



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Genes implicados en la floración del olivo

Alumno: Almudena Carreras Pulido

Julio, 2014



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Genes implicados en la floración del olivo

Alumno: Almudena Carreras Pulido

Almudena CP

Julio, 2014

INDICE

RESUMEN	4
SUMARY	5
1. INTRODUCCION	6
1.1. El proceso de floración	6
1.2. Principales rutas de control de la floración	8
1.3. Floración en el olivo	14
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Selección de secuencias	17
3.2. Genes estudiados	18
3.2.1. <i>Factor CCR4_Asociado (CAF 1)</i>	19
3.2.2. <i>Gen 22169 desconocido con dominios MADS</i>	20
3.2.3. <i>Gen Constans Like (CO-LIKE)</i>	23
3.2.4. <i>Gen Suppressor of Constans (SOC 1)</i>	23
3.2.5. <i>Gen Apetala 1 (AP1)</i>	25
3.3. Expresión génica a lo largo del tiempo	26
3.3.1. <i>Material vegetal de partida</i>	26
3.3.2. Síntesis de cDNA.....	26
3.3.3. <i>RT-PCR a tiempo real</i>	27
4. RESULTADOS	30
4.1. Expresión génica mediante RT-PCR	30
4.1.1. <i>Factor asociado a CCR4 (CAF 1)</i>	30
4.1.2. <i>Gen 22169-UNKNOWN CON DOMINIO MADS</i>	32
4.1.3. <i>Gen Constans-Like (CO-LIKE)</i>	34
4.1.4. <i>Gen Suppressor of Constans (SOC1)</i>	36
4.1.5. <i>Gen Apetala 1 (AP1)</i>	38
4.1.6. <i>Gen_17728 Desconocido</i>	39
4.1.7. <i>Gen_24412 Desconocido</i>	41
5. DISCUSIÓN	43
6. CONCLUSION	46
7. BIBLIOGRAFÍA	47

RESUMEN

La floración es la etapa que se designa con la adquisición de los órganos reproductores por parte de la planta, la cual está muy influenciada por factores tanto endógenos como ambientales. Para que se produzca la floración es necesario que la planta adquiera un tamaño mínimo. Esta etapa está regulada por una serie de rutas como son la vernalización, la ruta autónoma, y el fotoperiodo, entre otras. Los genes estudiados en este proyecto pueden actuar de forma directa o indirecta en la formación de las estructuras que darán lugar a la aparición de los órganos florales. Estos genes son SOC1, CO-LIKE, U-17, U-24, AP1 y dos genes de los que no se conoce casi nada, que son MADS y CAF1. Para este proyecto nos planteamos la identificación de secuencias de nucleótidos obtenidos a partir del transcriptoma de meristemos juveniles y adultos de olivo con el fin de encontrar genes candidatos implicados en la floración, estudiar el comportamiento de estos genes a lo largo del tiempo e identificar el punto máximo de expresión de cada uno de estos genes en el tiempo de estudio, para conocer su papel en la floración. Para este proyecto, recogimos las muestras de dos árboles diferentes (A y B), procedentes del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) de Córdoba, desde el mes 6 al 33 ambos inclusive, cada tres meses. Partimos también de un microarray (García López, MC; *et. al*; 2014), a partir del cual seleccionamos los genes expresados al inicio de la fase juvenil e inhibidos en la etapa adulta, y viceversa. Para conocer la función de dicha secuencia hicimos un Blast-n y además fueron sometidas a estudios de expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

SUMMARY

Flowering is the stage that is designated by the acquisition of the reproductive organs of the plant, which is heavily influenced by both endogenous and environmental factors. Flowering to occur it is necessary for the plant to reach a minimum size. This step is regulated by a number of routes such as vernalization, autonomous route, and photoperiod, among others. The genes studied in this project can act directly or indirectly in the formation of the structures that give rise to the appearance of floral organs. These genes are SOC1, CO-LIKE, U-17, U-24, AP1 and two genes is not known almost nothing, which are MADS and CAF1. For this project we consider the identification of nucleotide sequences obtained from the transcriptome of juvenile and adult olive meristems in order to find candidate genes involved in flowering, study the behavior of these genes over time and identify the point maximum expression of each of these genes in the study time, for his role in bloom. For this project, we collected samples from two different trees (A and B), from the Institute of Agricultural Research and Training and Fisheries (IFAPA) of Córdoba, from month 6 to 33 inclusive, every three months. Also start from a microarray (García López, MC, et al., 2014), from which we select those expressed at the beginning of the juvenile phase and inhibited genes in the adult stage, and vice versa. For the function of this sequence did a Blast-n and we also were subjected to gene expression studies using quantitative real-time PCR.

1. INTRODUCCION

1.1. El proceso de floración

Sabemos que el embrión se desarrolla como consecuencia de la fecundación de la oosfera. La doble fecundación en angiospermas da lugar al desarrollo del embrión y del endosperma, tratándose este del tejido nutricional del embrión durante la germinación. El embrión se origina a partir del cigoto. Al conjunto de procesos fisiológicos que conducen a la transformación de una sola célula, el cigoto, en un individuo multicelular más complejo siendo este el embrión, contenido en la semilla, se denomina embriogénesis. Este proceso está muy regulado y conduce a la elaboración de estructuras funcionales organizadas y a la diferenciación tisular generando las estructuras elementales de crecimiento como son los meristemas. Los órganos de las plantas tienen un origen post-embriionario. Los diferentes órganos se forman a partir de un meristemo apical y el meristemo radicular (Fig.1).

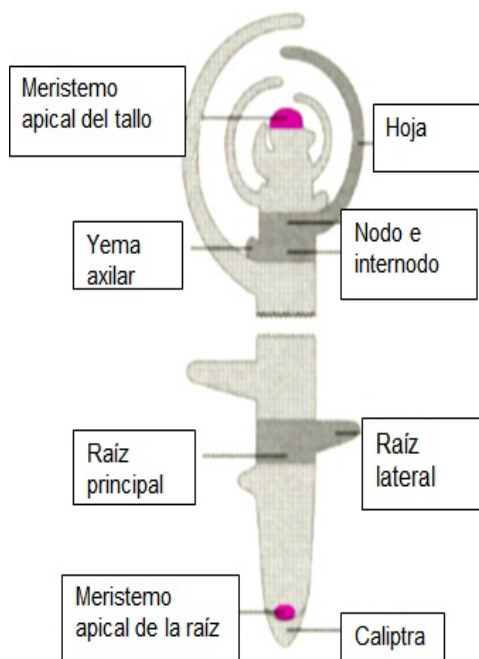


Figura 1. Desarrollo de los órganos a partir del meristemo radicular y del apical. El meristemo apical inicia el desarrollo de toda la parte aérea, a partir de la producción repetida de primordios de órganos y células del tallo. Las estructuras que encontramos compuestas por un segmento del tallo, o entrenudo y un nudo en el que se inserta una hoja con un meristemo axilar se denominan fitómeros los cuales se repiten durante el crecimiento. El meristemo axilar es el que tiene la función de generar una rama lateral con la misma estructura fitomérica.

El inicio de la floración determina el tiempo transcurrido desde la germinación hasta que se inicia el desarrollo reproductivo, definiendo por tanto el tiempo de desarrollo vegetativo de la planta (Sánchez Bermejo, E; 2008). La floración se

designa a la etapa del desarrollo con la cual se inicia la fase reproductiva de la planta, por lo que se produce un cambio en el patrón básico de desarrollo que tendrá lugar una vez que se haya alcanzado un determinado tamaño y la planta esté expuesta a una serie de estímulos endógenos y ambientales. Entonces es cuando se produce una alteración en la estructura del fitómetro (Fig. 2. B.), localizado por debajo del meristemo apical y formando unidades de crecimiento cuya estructura está formada por el nudo, la yema y un entrenudo. El desarrollo de la hoja se inhibe para dar lugar a una bráctea o su desaparición por completo. Entonces el meristemo axilar se diferencia a meristemo floral, produciendo una flor o inflorescencia, en vez de una rama lateral que es lo que produciría el meristemo axilar.

El meristemo floral, a diferencia del meristemo vegetativo, tiene un crecimiento determinado, es decir, limitado en el tiempo, y culmina finalmente en el desarrollo de la flor. Para el desarrollo de la floración se produce un estricto control genético. En este momento, la planta movilizará sus reservas e invertirá sus energías en la producción de la descendencia. En un trabajo desarrollado por Tofiño se describió que para que se desarrolle el paso de fase vegetativa a fase reproductiva debe producirse en un momento fisiológico óptimo, cuando en la planta se producen una serie de cambios estructurales y fisiológicos y a su vez debe coincidir con que las condiciones ambientales sean las favorables. El proceso reproductivo encaja en el desarrollo programado de la planta, gracias al control del ciclo celular ejercido por la coordinación entre proliferación y diferenciación celular. Para la mayoría de las especies la floración se produce en primavera.

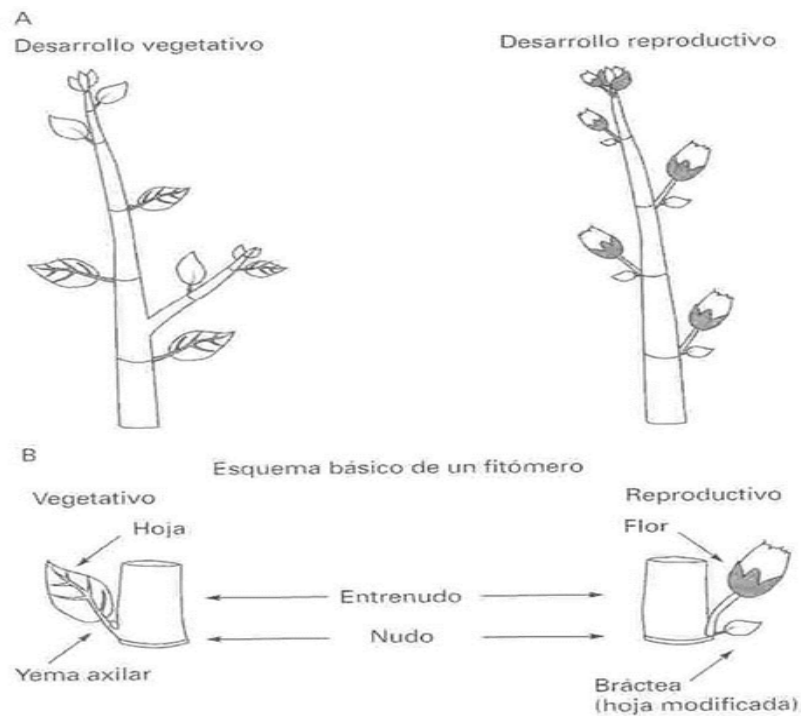


Figura 2. Estructura de la parte aérea de una planta. A. estructura del tallo vegetativo frente a estructura del tallo reproductivo. B. estructura básica de un fitómero en un tallo vegetativo y en un tallo reproductivo.

Debido a que las plantas carecen de movimiento, el fenómeno de floración debe darse de manera sincronizada en todos los individuos dentro de un área geográfica, para favorecer el intercambio genético

1.2. Principales rutas de control de la floración

Uno de los aspectos más importantes en el desarrollo de la planta es la transición entre el crecimiento vegetativo y la floración, reguladas por factores ambientales como son el fotoperiodo, reloj circadiano, vernalización (Fig.3) aporte hídrico, temperatura, y factores endógenos, como contenido celular, almidón y azúcares y concentración de algunas hormonas, proteínas y péptidos en el floema. A nivel genético, el desarrollo de la flor depende de la expresión de los genes responsables cuya regulación se logra en muchas ocasiones mediante la modificación en la cromatina y la expresión de otros genes que codifican factores de transcripción los cuales están involucrados en el proceso reproductivo (Hopkins y Hüner, 2004).

