

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

Nombre: JIMENEZ RUIZ, JAIME

Universidad: Universidad de Jaén

Departamento: Biología experimental

Fecha de lectura: 28/03/2014

Programa de doctorado: BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

Dirección:

> **Director:** FRANCISCO LUQUE VAZQUEZ

> **Codirector:** ANA MARÍA FERNÁNDEZ OCAÑA

Tribunal:

> **presidente:** RAUL JOSE DE LA ROSA NAVARRO

> **secretario:** Raquel Valderrama Rodríguez

> **vocal:** AURELIANO BOMBARELY GOMEZ

Descriptores:

> BIOLOGIA MOLECULAR

> GENETICA VEGETAL

El fichero de tesis no ha sido incorporado al sistema.

Resumen: 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 \geq fold change \geq 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.