) H₂O milliQ.
- Tampón de carga 6x: Azul de bromofenol 0,25% (p/v) y glicerol 30% (v/v).

3.1.3 Kits comerciales.

Cuando se necesita obtener ADN plasmídico de elevada calidad se utilizaron kits comerciales. Para pequeñas cantidades de ADN se utilizó el kit *Perfect Prep Plasmid Mini*® (Eppendorf, Hamburgo) y el kit *QIAprep Spin Miniprep*® de (Qiagen, Hilden). Para cantidades

mayores se utilizó el kit *PureYield Plasmid Midiprep System*[®] (Promega, Madison). En ambos casos se siguieron las instrucciones del fabricante.

3.2 Extracción de ADN genómico.

Para la extracción de ADN genómico de plantas de olivo se utilizó el kit *Nucleon PhytoPure Genomic DNA Extraction Kit*[®] (GE Healthcare, Uppsala) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se recogieron meristemos y hojas jóvenes para facilitar la disgregación de los tejidos, todo el proceso hasta que se añade el primer reactivo se realizó con las muestras congeladas en nitrógeno líquido. La disgregación se llevó a cabo de forma manual en un mortero de porcelana en condiciones estériles o en un molino mecánico modelo *MM400*[®] (Retsch, Haan), con esferas de acero para facilitar la rotura de tejidos y células. Para el resto del protocolo se siguieron las instrucciones del fabricante.

3.3 Cuantificación y pureza del ADN.

La cuantificación y medida de la pureza del ADN extraído con los protocolos anteriores se realizó por espectrofotometría. Dependiendo de las muestras, éstas se diluían o se usaban directamente, se determinó la absorbancia a 260 y 280 nm usando los espectrofotómetros *Ultraspec 4000*[®] o *NanoVue*[®] (ambos GE Healthcare, Uppsala). Aplicando las siguientes fórmulas se obtenía la medida de concentración y pureza del ADN:

$$[\text{ADN}] \mu\text{g/ml} = A_{260 \text{ nm}} \times 50 \times \text{factor de dilución.}$$

$$\text{Pureza} = A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$$

Se utiliza como factor de conversión 50, ya que se estima que una muestra pura de ADN de doble cadena con una absorbancia de 1 a 260 nm tiene una concentración de 50 µg/ml. Un ADN se considera puro cuando el ratio 260/280 se encuentra entre 1,8 y 2.

3.4 Purificación de ADN en geles de agarosa.

El objetivo de esta técnica es purificar un fragmento de ADN después de haber sido separado por electroforesis. Para ello, se emplearon dos métodos diferentes.

3.4.1 Filtración en papel o “pirindolo”.

Este método, descrito por Duro e Izzo (Duro et al. 1993), consiste en fabricar un filtro de papel y colocarlo dentro de un tubo de 1,5 ml de capacidad cortado por la mitad y con un agujero en el fondo. Estos filtros se esterilizan por autoclave. Cuando se quiere purificar una banda de ADN procedente de un gel de agarosa es importante que todo el material necesario para el desarrollo de la electroforesis esté lo más limpio posible para minimizar los riesgos derivados de una posible contaminación con ADNasas o con otras moléculas de ADN no deseadas. Una vez que se ha realizado la electroforesis la banda se corta con un bisturí estéril y se deposita en el interior del filtro de papel que previamente hemos colocado a modo de columna sobre otro tubo de 1,5 ml. Este conjunto se centrifuga a 23000xG durante 15 minutos en una microcentrífuga. El filtrado se precipita con sales y etanol y finalmente se resuspende en H₂O milliQ estéril o en TE.

3.4.2 Kits comerciales.

Se usaron kits de purificación de ADN procedente de geles de agarosa denominado *Perfectprep Gel Cleanup Kit*® (Eppendorf, Hamburgo), *Agarose Gel ADN Extraction Kit*® (Roche, Mannheim) y *NucleoSpin Extract II*® (Machery Nagel, Düren) siguiendo las instrucciones del fabricante.

En la fase final de esta Tesis, el procedimiento elegido para la purificación a partir de geles de agarosa fue un primer paso de filtración en papel o método del “pirindolo” y el filtrado resultante se sometía a limpieza usando el kit de filtración comercial de Machery Nagel, al igual que para purificar los productos de PCR.

3.5 Purificación de los productos de PCR.

Para la purificación de ADN a partir de productos de PCR se usaron distintos métodos

- *Métodos Directos*; Para la purificación de productos de PCR se utilizó el *kit Montage PCR*® (Millipore, Billerica) y el *kit NucleoSpin Extract II*® (Machery Nagel, Düren) siguiendo las instrucciones del fabricante.

- *Métodos Indirectos*; en este apartado se incluyen las extracciones de las bandas de los productos de PCR de un gel de agarosa (véase 3.4 Purificación de ADN en geles de agarosa).

3.6 Secuenciación de ADN.

A lo largo de las distintas técnicas realizadas en esta Tesis algunos pasos de secuenciación de fragmentos de ADN fueron necesarios. Las secuenciaciones de fragmentos pequeños (hasta 1,5Kb) se realizaron en los servicios Técnicos de Instrumentación Científica de la Universidad de Jaén y en Sistemas Genómicos (Valencia). Las secuenciaciones masivas de las librerías de ADNc para llevar a cabo el análisis transcriptómico se realizaron en Life Sequencing S.L. (Valencia) usando un secuenciador *illumina HiSeq 1000*[®] (illumina, San Diego).

4. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ARN.

4.1 Extracción de ARN total.

La extracción de ARN total de plantas de olivo se llevó a cabo a partir de distintos tejidos; meristemas, tallo, hojas, raíces, mesocarpo (fruto) y semilla. Se usaron dos protocolos de trabajo para extraer el ARN total; por un lado se utilizó el kit *TRIzol Reagent*[®] (Invitrogen, Carlsbad) y después se purificó con *RNeasy Mini Kit*[®] (Qiagen, Hilden) y por otro lado, para intentar mejorar la calidad y cantidad del ARN obtenido, sobre todo de las raíces, se usó *Spectrum Plant Total RNA Kit*[®] (Sigma-Aldrich, St. Louis), ambos con un paso intermedio de tratamiento con DNasa I libre de ARNasas (Roche, Mannheim) para eliminar la contaminación con ADN. Con los dos protocolos se siguieron las indicaciones del fabricante. Las muestras se eluían en agua DEPC (Dietilpirocarbonato, se añade al agua al 0,1% y elimina posibles ARNasas).

Al igual que para las extracciones de ADN, la disgregación se llevó a cabo de forma manual en un mortero de porcelana en condiciones estériles o en un molino mecánico modelo *MM400*[®] (Retsch, Haan), con esferas de acero para facilitar la rotura de tejidos y células, con especial atención a la esterilidad. La diferencia en contenido lignificado en los distintos tejidos obligó a alargar los ciclos de rotura de raíces y tallo. Las muestras se mantuvieron congeladas en nitrógeno líquido en todo momento durante el disgregado de los tejidos y se descongelaron en presencia de la primera de las soluciones en cada uno de los protocolos, este hecho fue clave para mejorar la calidad de las extracciones.

4.2 Cuantificación y pureza del ARN.

Las muestras de ARN total se diluían 1/10 y dicha dilución se usaba para la cuantificación y para su visualización mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y 100V durante 30min, con el objetivo de confirmar su integridad. La cuantificación y medida de la pureza del ARN total extraído con los protocolos anteriores se realizó por espectrofotometría. Se determinó la absorbancia a 260 nm y 280 nm usando *NanoVue* (GE Healthcare, Uppsala) o *Take3 Sinergy HT®* (Bio-Tek, Vermont). Aplicando las siguientes fórmulas se obtenía la medida de concentración y pureza del ADN:

$$[\text{ARN}] \mu\text{g/ml} = A_{260 \text{ nm}} \times 40 \times \text{factor de dilución.}$$

$$\text{Pureza} = A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$$

Se utiliza como factor de conversión 40, ya que se estima que una muestra pura de ARN con una absorbancia de 1 a 260 nm tiene una concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$. Un ARN se considera puro cuando el ratio 260/280 se encuentra entre 1,8 y 2.

5. MANIPULACIÓN ENZIMÁTICA DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

5.1 Digestión de ADN con enzimas de restricción.

Las reacciones de restricción se llevaron a cabo con las enzimas de restricción de la tabla 4 en un volumen final de 20 μl , con las concentraciones de ADN y de Unidades de enzima especificadas por el fabricante.

Tabla 4. Enzimas de restricción usadas en esta Tesis, aparece la casa comercial, el tampón para la reacción de restricción y las especificaciones entre paréntesis si fuese necesario.

<i>Enzima</i>	<i>Casa Com.</i>	<i>Buffer</i>	<i>Enzima</i>	<i>Casa Com.</i>	<i>Buffer</i>
Ale I	Biolabs	H	Mls I	Fermentas	R
Asc I	Qbiogene	Q-BIO (Red 2)	Msc I	Biolabs	4
Ava II	Takara	M	Nae I	Takara	L
Avi II	Roche	H	Nde I	Takara	H
Bam HII	Takara	K (30°C)	Not I	Takara	H (BSA+TRITON X-100)

Enzima	Casa Com.	Buffer	Enzima	Casa Com.	Buffer
Bgl II	Amersan	H	Nru I	Roche	B
Bpu AI	Roche	B	Pme I	Biolabs	4 (BSA)
Bsa XI	Biolabs	4	Pml I	Biolabs	1 (BSA)
Bsm I	Roche	H (65°C)	Psi I	Sibenzyme	B
Bsma I	Biolabs	4	Pst I	Amersan	H
Bsp 1407I	Takara	T (BSA)	Sac I	Takara	L
Bsp EI	Biolabs	3	Sac II	Takara	T (BSA)
Bss HII	Roche	A (50°C)	Sal I	Takara	H
Bve I	Fermentas	O+	Sma I	Takara	T (30°C BSA)
Cla I	Roche	H	Spe I	Takara	M
Dpn I	Promega	B	Sph I	Amersan	H
Eco RI	Roche	H	Ssp I	Takara	Ssp I buffer
Eco RV	Takara	H	Vsp I	Fermentas	O+
Hind III	Takara	ReAct2	Xba I	Takara	M (BSA)
Kpn I	Takara	L	Xho I	Amersan	H

5.2 Ligación de fragmentos de ADN.

Para ligar fragmentos de ADN tanto de extremos cohesivos como romos se usó ligasa de T4 junto con el tampón suministrado por la casa comercial Roche (Mannhein). Las ligaciones de extremos cohesivos se llevaron a cabo durante 2 horas a temperatura ambiente o a 16°C durante toda la noche y las ligaciones de extremos romos se llevaron a cabo a 4°C durante toda la noche. Los ligados se transformaron y los clones resultantes se analizaron por electroforesis después de llevar a cabo lisis alcalina y posterior restricción (ver 5.1), lisis rápida (ver 3.1.2) o análisis de colonias por PCR (ver 7.5).

5.3 Retrotranscripción de ARN.

Para la síntesis del ADNc a partir de los distintos ARN se usó el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit®* (Roche, Mannhein) según las indicaciones del fabricante usando los hexámeros aleatorios como cebadores.

6. VISUALIZACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE ELECTROFORESIS.

Para una correcta visualización de la cantidad e integridad de los ácidos nucleicos manipulados en esta Tesis; ADN genómico, plasmídico, productos de PCR, de RT-PCR, de Q-RT-PCR, restricciones, ARN total, etc. se llevó a cabo la técnica de la electroforesis.

Se realizó en geles de agarosa al 0,7-3% (p/v) en TAE 0,5x (20mM Tris-acetato, 1mM EDTA, pH8,5) en condiciones no desnaturalizantes, añadiendo a las muestras tampón de carga 6x o 10x hasta una concentración final de 1x. Transcurrida la electroforesis se sumergió el gel en un baño con una disolución de bromuro de etidio, para hacer al ADN visible a través de la luz UV. Las electroforesis se llevaron a cabo en geles de concentración de agarosa variable y a una diferencia de potencial de 10 V/cm de gel (80-100V).

En el caso del ARN total, la observación en el gel de las bandas definidas correspondientes a los ARNs ribosómicos, es indicativo de la integridad de la muestra, y por tanto se considera que es adecuada para ser utilizada en determinaciones posteriores.

7. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

La PCR es una técnica muy rápida y sensible que permite amplificar un fragmento de ADN *in vitro* de forma específica. Tiene infinidad de aplicaciones y en esta Tesis se han utilizado algunas de ellas, como se detalla a continuación.

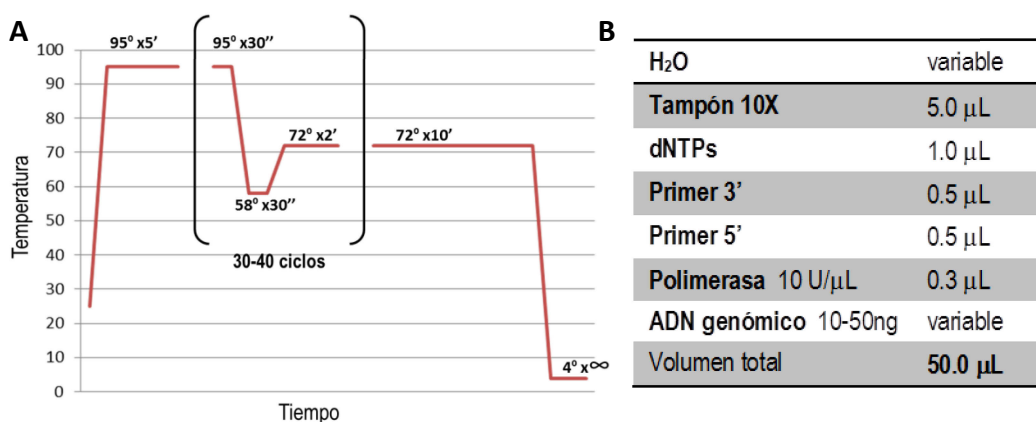


Figura 16. A; Perfil gráfico de las variaciones de temperatura durante el proceso de una PCR estándar y **B;** volúmenes de reacción para una PCR estándar.

7.1 PCR y RT-PCR.

La reacción básica se ha usado ampliamente a lo largo del transcurso de la Tesis para amplificar secuencias de ADN genómicas, plasmídicas o a partir de ADNc de interés para su posterior manipulación o secuenciación.

Se llevó a cabo una reacción estándar, como la que se representa en la figura 16, en la cual se modificaron algunos parámetros según los requerimientos de la polimerasa utilizada, la longitud del fragmento que se deseaba amplificar, o cuando fue necesario obtener un producto más específico y/o en mayor cantidad.

Todas las amplificaciones se llevaron a cabo usando la enzima ADN polimerasa termoestable *Fast Start High Fidelity PCR System*® (Roche, Mannheim) que tiene una tasa de error mucho menor que una Taq polimerasa estándar. Aquellas reacciones con la temperatura de unión a los cebadores fija se realizó con un termociclador *TGradient*® (Biometra, Goettingen), en el caso de aquellas con gradientes de temperatura se realizó en un termociclador *Multigene*® (Labnet International, Edison). El protocolo de amplificación se muestra en la figura 16.

7.2 Q-RT-PCR.

La Q-RT-PCR o RT-PCR cuantitativa es un método cuantitativo de amplificación de ARN que se realizó en los sistemas de detección de *Bio-Rad CFX96*® (Bio-Rad, Berkeley) usando una dilución 1:100 del ADNc, 5 pmoles de cada cebador en un volumen final de 10 µl según las indicaciones del fabricante. La enzima de elección fue la polimerasa que incluía el mix *SsoFast*

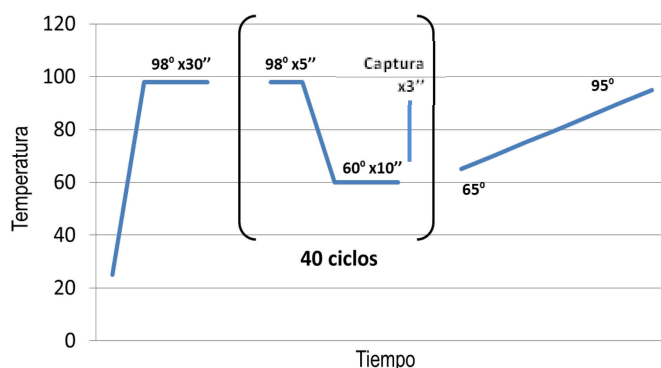


Figura 17. Perfil gráfico de las variaciones de temperatura durante el proceso de una Q-RT-PCR estándar.

EvaGreen Supermix[®] (Bio-Rad, Berkeley). Se usó un control interno de un gen constitutivo para normalizar los resultados (*Act40*), seleccionado por nuestro grupo de investigación de entre un grupo de posibles genes normalizadores, distintas parejas de cebadores y distintos tejidos (García-López et al. Aceptado).

El protocolo de amplificación se muestra en la figura 17. Antes de poder llevar a cabo la cuantificación específica de nuestro producto de amplificación mediante la detección de fluorescencia que genera *EvaGreen* al unirse a la doble cadena de ADN, hay que definir la temperatura a la cual se va a realizar la toma o recogida de datos, determinada por la temperatura de “melting”. Ésta se define como la temperatura a la cual el 50% de una molécula de ADN de doble cadena se encuentra desnaturalizada. Para determinarla se realiza al final de la reacción un paso de desnaturalización del ADN aumentando la temperatura de 65 a 95°C, durante el cual se va tomando nota de la fluorescencia.

Este último paso consigue que las moléculas del producto amplificado formen hebras simples, lo que se traduce en una pérdida progresiva de la emisión. Con el desarrollo de los nuevos sistemas de detección y el nuevo software, este paso se realiza mucho más rápido y de forma más sencilla, haciendo la técnica útil y pudiendo analizar la amplificación a distintas temperaturas sin que ello modifique en gran medida el tiempo total de la reacción. El programa utilizado fue la última versión de *Bio-Rad CFX Manager*[®] (Bio-Rad, Berkeley).

Cada pico de “melting” es específico de cada producto de reacción, ya que depende de su composición en nucleótidos y de su tamaño en pares de bases. La generación de este pico permite distinguir nuestro producto de PCR de posibles contaminaciones, bandas inespecíficas o ruido de fondo provocado por la formación de dímeros de cebadores (Fig.18). La temperatura a la cual empieza a aparecer el pico de “melting” de nuestro producto será la temperatura idónea para la toma o recogida de datos. De esta manera, podemos obviar en nuestra cuantificación el ruido de fondo originado por la incorporación de *EvaGreen* a los posibles dímeros de cebadores. Para la temperatura óptima se añade al final de cada ciclo un paso de captura de datos de 3 segundos.

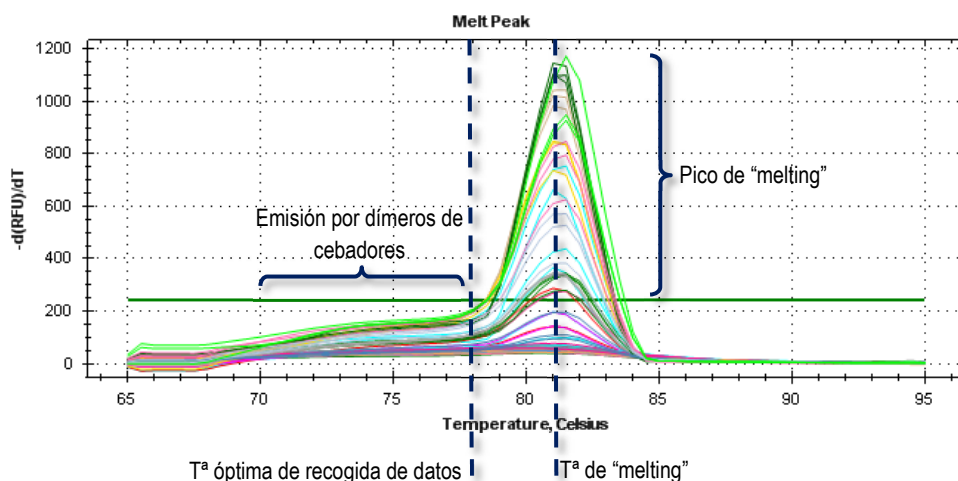


Figura 18. Gráfica en la que se ve representada como la derivada del valor de fluorescencia con respecto a la derivada de la temperatura ($-d(RFU)/dT$) frente a la temperatura (Temperature, Celsius), se traduce en una curva o **pico de "melting"**, se marcan también la zona de emisión debida a los dímeros, la Tª óptima de recogida de datos (78°C) y la Tª de "melting" (aprox. 81°C). En este caso se muestra dicha curva para todas las muestras/parejas de cebadores.

Las reacciones se realizaron en placas de 96 pocillos, con los controles necesarios y siempre por triplicado, partiendo de una mezcla o mix común para evitar, dentro de lo posible, los errores de pipeteo. Algunos de los análisis se realizaron con un robot automático del Servicio de Instrumentación Científica de la Universidad de Jaén.

Aunque el análisis posterior permite determinar si el proceso ha sido correcto, en algunos casos se realizó una electroforesis para visualizar los resultados, no siendo necesaria en este caso la exposición al bromuro de etidio.

7.3 Cálculo de la eficiencia de amplificación de los cebadores utilizados en Q-RT-PCR.

Antes de llevar a cabo la cuantificación relativa de los resultados de Q-RT-PCR debemos conocer la eficiencia de amplificación de cada pareja de cebadores. Para que los datos obtenidos en los ensayos de Q-RT-PCR puedan ser validados debemos obtener unas eficiencias de amplificación similares con todas las parejas de cebadores utilizados en el estudio, y siempre obteniendo valores de eficiencia por encima del 70%. Una eficiencia de amplificación elevada corresponde a valores mayores del 90% de eficiencia.

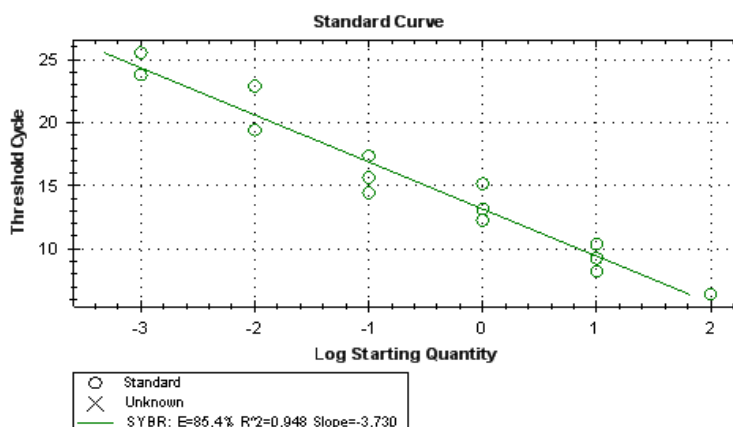


Figura 19. Gráfica de la representación del logaritmo de las diluciones frente al ciclo umbral o CT y la recta a la que se ajusta, de la que usamos la pendiente para calcular la Eficiencia de los cebadores.

Para calcular la eficiencia de amplificación de los cebadores, se realizó un ensayo de Q-RT-PCR con diluciones seriadas en base 10 partiendo de una misma muestra (producto amplificado resultado de una RT-PCR anterior). Representando el $-\log$ de los valores de dilución frente al C_T de cada una de las diluciones (Fig.19), obtenemos la gráfica de una ecuación lineal cuya pendiente nos proporcionará el valor de la eficiencia de amplificación de esos cebadores mediante la fórmula;

$$\% \text{ Eficiencia} = (E - 1) \times 100\%$$

$$E = 10^{-1/\text{pendiente}}$$

Una vez determinada la eficiencia de amplificación de los cebadores, podremos comenzar a cuantificar los datos obtenidos en los experimentos de Q-RT-PCR.

7.4 Diseño de cebadores y oligonucleótidos utilizados.

Los oligonucleótidos (Tabla 5) que se utilizaron como cebadores para las distintas PCRs fueron diseñados con el programa *OLIGO 4.1® – Primer Analysis Software* (Rychlik 1992) a partir de los datos de las secuencias previamente conocidas, de ADN o de ADNc.

Cabe hacer una separación en este apartado entre los oligonucleótidos utilizados para el capítulo I, en su mayor parte para análisis de PCR sobre la secuencia descrita del ADNc del gen *JAT* (GenBank: EF506538.1) (Fernández-Ocaña et al. 2010) y aquellos diseñados para el capítulo II, la mayoría utilizados en Q-RT-PCR para confirmar datos de microarray y ver

expresión en diferentes tejidos. Esta información se amplía en la parte de resultados de cada capítulo.

Tabla 5. Cebadores específicos utilizados para la amplificación por PCR de los diversos fragmentos de ADN o ADNc que han sido necesarios en este proyecto. Las parejas se especifican por colores de las filas gris/blanco, (*) marca el uso del mismo oligonucleótido en varias amplificaciones. En azul se marca las dianas de restricción insertadas en la PCR (ver 7.6). Su uso concreto se detalla en resultados.

Nombre	Secuencia	Td [°C]	Tamaño [pb]	% GC	Tm [°C]
Cebadores Capítulo I					
JATF1	5' CGCTTGAGTTTGAAGAAGAAAAGATGTC 3'	72,0	235	40,0	54,0
JATR1*	5' ATCGTGT CATGAGGAAGAAATTTGAAG 3'	71,9			
JATF2	5' GAGGGTCCTTACTTGGGTATTGTAGTGC 3'	72,5	305	45,6	56,0
JATR2	5' CAATAGTGCGGGATTGTAACATCTCC 3'	71,7			
JATF3*	5' AGGTGCAAATCCTGAAATTC AAATAGG 3'	71,8	275	43,6	55,3
JATR3	5' GCTCTCTAATCTCAGGTTCTCCGTCAC 3'	71,8			
JATF4	5' TCTTCAGACAATTATCTCAACAGAGTGTGG 3'	72,1	248	41,5	54,5
JATR4*	5' GCAGCATTGTCTACAAAGACATTAGCAC 3'	71,5			
JATF5	5' GTTTGTGTTTACCTCAACCTCCAAAGG 3'	72,1	270	44,4	55,6
JATR5	5' CCCTGATTGTATTTGAACGATCAGTGA 3'	73,2			
JATF6	5' TCTTCTGTTGACGAATCTGCCTTCTC 3'	71,8	267	40,1	54,3
JATR6	5' CCATCCAAACGTGACTAGGTTTTATTTAAC 3'	71,8			
JATOUT3	5' GTTAAATAAAACCTAGTCACGTTTGGATGG 3'	71,8	-	38,0	56,3
JATOUT5	5' GACATCTTTTCTTCTTCAAACCTCAAGCG 3'	72,0			
OUT5FBGLII	5' TGAGTATTACAAATGTAGCAGATGGAGCA 3'	71,4	-	35,0	50,2
OUT5R*	5' TATAGACATCTTTTCTTCTTCAAACCTCAAGC 3'	69,8			
OUT5FRCAI	5' GTCTATAGTTGTGAGAAATCTGTGCTTGG 3'	69,9	-	36,7	45,8
OUT5R*	5' TATAGACATCTTTTCTTCTTCAAACCTCAAGC 3'	69,8			
JAT-E4F	5' CGAAGAGGCGTGAGTGCTAATGTC 3'	71,7	58	48,3	50,1
JAT-E4R*	5' CTAAC TACCTTTGGAGGTTGAGGTAAACAC 3'	71,4			
OUT3F*	5' GTTTGT TAAATAAAACCTAGTCACGTTTGG 3'	70,4	-	42,4	55,3
JAT-E4R*	5' CTAAC TACCTTTGGAGGTTGAGGTAAACAC 3'	71,4			
OUT3F*	5' GTTTGT TAAATAAAACCTAGTCACGTTTGG 3'	70,4	-	40,5	54,2
OUT3R-PSTI	5' TGCTATAAAAGGCGTCTTCTGTTGG 3'	70,7			
JATNF2*	5' CTCTCCTCGAGTCTTCAAATTTTCTTCC 3'	72,2	484	32,9	53,1
JATNR2*	5' TACTCCATGGATCCTGAATACACTTAGCA 3'	72,2			
OUT3N	5' TTCAACCTTCTTTTCTAATAGTTTTCG 3'	69,1	-	30,4	44,0
OUT3N-HINDIII*	5' AATAGCCCATTCAGATTTTAAATCC 3'	70,0			
OUT3Ndel*	5' CTTATGCTTACAGATTTTGTGAATAC 3'	50,5	-	31,8	43,9
OUT5Ndel*	5' ACTAGTAATAATGTGATGAGTTGAGTTATC 3'	50,0			

Nombre	Secuencia	Td [°C]	Tamaño [pb]	% GC	Tm [°C]
OUT3Psil	5' ACAAACATTGCACATATATAGATATAGC 3'	50,1	-	37,5	51,3
OUT5Ndel*	5' ACTAGTAATAATGTGATGAGTTGAGTTATC 3'	50,0			
JATF1.5*	5' AAAATTGCACCACCAACGATCTTC 3'	70,8	-	31,9	52,8
JATR1*	5' ATCGTGTGATGAGGAAGRAAATTTGAAG 3'	70,1			
JATF1.5*	5' AAAATTGCACCACCAACGATCTTC 3'	70,8	1115	36,4	55,0
OUT5R*	5' TATAGACATCTTTTCTTCTTCAAACCTCAAGC 3'	69,8			
OUT3Ndel*	5' CTTATGCTTACAGATTTTGTGAATAC 3'	50,5	1335	35,7	58,0
JATNR2*	5' TACTCCATGGATCCTGAATACACTTAGCA 3'	72,2			
JATNF2*	5' CTCTCCTCGAGTCTTCAAATTTTCTTCC 3'	72,2	1480	42,9	60,0
JATR4*	5' GCAGCATTGTCTACAAAGACATTAGCAC 3'	71,5			
JATF3*	5' AGGTGCAAATCCTGAAATTCAAATAGG 3'	71,8	1369	42,3	58,0
OUT3N-HINDIII*	5' AATAGCCCATTGAGATTTTAAATCC 3'	70,0			
H12F	5' CAATTTCCAACCTAGCTGGTC 3'	61,2	261	39,8	51,0
H12R	5' GGTTTTATTTAACAACCTTAAGTACATAC 3'	61,5			
H34F/56F*	5' CAATTTCCAACCTAGCTGGTG 3'	62,0	275	39,6	51,0
H34R	5' GTTTTATTTAACAACCTTAAGTACACAA 3'	61,0			
H34F/56F*	5' CAATTTCCAACCTAGCTGGTG 3'	62,0	262	39,3	50,4
H56R	5' GTTTTATTTAACAACCTTAAGTACATTAC 3'	59,9			
JAToSacI	5' AGAGCT'C ATGTCTATAGTTGTGAGAATTCTG 3'	57,3	1107	45,0	52,0
JAToKpnI	5' AGGTAC'CC AAACCTTCACTCAGCCGCATC 3'	67,4			
Cebadores Capítulo II					
39721F	5' CCTTGCTACACATGGTTGGATAGTAACATTGG 3'	77,0	99	37,4	52,0
39721R	5' GAAATATTTTGCAACAACAAAAGATCCAACCTGC 3'	77,3			
4548F	5' GCTCAATGGAAGAAAACAGTTGGACAGTG 3'	75,8	170	35,9	53,2
4548R	5' CTGCATCTSCCTATGTATGATTGAAATTGGTG 3'	75,6			
61237F	5' TGTTCTTGCATTAAACTTGAAAATTAAGTGAAGC 3'	75,1	106	26,4	48,6
61237R	5' CAAGTATCATTGCCCTTAAACTTTCAACTCAG 3'	75,4			
64206F	5' TCGATTTTGCAGATTCTCATTGATTCAGTC 3'	75,4	189	29,1	51,2
64206R	5' GAATAAGTACTATTTCAATTGTGATGGCAATTTAC 3'	74,5			
9761F	5' TGATGTGTCTTGGCGTTGGATACTTCG 3'	76,6	95	45,3	54,0
9761R	5' GCCACAAGGGGCTAAATCCTGTTATATCG 3'	77,2			
25365F	5' GAAATTGGTGATATCACGTTAAATTTGACACTG 3'	75,7	113	32,7	50,7
25365R	5' ATTTCTAATGCTCCTACCGAAATAAGATTCTAGC 3'	75,0			
3626F	5' CGATTTGCAAACCTCGCCAACCTTTTGC 3'	77,3	131	29,0	50,5
3626R	5' AACCCATTCTGCATTCTTTAGGTTTCATGC 3'	76,1			
52708F	5' GCTAAACATGGAGCAAATGGAATGAACC 3'	75,5	95	45,3	53,7
52708R	5' CATTCAATATCACCCATACGCTCTAAAGTGTG 3'	75,7			

Nombre	Secuencia	Td [°C]	Tamaño [pb]	% GC	Tm [°C]
7357F	5' TTCCAAAACAAGAGGCTGGTGAATCG 3'	75,9	95	38,9	51,8
7357R	5' CTCAACAATTGCTAAAATACGTTTCTTTCAG 3'	75,3			
8226F	5' GACAATGAGATCTTTTACTGCGTTCAATATGC 3'	75,2	114	42,1	53,5
8226R	5' CCTCTCATAAAAATCGACAACCAACAATGG 3'	76,3			
8777F	5' GAAGGAAGGGAATGAACCGGACTACG 3'	75,6	94	42,6	52,9
8777R	5' GCTAAAATTGCCCCAGACAAGTATCTAACC 3'	76,7			
18821F	5' CCGATACGAGTGAAAACAGATGAGAAGTAGG 3'	75,3	115	46,1	54,7
18821R	5' CAAAGAGACCATGGCGAAATCCTTGAG 3'	76,6			
1038F	5' TACACCGGTGATGATGAACCATAACTGTG 3'	75,4	102	45,1	53,7
1038R	5' CTCGTTTGGTTTAGCATGGAATTGTAGG 3'	74,9			
8780F	5' ATAAGAACAGTGATTGGATATGAGTAAGTCG 3'	70,0	116	32,8	49,3
8780R	5' GAATTTTAACCTGATTCTTTTCTTCTAAACC 3'	70,2			
6820F	5' GCTGGAGGGATTACACAGATGATTAAGTGC 3'	76,1	106	41,5	53,3
6820R	5' TGTAGAGGACCATGAGATCTCCTCAATGG 3'	76,3			
4871F	5' AGCCACGTTTTGTAGCACTTTATAGG 3'	70,4	118	29,7	48,6
4871R	5' CAATCAACTCGACTCAGGTATAAACTAAGG 3'	70,5			
7967F	5' TGTAGATGTAATTCCTCTTCATAACCATAAGG 3'	71,0	129	31,0	49,2
7967R	5' TATTAATACAAAATTGAATCTCATTTTGATGC 3'	70,1			
5376F	5' TTGGATCAGAAACAAGTGACTGCTACTC 3'	71,0	111	38,7	51
5376R	5' TGGATCATATCTCCATAGTCTTTGGTG 3'	70,6			
9176F	5' TTTAACAATTTATGAAAAGGATGGCTTAACG 3'	74,8	120	30,8	50,3
9176R	5' TTTCTTTCTTTCTTACTACAATGTTTGC 3'	75,0			
9606F	5' GGCAGGAAAGTAATAGCATCACTTCATGC 3'	75,1	128	43,8	54,4
9606R	5' AATTGATCCCTTGCTCAACTCCTTCTCC 3'	75,7			
5923F	5' AGCTGAAAGTCGAAATATTGGATGTTGTAGC 3'	74,9	142	28,9	50,4
5923R	5' CAATTATCGACAAGAAAATTATTCAGAAAACAC 3'	75,2			
7489F	5' GTCCCCAAAAATTTGAGGGATAAAGATGG 3'	74,8	99	41,4	52,5
7489R	5' GATGTTGTACAGTAGGGTGTGAGTGCTGAC 3'	75,0			
50861F	5' CCTCAACGAGGAGAATATATTATATAAAAGTTGG 3'	72,8	108	27,8	47,9
50861R	5' TATATATATTTGTGATTCCGTAAGTTTGGTTACAC 3'	71,2			
9349F	5' GGGTGAAAGAAGAAGATAATGGTCCTAG 3'	70,2	95	44,2	51,8
9349R	5' TTTCGAAATCTTGTGTTCTTGAGACG 3'	70,6			
6777F	5' AATTGTGACCAGAATTTCTAAAAATATTGAGTGAG 3'	73,8	119	29,4	49,6
6777R	5' TTTTACCTTGTACACTATTTTCATTTTCTTGTGC 3'	75,7			
5807F	5' GGGGTCATAGGTTGTCATGGTACCTAGCTC 3'	76,6	140	33,6	52,2
5807R	5' TCAACAGGCCTAAGTGCATAGAAGACTTTAGG 3'	76,7			
6655F	5' GAGATTATGCACCCATAAAATTTTGTAGC 3'	75,1	113	31,9	50,4
6655R	5' ACATGGCCAAGTCTTTACATGGTATTAATAATAGC 3'	74,9			

Nombre	Secuencia	Td [°C]	Tamaño [pb]	% GC	Tm [°C]
6944F	5' AAGATTTCAATCAAGGTCTCGGACTTCG 3'	74,8	99	33,3	50,1
6944R	5' GGTAAAATAAGCAAAAGGGACATTCTTTCC 3'	74,6			
12043F	5' CCAAATCTGTTCTAATCCAAGAAAAACC 3'	70,8	131	27,5	48,5
12043R	5' GCTGATCAAGATTCAATGTTTGATAGTAGG 3'	71,0			
14252F	5' AAATCTCAAGAACTTTCATTAATTTGCACTTTCC 3'	75,3	108	34,3	51,0
14252R	5' AATGTTACAACCTCAGCTATTAGGATGTCATGC 3'	75,6			
6504F	5' TACTTTAACGTTTATGTTTTGTGCATTGG 3'	70,9	119	39,5	51,5
6504R	5' TGGTAGTTGTTTCCTTTCCTAGGTAGATG 3'	70,9			
16562F	5' GGGGGGTAAGACCTGATACGTAATATAAATATGTG 3'	75,7	101	37,6	51,7
16562R	5' TGCAAACCTGTGCCACGAATAGACTAGC 3'	75,3			
8379F	5' TTGCAGAAAATTTTAAAATCCTTTCTTGG 3'	75,5	122	32,8	51,0
8379R	5' CAAAACTCAAAAAACAAATGTGCAGAAAGC 3'	75,1			
20064F	5' CGTGGATCTACAAATATTTAATGGTTCCTTTCC 3'	76,5	215	27,4	51,4
20064R	5' GCCAAGTGTGACAATCTAGACTAATCTTCTAGCAC 3'	75,9			
68327F	5' ATGTTTTTTCTTCTTCGTTCTGACCAAATC 3'	76,0	72	37,5	50,0
68327R	5' GATGAGAATTTGATAGCATCGGCTCAGATC 3'	76,0			
64543-F1	5' ACTGCGAAAGCATTGCCAAGGA 3'	74,4	126	50,0	55,3
64543-R1	5' CTCAACCATAAACGATGCCGACCAG 3'	75,1			
7141-F1	5' GAAGATGCAGCAAACAATTATGCTCGTG 3'	75,6	129	43,9	53,1
7141-R1	5' ATGGAAGACCAAGAAACCTTGAAGACCAG 3'	75,6			
8698-F1	5' GCCGAACAACAAAAATTTATTGCGTAG 3'	73,9	152	38,9	52,4
8698-R1	5' AATTGCCTGTGCGCTTCAAAAAGTTC 3'	74,5			
9121-F1	5' AAAATTGCTAAAACTGTCGCAAAAGTTCG 3'	74,8	107	38,6	51,5
9121-R1	5' TGAATTTCAATCGCTCTGATCGTAGTCG 3'	75,3			
8396-F1	5' TCCCTCCAAATTTGTTCAATCACTCG 3'	75,0	155	36,8	52,7
8396-R1	5' TTGTTCTCGGCAATCTTATTCATTTATC 3'	74,5			
8889-F1	5' GGAAAGGATTTATTGCAAAACCATTTGAC 3'	74,0	113	38,3	51,4
8889-R1	5' GAGCATGTCCATTTGCTCTATTACCTAAAGG 3'	73,6			
9503-F1	5' TCTATCGCGGAATTCTAAATTCTGACCTTC 3'	75,0	140	44,6	53,0
9503-R1	5' TCGTTTCTCGCTAACAGAAGCGGAAG 3'	75,6			

7.5 Análisis de colonias recombinantes mediante PCR.

Esta técnica permite identificar de forma muy rápida las colonias que han sido transformadas con un plásmido, amplificando por PCR la secuencia insertada.

Las colonias recombinantes se tomaron con un palillo de madera estéril y se hizo una réplica ordenada en otra placa de LB-agar. Después el palillo se introdujo en un tubo de 0,5 ml con 10-20 μ l de H₂O para resuspender las bacterias. A continuación se preparó una mezcla para PCR como se describe en la figura 16-B, añadiendo 5 μ l de la suspensión bacteriana como molde en un volumen de reacción final de 15 μ l, y se amplificó con el mismo programa empleado para amplificar previamente el inserto. El resultado se visualizó mediante electroforesis para identificar los clones positivos.

7.6 Síntesis de productos de PCR flanqueados por dianas de restricción.

El propósito de esta técnica es generar productos de PCR con dianas de restricción en los extremos que faciliten su clonación orientada en un plásmido determinado. Para ello, se diseñan cebadores que hibriden con la región que se quiere clonar añadiéndole en el extremo 5' los nucleótidos necesarios para crear una diana de restricción. En la mayoría de los casos es conveniente añadir algún nucleótido extra en el extremo 5' ya que las enzimas de restricción suelen ser menos eficientes cortando en los extremos. Tras la amplificación, se obtendrá un fragmento de ADN de doble cadena flanqueado por dianas de restricción que será clonado de manera orientada en un plásmido que posea esas mismas dianas.

8. PLÁSMIDOS UTILIZADOS.

Para la clonación se han usado dos plásmidos comerciales; el vector-T comercial *pGEM-T Vector System I*® de (Promega, Madison) (Fig.20-A) y el vector *CloneJET PCR Cloning Kit*® (Fermentas, Vilnius) (Fig.20-B) siguiendo en ambos casos las instrucciones de los fabricantes. Las clonaciones se realizaron a partir de productos de PCR, por lo que no ha sido necesario modificar los extremos para la ligación en el caso del vector-T. En el caso de las ligaciones con pJET, de extremos romos, fue necesario un paso previo de conversión de los extremos protuberantes de los productos de PCR en romos. Para ello se usó el fragmento Klenow de la ADNpol I y dNTPs, ambos de la casa Roche (Mannheim), según las indicaciones del fabricante.

Otra opción fue utilizar una ADN polimerasa que no dejara extremos protuberantes en la amplificación por PCR, como es el caso de *iProof High Fidelity Polymerase*® (Bio-Rad, Berkeley).

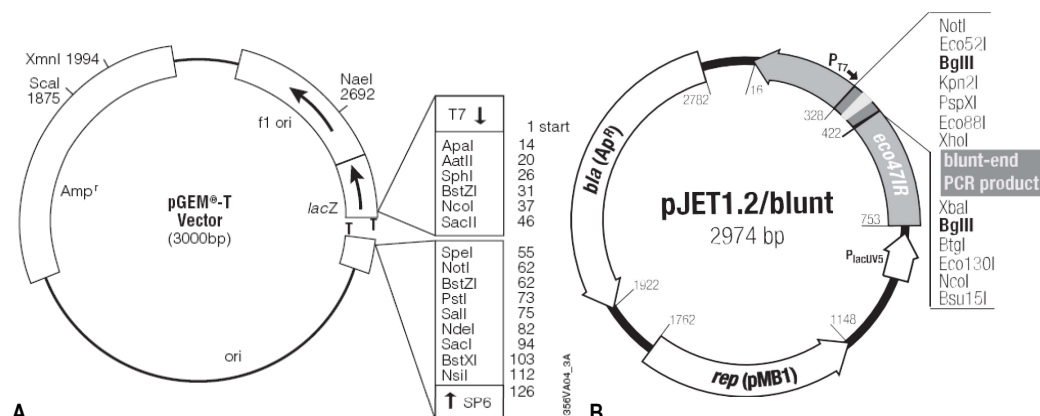


Figura 20. Vectores para clonación; A: Vector-T *pGEM-T Vector System I®* (Promega, Madison). **B:** Vector *pJET1.2/blunt* Fermentas®. Mapa de restricción y puntos de referencia.

9. AISLAMIENTO Y MANIPULACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS.

9.1 Obtención de homogenados.

Para la extracción de proteínas se prepararon diversos homogenados de los distintos tejidos de interés; meristemas, tallo, hojas, raíces, mesocarpo (fruto) y semilla. Al igual que para las extracciones de ácidos nucleicos, la disgregación se llevó a cabo de forma manual en un mortero de porcelana en condiciones estériles o en un molino mecánico modelo *MM400®* (Retsch, Haan), con esferas de acero para facilitar la rotura de tejidos y células, con atención especial al mantenimiento de la ultra-congelación de los tejidos en nitrógeno líquido. La diferencia en contenido lignificado en los distintos tejidos obligó a alargar los ciclos de rotura de raíces y tallo. Las muestras se mantuvieron congeladas en nitrógeno líquido en todo momento durante el disgregado de los tejidos y se descongelaron con vortex en presencia del tampón de homogenización a 4°C en una relación 1/3 (p/v).

Una vez descongeladas, las muestras se filtraron por presión a través de *Miracloth®* (Calbiochem, Schwalbach) humedecido en TrisHCl pH 8. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 3000xG durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se pasó también por columnas desaladoras *illustra NAP-10 Columns®* (GE Healthcare, Uppsala), previamente

equilibradas con tampón fosfato sódico, según indicaciones del fabricante para una eficiente purificación, y se eluyeron con tampón fosfato potásico.

El homogenado se guardó a -20°C con 0,1% de azida sódica y envueltos en papel de aluminio para protegerlos de la luz o desnaturalizados con tampón 4X y hervidos 5-10 minutos a 95°C.

Reactivos

- Tampón de homogenización: Tris-HCl 0,1 M pH 8, NaCl 0,1 M, PVPP 7% (p/v), EGTA 1 mM y EDTA 1 mM. se añade de manera extemporánea: DTT 15 mM; PMSF 1 mM y un cocktail de inhibidores de proteasas de plantas 100x, concentración final 1x (Sigma-Aldrich, St. Louis).
- Tampón de equilibrado: tampón fosfato sódico 100 mM pH 7.
- Tampón de elución: tampón fosfato potásico 10 mM pH 7,8.

9.2 Determinación de la concentración de proteínas.

La determinación de la concentración de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford (Bradford 1976), utilizando albúmina sérica bovina (ASB) a una concentración de 1 mg/ml para elaborar la recta patrón. Se realizaron tres diluciones de cada muestra con un volumen final de 800 µl a los que se añadieron 200 µl de reactivo comercial de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay Reagent®* (Bio-Rad, Berkeley)), se voltearon los tubos y se dejaron reaccionar durante 10 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se determinó la absorbancia a 595 nm frente a un blanco que contenía 800 µl de agua milliQ y 200 µl de reactivo de Bradford.

La interpolación de los datos en la recta patrón obtenida a partir de los datos de la albumina permite inferir la concentración de proteínas de las muestra en cuestión.

9.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

La separación de proteínas se llevó a cabo según el método descrito por Laemmli (Laemmli 1970), utilizando un sistema minigel vertical *Bio-Rad Mini-Protean II®* (Bio-Rad, Berkeley). El método se basa en someter el extracto que contiene las proteínas a electroforesis sobre geles discontinuos de poliacrilamida constituidos por dos zonas distintas: el gel concentrador y el gel

separador, dispuestos como una lámina delgada situada verticalmente. Al aplicarse un campo eléctrico, el complejo SDS-proteína debido a su carga negativa migra hacia el ánodo. Los geles de poliacrilamida son soportes químicamente inertes formados mediante la polimerización de acrilamida y N,N'-metilén-bis-acrilamida, con la participación de persulfato amónico y TEMED. La polimerización se inicia por TEMED que cataliza la formación de radicales libres a partir de persulfato amónico.

La electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes minimiza la agregación molecular y asegura la completa disociación de las proteínas en sus subunidades polipeptídicas individuales, para este propósito se utiliza el SDS en combinación con un agente reductor DTT y calor.

La gran carga negativa que impone el SDS a pH básico enmascara la carga de la proteína de manera que las proteínas tratadas con SDS tienden a exhibir idénticas relaciones carga-masa y formas semejantes. Esta técnica separa las proteínas de acuerdo con sus masas moleculares debido a la selección de tamaños impuestos por los poros del gel. La movilidad de las proteínas en este tipo de geles varía linealmente con el logaritmo de su masa molecular y no están afectadas por su carga original. La masa molecular de la proteína se determina sometiendo, junto a la proteína problema, varios patrones de proteínas de masas moleculares conocidas.

Preparación de geles y muestras.

Se utilizaron geles de 7,5 x 8 cm de 0,75, 1 ó 1,5 mm de grosor, y dependiendo del tamaño de la proteína que se deseara detectar, se usaron diferentes porcentajes de acrilamida (10% y 12%) en la elaboración del gel separador.

Las muestras para la SDS-PAGE se prepararon añadiendo el tampón de tratamiento de muestra 4x en la proporción 1/4 y se calentaron durante 5 min a 95°C para la desnaturalización.

Para llevar a cabo la electroforesis se normalizó la cantidad de proteínas de cada muestra. En la electroforesis se cargaron también los marcadores *SDS-PAGE Standards broad range*® (Bio-Rad, Berkeley).

La electroforesis se desarrolló, utilizando el correspondiente tampón de electroforesis, a 100 V durante 15 min, hasta que el frente había llegado al límite superior del gel separador y,

posteriormente, se aumentó el voltaje a 200 V hasta que la frente del azul de bromofenol llegó al límite inferior del gel separador.

El gel de acrilamida resultante se transfería a membrana para su uso posterior (ver 10.4) o podía teñirse directamente para ver las proteínas sumergiéndolo en solución de tinción con azul Coomassie en agitación durante 10-15 minutos y destiñéndolo con solución decolorante hasta obtener el contraste deseado.

Reactivos

- Tampón gel concentrador: Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8.
- Tampón gel separador: Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8.
- Acrilamida:metilén-bisacrilamida 30% (29:1): acrilamida 17 M y bisacrilamida 640 mM. Tris-HCl/SDS (4x): Tris-HCl 1,5 M, pH 6,8 y SDS 0,4% (p/v).
- Tampón de tratamiento de muestra 4x: Tris-HCl 0,425 M, pH 6,8; glicerol 40% (v/v); SDS 8% (p/v); azul de bromofenol 0,4% (p/v) y DTT 0,04 M.
- Tampón de electroforesis: Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3; glicina 0,192 M y SDS 0,1% (p/v).
- Persulfato amónico 10% (p/v).
- Colorante para geles de poliacrilamida: azul Coomassie brillante R-250 0,1% (p/v), metanol 50% (v/v) y ácido acético 7% (v/v).
- Solución decolorante: metanol 50% (v/v) y ácido acético 7% (v/v).

9.4 Transferencia semiseca de proteínas.

Tras la SDS-PAGE, se realizó la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de PVDF *Inmobilon-P*[®] (Millipore, Billerica), que tiene un tamaño de poro de 0,45 μ m, utilizando un sistema de transferencia semiseco *Trans-Blot Semidry Transfer Cell*[®] (Bio-Rad, Berkeley).

Debido a su naturaleza hidrofóbica, primero se activaron las membranas durante 15 s con metanol 100% (v/v), se lavaron 2 min con agua milliQ y posteriormente, se equilibraron con el tampón de transferencia. Se prepararon papeles Whatman n^o3 cortados 2 cm mayores que las mismas medidas del gel (8 para cada gel), y junto con los geles, se equilibraron en el mismo tampón.

La transferencia se realizó a una intensidad de 1,5 mA/cm² de membrana y un voltaje de 25 V durante 2 h. Tras la transferencia se teñía la membrana con rojo Ponceau al 1% (v/v) en ácido

acético glacial para visualizar las proteínas transferidas y hacer marcas en la escalera de marcadores de tamaño utilizada.

Las membranas se podían usar directamente para inmunodetección o dejarlas secar al aire para guardarlas y utilizarlas en otro momento, previa activación con metanol como se ha descrito.

Reactivos

- Tampón de transferencia: TrisHCl 48 mM, Glicina 39mM, Metanol 20% (v/v) pH=6,8, SDS 0,03% a pH 9,2.

10. DETECCIÓN INMUNOLÓGICA.

10.1 Western Blot.

Para determinar la presencia de nuestra proteína de interés en los distintos homogenados se realizó una inmunodetección por quimioluminiscencia como se describe a continuación.

Las membranas de PVDF fueron bloqueadas con leche en polvo desnatada al 5% en PBS-T durante 40 minutos y, tras un lavado en solución de bloqueo, incubadas con sus respectivos anticuerpos primarios diluidos en solución de primario durante 1 hora y 30 minutos. Tras lavar tres veces durante 10 minutos en agitación con solución de primario, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario policlonal anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, St. Louis) diluido 1:10.000 en solución de secundario. Finalmente se lavaron las membranas tres veces durante de 10 minutos con PBS-T y se procedió al revelado con el kit comercial *ECL-Plus*® (GE Healthcare, Uppsala) siguiendo las indicaciones del proveedor.

Se llevaron a cabo varias aproximaciones de esta técnica dependiendo del origen y la especificidad del anticuerpo primario, de las muestras y en la mayoría de los casos, de los resultados obtenidos. Variando en su caso el tiempo de bloqueo, la concentración del anticuerpo primario, la cantidad de leche y de Tween, los tiempos de incubación con los anticuerpos y la temperatura de los mismos. En los casos que estas modificaciones sean relevantes se indicarán en los resultados al igual que los anticuerpos utilizados en cada caso y sus concentraciones.

Reactivos

- PBS-T o solución de secundario: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄·7H₂O 4,3 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM y 0,05% Tween 20 a pH 7,3
- Solución de bloqueo: leche en polvo desnatada al 5% en PBS-T.
- Solución de primario: leche en polvo desnatada al 2% en PBS-T.

10.2 Deshibridación de las membranas de Western Blot.

Tras el proceso de detección con anticuerpos o Western Blot, las membranas se pueden reutilizar si se desea analizar más de una proteína en una misma membrana, o la misma proteína con diferentes anticuerpos. Para ello, las membranas se incuban 30 minutos en agitación a 50° C en una solución de deshibridación. Posteriormente, se lavan las membranas tres veces durante 10 minutos con PBS-T y se guardan hasta su uso posterior. Activando la membrana siempre antes de su uso.

Reactivos

- Solución de deshibridación: β-mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%, TrisHCl 62,5 mM pH=6,8

10.3 Inmunohistoquímica frente a JAT.

10.3.1 Procesado de las muestras.

Las muestras a analizar por inmunohistoquímica se recogieron en fresco de plantas de olivo variedad Picual procedentes de maceta. Se realizaron cortes transversales en secciones de aproximadamente un centímetro de los tejidos a analizar; raíz, tallo, hoja y meristemo.