En la Figura 3, se muestran las tres rutas más conocidas que influyen en el control de la floración, en las que hay muchos genes, siendo este esquema muy simplificado, el cual representa los genes claves que conocemos que controlan la floración, aunque existen muchos más.

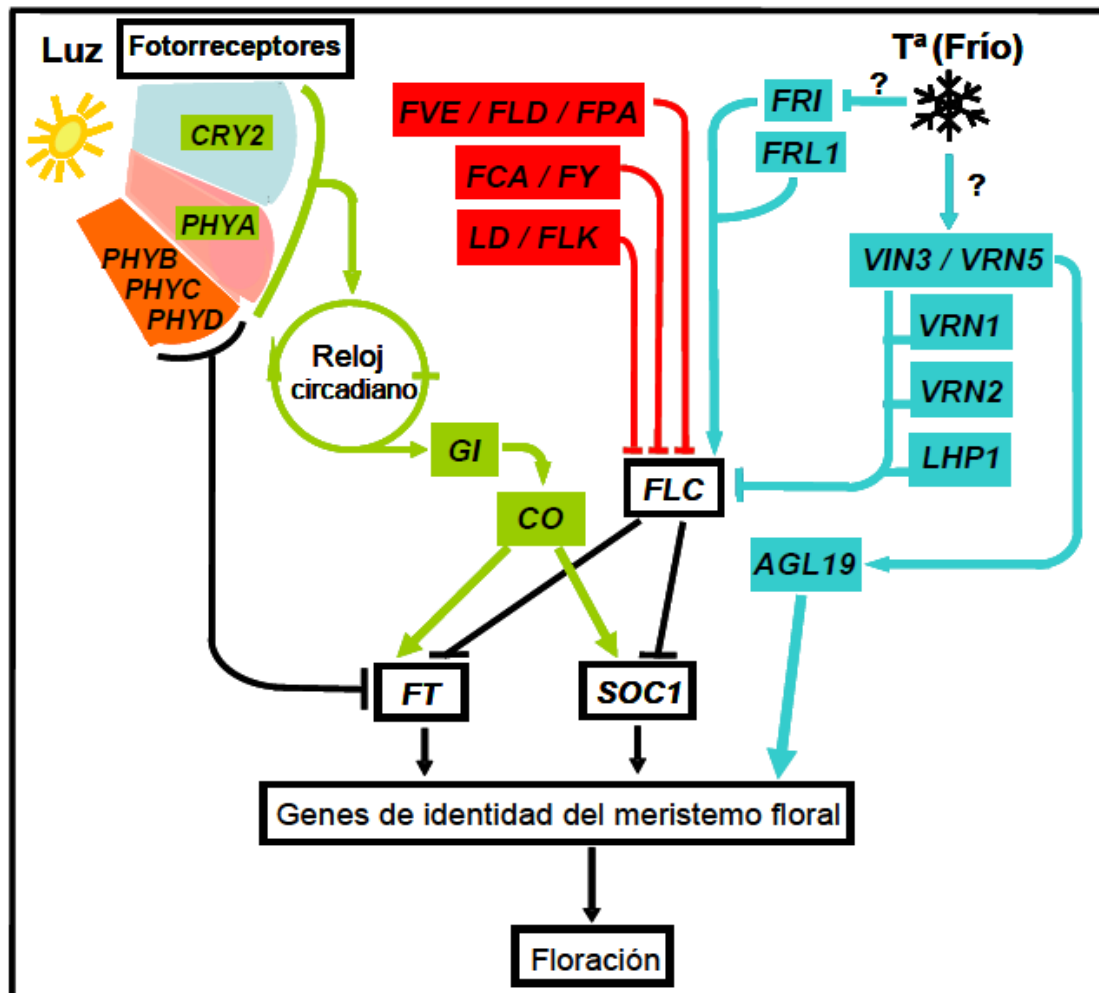


Figura 3. Modelo genético de control del tiempo de floración de *Arabidopsis*. En color verde se muestran los genes que pertenecen a la ruta de fotoperiodo, en color azul los genes de la ruta de vernalización y en rojo los genes que pertenecen a la ruta autónoma. Las cajas negras indican los genes que funcionan como integradores en los que convergen varias rutas de floración. Las flechas indican inducción y las barras de represión.

✚ Ruta del fotoperiodo

La ruta del fotoperiodo se compone de fotorreceptores criptocromos 2 (CRY2), fitocromo A (PHY A), reloj circadiano e integrados florales como son FT (flowering locus T) y SOC 1 (Suppressor of Overexpression of Constans). Todos los genes de esta ruta presentan una regulación circadiana de su

expresión. Los fotorreceptores CRY2 y PHYA perciben la luz y transmiten la señal al reloj circadiano permitiendo la medición del fotoperiodo por la planta. De esta forma CRY2 y PHYA regulan positivamente la floración. Se ha demostrado que el reloj circadiano en *Arabidopsis* se genera por la actividad de los genes LHY (LATE ELONGATED HYPOCOTYL, CCA (CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED) y TOC1 (TIMING OF CAB EXPRESSION). Se ha demostrado que el reloj circadiano regula la expresión de GI (GIGANTEA), que codifica una proteína con posibles dominios transmembrana y CO (CONSTANS), que es un factor de transcripción que regula la expresión de FT y SOC1, ya que activan la expresión de los genes del meristemo floral. Por otra parte, los fotorreceptores de luz roja como los fitocromos B, C y D (PHYB, PHYC, PHYD) participan en la respuesta del fotoperiodo y se comportan como represores actuando sobre FT. La proteína FT se produce en las hojas y se desplaza por el floema hasta el meristemo apical del tallo, junto con un factor de transcripción de la familia BZIP denominado FD, podría formar un complejo de regulación transcripcional que induce la floración como consecuencia de la activación de la expresión de APETALA (AP1) y otros genes del desarrollo floral. (Sánchez Bermejo, E; 2008).

Vernalización

Las plantas vernalizadas florecen posteriormente al tratamiento de la vernalización. Esta característica implica que las plantas vernalizadas “recuerdan” la exposición a temperaturas bajas durante las fases tempranas de su desarrollo y sugiere una regulación epigenética de la floración. (Sánchez Bermejo, E; 2008). A partir del análisis de variantes naturales de *Arabidopsis* se llegó a la identificación de los genes responsables de la respuesta a la vernalización. Los primeros análisis permitieron detectar dos locis con efectos cualitativos FRIGIDA (FRI) y FLOWERING LOCUS (FLC), responsables de las diferencias que existían en el tiempo de floración temprano y tardío.

Alelos dominantes de FRI y FLC actúan de manera combinada produciendo un retraso en la floración de muchas accesiones de *Arabidopsis* cuando no vernalizan, el cual es revertido mediante el tratamiento con bajas temperaturas. Ambos locis han sido aislados demostrando que FRI codifica una proteína sin homología a otras proteínas con un factor de transcripción

con un dominio MADs. El análisis molecular de los dos genes indica que FRI regula positivamente la expresión de FLC, mientras que FLC reprime la expresión de integrados florales como son SOC1 y FT. En el genoma de *Arabidopsis*, existen seis genes homólogos a FRI. Mutaciones en uno de ellos, FRI LIKE 1 (FR1), indican que este gen también es necesario para la expresión de FLC, mediada por FRI, sin embargo la sobreexpresión de FRI y FLC por separado o simultáneamente, no provoca un retraso en la floración, lo que hace suponer que se requiere al menos otro factor adicional. FLC sometido a temperaturas bajas produce una represión en su expresión. No obstante, la promoción de la floración por vernalización, no está regulada solo por el gen FLC, por lo que hay muchos genes implicados en esta respuesta como son los genes MADS AFFECTING FLOWERING (MAF) homólogos de FLC (Scortecci *et.al*; 2001;). Recientemente se ha demostrado que la vernalización no sólo reprime la expresión de factores de transcripción tipo MADS sino que también activa otros factores MADS como AGAMOUS LIKE19 (AGL19). A diferencia de su homólogo FLC, AGL19 funciona como un regulador positivo de la floración (Fig.3). El análisis de mutantes de AGL19 y FLC ha mostrado que la expresión de cada gen no influye en la del otro, por lo que AGL19 y FLC parecen funcionar de forma independiente en la ruta de vernalización. El mecanismo molecular mediante el cual la vernalización regula la expresión de FLC se ha establecido mediante la selección de mutantes alterada específicamente en esta respuesta, como *vrn1*, *vrn2* y *vin3* que impiden la reducción de los niveles de expresión de FLC mediada por temperaturas bajas. VERNALIZATION2 (VRN2) codifica una proteína nuclear con homología a proteínas del grupo Polycomb de *Drosophila* implicadas en remodelación de cromatina; VERNALIZATION1 (VRN1) codifica una proteína con dominios de unión inespecífica a DNA; VERNALIZATION INDEPENDENT3 (VIN3) codifica una proteína con un dominio PHD (Plant Homeodomain-Finger) que se encuentra frecuentemente en proteínas que forman parte de complejos de remodelación de cromatina. En los mutantes *vrn1* y *vrn2*, la vernalización provoca una reducción de la expresión de FLC similar a la observada en la cepa silvestre. Sin embargo, a diferencia de la cepa silvestre, la expresión de FLC se recupera rápidamente cuando estas plantas mutantes son transferidas a temperaturas de

crecimiento normales, lo que indica que el papel de VRN1 y VRN2 no es la reducción de FLC sino el mantenimiento del estado vernalizado a lo largo del desarrollo posterior de la planta. Por el contrario, VIN3 se requiere para el establecimiento de la represión de FLC durante el tratamiento de vernalización y podría estar implicado en la medición de la duración del tratamiento de vernalización pues su expresión aumenta proporcionalmente a dicho tratamiento. Se ha observado que la regulación de la expresión de FLC mediada por vernalización está asociada a la desacetilación y metilación de histonas y que los mutantes *vrn1* y *vrn2* presentan distintas alteraciones del patrón de metilación de la cromatina de FLC (Bastow *et. al*; 2004). Estos resultados indican que VRN1 y VRN2 están implicados en diferentes aspectos de metilación de las histonas al igual que LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN1 (LHP1) y VERNALIZATION5 (VRN5 o VIL1 por VIN3-LIKE1) que han sido identificados recientemente. LHP1, también conocido como TERMINAL FLOWER2 (TFL2), codifica una proteína homóloga a HP1 de *Drosophila* y está implicada en el mantenimiento de la metilación de histonas de FLC y en la estabilización de su represión después del tratamiento de vernalización. Por el contrario, VRN5 codifica una proteína muy similar a VIN3 (con un dominio PHD) que podría participar junto a éste en un complejo de desacetilación y metilación de histonas de FLC durante la vernalización (Sánchez Bermejo, E; 2008).

Autónoma

Los mutantes con pérdida de función de genes asignados a la ruta autónoma se caracterizan por presentar un fenotipo de floración tardía independientemente de las condiciones de fotoperiodo. El fenotipo de floración de estos mutantes correlaciona con niveles altos de mRNA de FLC y se revierte por vernalización. Además, mutaciones de pérdida de función en FLC suprimen el fenotipo tardío de todos los mutantes de esta ruta. Estos resultados han permitido concluir que la función principal de la ruta autónoma es reprimir la expresión de FLC (Fig.3). De esta forma las rutas autónoma y de vernalización convergen en FLC, que actúa de integrador de las señales de ambas rutas.

En la ruta autónoma se han identificado siete genes: LUMINIDEPENDENS (LD), FCA, FY, FPA, FLK, FLD y FVE. LD codifica una proteína nuclear

con un dominio homeobox mientras que el resto de los genes codifican proteínas que interactúan con RNA o proteínas que participan en procesos de modificación de cromatina. Los miembros del primer grupo (FCA, FY, FPA y FLK) codifican proteínas que presentan dominios de unión a RNA por lo que podrían participar en el procesamiento de este tipo de moléculas. En esta línea se ha demostrado que FCA interactúa con FY para regular su propia expresión a nivel post-transcripcional. Por otro lado, FLD y FVE son proteínas homólogas a las proteínas que forman parte de complejos implicados en la desacetilación de histonas y participan en la remodelación de la cromatina de FLC. Estos resultados ponen de manifiesto la participación de mecanismos epigenéticos de modificación de histonas en la regulación de la floración por la ruta autónoma en *Arabidopsis*. Recientemente se han identificado componentes adicionales de las rutas autónomas y de vernalización que también participan en la regulación epigenética de FLC.

FLC integra señales de las rutas de vernalización y autónoma y regula negativamente a los integradores florales FT y SOC1, regulados a su vez positivamente por la ruta dependiente del fotoperiodo. Esta convergencia parcial indica que las distintas rutas funcionan coordinadamente para regular un número limitado de integradores. Además las rutas de promoción de la floración no son totalmente independientes ya que se ha mostrado que CRY2 afecta a la expresión de FLC. Es de esperar que en el futuro se identifiquen más interacciones entre las tres rutas de control del tiempo de floración (Sánchez Bermejo, E; 2008).

Recientemente se ha descrito una nueva *ruta* reguladora de la floración en *Arabidopsis*, que integra información del fotoperiodo y *de la edad de la planta* e implica a los microRNAs (miRNAs) 156 y 172, como también a las familias de factores transcripcionales SQUAMOSA PROMOTER BINDING- LIKE (SPL) y APETALA 2 (AP2). La actividad de esta ruta modula la expresión de diferentes reguladores de la transición floral (Mathieu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2009; Yant *et al.*, 2010).

1.3. Floración en el olivo

La familia botánica de las *Oleáceas* comprende especies de plantas las cuales están distribuidas en las regiones tropicales y templadas. Las plantas que pertenecen a esta familia son mayormente árboles y arbustos. Esta familia está dotada de pequeñas flores agrupadas en racimos en forma de panícula, formando un eje central sobre el que se unen las pequeñas flores, el cual puede tener o no ramificaciones. Algunas son hermafroditas, es decir, tienen los dos sexos manifiestos, mientras que otras sólo son masculinas por lo que solo producen polen. El *olivo* *Olea europea* L. pertenece a dicha familia.

La fase de juvenil a etapa adulta en el olivo va acompañada de una serie de cambios morfológicos, que afectan al tamaño y a la forma de la hoja. Para que se produzca la transición, es necesario que el olivo al menos adquiera un tamaño de unos dos metros con respecto a la raíz (García López, *et.al*; 2014). El olivo se puede considerar una especie policárpica, es decir, que no todos los meristemos participan en la diferenciación de flores y frutos, sino algunos de dichos meristemos permanecen en estado quiescente (para asegurar el futuro crecimiento de la planta). Este árbol puede permanecer vivo y productivo durante muchos años.

La cantidad de polen que es vertido por el olivo a la atmósfera, es más elevada que en otras plantas. Es una especie fundamentalmente alógama que favorece la fecundación cruzada, proceso que tiene lugar gracias a un fenómeno de autoincompatibilidad polen-pistilo por el que el pistilo de una flor reconoce y rechaza el polen procedente de su misma variedad, facilitando el crecimiento del tubo polínico formado por los pólenes de otras variedades. También podemos decir que la especie *Olea europea* es una especie anemofila, ya que esta especie asegura su polinización mediante el viento y para ello tienen que verter mayores cantidades de polen a la atmósfera. Esta característica es propia de plantas que son dominantes en su ecosistema.

Los botones florales comienzan a apuntar a partir de marzo. Las flores aparecen en el mes de abril y mayo aunque las más abundantes se dan en el primer mes (Marcos, D; 2012). En junio, (Fig.4), la aceituna ya se encuentra formada y durante el verano y el otoño los frutos, que son las aceitunas, van aumentando de tamaño y pasan de un color verde a negro. Según las diferentes especies y el clima

de la zona donde crecen se puede empezar a recolectar a partir de noviembre o más tarde.



Figura 4. Olivo en floración. Imagen de un olivo, el cual tiene ya las flores verdaderas en el mes de mayo y junio.

El objetivo de este trabajo es observar el comportamiento de siete genes que se inducen o se reprimen en la etapa adulta del olivo mediante PCR en tiempo real a lo largo del tiempo y hasta los 33 meses de edad de la planta

2. OBJETIVOS

Los objetivos que nos planteamos al inicio de este trabajo fueron los siguientes:

- Identificar una serie de secuencias de nucleótidos que se expresan exclusivamente en la etapa juvenil o en la etapa adulta en el transcriptoma de meristemas adultos de olivo como posibles genes implicados en la floración.
- Estudiar el comportamiento de los genes de olivo escogidos CAF 1, SOC 1, APETALA 1, 22169 Desconocido con dominios MADS, CO-LIKE, Unigene 17728 Desconocido y Unigene 24412 desconocido a lo largo del tiempo de desarrollo de la planta.
- Identificar el punto máximo de expresión de cada uno de esos genes en el tiempo estudiado para ahondar en el conocimiento de los mismos y conocer algo más sobre su posible papel en el proceso de floración.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Selección de secuencias

Utilizamos un microarray realizado en un trabajo llevado a cabo por García López, MC; *et. al*; 2014. Dicho microarray se llevó a cabo a partir del diseño y de la fabricación de EST resultantes de la secuenciación de ocho bibliotecas generadas a partir de cDNA mediante la técnica Sanger y 545. El ARN fue extraído de 5 plántulas con patrones de crecimiento normales y muy similares, de 21 plántulas que hicieron crecer, para evitar cualquier fallo en los resultados causados por las diferencias en el crecimiento. El ARN fue extraído del mesocarpio de fruta verde y endocarpio lignificado de Lechín de Sevilla, hojas y tallos de Lechín de Sevilla, semillas y raíces de una variedad en dos estadios diferentes: juvenil y adulto a partir de una progenie segregante de un cruce de Picual y Arberquina (Muñoz-Mérida *et.al*; 2013).

Para la realización del microarray, se utilizó el árbol 11 de la variedad Arberquina obteniéndose 3 réplicas de la misma muestra a diferentes tiempos. Las muestras de meristemas se recolectaron cada tres meses desde el mes 3 al mes 33 de su desarrollo, siendo un árbol crecido en condiciones controladas de luz y temperatura, en una cámara de cultivo.

La figura 5 muestra el microarray de partida a partir del cual se seleccionaron los genes objeto de estudio. Por una parte seleccionamos las secuencias, las cuales están muy expresadas en las etapas primeras del desarrollo como se puede ver en el gráfico de líneas (Fig.5.1 y 2), y que disminuye su expresión conforme aumenta el desarrollo de la planta, y la otra elección de secuencias fue a partir de las cuales están muy poco expresadas en las primeras etapas de crecimiento y van aumentando conforme aumenta el desarrollo de la planta (Fig. 5.3 y 4).

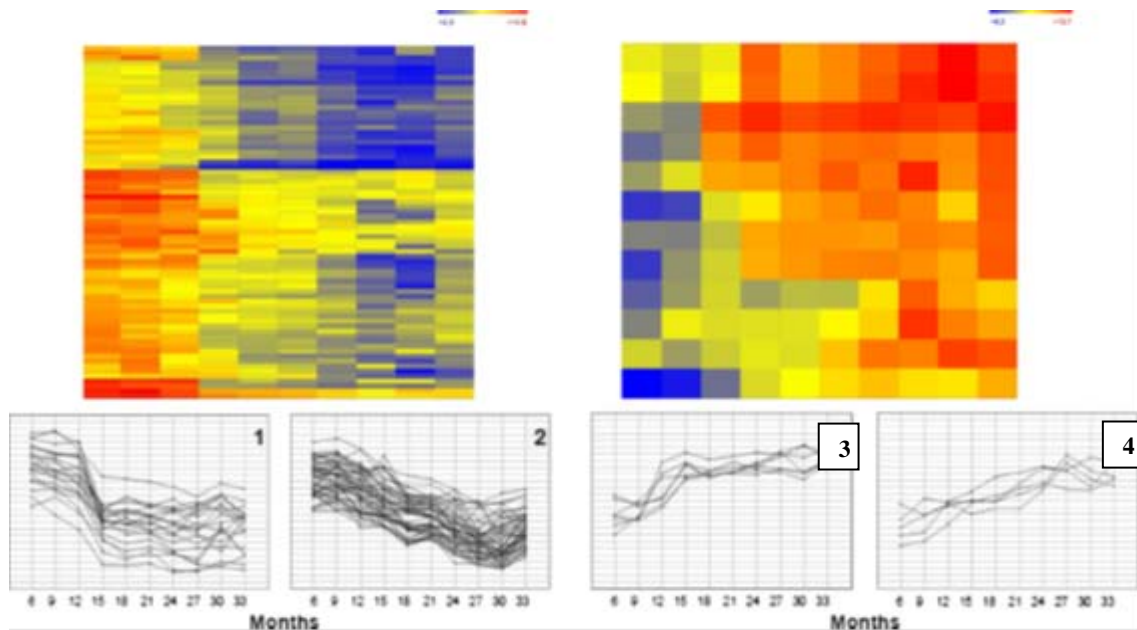


Figura 5. Mapas de calor y grafico de líneas de cambios donde los genes están regulados positivamente o regulados negativamente con respecto al desarrollo. García López, 2014.

Una vez identificadas las secuencias en los mapas de calor se obtuvo la secuencia de nucleótidos que correspondía a las mismas con el fin de hacer un blast-n para encontrar homologías de estas secuencias en otras plantas y poder saber algo más acerca de la función del gen. Las secuencias seleccionadas fueron aquellas que en los mapas de calor indicaban un cambio sustancial desde los tres meses a los 33 meses de edad, bien por sobreexpresión de los mismos, o bien por inhibición de dichos genes.

3.2. Genes estudiados

Para la elección de los genes que hemos estudiado en este proyecto, la selección se hizo a partir de Muñoz Mérida *et al.*, 2013, en el que se obtuvo el transcriptoma de olivo procedente de meristemos y raíz adultos y juveniles por primera vez. A partir de las secuencias que solo se expresaban en la muestra de meristemos adultos, se seleccionaron una serie de secuencias que se enfrentaron con un blastn a las bases de datos. Así obtuvimos las secuencias homólogas de algunos genes conocidos en Arabidopsis, así como una serie de secuencias, que no presentaron homología con ninguna de las existentes en las bases de datos y que

se seleccionaron por su expresión diferencial observada a partir de un microarray que se realizó a posteriori (García-López *et al*, 2014) los genes CAF 1, Gen con dominios MADS llamado 22169, SOC1, AP1, gen 17728 desconocido y gen 24412 desconocido. En concreto, lo que se conoce acerca de los genes estudiados se expone a continuación.