Las secciones se incubaron en paraformaldehído al 4% durante 3 horas en agitación a 4°C de temperatura. Después se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PB 0,1 M y finalmente se incubaron en sacarosa al 30% conteniendo 0,02% de azida sódica a 4°C toda la noche. Las muestras tratadas se pueden conservar a 4°C envueltas en papel de aluminio que las proteja de la luz hasta ser utilizadas.

10.3.2 Corte con criostato.

Se realizaron cortes de 60 µm de grosor en criostato (*Frigocut E.*®, Reichert-Jung, Viena) congelados a -20°C y se recogieron directamente en una placa de Petri que contenía tampón

TASB-ASBT. Los cortes se repartieron en pocillos de incubación de 500 micras de tamaño de malla, *Corning Netwells inserts*® (Sigma-Aldrich, St. Louis) donde se hicieron 3 lavados de 10 min cada uno con ese mismo tampón.

10.3.3 Inmunodetección.

Los cortes se incubaron durante toda la noche en agitación suave y a 4°C con el anticuerpo primario frente a JAT diluido en TASB-ASBT a 1/250 y a 1/1000, con un volumen aproximado de 3 ml por pocillo.

A continuación, se hicieron tres lavados de 10 min cada uno con TASB-ASBT y se incubaron durante una hora en agitación suave con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (Pierce Chemical, Rockford) unido a biotina y diluido 1/1.000 en TASB-ASBT. Tras tres lavados y en oscuridad, se procedió a la incubación con el fluorocromo Cy2 acoplado a estreptavidina (Amersham, Buckinghamshire) diluido 1/1.000 durante 1 h 30 min y agitación suave.

Finalmente y en condiciones de oscuridad, los cortes se lavaron con TASB-ASBT y se montaron sobre portas con PBS:glicerol 1/1 (v/v) para su posterior observación en el microscopio láser confocal (*Leica TCS SL*®, Leica Microsystems, Wetzlar). Las longitudes de onda de excitación y emisión (λ_{ex} y λ_{em}) fueron 495 y 515 nm, respectivamente. Como controles negativos se procesaron algunos cortes de cada muestra eliminando el anticuerpo primario, el fluorocromo o ambos.

Reactivos

- Tampón fosfato (PB) 0,2 M, pH 7,4
- Tampón fosfato salino (PBS) 0,01 M, pH 7,4; PB 0,01 M; NaCl 0,15 M y KCl 3 mM.
- Tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4.
- Paraformaldehído 8% (p/v).
- Paraformaldehído 4% (v/v) en PB 0,1 M.
- Sacarosa 30% (p/v) en PB 0,1 M.
- TASB-ASBT: Tris-HCl 5 mM, pH 7,6; NaCl 0,9% (p/v); azida sódica 0,05% (p/v); BSA 0,1% (p/v) y Tritón X-100 0,1% (v/v).

11. TRANSCRIPTÓMICA.

Para obtener una visión más amplia de los genes que se están expresando en el olivo a nivel de la raíz y obtener una serie de datos lo más completos posible, se abarcó un análisis transcriptómico mediante la tecnología del RNA-seq. El inmenso abanico de posibilidades que brindan los análisis de este tipo permiten tal libertad de modificaciones, que se han constituido una serie de directrices generales de “buenas prácticas” para intentar normalizarlos (rna-seqblog.com /best-practices-for-rna-seq/).

11.1 Diseño experimental.

Para el diseño experimental de estudios de este tipo cabe tener en cuenta *a priori*, una serie de factores que nos permitan obtener la mayor y más completa información posible a partir de las muestras que disponemos o vamos a utilizar. Entre las consideraciones más destacables están las genómicas, biológicas, técnicas y por supuesto, las económicas (Fig.21).

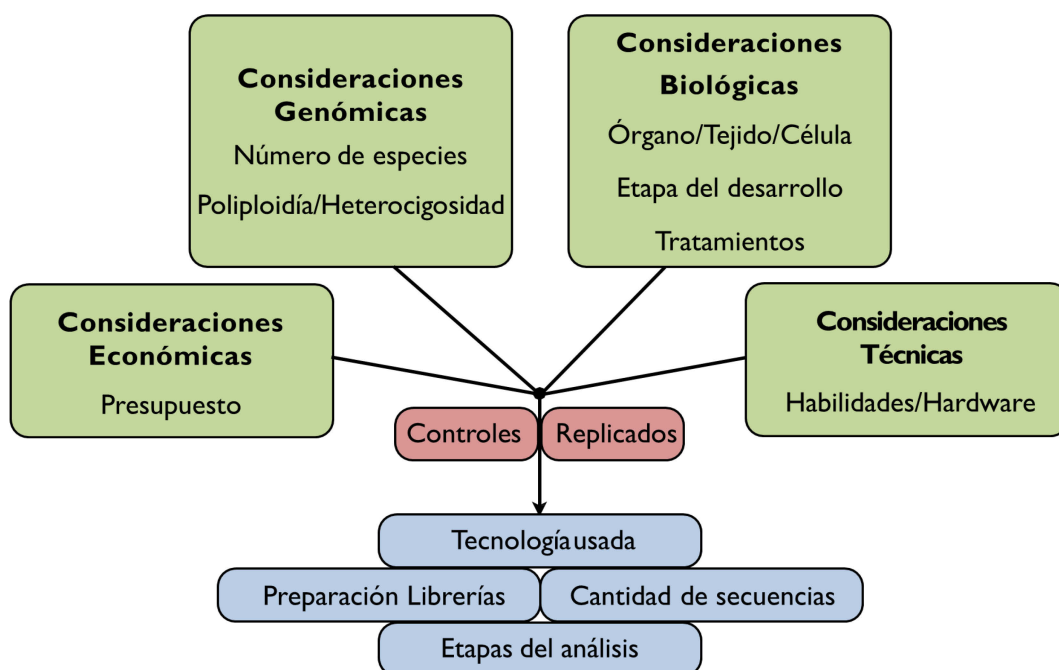


Figura 21. Esquema gráfico general que resume las consideraciones a tener en cuenta en un estudio de análisis transcriptómico.

11.2 Muestras.

Con el objetivo de realizar un análisis transcriptómico de los genes que se expresan a nivel de la raíz y abarcar un amplio rango de éstos y otros transcritos, las muestras fueron ensambladas junto con otras secuencias originadas en nuestro laboratorio, procedentes de distintos tejidos de plantas que fueron sometidas a diferentes situaciones de estrés, tanto biótico como abiótico. El objetivo era generar un transcriptoma de olivo lo más amplio posible para futuras investigaciones. En resumen, el total de las muestras de partida eran 13, que se identificaban con los códigos de la última columna de la Tabla 6.

Tabla 6. Resumen de las muestras utilizadas y de las relaciones entre ellas con respecto a los distintos ensayos que se realizaron.

Ensayo	Tejidos	Tiempo	Código	
Hojas Frío	Hojas Control	0 horas	Control Leaves 0h	CL0h
	Hojas Frío	24 horas	Cold Leaves 24h	CL24h
		10 días	Cold Leaves 10d	CL10d
Infección por <i>Verticillium dahliae</i>	Raíces Infe ctadas	48 horas	Vert. Infected Roots 48h	VR48h
		7 días	Vert. Infected Roots 7d	VR7d
		15 días	Vert. Infected Roots 15d	VR15d
	Hojas Infe ctadas	15 días	Vert. Infected Leaves 15d	VL15d
	Raíces Control	0 horas	Control Roots 0h	CR0h
Daño mecánico	Raíces Dañadas	8 horas	Dammaged Roots 8h	DR8h
		24 horas	Dammaged Roots 24h	DR24h
		48 horas	Dammaged Roots 48h	DR48h
		7 días	Dammaged Roots 7d	DR7d
	Hojas Dañadas	15 días	Dammaged Leaves 15d	DL15d

La línea de trabajo seguido o pipeline se compone de una serie de fases secuenciales en las que los datos de salida de cada una de ellas son el comienzo o punto de entrada de la fase siguiente.

Los ensamblajes y análisis que requerían de una gran capacidad computacional se realizaron en el supercomputador Boyce, un servidor con sistema operativo Debian (1 Tb RAM y 64 núcleos), perteneciente al Instituto de investigación Boyce Thompson Institute for Plant Research, situado en la Universidad de Cornell, Ithaca, NY (USA), en el seno del laboratorio del Dr. Lukas Mueller.

11.3 Procesado de las muestras de ARN.

Las extracciones de ARN de las diferentes muestras de raíces y hojas se llevó a cabo como se describe en el punto 4.1, se agruparon las muestras de tres en tres y se realizó la retrotranscripción a ADNc (ver 5.3) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se secuenciaron dos réplicas técnicas de cada muestra de ADNc en líneas diferentes con la tecnología Illumina HiSeq 1000® (illumina, San Diego).

11.4 Datos de partida o Raw data.

El resultado de la secuenciación masiva fue una enorme cantidad de lecturas pareadas procedentes de cada una de las librerías de las muestras anteriormente descritas, que sirvieron como punto de partida del proceso transcriptómico posterior. La elección de las lecturas pareadas o *paired-end*, además de ser la más adecuada teniendo en cuenta la tecnología de secuenciación, resultó ser la más correcta para realizar el ensamblaje de un transcriptoma *de novo*, es decir, un ensamblaje sin un genoma de referencia. Las lecturas *paired-end* van pareadas, en este caso se anotan como R1/R2, de unos 100 pb de tamaño cada una y en sentido opuesto, como indica la figura (Fig.22). Entre ambas lecturas queda un fragmento o inserto de secuencia desconocida que facilita el proceso de ensamblado, junto con la información de cada pareja de secuencias. En nuestro caso el inserto puede variar entre 100 y 200 pb, pero puede ser mayor (hasta 800 pb).

Los detalles de las muestras; número de lecturas, tamaño, etc. se desarrollarán en el apartado Resultados del Capítulo III.

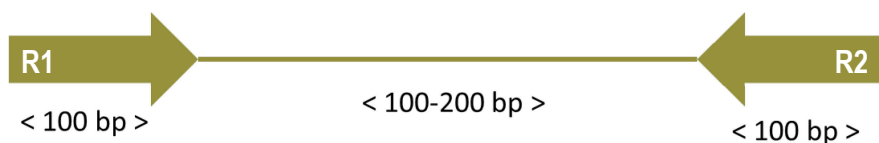


Figura 22. Esquema gráfico de una pareja de lecturas *paired-end* R1/R2.

11.5 Pre-procesamiento de los datos y análisis de calidad.

Las secuencias estaban en formato Fastq, un formato utilizado para el almacenamiento de secuencias de nucleótidos o péptidos que contiene además de la secuencia, información de la calidad de la misma, en dos líneas independientes. El filtrado, limpieza y retirada de los adaptadores de la tecnología *illumina* se llevó a cabo con la herramienta *fastq-mcf*, del paquete de utilidades *ea-utils* (code.google.com/p/ea-utils), utilizando como parámetro de calidad Q30 y de longitud mínima 50 pb. Q o Qphred nos indica la calidad de cada uno de los nucleótidos en la secuencia ($Q = -10 \log_{10}(e)$), por lo que Q30 se corresponde con un valor $e = 0,001$ por nucleótido, eliminando aquellos con una calidad menor.

El análisis de calidad de las secuencias se llevó a cabo con la herramienta *FastQC* (bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc), antes y después del procesamiento con *fastq-mcf*, para poder supervisar el proceso de filtrado de las muestras.

11.6 Ensamblaje.

Para conseguir el transcriptoma *de novo* se probaron tres ensambladores distintos; **ABYSS** (Robertson et al. 2010), **SOAPdenovo-Trans** (Xie et al. 2013) y **Trinity** (Grabherr et al. 2011) (Fig.23). Todos ellos son herramientas nuevas de ensamblaje que pueden utilizar como punto de partida gran cantidad de lecturas cortas, sin usar un genoma de referencia y basadas en la resolución de complejos gráficos (gráficos de Bruijn) con diferentes algoritmos. Los tres programas se utilizaron como indican los desarrolladores modificando únicamente los valores de *k-mer* o *k*, en aquellos que fue necesario.



Figura 23. Herramientas utilizadas para llevar a cabo el ensamblaje del transcriptoma.

El valor *k-mer* se corresponde con la longitud de las subsecuencias en las que se va a dividir cada lectura antes de proceder a su ensamblaje y también se utiliza para nombrar estas secuencias. Por ejemplo, si tenemos una lectura de 25 pb y usamos un *k-mer* de 20, el programa

genera 6 lecturas de 20 pb ($25 - k\text{-mer} + 1$) (Fig.24), generando gráficos que conectan éstas y otras lecturas si son iguales entre sí en toda su longitud menos un nucleótido, es decir, dos *k-mers* de 20 pb se van a unir si 19 pb coinciden. Después, los ensambladores resuelven dichas gráficas.

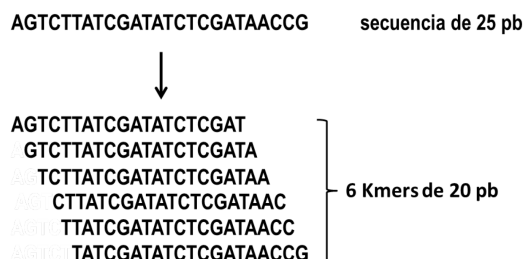


Figura 24. Esquema gráfico del generado de Kmers.

A mayor tamaño de *k-mer* mayor especificidad se le exige al ensamblaje, es aconsejable un valor alto para conseguir separar homólogos o secuencias muy parecidas. En el caso del olivo, al ser una planta altamente heterocigota, nuestro interés es colapsar en la medida de lo posible los alelos, por lo que habría que elegir un *k-mer* de menor tamaño. Desde un punto de vista computacional, valores más pequeños necesitan mayor cantidad de memoria. La estrategia a seguir sería comenzar con valores más altos e ir bajando hasta valores más pequeños, comparando los resultados. ABySS y SOAPdenovo permiten modificar el valor *k-mer*, mientras que Trinity usa 25 por defecto. En el caso de SOAPdenovo se usaron distintos valores de *k-mer*; 63, 55, 47, 39, 31, 23 y 19, para el ensamblaje posterior con ABySS se eligió un *k-mer* de 64 y Trinity se usó por defecto con una normalización de los datos anterior.

En el caso del ensamblador Trinity, los desarrolladores aconsejan que para gran cantidad de datos de partida, más de 300 millones de lecturas o reads, se normalicen las muestras de forma virtual (http://trinityrnaseq.sourceforge.net/trinity_insilico_normalization.html), de manera que se minimicen los requerimientos computacionales y el tiempo de ensamblaje, sin perder información.

Cuando se ensamblan genomas, generar contigs, scaffolds o secuencias más largas es el objetivo, pero en caso del transcriptoma nos interesa obtener una secuencia por cada ARNm distinto de la muestra, cuanto más se parezca el número final de secuencias a esta cantidad real, más fiel será nuestro ensamblaje. En resumen, junto con las herramientas basadas en los gráficos de Bruijn, los distintos valores de *k-mer* y las librerías *paired-end*, buscamos cuál de los ensamblajes es el más correcto (Fig.25).

Se realizó un análisis de las distribuciones de longitud de las secuencias de los distintos ensamblajes para compararlos entre sí con la herramienta *RStudio*® (RStudio, Inc., Boston), una interfaz gráfica desarrollada en lenguaje R (R Team 2005).

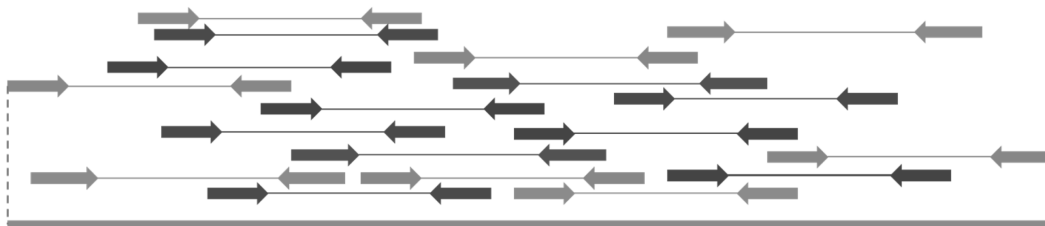


Figura 25. Esquema del ensamblaje usando secuencias *paired-end*.

Tras el ensamblado se llevó a cabo la separación del transcriptoma del hongo y una limpieza de las contaminaciones más habituales en los experimentos de genómica, además de aquellas contaminaciones que pudimos observar en un blast inicial (*blastall* www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Este alineamiento se realizó de forma local con las secuencias de mayor tamaño (>1 kb) de nuestro ensamblaje, frente a la base de datos de proteínas manualmente anotadas y revisadas de UniProt, Swiss-Prot, ([ftp.uniprot.org/pub/databases/uniprot/current_release/knowledgebase/complete/uniprot_sprot.fasta.gz](ftp://ftp.uniprot.org/pub/databases/uniprot/current_release/knowledgebase/complete/uniprot_sprot.fasta.gz)).

11.7 Anotación funcional.

El transcriptoma de elección, una vez filtrado de contaminaciones, se sometió a un alineamiento usando *blastall* frente a la base de datos de proteínas de plantas que existía hasta ese momento de dominio público en UniProtKB, denominada *uniprot-taxonomy-viridiplantae.fasta* (descargada de “www.uniprot.org/uniprot/?query=taxonomy%3a333090&force=yes&format=fasta”), y se continuó con la anotación funcional de los resultados, usando dos aproximaciones para ello.

11.7.1 Blast2GO.

La herramienta Blast2GO (Conesa et al. 2005) es una herramienta bioinformática con una interfaz gráfica *java* originariamente desarrollada para trabajar con anotaciones funcionales GO (Gene Ontology consortium (Ashburner et al. 2000)), y el análisis de las secuencias de genes y proteínas. La herramienta, en parte de libre acceso, en parte de pago, se ha usado en esta Tesis

para, una vez cargados los datos de salida de un alineamiento blast, trabajar con las anotaciones funcionales GO (Gene Ontology), análisis gráficos, manipulación de las mismas y data mining.

11.7.2 Trinotate.

Trinotate® (trinotate.sourceforge.net) es un proyecto de los desarrolladores de Trinity, diseñado para la anotación funcional automática de transcriptomas, particularmente para los ensamblados *de novo*. Unifica diferentes métodos bien referenciados para la anotación funcional incluyendo búsquedas por homología de secuencias; NCBI-BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), identificación de dominios proteicos conocidos; HMMER (Finn et al. 2011) y PFAM (Bateman et al. 2004), predicción de péptidos y secuencias señal; SignalP (Petersen et al. 2011) y tmHMM (Krogh et al. 2001), comparaciones con bases de datos de proteínas confirmadas; EMBL Uniprot eggNOG (Powell et al. 2012) y bases de datos de rutas GO (Ashburner et al. 2000), además de otras herramientas para la anotación de genes del ARN ribosómico; RNAMMER (Lagesen et al. 2007) y la visualización de rutas metabólicas; KEGG (Kanehisa et al. 2012).

Toda la información derivada del análisis de los transcritos que aporta el ensamblaje frente a las diferentes bases de datos, se integra en una base de datos propia tipo SQLite (www.sqlite.org), que nos permite tener toda la información del proceso de anotado de nuestro transcriptoma accesible de forma fácil y sencilla.

11.8 Análisis de expresión.

Para el análisis de expresión de las muestras, una vez tenemos nuestras secuencias filtradas y limpias de contaminantes, se realiza un mapeo de los datos de partida o Raw data frente al ensamblaje y después una estimación de la abundancia del número de secuencias que alinean en cada transcrito o unigen. En este caso se utilizó Bowtie2 (Langmead y Salzberg 2012) para el mapeo y RSEM (Li y Dewey 2011) para la estimación de la abundancia de reads por transcrito.

Para identificar los transcritos expresados diferencialmente se usó el paquete de herramientas DESeq (Anders y Huber 2012) de la plataforma Bioconductor (www.bioconductor.org/), indicado en el protocolo de trabajo del Trinity para los análisis de expresión diferencial.

Tras la estimación de la abundancia de los transcritos, la identificación de los genes diferencialmente expresados se calcula sólo de las muestras de elección, si es el caso, para poder compararlas entre sí. Teniendo en cuenta este hecho, se establecieron análisis distintos para el cálculo de la expresión diferencial y se realizaron para cada uno de los grupos de muestras establecidas, generando datos dos a dos de la comparación de las muestras de interés (Fig.26).

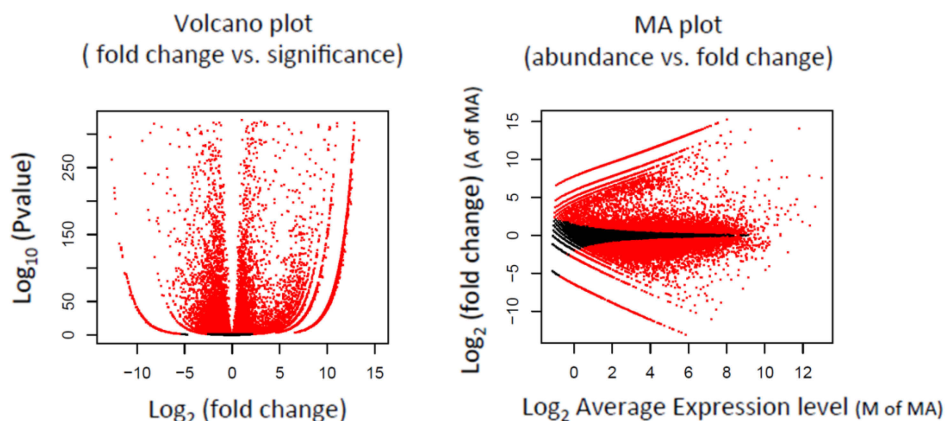


Figura 26. Representación por parejas de los transcritos diferencialmente expresados, en rojo, tras el análisis entre dos muestras. Se representa el fold change frente al *p*-valor (izq.) y la abundancia frente al fold change (drcha.).

11.9 Data mining.

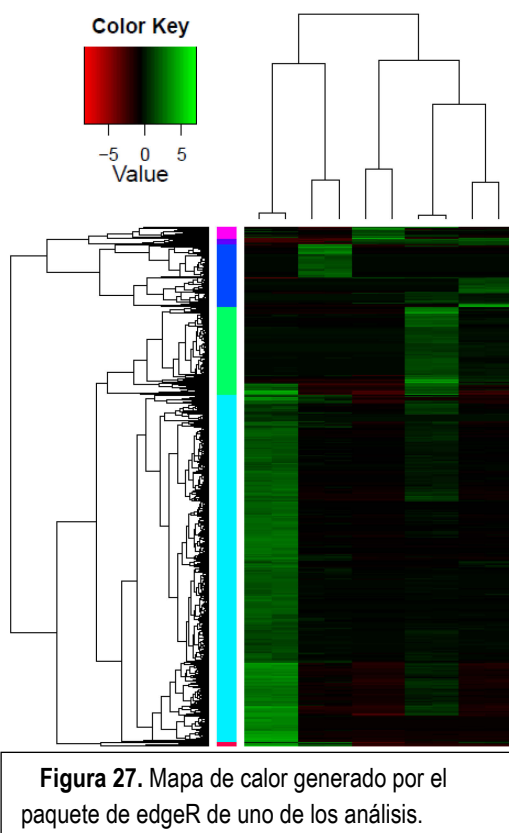
Se denomina minería de datos o Data Mining a todo el abanico de análisis y estudios que se pueden realizar tras el ensamblaje, y se pueden agrupar en seis grupos principales; detección de anomalías (búsqueda de datos inusuales), reglas de asociación (relacionar variables mediante hechos que tengan en común), agrupamiento de los datos (clustering), clasificación de los datos (aplicando estructuras previamente conocidas), análisis de regresión o extracción de generalidades a gran escala.

En el caso de los estudios de expresión génica, existen algunas tareas asociadas; como el análisis y agrupamiento de los valores de expresión diferencial en distintos clusters, la clasificación de los transcritos usando términos GO y anotaciones metabólicas y la visualización de la expresión con mapas de calor.

Los análisis de expresión diferencial se basan en estadísticas sobre los recuentos de las lecturas que mapean de vuelta sobre el transcriptoma, de modo que para estudios significativos de expresión génica debemos de tener en cuenta estos valores. El número de lecturas que se observa para cada término (puede ser un transcrito, un gen, un exón o cualquier otra secuencia que se pueda tomar como una unidad mapeable) depende de diversos factores, entre ellos la profundidad de la secuenciación, la longitud del término (fragmentos más largos generan más lecturas) y su nivel de expresión. Los valores de expresión normalizados para cada uno de estos factores se miden en FPKM (Fragments Per feature Kilobase per Million reads mapped).

Antes de calcular los valores FPKM es necesario normalizar los datos de las diferentes muestras de ARN-seq, con el objetivo de hacerlos comparables entre sí y entre distintas repeticiones. Primero se usa una normalización TMM (Robinson y Oshlack 2010), para buscar diferencias entre muestras. Esta normalización genera un parámetro que tiene en cuenta la escala del tamaño de cada librería o muestra, que es usado para los cálculos FPKM posteriores.

Una vez realizado el análisis, se extraen aquellos transcritos diferencialmente expresados (mediante *p-valor* y veces de cambio) y se agrupan de acuerdo con sus patrones de expresión con el paquete edgeR (Robinson et al. 2010), también de la plataforma Bioconductor. Los transcritos se



relacionan jerárquicamente; HCL (Hierarchical Clustering) o KMC (K-means clustering), mediante sus valores y patrones de expresión (Fig.27) y en análisis posteriores se definen el número de clusters o agrupamientos de interés.

Existen infinidad de análisis que se pueden llevar a cabo dentro de lo que se conoce como minería de datos; cómo búsqueda de SNPs, búsqueda de genes candidatos o marcadores, análisis de enriquecimiento funcional, etc.

En este caso los análisis que se han llevado a cabo han sido el agrupamiento de los genes diferencialmente expresados con patrones de expresión similares usando para ello 2 y 8 veces de cambio y un *p-valor* de 10^{-3} .

Capítulo I: JAT

Estudio del gen *JUVENIL TO ADULT TRANSITION* (*JAT*)

En la actualidad hay todavía un gran desconocimiento sobre cómo se produce la regulación de la transición juvenil a adulto en árboles. La importancia de explorar y revelar los mecanismos genéticos que controlan este cambio de fase radica, en su mayor parte, en la importancia económica de los árboles frutales. La existencia de un periodo juvenil improductivo, en la mayoría de los casos demasiado largo, ha ralentizado tradicionalmente los programas de mejora vegetal y por tanto tiene repercusiones económicas, debido a que las características del fruto solamente pueden ser evaluadas tras la entrada de la planta en producción, lo que ocurre varios años después de los cruzamientos.

En el olivo (*O. europaea* L.), este periodo juvenil es incluso más prolongado que en otros árboles frutales, aunque recientemente se ha conseguido, mediante métodos de crecimiento forzado, acortar a unos tres o cuatro años la floración tras la germinación de la semilla (Lavee et al. 1996, Santos-Antunes et al. 2005). Una producción más temprana, además de la importancia económica, supone una menor envergadura del árbol, lo que facilita la recolección de forma mecanizada con menor coste de la misma.

El gen *JAT* fue descrito en nuestro grupo de investigación (Fernández-Ocaña et al. 2010) como un gen necesario para que la transición ocurriera sin retraso. Se detectó por su diferencia de expresión a nivel de ARNm entre ápices de plantas juveniles y adultas. El análisis en plantas mutantes alteradas en la transición juvenil-adulta, así como en 31 segregantes de un cruce “Picual” x “Jabaluna”, apoyan el argumento sugerido: que una elevada expresión de *JAT* pudiera ser necesaria para que no ocurra retraso en la transición. El estudio del mutante de este gen en *Arabidopsis* también muestra retraso en la floración (Fernández-Ocaña et al. 2010).

Por este motivo, el trabajo de investigación que se presenta en este capítulo es el estudio y caracterización a distintos niveles de *JAT*, ya que es un gen de función desconocida, implicado en el control de la transición de fase juvenil a fase adulta en olivo.

RESULTADOS

Los resultados en este capítulo, referentes al gen *JAT* de *O.europaea*, se van a dividir en cuatro puntos principales; análisis de secuencias, análisis de expresión, localización tisular y estudio del ortólogo en *Arabidopsis*, para facilitar su comprensión y lectura

Análisis de secuencias.

Estudio Genómico.

Basándonos en los datos de los que disponíamos hasta ese momento, la secuencia de ADNc y los datos de expresión en algunos tejidos, se abordó la caracterización genómica del gen. Respecto al análisis genómico se realizaron dos aproximaciones experimentales, una para obtener la secuencia del gen, incluyendo exones e intrones, y otra para las zonas adyacentes 5' y 3' no codificantes, incluyendo la secuencia del promotor.

Obtención de la secuencia de los exones e intrones.

Para ello se diseñaron parejas de oligonucleótidos cebadores a lo largo de la secuencia de ADNc del gen, situados de forma que amplificasen fragmentos solapados entre sí que cubriesen la totalidad del transcrito y que facilitasen el posterior alineamiento de los productos de PCR. Los fragmentos amplificados serían teóricamente de 250 pb aproximadamente (cada pareja amplificaba fragmentos teóricos de tamaño conocido), por lo cual aquellos productos de mayor tamaño contendrían posibles zonas intrónicas. El tamaño total del ADNc era de 1222 pb, por lo que se diseñaron 6 parejas de cebadores, denominadas JATF1-JATR1, JATF2-JATR2, JATF3-JATR3, JATF4-JATR4, JATF5-JATR5, JATF6-JATR6, cuyas características se especifican en el apartado 7.4 de Materiales y Métodos, y que se situaban como muestra la figura (Fig.28).

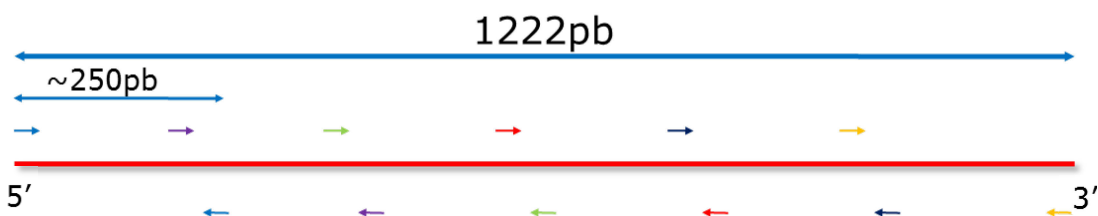


Figura 28. Esquema de la posición de los oligonucleótidos cebadores sobre la secuencia del ADNc de *JAT*.

Los resultados de las distintas reacciones de PCR con las parejas de oligonucleótidos cebadores, amplificaron una serie de fragmentos genómicos, cuyo tamaño exacto se verificó tras la secuenciación posterior de los amplicones (Fig.29). A partir de esta aproximación se resolvió la secuencia de la mayoría de los fragmentos, excepto el amplificado por la pareja JATF2-JATR2, de 786 pb, cuya secuenciación resultó ser parcial en ambas direcciones. Para solventarlo, se clonó el producto de amplificación en un vector-T comercial (pGEMT), se extrajo el ADN plasmídico de 10 de los clones que contenían el inserto y se secuenciaron para obtener la lectura correcta.

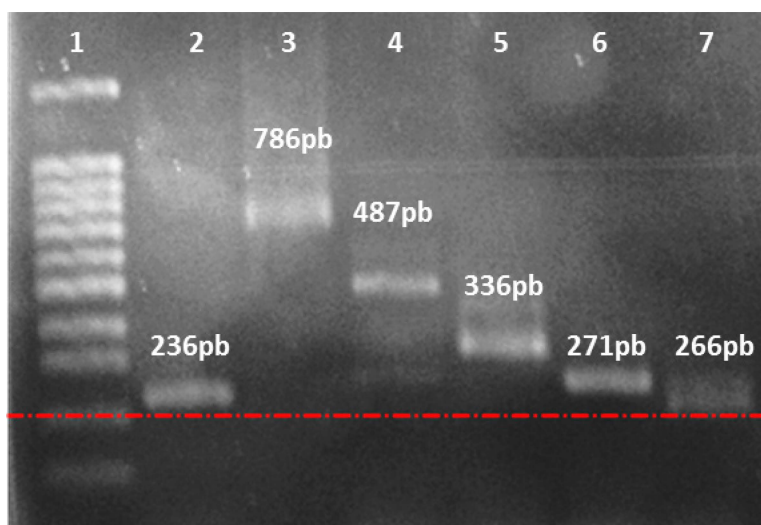


Figura 29. Fragmentos finales. Imagen de un gel de agarosa al 1,5% con la amplificación final de los 6 fragmentos cuyo tamaño teórico inicial era de ~250pb. El tamaño de cada fragmento aparece señalado sobre cada uno de los mismos. De izquierda a derecha las bandas corresponden a: 1; Marcador 100pb. 2; JATF1-JATR1, 3; JATF2-JATR2, 4; JATF3-JATR3, 5; JATF4-JATR4, 6; JATF5-JATR5 y 7; JATF6-JATR6. La altura correspondiente a 200 pb aparece como una línea roja discontinua.

La secuenciación de clones aislados resolvió el problema y se obtuvieron secuencias cuyo análisis puso de manifiesto dos microsatélites de una base (T/A), para el cual "Picual" ha resultado ser heterocigoto (alelos de 10 y 9 repeticiones en el primero y de 9 y 8 repeticiones en el segundo). Esto explica la dificultad para conseguir lecturas correctas en el producto de PCR, dada la mezcla de fragmentos amplificados con diferente tamaño en la zona de los microsatélites, lo que produce una lectura desfasada y picos solapados en la secuenciación. Con la secuenciación de los fragmentos se podía observar que los fragmentos JATF2-JATR2, JATF3-JATR3 y JATF4-JATR4 tenían un tamaño mayor al esperado a partir de la secuencia de ADNc y eran por tanto candidatos a poseer intrones en su interior. La comparación del tamaño teórico de los fragmentos

a partir del ADNc con los tamaños obtenidos de la amplificación por PCR permitió determinar la presencia y tamaño de las secuencias intrónicas (Tabla 7).

Tabla 7. Tabla comparativa de los tamaños de los fragmentos amplificados con su tamaño teórico. (*)Este tamaño engloba dos intrones diferentes, el primero, de 414 pb y el segundo, de 81 pb.

Oligonucleótidos cebadores	Tamaño teórico (ADNc)	Tamaño real (ADN genómico)	Posible/s intrón/es	Tamaño intrón/es
JATF1-JATR1	236 pb	236 pb	No	-
JATF2-JATR2	291 pb	786 pb	Si	495 pb * 414 pb 81 pb
JATF3-JATR3	275 pb	487 pb	Si	212 pb
JATF4-JATR4	248 pb	336 pb	Si	88 pb
JATF5-JATR5	271 pb	271 pb	No	-
JATF6-JATR6	266 pb	266 pb	No	-

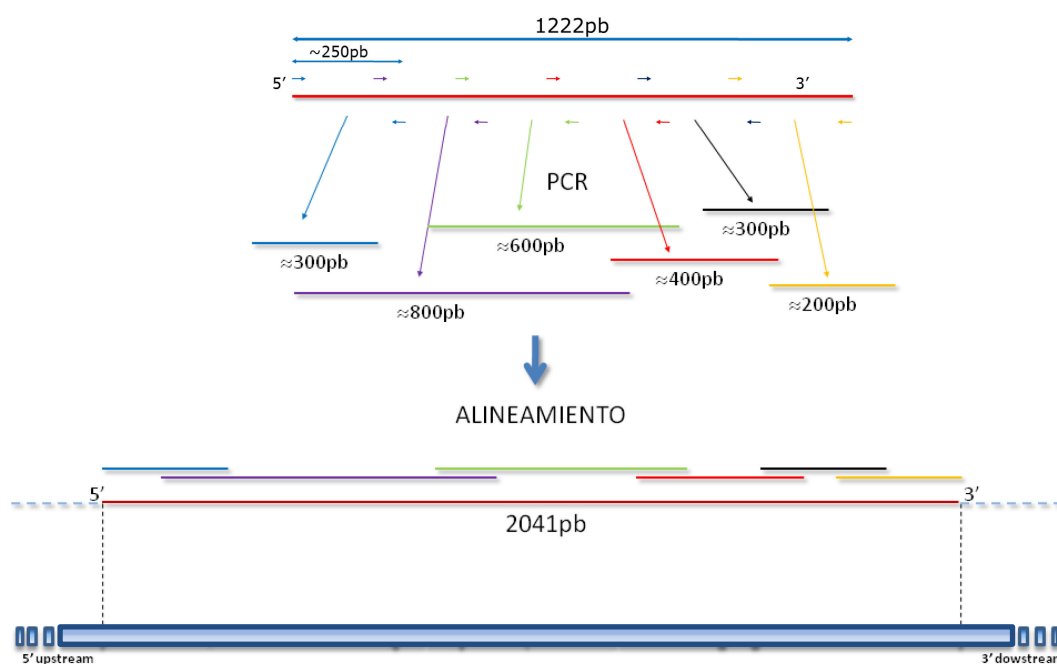


Figura 30. Esquema del proceso al completo; diseño de oligonucleótidos cebadores, PCR y alineamiento final gracias al solapamiento de las secuencias.

El análisis de todas las secuencias y su posterior alineamiento gracias a las zonas solapadas puso de manifiesto que la secuencia del gen tenía un tamaño total de 2041 pb (Fig.30).

Para delimitar los exones e intrones se comparó la secuencia obtenida con la secuencia de ADNc y se siguió la regla general que indica que la mayoría de los intrones comienzan con la secuencia GU y terminan con la secuencia AG en dirección 5'-3'. Estas zonas consenso o sitios donadores y aceptores de "splicing" se conocen como sitios de empalme 5' y 3' respectivamente. Aunque no parecen ser suficientes para la localización de un intrón, existe otra secuencia importante denominada "sitio de ramificación" situada 20-50 bases antes del extremo 3' cuya secuencia consenso es C U (A/G) A (C/U) en el cual la adenina está totalmente conservada seguida de un segmento polipirimidínico (Fig.31) (Watson 2006).

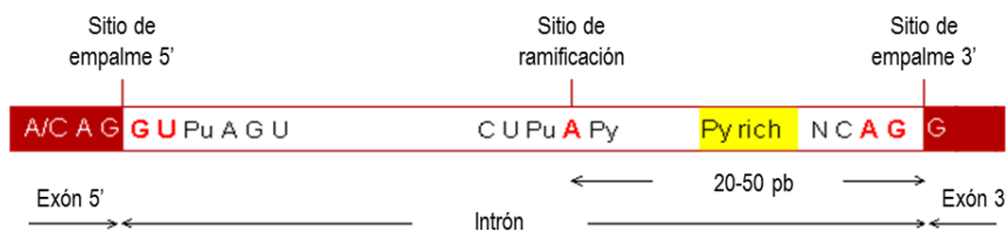


Figura 31. Regla general de la eliminación de los intrones en la maduración del ARNm y secuencias conservadas.

Teniendo en cuenta esta regla general y a partir de los datos de tamaño generados y las secuencias obtenidas, todos los datos se alinearon y analizaron con el programa Bioedit y se estableció una estructura interna del gen de 5 exones y 4 intrones, de tamaño proporcional al que muestra la figura (Fig.32). Todo los intrones del gen *JAT* de olivo cumplen correctamente esta regla general.



Figura 32. Exones e Intrones a escala de la estructura genómica del gen *JAT*.

Obtención de las secuencias adyacentes 5' y 3' del gen.

Una vez resuelta la estructura del gen a nivel genómico el siguiente paso era intentar resolver las zonas flanqueantes del gen 5' y 3'. Para obtener la secuencia flanqueante 3' se buscaron enzimas de restricción que cortaran a la secuencia cerca el extremo 3', quedando un fragmento lo

suficientemente amplio hasta el final de la secuencia para diseñar una pareja de oligonucleótidos cebadores inversos, como se muestra en la figura (Fig.33).

Se realizó la restricción del ADN genómico con las enzimas *EcoRI*, *Sall* y *PstI*, después se inactivaron los enzimas por calor (65°C 20 min). Se ligaron los extremos cohesivos generados y se realizó una PCR con cada una de las ligaciones, usando para ello la pareja de cebadores inversos OUT3F/OUT3R-PSTI. Se obtuvo amplificación a partir del proceso realizado con *EcoRI*, con un tamaño de unas 500 pb, de las cuales 330 pb correspondían a nueva secuencia 3' flanqueante. Con las enzimas *Sall* y *PstI* no se obtuvo amplificación posiblemente porque sus dianas de restricción estaban lo suficientemente alejadas del extremo para que la polimerasa no alcanzara a amplificar el fragmento.

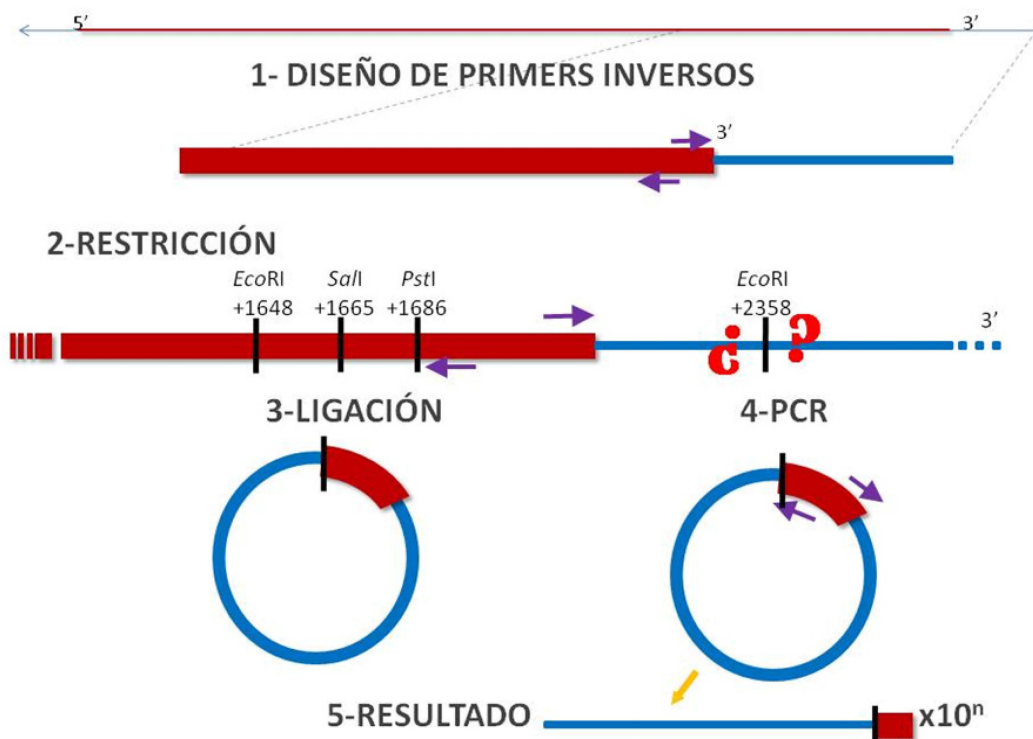


Figura 33. Esquema del método experimental utilizado para obtener una amplificación del extremo 3' del gen.

Del mismo modo, para la obtención de la secuencia de la zona flanqueante 5', las enzimas de restricción seleccionadas fueron *RcaI*, *BglII*, *XhoI* y *SspI*. Tras un proceso homólogo al anterior

restricción-ligación-PCR, se consiguieron amplificar fragmentos de distinto tamaño con cada una de las enzimas. Los cebadores diseñados de forma inversa que se utilizaron en este caso fueron; OUT5FRCAI/OUT5R, para la restricción-ligación con *RcaI* y OUT5FBGLII/OUT5R, para el resto. De entre los fragmentos amplificados la banda más definida en la visualización en un gel de agarosa fue la obtenida del proceso con la enzima *RcaI*. El tamaño del producto de PCR fue de unas 750 pb, que tras la secuenciación resultaron en un total de 658 pb nuevas que se añadieron a la zona 5' flanqueante (Fig.34).

El estudio de la secuencia de esta zona posee un mayor interés, ya que brinda la posibilidad de estudios de promotor y posibles zonas reguladoras de la expresión. Una vez secuenciado el nuevo fragmento se repitió el proceso, obteniendo amplificación con la enzima *PsiI*. La secuencia del extremo 5' se amplió en 435 pb, haciendo un total de 1,1 kb de secuencia flanqueante (Fig.34). La longitud de la secuencia genómica completa descrita, que contenía al gen *JAT*, fue de 3,5 kb totales.

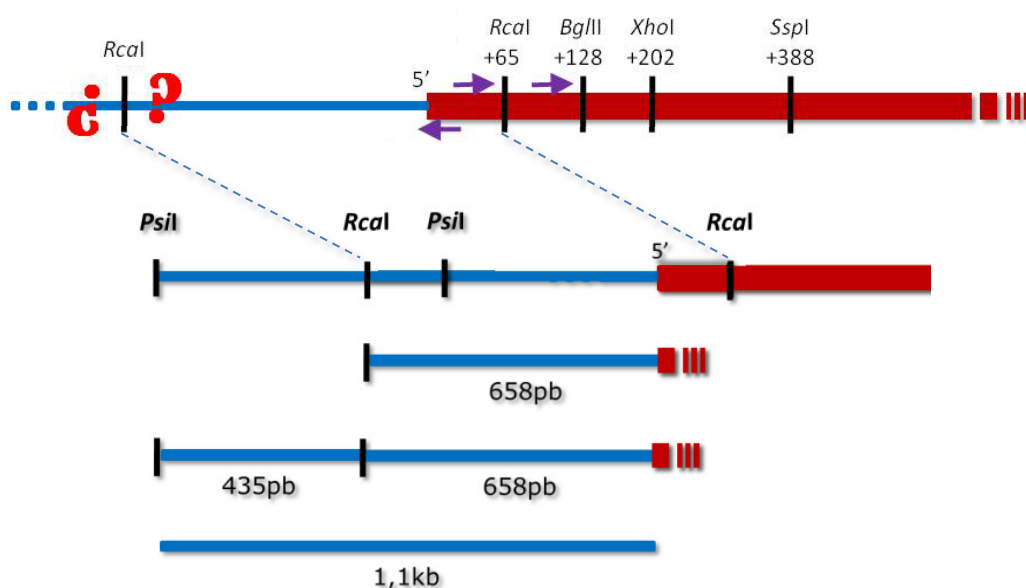


Figura 34. Esquema del método experimental utilizado para obtener una amplificación del extremo 5' del gen en el que se muestran los dos pasos sucesivos.

Durante las sucesivas secuenciaciones y análisis de secuencias se han puesto de manifiesto gran cantidad de polimorfismos y diferencias entre las secuencias, que podían deberse a que

Picual fuese heterocigoto para este gen, a fallos en el proceso de secuenciación o a la existencia de genes parálogos de *JAT* en el olivo. Para resolverlo y para comprobar la secuencia genómica completa; exones, intrones y zonas flanqueantes del gen, se realizó una segunda aproximación que consistió en la amplificación del total de la secuencia en cuatro fragmentos de entre 1,3-1,5 kb de forma que se solaparan entre sí unas 400-500 pb para su alineamiento posterior. Las PCRs se diseñaron haciendo uso de oligonucleótidos cebadores que ya se habían utilizado antes, además del diseño de los más externos y se emparejaron como sigue; JATF1.5/OUT5R (1115 pb), OUT3Ndel/JATNR2 (1335 pb), JATNF2/JATR4 (1480 pb) y JATF3/OUT3N-HINDIII (1369 pb). Los fragmentos debidamente purificados fueron clonados en el vector-T pGEMT y secuenciados tras la selección de aquellos clones positivos, unos 40 clones por fragmento.

El posterior análisis y alineamiento de las secuencias de los diferentes clones mostró seis grupos de secuencias, entre los que se podían agrupar tres parejas bien diferenciadas, que se correspondían con 3 genes parálogos que formarían el “cluster” *JAT*, constituido por los genes *JAT1*, *JAT2* y *JAT3* con 2 alelos cada uno (Fig.35).

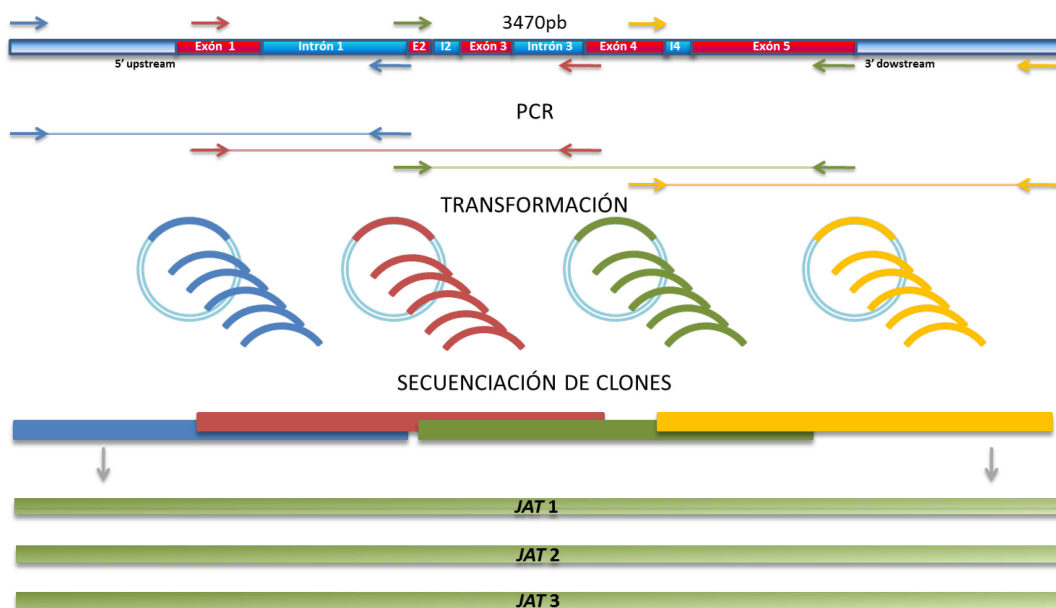


Figura 35. Esquema gráfico del método experimental seguido para resolver la hipótesis de los genes parálogos de *JAT* en olivo a partir de la secuencia genómica.

En un primer momento no se resolvieron las secuencias al completo, por lo que se secuenciaron varios clones de cada tipo para confirmar las secuencias de los 6 alelos (Tabla 8).

Tabla 8. Tabla resumen del tamaño final resuelto de la estructura de los genes parálogos JAT1, JAT2 y JAT3 indicando las regiones a las que pertenecen.

Gen	Alelos	Tamaño genómico (pb)	Secuencia codificante (pb)	Zona 5' / 3'(pb)
JAT1	1	3.295	1.071	1106 / 1.118
	2	3.288	1.071	1099 / 1.118
JAT2	1	3.426	1.089	1.118 / 1.219
	2	2.819	1.089	517 / 1.213
JAT3	1	2.978	1.071	736 / 1.111
	2	2.980	1.071	736 / 1.111

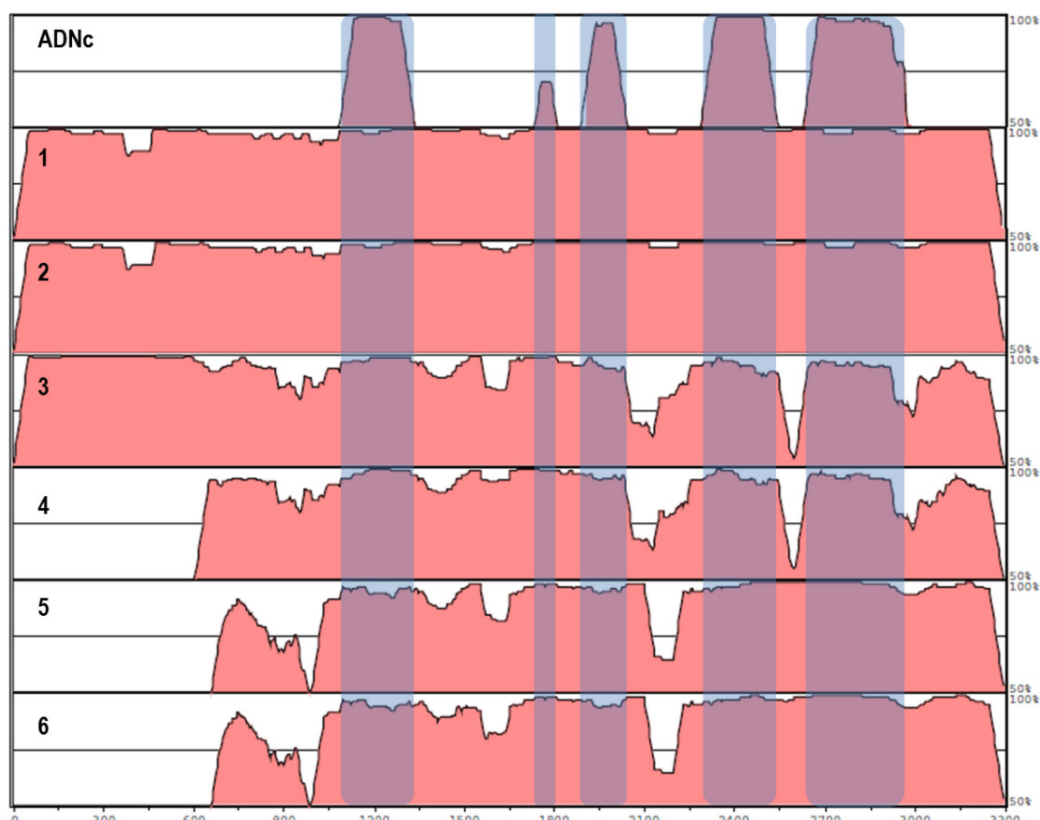


Figura 36. Perfiles de alineamiento entre los 6 alelos de JAT entre sí y comparándolos con la secuencia de ADNc consenso, sombreada en azul se muestra la posición de los exones (figura generada con la herramienta VISTA (Frazer et al. 2004) y modificada *a posteriori*).

Los tres parálogos presentan la misma estructura y gran parecido en las secuencias, a nivel genómico las mayores diferencias se encuentran en los extremos flanqueantes 5' y 3', además de en las zonas intrónicas. Como se ha comentado, los alelos son más parecidos por parejas, como se puede observar en la figura (Fig.36), manteniendo la estructura y el número de exones e intrones. Aunque el mayor parecido se encuentra sobre todo en las proteínas deducidas, como se verá más adelante. La secuencia del ADNc del gen *JAT* descrito anteriormente posee fragmentos de los distintos parálogos; los exones 1, 2 y 4 parecen coincidir con *JAT1* y los exones 3 y 5 con *JAT2*. Los cambios son puntuales y habrían pasado como polimorfismos en los análisis de secuencias, ya que como hemos comentado, las mayores diferencias se encuentran en los intrones.

Análisis de la secuencia peptídica.

Las secuencias peptídicas de los seis alelos son muy parecidas entre sí, como se muestra en la figura que ilustra su alineamiento (Fig.37), si lo reducimos a nivel de parálogos, comparando cada alelo con su par, *JAT1* se diferencian en 2 residuos, *JAT2* en 7 residuos y en el caso de *JAT3* las proteínas deducidas son iguales. Datos descriptivos de los péptidos se muestran en la Tabla 9.