3.2.1. Factor CCR4_Asociado (CAF 1)

El gen CAF 1 actúa suprimiendo la división celular de los meristemos florales, lo que provoca una disfunción en el meristemo floral. En un trabajo anterior (Jacobsen, SE; *et. al*; 1991) se encontró que CAF1 codificaba una proteína de unos 1909 aminoácidos el cual contiene similitudes con helicasas. Las proteínas helicasas, participan en los procesos de duplicación y reproducción celular, transcripción, recombinación y reparación del ADN, y en la biogénesis de ribosomas. De esta manera CAF puede actuar a través del procesamiento del ARN en los meristemos. CAF da lugar a dos importantes transcripciones de 2,5 y 6,2 kb. En los experimentos de hibridación in situ muestran que la CAF-RNA se expresa en todos los tejidos de brote (Jacobsen, SE; *et.al*; 1991). Estos autores concluyen que CAF- 1 es necesario para establecer la arquitectura de plántulas, el tamaño de la hoja y la diferenciación de los tricomas.

Durante la vida activa del ADN, este es leído varias veces por los ribosomas hasta que el ARN envejecido es reemplazado por el ARNm recién sintetizado, por lo que dicho ARN entra en la maquinaria que inicia su degradación, a través de la eliminación de la cola de poli(A) mediante la acción de una enzima específica conocidas como adenilasas. Posteriormente otras proteínas se encargan de eliminar el casquete transcrito, dejándolo totalmente desprotegido frente al ataque de nucleasas que degradan rápidamente el cuerpo del ARNm en sus componentes, nucleótidos (Marchat, LA; *et. al.*). Se ha demostrado en células de levaduras la asociación de las proteínas CCR4 y CAF1, componentes del complejo de proteínas nombrado CCR4-NOT, como principales enzimas desadenilasas citoplasmáticas (Wenxing, L; *et. al*; 2009). CCR4-NOT está involucrado en los diversos aspectos del control de la transcripción y metabolismo del ARNm, incluyendo la acción del enzima adenilasa y su posterior degradación. Las funciones bioquímicas y fisiológicas de

las proteínas CAF1 no se han establecido claramente. Aunque el papel CAF1, in vivo no está claro, in vitro, en levaduras muestran actividad adenilasa. Cuando se produce una delección de la proteína CAF1, in vivo, se reduce la tasa de acortamiento de la cola poli(A) del ARNm, aunque la sobreexpresión de CCR4 puede complementar este efecto. Por lo que esto apoya la idea de que CCR4 es el que tiene la principal actividad adenilasa. En este estudio se vio que la sobreexpresión del gen CAF1 en plantas de tomate presentan un crecimiento normal y su resistencia frente a patógenos aparece alterada, lo que sugiere un papel para CAF1 tanto en el desarrollo de la planta y ante respuestas de defensa (Wenxing, L; *et. al*; 2009).

3.2.2. Gen 22169 desconocido con dominios MADS

El nombre «MADS-box» es un acrónimo formado a partir de los nombres de los genes en cuya secuencia fue identificada la caja MADS por primera vez: *MCM1* (procedente de *Saccharomyces cerevisiae*); *AGAMOUS* (de *Arabidopsis thaliana* e implicado en su desarrollo floral); *DEFICIENS* (de *Antirrhinum majus*, donde interviene también en el desarrollo floral), y *SRF* (de *Homo sapiens*).

Estos factores de transcripción, son propios de un buen número de eucariotas, tanto en animales como en plantas y en levaduras. Poseen una gran importancia en su fisiología al regular distintas funciones. Como todos los factores de transcripción, los MADS-box interactúan con el ADN.

Con respecto a su estructura, las proteínas MADS-box poseen unos dominios los cuales interactúan con el ADN en su zona N-terminal (de unos 56 aminoácidos), pero también su zona N-terminal es esencial para una eficiente unión. Como en el caso de otros factores de transcripción, puede requerir dimerización para ser funcionalmente activo, formando homodímeros o heterodímeros.

Estos genes se caracterizan por tener múltiples funciones, y están involucrados en el desarrollo floral de las plantas. Los genes sólo transcritos en la parte vegetativa están localizados en la parte más basal del organismo, por el contrario los genes que están involucrados en el desarrollo de las flores están

expresados más tarde. En *Arabidopsis thaliana* se han identificado más de 80 genes diferentes del tipo MADS-Box3. (Münster, T; *et.al*; 1997).

La familia de los genes MADS-box se divide en tres grandes clados: ARG80 o familia génica SRF, MEF2 y MIKC22. Se cree que el origen de los genes de la caja MADS fue hace 1.000 millones de años (Münster,T; *et. al*; 1997).

En la actualidad, aun no se ha podido saber cuál es el origen exacto de la familia de genes de la caja MADS. Algunas proteínas bacterianas, tales como los miembros de la familia UspA, que son proteínas implicadas en la respuesta al estrés ambiental en *Escherichia coli* y *Haemophilus influenzae*, contienen secuencias cortas extendidas que pudieron ser homólogas de partes del dominio MADS (Münster,T; *et. al*; 1997).

La función mejor conocida de los genes procedentes de la caja MADS son los que darán lugar al modelo ABC para el desarrollo floral. Esquemáticamente se distinguen 5 genes diferentes involucrados en la identidad floral de *Arabidopsis*: APETALA 1 (AP1), APETALA2 (AP2), APETALA3 (AP3), PISTILLATA (P1) Y AGAMOUS (AG). La clase A es codificada por APETALA1 y APETALA2 (Blázquez, MA; 2000).

Cuando se produce la pérdida de función de clase A, da lugar a la formación de carpelos que sustituye a los sépalos en el primer verticilio (Fig.5), y estambres en vez de pétalos en el segundo verticilo. La clase B compuesta por APETALA3 y PISTILLATA junto con la clase C, da lugar al estambre. Mientras que solo la clase C incluye el gen AGAMOUS y da lugar al carpelo (Fig.6) (Blázquez, MA; 2000).

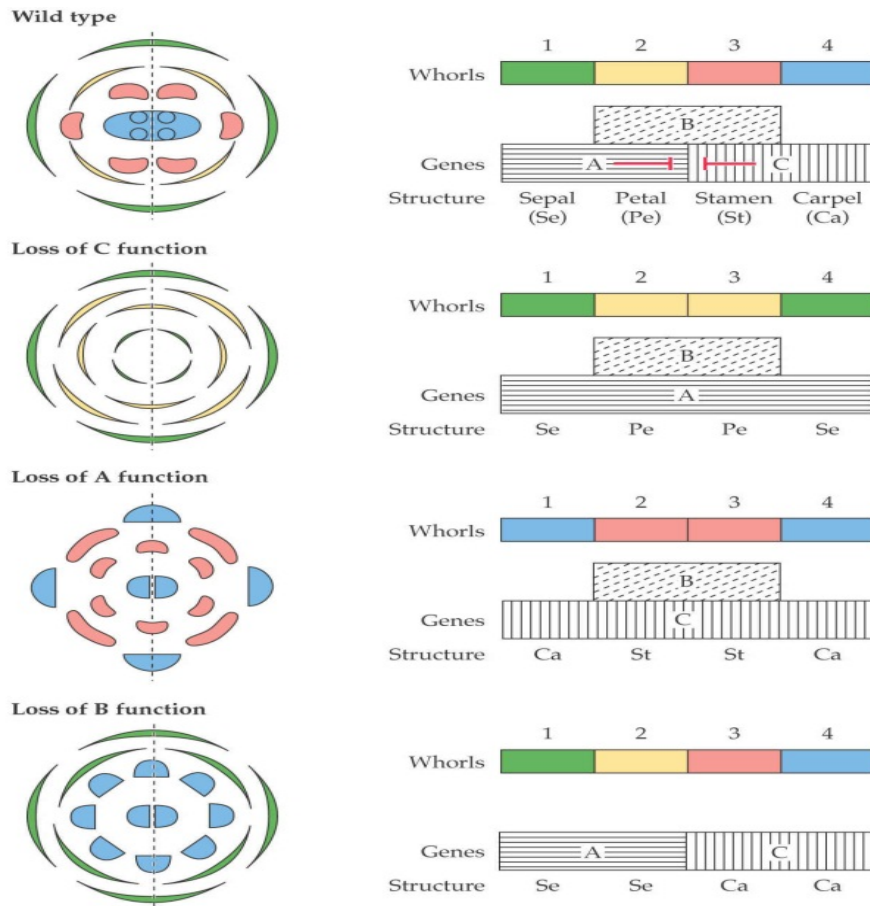


Figura 6. Modelo ABC de la adquisición de la identidad de órganos florales.

Debido a la poca información que se tiene sobre estos genes, actualmente, no se han identificado las dianas primarias a cuyos promotores se unan las mencionadas proteínas de tipo "MADS box". Por esta misma razón, es difícil comprender cómo la identidad de ciertos órganos la establece exclusivamente un tipo de proteínas (por ejemplo, AP1 para sépalos), mientras que la de otros órganos requiere la acción combinada de dos o más tipos de proteínas (por ejemplo, AP1, AP3 y PI para pétalos) (Blázquez, MA; 2000).

El gen que nosotros hemos utilizado para ver si se expresa en la floración es desconocido sabiendo solo que tiene el dominio MADS.

3.2.3. Gen *Constans Like* (CO-LIKE)

Los primeros genes de la ruta inductora de la floración dependiente del fotoperiodo se identificaron a partir de la caracterización de mutantes como *CO*, *FT* y *GI*, que florecen tarde en condiciones de día largo pero florecen al mismo tiempo que el silvestre en día corto (Koornneef *et al.*, 1991). A partir de esta observación se postuló que los genes *CONSTANS* (*CO*), *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) y *GIGANTEA* (*GI*) están implicados en la transmisión de la información procedente del fotoperiodo.

CO es por tanto un gen mediador del reloj biológico que induce la floración mediante el control del fotoperiodo. El gen *CO* de *Arabidopsis thaliana* puede regular otros genes integradores de estas rutas como son *FT* y *SOC1* (Fig.6). La activación transcripcional del gen *CO* se produce a partir de la respuesta del reloj circadiano en los días largos. El gen *CO* se expresa principalmente en la vasculatura del tallo y las hojas (Putterill *et al.*, 1995, An *et al.*, 2004) y codifica una proteína nuclear con dedos de zinc cuya estabilidad depende del ciclo de luz y oscuridad. (Valverde *et al.*, 2004).

Asimismo, la proteína *CO* activa en día largo, pero no en día corto, la expresión del gen *FT* (Fig. 7) (Suárez-López *et al.*, 2001; Yanovsky y Kay, 2002; Wigge *et al.*, 2005). El RNA mensajero (mRNA) de *FT* se acumula en el floema, particularmente de los cotiledones y hojas (Takada y Goto, 2003; An *et al.*, 2004; Wigge *et al.*, 2005).

3.2.4. Gen *Suppressor of Constans* (*SOC 1*)

Estudios recientes muestran que *SUPPRESSOR OF CONTANS 1* (*SOC1*) es una proteína multifuncional que regula no sólo el tiempo de floración, sino también los patrones florales y determinación de meristemas florales (Liu, C; Zhou, J; et al; 2007). *SOC1* está regulado por dos reguladores antagónicos, *CONSTANS* (*CO*) y *FLOREWING LOCUS C* (*FLC*), que actúan como activador y represor floral, respectivamente (Fig. 6). *CO* activa a *SOC1* principalmente a través de *FT* pero *FLC* reprime *SOC1* por unión directa al promotor. *SOC1* también es activado por un mecanismo dependiente de la edad en la que *SPL9* y *microRNA156* están involucrados. Cuando *SOC1* se induce en el ápice del brote, este junto con *AGL24*

activa directamente a LEAFY (LFY), un gen de identidad de meristemo floral (Fig.7). (Lee, J; *et.al*; 2010).

El heterodímero FT-FD también induce la transcripción en el ápice, de genes como *SOC1* y *APETALA 1 (AP1)*, (Fig. 6) que codifican dos factores de transcripción de la familia MADS cuya actividad acaba desencadenando la transición y el desarrollo floral (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005; Searle *et al.*, 2006; Michaels y Amasino, 2010). Por otro lado, las giberelinas activan, por una vía independiente de FT, la expresión de genes como *LFY* y *SOC1* (Blázquez *et al.*, 1998; Blázquez y Weigel, 2000; Moon *et al.*, 2003; Hisamatsu y King, 2008), y reprimen la expresión de *SVP* (Li *et al.*, 2008).

Está asociado con la inducción de la diferenciación celular requerida para el inicio de la floración, específicamente al producir la activación de los genes de identidad de los meristemos florales (*LFY* y *AP1*), cuya expresión promueve finalmente la diferenciación de los meristemos florales (Cobersier, *et. al*; 2005). El inductor floral *SOC1* también integra información proveniente de diferentes rutas. Inicialmente, *SOC1* fue identificado como un mediador de las señales que promueven la floración procedentes de las rutas del fotoperiodo, autónoma y de la vernalización (Lee *et al.*, 2000; Onouchi *et al.*, 2000; Samach *et al.*, 2000). Así, tanto CO, vía FT, como FLC regulan la expresión de *SOC1* mediante la interacción con diferentes regiones de su promotor (Hepworth *et al.*, 2002; Yoo *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008). Además, la expresión de *SOC1* es reprimida por AP2 y regulada por la ruta de los miRNAs 156 y 172, así como por las familias de factores de transcripción SPL y AP2 (Yant *et al.*, 2010). Por otra parte, *SOC1* percibe información que procede de la ruta de las giberelinas (Moon *et al.*, 2003).

En resumen, *SOC1* integra información de varias rutas, siendo un regulador clave de la transición floral.

En estudios llevados a cabo por Lee, 2010, se vio que la pérdida de la función de *SOC 1* produce un retraso en la floración temprana.

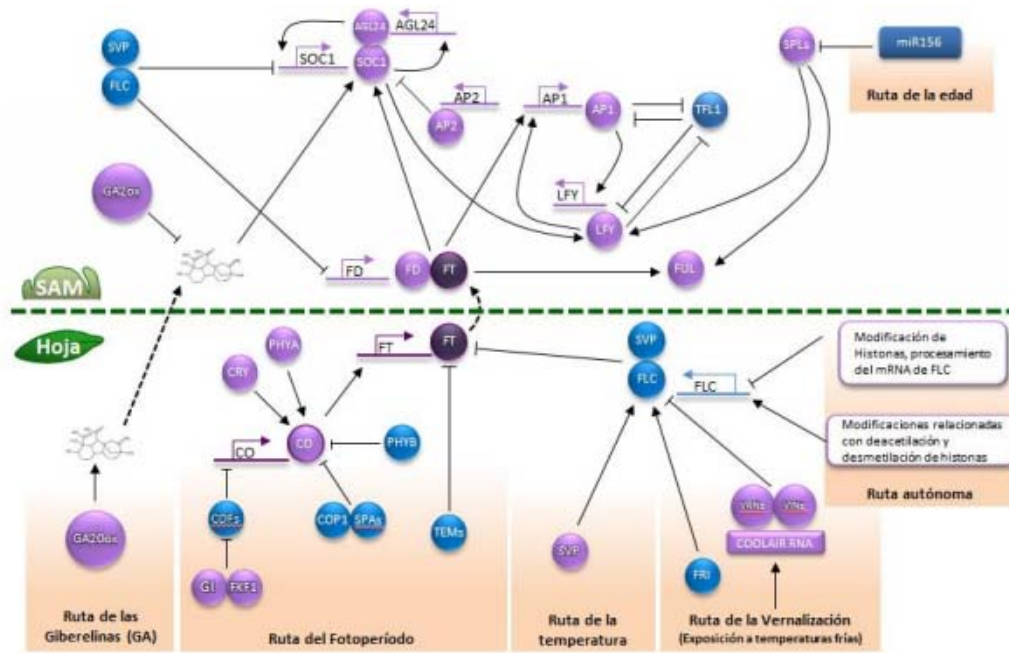


Figura 7. Diagrama de las rutas genéticas que regulan el tiempo de floración en Arabidopsis. Diferentes rutas responden a varias condiciones externas (fotoperíodo, vernalización, temperatura ambiente) o a señales endógenas (autónoma, edad, giberelinas) para regular la transición floral a través de una elaborada red genética. Las señales inductoras deben primero superar la actividad de varios represores de la transición floral (indicados en azul) y de activadores (indicados en violeta) para eventualmente activar los genes de identidad del meristemo (AP1 y LFY). Las rutas actúan sobre diferentes componentes de la red (genes) en diferentes tejidos; la red genética integra la información entrante a través del cambio de expresión de muchos de sus genes. Flechas, indican interacción positiva. Líneas continuas con barra, indican interacción negativa. Líneas discontinuas, indican movimiento a través de diferentes tejidos. Esquema modificado a partir de Fornara et al., 2010; Amasino, 2010.; Wellmer y Riechmann, 2010.

3.2.5. Gen *Apetala 1* (AP1)

El gen AP1 es requerido para que se exprese un patrón a partir del cual surgen los órganos florales (Vivian, F; et. al; 1990).

Las proteínas AP1 y CAL son factores transcripcionales de la familia MADS con alto nivel de homología y función redundante (Mandel et al., 1992; Kempin et al.,

1995). Como se ha comentado, *LFY* induce la expresión de *AP1* y *CAL* en los meristemas florales jóvenes (Parcy *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 1999; William *et al.*, 2004). Por otra parte, también se ha descrito que el complejo FT-FD (Fig. 7) participa en la activación de la expresión de *AP1* en los meristemas florales (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005), aunque recientemente se ha cuestionado que esta activación sea directa (Benlloch *et al.*, 2011). Finalmente, en estadios posteriores, la expresión de *AP1* y de *CAL* se localiza en los primordios de los órganos de los dos verticilos externos de la flor, donde *AP1* actúa como un gen homeótico floral controlando, junto a *APETALA 2* (*AP2*), la identidad de sépalos y pétalos (Irish y Sussex, 1990; Mandel *et al.*, 1992; Bowman *et al.*, 1993).

3.3. Expresión génica a lo largo del tiempo

3.3.1. Material vegetal de partida

Las muestras escogidas para nuestro estudio las hemos obtenido a partir de dos árboles el Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) de Córdoba, España. Nuestro estudio parte de una serie de muestras de ARN procedentes de meristemas de dos árboles (olivos) diferentes, los cuales los nombramos como árbol A y árbol B. De cada árbol, se recogieron meristemas de tres en tres meses desde el mes 6 hasta el mes 33, ambos inclusive. Para ver si las muestras del ARN del meristemo apical de olivo se mantenían en perfectas condiciones, se utilizó un lector de microplacas para medir las absorbancias a unas longitudes de onda de 260 y 280 nm. Ha de oscilar entre 1.8 y 2 dado que las proteínas absorben a 280 nm se emplea un cociente A_{260}/A_{280} para calcular la pureza de los ácidos nucleicos. Los cocientes respectivos del ADN y ARN puros son aproximadamente de 1.8 y 2.0. Una absorción a 230 nm significa que la muestra está contaminada con hidratos de carbono, péptidos, fenoles, compuestos aromáticos u otras sustancias.

3.3.2. Síntesis de cDNA

Para esta técnica se utiliza una enzima denominada transcriptasa inversa, la cual, a partir de una cadena de ARN sintetiza una doble cadena de ADN, es decir, cataliza

la retrotranscripción o transcripción inversa. Partimos de una hebra de ARNm. La transcriptasa inversa cataliza la síntesis de ADN complementario a una hebra de de ARN. Se utilizó para la síntesis el kit First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche).

La muestra del árbol B, mes 9 la descartamos para el análisis mediante RT-PCR a tiempo real al ser muy escasa y no poder analizarla.

3.3.3. *RT-PCR a tiempo real.*

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 1:5 del ADNc

Esta técnica que es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR). La característica principal que presenta con respecto a la otra es que va a monitorizar continuamente la aparición de un producto amplificado en cada ciclo de PCR, midiendo la fluorescencia de las cadenas sintetizadas, la cual es proporcional a la cantidad de amplicones en cada ciclo. La cantidad de material de partida se cuantifica mediante el llamado Crossing Point que se trata de un punto de la gráfica (producto/tiempo) que cuantifica el tiempo que tarda cada muestra en amplificar una cantidad determinada de DNA. Este tiempo nos informa de la cantidad de producto inicial.

Para identificar los productos de la PCR nos basamos en el análisis de las curvas de temperatura de fusión (melting curve), curva que expresa la relación con el contenido de GC, tamaño de amplicones y la secuencia de los mismos. La medida de la fluorescencia es dependiente de la temperatura en el termociclador aumentando de 50°C a 95°C, siendo la fluorescencia detectada dependiente de la presencia de secuencias de doble cadena de DNA. Cuando por efecto de la temperatura se produce la separación de las dobles cadenas de DNA, se produce una disminución de la fluorescencia debida a que el colorante en nuestro caso EvaGreen, deja de estar unido al producto de la PCR. Pueden aparecer varios picos en los que se representan las temperaturas a las que los máximos niveles de cambio de fluorescencia se producen, correspondiendo estos a un producto particular en la PCR a tiempo real.

Para este tipo de técnica específica se utiliza los mismos componentes que para una PCR convencional como son, cebadores o primers específicos (tabla 1), dNTPS, un tampón de reacción adecuado y una ADN polimerasa la cual será termoestable y a dicha mezcla o MIX se le añade un fluoróforo que en nuestro caso será EvaGreen, el cual no es un agente intercalante ya que no se inserta en el espacio entre dos pares de bases, sino que se asocia a la molécula de ADN interactuando con la hendidura menor del ADN, se acopla energéticamente a los ácidos nucleicos de éste, de manera que se incrementa notablemente su tasa de emisión fluorescente. A este fenómeno se le conoce como transferencia de energía mediante resonancia de fluorescencia y solo emitirá fluorescencia cuando se une a una doble cadena de ADN, mientras que si se une a una cadena simple no se emitirá.

Hicimos el estudio mediante RT-PCR de siete genes seleccionados, Unigene_12 (CAF1), Unigene_17728, Unigene_5004 (AP1), Unigene_63200 (SOC1), Unigene_22169, Unigene_61366 (CO-LIKE) y Unigene_24412. Utilizamos un control interno de actina 40 de olivo, para la normalización de los resultados.

Los primers utilizados para la PCR fueron los que se detallan en la tabla.

GEN	NOMBRE PRIMER	SECUENCIA PRIMER	TAMAÑO AMPLICON (bp)
CAF 1	12F	5' GAC GTG GCA TGC ATT TCA GAA AAT GAG 3'	103
	12R	5' GTC ATT ACT AAT ACA CTT CTA GTC CAT ACA ATA TTC CAG C 3'	
UNIG ENE 17728	17728F	5' GAA AGC AAA GGA GAG TAT ACA GAC AGA GAC AGT G 3'	110
	17728R	5' AAA ATC CAC CCC CAT TCA TTT CTT GAT C 3'	
UNIG ENE 24412	24412F	5' GAG CAA AGC AAT TCA TCC GAG TGT ATC AC 3'	112
	24412R	5' TGC TGC AGT CTC CTA GCA TCA TCT TCA G 3'	
SOC 1	63200F	5' CTC TTG CTC AAA TTA AGG AAG CCG AGA C 3'	176
	63200R	5' AGC TCC CGA ATT TAG GCA TAT AAG TTT TCC 3'	

MADS	22169F	5'GGT ATA ATC GAG CGA GGC AGT TCA TCT G 3'	104
	22169R	5' CAG TTG GAG AAA GGT AAG CCC AAC TTG AG 3'	
CO_LI KE	61366F	5'AAG GTC GAT TTG CAA AAA GAA CAG ATT CTG 3'	104
	61366R	5' TAC ATG TCC TCA AAA TGA GGG TAC GAT GC 3'	
ACTIN 40	Actin40370F	5' CCC TTG ACT ATG AGC AGG AGC TTG AGA C 3'	143
	Actin40370R	5' GAT CAT TGA AGG CTG GTA AAG AAC CTC AG 3'	
AP1	5004F	5'AAA CTG ATT ACG ATT ACT CGG AAT TTG AAA CG 3'	142
	5004R	5' TCA CTT GAG GGA TAC AAA TAT TCA ACG AAG G 3'	

Tabla 1. Tabla de los diferentes primers utilizados para cada gen específico donde podemos ver el tamaño del primers, el nombre y el número de pb.