Debido al gran parecido entre las secuencias peptídicas, los distintos análisis de secuencias subsiguientes se referirán en general a la proteína *JAT* en el caso de que los resultados hayan sido redundantes y a los parálogos o alelos en particular cuando se hayan encontrado diferencias significativas, aunque los análisis se han hecho con todas y cada una de ellas en aquellos que haya sido posible.

Tabla 9. Tabla resumen de los péptidos deducidos de las secuencia de los diferentes alelos de *JAT*, indicando el tamaño final, peso molecular, punto isoeléctrico y residuos con carga negativa y positiva.

Proteína	Alelo	Proteína (aa)	Peso molecular (Da)	pI	Residuos -/+
JAT1	1	356	39.875,27	5,76	40/33
	2	356	39.846,26	5,64	40/32
JAT2	1	362	40.530,23	5,61	42/35
	2	362	40.483,05	5,69	41/34
JAT3	1	356	39.729,19	6,01	38/33
	2	356	39.729,19	6,01	38/33

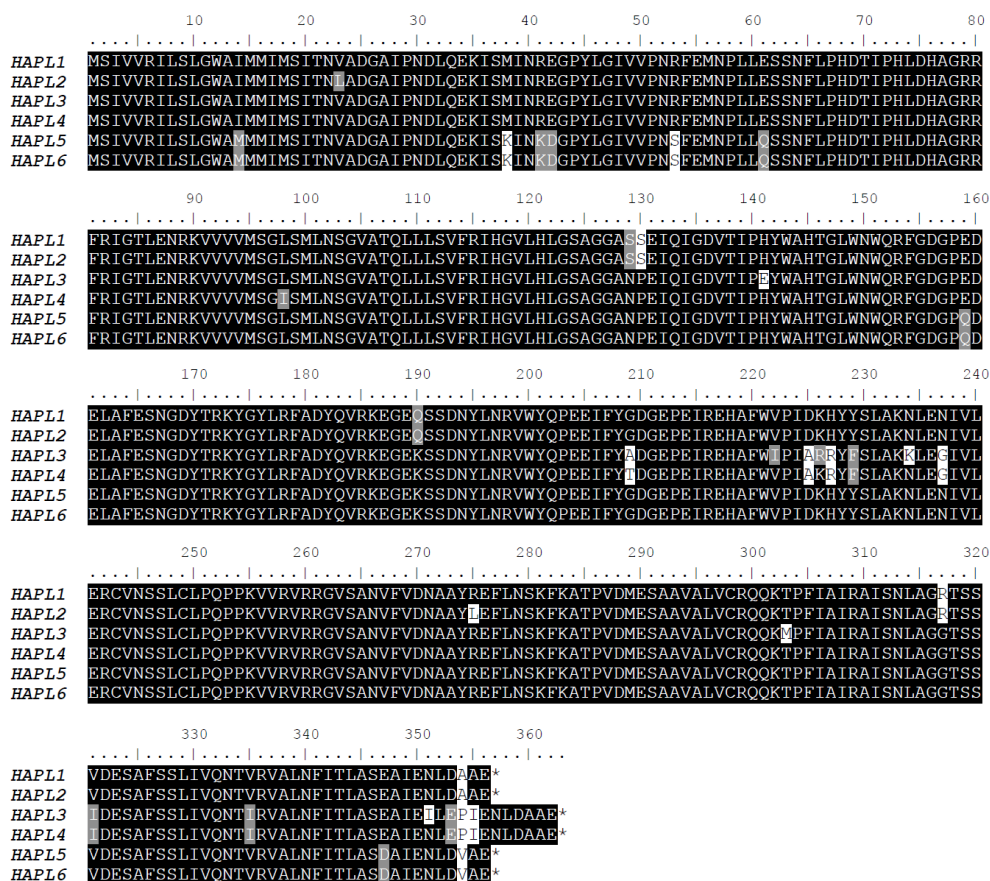


Figura 37. Alineamiento de la secuencia peptídica de cada uno de los alelos de los genes parálogos JAT. Para la correspondencia entre alelos y parálogos consultar la tabla 8. Sombreadas en negro están las identidades y en gris las similitudes entre aminoácidos (figura generada con Bioedit).

Un análisis detallado de la proteína deducida de JAT revela dos posibles dominios transmembrana a partir de su perfil de hidrofobicidad (Kyte y Doolittle 1982); el primero del aminoácido 1 al 24 y el segundo entre los aminoácidos 91 y 113 (Fig.38-A). El estudio de su secuencia en busca de dominios conservados (www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?) muestra homología con un dominio fosforilasa entre los aminoácidos 76 y 342 (Fig.38-B), que parece estar incompleto al perder esta homología en su zona central (146-257), sugiriendo un potencial sitio de unión a nucleótidos, aunque su función es todavía incierta.

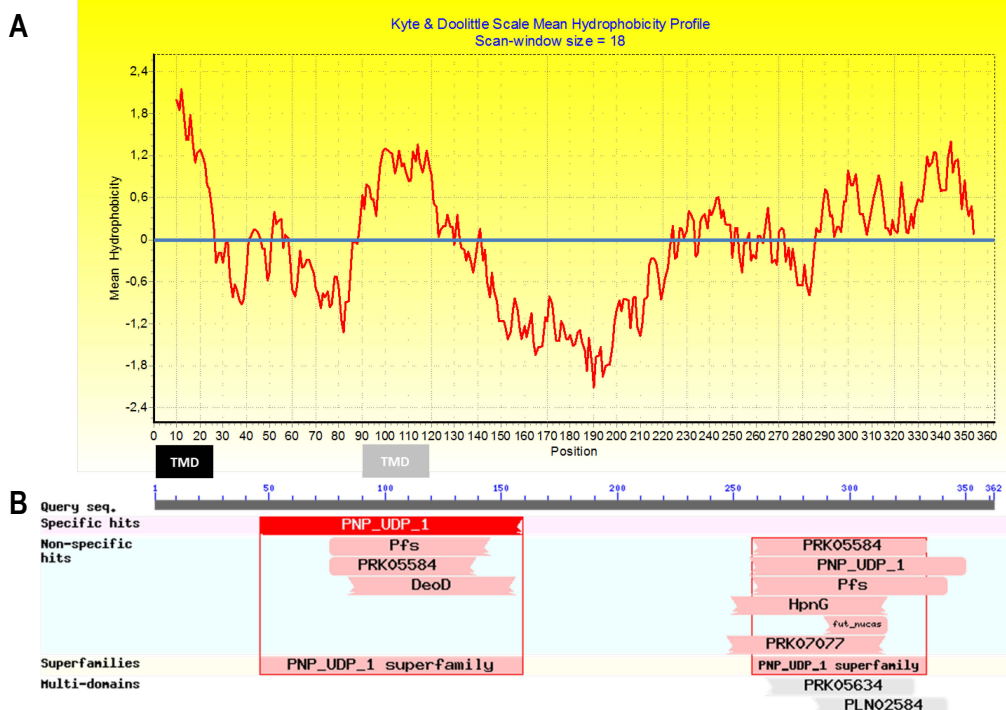


Figura 38. A. Perfil de hidrofobicidad de JAT según el método de Kite & Doolittle (Kyte y Doolittle 1982), realizado con la herramienta Bioedit y posibles dominios transmembrana derivados (TMD). **B.** Diagramas de predicción de dominios conservados (Marchler-Bauer et al. 2011).

El análisis de la presencia de péptidos señal con SignalP (Petersen et al. 2011) y el algoritmo Philius basado en modelos de Hidden Markov (Reynolds et al. 2008) confirman la predicción de un posible dominio transmembrana amino terminal que podría ser un péptido señal con un punto de rotura tras el aminoácido 26. De hecho, los análisis con otras herramientas; WoLF PSORT (wolfsort.org), herramientas del Center for Biological Sequence Analysis (cbs.dtu.dk) y Protein Prowler (bioinf.scmb.uq.edu.au/pprowler_webapp_1-2) confirman que JAT podría pertenecer a una ruta secretoria (Fernández-Ocaña et al. 2010). Sin embargo, el algoritmo Philius no predice el segundo dominio transmembrana, por lo que no podemos asumir por completo que sea una proteína de membrana. Los análisis de su localización celular mediante la herramienta de búsqueda de motivos de EML (elm.eu.org) predicen una localización citosólica o de la membrana (Fernández-Ocaña et al. 2010) mientras que los análisis con Wolf PSORT (wolfsort.org) la sitúan en vacuolas o cloroplastos.

Análisis filogenético.

La secuencia de ADNc de *JAT* se comparó mediante BLAST con las bases de datos presentes en el NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) y mostraba una gran similitud con secuencias de posibles proteínas presentes en *V. vinifera*, *P. trichocarpa*, *A. thaliana*, *Glycine max* y *Ricinus communis* (Tabla 10), además de con otras proteínas de plantas con menor semejanza (Fig.39).

Tabla 10. Datos obtenidos de un BLAST frente a las bases de datos non-redundant GenBank CDS translations + PDB + SwissProt + PIR + PRF excluyendo muestras de proyectos WGS.

Plantas	Referencia	Identities (%)	Similitudes (%)
<i>V. vinifera</i>	(XP_002280745.1)	65	80
<i>P. trichocarpa</i>	(XP_002331152.1)	61	77
<i>A. thaliana</i>	(NP_194623.2)	57	75
<i>G.max</i>	(ACU19785.1)	52	72
<i>R. communis</i>	(XP_002514270.1)	51	65

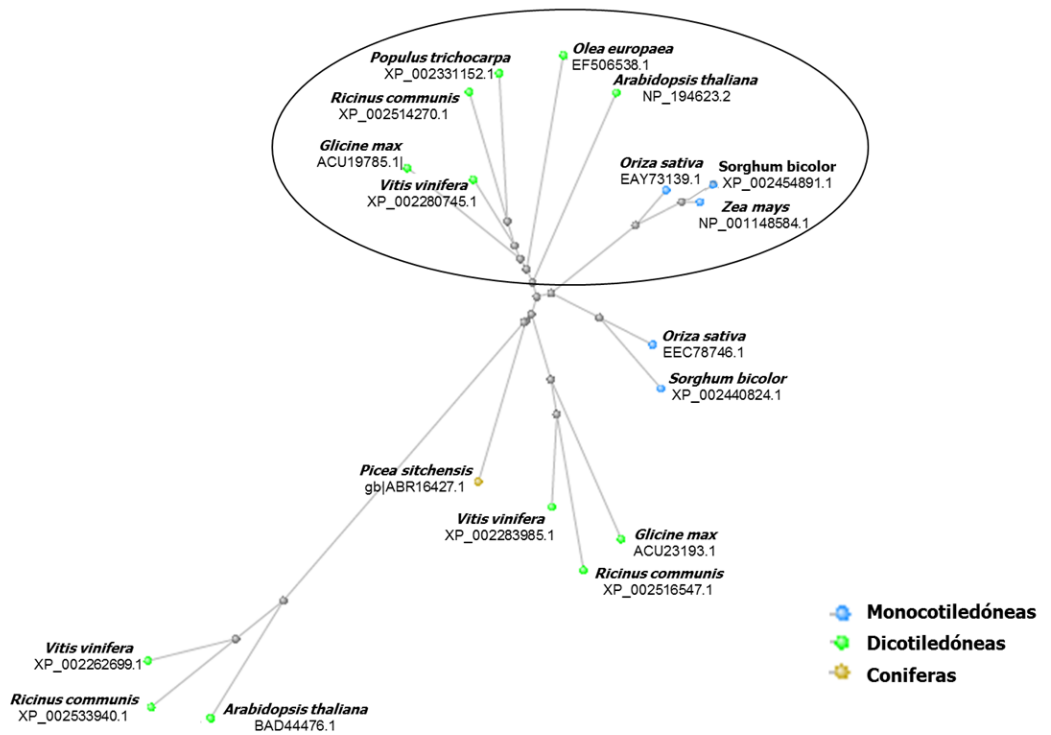


Figura 39. Árbol filogenético de las secuencias más parecidas al péptido JAT en las bases de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) realizado por el método de evolución mínima. Dentro de la elipse los posibles ortólogos de JAT en dicotiledóneas (verde) y en monocotiledóneas (azul).

Los análisis filogenéticos preliminares de la secuencia de aminoácidos confirmaban la elevada semejanza con péptidos de *V. vinifera*, *P. trichocarpa*, *A. thaliana*, *G. max* y *R. communis* que parecen estar codificados por ortólogos de JAT, así como también se observa un gran parecido con péptidos de las monocotiledóneas *Oriza sativa*, *Sorghum bicolor* y *Z. mays*, posiblemente codificados también por ortólogos del gen JAT de *O. europaea* (Fig.39).

El árbol filogenético también revela la existencia de parálogos en la mayoría de estas especies, en algunas de ellas hasta tres representantes, como es el caso de *V. vinifera* y *R. communis*. La ausencia de referencias sobre la función de estos ortólogos del gen JAT, así como de la actividad de la proteína, no permite hacer ninguna predicción sobre el papel que tiene este gen en el desarrollo del olivo ni de cómo lo lleva a cabo.

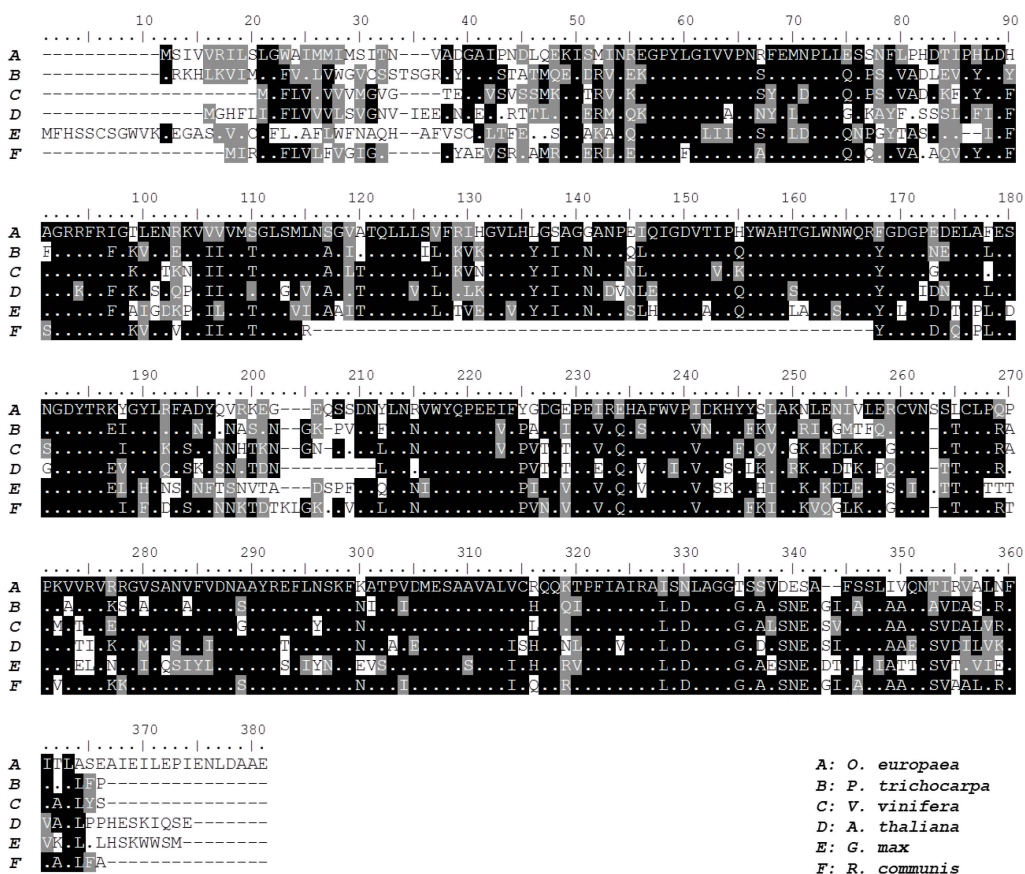


Figura 40. Alineamiento múltiple de las cinco secuencias peptídicas más parecidas a JAT presentes en las bases de datos de GeneBank. Los aminoácidos idénticos a la primera secuencia, JAT de *O. europaea*, aparecen como puntos. Cuando un mismo aminoácido se repite en tres o más de las seis secuencias aparece sombreado en negro y si son aminoácidos similares, en gris.

Un alineamiento múltiple de la proteína JAT y de las cinco secuencias más semejantes de proteínas de las bases de datos, muestran una buena conservación de las secuencias peptídicas, excepto en los 42 aminoácidos del extremo amino terminal, dos fragmentos cortos intermedios; del aminoácido 67 al 72 y del 184 al 192, y los últimos aminoácidos del extremo carboxilo terminal, tomando como referencia la secuencia de JAT (Fig.40). El alto nivel de conservación de la secuencia peptídica refuerzan la hipótesis de que estén codificados por genes ortólogos reales.

Se realizó también un estudio de la secuencia genómica para los genes que daban lugar a las proteínas con mayor similitud a JAT. Se comparó la secuencia genómica completa y no se obtuvieron parecidos significativos, por lo que se comprobó que la similitud media del 74% obtenida del alineamiento de las secuencias peptídicas estuviese definida por su secuencia codificante.

Los alineamientos múltiples de cada uno de los exones de las distintas especies con los exones de JAT revelaron que la estructura del gen es prácticamente la misma para todos los genes analizados, ya que el número de exones y el orden de los mismos se mantienen en todos ellos (Fig.41). Con excepción de *R. communis* en el cual el exón número 3 está ausente y se corresponde con la ausencia de un fragmento en la secuencia de aminoácidos de la posición 115 a la 167 del alineamiento (Fig.40), ambos inclusive.

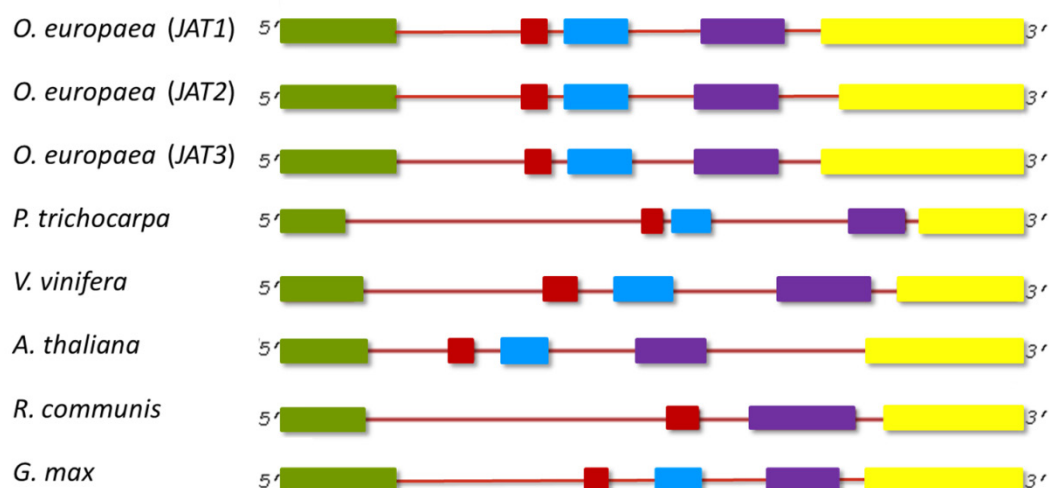


Figura 41. Esquema en el que se representan los diferentes exones de la estructura genómica completa de los probables ortólogos de JAT. Del mismo color aparecen los exones que se corresponden en secuencia y posición: exón 1 (verde), exón 2 (rojo), exón 3 (azul), exón 4 (violeta) y exón 5 (amarillo).

Análisis de expresión.

Estudio de la expresión a nivel del ARNm.

El análisis de la expresión del gen *JAT* mediante RT-PCR mostró una expresión mucho más elevada en plantas jóvenes y tejidos juveniles, que en tejidos adultos (Fig.42-A), habiendo recogido los tejidos juveniles y adultos de la misma planta al mismo tiempo. Además, en las plantas jóvenes de dos meses de edad procedentes de semilla, la expresión mayoritariamente parecía deberse a la expresión en raíz (Fig.42-B).

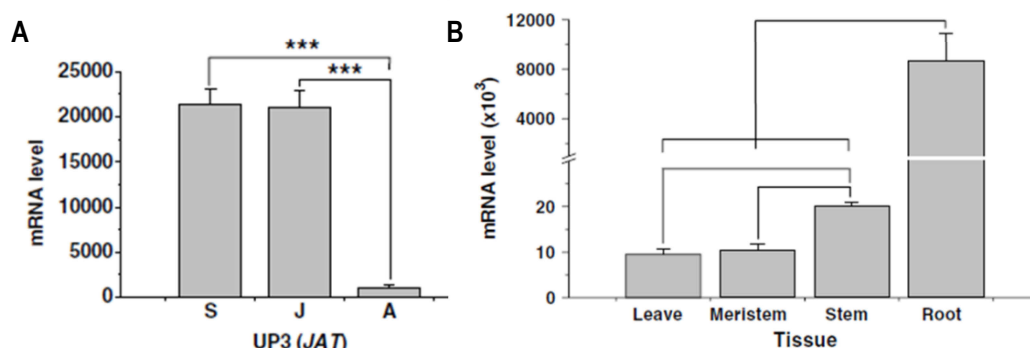


Figura 42. Gráficas de expresión de *JAT* a partir de sus niveles de ARNm mediante Q-RT-PCR (Fernández-Ocaña et al. 2010); (1) en plantas de 2 meses de edad procedentes de semilla (S), meristemos juveniles (J) y meristemos adultos (A), ambos de la misma planta. *** $p < 0,001$ (2) en diferentes tejidos, hojas, meristemos, tallo y raíces de plantas de dos meses de edad procedentes de semilla. Las comparaciones se muestran con líneas, todas con $p < 0,001$. En ambas gráficas las unidades son arbitrarias, las muestras provienen de varias plantas y los resultados son la media de tres experimentos independientes.

Habida cuenta de que *JAT* está compuesto por tres genes parálogos se procedió a analizar el patrón de expresión de los tres genes *JAT* en los diferentes tejidos. Para ello se diseñaron oligonucleótidos cebadores que consiguiesen diferenciar entre los tres genes parálogos. Debido al enorme parecido entre las secuencias y a la dificultad que suponía diferenciar entre los tres parálogos, sin perder ninguno de los alelos de los mismos, para llevar a cabo las RT-PCRs específicas de alelo se realizó un estudio pormenorizado de las zonas comunes que presentaban polimorfismos de un solo nucleótido. Los oligonucleótidos se diseñaron sobre el extremo 3' del exón 5, que poseía mayores diferencias, amplificando sobre la misma secuencia y un fragmento del mismo tamaño para que los resultados fuesen lo más comparables posible.

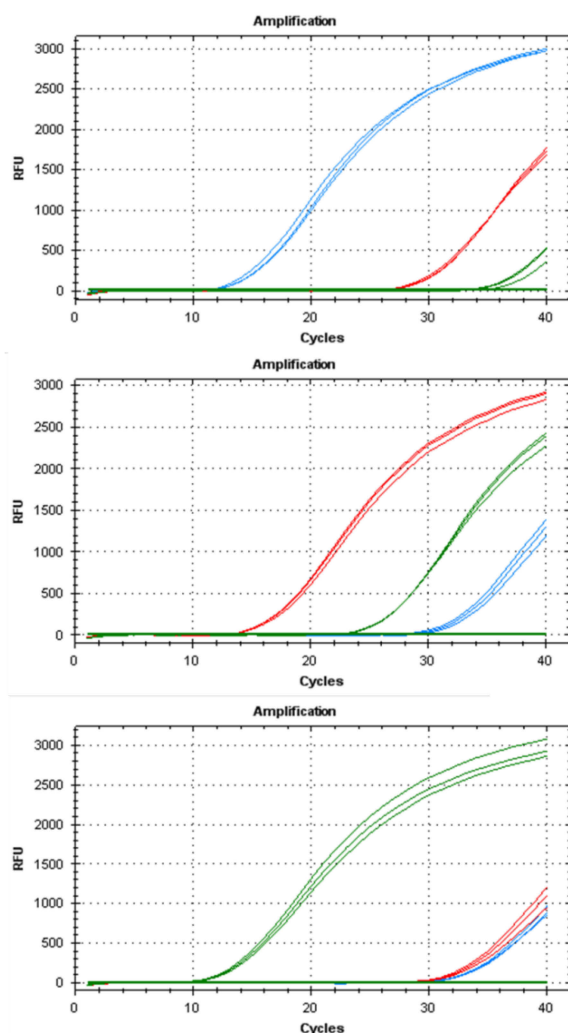


Figura 43. Gráficas de expresión de las diferentes parejas de cebadores; azul *JAT1* (H12F/H12R), rojo *JAT2* (H34F/H34R) y verde *JAT3* (H34F/H56R) en presencia del ADN sobre el que fueron diseñados respectivamente.

Las parejas de oligonucleótidos que se utilizaron fueron; H12F/H12R para los alelos 1 y 2 (*JAT1*), H34F/H34R para 3 y 4 (*JAT2*) y H34F/H56R para 5 y 6 (*JAT3*). La alta similitud de la secuencia obligó a utilizar un oligonucleótido común para *JAT2* y *JAT3*.

La Q-RT-PCR se puso a punto sobre plásmidos que poseían la secuencia de cada uno de los parálogos. Se calculó la eficiencia de cada una de las parejas sobre las secuencias *JAT* por separado en una reacción estándar. Los resultados se encontraban entre el 80-90% de eficiencia de los cebadores entre los distintos clones, lo cual no permitía diferenciar las muestras de ADN. Para aumentar la especificidad de los cebadores en el proceso se testaron diferentes temperaturas, concentración de oligonucleótidos y se adicionó la muestra con diferentes concentraciones de ADN de esperma de salmón. Consiguiendo finalmente discriminar con cada pareja el gen *JAT* para el que fueron específicamente diseñados (Fig.43).

El análisis de expresión se llevó a cabo sobre tres plantas diferentes de olivo adulto, de la variedad Picual, a partir de distintos tejidos: hoja, meristemo, raíz y tallo. La Q-RT-PCR se realizó en las condiciones discriminantes para los diferentes parálogos (Fig.44).

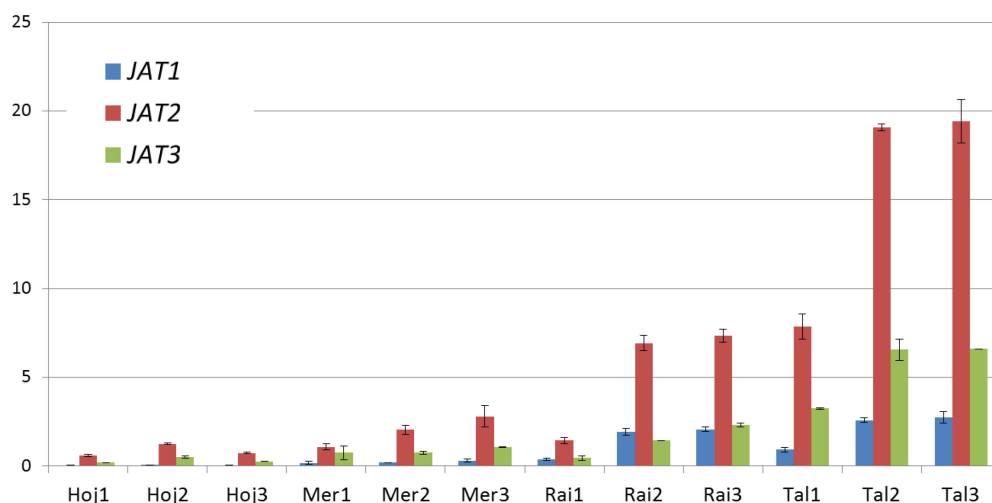


Figura 44. Gráficas de expresión a partir de ARNm en diferentes tejidos; meristemos (Mer), tallo (Tal), hojas (Hoj), y raíces (Rai), de tres árboles adultos de olivo Picual de los diferentes parálogos, identificados por colores (*JAT1*, *JAT2* y *JAT3*). Las unidades de expresión son aleatorias.

Como puede observarse, la expresión de los tres parálogos de *JAT* a nivel de ARNm es mayor en el tallo, seguido de la raíz, en los tres árboles analizados, siendo predominante la expresión de *JAT2* (*H34F/H34R*) sobre el resto. Aunque *a priori* los datos parezcan muy dispares, si analizamos la expresión en cada árbol (Fig.45-A) se puede observar que los patrones de expresión de los tres parálogos son proporcionales, obteniendo siempre mayor expresión *JAT2*.

Si por el contrario, analizamos la expresión de cada parálogo, para los distintos tejidos y para los distintos árboles (Fig.45-B), aun manteniendo patrones parecidos en los distintos tejidos, *JAT1* posee una expresión en raíces mayor que en el caso de los otros dos parálogos, tomando como referencia la expresión en el tallo.

Las muestras fueron normalizadas frente a un control interno de una actina de olivo (*Act40*) que se expresaba de forma constitutiva en todos los tejidos (García-López et al. Aceptado). Todas las reacciones de Q-RT-PCR se llevaron a cabo por triplicado para obtener una media representativa, las barras de error muestran la desviación estándar de las muestras.

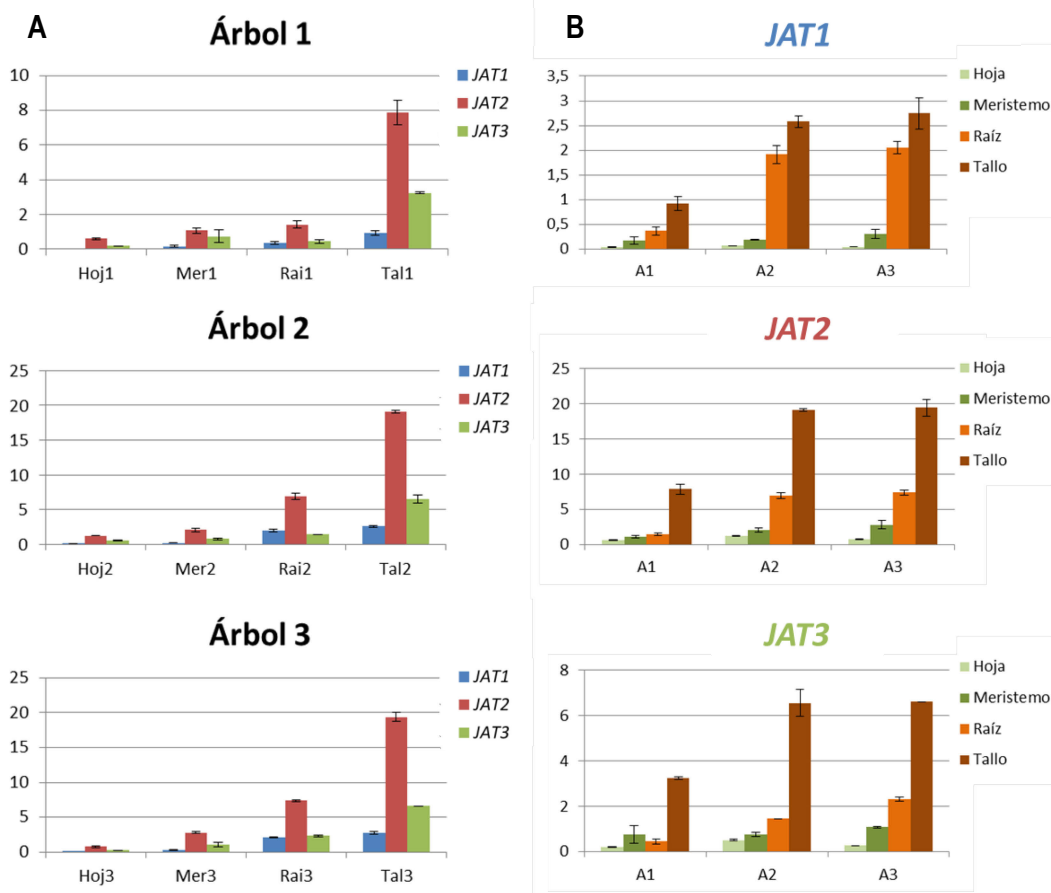


Figura 45. Gráficas de expresión a partir de ARNm en: **A**; diferentes tejidos, meristemos (Mer), tallo (Tal), hojas (Hoj), y raíces (Rai), de árboles adultos de olivo Picual (Árbol 1, 2 y 3) y **B**; niveles de expresión de los diferentes parálogos, identificados por colores (**JAT1**, **JAT2** y **JAT3**), en los tres árboles por separado (A1, A2 y A3). Las unidades de expresión son aleatorias.

Estudio de la expresión de la proteína JAT.

El siguiente paso en el estudio del gen *JAT* de *O. europaea* fue estudiar la expresión de la proteína traducida en los diferentes tejidos en los que hemos encontrado una expresión a nivel de transcritos. La aproximación escogida fue su detección inmunológica, para la cual fue necesario generar un anticuerpo específico frente a la proteína JAT. La obtención de anticuerpos específicos se llevó a cabo en conejo por la empresa Biomedal (Sevilla), usando un péptido inmunogénico de la proteína JAT.

Para la inmunodetección se realizaron extracciones de proteínas de diferentes tejidos de distintas partes del árbol, congelando las muestras directamente en nitrógeno líquido como se especifica en materiales y métodos (ver 9.1), a partir de plantas de vivero. La obtención de los homogenados y la extracción de proteínas se llevaron a cabo siempre en dos pasos consecutivos y en frío, para evitar en la medida de lo posible la degradación de la muestra. Las diferentes muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), cargando siempre la misma cantidad de proteína para conseguir separarlas por tamaño y detectarlas después por Western Blot mediante el anticuerpo frente a JAT.

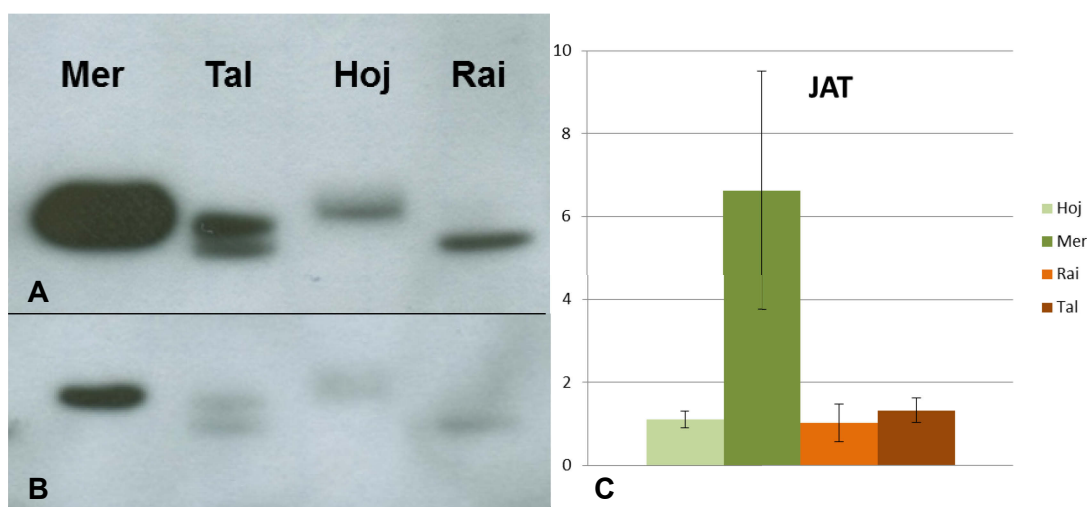


Figura 46. Detección de JAT mediante el anticuerpo específico en dos geles diferentes a concentraciones de 1/500 (A) y 1/1000 (B). Los distintos tejidos se especifican como; meristemo (Mer), tallo (Tal), hoja (Hoj) y raíz (Rai). C; datos de expresión de A y B realizados con el software de análisis de imagen para electroforesis GelAnalyzer® (GelAnalyzer.com, versión 2010a), en los que se representa el volumen de las bandas normalizados con el de expresión menor.

Los resultados revelan diferentes bandas, siempre alrededor del tamaño de 45 kDa, marcado por la ovoalbúmina de la escalera de pesos moleculares, y que aparecen en todos los tejidos (Fig.46). En el tallo el anticuerpo reconoce dos bandas bien diferenciadas de tamaño parecido, en hoja y meristemo, la banda proteica reconocida parece corresponderse con la banda superior y en el caso de la raíz, la inferior. Esta diferencia de tamaño podría deberse a la pérdida del posible péptido señal anteriormente comentado.

El análisis anterior de la proteína predecía un peso molecular de alrededor de 40 - 40,5 kDa a partir de su composición aminoacídica. Si suponemos el péptido señal predicho anteriormente y lo eliminamos, el peso molecular de la proteína resultaría en 37 – 37,5 kDa, el cual podría corresponderse con la doble banda encontrada en tallo.

Localización tisular.

Con el objetivo de poder identificar con más precisión la localización tisular de la proteína JAT, se llevó a cabo la inmunodetección con el anticuerpo frente a JAT a partir de secciones histológicas transversales de los distintos tejidos en plantas de vivero como se describe en materiales y métodos (ver 10.3). Tras el procesado y montaje de los cortes, su visualización mediante microscopía confocal reveló que la expresión de la proteína JAT es específica de algunos tipos celulares o estructuras dependiendo del tejido. Aunque de forma general aparece siempre relacionado con el sistema vascular y con tejidos de mantenimiento y protección, además de ser especialmente abundante en tejidos en crecimiento.

Hoja

En hoja se concentra fundamentalmente en los haces vasculares, de hecho se puede observar que aparece en su mayor parte en el floema y en las células parenquimáticas que lo acompañan (Fig.47). Suponiendo la naturaleza secretoria predicha en los análisis de secuencia, posiblemente se transporte vía floema desde las hojas a otros tejidos o a los meristemos, zonas en las que JAT es especialmente abundante. En menor cantidad aparece también en algunas de las células del parénquima xilemático.

También parece estar presente en la epidermis del haz y en la epidermis del envés, apareciendo en la pared celular externa de dichas células, bajo la cutícula superior. Junto a los haces vasculares se localiza en las paredes celulares del colénquima y en algunas esclereidas (cuya misión es de soporte) (Fig.47). En los tejidos asimiladores de la hoja, parénquima en empalizada y parénquima lagunar o esponjoso, la señal del fluoróforo unido a JAT parece corresponderse, por tamaño y posición, al núcleo celular.

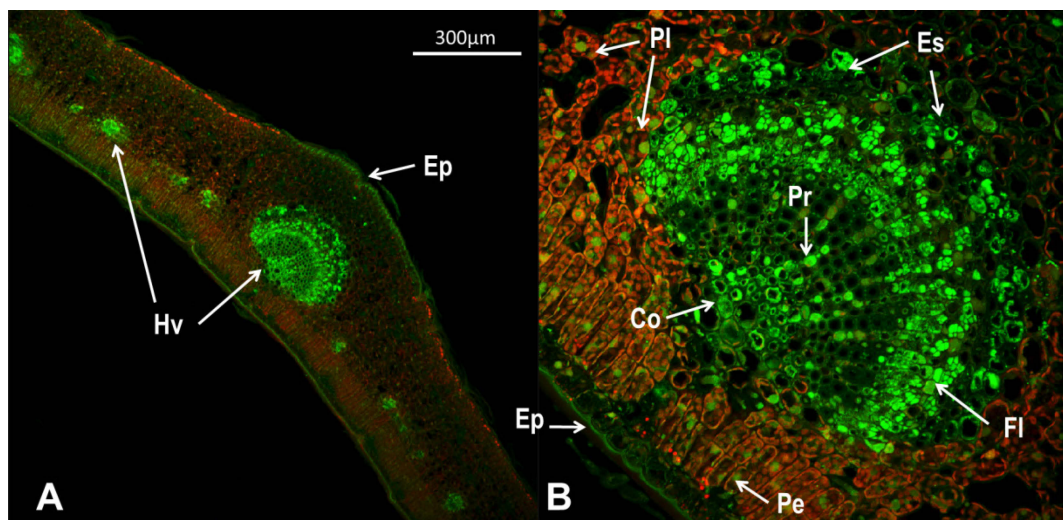


Figura 47. Detección de JAT a nivel de microscopía láser confocal en secciones transversales de hoja. En color rojo: autofluorescencia del tejido, en color verde: marcaje del fluoróforo. **A**, detalle de la zona central de la hoja 10X (Anticuerpo 1/250). **B**, detalle del haz vascular central de la hoja A 40X (Ac 1/250). Hv; haces vasculares, Ep; epidermis, Pl; parénquima lagunar o esponjoso, Es; esclereidas, Pr; parénquima radial xilemático, Co; colénquima, Fl; floema, Pe; parénquima en empalizada.

Tallo

En tallo, el tejido en el que se puede observar una mayor acumulación de JAT es en la epidermis (Fig.48-B), aunque aparece también asociado a los haces vasculares como en el caso de la hoja. A nivel de la epidermis la señal aparece en la pared celular de las células más externas, formando una señal continua, bajo la epidermis aparece en células suberificadas asociada a la pared celular de las mismas. En las células de parénquima cortical y colénquima inferiores la señal aparece de forma heterogénea, siendo en algunas de ellas muy intensa (Fig.48-C). En cuanto a los haces vasculares, la señal se localiza en una banda circular concéntrica que se corresponde con el floema (Fig.48-B), en el que parece tener una disposición radial, debido a la disposición de las células floemáticas y células acompañantes. En el xilema la señal aparece en los elementos acompañantes, que podría corresponderse con parénquima radial xilemático (Fig.48-A).

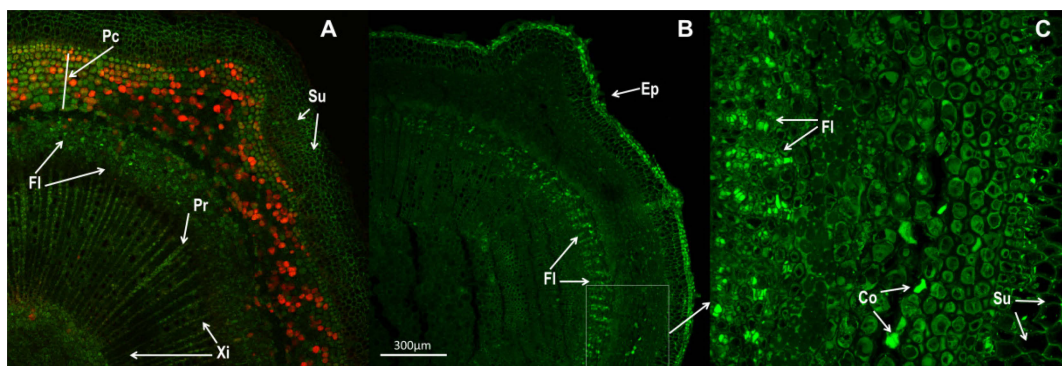


Figura 48. Detección de JAT a nivel de microscopía láser confocal en secciones transversales de tallo. En color rojo: autofluorescencia del tejido, en color verde: marcaje del fluoróforo. **A**, detalle del tallo 10X (Anticuerpo 1/1000). **B**, detalle del tallo 10X (Ac 1/250). **C**, detalle del tallo B, 40X. Pc; parénquima cortical, Fi; floema, Pr; parénquima radial xilemático, Xi; xilema Ep; epidermis, Co; colénquima, Su; súber. La zona recuadrada se corresponde con la imagen C.

Raíz

La localización de JAT en las raíces se encuentra de forma general en el córtex radicular, más concretamente, dentro de este tejido, se encuentra en el parénquima cortical a nivel de las paredes celulares, aunque el marcaje es heterogéneo. Suponiendo su naturaleza secretoria, posiblemente se lleve a cabo un transporte celular vía apoplasto en la zona del córtex radicular. En la zona central de la raíz o médula, donde JAT parece estar situado intracelularmente en las estructuras del sistema vascular, el transporte ocurre vía simplasto (Fig.49-B). Diferenciando las partes principales de la zona medular; parénquima medular central y sistema conductor, es en éste último donde se observa señal de la proteína JAT. Los haces vasculares en la raíz de olivo son continuos y se disponen de forma alterna, xilema y floema, formando una estructura estrellada de ocho puntas (Fig.49-A y B). La señal en las zonas vasculares se concentra en el floema, además la raíz también presenta señal asociada a la epidermis. Se puede observar acumulación de JAT en tejidos en crecimiento (Fig.49-C), como sería un ápice de una raíz secundaria, observándose mayoritariamente concentrado en la zona medular y en la zona apical del extremo de la raíz, que más adelante formará la cofia (Fig.49-C). En la zona de rotura de la raíz secundaria en crecimiento, parece aumentar la acumulación de la proteína en las paredes celulares del parénquima cortical cercano.

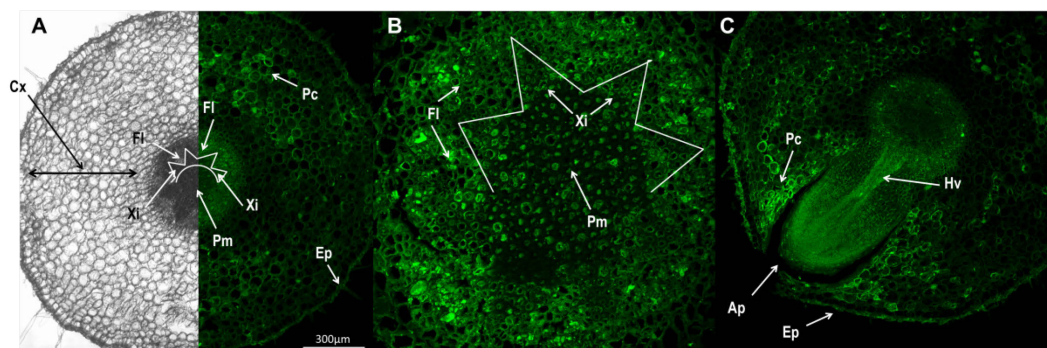


Figura 49. Detección de JAT a nivel de microscopía láser confocal en secciones transversales de raíz. En color verde: marcaje del fluoróforo. **A**, detalle de la raíz 10X, ½ imagen transmitida, ½ imagen confocal (Anticuerpo 1/1000). **B**, detalle de la zona central de la raíz A, 40X (Ac 1/1000). **C**, detalle de la raíz 10X con un corte longitudinal de un ápice radicular. Cx; córtex, Pc; parénquima cortical, Fl; floema, Xi; xilema, Ep; epidermis, Pm; parénquima medular, Hv; haces vasculares, Ap; ápice de la raíz.

Meristemo

Los meristemos son tejidos que se encuentran en continuo crecimiento y diferenciación, por lo que aun formando parte del extremo apical del tallo no se lignifican y poseen poca resistencia a su manipulación. Ello suponía una dificultad añadida a la hora de utilizarlos para el corte con criostato y en los diferentes pasos sucesivos en los que se divide la técnica (ver 10.3).

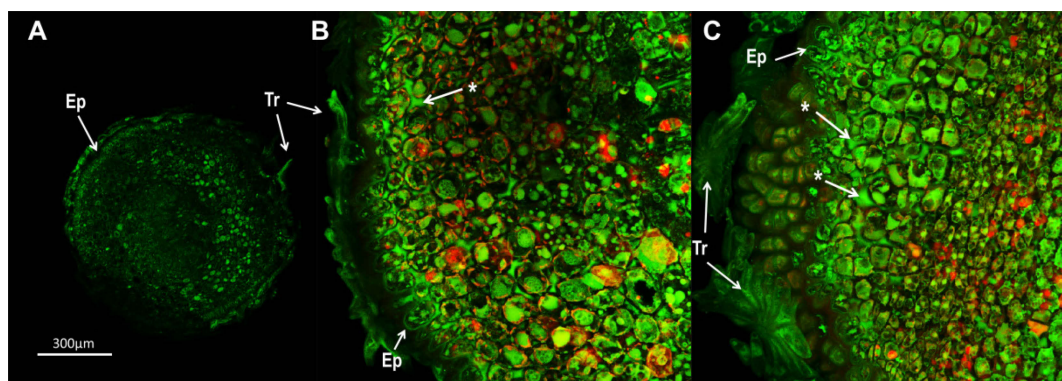


Figura 50. Detección de JAT a nivel de microscopía láser confocal en secciones transversales de meristemo. En color rojo: autofluorescencia del tejido, en color verde: marcaje del fluoróforo. **A**, detalle mer. apical 10X (Anticuerpo 1/250). **B**, detalle mer. apical 40X (Ac 1/1000) y **C** detalle mer. apical 40X (Ac 1/250. Ep; epidermis, Tr; tricoma, *, zonas con señal extracelular.

En este caso los cortes transversales muestran una localización generalizada de la expresión de JAT en la mayoría de células (Fig.50-A). Aunque parecen tener una disposición intracelular en orgánulos de distinto tamaño (Fig.50-B y C), al contrario que para el resto de tejidos, en los que en

su mayor parte JAT se asociaba a las paredes celulares. También aparece en las zonas más superficiales; en la epidermis y en las células inferiores a ésta, donde la señal sí se encuentra extracelularmente (Fig.50-B y C, marcadas con *). En los meristemos no es posible diferenciar los tipos celulares, ya que se encuentran en continuo desarrollo y diferenciación.

El gen *JAT* en *Arabidopsis*.

Las dificultades del estudio de árboles a lo largo del desarrollo de un mismo individuo han llevado a extrapolar este tipo de estudios a plantas modelo en la mayor parte de los casos.

Para comprobar la hipótesis del papel del gen en la transición, se utilizó el mutante *AtJAT*, un mutante para el gen ortólogo de *JAT* en *Arabidopsis* generado por la inserción de ADN-T, que en estudios previos había mostrado retraso en la transición a la etapa adulta.

Se analizó el crecimiento del mutante buscando alteraciones fenotípicas en su desarrollo, además de las ya descritas. Para este propósito se obtuvieron plántulas de la línea 951G12 que portaban el ADN-T insertado en la zona UTR 5' del gen *AtJAT* (*T-DNA::AtJAT*) desde una población GABI-Kat FST (Rosso et al. 2003). Se genotiparon plantas como se describe en los procedimientos experimentales y se utilizaron mutantes homocigotos y plantas salvajes para el estudio, crecidas en condiciones de fotoperiodo de día largo.

A pesar de que todas las semillas, mutantes y salvajes, germinaron al mismo tiempo, se observó un defecto en el

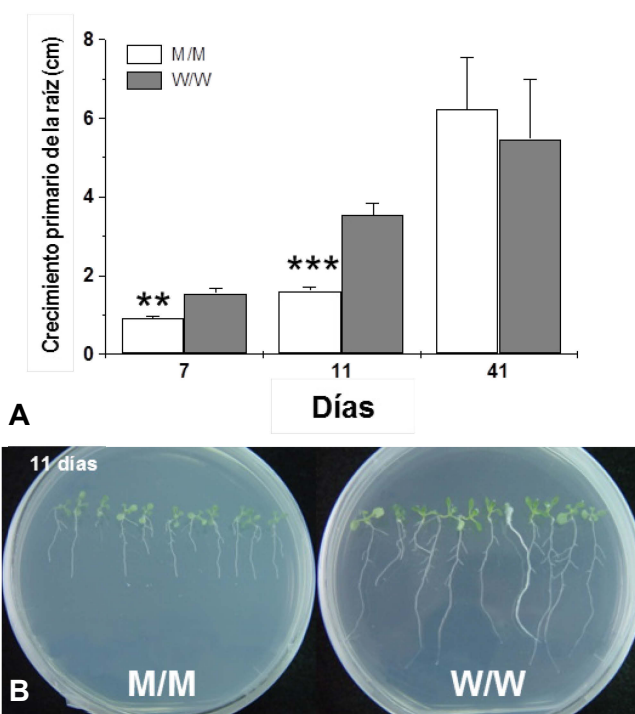


Figura 51. A; crecimiento de la raíz primaria en cm medido a 7, 11 y 41 días. **B;** imagen del crecimiento de las plantas *T-DNA::AtJAT* (M/M) frente a las plantas salvajes (W/W). ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

crecimiento primario de la raíz en las plantas *T-DNA::AtJAT*. Las raíces de las plantas mutantes presentaban un crecimiento más lento que las plantas salvajes en los primeros días aunque a punto final ambas alcanzaban la misma longitud (Fig.51).

También se observó que en las plantas mutantes, la roseta seguía creciendo tras la floración y producía un fenotipo con hojas más grandes que en las plantas salvajes (Fig.52). Estas hojas de la roseta, anormalmente de mayor superficie foliar, son un fenotipo general de *Arabidopsis* que sucede cuando ocurre un retraso de algún tipo en la floración, como puede ser su exposición a fotoperiodo de día corto o mutaciones en genes requeridos para la floración aún bajo condiciones de fotoperiodo de día largo (Coupland 1995).

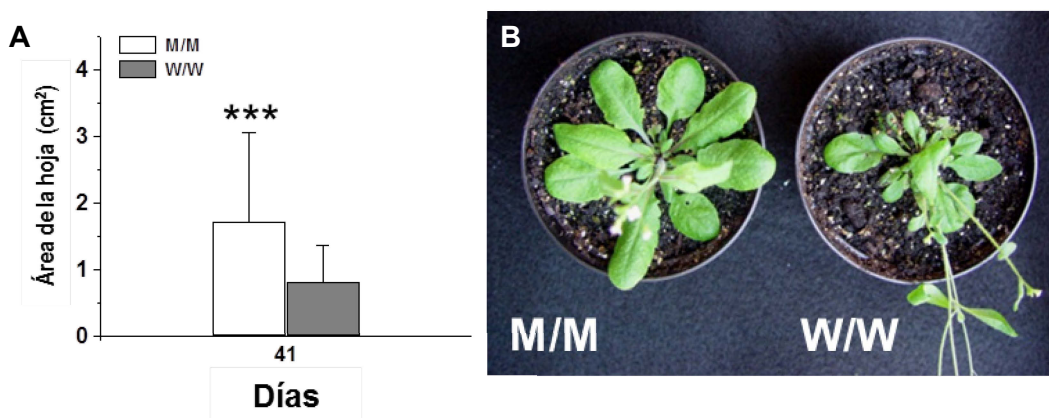


Figura 52. A; superficie de las hojas de la roseta al final de la fase reproductiva (41 días). **B;** imagen de la roseta de las plantas *T-DNA::AtJAT* (M/M) frente a las plantas salvajes (W/W). *** $p < 0,001$.

El mayor tamaño de las hojas junto con el retraso en el crecimiento de las raíces en las primeras fases apoyan la hipótesis que se sugiere de la implicación total o parcial del gen JAT en la transición a la etapa adulta y se corresponden con los datos de retraso en el crecimiento del tallo y el menor número de flores y silicuas descrito en estos mutantes (Fernández-Ocaña et al. 2010). Además, las plantas adultas *T-DNA::AtJAT* mantienen rasgos juveniles aun cuando los caracteres adultos han aparecido.

A pesar de las grandes diferencias entre el olivo y *Arabidopsis*, los resultados con plantas transgénicas *T-DNA::AtJAT* de *Arabidopsis* confirman el papel del gen JAT en la transición de fase juvenil a adulto, aunque su función exacta en el proceso es todavía desconocida.

DISCUSIÓN

El desarrollo es un proceso complejo en plantas que requiere la participación ordenada tanto de factores externos como internos que determinen la identidad de la célula. Durante el desarrollo, en el caso de los árboles frutales, la existencia de un periodo juvenil improductivo se traduce en un retraso en el tiempo de la producción y las consecuentes pérdidas económicas. Un amplio conocimiento del control genético del periodo juvenil y su transición al estado adulto es una buena aproximación para afrontar esta problemática.

En este capítulo, se ha avanzado en el conocimiento de uno de los genes implicados, que parece tener un papel relevante para que la transición juvenil a adulto no ocurra con retraso en el olivo, el gen *JUVENIL TO ADULT TRANSITION (JAT)*.

Análisis de secuencias.

Los estudios de la secuencia del gen *JAT* en el olivo, que comenzaron con la búsqueda de su secuencia genómica, revelaron la existencia de un “cluster” de genes parálogos, *JAT1*, *JAT2* y *JAT3*, con dos alelos cada uno, que presentaban gran parecido en sus secuencias nucleotídicas y en sus secuencias peptídicas traducidas. El análisis de las secuencias reveló que los tres genes tienen una estructura de 5 exones y 4 intrones (Fig.36), además de obtenerse las secuencias de sus extremos flanqueantes 5' y 3', hasta conseguir una secuencia genómica total de cada uno que oscila entre los 2.978 pb (alelo 1 de *JAT3*) a los 3.426 pb (alelo 1 de *JAT2*) (Tabla 8). Los alineamientos de la secuencia de *JAT* con los parálogos revelaban que los cambios en la secuencia son puntuales y habrían pasado como polimorfismos o fallos en el proceso de secuenciación en los análisis anteriores, ya que las mayores diferencias se encuentran en los intrones. La secuencia del ADNc anteriormente descrita del gen *JAT* posee fragmentos de los distintos parálogos; los exones 1, 2 y 4 parecen coincidir con *JAT1* y los exones 3 y 5 con *JAT2*.

Los péptidos traducidos de los seis alelos coincidían en longitud por parejas y los pequeños cambios observados (Tabla 9) (Fig.37) eran debidos a cambios puntuales en la secuencia de nucleótidos, de hecho, los diversos análisis estructurales de los péptidos coincidían en los resultados. El estudio del perfil de hidrofobicidad revelaba dos posibles zonas asociadas a la membrana, la primera de ellas identificada como un péptido señal de 26 residuos por las herramientas de búsqueda de péptidos señal y la segunda un posible dominio transmembrana

(Fig.38-A). La existencia de un dominio transmembrana interno apoyaría nuestra hipótesis que apunta a JAT como una proteína asociada a una ruta secretoria, aunque no todas las herramientas utilizadas predecían este segundo dominio. Aunque su función es todavía incierta, los análisis de dominios conservados catalogan a JAT como una enzima fosforilasa, proponiendo un potencial sitio de unión a nucleótidos, aunque esta homología parece perderse en la zona central del péptido (Fig.38-B). Su localización celular a partir del análisis de su secuencia es incierta, aunque una situación asociada a la membrana celular o a la membrana de algunos orgánulos celulares parece probable.

El análisis filogenético reveló una serie de ortólogos en otras especies de plantas, entre las que destacaban por la gran similitud de sus secuencias; *V. vinífera*, *P. trichocarpa*, *A. thaliana*, *G. max* y *R. communis* (Tabla 10), además de algunos péptidos en monocotiledóneas, posiblemente codificados por ortólogos de *JAT*. En algunas de estas especies también aparecían parálogos, hasta tres representantes en *V. vinífera* y *R. communis*, como en el caso del olivo, aunque ninguno de ellos presentaba función o actividad asociada. Los ortólogos presentaban una gran semejanza en sus secuencias peptídicas (Fig.40) y poseían la misma estructura genómica interna en exones e intrones, excepto en *R. communis*, que falta el exón 3 (Fig.41). La presencia de posibles ortólogos en plantas diferentes podría ser indicativa de que la función de la proteína fuese de especial importancia en el desarrollo de la planta.

Análisis de expresión.

El gen *JAT* fue identificado en el estudio de genotecas substractivas, de tejidos juveniles y adultos, de entre otros 72 genes seleccionados, como un buen candidato de estar relacionado con la transición juvenil a adulto, debido a la reducción de expresión que mostraba a nivel del ARNm en tejidos adultos (Fernández-Ocaña et al. 2010). Además, esta diferencia en la expresión entre los tejidos juveniles y adultos de la misma planta se mantenía en plantas de dos meses de edad procedentes de semilla (Fig.42-A). Los estudios de la expresión en diferentes tejidos en las plantas procedentes de semilla han revelado que los altos niveles de ARNm proceden en su mayor parte de la raíz (Fig.42-B). El estudio de la expresión del “cluster” de parálogos *JAT* en olivos adultos, con oligonucleótidos discriminantes para diferenciar entre *JAT1*, *JAT2* y *JAT3*, mostró de forma general que es *JAT2* el que posee mayores niveles de ARNm en todos los tejidos estudiados

(hoja, meristemo, raíz y tallo) y que el tallo es el que posee más expresión de los tres parálogos, seguido siempre de la raíz, el meristemo y la hoja en ese orden (Fig.45) para los tres árboles estudiados. Hemos encontrado también diferencias en la localización tisular dependiendo de la edad de la planta, así entre las plantas juveniles procedentes de semilla y las plantas adultas, se vio que en las primeras la expresión más elevada se encuentra localizada en las raíces y en las segundas la expresión se concentra en el tallo. Esto podría tomarse como una diferencia desde un punto de vista histológico y estructural, ya que son tejidos distintos con funciones estructurales diferentes.

El análisis de la acumulación de la proteína JAT se realizó con un anticuerpo específico para los tres parálogos, debido a la gran semejanza de las secuencias peptídicas de éstos, y se llevó a cabo en tejidos de plantas adultas, al igual que para los análisis de expresión a nivel de ARNm. La proteína se encontraba en mayor cantidad en meristemos, disminuyendo su expresión considerablemente en tallo, raíz y hoja (Fig.46). En los análisis de Western Blot se detectaron dos bandas de proteína bien diferenciadas en el caso del tallo, de forma que el meristemo y la hoja parecían presentar la banda superior y la raíz la inferior (Fig.46-AyB). Los análisis del tamaño de la proteína indican que la doble banda podía ser debida a la diferencia de tamaño provocada por la presencia o no del péptido señal. La presencia de una mayor cantidad de proteína en los meristemos, relacionada con una expresión de ARNm mayoritariamente localizada en el tallo de la zona apical de las ramas, podría indicar que ocurre un transporte de la proteína hacia las zonas apicales en crecimiento.

Localización tisular.

Para intentar esclarecer la hipótesis anterior se estudió la localización de una forma más específica en cada uno de los tejidos mediante inmunohistoquímica. El análisis de los diferentes tejidos muestra que JAT parece no ser específica de algunos tipos celulares o estructuras intracelulares, aunque en la mayoría de los casos aparece asociada al sistema vascular y de soporte y protección de la planta.

En hojas se cumple la localización general citada anteriormente y la señal más intensa se observa en los haces vasculares y en la epidermis (Fig. 47-A). En los haces vasculares la proteína aparece asociada en su mayor parte al floema y dentro de éste en las células parenquimáticas

acompañantes, en las que la señal parece estar muy compartimentalizada (Fig.47-B). También se observa señal en el parénquima radial del xilema, en el colénquima y en las esclereidas. La señal es diferente dependiendo de los tipos celulares, en el caso del parénquima que acompaña a floema y xilema, la señal parece ser citoplasmática o intracelular mientras que en el floema, el colénquima y las esclereidas la señal parece estar asociada a la membrana o a la pared celular (Fig.47-B). Lo mismo ocurre con las células de la epidermis, en las que la señal pertenece a la pared celular externa, justo bajo la cutícula de la hoja. En el parénquima en empalizada y el esponjoso, tejidos asimiladores de la hoja, la señal es más tenue que en los casos anteriores y parece localizarse, por su situación centrada y su tamaño, asociada a los núcleos celulares. El hecho de no encontrar la señal de la proteína en las células de transporte, xilema y floema, no apoya la hipótesis de una proteína relacionada con una ruta secretoria, pero tampoco puede contradecirla, pues son células con una morfología tubular que aparecerían vacías en los cortes histológicos.

La señal más intensa de la proteína en el tallo se encuentra en la epidermis, dónde aparece formando una banda continua, posiblemente ligada a la pared celular (Fig.48-B). Bajo la epidermis, aparece señal en las paredes celulares del súber, un tejido de paredes celulares delgadas e irregulares, formado por varias filas de células (3 filas en Fig.48-B y 8-10 filas en 48-A, posiblemente porque el tallo A pertenezca a una zona inferior más suberificada y que ya ha perdido la epidermis). En la zona del parénquima cortical la señal es heterogénea y aparece irregularmente distribuida (Fig.48-A), o intensa en el interior de algunas células aisladas (Fig. 48-B y C), que podría corresponderse a células de colénquima, aunque en general la señal es más débil que en la epidermis. En el tallo la señal aparece ligada también a los haces vasculares, en las células radiales acompañantes del xilema (Fig.48-A) y en las células acompañantes del floema (Fig.48-B), apareciendo distribuida en compartimentos o pequeñas células (Fig.48-C) como en el caso de la hoja.

Dividiendo a la raíz en sus zonas principales, del exterior al interior, en; epidermis, parénquima cortical y médula, la señalización de JAT en las raíces podemos resumirla en irregular y heterogénea. Aparece señal en la epidermis (Fig.49-A y C) del mismo modo que lo hacía en la hoja y en el tallo. El parénquima cortical posee en general la señal asociada a las paredes celulares, aunque aparecen algunas células aisladas con señal intracelular y una elevada

expresión en el parénquima cortical que se encuentra junto a zonas de rotura o daño celular, como en el caso de la salida de una raíz secundaria (Fig.49-C). La zona central de la raíz o médula se divide en una estructura central formada por parénquima medular y los haces vasculares se disponen alrededor de forma alterna con una distribución estrellada, xilema hacia el interior y floema hacia el exterior (Fig.49-B). En esta estructura central la señal de JAT aparece en la zona alternada exterior, asociada al floema, siendo la señal más intensa en las paredes de algunas células o intracelularmente en otras. Cabe destacar la acumulación de JAT encontrada en tejidos en crecimiento (Fig.49-C), en los que la señal se encuentra muy marcada en la zona medular y en el ápice de la raíz secundaria.

El hecho de que la señal de la proteína aparezca extracelularmente en la zona cortical e intracelularmente en células de la médula podría ser debido a un transporte de la misma vía apoplasto en el córtex, el cual cambia al interior celular para atravesar la banda de Caspar y se mantiene vía simplasto en la zona medular, todo ello atendiendo a la hipótesis de una proteína involucrada en una vía secretoria.

En los meristemos la señal de JAT aparece de una forma homogénea en la mayoría de los tipos celulares, entre los que no podemos distinguir estructuras o tejidos diferenciados (Fig 50-A). Podemos destacar una localización diferenciada entre las zonas más superficiales y externas del meristemo y las zonas más internas. En la zona central del meristemo, JAT parece distribuirse de una forma intracelular, asociado a estructuras citoplasmáticas, aunque no se puede especificar a qué orgánulos se asocia, pues los tamaños y la morfología de los mismos es heterogénea. Por el contrario, en las primeras filas de células superficiales, aunque se observan señales intracelulares, la señal de JAT parece localizarse más intensa extracelularmente (Fig.50-B y C). En algunas de las células en las que JAT se encuentra intracelularmente, parece co-localizar con la señal de autofluorescencia debida a los tejidos asimiladores, aunque no es una señal mantenida, por lo que podría ser un artefacto de la reconstrucción por capas superpuestas de las imágenes con el microscopio confocal. La señal, aunque menos intensa, aparece en algunos tricomas (Fig.50)

En los distintos meristemos analizados se observa un gradiente en la localización de JAT que va desde la aparición de la proteína asociada a floema en aquellos con una estructura más semejante al tallo (más lejanos de la parte apical), a la detección en la mayor parte de los tipos celulares del meristemo en las zonas más apicales y menos diferenciadas.

La aparición de una mayor cantidad de proteína JAT en los meristemas coincide con los datos de expresión por Western Blot, en los que la cantidad de proteína en los meristemas estaba seis veces por encima que en el resto de tejidos (Fig.46-C). Sin embargo, los niveles de ARNm son mayores en el tallo, lo que se podría explicar por un transporte vía haces vasculares, hasta las zonas en crecimiento como los meristemas. Algo similar puede estar ocurriendo en las raíces, donde se aprecia una gran acumulación de JAT en los ápices radiculares.

El gen *JAT* en *Arabidopsis*.

La acumulación de JAT en los ápices radiculares sugiere una función importante en esa zona de crecimiento de la raíz. Para determinar si se requiere JAT para el crecimiento normal de las raíces se estudió el mutante *T-DNA::AtJAT* Line 951G12 de *Arabidopsis*, el cual mostró un retraso significativo en el crecimiento de las raíces durante los primeros días del desarrollo tras la germinación (7 y 11 días) (Fig.51), aunque a tiempo final (41 días), no había diferencias significativas en la longitud de las mismas. Esto sugiere que efectivamente JAT tiene una función que se requiere para el crecimiento inicial en los ápices de las raíces, aunque finalmente la elongación de la raíz parece ser normal. Además, se observó que las hojas de la roseta seguían creciendo tras la floración (Fig.52-B), aumentando significativamente su superficie foliar (Fig.52-A). Este aumento de tamaño anormal en la superficie de las hojas de la roseta se ha descrito que ocurre cuando existe algún tipo de retraso en la floración, como aquel que ocurre bajo condiciones de fotoperiodo de día corto, o la existencia de mutaciones en genes requeridos para la floración (Coupland 1995). Ambos hechos apoyan la hipótesis del papel del gen *JAT* en la transición a la etapa adulta y se corresponden con los datos publicados de estos mutantes en cuanto a retraso en el crecimiento del tallo y en el número de flores y silicuas descrito por Fernández-Ocaña et al. 2010. Además, la localización tisular de la proteína en el olivo demuestra que hay una elevada expresión en tejidos o estructuras en crecimiento, por lo que ambos resultados se respaldan en su papel en el desarrollo.

Capítulo II:

Genes de la raíz.

TRANSICIÓN, RAÍCES Y GENES.

La transición de juvenil a adulto en plantas leñosas está más relacionada con la adquisición de cierto tamaño que con la edad (Hackett 1985), este cambio de fase ocurre cuando las ramas apicales y laterales alcanzan una distancia suficiente a las raíces (Robinson y Wareing 1969, Zimmerman 1971). Así, en árboles procedentes de semillas las partes inferiores y cercanas al tallo permanecen juveniles mientras que las ramas superiores y exteriores de la copa pasan a la siguiente fase del desarrollo y se comportan como adultas, formando lo que se conoce como un **cono de juvenilidad** (Hartmann et al. 2002). Como consecuencia la longitud del periodo juvenil en leñosas es muy amplio, llegando en el caso del olivo hasta los 15 años (Bellini 1990). El desarrollo de nuevos métodos de crecimiento forzado ha conseguido acortar este periodo juvenil, hasta lograr una primera floración tres o cuatro años tras la germinación de la semilla (Lavee et al. 1996, Santos-Antunes et al. 2005), sin embargo se han observado diferencias significativas entre la descendencia de distintas variedades (Bellini 1993, De la Rosa et al. 2006, Muñoz-Mérida et al. 2013) indicando una alta variabilidad para este carácter. De hecho, los cruces entre distintas variedades, a menudo producen segregantes mutantes en la transición juvenil a adulto, que se encuentra alterada en algún punto del proceso mostrando distintas características (Fernández-Ocaña et al. 2010). Comprender a nivel genético los cambios que tienen lugar en la transición de olivos normales es relevante para los mejoradores, con el objetivo de acortar el periodo juvenil no productivo.

La importancia en este proceso de la distancia a las raíces se ha puesto de manifiesto en algunos trabajos (Hartmann et al. 2002, Moreno-Alías et al. 2010a) y normalmente se mide mediante un número de divisiones celulares, que en plantas está relacionado con el número de nudos. En el olivo se ha constatado que la distancia media mínima desde la raíz a los meristemos es de 200 cm (Moreno-Alías et al. 2010a). Además, se sabe que los cambios genéticos responsables de la transición ocurren mucho antes de que puedan observarse los cambios morfológicos característicos de la fase adulta, como es la floración. Estudios más recientes datan estos cambios en el perfil de expresión génica de los meristemos durante los meses 12 a 15 tras la germinación, acotando alrededor de los 45 el número de nudos necesario. Estos cambios en los perfiles de expresión ocurrirían en los meristemos muchos meses antes de que se observe la

primera floración, probablemente debido a que una vez que la transición de fase se pone en marcha, se necesita bastante tiempo para generar las nuevas estructuras adultas y alcanzar la competencia reproductiva (García-López et al. Aceptado).

En herbáceas, los estudios indican que la señal o señales implicadas en la transición provienen principalmente de las hojas, y que la raíz y los cotiledones parecen no estar implicados en el proceso (Yang et al. 2011).

Sin embargo, este modelo no es directamente extrapolable a leñosas, de hecho el cono de juvenilidad sigue existiendo incluso en árboles centenarios, por lo que la distancia a las raíces sigue siendo un factor clave para que se produzca la transición de fase juvenil a adulto en leñosas. Se ha observado una gran variabilidad en la duración de los cambios de fase que ocurren en diferentes árboles, incluso dentro de la misma especie. De este modo en el género *acacia*, por ejemplo, la transición juvenil a adulto puede ocurrir en un solo nudo de distancia a las raíces (*A. confusa*), mientras que en otros casos se requieren distancias mayores, como el caso de *A. koa*, donde pueden ser necesarios hasta 30 nudos. No es la primera vez que se relaciona la expresión génica en las raíces con aquello que ocurre en los meristemos apicales, como en el caso de *XAL1*, un gen MADS-box emparentado con *AGAMOUS* (*AG*) que parece ser un importante regulador del desarrollo de la raíz y que a su vez induce genes relacionados con la floración como *SOC*, *FT* y *LFY* en *Arabidopsis* (Tapia-López et al. 2008). Un enfoque de estos hechos sería estudiar la transición juvenil a adulto en árboles y su posible relación con las raíces, con la búsqueda del gen o genes implicados en el proceso.

Para explicar cómo se determina por parte de la planta la distancia a las raíces para que se produzca la transición de fase, se puede postular la existencia de una señal raíz-meristemo apical que forme un gradiente de concentración que disminuya al alejarse de la raíz y que ejerza un control sobre el desarrollo de la planta. Por ejemplo, en *Arabidopsis* se ha descrito en el mutante *bypass1* (*bps1*) una señal móvil sintetizada por la raíz que es capaz de inducir un retraso en el crecimiento de los meristemos y que requiere de un crecimiento activo de la raíz para ser sintetizado, postulándose una unión directa del crecimiento de la planta con las condiciones del suelo (Van Norman y Murphy 2011).

Por estas razones, en este capítulo se realizó un análisis transcripcional de la expresión génica en raíces juveniles y adultas, así como la identificación de genes específicos de la raíz, entre los cuales cabría esperar que se encuentren los genes potencialmente implicados en la generación del gradiente y por lo tanto, en la transición juvenil a adulto en el olivo. Este estudio se llevó a cabo mediante una hibridación con un microarray de olivo generado por nuestro grupo de investigación (García-López et al. Aceptado), que incluía un total de 40,000 genes, procedentes de una gran cantidad de muestras de olivo de distintos tejidos (publicados en chirimoyo.ac.uma.es/oleagen y (Muñoz-Mérida et al. 2013)).

RESULTADOS.

Análisis transcripcional en raíces juveniles y adultas.

Para proporcionar una visión más completa de los cambios genéticos producidos en la raíz en la transición juvenil a adulto, se cultivaron plantas de olivo segregantes de un cruce “Picual x Arbequina” y se seleccionaron 9 de ellas de dos meses de edad con patrones de crecimiento normales y muy similares entre sí para evitar un posible sesgo en los resultados, causados por diferencias en el crecimiento. Tras la extracción del ARN de las raíces, se agruparon las muestras de tres en tres, con el objetivo de minimizar las posibles diferencias genotípicas resultado de la segregación, obteniendo tres réplicas biológicas independientes de raíces juveniles.

Para generar una situación genéticamente cercana y comparable a las raíces juveniles, se utilizaron plantas adultas que procedían de la propagación vegetativa de árboles de la variedad Picual y de la variedad Arbequina cultivadas durante 6-8 meses en condiciones similares de vivero que las juveniles. Se usaron tres plantas adultas de cada variedad, que se agruparon en tres réplicas biológicas independientes conteniendo igual cantidad de ARN de cada variedad. Las tres muestras finales de raíces adultas junto con las tres de ARN de raíces juveniles se usaron para la hibridación del microarray. Las diferencias encontradas entre raíces juveniles y raíces adultas fueron muy numerosas, por lo que se utilizaron diversos filtros, estadísticos y niveles de cambio (veces de cambio), seleccionando un nivel final del 95% de confianza y “fold change” (FC) de 8. El filtrado se correspondía con 253 unigenes (transcritos) diferencialmente expresados entre las raíces juveniles y las adultas (Fig.53).

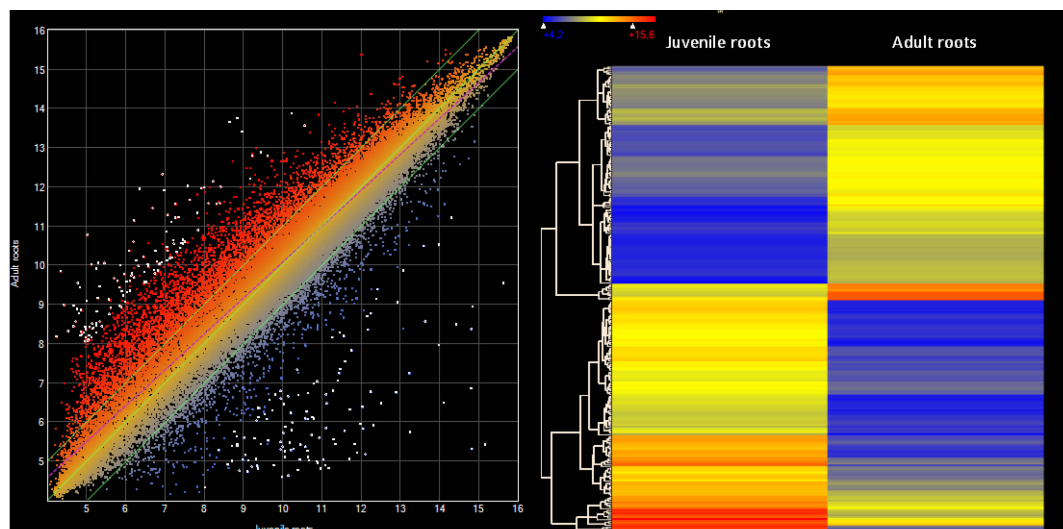
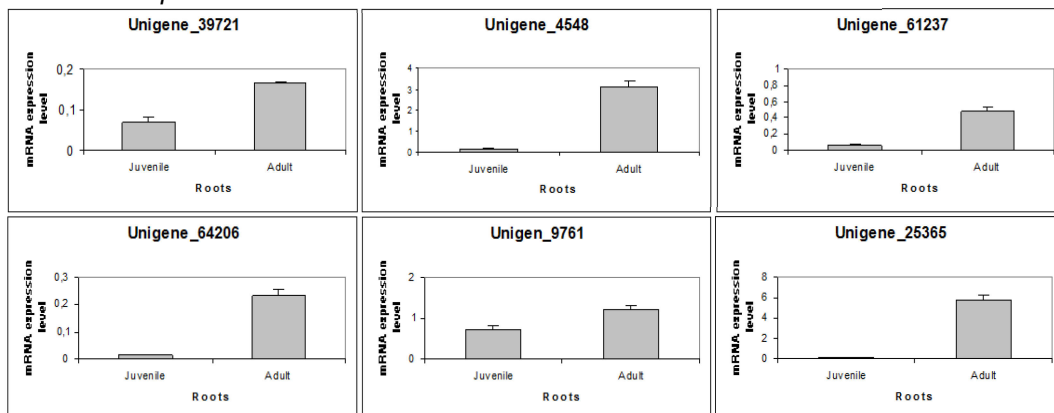


Figura 53. Unigenes diferencialmente expresados entre raíces juveniles y raíces adultas con un 95% de confianza y un FC de 8.

De estos 253 transcritos que mostraban marcadas diferencias en la expresión, 126 estaban sobre-expresados en raíces adultas y 127 en raíces juveniles. Para confirmar estos datos transcriptómicos obtenidos mediante la hibridación del microarray, se analizaron 12 unigenes al azar por Q-RT-PCR, 6 cuya expresión era mayor en raíces adultas y 6 que se expresaban más en juveniles (Fig.54).

Para este propósito se utilizaron una réplica de las raíces juveniles y una de las adultas, corroborando en todos los casos que los niveles de ARNm encontrados correspondientes a los unigenes estaban expresados diferencialmente, coincidiendo con los datos de la hibridación del microarray en 11 de los 12 unigenes analizados.

A. Sobre-expresados en raíces adultas.



B. Sobre-expresados en raíces juveniles.

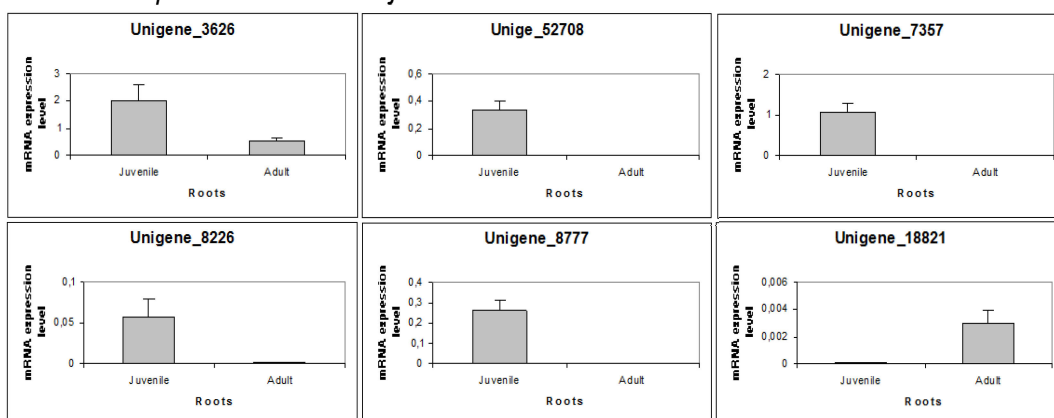


Figura 54. Confirmación por Q-RT-PCR de los unigenes sobre-expresados del microarray de los adultos (A) y de los juveniles (B).

La anotación de los genes expresados diferencialmente se realizó mediante su comparación con las bases de datos públicas (Uniprot-annotated sequences, preferiblemente con aquellas pertenecientes a *Viridiplantae*), mediante el uso de la herramienta pública Sma3s (Muñoz-Mérida et al. Aceptado). Los datos de las anotaciones obtenidas fueron filtrados usando sólo los términos GO (Gene Ontology - geneontology.org), analizados posteriormente para la ontología de Procesos Biológicos con la herramienta Blast2Go (Conesa et al. 2005).

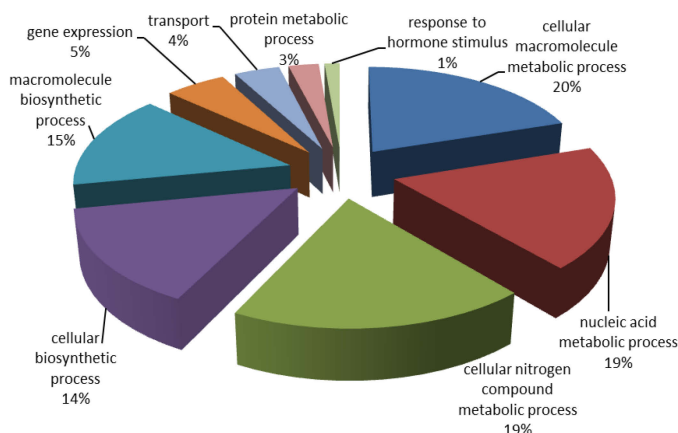


Figura 55. Gráfico circular seccionado con los términos GO de los genes sobre-expresados en raíces adultas obtenido del análisis a nivel 4 de la ontología de Procesos Biológicos propuesta por Gene Ontology.

total, más del 60% de los procesos biológicos totales para los que anotaban. El segundo proceso más representado era la biosíntesis celular (14%) y de macromoléculas (15%), que abarcaban un 29% del total. El 10% restante lo componían procesos de expresión génica, transporte y respuesta a estímulos hormonales (Fig. 55).

El análisis de los genes que se sobre-expresan diferencialmente en raíces juveniles para los Procesos Biológicos, resultó en una mayor variedad de procesos metabólicos que en el caso de

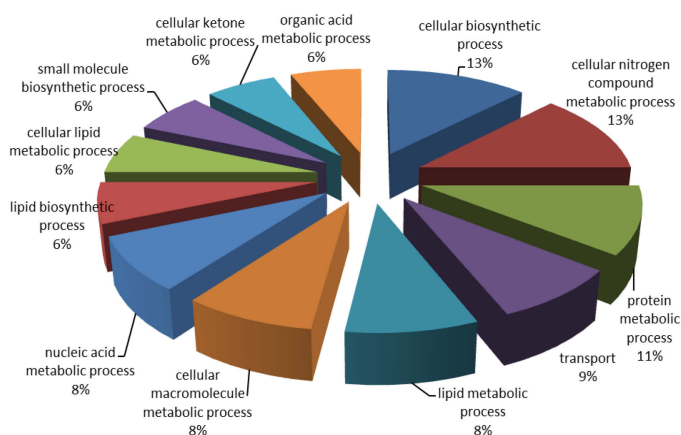


Figura 56. Gráfico circular seccionado con los términos GO de los genes sobre-expresados en raíces juveniles obtenido del análisis a nivel 4 de la ontología de Procesos Biológicos propuesta por Gene Ontology.

Entre los genes sobre-expresados en raíces adultas se observaba que la mayoría estaban implicados en procesos metabólicos celulares a distintos niveles, entre los que destacan; metabolismo de macromoléculas (20%), de ácidos nucleicos (19%) y de compuestos nitrogenados (19%), comprendiendo en

las raíces adultas, aunque también eran los más representados, alcanzando un 66% del total de los procesos anotados. Los procesos metabólicos principales anteriores disminuían su representación a la mitad (del 58 al 29%), excepto el metabolismo de proteínas, que aumentaba más de tres veces (del 3 al 11%). Los

procesos metabólicos nuevos estaban relacionados con el metabolismo de lípidos (14%), de las cetonas (6%) y de ácidos orgánicos (6%). Los procesos de biosíntesis, que en adultos representaban el 29%, en los juveniles se corresponden con el 25% del total, apareciendo la biosíntesis de lípidos (6%) y de pequeñas moléculas (6%). El 9% restante correspondía a transporte (Fig.56).

La comparación mediante un gráfico de barras pone de relieve muy claramente esta distribución más homogénea de los procesos biológicos en las raíces juveniles y un sesgo en las adultas hacia los 5 más comunes; metabolismo de macromoléculas, ácidos nucleicos, nitrógeno y biosíntesis de macromoléculas y componentes celulares (Fig.57)

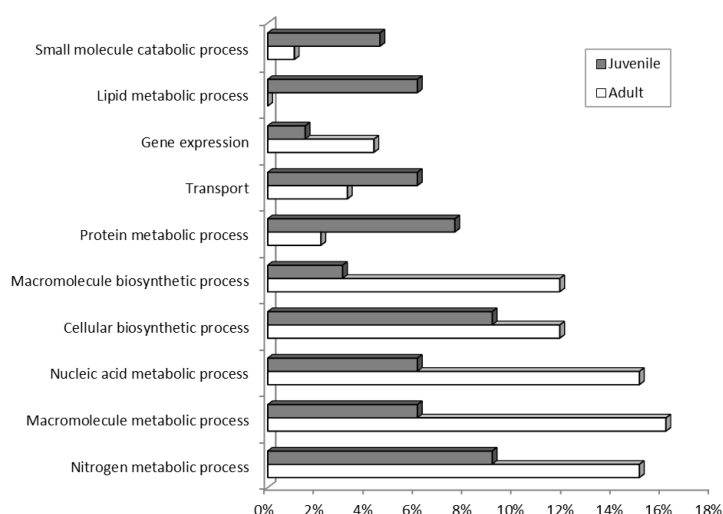
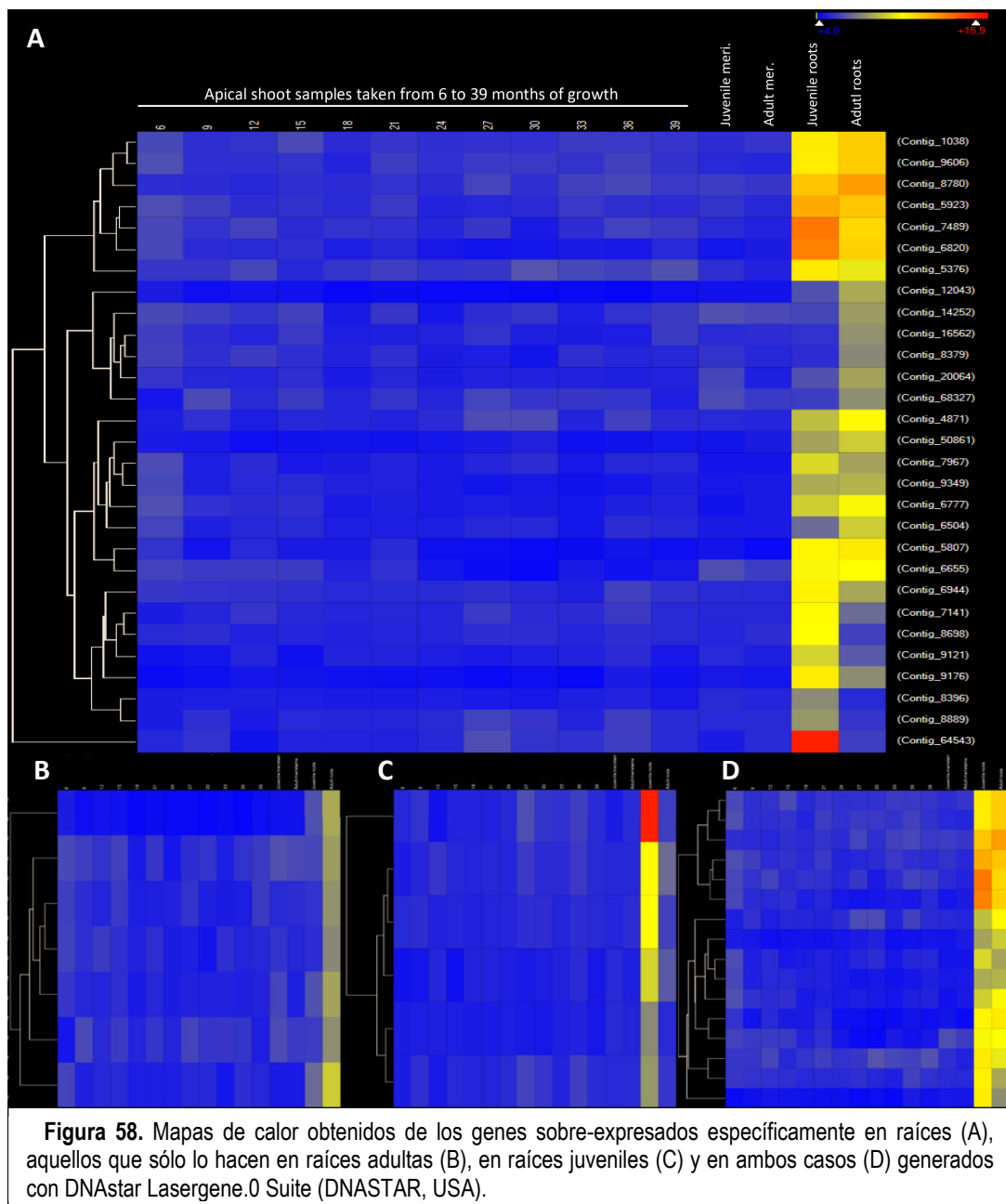


Figura 57. Gráfico de barras con los términos GO de los genes sobre-expresados en raíces juveniles (gris) y los sobre-expresados en adultas (blanco), obtenidos del análisis de términos GO a un nivel 4 de la ontología de Procesos Biológicos de Gene Ontology. Sólo se muestran los diez más representados.

Identificación de genes específicos de raíz

Con objeto de identificar genes específicos de raíz, potencialmente implicados en la producción y transmisión de una señal hacia la parte aérea que controle la transición de fase juvenil a adulta, se hizo un primer cribado con los datos del microarray, seleccionando genes que se expresen en las raíces pero no se expresen en ningún momento del desarrollo en los meristemos (Fig.58).



Para ello se usaron datos de hibridaciones del microarray, en la que se utilizaron meristemos en distintos estadios del desarrollo, desde los 6 hasta los 39 meses de edad tomados con intervalos de tres meses. Se compararon los datos con los procedentes de las raíces, buscando genes no expresados en los meristemos (nivel de expresión inferior a 6) y con un nivel de

expresión en las raíces mayor a 7 (2 fold-change sobre el nivel de expresión que consideramos ruido de fondo). De esta forma, se obtuvieron 30 unigenes que se expresaban en raíces (Fig.58-A), ya fuese sólo en raíces adultas (7 unigenes) (Fig.58-B), sólo en raíces juveniles (7 unigenes) (Fig.58-C) o en ambas (16 unigenes) (Fig.58-D) (Tabla 11).

Seguidamente, se llevó a cabo una anotación manual de los genes específicos de las raíces, usando además del Sma3s, las bases de datos públicas presentes en el NCBI y comparando tanto la secuencia de ADN cómo los posibles péptidos codificados (Tabla 11).

Tabla 11. Anotaciones funcionales de los unigenes seleccionados específicos de raíces.

Unigen	Keywords	Function
Adult and juvenile root specific genes.		
Unigene_1038	DUF1775	Eucariotic protein of unknown function.
Unigene_8780	Unknown	Unknown
Unigene_6820	Pathogenesis-related protein Bet-v-I	Bet_v_1-Like is believed to be involved in the transport of plant steroids, this family includes other plant intracellular pathogenesis-related proteins.
Unigene_4871	Unknown	Unknown
Unigene_7967	Cellulose synthase protein	These proteins are involved in the elongation of the glucan chain of cellulose, they are putative catalytic subunit of cellulose synthase, which is a glycosyltransferase using UDP-glucose as the substrate.
Unigene_5376	Unknown function plant protein	Unknown
Unigene_9176	Unknown	Unknown
Unigene_9606	Unknown	Unknown
Unigene_5923	Unknown	Unknown
Unigene_7489	GDSL esterase/lipase	SGNH_plant_lipase_like, a plant specific subfamily of the SGNH-family of hydrolases, family of lipases and esterases.
Unigene_50861	Unknown	Unknown
Unigene_9349	Plant protein of unknown function	Unknown. PLN0303, hypothetical protein.
Unigene_6777	Oxidoreductase.	Oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein. This is the highly conserved N-terminal region of proteins with 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenase activity.
Unigene_5807	11S globulin seed storage protein	This family contains 11S and 7S plant seed storage proteins, and germins. Plant seed storage proteins provide the major nitrogen source for the developing plant.

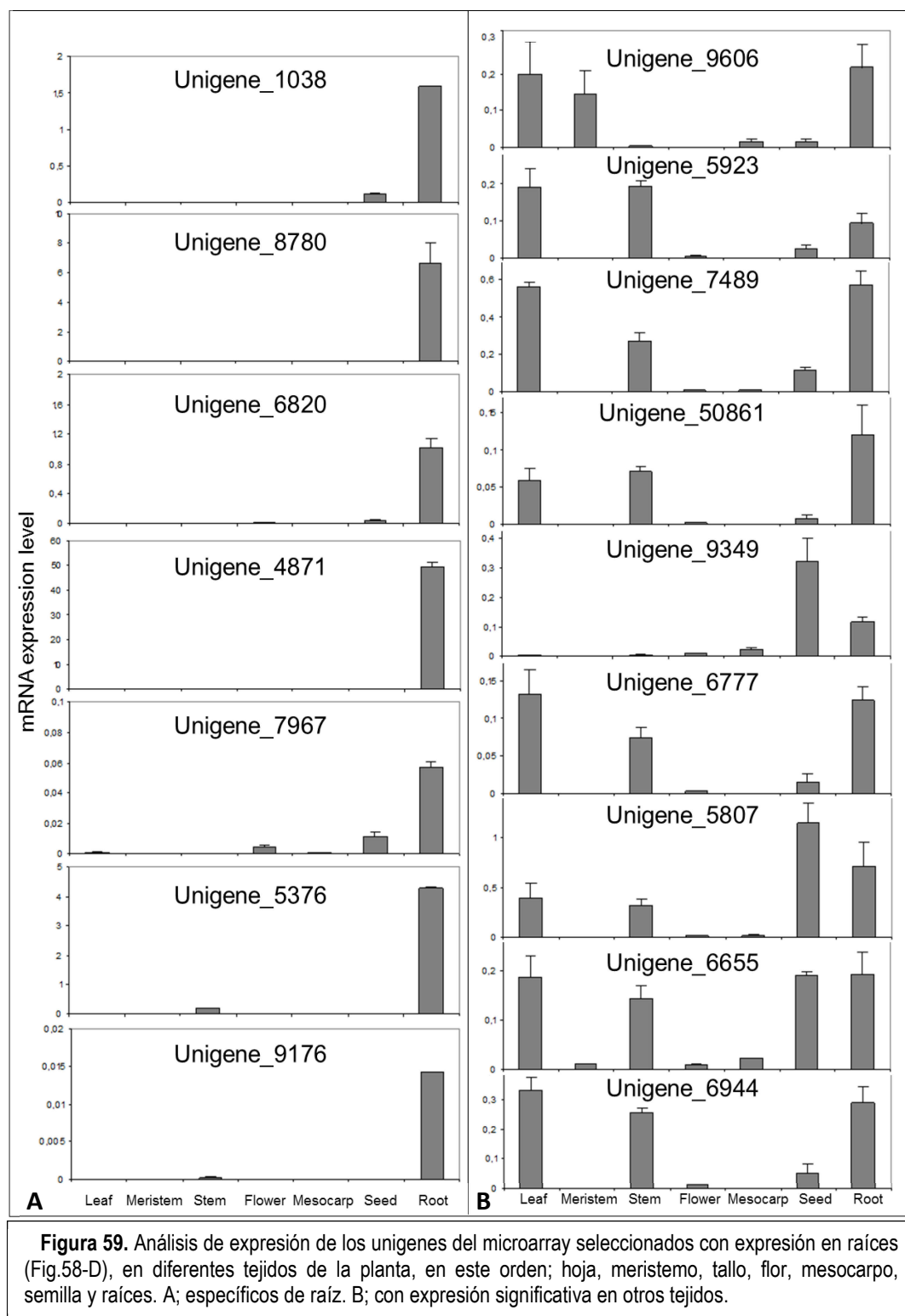
Unigene_6655	Protein Tyrosine Kinase (PTK)	PTKs catalyze the transfer of the gamma-phosphoryl group from ATP to tyrosine (tyr) residues in protein substrates. PTKs play important roles in many cellular processes including, epithelium growth and maintenance, metabolism control, organogenesis regulation, survival, proliferation, differentiation, migration, motility, and morphogenesis.
Unigene_6944	Unknown	Unknown
Genes específicos de raíces adultas		
Unigene_12043	Lysosomal beta glucosidase.	Glycosyl hydrolase family 3 N terminal domain; is involved in catalysis and maybe in binding beta-glucan, carbohydrate transport and metabolism.
Unigene_14252	DUF247	Plant protein of unknown function.
Unigene_6504	Dirigent protein	This family contains a number of proteins which are induced during disease response in plants. Members of this family are involved in lignification.
Unigene_16562	Unknown	Unknown
Unigene_8379	DUF761	Plant proteins of unknown function.
Unigene_20064	Unknown	Unknown
Unigene_68327	Unknown	Unknown
Genes específicos de raíces juveniles		
Unigene_64543	Homing endonuclease	RRNA intron-encoded homing endonuclease
Unigene_7141	Alpha-tubulin	The alpha- and beta-tubulins are the major components of microtubules, while gamma-tubulin plays a major role in the nucleation of microtubule assembly.
Unigene_8698	Exo70	The Exo70 protein forms one subunit of the exocyst complex. Exo70 is expressed in several tissues and is thought to also be involved in exocytosis.
Unigene_9121	ATPase	Plasma-membrane proton-efflux P-type ATPase; found in plants, fungi, protozoa, slime molds and archaea.
Unigene_8396	DNA-dependent RNA polymerase.	This is a family of single chain RNA polymerases.
Unigene_8889	Catalytic core of leucyl-tRNA synthetases	This class I enzyme is a monomer which aminoacylates the 2'-OH of the nucleotide at the 3' of the appropriate tRNA, responsible for the ATP-dependent formation of the enzyme bound aminoacyl-adenylate and are involved in ATP binding.
Unigene_9503	Plant protein of unknown function	Unknown

Se estudió la expresión de estos 30 genes preseleccionados por su expresión diferencial entre raíz y meristemas en un amplio panel de tejidos vegetales mediante Q-RT-PCR. Concretamente se analizó la expresión en muestras procedentes de hoja, meristemo, tallo, flores, mesocarpio y semilla, además de las raíces.

En todos los casos analizados se confirmó la diferencia de expresión encontrada en la hibridación del microarray entre raíces y meristemas, (Fig.59, 60 y 61).

Entre los 16 unigenes seleccionados diferencialmente con expresión en raíces juveniles y adultas al mismo tiempo, tan sólo 7 confirmaban su especificidad de expresión en raíces (Fig.59-A), los 9 unigenes restantes mostraban expresión en alguno de los tejidos analizados. La mayoría (7 de 9) mostraban expresión en las hojas y en el tallo, mientras que tres de ellos presentaban una expresión elevada en semilla (Fig.59-B).

En el caso de los genes específicos de raíces adultas 2 de los 7 unigenes seleccionados parecen ser específicos de raíces mientras que el resto, al igual que ocurre en el grupo anterior, se expresan en otros tejidos de la planta (Fig.60), en este caso, los cinco unigenes que parecen no ser específicos, no se pueden agrupar como en el caso del conjunto de genes específicos de raíces anterior, pues se expresan en hoja, tallo y semilla, sin patrón aparente.



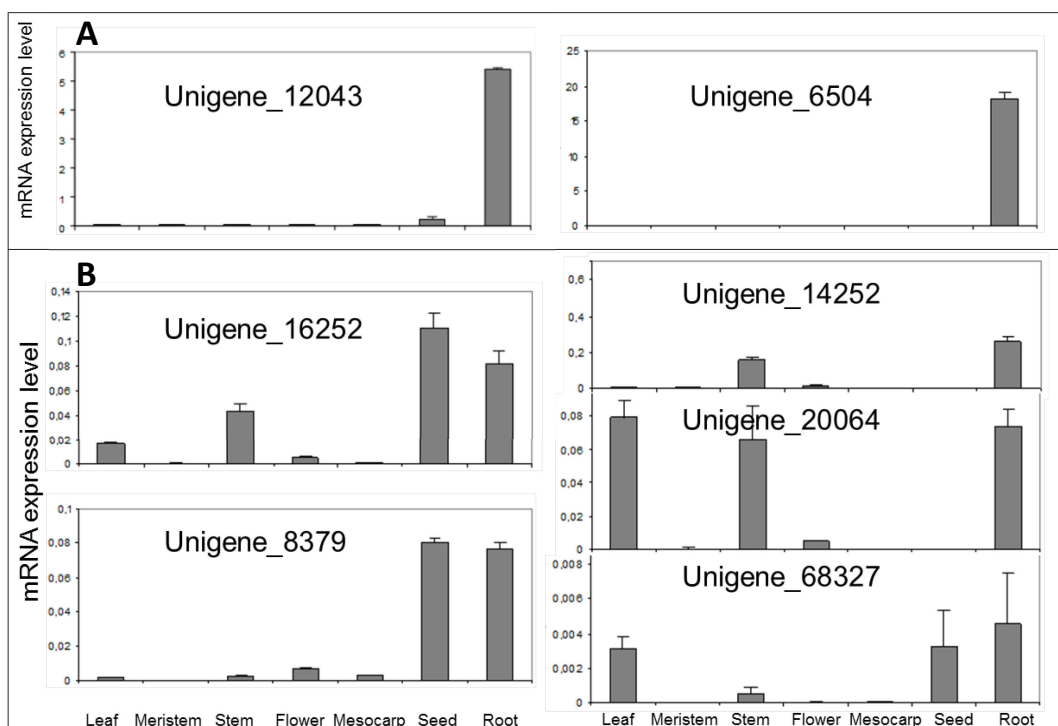


Figura 60. Análisis de expresión de los unigenes del microarray seleccionados con expresión en raíces adultas Fig.58-B en diferentes tejidos de la planta, en este orden; hoja, meristemo, tallo, flor, mesocarpo, semilla y raíces. A; específicos de raíces adultas. B; con expresión en otros tejidos.

Todos los unigenes seleccionados en el último grupo, como sobre-expresados en las raíces juveniles y específicos de raíz, además de confirmar el microarray, son específicos de raíces juveniles (Fig.61).

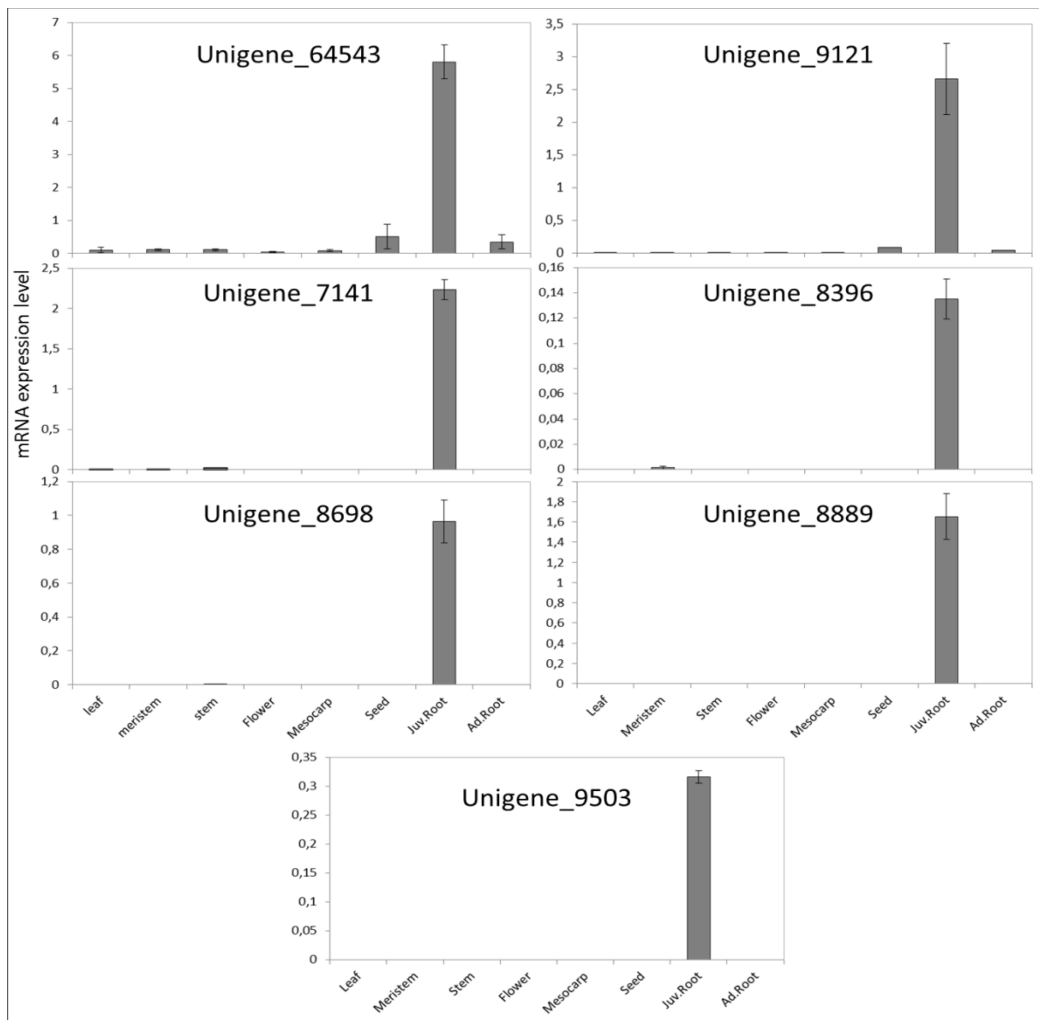


Figura 61. Análisis de expresión de los unigenes del microarray seleccionados con expresión en raíces juveniles Fig.58-C en diferentes tejidos de la planta, en este orden; hoja, meristemo, tallo, flor, mesocarpio, semilla, raíces juveniles y raíces adultas.

DISCUSIÓN.

En las plantas leñosas al igual que en el olivo, la transición juvenil a adulto ocurre varios años después de la germinación. El control genético de este largo proceso es todavía poco conocido, así como la temporalización de la expresión de los genes que lo regulan. Estos cambios en la expresión génica se presuponen anteriores a los cambios morfológicos que nos indican que la

planta ha alcanzado la fase adulta reproductiva. Para el estudio del papel de la raíz en dichos cambios, se estudiaron 9 plantas de 2 meses de edad, segregantes de un cruce “Picual x Arbequina”, como muestras de plantas juveniles y tres plantas adultas de cada variedad, reproducidas vegetativamente. El análisis de los datos de la hibridación del microarray con las muestras de raíces dio como resultado, usando un $FC=8$ y 95% de significación, que 253 unigenes mostraban una expresión diferente entre raíces juveniles y adultas, 126 sobre-expresados en raíces adultas y 127 en raíces juveniles (Fig.53). Los datos de hibridación del microarray fueron comprobados mediante Q-RT-PCR, confirmándose la validez de la hibridación ya que los resultados coincidieron en 11 de los 12 unigenes analizados (Fig.54).