Para la realización de la RT-PCR se utilizó un aparato marca BioRad-CFX384 (Real Time System). Para ello utilizamos el protocolo siguiente: un ciclo a 95°C durante 5 minutos 40 ciclos a 95°C, 30 segundos, 60°C, 30 segundos y 72 °C, 30 segundos y finalmente un ciclo a 72°C durante 10 minutos. Se pusieron cuatro cámaras para lectura de fluorescencia, a 70°C, 74°C, 76 °C y 80°C

Una vez obtenidos los datos de las diferentes RT-PCR, se analizaron a través del programa bioinformático Bio-Rad con el que se obtuvieron las gráficas para la curvas de melting y se analizó el comportamiento de los genes en los distintos tiempos.

4. RESULTADOS

Los patrones de expresión génica durante el crecimiento del olivo, nos permite obtener una visión de la importancia de los genes en la transición de juvenil a adulto, ya que muchos genes, junto con factores ambientales como son las horas de luz y oscuridad, la temperatura y una serie de señales endógenas procedentes de la misma planta, son los responsables de dicha transición

Partimos de unas muestras de ARN de dos árboles diferentes denominadas árbol A y árbol B, extraído desde el mes 6 al mes 33, cada tres meses. Se midió la calidad e integridad de las muestras para asegurar el buen estado de las mismas. La muestra proveniente del árbol B y del mes 9, fue descartada del estudio al no ser suficientemente concentrada. Con el resto de las muestras se trabajó sintetizando el cDNA mediante el kit de Roche (Transcriptor First Strand Synthesis Kit), para estudiar posteriormente la expresión de cada gen a lo largo del tiempo mediante la técnica de PCR en tiempo real.

4.1. Expresión génica mediante RT-PCR

4.1.1. Factor asociado a CCR4 (CAF 1)

La figura 8 representa las curvas de fluorescencia en cada ciclo de amplificación y las curvas de melting para el gen CAF 1.

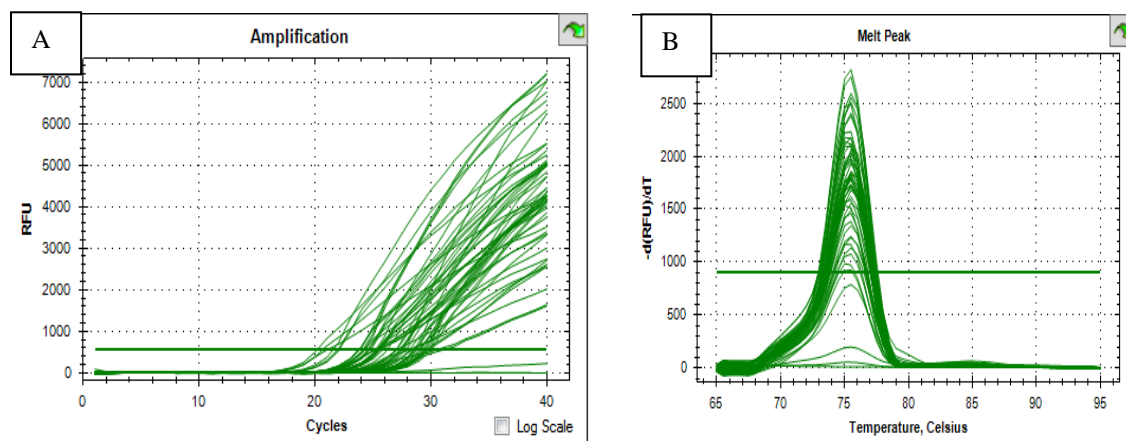


Figura 8. Amplificación y curva melting para el gen CAF1.

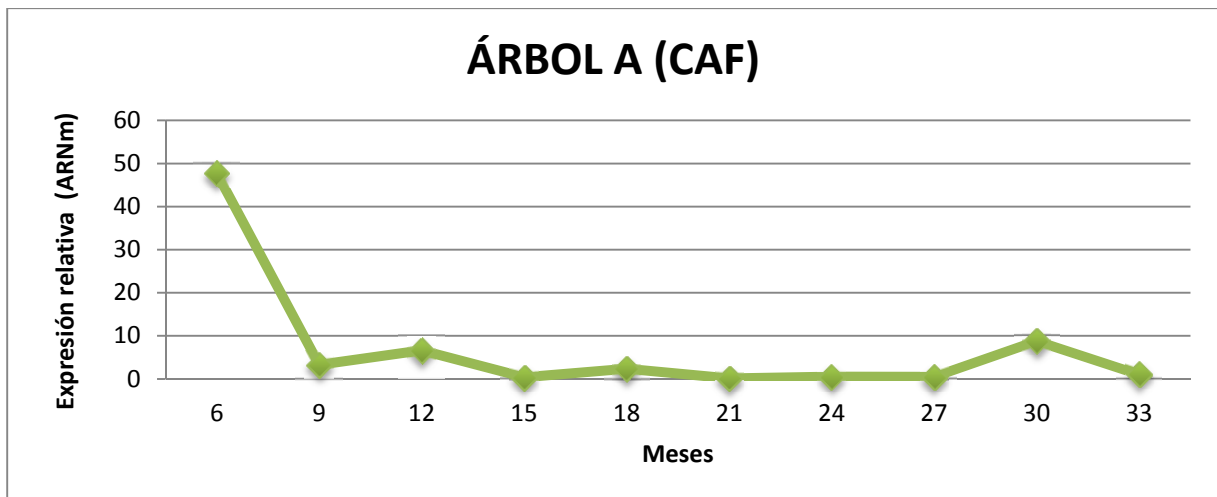


Figura 9. Expresión del Gen CAF en el árbol A.

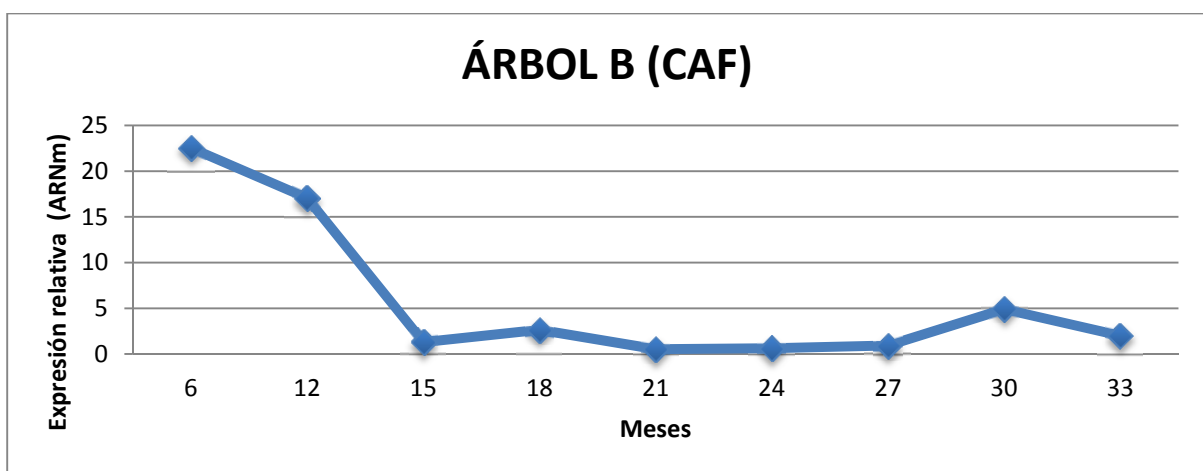


Figura 10. Expresión del Gen CAF en el árbol B.

Las figuras 9 y 10 representan el comportamiento de CAF en ambos árboles, A y B, a lo largo del tiempo. Podemos observar que es un gen que se expresa mucho en las primeras etapas del crecimiento, cuando la planta está en sus primeros estadios de desarrollo. El que este muy expresado al inicio del desarrollo del árbol, puede estar relacionado con la función del mismo. Algunos autores, muestran que este gen está relacionado con la respuesta de defensa frente a patógenos y también está implicado en el desarrollo (Wenxing, L; *et. al*; 2009), por lo que debe estar muy expresado al inicio del desarrollo de la misma, como ocurre en nuestros dos árboles aunque en diferentes meses. Paulatinamente, va desapareciendo y a partir de los 15 meses de vida de la plántula en el caso del árbol B y de los 9 meses en el árbol A, es casi indetectable su expresión. El patrón de expresión para ambos árboles es casi idéntico. Luego de nuevo se produce una

subida de expresión pero apenas significativa en el mes 30 y vuelve a bajar a los 33 meses de vida.

4.1.2. Gen 22169-UNKNOWN CON DOMINIO MADS

La figura 11 representa las curvas de fluorescencia en cada ciclo de amplificación y la curva de melting para el gen 22169 con dominio MADS. Las medidas de fluorescencia se hicieron por tanto a 74°C.

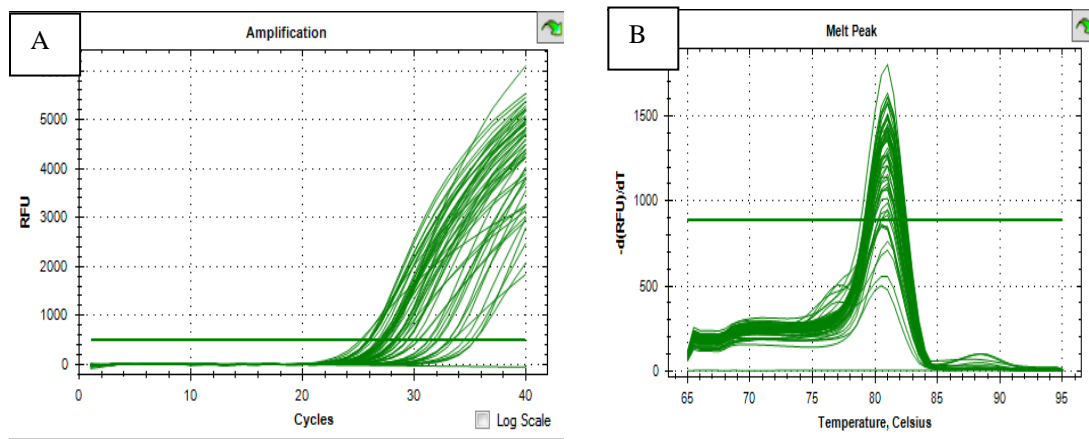


Figura 11. Amplificación y curva Melt para el Gen_22169 desconocido con dominio MADS.