La anotación de los 126 unigenes que se sobre-expresaban en raíces adultas mostraban que la mayoría de ellos estaban implicados en procesos metabólicos (61%) y procesos de biosíntesis (29%). Del mismo modo, los 127 unigenes sobre-expresados en raíces juveniles presentaban también la mayor parte de los procesos biológicos divididos entre metabólicos (66%) y de biosíntesis (25%). Ambos grupos de datos mostraban que las raíces poseen un 90% de sus procesos ligados al metabolismo y biosíntesis de distintos compuestos, este hecho no es novedoso, ya que es ampliamente conocido, que además de los clásicos papeles de la raíz como soporte mecánico y la captación de agua, las raíces tienen la capacidad de sintetizar, acumular y secretar gran variedad de compuestos (Flores et al. 1999). Como principales diferencias encontradas, las raíces juveniles presentan el 12% de los procesos representados asociados al metabolismo y biosíntesis de lípidos, mientras que estos procesos no aparecen en las raíces adultas. Una visión general de los datos permite observar que los procesos biológicos en las raíces juveniles son más diversos y regularmente repartidos que en las raíces adultas, cuyos procesos están más concentrados en sólo algunos grupos relacionados con el metabolismo de ácidos nucleicos y de macromoléculas (Fig.57). De hecho, el número de genes sobre-expresados en raíces juveniles y adultas es prácticamente el mismo, pero los procesos biológicos son más diversos en las raíces juveniles, lo cual es consistente con el mantenimiento de la totipotencia que presentan los tejidos juveniles. Por ejemplo, los esquejes juveniles enraizan mucho más fácilmente que los adultos (Hartmann et al. 2002).

Una segunda aproximación a los datos de hibridación de las raíces se llevó a cabo usando datos de hibridación de muestras de meristemos tomados a lo largo del tiempo, que cubrían un

amplio espectro de la expresión de unigenes en el olivo. El filtrado diferencial de los datos de las raíces y los meristemos revelaron 30 unigenes que se expresaban en raíces y no lo hacían en los meristemos. Este nuevo grupo de transcritos se podía agrupar en aquellos que se expresaban tanto en raíces adultas como en raíces juveniles (16 unigenes), sólo en raíces adultas (7 unigenes) o con expresión específica de raíces juveniles (7 unigenes) (Fig.58). Los tres grupos de unigenes fueron anotados de forma manual (Tabla 11), tanto para su secuencia de nucleótidos como para su secuencia traducida, obteniendo una anotación satisfactoria para 14 de ellos, en los que se pudo identificar el unigen como alguna proteína de función conocida, ya fuera por homología de la secuencia peptídica (BlastX, BlastP) o por poseer dominios conservados de alguna familia de proteínas (Marchler-Bauer et al. 2011). De entre los 16 unigenes restantes, 4 fueron identificadas como péptidos pertenecientes a familias de proteínas de función desconocida y 12 unigenes no se anotaron.

Para determinar si estos 30 unigenes eran de expresión específica en la raíz, se comprobó mediante Q-RT-PCR si se expresaban en otros tejidos como son hoja, meristemo, tallo, flor, mesocarpo y semilla, además de en las raíces

Estos análisis de expresión confirmaron como genes específicos de raíz a 7 de los 16 unigenes que se expresaban tanto en raíces juveniles como adultas (Fig.59), a 2 de los 7 unigenes preseleccionados como específicos de raíces adultas (Fig.60) y a los 7 unigenes identificados como específicos de las raíces juveniles (Fig.61). Dentro de los unigenes específicos confirmados por Q-RT-PCR estaban anotados 2 unigenes en el primer grupo (6820 y 7967), 2 en el de raíces adultas (12043 y 6504) y 6 en el grupo de las raíces juveniles (64543, 7141, 8698, 9121, 8396 y 8889).

El unigen 6820 posee un dominio completo muy conservado (e-valor: $1,9e^{-28}$), de una proteína de unión a Bet_v_1 de abedul (*Betula verrucosa*), el mayor componente alérgeno del polen de esta planta. La superfamilia a la que pertenece Bet_v_1, SRPBCC family, posee dominios con una estructura de unión fuerte a ligandos hidrofóbicos, entre las que se encuentran diversas proteínas de funciones distintas; PR-10, por ejemplo, son proteínas relacionadas con patogénesis intracelular clase 10, NCSs, norcoclaurine sintasas, CSBPs, proteínas de unión a citoquininas, MLPs, (Mayor Latex Protein) proteínas sin función específica conocida relacionadas con la respuesta a estímulos bióticos y de defensa, además de proteínas de relacionadas con la

maduración del fruto. Entre ellas, alguna proteína presente en *Arabidopsis* parece ser específica de raíces (NP_177244.1), aunque no posee función conocida. La función biológica de la familia de proteínas clasificadas como Bet_v_1, que incluye 11 subgrupos de proteínas, está relacionada con unión a lípidos, así como el transporte de componentes a través de la membrana y respuesta a estímulos bióticos, aunque posee una gran divergencia en la familias descritas hoy en día, debidas a ganancia de nuevas funciones por inserción de elementos estructurales o por fusión con otros dominios (Osmark et al. 1998, Liu y Ekramoddoullah 2006, Radauer et al. 2008).

En el caso del unigen 7967, el péptido traducido anota para una subunidad catalítica de una celulosa sintasa (CESA_CelA) (e-valor: $2,23e^{-16}$), la cual tiene actividad glicotransferasa usando UDP-glucosa como sustrato, involucrada en la elongación de la cadena de celulosa. El dominio conservado pierde la homología en la parte central de la proteína, aunque la mantiene en el extremo amino y carboxilo terminal. Las celulosa sintasas de esta familia se requieren para la síntesis de polisacáridos de la pared celular, y se ha descrito que poseen una alta expresión en meristemos jóvenes en arroz; ápices de la raíz y meristemos apicales (Luan et al. 2011), mutantes de estas plantas presentaban retraso en el crecimiento debido al retardo en la división celular (Li et al. 2009). De una forma general, los mutantes para celulosa sintasas presentan defectos en el crecimiento y la morfogénesis de las raíces (Favery et al. 2001, Wang et al. 2001, Kim et al. 2007, Bernal et al. 2008).

El unigen 12043 posee un dominio completo conservado para una N-Glucosil hidrolasa de la familia 3 (e-valor: $1,06e^{-89}$) y los alineamientos del péptido traducido lo anotan para una beta-glucosidasa lisosomal en varias plantas. Estas enzimas están involucradas en la unión, transporte e hidrólisis de carbohidratos (Cairns y Esen 2010), más concretamente, se relacionan con el metabolismo de los polisacáridos de la pared celular. Las glucosil hidrolasas pertenecientes a familia 3 en *Arabidopsis* usan como sustrato xilano, arabinano y arabinoxilano, (Minic 2008). Algunas de las familias de glucosil hidrolasas de forma conjunta (2, 3, 18, 35, 38 y 79) podrían estar involucradas en el procesamiento del N- y O-glicano de proteínas pertenecientes a rutas secretorias tras su biosíntesis (Minic 2008).

El péptido traducido por el unigen 6504 tiene un dominio conservado completo de la superfamilia Dirigent (e-valor: $2,03e^{-46}$). Esta familia contiene un amplio abanico de proteínas que se inducen durante la respuesta a distintas enfermedades en plantas, como ataques por insectos,

heridas (Ralph et al. 2006) o situaciones de estrés diverso (Ralph et al. 2007), además de contener proteínas involucradas en lignificación celular (Davin y Lewis 2000).

El unigen 64543 no posee dominios conservados, pero en la búsqueda por homología de secuencias (BlastX) obtenía los resultados positivos más significativos con varias proteínas de *Medicago truncatula*: Tarp1 (e-valor: $2e^{-32}$), citocromo P450 ($8e^{-28}$), *rRNA intron-encoded homing endonuclease* ($4e^{-29}$) y la subunidad beta de la ATP sintasa ($6e^{-15}$), aunque la secuencia tenía la máxima identidad de secuencia (100%) con la endonucleasa, y cubría el 80% de la secuencia. Por tanto, la anotación de este unigen no queda muy clara, aunque por similitud de secuencias parece ser una endonucleasa de ARNr codificada por un intrón que se traduce y realiza su función en el mismo lugar, de ahí el apelativo “homing”. Cabe apuntar, que todas las proteínas de *M. truncatula* para las que tenía similitud de secuencia se encuentran codificadas por genes de la misma región del cromosoma 5.

El unigen 7141 posee un dominio parcial del extremo N-terminal de una alfa-tubulina (e-valor: $6,82e^{-87}$), la superfamilia a la que pertenece está compuesta por 5 familias, que se encuentran presentes en todos los organismos. La alfa-tubulina es uno de los componentes principales de los microtúbulos, por lo que su secuencia está muy conservada entre las distintas especies, sobre todo su extremo N-terminal, esta conservación de la estructura viene impuesta por las limitaciones estructurales de los microtúbulos (Burns 1991). El hecho de que una tubulina sea específica de un tejido en un periodo concreto no es un hecho extraño, se han descrito alfa-tubulinas en *Arabidopsis* específicas de polen y diferencialmente expresadas en raíces, hojas y flores (Carpenter et al. 1992). En maíz, se han observado alfa y beta-tubulinas que se expresan prioritariamente en tejidos que se encuentran en división rápida, como los ápices radiculares, más que en tejidos adultos (Joyce et al. 1992, Uribe et al. 1998). En estudios en plantas de arroz se sugiere que la expresión preferente de una alfa-tubulina en tejidos muy activos en división celular (ápices de la raíz y hojas y flores jóvenes) puede estar mediada por el primero de los intrones del gen que la codifica (Jeon et al. 2000). También se han descrito alfa-tubulinas en animales específicas de tejido en *Drosophila* (Theurkauf et al. 1986) y en ratón (Villasante et al. 1986).

Los análisis de dominios conservados para el unigen 8698 indican que posee un dominio conservado Exo70 (e-valor: $2,25e^{-12}$), al igual que los alineamientos de secuencias. La proteína Exo 70 es una subunidad del complejo de exocitosis. Fueron descritas por primera vez en

levaduras, pero se han observado en varios eucariotas. En plantas forman parte del complejo conservado de exocitosis y se han encontrado hasta 23 genes *EXO70* en *Arabidopsis* implicados en exocitosis específicas de distintos tipos celulares (Li et al. 2010), al contrario que los genes únicos observados en levaduras y en la mayoría de animales. También han sido descritos como factores importantes para el crecimiento y el desarrollo, observándose defectos fenotípicos en el crecimiento de mutantes para dos genes *EXO70* en *Arabidopsis*, como pérdida de la dominancia apical, órganos más pequeños y fertilidad reducida (Synek et al. 2006) y relacionados con la respuesta a patógenos (Pečenková et al. 2011).

El unigen 9121 posee un dominio C-terminal conservado de una ATPasa III (e-valor: $4,82e^{-07}$), la función de esta subfamilia de ATPasas está relacionada con la producción de ATP usando el gradiente de protones generado por la fosforilación oxidativa (mitocondrias) o por la fotosíntesis (cloroplastos) (InterPro). Algunos estudios relacionan el control transcripcional de la actividad ATPasa con la regulación del crecimiento para las plantas, relacionado con los gradientes de H^+ en las células (Palmgren 1998).

El análisis de secuencias conservadas del unigen 8396 encontraba un dominio conservado C-terminal para una ARN polimerasa dependiente de ADN de una sólo cadena (e-valor: $1,26e^{-56}$). Estas ARN polimerasas se encuentran en plantas solamente en mitocondrias y plastos (Lerbs-Mache 1993, Hess y Börner 1999). Tres genes nucleares codifican para ARN polimerasas de esta familia en *Arabidopsis*, dos son posibles enzimas mitocondriales y una activa en plastos (Hess y Börner 1999). En mostaza (*Sinapis alba* L.) se han separado dos clases de ARN polimerasas procedentes de plastos, los análisis de su actividad mostraban que cada una actuaba preferiblemente en cloroplastos o etioplastos, siendo la actividad total descrita en ambos casos aproximadamente la misma (Pfannschmidt y Link 1994).

El unigen 8889 posee un dominio conservado del núcleo catalítico de una leucil-ARNt sintetasa (e-valor: $1,54e^{-21}$), esta enzima de clase I cataliza la unión de leucina al extremo de una ribosa para generar leucil-ARNt, el núcleo central está involucrado en la unión a ATP necesario para la reacción. Los alineamientos de secuencias encuentran homologías para esta enzima en multitud de organismos, con e-valor máximo para plantas de $7e^{-100}$ en una fabácea (*Phaseolus vulgaris*). Se han descrito enzimas específicas de distintos órganos en plantas (Cherry y Osborne

1970, Souciet et al. 1982) aunque la mayor parte de ellos están realizados en hipocotilos y semillas de soja (*G.max*) (Anderson y Cherry 1969, Kanabus y Cherry 1971).

Del total de 16 unigenes confirmados específicos de las raíces (2 de raíces adultas, 7 de raíces juveniles y 7 de expresión en ambas), sólo 10 se pudieron anotar manualmente. Se ha descrito la anotación basándonos en la conservación de dominios funcionales y homología de secuencias, pero no podemos asegurar que la actividad final de los péptidos anotados sea la descrita anteriormente, aun perteneciendo a familias de proteínas conocidas, ya que estas presentan un amplio rango de funciones, que a veces pueden variar entre especies, entre tejidos e incluso entre células. En general, la anotación de los unigenes específicos de raíz encontrados en este trabajo, muestra que proteínas parecidas en otras especies de plantas pueden ser específicas ya sea por su expresión y/o distribución, a nivel de órganos, tejidos o células.

Partiendo de esta premisa y de la hipótesis que se plantea, una señal procedente del sistema radicular que genere un gradiente responsable de la inhibición de la transición juvenil a adulto, cualquiera de estos 16 unigenes podría ser la sustancia en cuestión o estar involucrado directa o indirectamente en su metabolismo. Dicha hipótesis centraría la búsqueda en genes que se expresen tanto en raíces juveniles como en raíces adultas, ya que en árboles adultos, las ramas que crecen cercanas a la raíz se mantienen juveniles (cono de juvenilidad). Además, el transporte de esta sustancia parece estar más relacionado con una difusión celular que con los haces vasculares, apoyando la formación del gradiente decreciente a más número de nudos de distancia a las raíces. Las anotaciones relacionan a tres unigenes con el transporte de sustancias (6820, 12043 y 8698) y a dos de ellos con la pared celular (7967 y 6504), que potencialmente podrían estar implicados en el movimiento y transporte de la sustancia a través de las membranas y las paredes celulares contiguas.

El estudio de la función y localización de los péptidos específicos de raíces sería interesante para ampliar la búsqueda de la hipotética señal, describiendo uno de los mecanismos que parecen estar involucrados en la transición juvenil a adulto, específicamente en el olivo y de forma generalizada en leñosas.

Capítulo III
El transcriptoma de
la raíz del olivo.

ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO.

Con el desarrollo en los últimos años de las tecnologías de última generación, las secuenciaciones genómicas y los estudios a gran escala, la mayor parte de las investigaciones a en ciencia han tornado a “ómicas”. Este tipo de estudios amplía enormemente el horizonte y la capacidad del investigador de abarcar un gran rango de situaciones y factores que hasta no hace mucho eran inconcebibles. La dificultad de este tipo de estudios radica en el desarrollo de las tecnologías y las aptitudes necesarias para ser capaces de extraer y comprender la gran cantidad de datos que se ponen a nuestra disposición.

En esta Tesis se aborda un estudio transcriptómico en el olivo usando para ello la tecnología del RNAseq, una herramienta potente que permite la secuenciación masiva de ADNc o ARN y hace posible la obtención de perfiles de expresión génica de los diferentes transcritos en los datos analizados. Para ello se hace necesaria una base de secuencias génicas frente a la que analizar los datos de expresión, que vienen dados en número de secuencias o “reads” por cada transcrito. La base más comúnmente utilizada, si éste está disponible, es el genoma de la especie en cuestión. Los avances en secuenciación genómica de la última década han permitido disponer de

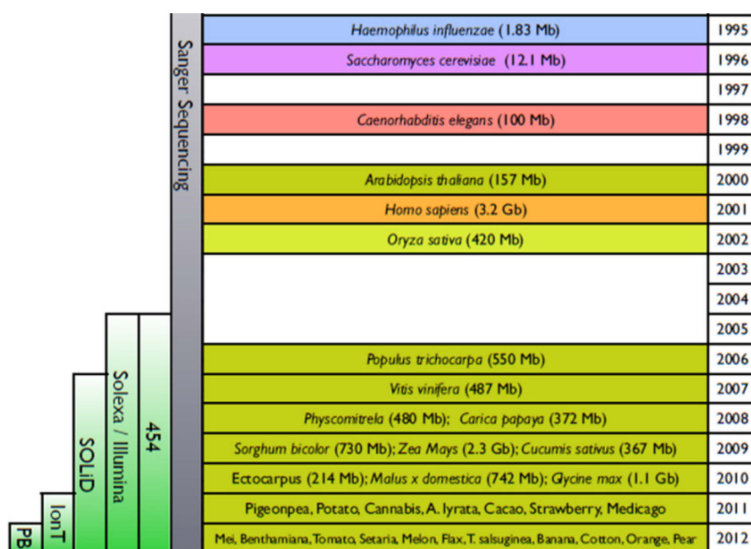


Figura 62. Genomas más relevantes secuenciados desde 1995 hasta 2012, anteriormente se habían secuenciado el bacteriófago MS2 (1977) y el virus de Epstein-Barr (1984). Alcanzando en la fecha actual 41 genomas de plantas secuenciados y disponibles, siendo el último *Panicum virgatum* (phytozome.net). A la izquierda se marca la aparición de los distintos tipos de secuenciación.

la información de un gran número de genomas completos, cuyo número aumenta progresivamente y que abarcan, además de las especies modelo de estudio en cada campo de conocimiento, aquellas con intereses científicos o económicos (Fig.62).

En el caso de la especie que nos ocupa, el olivo (*O. europaea*), no hay todavía disponible un genoma de referencia, por lo que la solución que se plantea en estos casos es el ensamblaje de un transcriptoma *de novo* a partir de los datos de la secuenciación, que sirva como estructura sobre la cual realizar el volcado de los datos para el análisis RNAseq.

Un ensamblaje siempre supone un nuevo reto, que se complica si no disponemos de un genoma de referencia, en los últimos años se ha avanzado mucho en este tipo de procesos y se han desarrollado herramientas que ofrecen muy buenos resultados, dependiendo del tipo de datos de partida que poseamos. En nuestro caso partimos de una librería de ADNc de cada una de las muestras de estudio, generada a partir de ARN total de cada una de ellas (ver tabla 6). Se extrajo el ARN total de tres plantas en cada una de las situaciones del estudio y se realizó un pool para la retrotranscripción y la fabricación de las librerías. La secuenciación de cada librería se realizó por duplicado en un secuenciador *Illumina HiSeq 1000*® (illumina, San Diego).

RESULTADOS.

Con el objetivo de obtener un transcriptoma lo más completo posible de raíces que respondiera a varios supuestos experimentales, se utilizaron un amplio rango de muestras que abarcaban más de un estudio o análisis. En términos generales, el transcriptoma se podría describir como un transcriptoma de raíces y hojas de olivo en condiciones normales y de estrés, tanto biótico, cómo abiótico. La gran cantidad de muestras de raíces que se incluyen, constituyen un material ideal para obtener una aproximación muy completa de cara a definir qué genes se expresan a nivel de la raíz del olivo.

Datos de partida o Raw data.

El resultado de la secuenciación fueron aproximadamente 740 M de lecturas *paired-end* (ver 11.4) que abarcaban ambas réplicas de la secuenciación de cada una de las muestras, con un tamaño medio de 28,5 M de secuencias por réplica (Tabla 12).

Tabla 12. Tabla resumen de los datos brutos de la secuenciación por muestras.

Muestra		Réplica	Total <i>Paired-end</i>	Total reads	Gb secuenciados
CR0h	1	1	18.974.562	38.070.636	7,69
		2	19.096.074		
DR8h	2	1	45.857.680	91.611.217	18,50
		2	45.753.537		
DR24h	3	1	26.775.754	53.361.340	10,78
		2	26.585.586		
DR48h	4	1	22.547.755	45.168.452	9,12
		2	22.620.697		
DR7d	5	1	30.930.898	61.961.137	12,51
		2	31.030.239		
VR48h	6	1	27.214.837	54.358.741	10,98
		2	27.143.904		
VR7d	7	1	27.681.432	55.072.107	11,12
		2	27.390.675		
VR15d	8	1	22.286.016	44.316.858	8,95
		2	22.030.842		
CL0h	9	1	28.852.727	57.751.773	11,66
		2	28.899.046		
CL24h	10	1	35.059.159	69.681.545	14,07
		2	34.622.386		
CL10d	11	1	11.131.408	22.205.570	4,48
		2	11.074.162		
VL15d	12	1	37.391.858	74.291.842	15,00
		2	36.899.984		
DL15d	13	1	47.498.270	73.823.537	14,91
		2	26.325.267		
Total			741.674.755	741.674.755	149,77

Pre-procesamiento de las secuencias *paired-end*.

La secuencias fueron proporcionadas por la empresa que hizo el RNA-seq, procesadas con una calidad mínima de Q o Qphred de 20 ($e=0,01$). Para mejorar la calidad de partida de las secuencias se llevó a cabo un segundo filtrado de las muestras para Q30 ($e=0,001$), además de llevar a cabo la limpieza de los adaptadores que se añaden en el proceso de secuenciación y un filtrado por tamaño mínimo de 50 pb.

El filtrado retiró aproximadamente 13 M de secuencias de baja calidad y lecturas desapareadas, paso necesario para los procesos posteriores. Antes y después del procesamiento se llevó a cabo la supervisión del mismo mediante el análisis de las muestras con la herramienta FastQC (ver 11.5).

Ensamblaje del transcriptoma.

Con objeto de definir las mejores condiciones para realizar el ensamblaje del transcriptoma se realizó el mismo utilizando tres ensambladores distintos y varias condiciones de ensamblado:

SOAPdenovo-Trans: El ensamblaje con SOAP *de novo* (Xie et al. 2013) se llevó a cabo usando un amplio rango de valores *k-mer* (ver 11.6), hasta siete diferentes, que contemplaban valores desde 19 a 63 y generaron salidas que variaban entre un millón y tres millones totales de secuencias o “scaffolds”, entre ellas, el transcrito más largo de los ensamblajes (23 kb) y con un N50 medio entre ellos de 1,3 kb.

ABYSS: La herramienta ABySS (Robertson et al. 2010) fue utilizada con un *k-mer* fijo de 64, en base a los resultados obtenidos con el ensamblador anterior, en el cual los datos preferibles habían sido los obtenidos a *k-mer* mayores. Los resultados fueron una cantidad menor de secuencias, unas 760.000, con el N50 y el porcentaje de secuencias mayores de 1 kb más bajo de entre los tres ensambladores.

Trinity: En el caso del ensamblador Trinity (Grabherr et al. 2011), al superar las lecturas los 300 M de secuencias, se llevó a cabo la normalización recomendada de la muestra. Este proceso consiste en una reducción virtual o *in silico* del número de lecturas, con el objetivo de reducir memoria y requerimientos computacionales necesarios para el ensamblaje. Esto no produce una pérdida de información, pues el objetivo es eliminar lecturas repetidas que no son necesarias para el proceso de ensamblado. En cuanto al valor de *k-mer*, Trinity está desarrollado para correr a un valor fijo de 25, resultando en un número de scaffolds cercano a los setecientos mil, mostrando el N50 más alto y el mayor número de secuencias de más de 1 kb.

Análisis de los ensamblajes.

Cuando se generan una serie de ensamblajes a partir de los mismos datos se plantean una serie de cuestiones, entre las que destacan dos, ¿Cómo de buenos son los ensamblajes? y

¿Cómo los comparo? La respuesta depende del tiempo y de la capacidad computacional que poseamos, normalmente pasa por una serie de fases; buscar contaminantes, estudiar si el número de contigs o transcritos ensamblados es el esperado y si su longitud es la correcta. El proceso se simplifica si tenemos a nuestra disposición un genoma de referencia. En el caso contrario se pueden llevar a cabo complejos análisis comparando diferentes ensambladores y transcriptomas (Zhao et al. 2011, Gruenheit et al. 2012, BingXin et al. 2013).

Una opción para evaluar distintos transcriptomas sería compararlos cuantitativa y cualitativamente con datos que haya publicados. Para ello se realizó una búsqueda de genomas publicados de plantas cercanas filogenéticamente al olivo (Fig.63).

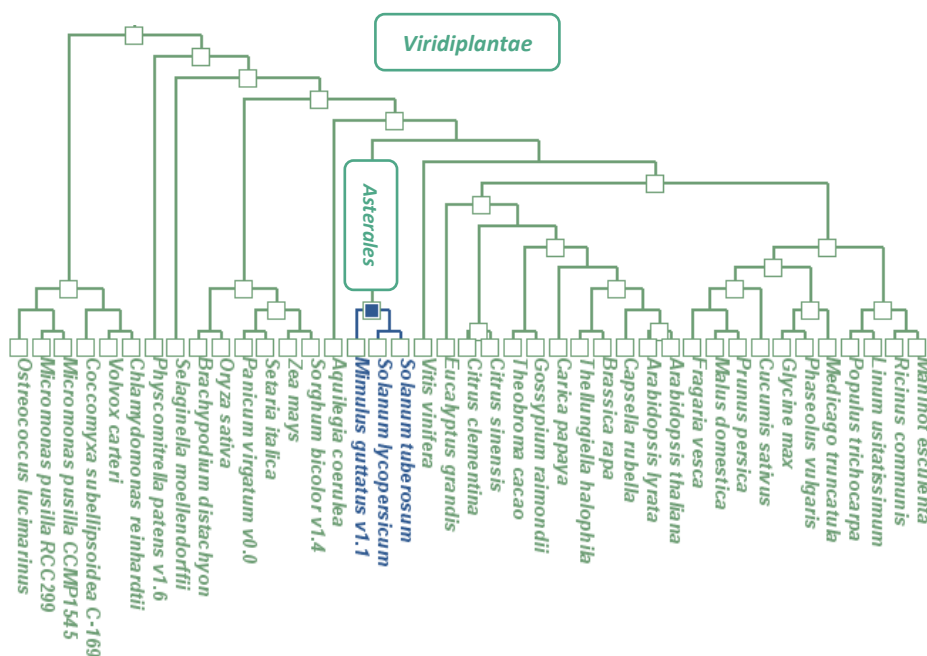


Figura 63. Árbol filogenético de los genomas de plantas publicados y disponibles en las bases de datos (phytozome.net), en azul se marcan las asterales.

Los datos de los genomas de tres plantas de la subclase asterales estaban disponibles (según el sistema de clasificación APG III-Angiosperm Phylogeny Group 2009): dos pertenecientes a la familia solanáceas; el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y la patata (*Solanum tuberosum* L.) y una que compartía el orden de las lamiales con el olivo, la flor-mono (*Mimulus guttatus*). Por tanto, para comparar con los ensamblajes, se eligieron los transcriptomas de *M. guttatus*, por ser la más

cercana desde un punto de vista filogenético, y *S. lycopersicum*, como representante de la subclase asterales.

Antes de comparar los datos cuantitativos de los diferentes transcriptomas, se llevó a cabo una normalización de los datos que consistió en filtrar los ensamblajes para secuencias mayores de 200 pb, eliminando aquellas de menor tamaño, excepto en el caso de la herramienta Trinity, que las elimina por defecto. Valores menores no se consideran representativos, pues la longitud máxima de las secuencias *paired-end* de partida era de 300-400 pb.

Los datos de los distintos transcriptomas ensamblados, así como los transcriptomas públicos de *S. lycopersicum* y *M. guttatus*, realizados para las secuencias mayores de 200 pb se muestran en la tabla II.

Tabla 13. Tabla resumen de los datos más significativos de los transcriptomas; número de contigs o secuencias finales, secuencia de mayor longitud, valor del N50, porcentaje y número de secuencias mayores de 1 kb. Las dos últimas filas corresponden a; transcriptoma de *S. lycopersicum* (Tom_cdna) y de *M. guttatus* (Mim_cdna).

Ensamblaje	Nº contigs	> longitud	N50	% > 1Kb	Nº sc. > 1kb
Trinity	691.424	17.990	1.919	34,98 %	241.891
Soap_k63	698.404	23.468	1.614	26,99 %	188.484
Soap_k55	819.853	20.482	1.511	26,07 %	213.715
Soap_k47	929.366	27.733	1.380	24,54 %	228.074
Soap_k39	1.022.968	18.533	1.254	22,54 %	230.528
Soap_k31	1.087.478	20.187	1.103	20,31 %	220.868
Soap_k23	1.080.452	19.399	1.044	19,42 %	209.867
Soap_k19	787.608	19.865	960	18,38 %	144.768
ABYSS	761.563	17.974	692	11,72 %	89.259
Tom_cdna	32.518	23.220	1693	53,3%	17.345
Mim_cdna	28.262	15.339	1658	62,3%	17.621

Uno de los parámetros que se utilizó para evaluar la calidad del ensamblaje del transcriptoma del olivo fue la comparación de la distribución de la longitud de los transcritos ensamblados, con la distribución de la longitud de transcritos de especies modelo de las que existiera un genoma de referencia. Para ello, se ordenaron los contigs generados en cada caso para representarlos, usando la herramienta RStudio, en un diagrama de cajas, que nos permitiese compararlos entre sí. Este tipo de diagrama obvia el sesgo presente en el número total de secuencias, la caja contendría el 50% de los datos centrales. Los resultados muestran que el transcriptoma ensamblado con Trinity es el que muestra un mayor parecido a la distribución presente en los transcriptomas de referencia (*S. lycopersicum* (Tom_cdna) y *M. guttatus* (Mim_cdna)) (Fig.64).

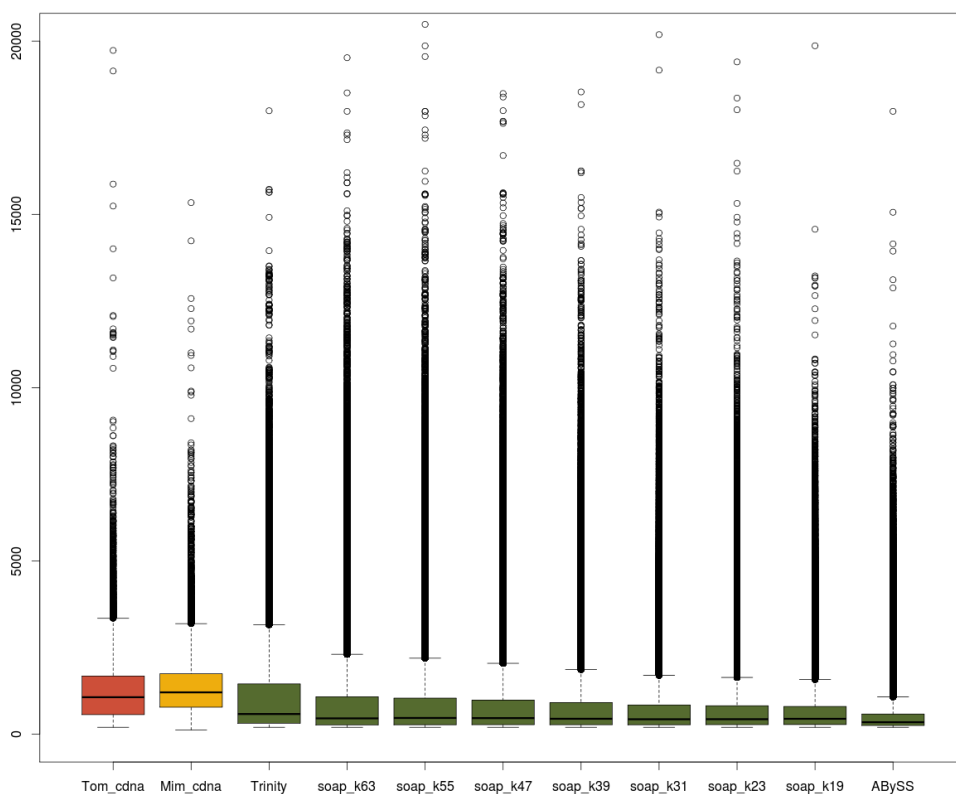


Figura 64. Diagramas de cajas que representan la distribución de longitudes de los distintos transcriptomas ensamblados (verde oliva) y del transcriptoma de *S. lycopersicum* (rojo) y de *M. guttatus* (dorado).

El ensamblaje realizado con Trinity produjo un mayor número de transcritos largos y un valor más elevado de N50, aunque el número de transcritos o contigs estaría por encima del esperado

inicialmente. La distribución de la longitud de sus secuencias es la más parecida a la de las referencias seleccionadas, por lo que los procesos siguientes se realizaron con dicho transcriptoma.

Reducción del tamaño y limpieza del ensamblaje.

El transcriptoma ensamblado con Trinity es el que se parece más a los publicados, pero supera el número de secuencias en 20 veces aproximadamente a los transcriptomas usados como modelos. Este elevado número de contigs puede deberse, al menos en parte, a contaminaciones con microorganismos presentes en la rizosfera, además de posibles endosimbiontes o patógenos, como ocurre con algunas de las muestras incluidas en el ensamblaje, que procedían de plantas infectadas por *Verticillium dahliae*.

Para buscar posibles contaminantes de otros organismos en el ensamblaje se realizó un BlastX (busca secuencias proteicas en la base de datos a partir de las codificadas por secuencias de nucleótidos dadas) frente a la base de datos de proteínas curadas UniProtKB/Swiss-Prot (uniprot.org) con los transcritos del ensamblaje mayores de 1 kb de longitud. Aquellas que alinearon frente a la base de datos fueron el 60% de las utilizadas, de entre las que destacaban las plantas (46%) y los representantes del reino Fungi (28%), entre otras especies con menor representación (Fig.65).

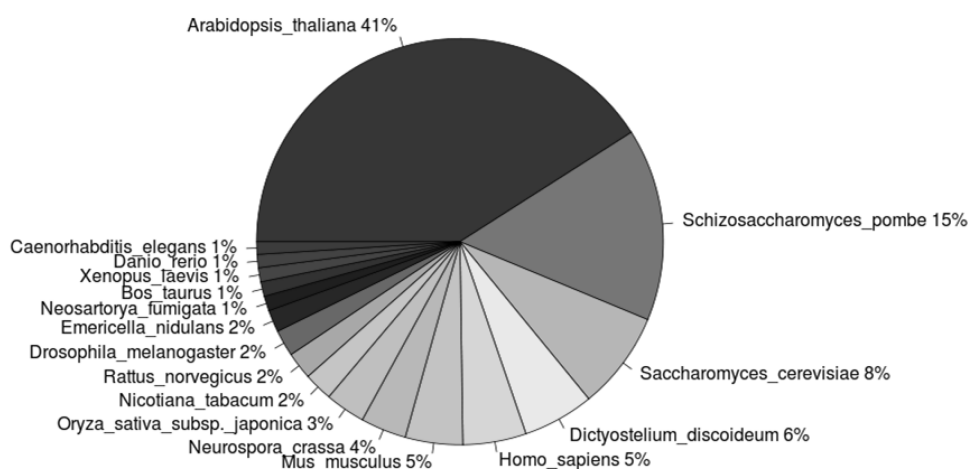


Figura 65. Diagrama circular que muestra los porcentajes de secuencias que han alineado con las especies más representativas.

En base a estos datos, para llevar a cabo la limpieza y el filtrado del transcriptoma, se seleccionaron las especies presentes más representativas, además de aquellas que producen de forma rutinaria contaminación en este tipo de experimentos.

El depurado del transcriptoma se llevó a cabo realizando un BlastN (busca secuencias nucleotídicas en la base de datos a partir de secuencias de nucleótidos dadas) frente a una base de datos propia, generada uniendo las secuencias publicadas de distintas plantas y de las especies contaminantes seleccionadas. En el caso del hongo patógeno *V. dahliae*, como era de esperar una proporción de transcritos mayor que para el resto de contaminantes, se usó el genoma completo como base para eliminar todas las secuencias posibles. Para todas las secuencias se utilizó un sistema de códigos, a la hora de generar la base de datos, que facilitara la selección posterior de aquellas secuencias que habían alineado con secuencias de plantas, con secuencias de *V. dahliae* o con secuencias contaminantes. Los organismos utilizados para generar la base de datos se resumen en la tabla 14, siendo el número total de 476.252 secuencias.

Tabla 14. Resumen de los organismos incluidos en la base de datos para el BlastN, especificando su tratamiento como planta o contaminante; * posee la secuencia de los cromosomas y las secuencias sin emplazar, **contiene los cromosomas completos de la especie, *** el cloroplasto se añade como contaminante para retirarlo del transcriptoma.

Especie	Tratamiento	Referencia	Descarga	Nº secuencias
<i>M. guttatus</i>	Planta	(mimulusevolution.org)	phytozome.net	28.282
<i>S. lycopersicum</i>		(Zouine et al. 2012)	solgenomics.net	34.727
<i>V. vinifera</i>		(Jaillon et al. 2007)	phytozome.net	26.346
<i>A. thaliana</i>		(Swarbreck et al. 2008)	phytozome.net	35.386
<i>O. sativa</i>		(Ouyang et al. 2007)	phytozome.net	49.061
<i>V. dahliae</i>		(Qin et al. 2006)	broadinstitute.org	395*
<i>D. discoideum</i>	Contaminante	(Basu et al. 2013)	dictybase.org	11**
<i>H. sapiens</i>		(Collins et al. 2004)	ensemble.org	191.495
<i>M. musculus</i>		(Church et al. 2009)	ensemble.org	83.328
<i>X. tropicalis</i>		(Bowes et al. 2010)	xenbase.org	22.878
<i>S. pombe</i>		(Wood et al. 2002)	pombase.org	4**
<i>S. cerevisiae</i>		(Giaever et al. 2002)	yeastgenome.org	17**
<i>E. coli</i>		(Blattner et al. 1997)	ncbi.nlm.nih.gov	4.321
Cloroplasto <i>O. europaea</i>		(Besnard et al. 2011)	ncbi.nlm.nih.gov	1***

El alineamiento del transcriptoma mediante BlastN a la base de datos generada resultó en 258.411 secuencias alineadas, de las cuales 195.257 alinearon con secuencias de plantas (28,7%) y 63.154 con secuencias marcadas previamente como contaminantes (9,1%) (Tabla IV). El resto de secuencias, 433.013 contigs (62,2%), no alineó con la base de datos.

Tabla 15. Resumen de los resultados del BlastN frente a la base de datos generada.

Plantas		Contaminantes			
<i>M. guttatus</i>	106.722	<i>V. dahliae</i>	52.119	<i>S. pombe</i>	1.118
<i>S. lycopersicum</i>	43.935	<i>D. discoideum</i>	1.674	<i>S. cerevisiae</i>	1.110
<i>V. vinifera</i>	36.568	<i>H. sapiens</i>	1.559	<i>E. coli</i>	960
<i>A. thaliana</i>	4.963	<i>M. musculus</i>	1.424	Cloroplasto <i>Olea</i>	2.043
<i>O. sativa</i>	3.069	<i>X. tropicalis</i>	1.147		
TOTAL:	195.257				63.154

Tras la eliminación de las secuencias contaminantes y la extracción de aquellos transcritos que habían alineado frente a alguna especie de planta, quedaron 433.013 secuencias no alineadas. Un análisis de la distribución de longitudes de las secuencias alineadas y no alineadas, mostró que las segundas poseían un gran número de secuencias de pequeño tamaño, insuficientemente ensambladas para permitir un alineamiento significativo de las mismas.

Para recuperar la mayor parte de las secuencias de plantas de entre las que no habían alineado, se realizó un BlastX de las secuencias mayores de 500 pb (161.887 secuencias) frente a la base de datos *Viridiplantae* de UniProtKB/SwissProt, que contenía todas las proteínas de plantas que existían hasta la fecha. El BlastX de recuperación alineó satisfactoriamente 58.995 secuencias, siendo más de la mitad mayores de 1 kb. Añadiendo estas 58.995 secuencias a las anteriormente extraídas como contigs de planta (195.257 secuencias, ver tabla 15), hacían un total de 254.252 transcritos o contigs que constituían el transcriptoma del olivo al completo.

En este punto cabe destacar que la herramienta Trinity posee una salida de los datos que permite diferenciar secuencias a nivel de transcritos y secuencias a nivel de unigenes, de forma que un unigen puede llevar asociados varios transcritos (Grabherr et al. 2011). En este caso el transcriptoma posee 254.252 transcritos que se reducirían a 68.259 unigenes. Si realizamos un

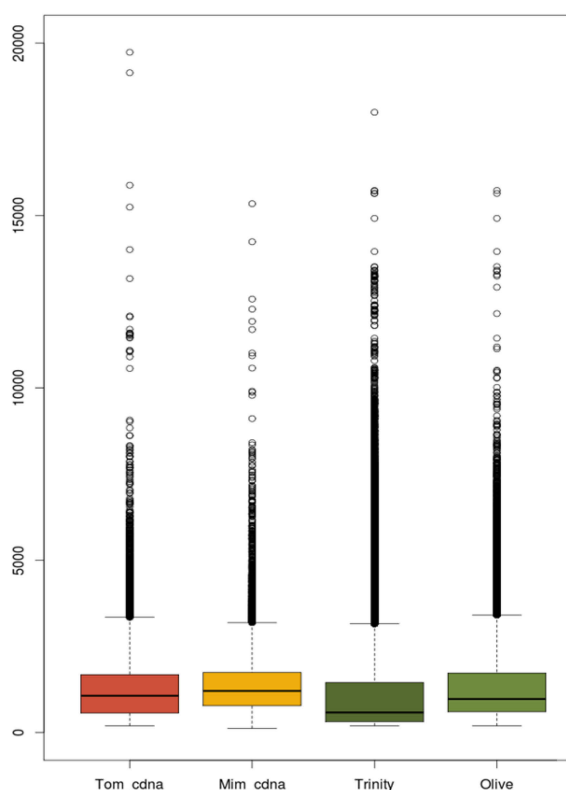


Figura 66. Diagramas de cajas que representan la distribución de longitudes de los transcriptomas de *S. lycopersicum* (rojo), de *M. guttatus* (dorado), el ensamblaje con Trinity (verde oscuro) y el transcriptoma final del olivo (verde oliva).

estudio de la distribución de longitudes de nuevo (Fig.66), se puede observar cómo ha mejorado la misma con respecto al ensamblaje completo y a los transcriptomas de referencia.

Se llevó a cabo un último análisis de la calidad de las secuencias con la herramienta FULL-LENGTHNEXT (FLN) (Claros et al. 2012), que informa cuales de los transcritos pueden ser posibles unigenes y cuales deberían ser desechados, dado que los ensambladores normalmente cometen errores debidos a problemas en la amplificación o en la secuenciación. FLN es capaz de clasificar transcritos que posean una estructura completa (full-length); 5' y 3' flanqueantes y zona interna, sugiriendo cuales

podrían traducirse o no. Además corrige los marcos de lectura y sugiere posibles nuevos genes clasificados como desconocidos y secuencias de ARN no codificante, por lo que supone una herramienta útil para comparar transcriptomas.

Además, los datos obtenidos con la herramienta FLN del transcriptoma, se compararon con el transcriptoma AS8 (Fig.67) (Muñoz-Mérida et al. 2013), para obtener un análisis cuantitativo de los resultados.

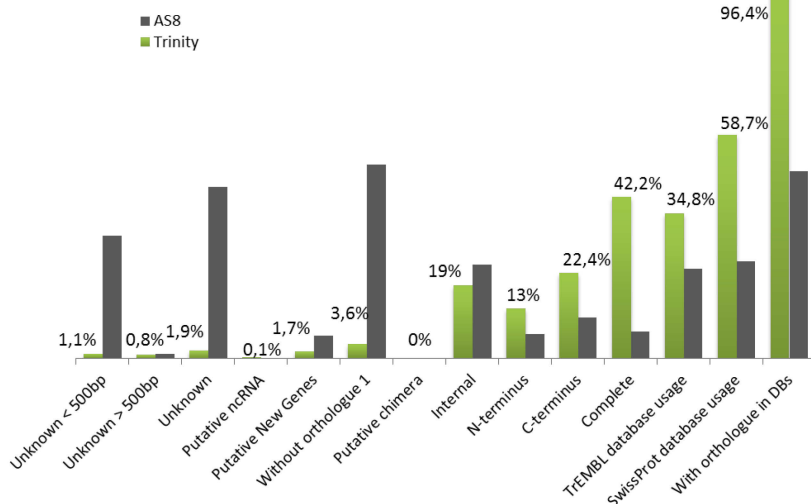


Figura 67. Análisis del transcriptoma de olivo generado con Trinity tras su limpieza con el transcriptoma de olivo AS8. Por claridad sólo se muestran los porcentajes obtenidos con Trinity.

FLN encontró ortólogos en las principales bases de datos, SwissProt y TrEMBL, hasta hacer un total de 65.807 transcritos o unigenes (96,4% de las secuencias totales del ensamblaje), un resultado esperado pues el proceso de limpieza del ensamblaje se basó en su mayor parte en estas bases de datos. Entre ellos, 28.779 transcritos parecen estar completos (42,2%) y 24.031 parecen ser secuencias parciales del extremo amino o carboxilo (13% y 22,4% respectivamente) y no se detectaron quimeras. Dentro del 3,6% de las secuencias restantes sin ortólogos muy pocas secuencias se detectaron como nuevos genes o posibles ARN no codificantes, siendo la mayoría secuencias desconocidas.

Anotación funcional.

La anotación del transcriptoma asigna a cada transcrito su posible función mediante una serie de herramientas virtuales que consisten básicamente en el alineamiento de los transcritos con secuencias de función conocida y el análisis de su estructura basado en su secuencia nucleotídica o en su secuencia peptídica traducida. Uno de los objetivos al realizar una anotación funcional es obtener los términos GO (Ashburner et al. 2000) asociados a las secuencias. Estos términos forman un vocabulario controlado y jerarquizado, que describe la relación de los productos génicos en base a su asociación a tres ontologías independientes; procesos biológicos, componentes celulares o funciones moleculares, independientemente a la especie a la que

pertenezcan. La jerarquía de las ontologías establece una serie de niveles que van aumentando a la vez que lo hace la caracterización del término y su descripción específica. Se realizó la anotación usando dos herramientas, Blast2GO (Conesa et al. 2005) y Trinotate (trinotate.sourceforge.net).

Blast2GO.

El punto de partida del análisis fue un BlastX del transcriptoma frente a las bases de datos UniProtKB/SwissProt, los datos resultantes se importaron a Blast2GO en formato *xml* y se llevó a cabo el mapeo de las secuencias. El mapeo es el encargado de recuperar todos los términos GO asociados a los transcritos de las diferentes bases de datos. En la figura VI se puede observar una distribución del origen de los términos GO; dependiendo de la calidad de la fuente, código de evidencia (Evidence Code, EC) que respalda al término en cuestión (Fig.68-A) o dependiendo de la base de datos de la que procede (Fig.68-B).

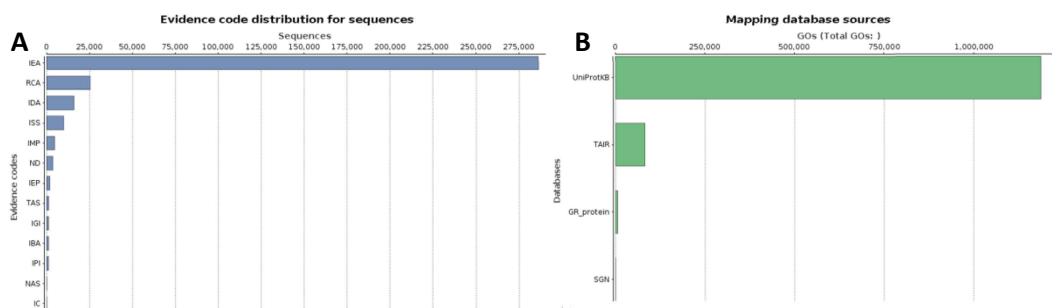


Figura 68. A; distribución de los códigos de evidencia resultado del mapeo de los transcritos. **B;** distribución de las bases de datos de las que se han obtenido los términos GO.

El siguiente proceso selecciona, de entre todos los GO obtenidos, aquellos que son más significativos para cada secuencia mediante una serie de algoritmos, teniendo en cuenta el origen, los códigos de evidencia y una serie de valores ajustables que se usaron por defecto. Una visión general se obtiene representando el número de secuencias totales anotadas para cada cantidad de términos GO por secuencia (Fig.69-A).

Tras la anotación de términos GO se realizó una anotación frente a la base de datos *InterPro* (Hunter et al. 2012), que consistía en la recuperación de la información procedente de motivos o dominios proteicos. Los términos GO asociados a esta búsqueda se comparan con los anteriores y se añaden aquellos que no estaban presentes a las secuencias, mejorando el proceso (Fig.69-B).

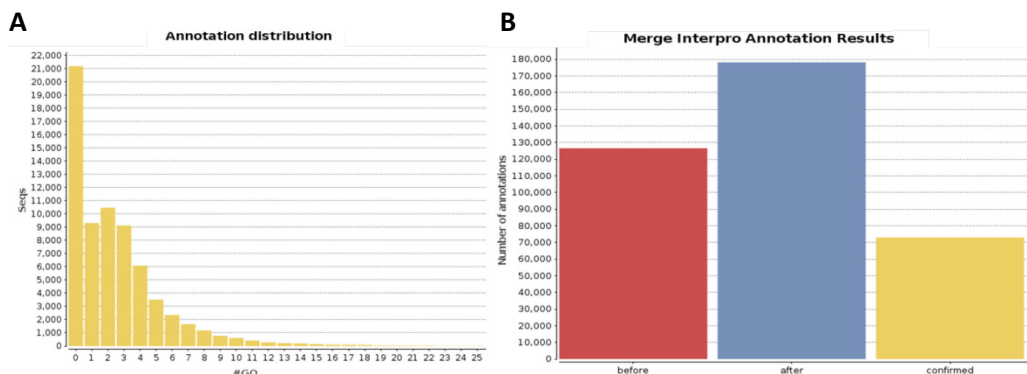


Figura 69. A; distribución de las anotaciones GO. B; resultado de la anotación frente a InterPro en los que aparecen los datos antes (rojo) y después (azul) del análisis, además de los confirmados en ambos.

Finalmente, la herramienta Blast2GO consiguió anotar aproximadamente el 71% de las secuencias del transcriptoma (Fig.70-A) con una distribución en niveles de los términos GO que se indica en la figura 70-B, en la que se representan la cantidad de términos para cada nivel de cada ontología.

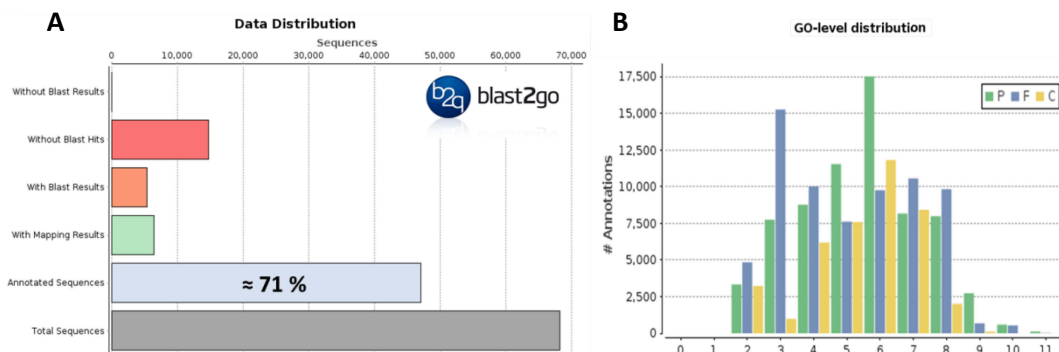


Figura 70. A; resumen de la anotación de las secuencias, estableciendo distintos niveles según el nivel alcanzado en el proceso. B; distribución de los términos GO para los niveles de ontología discriminando su procedencia; P, procesos biológicos, F, función molecular y C, componentes celulares.

La distribución general de los términos respecto a las tres ontologías revelaba en qué nivel se concentraban el mayor número de los mismos, siendo el nivel 3 para la función molecular y el nivel 6 para los procesos biológicos y para los componentes celulares.

Trinotate.

Con el objetivo de generar una segunda anotación sólida y significativa del transcriptoma se utilizó Trinotate (sourceforge.net), un paquete de herramientas diseñado para la anotación automática de transcriptomas, en especial en aquellos ensamblados *de novo* con la herramienta Trinity.

Trinotate utiliza un amplio rango de herramientas web de libre acceso que van desde aquellas que se basan en el alineamiento de secuencias (Blast), pasando por las de búsqueda de dominios proteicos (HMMER/PFAM, SignalP/tmHMM) hasta aquellas que comparan con bases de datos de proteínas caracterizadas (UniProt, eggNOG/GO) entre otras (Fig.71). Las anotaciones funcionales derivadas de los análisis con dichas herramientas se integran en una base de datos propia del tipo SQLite que permite una manipulación sencilla para la búsqueda y extracción de datos.



Figura 71. Resumen de las herramientas que utiliza el análisis con Trinotate.

Como punto de partida del proceso se buscaron las pautas abiertas de lectura en las secuencias del transcriptoma, filtrándolas por longitud en cada transcrito y se generó un archivo de las secuencias peptídicas más probables. Usando este archivo y el transcriptoma como base, se siguieron las instrucciones de

los desarrolladores y se analizaron con todas y cada una de las herramientas disponibles. Los datos de los análisis se incorporaron a la base de datos propia y revelaron que el 79% de las secuencias habían anotado y poseían términos GO asociados.

Análisis de expresión del transcriptoma de la raíz.

Finalmente y con objeto de conocer qué genes y en qué proporción se expresan en condiciones normales en la raíz del olivo, se realizó el análisis de expresión de muestras de raíces correspondientes a plantas no sometidas a ningún tipo de estrés o alteración. Los análisis de expresión de las muestras son un proceso independiente de la anotación, que comienza con el

alineamiento de las secuencias de partida o Raw data frente al transcriptoma final o secuencias seleccionadas, para ello se utilizó la herramienta Bowtie2 (Langmead y Salzberg 2012). Este mapeo de vuelta, alinea a cada transcrito aquellas lecturas cortas (*paired-end*) a partir de las cuales se generó, pero esta vez con el número total de secuencias de partida *paired-end* (para el alineamiento se realizó una normalización *in silico* de los “reads”). Tras el alineamiento, se realizó una estimación de la abundancia de lecturas que habían mapeado para cada transcrito, haciendo uso de la herramienta RSEM (Li y Dewey 2011), generando los datos FPKM (Fragments Per feature Kilobase per Million reads mapped), que son los que nos indican las lecturas que han mapeado para cada transcrito. El estudio de la expresión de los transcritos en las raíces en condiciones normales revelaba que 28.082 transcritos (41%) se estaban expresando en raíces (FPKM>0,00). Se extrajo la información referente a los transcritos con expresión de la base de datos de trinotate y los datos se cargaron en Blast2GO para realizar gráficos combinados de los términos GO para cada ontología, generando una visión general de los genes que se expresan en condiciones normales en la raíz (Fig.72). Los procesos biológicos principales parecen estar representados por el metabolismo y la regulación de la expresión génica mientras que en las funciones moleculares las actividades de unión a diferentes compuestos representan más del 60% (compuestos con estructuras cíclicas, iones y pequeñas moléculas). La mayor actividad en la raíz parece concentrarse a nivel de los orgánulos, estando más del 40% relacionado con la membrana de los mismos.

Un transcriptoma completo supone una herramienta útil para tener una visión general de los procesos que están ocurriendo en las situaciones estudiadas. En nuestro caso, el transcriptoma del olivo, anotado y con los análisis de expresión, queda a disposición para su uso en investigaciones posteriores.

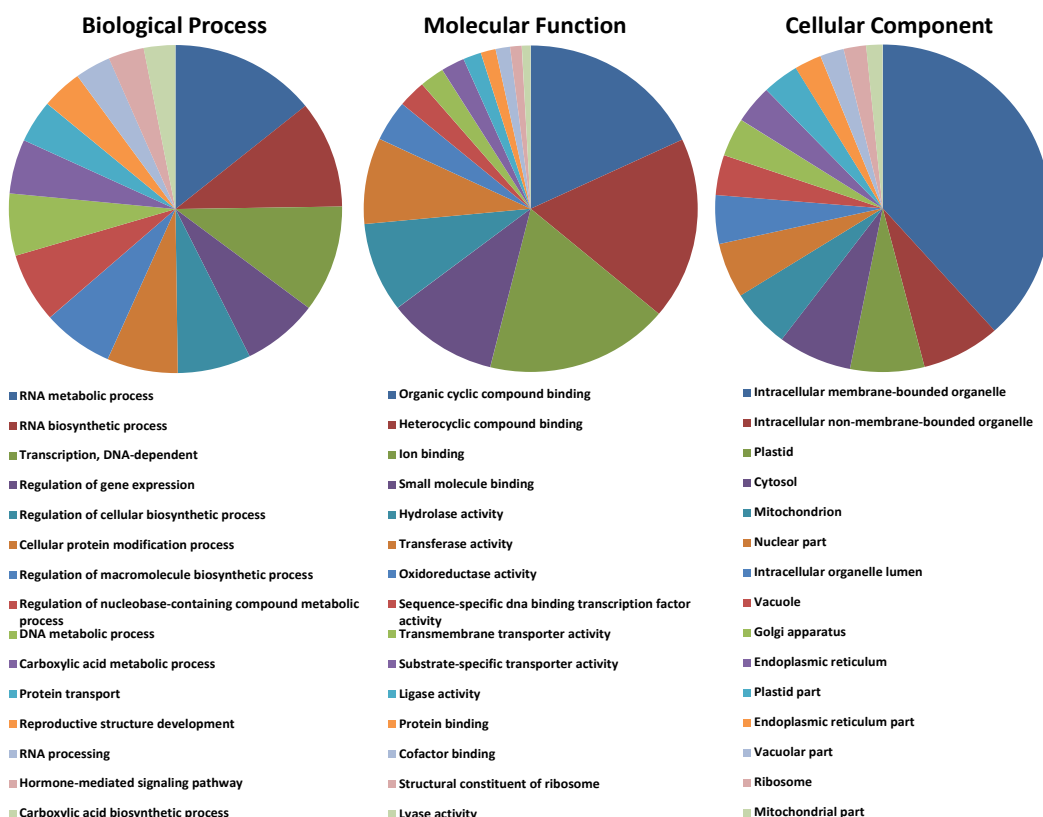


Figura 72. Gráficos funcionales de los términos GO mas representados de cada una de las ontologías, se muestran los 15 primeros, se han utilizado los niveles para los que la anotación encontraba mayor número de términos; nivel 6 para Procesos biológicos y Componentes celulares y nivel 3 para Función molecular.

DISCUSIÓN.

Actualmente, los avances de las técnicas de secuenciación del ADN a través de las tecnologías de nueva generación (NGS – Next Generation Sequencing) han revolucionado los campos de la genómica y la transcriptómica, abriendo un amplio abanico hacia el conocimiento global de los procesos biológicos. Concretamente la tecnología del RNA-seq nos permite una caracterización completa y un análisis global de una célula, tejido, órgano u organismo, aun sin ninguna información genómica previa, a través de la secuenciación de su ARN vía ADNc. Esta tecnología es capaz de generar una cobertura completa a nivel de transcritos, información de su secuencia y de su estructura de exones y posibles eventos de “splicing” alternativo.

Con el objetivo de generar un transcriptoma lo más completo posible de las raíces de olivo, se unieron muestras de raíces en condiciones normales con una serie de muestras de raíces procedentes de distintos experimentos de nuestro grupo de investigación, así como algunas de hoja, que conseguían una cobertura bastante amplia de los genes expresados en la raíz del olivo en distintas condiciones.

El proceso de secuenciación masiva, del que se llevaron a cabo dos réplicas técnicas, generó aproximadamente 740 M de lecturas *paired-end* (Tabla 12). Para aumentar la calidad mínima de las lecturas antes de proceder al ensamblaje, todas las muestras se filtraron para Q30 ($e=0,001$) eliminando en total 13 M de secuencias.

Antes de llevar a cabo un experimento de este tipo, usando la tecnología del RNAseq, hay que tener en cuenta una serie de factores que van a influir firmemente en el proceso y en los resultados. El primero y más importante es la cantidad de ARNm que suponemos vamos a obtener, es decir, en el caso de procariotas y organismos más sencillos cabría esperar un solo ARNm por cada gen, pero en organismos superiores un solo ARNm puede dar lugar a diferentes ARN maduros a causa del splicing alternativo. Además, el olivo posee una alta heterocigosidad, lo que acentúa mucho más este hecho. Cabe mencionar en este apartado que el olivo es una especie diploide, pero se han postulan algunos eventos de poliploidía parcial, evaluados a partir de análisis de microsatélites (Rallo et al. 2003), aunque estos estudios no se han confirmado en estudios posteriores (Besnard et al. 2008). Otro factor importante a tener en cuenta, que aumenta enormemente la complejidad del ensamblaje de un transcriptoma, es la mezcla con material genético de otras especies presentes en la rizosfera, ya que esta incluye una gran cantidad de especies del suelo en distinto grado de interacción con la raíz. En nuestro caso, además de las posibles especies que contiene la rizosfera, este hecho se acentúa al incluir muestras infectadas por el patógeno *V. dahliae*.

El ensamblaje del transcriptoma se realizó primeramente mediante una evaluación de los programas *SOAPdenovo-Trans*, *ABYSS* y *Trinity*, modificando algunas de las opciones de ensamblado. Para el ensamblado con el programa *SOAPdenovo* se utilizaron un amplio rango de valores para Kmer, cuyo análisis mostró un mayor porcentaje de secuencias ensambladas mayores de 1 kb y un N50 más elevado para el valor Kmer=63, siendo este el mayor valor utilizado (Tabla 13). El ensamblaje con la herramienta *ABYSS* (kmer=63) mostró menos cantidad de

secuencias mayores de 1 kb (la mitad que SOAPdenovo para el mismo valor de kmer) además del menor valor de N50, mientras que Trinity (con valor por defecto Kmer=25) mostró valores más elevados que los obtenidos con los programas anteriores. Para determinar las mejores condiciones de ensamblaje, se utilizaron parámetros cuantitativos comparables entre ensamblajes propios (nº de contigs, mayor longitud, N50 y porcentaje y número de contigs mayores de 1 kb) y ensamblajes de otros transcriptomas publicados de plantas, cuyo genoma está disponible (phytozome.net). Se utilizaron, de entre los disponibles, los transcriptomas de aquellas especies más cercanas al olivo desde un punto de vista filogenético; *M. guttatus* como representante del orden lamiales, al que pertenece el olivo, y *S. lycopersicum* como representante de un taxón superior, la subclase asterales (Fig.63). El análisis comparativo de los datos cuantitativos de ambos transcriptomas con los ensamblajes generados, mostró que con Trinity se habían conseguido los mejores resultados, aun siendo el número de contigs más de 20 veces superior al de los transcriptomas de referencia. Desde un punto de vista cualitativo se analizó la distribución de longitudes de los ensamblajes (Fig.64), tomando de nuevo como referencia las distribuciones de *M. guttatus* y *S. lycopersicum*, siendo la distribución del ensamblaje de la herramienta Trinity la que más se asemejaba a las referencias.

Una vez seleccionado el ensamblaje de Trinity, se llevó a cabo una reducción del tamaño en número de secuencias, que se abordó desde la limpieza de contaminantes. Para determinar qué contaminantes podíamos encontrar en el ensamblaje, se realizó un BlastX con las secuencias mayores de 1 kb, obteniendo una visión general de frente a qué especies alineaban las secuencias más largas (Fig.65). Se realizó entonces un alineamiento BlastN del ensamblaje de Trinity frente a una base de datos propia (Tabla 14) generada a partir de los datos de ADNc de plantas (*M. guttatus*, *S. lycopersicum*, *V. vinífera*, *A. thaliana* y *O. sativa*) y de los posibles contaminantes seleccionados (*V. dahliae*, *D. discoideum*, *H. sapiens*, *M. musculus*, *X. tropicalis*, *S. pombe*, *S. cerevisiae*, *E. coli* y el cloroplasto de *O. europaea*). Como resultado, 258.411 secuencias (37,8%) alinearon frente a la base de datos; 195.257 frente a plantas (28,7%) y 63.154 secuencias (9,1%) frente a contaminantes (Tabla 15). El resto, las 433.013 secuencias que no alinearon resultaron contener una gran cantidad de contigs de pequeño tamaño. Para intentar recuperar los posibles transcritos de plantas de las secuencias que no habían alineado con las secuencias de plantas que se habían incluido, se realizó un BlastX con aquellas cuya longitud superaba las 500 pb

(161.887 secuencias) frente a la base de datos de plantas de UniProtKB/SwissProt (*Viridiplantae database*). Se recuperaron 58.995 secuencias, de las que el 50% eran mayores a 1 kb, que se añadieron a que habían alineado con plantas en el BlastN anterior (195.257 secuencias), formando el transcriptoma que consideramos completo de 254.252 transcritos.

Como se ha comentado al comienzo de esta discusión, la tecnología del RNA-seq genera tal cobertura de los datos, que nos permite analizar las secuencias hasta mostrarnos transcritos diferentes procedentes de un mismo gen, resultado del *splicing* alternativo. Trinity facilita este proceso debido a la forma a la que identifica a los transcritos ensamblados, pudiendo fácilmente pasar de genes a transcritos. El transcriptoma se compone en este caso de 254.252 transcritos, reduciéndose este número hasta 68.259 secuencias ensambladas a nivel de genes. La distribución de longitudes del transcriptoma “limpio” es mucho más parecida a la que presentaban los transcriptomas de referencia y mejora la distribución del ensamblaje completo de Trinity (Fig.66).

El análisis con la herramienta FLN confirmó el elevado número de secuencias de plantas del transcriptoma final y mostraba que casi la mitad parecía poseer una estructura génica completa (Fig.67). Por último, se compararon los datos del análisis con los obtenidos para el transcriptoma de olivo recientemente publicado AS8 (Muñoz-Mérida et al. 2013), obteniéndose unos resultados parcialmente esperados, pues el filtrado de las secuencias que se había llevado a cabo, se realizó en base a la homología frente a las bases de datos de plantas.

La anotación funcional del transcriptoma se llevó a cabo con dos herramientas diferentes; Blast2GO y Trinotate, consiguiendo anotar significativamente el 71 y el 79% de las secuencias del transcriptoma. Los análisis estadísticos de Blast2GO mostraban que la mayor parte de los términos GO provenían de UniProtKB y en menor cantidad de TAIR (arabidopsis.org), la base de datos de Arabidopsis, y que más del 90% de las anotaciones poseían códigos de evidencia electrónicos (Fig.68), que son los códigos menos significativos, aunque es un desfase ampliamente aceptado, pues sería imposible anotar las secuencias individualmente. Uno de los objetivos cuando se anotan gran cantidad de datos, es asociar términos GO a cada una de las secuencias, que revelen información de su función y/o localización, independientemente de la especie que se esté estudiando. La distribución de procesos por niveles en cada una de las ontologías en que se dividen los términos GO (Procesos Biológicos (P), Funciones Moleculares (F) y Compartimentos Celulares (C)) mostró que había mayor representación de términos GO del nivel

3 para las funciones moleculares y del nivel 6 para los procesos biológicos y los componentes celulares. La anotación con trinode generó una base de datos propia de fácil acceso que resume datos de alineamientos de secuencias, dominios conservados, predicción peptídica, rutas metabólicas, etc., además de los términos GO asociados a las secuencias. Ambas herramientas generaban una anotación significativa para los análisis posteriores, pudiendo tener dos aproximaciones a los datos experimentales que se establecieran en cada caso, aunque se obtenía un mayor porcentaje de anotación de secuencias con la plataforma trinode.

El análisis de los genes que se expresaban en la raíz en condiciones normales mostraba que los procesos generales que ocurren, mediante el estudio de los términos GO asociados a los transcritos, están relacionados con el metabolismo y biosíntesis de ARN, la transcripción y la regulación génica (43%) si atendemos a los procesos biológicos, a la unión a compuestos cíclicos, iones y pequeñas moléculas (65%) en las funciones moleculares y que la mayor parte de ellos ocurren intracelularmente en orgánulos celulares (85%), siendo en su mayoría a nivel de las membranas celulares (38%) según los datos de la ontología de componentes celulares. La mayor parte de los procesos parecen estar relacionados con el transporte de sustancias y la regulación transcripcional.

Este tipo de análisis de términos GO generan una visión global de lo que está ocurriendo en las muestras objeto de estudio en momentos concretos, para cada una de las tres ontologías (P, F y C), aunque la información está basada en su mayor parte en evidencias electrónicas que no son las que poseen los mayores valores de significación. Hasta que no se obtengan más datos procedentes de la experimentación, comprender toda la información que se genera y a la velocidad que ocurre en los últimos años, es una tarea ardua prácticamente inalcanzable.

El transcriptoma generado mediante esta metodología de trabajo, intenta dar cabida al análisis de diversos experimentos que se están desarrollando en este momento en nuestro grupo de investigación. Resultando en una herramienta útil para el análisis posterior de la expresión diferencial entre las situaciones que comprenden las muestras utilizadas para el RNA-seq. En cuanto a las secuencias ensambladas que no alinearon frente a las bases de datos, son un buen punto de partida para el estudio de genes de plantas no descritos y sería muy interesante el estudio de su expresión en las diferentes muestras.

Conclusiones

Conclusions

Las conclusiones que se extraen del desarrollo del trabajo y los resultados de esta Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Se ha descrito una familia de genes *JAT* en olivo, dentro de la cual se han caracterizado 3 parálogos, cuya estructura genómica consta de 5 exones y 4 intrones.
2. La localización tisular de la proteína JAT está asociada a los haces vasculares y a tejidos que presentan un crecimiento activo.
3. Un déficit del gen *JAT* en *Arabidopsis* provoca un retraso en el crecimiento inicial de las raíces, pero no en su elongación final.
4. Se han identificado 253 genes expresados diferencialmente entre raíces juveniles y adultas en olivo, cuya anotación revela un amplio rango de procesos biológicos cubierto por los genes expresados diferencialmente en raíces juveniles, mientras que en raíces adultas se concentran en 5 procesos principales.
5. Se han identificado 16 unigenes específicos de raíces de olivo entre los cuales podría encontrarse la emisión de la señal de juvenilidad que se supone que producen las raíces.
6. Se ha ensamblado un transcriptoma del olivo que engloba ampliamente la expresión diferencial de las raíces y se ha analizado la expresión de los genes de la raíz.

The conclusions extracted from the development work and the results of this dissertation are:

1. A family of *JAT* genes has been described in olive. In this, three paralogs were characterized; whose genomic structure contains 5 exons and 4 introns.
2. Tissue localization of JAT protein is associated with the vascular bundles and active growth tissues.
3. A deficit of *JAT* gene in *Arabidopsis* causes a delay in the initial roots growth, but not in its final elongation.
4. A total of 253 genes differentially expressed were found between juvenile and adult roots in olive, whose annotation reveals a wide range of biological processes covered by the juvenile roots genes, while five main processes concentrated them in adult roots.
5. A group of 16 specific olive root unigenes were identified among which it could be found the juvenility signal emitting that is supposed to be produced by the root.
6. An olive transcriptome was assembled which widely includes roots differential expression genes and the root genes expression was analyzed.

Bibliografía

- Abu-Abied, M., D. Szwedzarszf, I. Mordehaev, A. Levy, E. Belausov, Y. Yaniv, S. Uliel, M. Katzenellenbogen, J. Riov and R. Ophir** (2012). "Microarray analysis revealed upregulation of nitrate reductase in juvenile cuttings of *Eucalyptus grandis*, which correlated with increased nitric oxide production and adventitious root formation." The Plant Journal **71**(5): 787-799.
- Ahuja, M. R.** (1993). Micropropagation of woody plants, Springer.
- Allsopp, A.** (1967). "Heteroblastic development in vascular plants." (0065-2962).
- Anders, S. and W. Huber** (2012). "Differential expression of RNA-Seq data at the gene level—the DESeq package."
- Anderson, M. B. and J. H. Cherry** (1969). "Differences in leucyl-transfer RNA's and synthetase in soybean seedlings." Proceedings of the National Academy of Sciences **62**(1): 202-209.
- Angiolillo, A., M. Mencuccini and L. Baldoni** (1999). "Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms." Theoretical and Applied Genetics **98**(3-4): 411-421.
- Arazi, T., M. Talmor-Neiman, R. Stav, M. Riese, P. Huijser and D. C. Baulcombe** (2005). "Cloning and characterization of micro-RNAs from moss." The Plant Journal **43**(6): 837-848.
- Ashburner, M., C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight and J. T. Eppig** (2000). "Gene Ontology: tool for the unification of biology." Nature genetics **25**(1): 25-29.
- Axtell, M. J. and D. P. Bartel** (2005). "Antiquity of microRNAs and their targets in land plants." The Plant Cell Online **17**(6): 1658-1673.
- Axtell, M. J. and J. L. Bowman** (2008). "Evolution of plant microRNAs and their targets." Trends in plant science **13**(7): 343-349.
- Bach-Faig, A., E. M. Berry, D. Lairon, J. Reguant, A. Trichopoulou, S. Dernini, F. X. Medina, M. Battino, R. Belahsen, G. Miranda, L. Serra-Majem and G. Mediterranean Diet Foundation Expert** (2011). "Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates." Public Health Nutr **14**(12A): 2274-2284.
- Baldoni, L. and A. Belaj** (2010). Olive. Oil Crops. J. Vollmann and I. Rajcan, Springer New York. **4**: 397-421.
- Baldoni, L., N. G. Cultrera, R. Mariotti, C. Ricciolini, S. Arcioni, G. G. Vendramin, A. Buonamici, A. Porceddu, V. Sarri and M. A. Ojeda** (2009). "A consensus list of microsatellite markers for olive genotyping." Molecular Breeding **24**(3): 213-231.

- Baldoni, L., N. Tosti, C. Ricciolini, A. Belaj, S. Arcioni, G. Pannelli, M. A. Germana, M. Mulas and A. Porceddu** (2006). "Genetic structure of wild and cultivated olives in the central Mediterranean basin." *Ann Bot* **98**(5): 935-942.
- Bartolini, G.** (2008). "*Olea* databases."
- Basheer-Salimina, R. A. S., G. Diamantidis, M. Vasilakakis, A. Patakas, V. Noitsakis and A. Bosabalidis** (2004). "Morphological-Anatomical and Biochemical Differences between Leaves of Non-Pruned (Central Leader) and Rejuvenated Olive Trees (*Olea europaea* L. cv. *Chondrolia Chalkidikis*)."
V International Symposium on Olive Growing **791**: 241-248.
- Basu, S., P. Fey, Y. Pandit, R. Dodson, W. A. Kibbe and R. L. Chisholm** (2013). "dictyBase 2013: integrating multiple Dictyostelid species." *Nucleic acids research* **41**(D1): D676-D683.
- Bateman, A., L. Coin, R. Durbin, R. D. Finn, V. Hollich, S. Griffiths-Jones, A. Khanna, M. Marshall, S. Moxon and E. L. L. Sonnhammer** (2004). "The Pfam protein families database." *Nucleic acids research* **32**(suppl 1): D138-D141.
- Bäurle, I. and C. Dean** (2006). "The timing of developmental transitions in plants." *Cell* **125**(4): 655-664.
- Beemster, G. T. S., F. Fiorani and D. Inzé** (2003). "Cell cycle: the key to plant growth control?" *Trends in plant science* **8**(4): 154-158.
- Belaj, A., M. C. Dominguez-García, S. G. Atienza, N. Martín-Urdíroz, R. De La Rosa, Z. Satovic, A. Martín, A. Kilian, I. Trujillo, V. Valpuesta and C. Río** (2012). "Developing a core collection of olive (*Olea europaea* L.) based on molecular markers (DARts, SSRs, SNPs) and agronomic traits." *Tree Genetics & Genomes* **8**(2): 365-378.
- Belaj, A., C. Muñoz-Diez, L. Baldoni, A. Porceddu, D. Barranco and Z. Satovic** (2007). "Genetic diversity and population structure of wild olives from the north-western Mediterranean assessed by SSR markers." *Ann Bot* **100**(3): 449-458.
- Belaj, A., L. Rallo, I. Trujillo and L. Baldoni** (2004). "Using RAPD and AFLP Markers to Distinguish Individuals Obtained by Clonal Selection of Arbequina and Manzanilla de Sevilla Olive." *HortScience* **39**(7): 1566-1570.
- Belaj, A., Z. Satovic, L. Rallo and I. Trujillo** (2002). "Genetic diversity and relationships in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA." *Theor Appl Genet* **105**(4): 638-644.
- Belaj, A., I. Trujillo and L. Rallo** (2002). "RAPD'S analysis support the autochthon origin of olive cultivars." *Acta Hort. (ISHS)*(586): 83-86.

- Bell, R. L. and R. H. Zimmerman** (1990). "Combining ability analysis of juvenile period in pear." HortScience **25**(11): 1425-1427.
- Bellini, E.** (1990). "Behaviour of some genetic characters in olive seedlings obtained by cross-breeding." Fruit Breeding and Genetics. **317**: 197-208.
- Bellini, E.** (1993). "Genetic variability and heritability of some characters in cross-bred olive seedlings." Olivae **49**: 21-34.
- Bergonzi, S. and M. C. Albani** (2011). "Reproductive competence from an annual and a perennial perspective." Journal of experimental botany **62**(13): 4415-4422.
- Bernal, A. J., C. M. Yoo, M. Mutwil, J. K. Jensen, G. Hou, C. Blaukopf, I. Sørensen, E. B. Blancaflor, H. V. Scheller and W. G. T. Willats** (2008). "Functional analysis of the cellulose synthase-like genes CSLD1, CSLD2, and CSLD4 in tip-growing Arabidopsis cells." Plant Physiology **148**(3): 1238-1253.
- Besnard, G., P. H. Baradat, D. Chevalier, A. Tagmount and A. Bervillé** (2001). "Genetic differentiation in the olive complex (*Olea europaea*) revealed by RAPDs and RFLPs in the rRNA genes." Genetic Resources and Crop Evolution **48**(2): 165-182.
- Besnard, G. and A. Berville** (2000). "Multiple origins for Mediterranean olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea*) based upon mitochondrial DNA polymorphisms." C R Acad Sci III **323**(2): 173-181.
- Besnard, G. and A. Berville** (2002). "On chloroplast DNA variations in the olive (*Olea europaea* L.) complex: comparison of RFLP and PCR polymorphisms." Theor Appl Genet **104**(6-7): 1157-1163.
- Besnard, G., C. Garcia-Verdugo, R. R. De Casas, U. A. Treier, N. Galland and P. Vargas** (2008). "Polyploidy in the olive complex (*Olea europaea*): evidence from flow cytometry and nuclear microsatellite analyses." Ann Bot **101**(1): 25-30.
- Besnard, G., P. Henry, L. Wille, D. Cooke and E. Chapuis** (2007). "On the origin of the invasive olives (*Olea europaea* L., *Oleaceae*)." Heredity (Edinb) **99**(6): 608-619.
- Besnard, G., P. Hernández, B. Khadari, G. Dorado and V. Savolainen** (2011). "Genomic profiling of plastid DNA variation in the Mediterranean olive tree." BMC plant biology **11**(1): 80.
- Besnard, G., B. Khadari, P. Baradat and A. Berville** (2002). "Combination of chloroplast and mitochondrial DNA polymorphisms to study cytoplasm genetic differentiation in the olive complex (*Olea europaea* L.)." Theor Appl Genet **105**(1): 139-144.

- Besnard, G., B. Khadari, P. Baradat and A. Berville** (2002). "*Olea europaea* (Oleaceae) phylogeography based on chloroplast DNA polymorphism." Theor Appl Genet **104**(8): 1353-1361.
- Besnard, G., B. Khadari, P. Villemur and A. Bervillé** (2000). "Cytoplasmic male sterility in the olive (*Olea europaea* L.)." Theoretical and Applied Genetics **100**(7): 1018-1024.
- Besnard, G., R. Rubio de Casas and P. Vargas** (2007). "Plastid and nuclear DNA polymorphism reveals historical processes of isolation and reticulation in the olive tree complex (*Olea europaea*)." Journal of Biogeography **34**(4): 736-752.
- Biesalski, H. K.** (2007). "Polyphenols and inflammation: basic interactions." Current opinion in clinical nutrition and metabolic care **10**(6): 724-728.
- BingXin, L. U., Z. ZhenBing and S. H. I. TieLiu** (2013). "Comparative study of *de novo* assembly and genome-guided assembly strategies for transcriptome reconstruction based on RNA-Seq." Science.
- Blake, P. S., G. Browning, L. J. Benjamin and L. N. Mander** (2000). "Gibberellins in seedlings and flowering trees of *Prunus avium* L." Phytochemistry **53**(4): 519-528.
- Blattner, F. R., G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode and G. F. Mayhew** (1997). "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12." Science **277**(5331): 1453-1462.
- Bogani, P., D. Cavalieri, R. Petruccelli, L. Polsinelli and G. Roselli** (1994). "Identification of olive tree cultivars by using random amplified polymorphic DNA." Acta Hort. **356**: 98-101.
- Boland, D. J., M. H. Brooker, G. M. Chippendale, N. Hall, B. P. M. Hyland, R. D. Johnston, D. A. Kleinig, M. W. McDonald and J. D. Turner** (2006). Forest trees of Australia, CSIRO publishing.
- Bousquet, J., P. Cour, B. Guerin and F. B. Michel** (1984). "Allergy in the Mediterranean area I. Pollen counts and pollinosis of Montpellier." Clinical & Experimental Allergy **14**(3): 249-258.
- Bowes, J. B., K. A. Snyder, E. Segerdell, C. J. Jarabek, K. Azam, A. M. Zorn and P. D. Vize** (2010). "Xenbase: gene expression and improved integration." Nucleic acids research **38**(suppl 1): D607-D612.
- Bracci, T., M. Busconi, C. Fogher and L. Sebastiani** (2011). "Molecular studies in olive (*Olea europaea* L.): overview on DNA markers applications and recent advances in genome analysis." Plant Cell Rep **30**(4): 449-462.

- Bradford, M. M.** (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical biochemistry **72**(1): 248-254.
- Brink, R. A.** (1962). "Phase change in higher plants and somatic cell heredity." Quarterly Review of Biology: 1-22.
- Bronzini, C. V., J. Giannettini, C. Gambotti and J. Maury** (2002). "Genetic relationships between cultivated and wild olives of Corsica and Sardinia using RAPD markers." Euphytica **123**(2): 263-271.
- Bullock, W. O.** (1987). "XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection." Bio Techniques **5**: 376-378.
- Burns, R. G.** (1991). " α -, β -, and γ -tubulins: Sequence comparisons and structural constraints." Cell motility and the cytoskeleton **20**(3): 181-189.
- Busconi, M., L. Sebastiani and C. Fogher** (2006). "Development of SCAR Markers for Germplasm Characterisation in Olive Tree (*Olea europaea* L.)." Molecular Breeding **17**(1): 59-68.
- C.E._nº_1234/2007** "Reglamento del consejo de 22 octubre de 2007 nº 1234/2007."
- C.O.I.** "OLIVÆ, Consejo Oleícola Internacional." Revista Oficial del Consejo Oleícola Internacional **117**.
- Cairns, J. R. K. and A. Esen** (2010). " β -Glucosidases." Cellular and Molecular Life Sciences **67**(20): 3389-3405.
- Calderon, M. A., F. E. R. Simons, H. J. Mallng, R. F. Lockey, P. Moingeon and P. Demoly** (2012). "Sublingual allergen immunotherapy: mode of action and its relationship with the safety profile." Allergy **67**(3): 302-311.
- Carlsbecker, A., K. Tandre, U. Johanson, M. Englund and P. Engström** (2004). "The MADS-box gene *DAL1* is a potential mediator of the juvenile-to-adult transition in Norway spruce (*Picea abies*)." The Plant Journal **40**(4): 546-557.
- Carpenter, J. L., S. E. Ploense, D. P. Snustad and C. D. Silflow** (1992). "Preferential expression of an alpha-tubulin gene of Arabidopsis in pollen." The Plant Cell Online **4**(5): 557-571.
- Carriero, F., G. Fontanazza, F. Cellini and G. Giorio** (2002). "Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.)." Theor Appl Genet **104**(2-3): 301-307.

- Cipriani, G., M. T. Marrazzo, R. Marconi, A. Cimato and R. Testolin** (2002). "Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars." Theor Appl Genet **104**(2-3): 223-228.
- Claros, M. G., R. Bautista, D. Guerrero-Fernández, H. Benzerki, P. Seoane and N. Fernández-Pozo** (2012). "Why Assembling Plant Genome Sequences Is So Challenging." Biology **1**(2): 439-459.
- Collins, F. S., E. S. Lander, J. Rogers, R. H. Waterston and I. Conso** (2004). "Finishing the euchromatic sequence of the human genome." nature **431**(7011): 931-945.
- Conesa, A., S. Götz, J. M. Garcia-Gomez, J. Terol, M. Talon and M. Robles** (2005). "Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research." Bioinformatics **21**(September): 3674-3676.
- Contiñas, A., S. Martínez, J. Carballo and I. Franco** (2008). "Detección de adulteraciones y/o contaminaciones del aceite de oliva virgen extra con aceites de semillas y aceite de orujo de oliva."
- Coupland, G.** (1995). "Genetic and environmental control of flowering time in *Arabidopsis*." Trends in Genetics **11**(10): 393-397.
- Covas, M. I.** (2007). "Olive oil and the cardiovascular system." Pharmacol Res **55**(3): 175-186.
- Cuperus, J. T., N. Fahlgren and J. C. Carrington** (2011). "Evolution and functional diversification of MIRNA genes." The Plant Cell Online **23**(2): 431-442.
- Cherry, J. H. and D. J. Osborne** (1970). "Specificity of leucyl-tRNA and synthetase in plants." Biochemical and Biophysical Research Communications **40**(4): 763-769.
- Christopoulou, E., M. Lazaraki, M. Komaitis and K. Kaselimis** (2004). "Effectiveness of determinations of fatty acids and triglycerides for the detection of adulteration of olive oils with vegetable oils." Food Chemistry **84**(3): 463-474.
- Chuck, G., A. M. Cigan, K. Saeteurn and S. Hake** (2007). "The heterochronic maize mutant *Corngrass1* results from overexpression of a tandem microRNA." Nature genetics **39**(4): 544-549.
- Church, D. M., L. Goodstadt, L. W. Hillier, M. C. Zody, S. Goldstein, X. She, C. J. Bult, R. Agarwala, J. L. Cherry and M. DiCuccio** (2009). "Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse." PLoS biology **7**(5): e1000112.

- D'Amato, G., J. Mullins, N. Nolard, F. T. M. Spieksma and R. Wachter** (1988). "City spore concentrations in the European Economic Community (EEC). VII. *Oleaceae* (*Fraxinus*, *Ligustrum*, *Olea*)." Clinical & Experimental Allergy **18**(6): 541-547.
- D'Imperio, M., V. Viscosi, M.-T. Scarano, M. D'Andrea, B. A. Zullo and F. Pilla** (2011). "Integration between molecular and morphological markers for the exploitation of olive germoplasm (*Olea europaea*)." Scientia Horticulturae **130**(1): 229-240.
- Daehler, C. C., M. Yorkston, W. Sun and N. Dudley** (1999). "Genetic variation in morphology and growth characters of *Acacia koa* in the Hawaiian Islands." International Journal of Plant Sciences **160**(4): 767-773.
- Davin, L. B. and N. G. Lewis** (2000). "Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis." Plant Physiology **123**(2): 453-462.
- Day, J. S., K. S. Gould and P. E. Jammeson** (1997). "Vegetative architecture of *Elaeocarpus hookerianus*. Transition from juvenile to adult." Ann Bot **79**(6): 617-624.
- Dayton, D. F.** (1966). "Chemical induction of flowering in triploid apple progenies." HortScience **1**: 92-93.
- De la Rosa, C. M. James and K. R. Tobutt** (2004). "Using microsatellites for paternity testing in olive progenies." HortScience **39**(2): 351-354.
- De la Rosa, R., A. Angiolillo, C. Guerrero, M. Pellegrini, L. Rallo, G. Besnard, A. Berville, A. Martin and L. Baldoni** (2003). "A first linkage map of olive (*Olea europaea* L.) cultivars using RAPD, AFLP, RFLP and SSR markers." Theor Appl Genet **106**(7): 1273-1282.
- De La Rosa, R., C. M. James and K. R. Tobutt** (2002). "Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the *Oleaceae*." Molecular Ecology Notes **2**(3): 265-267.
- De La Rosa, R., C. M. James and K. R. Tobutt** (2004). "Using microsatellites for paternity testing in olive progenies." HortScience **39**(2): 351-354.
- De la Rosa, R., A. I. Kiran, D. Barranco and L. León** (2006). "Seedling vigour as a preselection criterion for short juvenile period in olive breeding." Crop and Pasture Science **57**(4): 477-481.
- De la Rosa, R. and L. León** (2009). "Nuevas variedades y perspectivas futuras de la mejora vegetal del olivo." Vida Rural **292**: 41-44.

- Díaz, A., R. De la Rosa, P. Rallo, C. Muñoz-Díez, I. Trujillo, D. Barranco, A. Martín and A. Belaj (2007). "Selections of an olive breeding program identified by microsatellite markers." Crop Science **47**(6): 2317-2322.
- Díaz, A., A. Martín, P. Rallo, D. Barranco and R. De la Rosa (2006). "Self-incompatibility of Arbequina and Picual Olive Assessed by SSR Markers." Journal of the American Society for Horticultural Science **131**(2): 250-255.
- Díaz, A., A. Martín, P. Rallo and R. De la Rosa (2007). "Cross-compatibility of the parents as the main factor for successful olive breeding crosses." Journal of the American
Domínguez-García, M. C., A. Belaj, R. De la Rosa, Z. Satovic, K. Heller-Uszynska, A. Kilian, A. Martín and S. G. Atienza (2012). "Development of DArT markers in olive (*Olea europaea* L.) and usefulness in variability studies and genome mapping." Scientia Horticulturae **136**(0): 50-60.
- Donini, P., V. Sarri, L. Baldoni, A. Porceddu, N. G. M. Cultrera, A. Contento, M. Frediani, A. Belaj, I. Trujillo and P. G. Cionini (2006). "Microsatellite markers are powerful tools for discriminating among olive cultivars and assigning them to geographically defined populations." Genome **49**(12): 1606-1615.
- Duffort, O., O. Palomares, M. Lombardero, M. Villalba, D. Barber, R. Rodríguez and F. Polo (2006). "Variability of Ole e 9 allergen in olive pollen extracts: relevance of minor allergens in immunotherapy treatments." International archives of allergy and immunology **140**(2): 131-138.
- Duro, G., V. Izzo and R. Barbieri (1993). "Methods for recovering nucleic acid fragments from agarose gels." Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications **618**(1): 95-104.
- Endo, T., T. Shimada, H. Fujii, Y. Kobayashi, T. Araki and M. Omura (2005). "Ectopic expression of an *FT* homolog from *Citrus* confers an early flowering phenotype on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.)." Transgenic research **14**(5): 703-712.
- Erre, P., I. Chessa, C. Muñoz-Díez, A. Belaj, L. Rallo and I. Trujillo (2010). "Genetic diversity and relationships between wild and cultivated olives (*Olea europaea* L.) in Sardinia as assessed by SSR markers." Genetic Resources and Crop Evolution **57**(1): 41-54.
- Evans, M. M., H. J. Passas and R. S. Poethig (1994). "Heterochronic effects of glossy15 mutations on epidermal cell identity in maize." Development **120**(7): 1971-1981.
- Evans, M. M. and R. S. Poethig (1995). "Gibberellins promote vegetative phase change and reproductive maturity in maize." Plant Physiology **108**(2): 475-487.

- Fabbri, A., J. I. Hormaza and V. S. Polito** (1995). "Random Amplified Polymorphic DNA Analysis of Olive (*Olea europaea* L.) Cultivars." Journal of the American Society for Horticultural Science **120**(3): 538-542.
- Fattash, I., B. Voß, R. Reski, W. R. Hess and W. Frank** (2007). "Evidence for the rapid expansion of microRNA-mediated regulation in early land plant evolution." BMC plant biology **7**(1): 13.
- Favery, B., E. Ryan, J. Foreman, P. Linstead, K. Boudonck, M. Steer, P. Shaw and L. Dolan** (2001). "KOJAK encodes a cellulose synthase-like protein required for root hair cell morphogenesis in Arabidopsis." Genes & development **15**(1): 79-89.
- Fernández-Ocaña, A., M. C. García-López, J. Jiménez-Ruiz, L. Saniger, D. Macías, F. Navarro, R. Oya, A. Belaj, R. de la Rosa and F. J. Corpas** (2010). "Identification of a gene involved in the juvenile-to-adult transition (*JAT*) in cultivated olive trees." Tree Genetics & Genomes **6**(6): 891-903.
- Finn, R. D., J. Clements and S. R. Eddy** (2011). "HMMER web server: interactive sequence similarity searching." Nucleic acids research **39**(supl 2): W29-W37.
- Flachowsky, H., A. Peil, T. Sopanen, A. Elo and V. Hanke** (2007). "Overexpression of *BpMADS4* from silver birch (*Betula pendula* Roth.) induces early-flowering in apple (*Malus domestica* Borkh.)." Plant Breeding **126**(2): 137-145.
- Flores, H. E., J. M. Vivanco and V. M. Loyola-Vargas** (1999). "'Radicle' biochemistry: the biology of root-specific metabolism." Trends in plant science **4**(6): 220-226.
- Florida, J. F., P. G. Delgado, B. S. de San Pedro, Q. J., d. S. J.M.A., P. V. and V. L.R.** (1999). "High levels of *Olea europaea* pollen and relation with clinical findings." International archives of allergy and immunology **119**(2): 133-137.
- Fontanazza, G. and L. Baldoni** (1990). "Proposed programme for the genetic improvement of the olive." Olivae(34): 32-40.
- Fornara, F. and G. Coupland** (2009). "Plant phase transitions make a SPLash." Cell **138**(4): 625-627.
- Frazer, K. A., L. Pachter, A. Poliakov, E. M. Rubin and I. Dubchak** (2004). "VISTA: computational tools for comparative genomics." Nucleic acids research **32**(supl 2): W273-W279.
- Galili, E., D. J. Stanley, J. Sharvit and M. Weinstein-Evron** (1997). "Evidence for Earliest Olive-Oil Production in Submerged Settlements off the Carmel Coast, Israel." Journal of Archaeological Science **24**(12): 1141-1150.

- Galili, E., M. Weinstein-Evron and D. Zohary** (1989). "Appearance of olives in submerged Neolithic sites along the Carmel Coast." Journal of the Israel Prehistoric Society **22**: 95-97.
- Gallus, S., P. Colombo, V. Scarpino, P. Zuccaro, E. Negri, A. G. and C. La Vecchia** (2006). "Overweight and obesity in Italian adults 2004, and an overview of trends since 1983." European Journal of Clinical Nutrition **60**: 1174-1179.
- García-Díaz, A., R. Oya, A. Sánchez and F. Luque** (2003). "Effect of prolonged vegetative reproduction of olive tree cultivars (*Olea europaea* L.) in mitochondrial homoplasmy and heteroplasmy." Genome **46**(3): 377-381.
- García-López, M. C., I. Vidoy, J. Jiménez-Ruiz, A. Muñoz-Mérida, A. Fernández-Ocaña, R. de la Rosa, J. B. Barroso, F. Navarro, O. Trelles, C. R. Beuzón, A. Barceló, V. Valpuesta and F. Luque** (Aceptado). "Genetic changes involved in the juvenile-to-adult transition in the shoot apex of *Olea europaea* L. occurs years before the first flowering." Tree Genetics & Genomes.
- Garcia, J. L., N. Avidan, A. Troncoso, R. Sarmiento and S. Lavee** (2000). "Possible juvenile-related proteins in olive tree tissues." Scientia Horticulturae **85**(4): 271-284.
- Gebhardt, J. S. and C. N. McDaniel** (1991). "Flowering response of day-neutral and short-day cultivars of *Nicotiana tabacum* L. interactions among roots, genotype, leaf ontogenic position and growth conditions." Planta **185**(4): 513-517.
- Gemas, V. J., M. J. Rijo-Johansen, R. Tenreiro and P. Feveireiro** (2000). "Inter-and intra-varietal analysis of three *Olea europaea* L. cultivars using the RAPD technique." Journal of Horticultural Science and Biotechnology **75**(3): 312-319.
- Gemas, V. J. V., M. C. Almadanim, R. Tenreiro, A. Martins and P. Feveireiro** (2004). "Genetic diversity in the Olive tree (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) cultivated in Portugal revealed by RAPD and ISSR markers." Genetic Resources and Crop Evolution **51**(5): 501-511.
- Giacosa, A., R. Barale, L. Bavaresco, P. Gatenby, V. Gerbi, J. Janssens, B. Johnston, K. Kas, C. La Vecchia, P. Mainguet, P. Morazzoni, E. Negri, C. Pelucchi, M. Pezzotti and M. Rondanelli** (2013). "Cancer prevention in Europe: the Mediterranean diet as a protective choice." Eur J Cancer Prev **22**(1): 90-95.
- Giaever, G., A. M. Chu, L. Ni, C. Connelly, L. Riles, S. Veronneau, S. Dow, A. Lucau-Danila, K. Anderson and B. Andre** (2002). "Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome." nature **418**(6896): 387-391.

- Gil, F. S., M. Busconi, A. Da CÂMara Machado and C. Fogher** (2006). "Development and characterization of microsatellite loci from *Olea europaea*." Molecular Ecology Notes **6**(4): 1275-1277.
- Godley, E. J.** (1985). "Paths to maturity." New Zealand journal of botany **23**(4): 687-706.
- Grabherr, M. G., B. J. Haas, M. Yassour, J. Z. Levin, D. A. Thompson, I. Amit, X. Adiconis, L. Fan, R. Raychowdhury and Q. Zeng** (2011). "Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome." Nature biotechnology **29**(7): 644-652.
- Green, P. S.** (2002). "A revision of *Olea* L. (*Oleaceae*)." Kew Bulletin **140**: 57-91.
- Green, P. S. and G. I. Wickens** (1989). "The *Olea europaea* complex." Kit Tan (ed.) The Davis and Hedge Festschrift: 287-299.
- Greenwood, M. S.** (1987). "Rejuvenation of forest trees." Plant Growth Regulation **6**(1-2): 1-12.
- Greenwood, M. S.** (1995). "Juvenility and maturation in conifers: current concepts." Tree Physiology **15**(7-8): 433-438.
- Grigg, D.** (2001). "Olive oil, the Mediterranean and the world." GeoJournal **53**(2): 163-172.
- Gruenheit, N., O. Deusch, C. Esser, M. Becker, C. Voelckel and P. Lockhart** (2012). "Cutoffs and k-mers: implications from a transcriptome study in allopolyploid plants." BMC genomics **13**(1): 92.
- Guerin, J. R., S. M. Sweeney, G. G. Collins and M. Sedgley** (2002). "The development of a genetic database to identify olive cultivars." Journal of the American Society for Horticultural Science **127**(6): 977-983.
- Hackett, W. P.** (1985). "Juvenility, maturation, and rejuvenation in woody plants." Horticultural Reviews, Volume 7: 109-155.
- Hakim, I. R., N. G. Kammoun, E. Makhloufi and A. Rebaï** (2009). "Discovery and potential of SNP markers in characterization of Tunisian olive germplasm." Diversity **2**(1): 17-27.
- Hansche, P. E.** (1986). "Heritability of juvenility in peach." HortScience. **21**(5).
- Harashima, H. and A. Schnittger** (2010). "The integration of cell division, growth and differentiation." Current opinion in plant biology **13**(1): 66-74.

- Hartmann, H. T., D. E. Kester, J. F. T. Davies and R. L. Geneve** (2002). Plant propagation: principles and practices. (Edn. 7th).
- Haumann, B. F.** (1996). "Olive oil. Mediterranean product consumed worldwide." INFORM International News on Fats, Oils and Related Materials **7**(9): 890-903.
- Hess, J., J. W. Kadereit and P. Vargas** (2000). "The colonization history of *Olea europaea* L. in Macaronesia based on internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences, randomly amplified polymorphic DNAs (RAPD), and intersimple sequence repeats (ISSR)." Mol Ecol **9**(7): 857-868.
- Hess, W. R. and T. Börner** (1999). "Organellar RNA polymerases of higher plants." International review of cytology **190**: 1-59.
- Hopkinson, J. M. and R. L. Ison** (1982). "Investigations of ripeness to flower in tobacco." Field Crops Research **5**: 335-348.
- Huang, C. L. and B. E. Sumpio** (2008). "Olive oil, the mediterranean diet, and cardiovascular health." J Am Coll Surg **207**(3): 407-416.
- Huijser, P. and M. Schmid** (2011). "The control of developmental phase transitions in plants." Development **138**(19): 4117-4129.
- Hunter, S., P. Jones, A. Mitchell, R. Apweiler, T. K. Attwood, A. Bateman, T. Bernard, D. Binns, P. Bork and S. Burge** (2012). "InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database." Nucleic acids research **40**(D1): D306-D312.
- Jager, S. M., S. Maughan, W. Dewitte, S. Scofield and J. A. H. Murray** (2005). "The developmental context of cell-cycle control in plants." Seminars in cell & developmental biology **16**(3): 385-396.
- Jaillon, O., J. M. Aury, B. Noel, A. Policriti, C. Clepet, A. Casagrande, N. Choisne, S. Aubourg, N. Vitulo and C. Jubin** (2007). "The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla." nature **449**(7161): 463-467.
- Jeon, J. S., S. Lee, K. H. Jung, S. H. Jun, C. M. Kim and G. An** (2000). "Tissue-preferential expression of a rice α -tubulin gene, *OsTubA1*, mediated by the first intron." Plant Physiology **123**(3): 1005-1014.
- Joyce, C. M., R. Villemur, D. P. Snustad and C. D. Silflow** (1992). "Tubulin gene expression in maize (*Zea mays*): Change in isotype expression along the developmental axis of seedling root." Journal of molecular biology **227**(1): 97-107.
- Kanabus, J. and J. H. Cherry** (1971). "Isolation of an organ-specific leucyl-tRNA synthetase from soybean seedling." Proceedings of the National Academy of Sciences **68**(5): 873-876.

- Kanehisa, M., S. Goto, Y. Sato, M. Furumichi and M. Tanabe** (2012). "KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets." Nucleic acids research **40**(D1): D109-D114.
- Kaniewski, D., E. Van Campo, T. Boiy, J. F. Terral, B. Khadari and G. Besnard** (2012). "Primary domestication and early uses of the emblematic olive tree: palaeobotanical, historical and molecular evidence from the Middle East." Biol Rev Camb Philos Soc **87**(4): 885-899.
- Karban, R. and J. S. Thaler** (1999). "Plant phase change and resistance to herbivory." Ecology **80**(2): 510-517.
- Keys, A., A. Mienotti, M. Karvonen, C. Aravanis, H. Blackburn, R. Buzina, B. S. Djordjevic, A. S. Dontas, F. Fidanza and M. H. Keys** (1986). "The diet and 15-year death rate in the seven countries study." American journal of epidemiology **124**(6): 903-915.
- Kim, C. M., S. H. Park, B. Je, S. H. Park, S. J. Park, H. L. Piao, M. Y. Eun, L. Dolan and C. Han** (2007). "*OsCSLD1*, a cellulose synthase-like D1 gene, is required for root hair morphogenesis in rice." Plant Physiology **143**(3): 1220-1230.
- Kislev, M. E., D. Nadel and I. Carmi** (1992). "Epipalaeolithic (19,000 BP) cereal and fruit diet at Ohalo II, Sea of Galilee, Israel." Review of Palaeobotany and Palynology **73**(1-4): 161-166.
- Kiyono, H. and S. Fukuyama** (2004). "NALT-versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity." Nature Reviews Immunology **4**(9): 699-710.
- Kok, F. J. and D. Kromhout** (2004). "Atherosclerosis--epidemiological studies on the health effects of a Mediterranean diet." Eur J Nutr **43 Suppl 1**: 1/2-5.
- Krogh, A., B. Larsson, G. Von Heijne and E. L. L. Sonnhammer** (2001). "Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes." Journal of molecular biology **305**(3): 567-580.
- Kromhout, D., A. Keys, C. Aravanis, R. Buzina, F. Fidanza, S. Giampaoli, A. Jansen, A. Menotti, c. S. Nedeljkovi and M. Pekkarinen** (1989). "Food consumption patterns in the 1960s in seven countries." AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL NUTRITION **49**(5): 889-894.
- Kyte, J. and R. F. Doolittle** (1982). "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein." Journal of molecular biology **157**(1): 105-132.
- La Vecchia, C.** (2011). "The future of cancer in Europe." European Journal of Cancer Prevention **20**(4): 253-254.

- Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." nature **227**(5259): 680-685.
- Lagesen, K., P. Hallin, E. A. Rødland, H. H. Stærfeldt, T. Rognes and D. W. Ussery** (2007). "RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes." Nucleic acids research **35**(9): 3100-3108.
- Lai, Y. W., E. K. Kemsley and R. H. Wilson** (1995). "Quantitative analysis of potential adulterants of extra virgin olive oil using infrared spectroscopy." Food Chemistry **53**(1): 95-98.
- Langmead, B. and S. L. Salzberg** (2012). "Fast gapped-read alignment with Bowtie 2." Nature methods **9**(4): 357-359.
- Lau, A. T., Y. Wang and J. F. Chiu** (2008). "Reactive oxygen species: current knowledge and applications in cancer research and therapeutic." Journal of cellular biochemistry **104**(2): 657-667.
- Lauter, N., A. Kampani, S. Carlson, M. Goebel and S. P. Moose** (2005). "*microRNA172* down-regulates *glossy15* to promote vegetative phase change in maize." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(26): 9412-9417.
- Lavee, S., N. Avidan, A. Haskal and A. Ogrodovich** (1996). "Juvenility period reduction in olive seedlings: A tool for enhancement of breeding." Olivae **60**: 33-41.
- Lerbs-Mache, S.** (1993). "The 110-kDa polypeptide of spinach plastid DNA-dependent RNA polymerase: single-subunit enzyme or catalytic core of multimeric enzyme complexes?" Proceedings of the National Academy of Sciences **90**(12): 5509-5513.
- Li, B. and C. Dewey** (2011). "RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome." BMC bioinformatics **12**(1): 323.
- Li, M., G. Xiong, R. Li, J. Cui, D. Tang, B. Zhang, M. Pauly, Z. Cheng and Y. Zhou** (2009). "Rice cellulose synthase-like D4 is essential for normal cell-wall biosynthesis and plant growth." The Plant Journal **60**(6): 1055-1069.
- Li, S., G. M. A. van Os, S. Ren, D. Yu, T. Ketelaar, A. M. C. Emons and C. M. Liu** (2010). "Expression and functional analyses of *EXO70* genes in Arabidopsis implicate their roles in regulating cell type-specific exocytosis." Plant Physiology **154**(4): 1819-1830.
- Linnaeus, C.** (1753). "Species Plantarum, I. Ed. L." Salvii. Estocolmo.
- Lipshchitz, N., R. Gophna, M. Hartman and G. Biger** (1991). "The beginning of olive (*olea europaea*) cultivation in the old world: A reassessment." Journal of Archaeological Science **18**(4): 441-453.

- Liu, J. J. and A. K. M. Ekramoddoullah** (2006). "The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses." Physiological and Molecular Plant Pathology **68**(1): 3-13.
- Lopez-Miranda, J., F. Perez-Jimenez, E. Ros, R. De Caterina, L. Badimon, M. I. Covas, E. Escrich, J. M. Ordovas, F. Soriguer, R. Abia, C. A. de la Lastra, M. Battino, D. Corella, J. Chamorro-Quiros, J. Delgado-Lista, D. Giugliano, K. Esposito, R. Estruch, J. M. Fernandez-Real, J. J. Gaforio, C. La Vecchia, D. Lairon, F. Lopez-Segura, P. Mata, J. A. Menendez, F. J. Muriana, J. Osada, D. B. Panagiotakos, J. A. Paniagua, P. Perez-Martinez, J. Perona, M. A. Peinado, M. Pineda-Priego, H. E. Poulsen, J. L. Quiles, M. C. Ramirez-Tortosa, J. Ruano, L. Serra-Majem, R. Sola, M. Solanas, V. Solfrizzi, R. de la Torre-Fornell, A. Trichopoulou, M. Uceda, J. M. Villalba-Montoro, J. R. Villar-Ortiz, F. Visioli and N. Yiannakouris** (2010). "Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaen and Cordoba (Spain) 2008." Nutr Metab Cardiovasc Dis **20**(4): 284-294.
- Luan, W., Y. Liu, F. Zhang, Y. Song, Z. Wang, Y. Peng and Z. Sun** (2011). "OsCD1 encodes a putative member of the cellulose synthase-like D sub-family and is essential for rice plant architecture and growth." Plant biotechnology journal **9**(4): 513-524.
- Lumaret, R., N. Ouazzani, H. Michaud, G. Vivier, M. F. Deguilloux and F. Di Giusto** (2004). "Allozyme variation of oleaster populations (wild olive tree) (*Olea europaea* L.) in the Mediterranean Basin." Heredity (Edinb) **92**(4): 343-351.
- Marchler-Bauer, A., S. Lu, J. B. Anderson, F. Chitsaz, M. K. Derbyshire, C. DeWeese-Scott, J. H. Fong, L. Y. Geer, R. C. Geer and N. R. Gonzales** (2011). "CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins." Nucleic acids research **39**(suppl 1): D225-D229.
- Marinova, E., J. A. Valk, S. Valamoti and J. Bretschneider** (2011). "An experimental approach for tracing olive processing residues in the archaeobotanical record, with preliminary examples from Tell Tweini, Syria." Vegetation History and Archaeobotany **20**(5): 471-478.
- Massiah, A. J.** (2007). "Understanding flowering time." CAB Reviews: Perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources. **2**: 1-21.
- Mattingly, D. J.** (1996). "First fruit? The olive in the Roman world." Human Landscapes in Classical Antiquity. Environment and Culture: pp. 213-253.
- McDaniel, C. N.** (1980). "Influence of leaves and roots on meristem development in *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38." Planta **148**(5): 462-467.