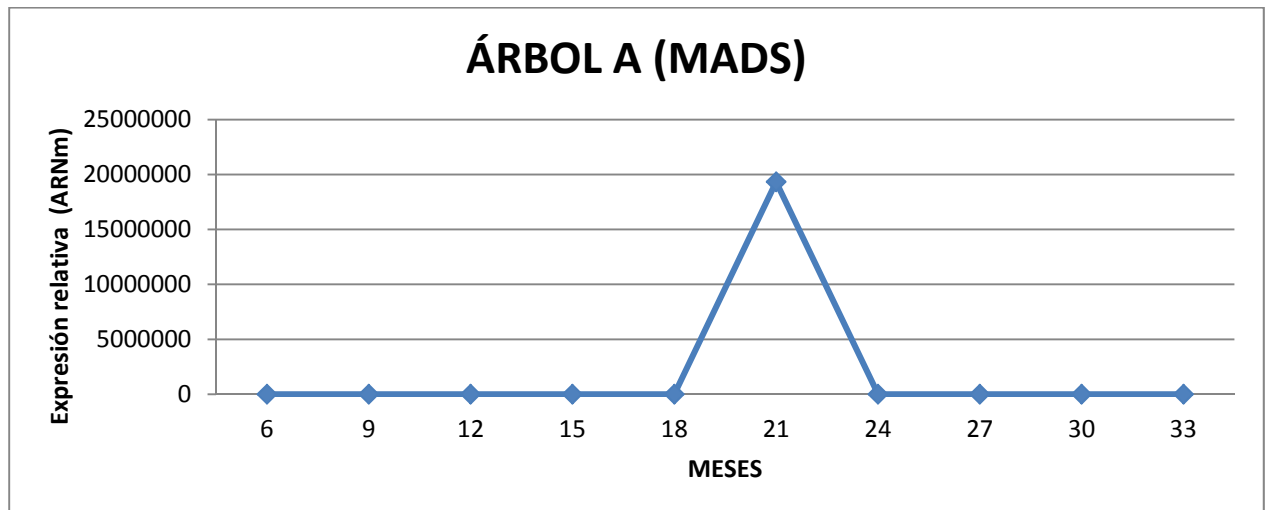


Figura 12. Expresión del Gen_22169 con dominio MADS, en el árbol A.

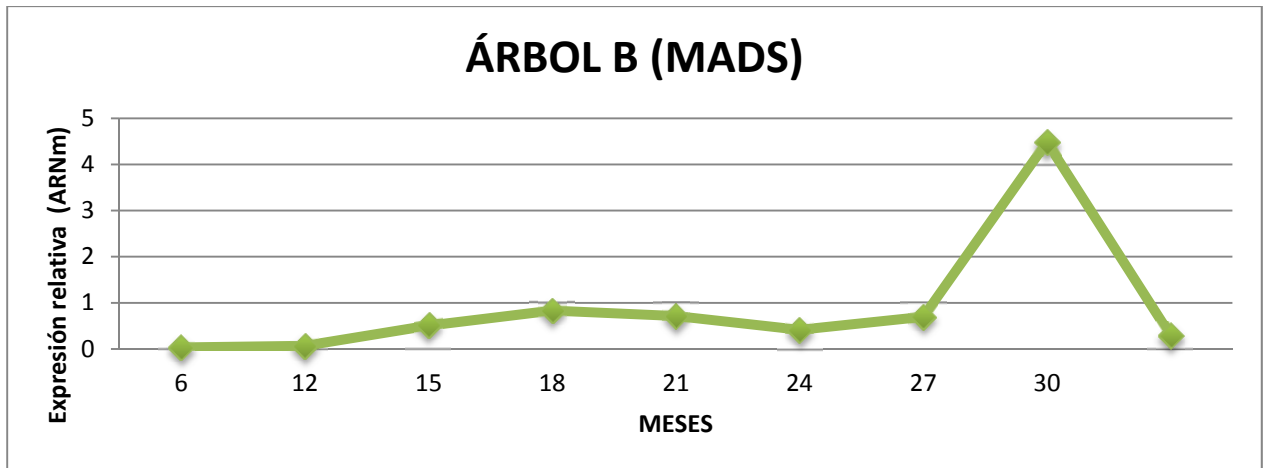


Figura 13. Expresión del Gen_22169 con dominio MADS, en el árbol B.

Las figuras 12 y 13 representan el comportamiento de expresión en ambos árboles, A y B, de este gen con dominio MADS-Box a lo largo del tiempo. Podemos observar que es un gen que no se expresa en las primeras etapas de crecimiento, cuando la planta está en sus primeros estadios. La expresión es muy puntual y en distinto momento para los dos árboles estudiados. En el árbol A en el mes 21 mientras que en el árbol B la expresión del gen es en el mes 30. El patrón de expresión para ambos árboles es también idéntico para A y B como en el caso anterior. Podríamos decir que el papel de este gen es muy puntual y se expresa mucho en un punto determinado de su desarrollo, para volver a inhibirse casi totalmente, una vez realizada su misión, que como decimos, parece ser muy concreta en la transición a la fase adulta. Algunos autores (Borner, R *et. al*; 2000) han observado un papel muy importante de este gen en la transición a la etapa adulta, hecho que coincide con el comportamiento que nosotros hemos observado y describen un aumento de expresión en la planta más tarde, cuando se produce la inflorescencia, así como en el tejido meristemático y en los meristemas florales. En nuestro caso, podemos sugerir en base a los resultados obtenidos, que la floración se produce de forma más tardía en el árbol B (30 meses) que en el árbol A (21 meses). Las causas tendrían que estudiarse en más detalle, puesto que ambos árboles se encuentran en la misma parcela de experimentación, sometidos a condiciones climáticas muy parecidas. De todos modos, siendo el olivo un árbol tan longevo, cuyo desarrollo de la etapa adulta se produce normalmente cuando el árbol alcanza una determinada estatura, suponemos que esta será la causa principal de la diferente expresión del gen en el árbol A y en el B.

4.1.3. Gen *Constans-Like* (CO-LIKE)

La figura 14 representa las curvas de fluorescencia en cada ciclo de amplificación y la curva de melting para el gen CO-LIKE. Las medidas de fluorescencia se hicieron por tanto a 74°C.

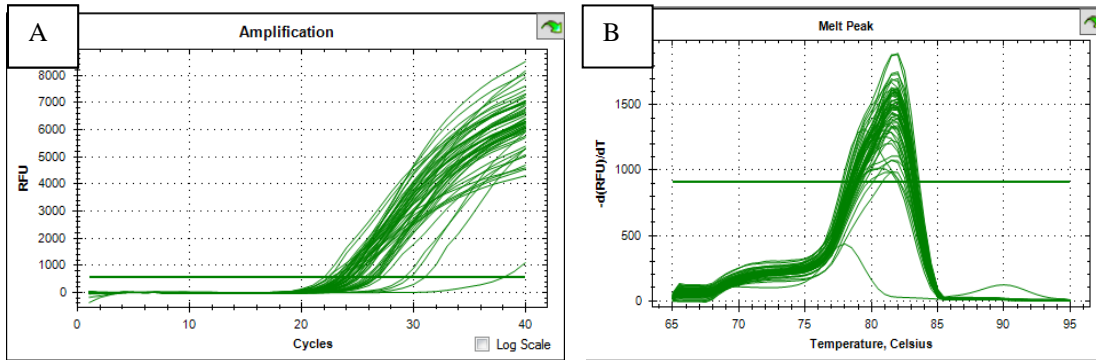


Figura 14. Amplificación y curva Melt para el gen CO-LIKE.

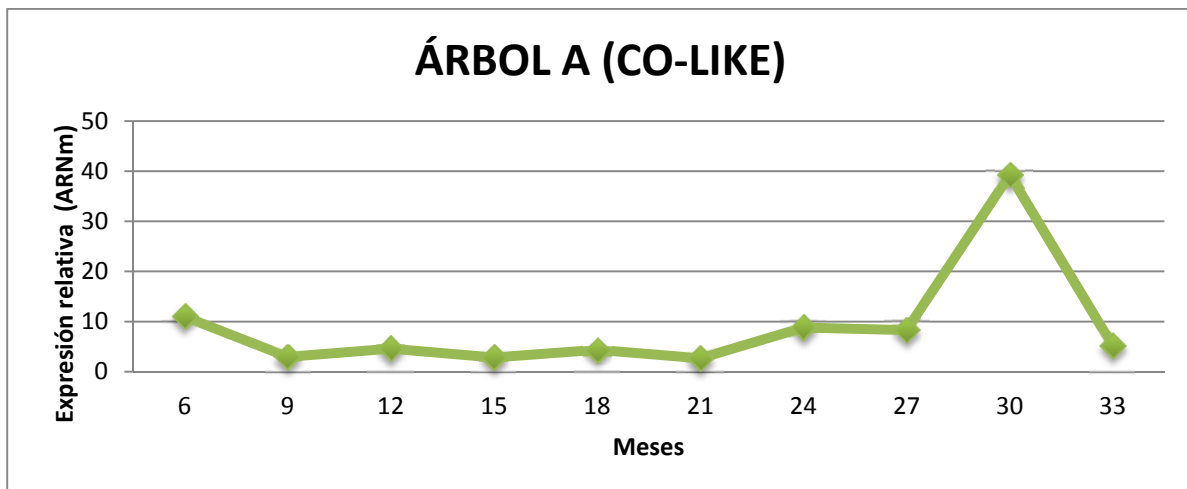


Figura 15. Expresión del Gen CO-LIKE, en el árbol A.

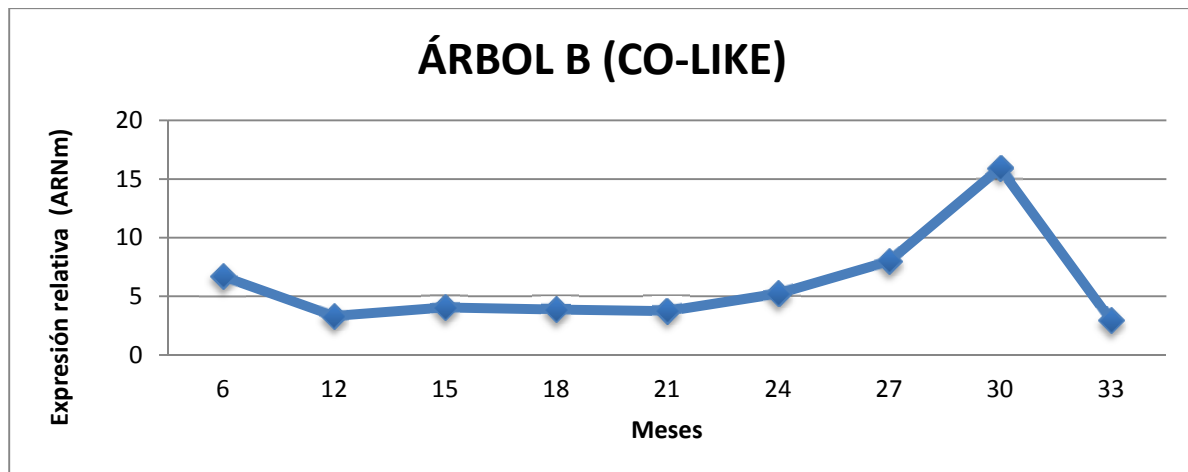


Figura 16. Expresión del Gen CO-LIKE, en el árbol B.