- McDaniel, C. N., K. A. Sangrey and D. E. Jegla** (1989a). "Cryptic floral determination: stem explants from vegetative tobacco plants have the capacity to regenerate floral shoots." Developmental biology **134**(2): 473-478.
- McDaniel, C. N., K. A. Sangrey and S. R. Singer** (1989b). "Node counting in axillary buds of *Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin 38, a day-neutral plant." American journal of botany: 403-408.
- McDaniel, C. N., S. R. Singer and S. M. E. Smith** (1992). "Developmental states associated with the floral transition." Developmental biology **153**(1): 59-69.
- Mildner-Szkudlarz, S. and H. Jeleń** (2008). "The potential of different techniques for volatile compounds analysis coupled with PCA for the detection of the adulteration of olive oil with hazelnut oil." Food Chemistry **110**(3): 751-761.
- Minic, Z.** (2008). "Physiological roles of plant glycoside hydrolases." Planta **227**(4): 723-740.
- Moncaleán, P., A. Rodríguez and B. Fernández** (2002). "Plant growth regulators as putative physiological markers of developmental stage in *Prunus persica*." Plant Growth Regulation **36**(1): 27-29.
- ontealegre, C., M. L. Marina Alegre and C. Garcia-Ruiz** (2010). "Traceability markers to the botanical origin in olive oils." J Agric Food Chem **58**(1): 28-38.
- Mookerjee, S., J. Guerin, G. Collins, C. Ford and M. Sedgley** (2005). "Paternity analysis using microsatellite markers to identify pollen donors in an olive grove." Theoretical and Applied Genetics **111**(6): 1174-1182.
- Moreno-Alías, I., L. León, R. De la Rosa and H. F. Rapoport** (2009). "Morphological and anatomical evaluation of adult and juvenile leaves of olive plants." Trees **23**(1): 181-187.
- Moreno-Alías, I., H. F. Rapoport, L. León and R. de la Rosa** (2010a). "Olive seedling first-flowering position and management." Scientia Horticulturae **124**(1): 74-77.
- Moreno-Alías, I., H. F. Rapoport, R. López, L. León and R. de la Rosa** (2010b). "Optimizing early flowering and pre-selection for short juvenile period in olive seedlings." HortScience **45**(4): 519-522.
- Moriondo, M., F. M. Stefanini and M. Bindi** (2008). "Reproduction of olive tree habitat suitability for global change impact assessment." Ecological Modelling **218**(1-2): 95-109.

- Moriondo, M., G. Trombi, R. Ferrise, G. Brandani, C. Dibari, C. M. Ammann, M. M. Lippi and M. Bindi** (2013). "Olive trees as bio-indicators of climate evolution in the Mediterranean Basin." Global Ecology and Biogeography **22**(7): 818-833.
- Muleo, R., M. C. Colao, D. Miano, M. Cirilli, M. C. Intrieri, L. Baldoni and E. Rugini** (2009). "Mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis in olive germplasm." Genome **52**(3): 252-260.
- Muñoz-Mérida, A., J. J. González-Plaza, A. M. Blanco, M. C. García-López, J. M. Rodríguez, L. Pedrola, M. D. Sicardo, M. L. Hernández, R. De la Rosa and A. Belaj** (2013). "De Novo Assembly and Functional Annotation of the Olive (*Olea europaea*) Transcriptome." DNA research **20**(1): 93-108.
- Muñoz-Mérida, A., E. Viguera, M. G. Claros, O. Trelles and A. J. Pérez-Pulido** (Aceptado). "Sma3s: a three-step modular annotator for large sequence datasets." DNA research: in press.
- Naciones Unidas** (Actualizado 2013). Convenio Internacional de Aceite de Oliva y Aceitunas de Mesa, 2005. Conferencia de las Naciones Unidas sobre Comercio y Desarrollo. Ginebra. **TD/Olive Oil.10/6**.
- Osmark, P., B. Boyle and N. Brisson** (1998). "Sequential and structural homology between intracellular pathogenesis-related proteins and a group of latex proteins." Plant molecular biology **38**(6): 1243-1246.
- Ouazzani, N., R. Lumaret, P. Villemur and F. Di Giusto** (1993). "Leaf Allozyme Variation in Cultivated and Wild Olive Trees (*Olea europaea* L.)." Journal of Heredity **84**(1): 34-42.
- Ouyang, S., W. Zhu, J. Hamilton, H. Lin, M. Campbell, K. Childs, F. Thibaud-Nissen, R. L. Malek, Y. Lee and L. Zheng** (2007). "The TIGR rice genome annotation resource: improvements and new features." Nucleic acids research **35**(suppl 1): D883-D887.
- Owen, C. A., E. C. Bitá, G. Banilas, S. E. Hajjar, V. Sellianakis, U. Aksoy, S. Hepaksoy, R. Chamoun, S. N. Talhook, I. Metzidakis, P. Hatzopoulos and P. Kalaitzis** (2005). "AFLP reveals structural details of genetic diversity within cultivated olive germplasm from the Eastern Mediterranean." Theoretical and Applied Genetics **110**(7): 1169-1176.
- Owen, R., R. Haubner, G. Wurtele, E. Hull, B. Spiegelhalder and H. Bartsch** (2004). "Olives and olive oil in cancer prevention." (0959-8278).
- Palmgren, M. G.** (1998). "Proton Gradients and Plant Growth: Role of the Plasma Membrane H⁺ATPase." Advances in Botanical Research **28**: 1-70.

- Palomares, O., M. Alcántara, J. Quiralte, M. Villalba, F. Garzón and R. Rodríguez** (2008). "Airway Disease and Thaumatin-like Protein in an Olive-Oil Mill Worker." New England Journal of Medicine **358**(12): 1306-1308.
- Pauwels, E. K.** (2011). "The protective effect of the Mediterranean diet: focus on cancer and cardiovascular risk." Med Princ Pract **20**(2): 103-111.
- Pečenková, T., M. Hála, I. Kulich, D. Kocourková, E. Drdová, M. Fendrych, H. Toupalová and V. Žárský** (2011). "The role for the exocyst complex subunits *Exo70B2* and *Exo70H1* in the plant-pathogen interaction." Journal of experimental botany **62**(6): 2107-2116.
- Pelucchi, C., C. Bosetti, E. Negri, L. Lipworth and C. La Vecchia** (2011). "Olive oil and cancer risk: an update of epidemiological findings through 2010." Curr Pharm Des **17**(8): 805-812.
- Peña, F., S. Cárdenas, M. Gallego and M. Valcárcel** (2005). "Direct olive oil authentication: Detection of adulteration of olive oil with hazelnut oil by direct coupling of headspace and mass spectrometry, and multivariate regression techniques." Journal of Chromatography A **1074**(1): 215-221.
- Peña, L., M. Martín-Trillo, J. Juárez, J. A. Pina, L. Navarro and J. M. Martínez-Zapater** (2001). "Constitutive expression of *Arabidopsis* *LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time." Nature biotechnology **19**(3): 263-267.
- Petersen, T. N., S. Brunak, G. von Heijne and H. Nielsen** (2011). "SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions." Nature methods **8**(10): 785-786.
- Pfannschmidt, T. and G. Link** (1994). "Separation of two classes of plastid DNA-dependent RNA polymerases that are differentially expressed in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings." Plant molecular biology **25**(1): 69-81.
- Pillitteri, L. J., C. J. Lovatt and L. L. Walling** (2004). "Isolation and characterization of a *TERMINAL FLOWER* homolog and its correlation with juvenility in *citrus*." Plant Physiology **135**(3): 1540-1551.
- Poethig, R. S.** (1990). "Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants." Science **250**(4983): 923-930.
- Poethig, R. S.** (2010). "The past, present, and future of vegetative phase change." Plant Physiology **154**(2): 541-544.

- Powell, S., D. Szklarczyk, K. Trachana, A. Roth, M. Kuhn, J. Muller, R. Arnold, T. Rattei, I. Letunic and T. Doerks** (2012). "eggNOG v3. 0: orthologous groups covering 1133 organisms at 41 different taxonomic ranges." Nucleic acids research **40**(D1): D284-D289.
- Pua, E. C. and M. R. Davey** (2010). Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives.
- Qin, Q. M., G. E. Vallad, B. M. Wu and K. V. Subbarao** (2006). "Phylogenetic analyses of phytopathogenic isolates of *Verticillium spp.*" Phytopathology **96**(6): 582-592.
- R Team, D. C.** (2005). R: A language and environment for statistical computing, ISBN 3-900051-07-0. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2013.
- Radauer, C., P. Lackner and H. Breiteneder** (2008). "The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands." BMC evolutionary biology **8**(1): 286.
- Ralph, S. G., S. Jancsik and J. Bohlmann** (2007). "Dirigent proteins in conifer defense II: Extended gene discovery, phylogeny, and constitutive and stress-induced gene expression in spruce (*Picea spp.*)." Phytochemistry **68**(14): 1975-1991.
- Ralph, S. G., J. Y. Park, J. Bohlmann and S. D. Mansfield** (2006). "Dirigent proteins in conifer defense: gene discovery, phylogeny, and differential wound-and insect-induced expression of a family of DIR and DIR-like genes in spruce (*Picea spp.*)." Plant molecular biology **60**(1): 21-40.
- Rallo, P., G. Dorado and A. Martín** (2000). "Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.)." Theoretical and Applied Genetics **101**(5-6): 984-989.
- Rallo, P., R. Jiménez, J. Ordovás and M. P. Suárez** (2008). "Possible early selection of short juvenile period olive plants based on seedling traits." Crop and Pasture Science **59**(10): 933-940.
- Rallo, P., I. Tenzer, C. Gessler, L. Baldoni, G. Dorado and A. Martin** (2003). "Transferability of olive microsatellite loci across the genus *Olea*." Theoretical and Applied Genetics **107**(5): 940-946.
- Reale, S., S. Doveri, A. Diaz, A. Angiolillo, L. Lucentini, F. Pilla, A. Martin, P. Donini and D. Lee** (2006). "SNP-based markers for discriminating olive (*Olea europaea* L.) cultivars." Genome **49**(9): 1193-1205.
- Reynolds, S. M., L. Käll, M. E. Riffle, J. A. Bilmes and W. S. Noble** (2008). "Transmembrane topology and signal peptide prediction using dynamic bayesian networks." PLoS computational biology **4**(11): e1000213.

- Robertson, G., J. Schein, R. Chiu, R. Corbett, M. Field, S. D. Jackman, K. Mungall, S. Lee, H. M. Okada and J. Q. Qian** (2010). "De novo assembly and analysis of RNA-seq data." Nature methods **7**(11): 909-912.
- Robinson, L. W. and P. F. Wareing** (1969). "Experiments on the juvenile-adult phase change in some woody species." New Phytologist **68**(1): 67-78.
- Robinson, M. and A. Oshlack** (2010). "A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data." Genome Biology **11**(3): R25.
- Robinson, M. D., D. J. McCarthy and G. K. Smyth** (2010). "edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data." Bioinformatics **26**(1): 139-140.
- Rosso, M. G., Y. Li, N. Strizhov, B. Reiss, K. Dekker and B. Weisshaar** (2003). "An Arabidopsis thaliana T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics." Plant molecular biology **53**(1-2): 247-259.
- Rottmann, W. H., R. Meilan, L. A. Sheppard, A. M. Brunner, J. S. Skinner, C. Ma, S. Cheng, L. Jouanin, G. Pilate and S. H. Strauss** (2000). "Diverse effects of overexpression of *LEAFY* and *PTLF*, a poplar (*Populus*) homolog of *LEAFY/FLORICAULA*, in transgenic poplar and *Arabidopsis*." The Plant Journal **22**(3): 235-245.
- Rubio de Casas, R., G. Besnard, P. Schönschwetter, L. Balaguer and P. Vargas** (2006). "Extensive gene flow blurs phylogeographic but not phylogenetic signal in *Olea europaea* L." Theoretical and Applied Genetics **113**(4): 575-583.
- Rubio, M. J. and P. Arús** (1997). "Un vivero español, "Agromillora Catalana", aplica en su producción de planta de olivo un control de calidad, genético y sanitario basado en las nuevas tecnologías de RAPDs y ELISA-DAS." Fruticultura profesional **88**: 14-18.
- Rugini, E., M. Mencuccini, R. Biasi and M. Altamura** (2005). Olive (*Olea europaea* L.). Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants. S. M. Jain and P. Gupta, Springer Netherlands. **77**: 345-360.
- Rychlik, W.** (1992). "OLIGO 4, primer analysis software." National Biosciences Inc., Plymouth (MN).
- Santos-Antunes, F., L. León, R. de la Rosa, J. Alvarado, A. Mohedo, I. Trujillo and L. Rallo** (2005). "The length of the juvenile period in olive as influenced by vigor of the seedlings and the precocity of the parents." HortScience **40**(5): 1213-1215.

- Santos Macedo, E., H. G. Cardoso, A. Hernández, A. A. Peixe, A. Polidoros, A. Ferreira, A. Cordeiro and B. Arnholdt-Schmitt** (2009). "Physiologic responses and gene diversity indicate olive alternative oxidase as a potential source for markers involved in efficient adventitious root induction." Physiologia Plantarum **137**(4): 532-552.
- Schwab, R., J. F. Palatnik, M. Riester, C. Schommer, M. Schmid and D. Weigel** (2005). "Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome." Developmental cell **8**(4): 517-527.
- Schwabe, W. W. and A. H. Al-Doori** (1973). "Analysis of a juvenile-like condition affecting flowering in the black currant (*Ribes nigrum*)." Journal of experimental botany **24**(5): 969-981.
- Sefc, K. M., M. S. Lopes, D. Mendonça, M. Santos, M. Machado and A. Machado** (2000). "Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees." Mol Ecol **9**(8): 1171-1173.
- Servili, M., R. Selvaggini, S. Esposto, A. Taticchi, G. Montedoro and G. Morozzi** (2004). "Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil." Journal of Chromatography A **1054**(1-2): 113-127.
- Simopoulos, A. P.** (2001). "The Mediterranean diets: What is so special about the diet of Greece? The scientific evidence." J Nutr **131**(11 Suppl): 3065S-3073S.
- Singer, S. R., C. H. Hannon and S. C. Huber** (1992). "Acquisition of competence for floral development in *Nicotiana* buds." Planta **188**(4): 546-550.
- Smith, S. M. E. and C. N. McDaniel** (1992). "The *maryland mammoth* allele and rooting both perturb the fate of florally determined apices in *Nicotiana tabacum*." Developmental biology **153**(1): 176-184.
- Snowball, A. M., E. A. Halligan, I. Warrington and M. G. Mullins** (1994). "Phase change in *citrus*: Growth and flowering of citrus seedlings from thirteen genetically diverse seedling families." Journal of horticultural science **69**(1): 141-148.
- Snowball, A. M., A. M. Zeman, Y. T. Tchan, M. G. Mullins and P. B. Goodwin** (1991). "Phase change in citrus: immunologically detectable differences between juvenile and mature plants." Functional Plant Biology **18**(4): 385-396.
- Somerville, C. and M. Koornneef** (2002). "A fortunate choice: the history of Arabidopsis as a model plant." Nature Reviews Genetics **3**(11): 883-889.
- Souciet, G., A. Dietrich, B. Colas, P. Razafimahatratra and J. H. Weil** (1982). "Purification and properties of chloroplast leucyl-tRNA synthetase from a higher plant: *Phaseolus vulgaris*." Journal of Biological Chemistry **257**(16): 9598-9604.

- Strable, J., L. Borsuk, D. Nettleton, P. S. Schnable and E. E. Irish** (2008). "Microarray analysis of vegetative phase change in maize." The Plant Journal **56**(6): 1045-1057.
- Suárez, M. P., L. Casanova, R. Jiménez, A. Morales-Sillero, J. Ordovás and P. Rallo** (2011). "Variability of first flower to ground distance in olive seedlings and its relationship with the length of the juvenile period and the parent genotype." Scientia Horticulturae **129**(4): 747-751.
- Swarbreck, D., C. Wilks, P. Lamesch, T. Z. Berardini, M. Garcia-Hernandez, H. Foerster, D. Li, T. Meyer, R. Muller and L. Ploetz** (2008). "The Arabidopsis Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation." Nucleic acids research **36**(suppl 1): D1009-D1014.
- Synek, L., N. Schlager, M. Eliáš, M. Quentin, M. T. Hauser and V. Žárský** (2006). "*AtEXO70A1*, a member of a family of putative exocyst subunits specifically expanded in land plants, is important for polar growth and plant development." The Plant Journal **48**(1): 54-72.
- Tan, F. C. and S. M. Swain** (2006). "Genetics of flower initiation and development in annual and perennial plants." Physiologia Plantarum **128**(1): 8-17.
- Tanaka, N., H. Itoh, N. Sentoku, M. Kojima, H. Sakakibara, T. Izawa, J. I. Itoh and Y. Nagato** (2011). "The *COP1* ortholog *PPS* regulates the juvenile–adult and vegetative–reproductive phase changes in rice." The Plant Cell Online **23**(6): 2143-2154.
- Tapia-López, R., B. García-Ponce, J. G. Dubrovsky, A. Garay-Arroyo, R. V. Pérez-Ruiz, S. H. Kim, F. Acevedo, S. Pelaz and E. R. Alvarez-Buylla** (2008). "An *AGAMOUS*-related MADS-box gene, *XAL1* (*AGL12*), regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in Arabidopsis." Plant Physiology **146**(3): 1182-1192.
- Telfer, A., K. M. Bollman and R. S. Poethig** (1997). "Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*." Development **124**(3): 645-654.
- Therios, I.** (2009). Olives: Crop production Science in Horticulture. Cambridge, MA., CABI Publishing.
- Theurkauf, W. E., H. Baum, J. Bo and P. C. Wensink** (1986). "Tissue-specific and constitutive alpha-tubulin genes of *Drosophila melanogaster* code for structurally distinct proteins." Proceedings of the National Academy of Sciences **83**(22): 8477-8481.
- Trebbi, D. and J. M. McGrath** (2009). "Functional differentiation of the sugar beet root system as indicator of developmental phase change." Physiologia Plantarum **135**(1): 84-97.

- Tripoli, E., M. Giammanco, G. Tabacchi, D. Di Majo, S. Giammanco and M. La Guardia** (2005). "The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health." Nutrition Research Reviews **18**(01): 98-112.
- Trujillo, I., A. Belaj and R. L. Rallo** (1999). "Marcadores de ADN para la identificación de variedades del olivo." Revista agropecuaria **68** (799): 166-167.
- Trujillo, I., L. Rallo, E. A. Carbonell and M. J. Asins** (1990). " Isoenzymatic variability of cultivars according to their origin." Acta Hort. (ISHS) **286**: 137-140.
- Tsakagoshi, H., W. Busch and P. N. Benfey** (2010). "Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root." Cell **143**(4): 606-616.
- Uribe, X., M. A. Torres, M. Capellades, P. Puigdomenech and J. Rigau** (1998). "Maize α -tubulin genes are expressed according to specific patterns of cell differentiation." Plant molecular biology **37**(6): 1069-1078.
- Valdés, B., S. Talavera and E. Fernández-Galiano** (1987). "Flora vascular de Andalucía Occidental." **3**.
- Van der Linden, C. G., B. Vosman and M. J. M. Smulders** (2002). "Cloning and characterization of four apple MADS box genes isolated from vegetative tissue." Journal of experimental botany **53**(371): 1025-1036.
- Van Norman, J. M. and C. Murphy** (2011). "BYPASS1: synthesis of the mobile root-derived signal requires active root growth and arrests early leaf development." BMC plant biology **11**.
- Vargas, P. and J. W. Kadereit** (2001). "Molecular fingerprinting evidence (ISSR, inter-simple sequence repeats) for a wild status of *Olea europaea* L.(*Oleaceae*) in the Eurosiberian north of the Iberian Peninsula." Flora (Germany) **196**(2): 142-152.
- Varkonyi-Gasic, E., S. M. Moss, C. Voogd, R. Wu, R. H. Lough, Y. Y. Wang and R. P. Hellens** (2011). "Identification and characterization of flowering genes in kiwifruit: sequence conservation and role in kiwifruit flower development." BMC plant biology **11**(1): 72.
- Villalba, M., R. Rodríguez and E. Batanero** (2013). "The spectrum of olive pollen allergens. From structures to diagnosis and treatment." Methods.
- Villasante, A., D. Wang, P. Dobner, P. Dolph, S. A. Lewis and N. J. Cowan** (1986). "Six mouse alpha-tubulin mRNAs encode five distinct isotypes: testis-specific expression of two sister genes." Molecular and cellular biology **6**(7): 2409-2419.

- Visser, T.** (1964). "Juvenile phase and growth of apple and pear seedlings." Euphytica **13**(2): 119-129.
- Visser, T.** (1975). "A comparison of apple and pear seedlings with reference to the juvenile period-II. Mode of inheritance." Symposium on Juvenility in Woody Perennials **56**: 215-218.
- Vossen, P.** (2005). "Olive oil production." Olive Production Manual: 161-182.
- Vossen, P.** (2007). "Olive Oil: History, Production, and Characteristics of the World's Classic Oils." HortScience August **42**: 1093-1100
- Wang, J. W., M. Y. Park, L. J. Wang, Y. Koo, X. Y. Chen, D. Weigel and R. S. Poethig** (2011). "miRNA control of vegetative phase change in trees." PLoS genetics **7**(2): e1002012.
- Wang, X., G. Cnops, R. Vanderhaeghen, S. De Block, M. Van Montagu and M. Van Lijsebettens** (2001). "AtCSLD3, a cellulose synthase-like gene important for root hair growth in Arabidopsis." Plant Physiology **126**(2): 575-586.
- Wareing, P. F. and V. M. Frydman** (1975). "General aspects of phase change, with special reference to *Hedera helix* L." Symposium on Juvenility in Woody Perennials **56**: 57-70.
- Watson, J. D.** (2006). Biología molecular del gen/Molecular Biology of the Gene, Ed. Médica Panamericana.
- Wiesman, Z., N. Avidan, S. Lavee and B. Quebedeaux** (1998). "Molecular characterization of common olive varieties in Israel and the West Bank using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers." Journal of the American Society for Horticultural Science **123**(5): 837-841.
- Willmann, M. R. and R. S. Poethig** (2005). "Time to grow up: the temporal role of smallRNAs in plants." Current opinion in plant biology **8**(5): 548-552.
- Wood, V., R. Gwilliam, M. A. Rajandream, M. Lyne, R. Lyne, A. Stewart, J. Sgouros, N. Peat, J. Hayles and S. Baker** (2002). "The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*." nature **415**(6874): 871-880.
- Woodcock, D. M., P. J. Crowther, J. Doherty, S. Jefferson, E. DeCruz, M. Noyer-Weidner, S. S. Smith, M. Z. Michael and M. W. Graham** (1989). "Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants." Nucleic acids research **17**(9): 3469-3478.

- Wu, G., M. Y. Park, S. R. Conway, J. W. Wang, D. Weigel and R. S. Poethig** (2009). "The Sequential Action of *miR156* and *miR172* Regulates Developmental Timing in Arabidopsis." Cell **138**(4): 750-759.
- Wu, G. and R. S. Poethig** (2006). "Temporal regulation of shoot development in Arabidopsis thaliana by *miR156* and its target *SPL3*." Development **133**(18): 3539-3547.
- Wu, S. B., G. Collins and M. Sedgley** (2004). "A molecular linkage map of olive (*Olea europaea* L.) based on RAPD, microsatellite, and SCAR markers." Genome **47**(1): 26-35.
- Xie, Y., G. Wu, J. Tang, R. Luo, J. Patterson, S. Liu, W. Huang, G. He, S. Gu and S. Li** (2013). "SOAPdenovo-Trans: *De novo* transcriptome assembly with short RNA-Seq reads." arXiv preprint arXiv:1305.6760 (submission).
- Yang, L., S. R. Conway and R. S. Poethig** (2011). "Vegetative phase change is mediated by a leaf-derived signal that represses the transcription of *miR156*." Development **138**(2): 245-249.
- Yang, L., M. Xu, Y. Koo, J. He and R. S. Poethig** (2013). "Sugar promotes vegetative phase change in Arabidopsis thaliana by repressing the expression of *MIR156A* and *MIR156C*." eLife **2**.
- Yoshikawa, T., S. Ozawa, N. Sentoku, J. I. Itoh, Y. Nagato and S. Yokoi** (2013). "Change of shoot architecture during juvenile-to-adult phase transition in soybean." Planta: 1-9.
- Yu, S., L. Cao, C. M. Zhou, T. Q. Zhang, H. Lian, Y. Sun, J. Wu, J. Huang, G. P. Wang and J. W. Wang** (2013). "Sugar is an endogenous cue for juvenile-to-adult phase transition in plants." eLife **2**.
- Zagory, D. and W. J. Libby** (1985). "Maturation-related resistance of *Pinus radiata* to western gall-rust." Phytopathology **75** 1443-1447.
- Zhang, X. Z., Y. B. Zhao, C. M. Li, D. M. Chen, G. P. Wang, R. F. Chang and H. R. Shu** (2007). "Potential polyphenol markers of phase change in apple *Malus domestica*." Journal of plant physiology **164**(5): 574-580.
- Zhao, Q. Y., Y. Wang, Y. M. Kong, D. Luo, X. Li and P. Hao** (2011). "Optimizing *de novo* transcriptome assembly from short-read RNA-Seq data: a comparative study." BMC bioinformatics **12**(Suppl 14): S2.
- Zheng, Z. L.** (2009). "Carbon and nitrogen nutrient balance signaling in plants." Plant signaling & behavior **4**(7): 584-591.

- Zimmerman, R. H.** (1971). "Flowering in crabapple seedlings. Methods of shortening the juvenile phase. ." J Amer Soc Hort Sci **96**: 404-411.
- Zimmerman, R. H.** (1972). SESSION III-Juvenility and flowering of fruit trees. Symposium on growth Regulators in Fruit Production 34.
- Zimmerman, R. H., W. P. Hackett and R. P. Pharis** (1985). Hormonal aspects of phase change and precocious flowering. Hormonal Regulation of Development III, Springer: 79-115.
- Zohary, D. and M. Hopf** (2000). "Domestication of plants in the Old World. 3rd edn." Oxford.
- Zohary, D. and P. Spiegel-Roy** (1975). "Beginnings of fruit growing in the old world." Science **187**(4174): 319-327.
- Zouine, M., A. Latché, C. Rousseau, F. Regad, J. C. Pech, M. Philippot, M. Bouzayen, C. Delalande, P. Frasse and T. Schiex** (2012). "The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution." nature **485**: 635-641.

Curriculum Vitae

JAIME JIMÉNEZ RUIZ

Estudiante de doctorado

Dep. Biología Experimental - Genética (B3-078)

Universidad de Jaén

Campus Las Lagunillas s/n, 23071

Jaén (España)

Tel: +34-953213054 / +34-953213097

e-mail: ruiz@ujaen.es

FORMACIÓN UNIVERSITARIA

- 2010-2014 *Estudios de doctorado*. Universidad de Jaén.
- 2008-2009 *Máster Investigación básica y aplicada en biología molecular y celular*. Mención de calidad. Universidad de Jaén.
- 2009 *Certificado de Aptitud Pedagógica (CAP)*. Universidad de Jaén.
- 2004-2008 *Licenciatura en Biología*. Universidad de Jaén.

OTRA FORMACIÓN

- Abril-2013 *Functional Annotation of Genome Sequences in Agricultural Species*. Instituto de Biotecnología. Universidad de Helsinki.
- Feb-2013 *Programa de Prácticas Externas e Itinerario de Autoempleo*. Universidad de Jaén.
- Feb-2013 *Fundamentals of IPA Training and Certification Training Program*. Plataforma bioinformática de Andalucía (SCBI).
- Nov-2010 *Ensamblado y anotación de genomas empleando supercomputación*. Centro de Supercomputación de Castilla y León.

PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS I+D+I

- 2011-2015 *Desarrollo de biomarcadores para el análisis del estado fitosanitario del olivar mediante control biológico de la verticilosis en la provincia de Jaén*. Junta de Andalucía, Proyecto de Excelencia. Luque-Vázquez, Francisco; Mercado-Blanco, Jesús; Rincón-Romero, Ana María (290.928,44 €)

2011-2015 *Estudio transcriptómico dirigido al desarrollo de un kit diagnóstico para detección precoz de las principales enfermedades en olivar causadas por patógenos del suelo.* Junta de Andalucía, Proyecto de Excelencia. Mercado-Blanco, Jesús (225.283,43 €)

BECAS Y RECONOCIMIENTOS

2010-2014 *Ayuda de Personal Investigador en Formación del Plan de Apoyo a la Investigación.* Universidad de Jaén.

2013 *Ayuda al personal investigador en formación para la obtención del doctorado con mención internacional.* Plan de Apoyo. Estancia de Investigación en el Boyce Thompson Institute, Estados Unidos (4.224€)

2007-2008 *Beca-Colaboración.* Ministerio de Educación y Ciencia (2.550€).

PREMIOS Y RECONOCIMIENTOS DE CARÁCTER PROFESIONAL

2008 *Premio Extraordinario de grado al mejor expediente académico.* Universidad de Jaén.

PUBLICACIONES EN REVISTAS

1. Leyva-Pérez, María de la O; Valverde-Corredor, Antonio; Valderrama, Raquel; **Jiménez-Ruiz, Jaime**; Muñoz-Merida, Antonio; Trelles Oswaldo; Barroso, Juan Bautista; Mercado-Blanco, Jesús and Luque, Francisco (En revisión). *Cold acclimation in olive leaves implies early and delayed long term transcriptional changes as well as short term transient responses and posttranscriptional regulation.* **PlosOne.**

2. García-López, Mari Carmen; Vidoy, Isabel; **Jiménez-Ruiz, Jaime**; Muñoz-Mérida, Antonio; Fernández-Ocaña, Ana; de la Rosa, Raúl; Barroso-Albarracín, Juan Bautista; Navarro, Francisco; Trelles, Oswaldo; R. Beuzón, Carmen; Barceló, Araceli; Valpuesta, Victoriano and Luque, Francisco (Aceptado). *Genetic changes involved in the juvenile-to-adult transition in the shoot apex of Olea europaea L. occurs years before the first flowering.* **Tree genetics & genomes.**

3. Fernández-Ocaña, Ana María; García-López, M^a Del Carmen; **Jiménez-Ruiz, Jaime**; Saniger-Bernal, María Luisa; Macías-Gutierrez, David; Navarro-Gómez, Francisco; Oya-Aponte, Ricardo Antonio; Belaj-, Angjelina; De La Rosa-Navarro, Raúl; Corpas-Aguirre, Francisco Javier; Barroso-Albarracín, Juan Bautista; Luque-Vázquez, Francisco (2010). *Identification of a gene involved in the juvenile-to-adult transition (JAT) in cultivated olive trees*. **Tree genetics & genomes** 6:891-903.

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS Y WORKSHOPS.

1. Leyva-Pérez, María De La O; **Jiménez-Ruiz, Jaime**; Valderrama-Rodríguez, Raquel; Barroso-Albarracín, Juan Bautista; Mercado-Blanco, Jesús; Luque-Vázquez, Francisco (2013). *Análisis transcriptómico del estrés por frío en el olivo*. **III Jornadas de Investigación Máster en Biotecnología y Biomedicina**. Universidad de Jaén.

2. **Jiménez-Ruiz, Jaime**; Leyva-Pérez, María De La O; Schiliro-, Elisabetta; Barroso-Albarracín, Juan Bautista; Mercado-Blanco, Jesús; Bombarely-Gómez, Aureliano; Mueller, Lukas A.; Luque-Vázquez, Francisco (2013). *Respuesta a estrés por daño mecánico en raíces* (*Olea europaea* L.). **XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Genética**. Girona.

3. Leyva-Pérez, María De La O; Valverde-Corredor, Antonio; **Jiménez-Ruiz, Jaime**; Muñoz-Mérida, Antonio; Trelles-Salazar, Oswaldo; Barroso-Albarracín, Juan Bautista; Mercado-Blanco, Jesús; Luque-Vázquez, Francisco (2013). *La respuesta a estrés por frío en el olivo* (*Olea europea* L.) *se produce mediante cambios transitorios de la expresión génica a la vez que por cambios adaptativos estables durante la persistencia del estrés*. **XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Genética**. Girona.

4. Leyva-Pérez, María De La O; Valverde, Antonio; **Jiménez-Ruiz, Jaime**; Muñoz-Mérida, Antonio; Valderrama-Rodríguez, Raquel; Trelles-Salazar, Oswaldo; Barroso-Albarracín, Juan Bautista; Mercado-Blanco, Jesús; Luque-Vázquez, Francisco (2013). *Cold response in Olive tree; A RNAseq Study*. **5th Workshop of COST Action TD801, "StatSeq"**. Aalto University. Helsinki (Finlandia).

5. García-López, M^a Del Carmen; Vidoy-Mercado, Isabel; **Jiménez-Ruiz, Jaime**; Muñoz-Mérida, Antonio; Fernández-Ocaña, Ana María; De La Rosa-Navarro, Raúl; Barroso-Albarracín, Juan Bautista; Navarro-Gómez, Francisco; Trelles-Salazar, Oswaldo; Beuzón-López, Carmen; Barceló-Muñoz, Araceli; Valpuesta-Fernández, Victoriano; Luque-Vázquez, Francisco (2011). *En el olivo los cambios en la expresión génica relacionados con el paso de árbol joven a adulto se producen años antes de que se produzca la primera floración*. **XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Genética**. Murcia.

6. Fernández-Ocaña, Ana María; García-López, M^a Del Carmen; Jiménez-Ruiz, Jaime; Saniger-Bernal, María Luisa; Macías-Gutierrez, David; Navarro-Gómez, Francisco; Oya-Aponte, Ricardo Antonio; Belaj-, Angelina; De La Rosa-Navarro, Raúl; Corpas-Aguirre, Francisco Javier; Barroso-Albarracín, Juan Bautista; Luque-Vázquez, Francisco (2010). *A gene required for a non-delayed juvenile to adult transition in cultivated olive trees*. **28th International Horticultural Congress**. Lisboa (Portugal).

7. **Jiménez-Ruiz, Jaime**; García-López, M^a Del Carmen; Fernández-Ocaña, Ana María; Barroso-Albarracín, Juan Bautista; Luque-Vázquez, Francisco (2010). *Estructura genética del gen JAT implicado en la transición juvenil-adulto del olivo e identificación de parálogos*. **X Reunión de Biología Molecular de Plantas** (Valencia).

8. **Jiménez-Ruiz, Jaime**; García-López, M^a Del Carmen; Fernández-Ocaña, Ana María; Macías-Gutierrez, David; De La Rosa-Navarro, Raúl; Barroso-Albarracín, Juan Bautista; Luque-Vázquez, Francisco (2009). *Estructura genética, análisis filogenético y de expresión del gen (JAT) implicado en la transición juvenil-adulto del olivo*. **XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Genética**. Torremolinos (Málaga).

9. García-López, M^a Del Carmen; **Jiménez-Ruiz, Jaime**; Macías-Gutierrez, David; Fernández-Ocaña, Ana María; Barroso-Albarracín, Juan Bautista; Belaj-, Angelina; De La Rosa-Navarro, Raúl; Corpas-Aguirre, Francisco Javier; Luque-Vázquez, Francisco (2009). *A gene that affects Arabidopsis thaliana primary root, rosette leaves and floral stem development*. **Plant Growth Biology and Modeling Workshop**. Elche.

10. Fernández-Ocaña, Ana María; Macías-Gutierrez, David; García-López, M^a Del Carmen; **Jiménez-Ruiz, Jaime**; De La Rosa-Navarro, Raúl; Barroso-Albarracín, Juan Bautista; Corpas-Aguirre, Francisco Javier; Luque-Vázquez, Francisco (2009). *Identificación de un gen implicado en la transición juvenil a adulto en el olivo cultivado. XXXII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular*. Oviedo.

DOCENCIA IMPARTIDA

Área de Genética, Departamento de Biología Experimental. Universidad de Jaén.

2013-2014 **Biología** (Básica Primer Cuatrimestre). Grado en Ciencias Ambientales. 17,2 horas prácticas.

Diseño Experimental y Método Científico (Básica Primer Cuatrimestre). Grado de Biología. 30 horas prácticas.

2012-2013 **Genética** (Obligatoria anual). Grado de Biología. 40 horas prácticas.

2011-2012 **Genética Molecular** (Optativa Anual). Licenciatura de Biología. 20 horas prácticas.

Genetics and Society (Oferta específica) 15 horas prácticas.

Genética (Obligatoria Anual). Grado en Biología. 10 horas prácticas.

TUTORÍAS

2013-2014 Co-tutor de Trabajo Fin de Grado en el Grado de Biología. Área de Genética. Departamento de Biología Experimental. Universidad de Jaén.

2011-2012 Co-Tutor de Trabajo Fin de Máster en el Máster Biotecnología y Biomedicina. Área de Genética. Departamento de Biología Experimental. Universidad de Jaén.

ESTANCIAS

2013 Lukas Mueller's Lab, The Boyce Thompson Institute (BTI) for plant research. Cornell University, Ithaca, New York, USA. RNA-seq analysis and Bioinformatics training (Mayo-Julio)

IDIOMAS

- **Español:** Lengua materna.
- **Inglés:** B1/B2 (actualmente 5º curso en la Escuela Oficial de Idiomas).

Publicaciones

Identification of a gene involved in the juvenile-to-adult transition (JAT) in cultivated olive trees

Ana Fernández-Ocaña · Mari Carmen García-López · Jaime Jiménez-Ruiz ·
Luisa Saniger · David Macías · Francisco Navarro · Ricardo Oya · Angelina Belaj ·
Raul de la Rosa · Francisco J. Corpas · Juan Bautista Barroso · Francisco Luque

Received: 15 January 2010 / Revised: 18 March 2010 / Accepted: 21 April 2010 / Published online: 12 June 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract The juvenile-to-adult transition is a complex and poorly understood process in plant development required to reach reproductive competence. For woody plants, knowledge of this transition is even scantier and no genes have been definitively identified as involved in this transition. To search for genes involved in the juvenile-to-adult transition in olive, we constructed juvenile and adult subtractive cDNA gene libraries and identified genes that were differentially expressed in the juvenile and adult phases. In the analysis of these libraries, we found 13 differentially expressed genes. One of these genes designated as juvenile to adult transition (*JAT*) was of special interest because it was highly expressed at the mRNA level in the early developmental phases but repressed in the adult phase. The analysis of mutant trees altered in the juvenile-to-adult

transition, as well as a segregating progeny of 31 trees from a “Picual” x “Jabaluna” cross, support the contention that its activity might be required for a non-delayed transition. The study of an *Arabidopsis thaliana JAT* mutant strain confirmed this hypothesis as it showed a delayed flowering phenotype. *JAT* is expressed in different parts of the plant, showing an unexpectedly high level of mRNA in the roots. However, the *JAT* expression level is not determined by the distance to the roots, but rather depends on the developmental stage of the branch meristems. *JAT* is a widely represented gene in plants that appears to be involved in the control of the juvenile-to-adult transition in olive.

Keywords *Olea europaea* · Plant development · cDNA library · Juvenile · Adult · *JAT*

Communicated by A. Dandekar

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11295-010-0299-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. Fernández-Ocaña · J. Bautista Barroso
Grupo de Señalización Molecular y Sistemas Antioxidantes en Plantas, Unidad Asociada al CSIC (EEZ), Universidad de Jaén, Jaén, Spain

M. Carmen García-López · J. Jiménez-Ruiz · L. Saniger ·
D. Macías · F. Navarro · R. Oya · F. Luque
Grupo de Estudios de Patologías Humanas, Universidad de Jaén, Jaén, Spain

A. Belaj · R. de la Rosa
Centro Alameda del Obispo, IFAPA,
Córdoba, Spain

F. J. Corpas
Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín (EEZ), CSIC, Granada, Spain

F. Luque (✉)
Departamento de Biología Experimental, Universidad de Jaén,
Campus de las Lagunillas s/n. Edif. B-3,
23071 Jaén, Spain
e-mail: flluque@ujaen.es

Present Address:
L. Saniger
Centro La Mojonera, IFAPA, La Mojonera,
Almería, Spain

Introduction

Plant development is a complex process that requires the coordinated participation of external as well as internal factors determining the cell identity. Shoot development can be divided into three post-embryonic developmental phases: juvenile, vegetative adult, and reproductive adult (reviewed by Poethig 1990). These different phases are accompanied by morphological changes and the acquisition of the capacity of the shoot for reproductive development. The major changes in organ morphology occurring during developmental transitions are determined by a complex process only partially understood in herbaceous plants (Poethig 2003). The juvenile-to-adult transition is required to gain reproductive competence, which is manifested only in the adult reproductive phase. Despite the relevance of the juvenile-to-adult transition in plant development, much of the research on phase changes has focused on floral induction.

Although some genes involved in vegetative phase transitions have been identified (Asai et al. 2002; Berardini et al. 2001; Bollman et al. 2003; Moose and Sisco 1996), the molecular mechanism of this process is still poorly defined. In *Arabidopsis thaliana*, the floral transition is controlled by environmental and autonomous pathways that eventually lead to the activation of the transcription factor LEAFY (*LFY*; Weigel and Nilsson 1995). *A. thaliana LFY* gene is expressed at low levels during the vegetative phase (Blazquez 1997) and, when *LFY* reaches a certain threshold level of expression, floral-meristem identity is induced by the activation of the MADS box gene *APETALA1* (Parcy et al. 1998). The constitutive expression of either of these two genes in citrus and poplar reduces the juvenile period and induces early flowering (Pena et al. 2001; Rottmann et al. 2000; Weigel and Nilsson 1995). However, in some cases, the ectopic expression of these genes either has no effect or prompts developmental abnormalities in woody plants. For example, the introduction of *LFY* in hybrid aspen induced abnormal male flowers that failed to produce pollen (Weigel and Nilsson 1995), while the ectopic expression of *API* had no effect on the flowering time (Nilsson and Weigel 1997). In addition, the effect of constitutive expression of *LFY* varies widely among different interspecific *Populus* hybrids (Rottmann et al. 2000), and was found to trigger abnormality in vegetative organs of citranges, an intergeneric hybrid between sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) and trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.), whereas *API* succeeded in reducing the flowering time without inducing any abnormality (Pena et al. 2001). The different effects of the ectopic expression of *API* or *LFY* on woody plants might be caused by interactions between the introduced genes and the host plants (Martin-Trillo and Martinez-Zapater 2002; Pena et al.

2001; Rottmann et al. 2000). The *API* and *LFY* ectopic-expression experiments indicate that juvenile-to-adult and adult vegetative-to-reproductive phase transitions are distinct processes that affect each other (Battey and Tooke 2002). There is recent evidence of the role of miRNAs in the control of plant development. In the juvenile-to-adult transition of *A. thaliana* two miRNAs (miR156 and miR172) have been described as regulators of shoot maturation and the developmental timing (Schwartz et al. 2009; Wu et al. 2009).

Woody plants such as fruit-tree species have juvenile as well as adult structures. Basal branches of the tree are juvenile because they come from a young apical meristem, while branches in higher parts of the tree are adult because they grow from an older apical meristem. The juvenile phase in fruit trees and other woody plants is usually very long (Janick and Moore 1996), lasting several seasons and often displaying differences in several traits with regard to the adult phase (Jones 1999). In olive (*Olea europaea* L.), the juvenile period can exceed 15 years (Bellini 1992), with leaf morphology differing in juvenile and adult branches (Moreno-Álias et al., in press). Despite the development of forced-growth cultivation methods that have shortened the juvenile phase to 3–4 years (Lavee et al. 1996; Santos-Antunes et al. 2005), the length of the juvenile period has traditionally involved major drawbacks for olive breeding (De la Rosa et al. 2006).

There is evidence of epigenetic modifications in several species, including increased DNA methylation throughout the juvenile-to-adult transition (Baurens et al. 2004; Fraga et al. 2002; von Aderkas and Bonga 2000). However, there is little or no information on mutants or candidate genes involved in the juvenile-to-adult phase change in woody plants. A role has been suggested for the MADS box gene *MdMADS12*, in the juvenile-to-adult transition in apple (*Malus domestica*; van der Linden et al. 2002), but experimental support for this hypothesis is still needed. *DAL1*, another MADS box gene, has been described as a potential mediator of the juvenile-to-adult transition in Norway spruce (*Picea abies*; Carlsbecker et al. 2004). *DAL1* expression increases with age, showing a spatial pattern along the trunk of the tree that parallels a similar gradient in physiological and morphological features associated with maturation to the adult phase (Carlsbecker et al. 2004). Ectopic expression of *DAL1* in transgenic *A. thaliana* plants reportedly shortens the juvenile phase, suppresses the adult vegetative phase, and induces flowering (Carlsbecker et al. 2004). Therefore, *DAL1* appears to induce the transition from the juvenile to the reproductive phase. However, there is still much work to do to identify the genes controlling the juvenile phase and its transition to the adult vegetative phase.

To identify genes involved in the juvenile-to-adult phase transition, we have used a transcriptomic approach in olive trees and tested the possible involvement in the juvenile-to-adult transition of the genes that display a differential expression pattern in juvenile and adult tissues.

Materials and methods

Plant material

When young trees grow, the juvenile branches remain at the bottom and the new upper branches change through a gradient to the adult phenotype. Therefore, we were able to study juvenile and adult samples from the same genotype at the same time. The samples for the construction of the subtractive gene libraries were taken from ~5 cm apical juvenile and adult non-reproductive shoots of 4–5-year-old olive saplings of (*O. europaea* L., c.v. Picual, c.v. Arbequina and c.v. Zaity) that were produced in current inbreeding programs at Centro IFAPA “Alameda del Obispo” Cordoba (Spain). Those saplings came from the crosses: ♀ “Picual” x ♂ “Arbequina”, ♀ “Arbequina” x ♂ free pollination and ♀ “Zaity” x ♂ free pollination. One tree from each cross with a normal developmental phenotype was chosen for sample collection. Juvenile and adult samples were taken from low (juvenile) and high (adult) branches of the same trees and at the same moment of early spring, at the onset of growth after the end of the cool season (winter). Samples from low and high juvenile branches of trees with developmental defects affecting the juvenile-to-adult transition were from the same inbreeding programs. Eight juvenile mutant trees were also from breeding programs at the same center as above. Roots, leaves, stems, and meristems were sampled from 15 two-month-old seedlings from “Arbequina” seeds in Centro IFAPA “Churriana” Málaga. All material for RNA preparations was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analyzed. The segregating progeny of a cross “Picual” x “Jabaluna” was also produced in current inbreeding programs at Centro IFAPA “Alameda del Obispo” Cordoba (Spain).

Seedlings of wild olive trees were obtained from open pollination of a wild olive tree located in the province of Cadiz (Andalusia, southern Spain). Previous studies carried out by means of SSR markers have shown that wild populations from Cadiz may represent true oleasters (Belaj et al. 2007). Wild olive is common among the natural flora of this province, where, in contrast with the rest of Andalusia, the area of olive cultivation is very small (Belaj et al. 2007).

A. thaliana Line 951G12 that carries a T-DNA inserted in the 5'UTR of the *JAT* mRNA was obtained from a GABI-Kat FST population (Rosso et al., 2003).

Arabidopsis growth conditions

A. thaliana seeds were surface-sterilized for 5 min in 70% ethanol containing 0.1% (SDS), then 20 min in sterile water containing 20% bleach and 0.1% SDS, and washed four times in sterile water. The seeds were sown for 2 days at 4°C in the dark for vernalization on the basal growth medium composed of 4.32 g/l commercial Murashige and Skoog medium (Sigma), pH 5.5, containing 1% sucrose and 0.8% phyto-agar. The Petri plates containing the *Arabidopsis* seeds were grown at 16 h light, $22^{\circ}\text{C}/8$ h dark, 18°C (long day conditions) under a light intensity of $100\ \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Seeds were grown in individual pots on a 1:1 mixture of vermiculite and soil under long day conditions.

A. thaliana genotyping

DNA was extracted and purified using the Illustra DNA-extraction kit PhytoPure (GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, UK) from one leaf of each plant. Amplifications were performed with 0.1 μg DNA, in the buffer provided and 1.8 mM MgCl_2 , 200 μM dNTP and 2.5 U FastStart High-Fidelity PCR System (Roche, Basel, Switzerland) under the following conditions: initial polymerase activation: 95°C , 5 min; then 40 cycles at 95°C , 30 s; 43.5°C , 30 s; 72°C , 1 min and a final extension at 72°C for 10 min. The results were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis. Primer sequences are available upon request.

Construction of normalized subtractive cDNA gene libraries

RNA was extracted and purified from samples by TRIzol® Reagent (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), quantified by spectrophotometry and stored at -80°C until used. Four microgram of total RNA of adult samples from each of the three trees were pooled for a total amount of 12 μg of adult RNA. A similar procedure was followed with juvenile RNA samples. Subtractive normalized cDNA gene libraries enriched for genes expressed at a higher level in adult or juvenile tissues were prepared with the PCR-Select cDNA subtraction kit (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA).

Cloning and DNA sequencing

The subtracted cDNAs were amplified and cloned using the 3'-A overhang produced after amplification in the pGEM-T

plasmid (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Bacterial clones containing recombinant plasmids were grown and plasmid DNA was purified and sequenced using a Beckman Coulter CEQ 2000XL sequencer (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA).

All sequences were analyzed and manually proofread, using BIOEDIT software (<http://www.mbio.mcsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Nucleotide and deduced amino acid sequences corresponding to all putative ORFs were run against all available databases from the (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using the stand-alone version of program BLAST version 2.2.13 (Altschul et al. 1990). Programs PSI-BLAST, stand-alone version (Altschul et al. 1997), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) (Letunic et al. 2006) and InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>) (Apweiler et al. 2001) were also used in the analysis. The protein sequences were cut into suitable regions based on overlap of domain regions in BLAST and PSI-BLAST outputs for further analysis. Multiple alignment was performed using Multalin software (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>) (Corpet 1988). Programs TmPred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) and SOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui/frame0E.html>) (Mitaku et al. 2002) were used for determining the transmembrane regions and predicting protein membrane, and SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Nielsen et al. 1997) was used for determining the N-terminal cleavage site.

RT-PCR and Q-RT-PCR

First-strand cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA primed with 3.2 µg of random primer (pdN)6 and AMV reverse transcriptase, using the first-strand cDNA-synthesis kit (Roche, Basel, Switzerland). The reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) reactions were performed in 20 µl of reaction mixture, composed of 1 µl of cDNAs and 10 mM Tris-HCl, pH8.3, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 2.5 U Expand High Fidelity^{plus} PCR System of ROCHE and 10 pmol of specific primers. Amplifications were performed under the following conditions: initial polymerase activation at 95°C for 5 min; then 25 or 30 cycles at 95°C for 30 s, at 58°C for 30 s, and at 72°C 1 min, followed by a final extension at 72°C for 10 min. The results were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis. Primer sequences are available upon request. The quantitative real-time polymerase chain reaction (Q-RT-PCR) reactions were performed in 20 µl of reaction mixture, composed of 1 µl of cDNAs and master mix IQTM SYBR[®] Green Supermix with a final concentration of 0.5 U of hot-start iTaq[™] DNA Polymerase (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), 16 mM Tris-HCl buffer, pH8.4, 20 mM KCl, 0.16 mM each dNTPs, 2.4 mM MgCl₂,

0.5 pmol of gene-specific primers and SYBR Green I, 8 nM fluorescein, using an iCycler iQ system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Amplifications were performed under the following conditions: initial polymerase activation at 95°C for 4 min; then 40 cycles at 95°C for 30 s, 58°C for 30 s; 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 7 min. An internal control of 18S rRNA (accession No. L49289) was used for the normalization of the results.

Amplification of 5' and 3' cDNA ends

A full cDNA sequence was obtained by amplifying 5' and 3' cDNA ends using the 5'/3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) Kit second generation (Roche Applied Science, 68298 Mannheim, Germany). Amplified cDNA ends were cloned in the pGEM-T plasmid and the insert sequenced as stated above. Several clones of each cDNA end were sequenced to avoid mutations during the DNA amplification by PCR.

Statistical data analysis

Samples were compared by the Student's *t* test using the Statgraphics plus program.

Results

Construction and analysis of subtractive juvenile-adult and adult-juvenile cDNA gene libraries

Subtractive juvenile-adult and adult-juvenile cDNA gene libraries were constructed as specified in the “[Materials and methods](#)” section. Samples were taken from three trees which showed no developmental alterations and which were derived from crosses of cultivars that, according to their geographical origin and phenotypic characteristics, likely represent a wide genetic spectrum of cultivated olive. We sequenced 450 cDNA clones, 200 from the juvenile-adult and 250 from the adult-juvenile subtractive libraries. The analysis of these sequences produced 41 contigs and 32 singletons corresponding to 73 different ESTs (GenBank accession numbers EF506491 to EF506558, EF529815 to EF529817 and GU980692), of which 53 had probable orthologous genes in other plants due to their significant sequence similarity, and 20 ESTs had no significant similarity with any sequence present in the NCBI databases.

Identification of ESTs differentially expressed in juvenile and adult tissues

For a preliminary screening, the differentially expressed ESTs were amplified by RT-PCR from vegetative shoot

mRNA samples of juvenile and adult branches (Fig. 1). The number of PCR cycles ranged between 25 and 30 to get non-saturating band intensities in the electrophoresis for each gene. The mRNA samples were collected from the same trees and at the same time to avoid environmental, genetic or seasonal differences. Of the 73 ESTs, 13 showed a probable differential expression; i.e., a stronger signal was found in 11 juvenile samples and in two adult ones (Table 1). Seven EST-deduced peptide sequences had identified orthologs, but none seem to be viable candidates in the control of the phase transition, so we focused on those that had no known peptide sequence, probably because the EST did not cover a large enough coding sequence. The mRNA level in adult, juvenile, and 2-month-old seedling samples was determined by Real Time Q-RT-PCR for the selected ESTs (Fig. 2a). We analyzed the mRNA expression of the selected ESTs in 2-month-old seedling samples to determine the expression level of these ESTs in a very early juvenile stage. We found that four of the six ESTs (UP7, UP10, UP14, and UP19) had lower mRNA levels in seedling than in juvenile samples. This was especially pronounced in UP19, in which the mRNA was almost undetectable in the seedling samples. However, as the seedling samples came from different plants and culture conditions, the differences in the expression level could be due to environmental factors. Therefore, we cannot be sure that these differential expression patterns

of ESTs in the seedling and the juvenile samples are due to the developmental stage. Nevertheless, in UP3 and UP11 the mRNA-expression levels were the same in seedling and juvenile samples. Furthermore, the mRNA level modestly lowered from juvenile to adult samples in four of the six ESTs (UP7, UP10, UP11, and UP19). In addition, we noted a fourfold reduction in UP14 and a strong 20-fold reduction in UP3. The UP3 EST had a very high expression level in seedling and juvenile samples that fell remarkably in adult samples. The *A. thaliana* probable orthologous gene also showed a higher expression in juvenile than adult tissues (data obtained from Genevestigator expression database and meta-analysis system, <https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>; Fig. 2b). According to these results and others shown below, we call this the Juvenile to Adult Transition (*JAT*) gene.

JAT expression pattern in the plant

For further study, we selected the *JAT* gene because it had shown a clear overexpression throughout the juvenile phase samples. Expression in the different parts of the tree was determined by Q-RT-PCR mRNA quantification in 2-month-old seedling samples (Fig. 3a). The results show that *JAT* had mRNA expression levels that changed in different parts of the plant. We discovered an unexpectedly high level of *JAT* mRNA in the roots, a much lower level in the stem, and the lowest level of expression in the shoot apical meristem as well as in the leaves. A similar pattern was observed in *A. thaliana* *JAT* probable orthologous gene according to data from the Genevestigator expression database and meta-analysis system (Fig. 3b).

JAT expression in segregant olive trees that have an abnormally delayed juvenile-to-adult transition

In routine breeding programs, thousands of olive trees are produced and grown under forced conditions to encourage a shorter unproductive juvenile phase (Santos-Antunes et al. 2005). In this process, many trees show developmental defects (unpublished data). These trees appear after sexual reproduction presumably because the current olive cultivars (i.e., their genitors) had been multiplied by vegetative reproduction over thousands of years and may have accumulated many deleterious recessive mutations at the same time as dominant mutations that improve agricultural traits. Sexual reproduction allows segregation and appearance of homozygotes for recessive alleles, which may explain the number of abnormal segregants altered in different traits, as in the case of the juvenile-to-adult transition.

In the present study, many of the trees with developmental defects had poor growth or had stopped growing at a

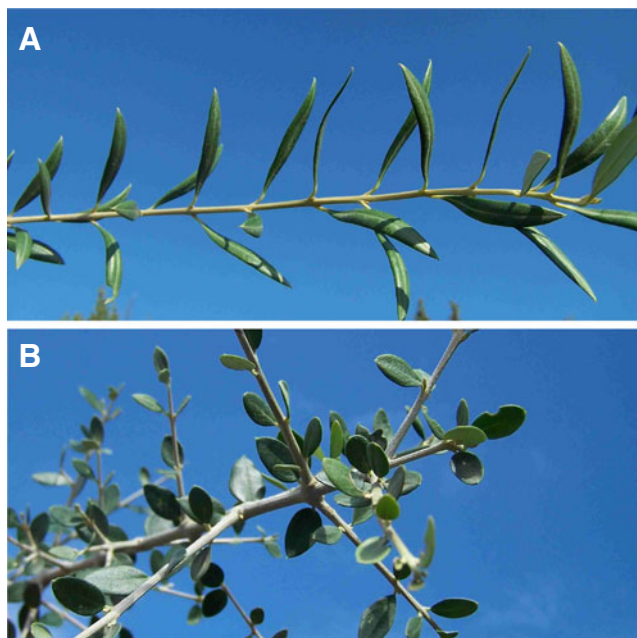


Fig. 1 Phenotype differences between adult and juvenile branches in olive trees: photographs of adult (a) and juvenile (b) olive branches. Juvenile branches are present in very young trees and in the lower parts of the adult trees. Juvenile leaves are smaller and more rounded than adult ones and their axial buds are activated at a higher number than are the adult ones

Table 1 Olive ESTs with different mRNA levels in adult and juvenile samples

EST GeneBank accession no.	Putative ortholog/function	E value	Expression profile
EF506496	Pectin methylesterase	3e-09	Higher expression in adult samples
EF506510	Cytochrome b6/f complex subunit IV	2e-113	Higher expression in adult samples
EF506499	6-phosphofructokinase	9e-17	Higher expression in juvenile samples
EF506514	Lipoxygenase	2e-10	Higher expression in juvenile samples
EF506516	Protein translocase (TOC75)	1e-22	Higher expression in juvenile samples
EF506520	Pyridoxine biosynthesis enzyme (SNZ1)	3e-43	Higher expression in juvenile samples
EF506538	Unknown peptide 3 (<i>JAT</i>)	.*	Much higher expression in juvenile and seedling samples than in adult ones. Very high expression in roots
EF506542	Unknown peptide 7	-	Slightly higher expression in juvenile samples. Very low expression in seedlings
EF506545	Unknown peptide 10	-	Slightly higher expression in juvenile samples. Very low expression in seedlings
EF506546	Unknown peptide 11	-	Slightly higher expression in juvenile and seedling samples than in adult ones
EF506549	Unknown peptide 14	-	Higher expression in juvenile samples, intermediate level in seedling samples and low level in adult samples
EF506554	Unknown peptide 19	-	Higher expression in juvenile samples than in adult samples. Almost undetectable in seedlings

Shoot mRNA samples from juvenile and adult branches were amplified by RT-PCR and analyzed in a 2% agarose gel electrophoresis. The table shows only the ESTs that had different band intensity between juvenile and adult samples. * After complete cDNA sequencing putative orthologs were found (see below).

certain time, so they appear to be deficient in phase transition as a side effect of a growth defect. However, some of the trees that showed developmental defects grew vigorously to a good size, but were unable to proceed through the juvenile-to-adult transition. Therefore, they were unable to produce flowers and fruits and their branches had a juvenile phenotype even at the top of the tree, over 2–3 m high. By contrast, the rest of the normal trees had already produced flowers and fruits by that time (4–5 years old) and all branches over 1.6 m high (Moreno-Álías et al., *in press*) were adult. We do not know whether the aforementioned trees will ever proceed to the adult phase, but it is clear that they are somehow blocked at the juvenile-to-adult transition, and therefore we call them juvenile mutants. The analysis of the expression of *JAT* in eight juvenile mutant trees revealed that they had very low levels of *JAT* mRNA in comparison to juvenile samples of normal trees (Fig. 4).

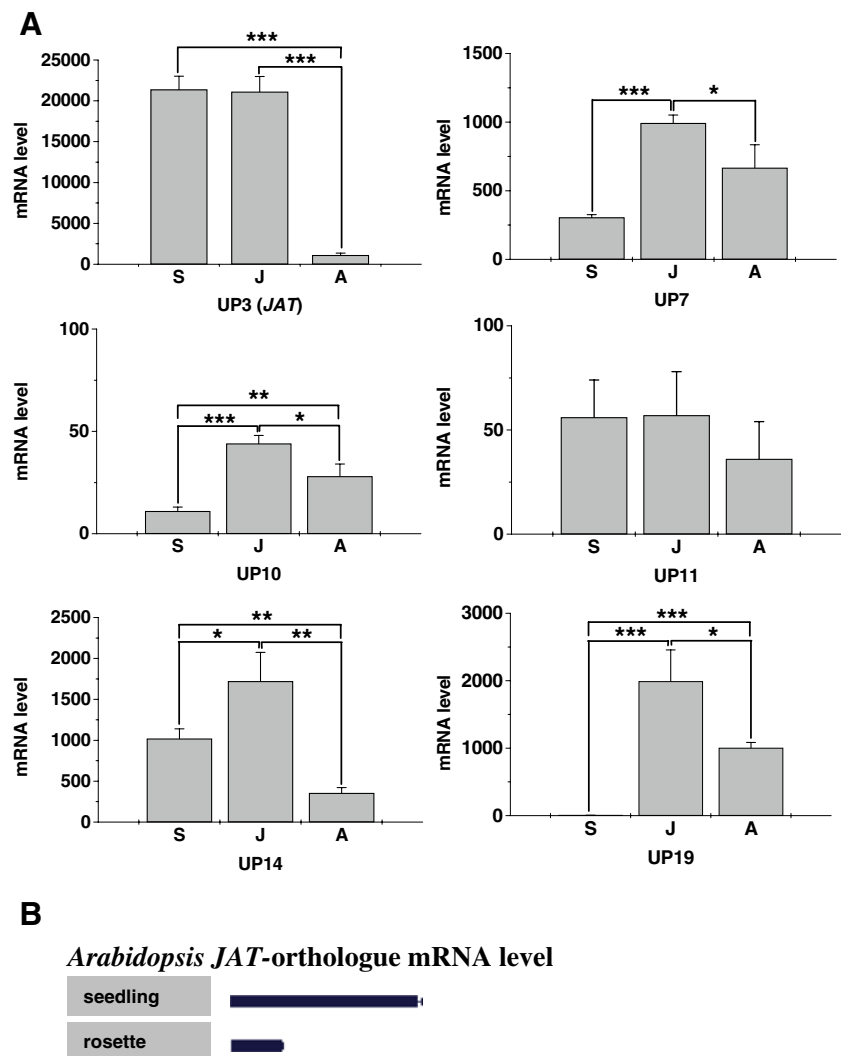
Normal olive trees have juvenile branches at the basal part of the tree and adult branches at the higher parts, while juvenile mutants have juvenile branches at all positions in the tree. As adult branches have low expression levels of *JAT* and juvenile branches have high expression levels, the differences of expression in normal olive trees could be due

to the developmental stage or to the distance from the roots. To study which of these two possibilities is true, we quantified the mRNA level in shoot samples from low and high branches in some of the juvenile mutant trees and found no differences of *JAT* expression (data not shown). Therefore, the *JAT*-expression level is not determined by the height of the branches in the tree by itself, but is related to the developmental stage of the branches.

The *JAT* mRNA level is higher in young olive trees that make an early juvenile-to-adult transition than in those with a delayed transition

The very low expression level of *JAT* mRNA in juvenile mutant trees might indicate that a high expression of this gene in the juvenile tissues is somehow required to have a non-delayed juvenile-to-adult transition. If this is true, young saplings with high *JAT* mRNA levels should become reproductively competent adults earlier than those with low levels of *JAT*. To test this hypothesis, we made a prospective experiment with 31 three-year-old “Picual” × “Jabaluna” olive saplings which had never flowered and with five wild olive saplings of the same age. The mRNA level was analyzed from shoots of low branches at the onset

Fig. 2 The mRNA-expression profile of phase transition involved candidate genes over the course of development; **a** the mRNA level was analyzed by real-time Q-RT-PCR in 2-month-old seedlings (*S*), juvenile shoots (*J*), and adult shoots (*A*). The *J* and *A* samples were taken from the same tree at the same time. The *S* samples are a mixture of several plants. The expression units are arbitrary. The results are the average of three independent experiments. **b** *A. thaliana* expression at different developmental stages. Data from Genevestigator expression database and meta-analysis system; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$



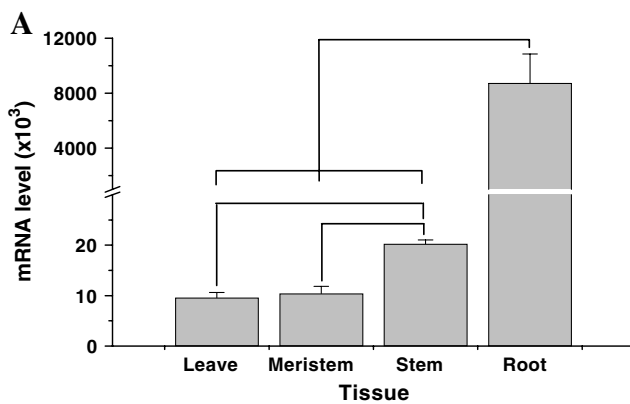
of the spring, and the trees were monitored to identify which of them flowered for the first time that season (fourth spring). The juvenile-to-adult transition precedes flowering and, although morphological changes occur at the transition, they are not always clear enough to provide certainty of the change. Therefore, flowering was used as a marker of the juvenile-to-adult transition even though it is known that some trees could have made the transition without having flowered.

Eight of the 31 “Picual” x “Jabaluna” trees and the five wild trees flowered for the first time that spring, indicating an early juvenile-to-adult transition. The wild trees and the flowered progeny trees had quite similar *JAT* mRNA levels, while the non-flowering “Picual” x “Jabaluna” saplings had a five-fold lower mRNA level ($p < 0.01$; Fig. 5 and Table 2). To perform the statistical analysis, we removed tree number 11, which had the highest *JAT* mRNA level but produced no flowers. This tree data exceeded the mean value plus more than fivefold the standard deviation, and made the standard deviation too high. For this reason, it was

considered as an outlier. This tree in fact shows evident morphological changes of an adult tree but it is probably affected at some other point of the flowering process. With the exception of tree 11, all the trees with very high *JAT* mRNA levels had early flowering (trees number 9, 13, 29, a2, and a5) and none with very low *JAT* mRNA level (trees number 2, 17, and 27) had flowered. Therefore, there was a significant trend in trees with higher *JAT* mRNA levels to undergo an early transition, this strongly supporting the hypothesis that *JAT* (together to other unknown genes) promotes the juvenile-to-adult transition in olive trees.

The insertional mutagenesis of the *A. thaliana JAT* (*AtJAT*) orthologous gene delays flowering time

A transgenic approach has been used to determine whether *JAT* is required for a non-delayed flowering. Because olive trees grow so slowly, an *A. thaliana* transgenic mutant with T-DNA inserted in the *AtJAT* gene was analyzed in search for any phenotypic alteration in the plant development. For



B
Arabidopsis JAT-orthologue mRNA level



Fig. 3 *JAT* expression at the mRNA level in different parts of the plant; **a** The mRNA level was analyzed by Q-RT-PCR in samples from leaves, shoots apical meristems, stems, and roots of 2-month-old seedlings. The samples were a mixture of several plants. The expression units are arbitrary. The results are the average of three independent experiments. Contrasts are represented by lines; in all cases we found $p < 0.001$ **b** *A. thaliana* expression in different plant tissues. Data obtained from Genevestigator expression database and meta-analysis system

this purpose, seeds of the *A. thaliana* Line 951G12 that carries a T-DNA inserted in the 5'UTR of the *AtJAT* mRNA (*T-DNA::AtJAT*) were obtained from GABI-Kat FST population (Rosso et al., 2003). The seedlings were genotyped as described in the “Materials and Methods” section, and homozygous mutants and wild plants were

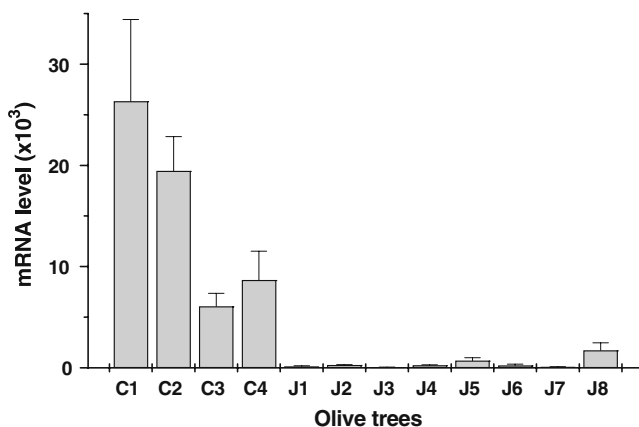


Fig. 4 *JAT* expression in normal and juvenile olive trees: the mRNA level was analyzed by Q-RT-PCR in juvenile shoots of normal control trees (C1–C4) and in juvenile mutant trees (J1–J8), from branches c. 1 m high. The expression units are arbitrary. The results are the average of three independent experiments

selected for further study. Self-pollinated seeds from homozygous mutant and wild *AtJAT* plants were collected and grown under long day conditions.

All seeds, wild and mutant, germinated at the same time and grew at a similar rate. The phenotypic analysis of the *T-DNA::AtJAT* showed a significant delay in the flowering time (Fig. 6). Despite the great differences between the olive trees and *A. thaliana* plants, the results with transgenic *T-DNA::AtJAT* mutant *A. thaliana* plants confirm the involvement of *JAT* in the transition between the juvenile and adult phases. The exact role of this gene remains to be established.

JAT protein phylogenetic relationships

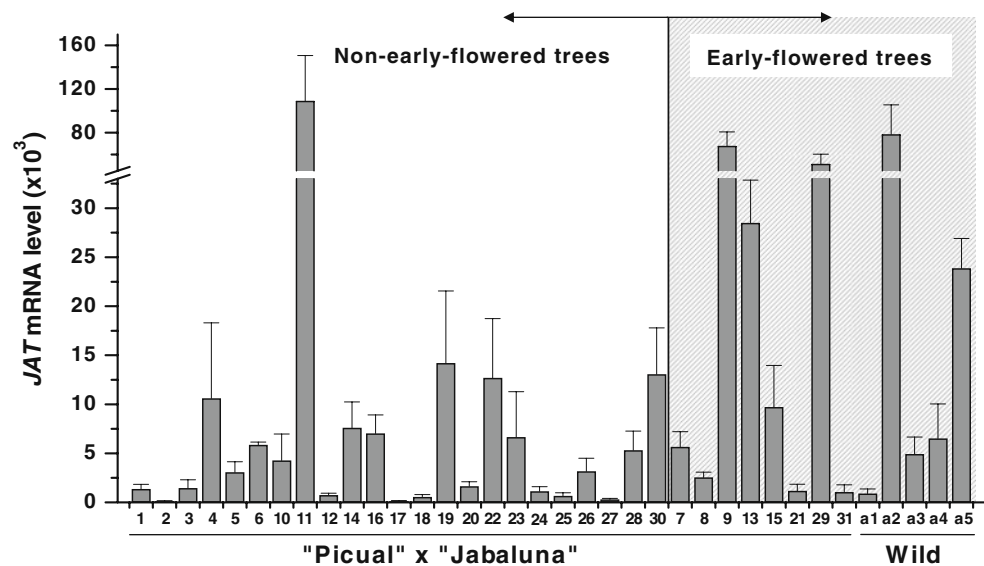
The full *JAT* cDNA was obtained by RACE and sequenced. The deduced amino acid sequence was determined and compared by blast on NCBI databases, with the available sequences. The results showed a high similarity to sequences corresponding to putative proteins present in *Vitis vinifera*, *Populus trichocarpa*, *A. thaliana*, *Glycine max*, and *Ricinus communis*, and less similarity to other plants (Table 3).

In addition, a preliminary phylogenetic analysis of the amino acid sequences confirmed a quite high similarity with *V. vinifera*, *P. trichocarpa*, *A. thaliana*, *G. max*, and *R. communis* peptides that seem to be coded by *JAT* orthologs, as well as a high similarity with the monocots *Oriza sativa*, *Sorghum bicolor*, and *Zea mays* peptides, which are also likely to be coded by orthologs of *O. europaea JAT* gene (Supplemental material Fig. s1). The phylogenetic tree also reveals paralogs in most of these plant species. A multiple alignment of the *JAT* protein and the five most similar putative proteins from the GenBank databases shows good conservation except for the first *JAT* 42 amino terminal amino acids, two short fragments between *JAT* amino acids 67–72 and 184–192, and the last carboxy-terminal residues (Supplemental material Fig. s2). The high degree of conservation of the amino acid sequence strengthens the possibility that they are coded by real orthologous genes.

Analysis of the *JAT*-deduced amino acid sequence

A detailed analysis of the *JAT* amino acid sequence shows a presumed incomplete phosphorylase domain (amino acids 76–342) that lacks the homology in the highly hydrophilic central part of the domain (amino acids 146–257; Supplemental material Fig. s3), suggesting a potential nucleotide-binding domain, but the phosphorylase activity of *JAT* protein is uncertain. Two different programs predict two putative transmembrane domains in the *JAT* protein: (1) amino acids 1–24 and (2) amino acids 91–113 (<http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/>

Fig. 5 *JAT* mRNA level in segregating young olive saplings and early first-time-flowering trees: The mRNA level was analyzed by Q-RT-PCR in juvenile shoots of three-years-old segregating “Picual” x “Jabaluna” cross and in five wild olive trees of the same age. It is indicated which of them flowered for a first time the next spring. The expression units are arbitrary. The results are the average of three independent experiments.



TMPRED_form_parser) and (<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/nph-webface?jobid=TMHMM2,49EC257D03C33E3E&opt=wait>). The analysis (SignalP 3.0 Server-prediction results, Technical University of Denmark) and the Philius prediction algorithm based on Hidden Markov models (Reynolds et al. 2008) confirm the prediction that the amino terminal transmembrane putative domain could be a signal peptide with an assumed cleavage site between amino acids 26 and 27 or a membrane anchor domain (Supplemental material Fig. s4), in fact the analysis with (<http://wolfsort.org/>), (<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/webface?jobid=targetp,49E89F2603837C47&opt=none>) and (http://pprowler.itte.uq.edu.au/pprowler_webapp_1-2/index.jsp) all confirmed the prediction that the JAT protein belongs to the secretory pathway. However, the Philius algorithm does not predict the 91-113 domain as transmembrane, so it is quite uncertain that JAT could be a membrane protein. In addition, these data do not offer certainty in predicting the subcellular location of the protein. In fact, the results of the ELM motif search after globular domain filtering and context filtering predict that

JAT could be a cytosol, plasma-membrane, or endomembrane protein.

Discussion

The olive tree has fundamental economic significance in Southern European agriculture. The olive oil is the fat of choice for the Mediterranean diet, which is widely recognized to have beneficial health effects, particularly regarding coronary heart diseases and certain types of cancer (Alarcon de la Lastra et al. 2001). In previous studies, we have characterized the metabolism of reactive oxygen and nitrogen species in olive plants under salinity conditions (Valderrama et al. 2006, 2007). In this study, we focus on the identification of genes involved in the juvenile-to-adult phase transition. This transition is of economical importance because it is related to the length of the non-productive phase of vegetatively multiplied olive trees used in agriculture. However, the juvenile-to-adult phase change is poorly studied in olive and other tree

Table 2 *JAT* mRNA level in young trees was higher on average in those with early flowering

Trees	<i>n</i>	mRNA level (x±sd)
Wild (flowered)	5	23,153±32,279
Wild (unflowered)	0	-
Segregating progeny (flowered)	8	20,959±25,794
Segregating progeny (unflowered)	23	9,155±22,233
Segregating progeny (unflowered)-outlier tree 11	22	4,687±4,666

The average mRNA level analyzed by Q-RT-PCR in juvenile shoots of 3-year-old segregating “Picual” x “Jabaluna” cross and in five wild olive trees of the same age. The segregating progeny (flowered) had a higher mean value than the (unflowered) once removed the outlier tree 11 ($p<0.01$)

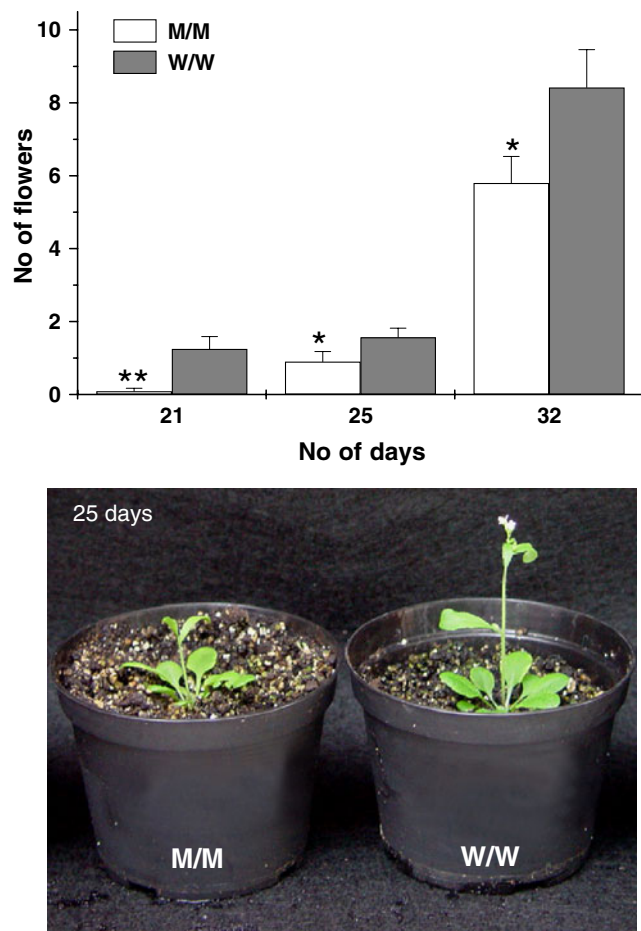


Fig. 6 The *T-DNA::AtJAT Arabidopsis* mutant strain shows a delayed flowering time: Mean number of flowers along the development and a picture of representative wild and mutant plants; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$

species, and the mechanisms that control maturation remain unknown (Martin-Trillo and Martinez-Zapater 2002).

Construction and analysis of subtractive cDNA gene libraries for the search of genes involved in the juvenile-to-adult transition in olive

Vegetative-phase transitions prior to the reproductive phase are poorly understood at the molecular level (Poethig

2003). In many woody plants such as olive and other trees, the juvenile-to-adult transition occurs after many years of growth. The genetic control of this long developmental process is still barely known. In these types of plants, only one gene (*DALI*) has been clearly linked to the transition. The *DALI* gene appears to be a mediator of the juvenile-to-adult transition in Norway spruce and shows a temporal and spatial pattern of expression that increases at the adult phase (Carlsbecker et al. 2004). However, much work is still required to identify the genes involved in the control of the juvenile-to-adult transition.

In search of genes involved in the juvenile-to-adult transition, we made subtractive cDNA gene libraries from adult-juvenile and juvenile-adult samples. Olive trees present a phenological gradient from the bottom to the upper branches. Low branches have a juvenile phenotype while as the tree grows, new upper branches change to an adult phenotype and finally reach the reproductive competence. To prevent gene expression changes produced by environmental, genetic, or seasonal factors, we sampled low juvenile branches and high adult non-reproductive branches of the same trees at the same time. We studied 73 genes identified in the subtractive cDNA gene libraries, only the *JAT* gene was a good candidate to be involved in the juvenile-to-adult transition. This gene had a strong reduction of the mRNA level in the adult samples, meanwhile the *JAT* mRNA level was the same in seedling and juvenile samples, indicating a high expression of this gene throughout the juvenile growth period but dropping in the adult phase. Moreover, the ortholog of *JAT* in *A. thaliana* also shows a higher expression in the early developmental phases (data obtained from Genevestigator expression database and meta-analysis system), (Fig. 2b).

High JAT expression in roots

The quantification of the mRNA level of *JAT* in different parts of seedlings showed extraordinarily high levels of mRNA in the roots, nearly 350-fold more than in the stem, and 700-fold more than in the shoot apical meristem and leaves (Fig. 3a). A similar pattern of very high expression

Table 3 More conserved orthologs to the *O. europaea* JAT protein

Plant proteins	Identities (%)	Similarities (%)
<i>Vitis vinifera</i> (XP_002280745.1)	65	80
<i>Populus trichocarpa</i> (XP_002331152.1)	61	77
<i>Arabidopsis thaliana</i> (NP_194623.2)	57	75
<i>Glycine max</i> (ACU19785.1)	52	72
<i>Ricinus communis</i> (XP_002514270.1)	51	65

Data obtained from Program BLASTP 2.2.22 and all non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects

in roots and the lowest expression in the shoot apex was found in *A. thaliana*, even though the high expression of *AtJAT* in the roots was not so high as in olive seedlings (data from Genevestigator expression database and meta-analysis system), (Fig. 3b). It is known that the roots have some kind of juvenility capacity, because grafted adult branches near the roots usually manifest some juvenile characteristics. For this reason, the expression pattern of *JAT* suggests a gradient of a signal that might come from the roots. This possibility deserves further study.

JAT is involved in a non-delayed juvenile-to-adult transition

In our breeding experiments, many olive trees were found to show some kind of developmental defects. Deleterious alleles might have arisen in the olive cultivars after thousands of years of vegetative reproduction. Another possibility is that, during this long time of vegetative reproduction, farmers may have selected spontaneous dominant mutations that improve the agricultural traits of the cultivated olive trees that might have deleterious effects when sexually reproduced. Whatever the case, sexual reproduction allows the segregation and appearance of homozygote plants for recessive alleles. This is the most likely explanation for the high number of trees with some kind of developmental defects that appears after sexual reproduction. Eight vigorous trees from the progeny of a “Picual” x “Arbequina” cross, showed an abnormally delayed juvenile-to-adult transition, having the phenotypic characters of juvenile trees at an abnormal age and size, and we called these “juvenile mutants”. Surprisingly, the quantification of the mRNA level in shoots of these juvenile mutant trees showed an unexpectedly low level of *JAT* mRNA (Fig. 4). We would have expected to find a high expression of a gene that seems to be characteristic of both early and late juvenile phases. However, the very low expression of *JAT* in the juvenile mutant trees could signify that this gene is required or is co-expressed together to genes required to complete the juvenile phase, and therefore the transition would be blocked or delayed in the absence of a high expression of *JAT* and/or other genes co-regulated with *JAT*.

The low mRNA expression level of *JAT* in the juvenile mutant trees may be the consequence of another genetic defect that alters the expression of genes required for a normal juvenile-to-adult transition, as occurs with many transcription factor genes that control developmental processes. The fact that *JAT* has an abnormally low expression in all the mutants analyzed and that its mRNA level has a 20-fold reduction in adult samples suggests that its function might be required for a non-delayed juvenile-to-adult phase transition. To test this hypothesis, we made a

prospective study with the segregating progeny of a “Picual” x “Jabaluna” cross and with five wild olive trees, and found that the *JAT* mRNA level was higher in the trees that had an early transition. This confirms that this gene is involved in this transition and that high expression levels favor an early transition and very low levels increase the likelihood of a delayed transition. In addition, *JAT* is expressed at very early developmental stages, so that it could be a marker for delayed juvenile-to-adult transition when its expression at the mRNA level is low. The expression level of *JAT* mRNA could be tested just after seed germination and thereby save time and costs in inbreeding experiments.

Effect of the mutational inactivation of the *AtJAT* gene on flowering time

Confirmation that *JAT* is required for a correct phase transition from juvenile to adult stages in olive would require an experiment several years in length using transgenic plants. For that reason, the experiment was made in *A. thaliana*, despite the great phylogenetic distance and developmental differences between the two species. However, the high conservation of the amino acid sequence observed suggests that the gene should maintain a similar function up to some point in both plant species (Table 3).

The analysis of the *A. thaliana T-DNA::AtJAT* mutants showed no symptoms of weakness. Similarly, juvenile mutant olive trees are no less vigorous than wild olives.

The development of *A. thaliana* is so different from that of olive that it was not expected to reproduce exactly the same phenotype as the juvenile mutant olive trees. *A. thaliana* does not have such clearly separated juvenile and adult phases prior to the reproductive phase. In addition, it is possible that this mutant strain does not have a null phenotype because the insertion is in the 5' UTR, which may produce a leaky expression of the gene. However, the *A. thaliana T-DNA::AtJAT* mutants showed a clear phenotype of more delayed flowering time than in the wild plants. It is evident that the mutant plants were able to make the transition to the reproductive phase. However, this transition was affected to produce delaying the flowering time. This phenotype is consistent with what we found in olive and confirms that *JAT* gene is required for a normal non-delayed juvenile-to-adult transition.

JAT gene expression along the stem depends on the meristem phase and not on branch height

Trees usually have a branch-phenotype pattern of juvenile towards adult from the bottom to the top of the plant. We found that low juvenile branches have a high *JAT* mRNA level, whereas the upper adult branches had low mRNA

levels. In addition, the *JAT* gene presented a much higher mRNA level in the roots than in the stem. Therefore, it might be a spatial pattern of *JAT* along the stem, with a higher expression level at the bottom and a lower expression level at the top of the tree. In fact, the Norway spruce *DAL1* gene, required for the transition from the adult vegetative to reproductive phase, is expressed in a spatial pattern along the stem (Carlsbecker et al. 2004). On the contrary, *JAT* expression may not depend on the distance to the roots but rather on the meristem phase. However, the *JAT* mRNA expression in mutant juvenile olive trees that have juvenile branches along the stem, regardless of their position, presented no spatial pattern. Therefore, the *JAT* expression level does not seem to be determined by the distance to the roots, but rather depends on the developmental stage of the branch meristems.

The *JAT* gene has orthologous as well as paralogous genes in other plant species

The deduced amino acid sequence had a strong similarity to sequences corresponding to putative proteins present in other plants (Table 3 and Fig. s2). A preliminary phylogenetic analysis of the amino acid sequences confirmed this similarity, suggesting that they are coded by *JAT* orthologous genes (Fig. s1), and that there are paralogs in most of these plant species. The absence of reports on the function of these *JAT* orthologous genes as well as the protein activity do not yet support any prediction concerning the function of this gene in the development of the olive tree and the mechanisms involved.

The *JAT*-deduced protein might belong to a secretory pathway

As stated above, the real activity and function of this protein is far from clear in any of these systems. Therefore, we undertook a preliminary analysis of the deduced amino acid sequence of the olive *JAT* protein. The result of this analysis suggests that it might have a nucleotide-binding domain because it has a partially conserved domain of nucleotide phosphorylase (amino acids 76–342), which lacks the homology in the highly hydrophilic central part of the domain (amino acids 146–257; Fig. s3). Thus, it is not clear whether this protein is a true phosphorylase enzyme. In addition, two potential transmembrane domains are also predicted (amino acids 1–24 and 91–113; Fig. s3). The first one presents a high likelihood of being a transmembrane domain while the second shows less likelihood and it is not predicted as such by the Philius prediction algorithm. This first transmembrane domain could be a signal peptide with a presumed cleavage site between amino acids 26 and 27 (Fig. s3) or a membrane anchor domain. An amino acid sequence analysis using

several programs predicted that the *JAT* protein belongs to the secretory-pathway proteins. However, these data do not offer certainty in predicting the subcellular location of the protein. The activity of *JAT* as well as its subcellular localization requires further study.

In summary, we have identified a new gene that we call *JAT*. The results presented in this work also support the idea that the *JAT* gene is involved in the juvenile-to-adult transition in olive. This phase transition is likely controlled by a complex genetic mechanism that we do not yet understand. In this sense, the function of this gene remains unknown and will be further studied.

Acknowledgments Two-month-old olive plants were kindly provided by Dr Araceli Barceló, from Centro IFAPA “Churriana” Málaga. DNA sequencing was carried out and supported by the Servicios Técnicos de Investigación, Universidad de Jaén. This work was financed by the Universidad de Jaén project OA/3/2004 and Junta de Andalucía support to Groups CVI258 and CVI286.

Ethical standards The experiments performed in this work comply with the laws of Spain and the European Union.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Alarcon de la Lastra C, Barranco MD, Motilva V, Herrerias JM (2001) Mediterranean diet and health: biological importance of olive oil. *Current Pharmaceutical Design* 7:933–950
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Meyers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA et al (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res* 25:3389–3402
- Apweiler R, Attwood TK, Bairoch A et al (2001) The InterPro database, an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. *Nucl Acids Res* 29:37–40
- Asai K, Satoh N, Sasaki H, Satoh H, Nagato Y (2002) A rice heterochronic mutant, *mor1*, is defective in the juvenile-adult phase change. *Development* 129:265–273
- Batley NH, Tooke F (2002) Molecular control and variation in the floral transition. *Curr Opin Plant Biol* 5:62–68
- Baurens FC, Nicolleau J, Legavre T, Verdeil JL, Monteuiis O (2004) Genomic DNA methylation of juvenile and mature *Acacia mangium* micropropagated in vitro with reference to leaf morphology as a phase change marker. *Tree Physiol* 24:401–407
- Belaj A, Munoz-Diez C, Baldoni L, Porceddu A, Barranco D, Satovic Z (2007) Genetic diversity and population structure of wild olives from North-Western Mediterranean assessed by SSR markers. *Annals of Botany* 100:449–458
- Bellini E (1992) Behaviour of some genetic characters in olive seedlings obtained by cross-breeding. *Acta Hort* 317:197–208
- Berardini TZ, Bollman K, Sun H, Poethig RS (2001) Regulation of vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by cyclophilin 40. *Science* 291:2405–2407
- Blazquez MA (1997) Illuminating flowers: CONSTANS induces LEAFY expression. *Bioessays* 19:277–279

- Bollman KM, Aukerman MJ, Park MY, Hunter C, Berardini TZ, Poethig RS (2003) HASTY, the *Arabidopsis* ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis. *Development* 130:1493–1504
- Carlsbecker A, Tandre K, Johanson U, Englund M, Engstrom P (2004) The MADS-box gene DAL1 is a potential mediator of the juvenile-to-adult transition in Norway spruce (*Picea abies*). *Plant J* 40:546–557
- Corpet F (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acids Res* 16:10881–10890
- De la Rosa R, Kiran AI, Barranco D, Leon L (2006) Seedling vigour as a preselection criterion for short juvenile period in olive breeding. *Aust J Agr Res* 57:477–481
- Fraga MF, Canal MJ, Rodriguez R (2002) Phase change related epigenetic and physiological changes in *Pinus radiata* D. Don. *Planta* 215:672–678
- Janick J, Moore JN (1996) Fruit breeding. Wiley, Inc
- Jones CS (1999) An essay on juvenility, phase change, and heteroblasty in seed plants. *Int J Plant Sci* 160:S105–S111
- Lavee S, Avidan N, Haskal A, Ogrudovich A (1996) Juvenility period reduction in olive seedlings—a tool for enhancement of breeding. *Olivae* 60:33–41
- Letunic I, Copley RR, Pils B, Pinkert S, Schultz J, Bork P (2006) SMART 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucl Acids Res* 34:D257–D260
- Martin-Trillo M, Martinez-Zapater JM (2002) Growing up fast: manipulating the generation time of trees. *Curr Opin Biotechnol* 13:151–155
- Mitaku S, Hirokawa T, Tsuji T (2002) Amphiphilicity index of polar amino acids as an aid in the characterization of amino acid preference at membrane-water interfaces. *Bioinformatics* 18:608–616
- Moose SP, Sisco PH (1996) Glossy15, an APETALA2-like gene from maize that regulates leaf epidermal cell identity. *Genes Dev* 10:3018–3027
- Moreno-Álias I, Gracia A, León L, De la Rosa R, Rapoport HF. Morphological and histological characteristics related with phase change (juvenile/adult) in olive leaves and its determination by near infrared reflectance spectroscopy. *Acta Hort* (in press).
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, Von Heijne G (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10:1–6
- Nilsson O, Weigel D (1997) Modulating the timing of flowering. *Curr Opin Biotechnol* 8:195–199
- Parcy F, Nilsson O, Busch MA, Lee I, Weigel D (1998) A genetic framework for floral patterning. *Nature* 395:561–566
- Pena L, Martin-Trillo M, Juarez J, Pina JA, Navarro L, Martinez-Zapater JM (2001) Constitutive expression of *Arabidopsis* LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. *Nat Biotechnol* 19:263–267
- Poethig RS (1990) Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science* 250:23–30
- Poethig RS (2003) Phase change and the regulation of developmental timing in plants. *Science* 301:334–336
- Reynolds, S.M., Kall, L., Riffle, M.E., Bilmes, J.A. and Noble, W.S. (2008) Transmembrane topology and signal peptide prediction using dynamic bayesian networks. *PLoS Comput Biol* 4: e1000213
- Rosso MG, Li Y, Strizhov N, Reiss B, Dekker K, Weisshaar B (2003) An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol Biol* 53:247–259
- Rottmann WH, Meilan R, Sheppard LA et al (2000) Diverse effects of overexpression of LEAFY and PTLF, a poplar (*Populus*) homolog of LEAFY/FLORICAULA, in transgenic poplar and *Arabidopsis*. *Plant J* 22:235–245
- Santos-Antunes F, León L, de la Rosa R, Alvarado J, Mohedo A, Trujillo I, Rallo L (2005) The length of the juvenile period in olive as influenced by vigor of the seedlings and the precocity of the parents. *HortScience* 40:1213–1215
- Schwarz S, Grande AV, Bujdoso N, Saedler H, Huijser P (2009) The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 67:183–195
- Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A et al (2006) The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. *Plant Cell Environ* 29:1449–1459
- Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A et al (2007) Nitrosative stress in plants. *FEBS Lett* 581:453–461
- Van der Linden CG, Vosman B, Smulders MJ (2002) Cloning and characterization of four apple MADS box genes isolated from vegetative tissue. *J Exp Bot* 53:1025–1036
- von Aderkas, P. and Bonga, J.M. (2000) Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. *Tree Physiol* 20:921–928.
- Weigel D, Nilsson O (1995) A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* 377:495–500
- Wu G, Park MY, Conway SR, Wang JW, Weigel D, Poethig RS (2009) The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell* 138:750–759



RESPUESTA A ESTRÉS POR DAÑO MECÁNICO EN RAÍCES (OLEA EUROPEA L.).

ID: 80

Genómica

Jiménez-Ruiz ⁽¹⁾; Leyva-Pérez ⁽²⁾; Schilirò ⁽³⁾; Bautista Barroso ⁽⁴⁾; Mercado-Blanco ⁽⁵⁾; Bombarely ⁽⁶⁾; Mueller ⁽⁷⁾; Luque ⁽⁸⁾

(1) Departamento de Biología Experimental, Universidad de Jaén; (2) Departamento de Biología Experimental, Universidad de Jaén; (3) Departamento de Protección de Cultivos del IAS-CSIC-Córdoba; (4) Departamento de Biología Experimental, Universidad de Jaén; (5) Departamento de Protección de Cultivos del IAS-CSIC-Córdoba; (6) Boyce Thompson Institute for Plant Research, Tower Road, Ithaca, NY, 14853-1801, USA; (7) Boyce Thompson Institute for Plant Research, Tower Road, Ithaca, NY, 14853-1801, USA; (8) Departamento de Biología Experimental, Universidad de Jaén

El olivo sufre anualmente el ataque de numerosas plagas y enfermedades que provocan cuantiosas pérdidas tanto económicas como en número de plantas y que se han mantenido a lo largo de los años, algunas de estas enfermedades afectan a la raíz directamente (*Phytophthora spp.*) y otras usan la raíz como punto de entrada (*Verticillium dahliae*). Existen técnicas de laboreo tradicionalmente utilizadas que dañan las raíces y hacen que la planta sea más susceptible a dichos ataques. Para estudiar la respuesta en las raíces al estrés producido por el daño mecánico se mantuvieron en condiciones de cultivo de campo olivos cv. Picual de dos meses de edad obtenidos mediante propagación vegetativa. Se realizó el análisis transcriptómico con muestras a tiempo 0h, 8h, 24h, 48h y 7 días del daño mecánico inducido. Se prepararon dos réplicas de cada muestra para la secuenciación masiva de cDNA en un secuenciador Illumina HiSeq 1000.

Se obtuvieron 290 millones de lecturas pareadas procedentes de muestras de raíz que se unieron a otras situaciones control y diversos estreses tanto bióticos como abióticos hasta un total de 742 millones, con el objetivo de ensamblar un transcriptoma *de novo* de olivo que contenga el mayor número de secuencias expresadas con respuesta a estrés. El número total de lecturas pareadas tras el filtrado fue de 735 millones. La optimización del ensamblaje del transcriptoma se llevó a cabo comparando el resultado de los programas de ensamblaje SOAPdenovo-Trans, ABySS y Trinity. Una vez seleccionado el de mayor calidad, se filtró para eliminar contaminantes y se usó como referencia para los análisis de expresión.

El análisis transcriptómico dio como resultado 16165 unigenes expresados diferencialmente con un fold-change mínimo de 8. Estos genes se agruparon según sus perfiles de expresión en diferentes tipos de respuestas al estrés, pudiendo diferenciar entre respuestas tempranas y respuestas tardías, mantenidas y transitorias. La anotación de los genes se realizó con el programa Blast2go (V.2.6.2), el cual permitió obtener los términos GO para análisis posteriores.

Cold response in Olive tree; A RNAseq Study.

María de la O Leyva-Pérez¹, Antonio Valverde², Jaime Jiménez-Ruiz^{1*}, Antonio Muñoz-Merida³, Raquel Valderrama¹, Oswaldo Trelles³, Juan Bautista Barroso¹, Jesús Mercado² and Francisco Luque¹

¹Departamento de Biología Experimental, Universidad de Jaén

²Departamento de Protección de Cultivos del IAS-CSIC-Córdoba

³Departamento de Arquitectura de Computadores, Universidad de Málaga

* Jaime Jiménez-Ruiz. ruiz@ujaen.es

Background

Low temperature severely affects plant growth and development. Several plant species have evolved an adaptive response, named cold acclimation. In order to study this response in olive tree (*Olea europaea*), we maintained two-months-old vegetative propagated olive trees cv. Picual at low temperature (14h at 10°C with light, 10h at 4°C at the dark) for 15 days. Control plants were maintained in field growing conditions. Cold stress symptoms were observed after the first 24h as sagging leaf and biochemical stress markers. After 5 days the plants were observed completely recovered. We extracted RNA from leaves of three control plants and the same number from 24h and 10 days cold stressed plants. We pooled RNA and made two cDNA libraries for sequencing. We used Illumina HiSeq 1000 sequencer.

Results

We obtained 129278973 101bp 35 phred quality paired-end reads (18,55Gb). We used ABySS-pe (k-mer=64) and ABySS single-end (k-mer=63) software for *de novo* ensambling in Picasso supercomputer (www.scbi.uma.es). We obtained 125969 contigs (N50=1212bp). We used DNASTar for RNAseq analysis (k-mer=63, 95% of matches). We found 7643 unigenes differentially expressed with an 8-fold-change. Among these unigenes, 3106 were found differentially expressed after 24h of cooling (2179 up-regulated and 926 down-regulated) so we considered them responsible for early cold response. From these unigenes, 904 were up-regulated and 5 repressed by cold stress at 24h but recovered to normal expression level after 10 days of cold stress so we considered them **cold stress** genes. Among the rest of early cold response unigenes, 201 kept induced and 598 kept repressed after 10 days of cold, when plants didn't show any symptoms, so they were considered involved in **early cold acclimation response**. Other unigenes were observed differentially expressed only at 10 days so we called them **late cold acclimation** genes (42 up-regulated and 4495 down-regulated). We used Sma3 to annotate the selected unigenes. We got 53% in average of annotations from uniprot plant database. Sma3 also retrieved GO Terms and we analyzed them with Blast2GO (V.2.6.2).

Conclusions

We have found three types of response involved in the Olive tree cold stress which affect different biological process; Short term cold stress response, short term cold acclimation response and late acclimation response.

CR0155: ESTRUCTURA GENÉTICA DEL GEN JAT IMPLICADO EN LA TRANSICIÓN JUVENIL-ADULTO DEL OLIVO E IDENTIFICACIÓN DE PARÁLOGOS

Nombre: Jaime Jiménez Ruiz

Dirección:
Jaén

Teléfono:

E-Mail: ruiz@ujaen.es

Autores: Jiménez Ruiz J, (Universidad de Jaén, Departamento de Biología Experimental)
García López MC, (Universidad de Jaén, Departamento de Biología Experimental)
Fernández Ocaña A, (Universidad de Jaén, Departamento de Biología Animal, Vegetal y Ecología)
Barroso JB, (Universidad de Jaén, Departamento de Biología Experimental)
Luque F, (Universidad de Jaén, Departamento de Biología Experimental)

Tipo Póster

Sesión Desarrollo

Resumen:

La transición juvenil a adulto es un proceso complejo y poco conocido especialmente en plantas leñosas. Este cambio de fase se requiere para que la planta adquiera la competencia para la reproducción por lo que su conocimiento tiene tanto un gran interés básico como aplicado a la mejora genética. En un trabajo previo hemos identificado un gen en el olivo cuya expresión se requiere para que la transición juvenil a adulto proceda sin retraso (JAT) (A. Fernández-Ocaña et al. sometido a publicación). Este gen tiene una expresión muy elevada en tejidos juveniles y baja en tejidos adultos. Además su expresión está muy disminuida en olivos que realizan la transición juvenil a adulto anormalmente retrasada.

Hemos obtenido la secuencia tanto del cDNA completo como de la secuencia genómica del gen JAT y comparado su estructura con la de sus probables ortólogos en *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera*, *Populus trichocarpa* y *Ricinus communis*. Dado que el gen está sin estudiar en ningún sistema y que no se ha descrito cual es la actividad ni la función de la proteína codificada, hemos realizado un estudio filogenético de la proteína deducida, así como de la posible estructura y actividad de la misma. De este estudio se desprende que la proteína tiene dos posibles dominios transmembrana y parece seguir la ruta secretoria, con posible, pero no segura, localización en vacuolas. Sin embargo, las predicciones de posibles dominios funcionales no permiten saber todavía cual es su actividad. El gen JAT del olivo consta de cuatro intrones y cinco exones, igual que sus ortólogos, excepto en *R. communis* en el que falta el exón 3, lo que produce una proteína más corta. El análisis filogenético revela la existencia de genes parálogos de JAT en *A. thaliana*, *V. vinifera*, *R. communis*, *Glycine max*, *Oriza sativa* y *Sorghum bicolor*. Por lo que hemos estudiado la posible existencia de genes parálogos en el olivo variedad "Picual" y hemos encontrado 6 haplotipos que definen tres genes, cada uno de ellos con dos alelos, que son el gen JAT y dos parálogos. Los tres genes presentan la misma estructura y un gran parecido en las secuencias, sobre todo en las proteínas deducidas. Donde se encuentran las mayores diferencias entre estos genes parálogos es en las secuencias intrónicas y en la zona 5' correspondiente al promotor. La expresión diferencial a lo largo del desarrollo y en diferentes tejidos está en estos momentos bajo estudio.

Estructura genética, análisis filogenético y de expresión del gen (JAT) implicado en la transición juvenil-adulto del olivo

Jaime Jiménez-Ruiz*, Mari Carmen García-López*, Ana Fernández-Ocaña**, David Macías*, Francisco Navarro*, Raúl de la Rosa***, Juan Bautista Barroso* y Francisco Luque*

*Departamento de Biología Experimental, **Departamento de Biología Animal, Vegetal y Ecología, Universidad de Jaén.
***IFAPA, Centro de Alameda del Obispo en Córdoba.

La transición juvenil a adulto es un proceso complejo y poco conocido que se requiere para que la planta adquiera la competencia para la reproducción. En plantas leñosas el conocimiento de este cambio de fase es incluso peor conocido que en herbáceas y no se han descrito genes que definitivamente estén implicados en la transición juvenil a adulto, centrandose el conocimiento que se tiene hasta el momento a la transición de fase adulta vegetativa a adulta reproductora. Con objeto de encontrar qué genes están controlando este cambio de fase en el olivo hemos hecho genotecas sustractivas e identificado varios genes que tienen una expresión diferente en tejidos juveniles y adultos. Uno de estos genes tiene una expresión muy elevada en tejidos juveniles y baja en tejidos adultos. Además su expresión está muy disminuida en olivos alterados en la transición juvenil a adulto. Estos olivos, aunque tienen un crecimiento normal en cuanto al vigor y porte, no realizan el cambio de fase y se mantienen durante un número de años elevado como árboles juveniles, a pesar de que por su tamaño les correspondería hacer el cambio de fase y entrar en producción. Un estudio prospectivo de árboles de un cruzamiento entre Picual x Jabaluna, ha revelado que los que florecen a los 3-4 años de edad tienen un nivel de expresión de JAT significativamente superior que los que aun no lo han hecho.

Hemos obtenido la secuencia tanto del cDNA completo como de la secuencia genómica del gen JAT y comparado su estructura con la de su probable ortólogo en *Arabidopsis thaliana*. El gen JAT del olivo consta de cuatro intrones y cinco exones, igual que el ortólogo de *A. thaliana*. Dado que el gen está sin estudiar en ningún sistema y que no se ha descrito cual es la actividad ni la función de la proteína codificada, hemos realizado un estudio filogenético de la proteína deducida, así como de la posible estructura y actividad de la misma. La proteína tiene dos posibles dominios transmembrana y parece seguir la ruta secretoria, con posible, pero no segura, localización en vacuolas. Sin embargo, aunque en la presentación se darán estos datos, las predicciones de posibles dominios funcionales no permiten saber todavía cual es la actividad de la proteína deducida. También se realizó el perfil de expresión en la planta mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Esto ha revelado que JAT se expresa en toda la planta, pero que su expresión es máxima en raíces donde se alcanzan niveles de expresión 700 veces superiores a los que se encuentran en hojas y meristemas. El gen JAT presenta un patrón de expresión espacial, con niveles elevados en la zona baja (juvenil) del árbol y niveles bajos en la zona alta (adulta) del árbol que no está determinado por la distancia a las raíces, sino con la fase de desarrollo de esa parte del árbol, como se pone de manifiesto al estudiar su expresión en los olivos incapaces de realizar la transición juvenil a adulto.

A gene that affects *Arabidopsis thaliana* primary root, rosette leaves and floral stem development

M. C. García-López¹, J. Jiménez-Ruiz¹, D. Macías¹, A. Fernandez-Ocaña², J. B. Barroso¹, Angielina Belaj³, R. de la Rosa³, F. J. Corpas⁴, F. Luque¹

¹*Departamento de Biología Experimental, Universidad de Jaén, Jaén, España*

²*Departamento de Biología Animal Vegetal y Ecología, Universidad de Jaén, Jaén, España*

³*Centro de Alameda del Obispo, IFAPA, Córdoba, España*

⁴*Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, España*

Our group is interested in the study of the juvenile-to-adult transition in olive trees as a model for this phase transition in woody plants. In a previous work we identified the *JAT* gene, which is presumably involved in the juvenile-to-adult transition in olive. To confirm this hypothesis we performed two different experimental approaches.

First, we carried out a prospective analysis of the *JAT* expression in 30 olive plant saplings from a cross of “*Jabaluna*” x “*Picual*” cultivars as well as in five wild olive saplings. The plants were followed-up until for a four years time period after seeded and determined the first flowering season. Eight of the 30 cross saplings had been flowered at the end of the four-years follow-up, as well as the five wild olive saplings. The average *JAT* mRNA level was determined by Q-RT-PCR in buds early at the spring. The flowered cross saplings had nearly five-fold higher *JAT* mRNA level than the non-flowered ones, $p < 0.01$, and the same to the wild olive saplings. This result confirms that a high expression of the *JAT* gene is required to get a non-delayed juvenile-to-adult phase transition in olive trees.

The second approach was to study the inactivation of the *Arabidopsis thaliana* probable orthologue of *JAT* by T-DNA mutagenesis. Thus, *A. thaliana* transgenic plants with T-DNA inserted in the *AtJAT* gene were analysed in search for any phenotypic alteration in the plant development. For this purpose, seeds of the *A. thaliana* Line 951G12 that carries a T-DNA inserted in the 5'UTR of the *AtJAT* mRNA (*T-DNA::AtJAT*) was obtained from GABI-Kat FST population. Self-pollinated seeds from homozygous mutant and wild *AtJAT* plants were collected and grown under a long-day condition. Although all seeds, wild and mutant, germinated at the same time, a defect in the early growth of the primary root was observed in the *T-DNA::AtJAT* plants. Roots of *A. thaliana T-DNA::AtJAT* plants grew slower in the first days than did those of wild plants ($p < 0.001$ at 11 days) but finally reached the same length. The floral stem also appeared at the same time in both wild and mutant plants, but at first the *T-DNA::AtJAT* mutant stem grew more slowly than did the wild one ($p < 0.01$ at 21 days), to reach the same length at the later stages. The number of flowers and siliques were lower in the *T-DNA::AtJAT* mutant plants ($p < 0.05$ in no of flowers and $p < 0.001$ in no of siliques at 32 days) and the rosette leaves continue to grow in the mutant plants to produce abnormally larger leaves than in wild plants ($p < 0.001$ at 41 days). These abnormal rosette leaves grow together with the slower growth of the stem and the lower number of flowers and siliques suggest a kind of partial or uncompleted phase change from the juvenile to adult plant. Therefore, the *T-DNA::AtJAT* mutant plant maintains juvenile characters even after adult traits have already appeared.