Las figuras 15 y 16 representan el comportamiento que tiene el gen CO-LIKE en los árboles A y B a lo largo del tiempo. Podemos observar que el gen no está expresado durante los primeros estadios de crecimiento pero luego se produce un aumento de expresión sobre el mes 24 para alcanzar su máximo a los 30 meses de edad. El patrón de expresión es casi idéntico en ambos árboles. CONSTANS (CO) es un importante regulador de la floración en la vía del fotoperíodo, integrando el reloj circadiano y la señal de la luz con el control de tiempo de floración. Se sabe que CO promueve la floración en *Arabidopsis* bajo condiciones de día largo. CONSTANS-LIKE (COL) es un miembro de la familia de genes CONSTANS que codifica una proteína nuclear. La expresión de COL9 está regulada por el reloj circadiano en la vía de fotoperíodo y es detectado en varios órganos (Xiao *et al*, 2005) COL está implicado en la regulación del tiempo de floración reprimiendo la expresión de CO, lo que reduce de forma concomitante la expresión de FT y retrasando la transición floral (Xiao *et al*, 2005). Parece que una regulación equilibrada de expresión CO determinará finalmente el tiempo de floración y solo cuando se produce una sobreexpresión del gen COL9 es cuando se reprime CO y por lo tanto se retrasa la floración. En nuestro caso la expresión del gen se produce en los últimos meses de estudio por lo que podemos sugerir que puede que la floración en los olivos estudiados se retrase por la expresión del gen COL9 que retrasa la floración. Para ello deberíamos de realizar un estudio más exhaustivo de genes que estén bajo el control de la sobreexpresión del gen COL9 como son CO y FT.

4.1.4. Gen Suppressor of Constans (SOC1)

La figura 17 representa las curvas de fluorescencia en cada ciclo de amplificación y la curva de melting para el gen SOC1. Las medidas de fluorescencia se hicieron por tanto a 74°C.

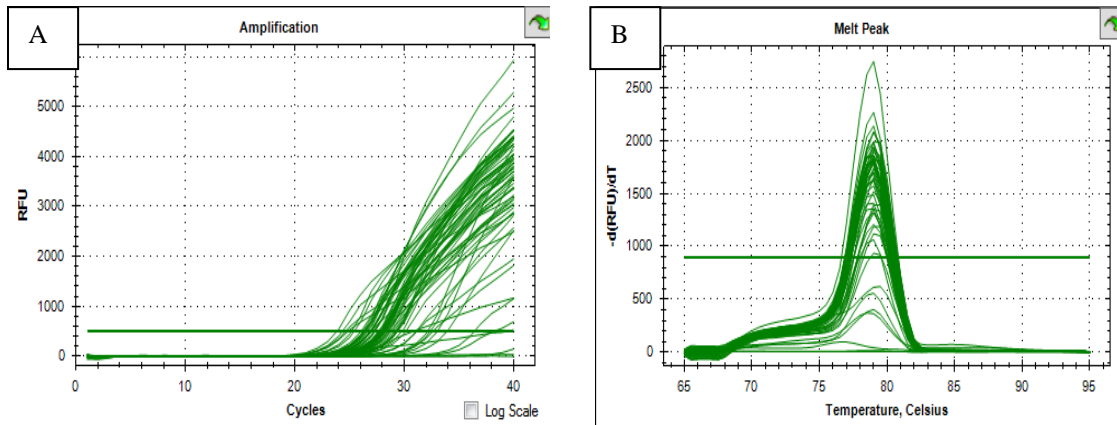


Figura 17. Amplificación y curva Melt para el gen SOC1.

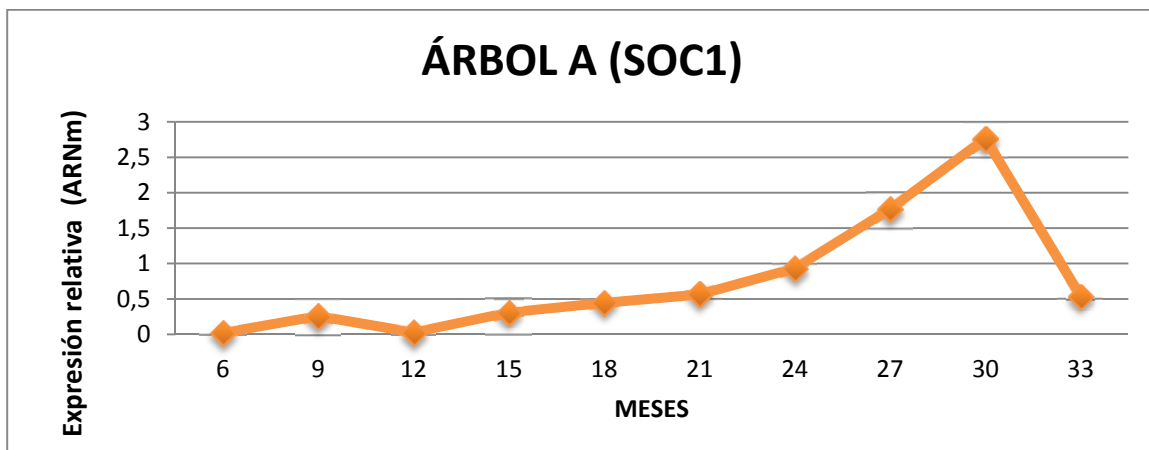


Figura 18. Expresión del Gen SOC1, en el árbol A.

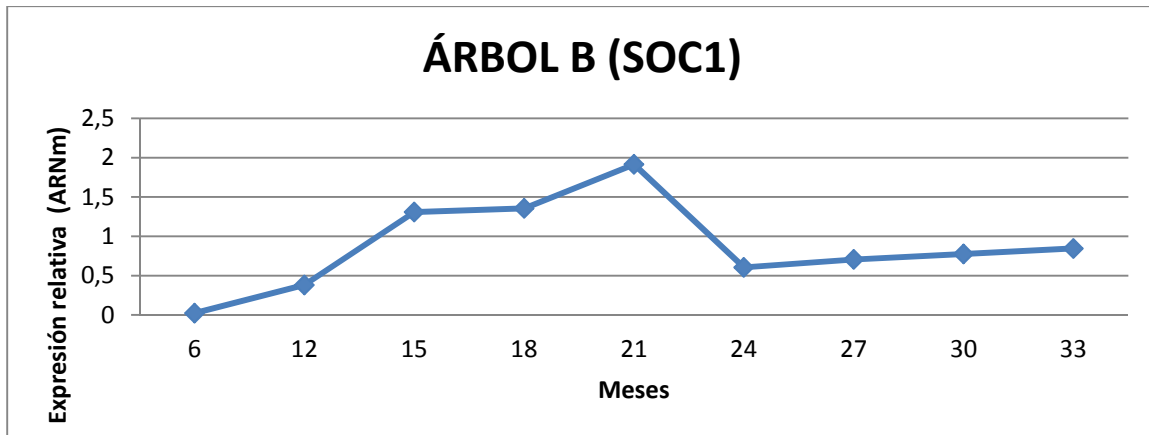


Figura 19. Expresión del Gen SOC1, en el árbol B.

Las figuras 18 y 19 representan el comportamiento de SOC1 en ambos árboles, A y B, a lo largo del tiempo. Podemos observar que el comportamiento es diferente en ambos árboles aunque en ambos casos la expresión tiene unos niveles bastante bajos. Para A, SOC1 comienza a expresarse paulatinamente a partir del mes 15 para llegar a su máximo a los 30 meses de edad de la planta. A partir de ese momento su expresión baja bruscamente. En el caso del árbol B, SOC1 aumenta paulatinamente hasta alcanzar su máximo en los 21 meses. A partir de ese punto, disminuye su expresión. El patrón de expresión es ligeramente diferente en ambos árboles A y B. Este gen SOC1 está asociado con la inducción de la diferenciación celular requerida para el inicio de la floración siendo un integrador floral muy importante en la transición a la etapa adulta de la planta, con lo cual podríamos decir que a partir del mes 15 de edad, en el olivo comienzan a producirse los mecanismos endógenos necesarios para que los meristemos vegetativos se diferencien, inducidos por este gen. Sin embargo, no sabemos si estos niveles de expresión son suficientes para que la planta induzca la floración, puesto que el paso o la transición hasta planta adulta, ocurrirá más tarde, hacia los 3-4 años según muchos autores (Lavee, S. *et.al*; 1996), (Rallo; 2005).

4.1.5. Gen *Apetala 1* (AP1)

La figura 20 representa las curvas de fluorescencia en cada ciclo de amplificación y la curva de melting para el gen AP1. Las medidas de fluorescencia se hicieron por tanto a 74°C.

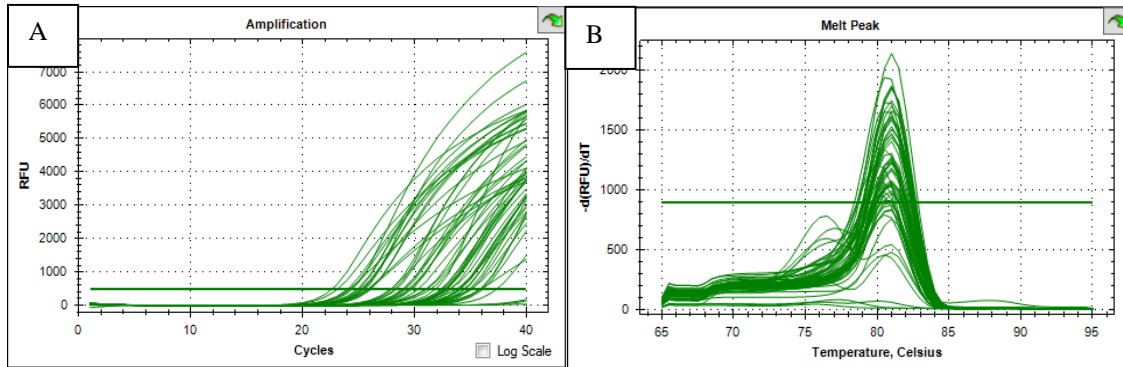


Figura 20. Amplificación y curva Melt para el gen AP1.

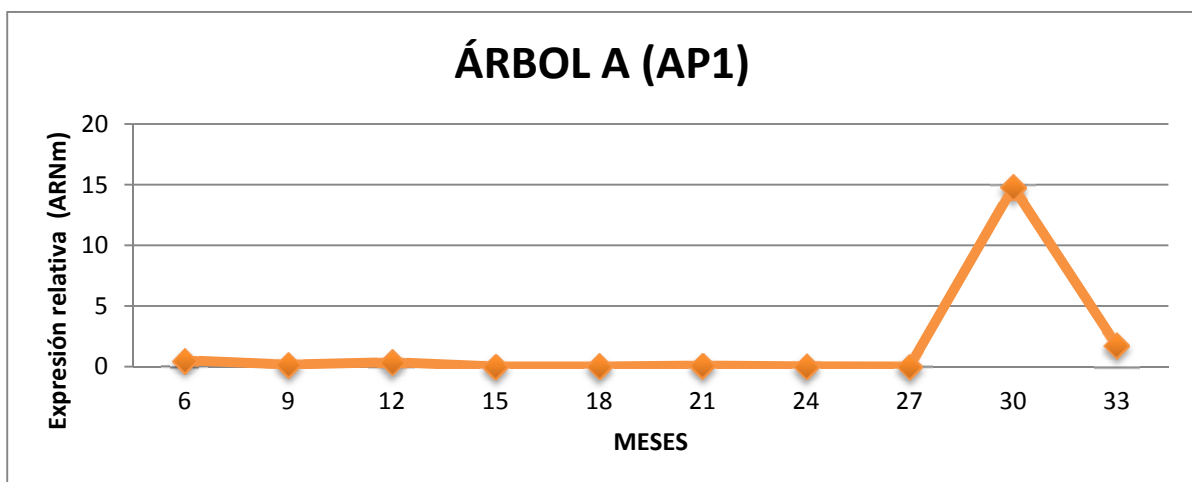


Figura 21. Expresión del Gen AP1, en el árbol A.

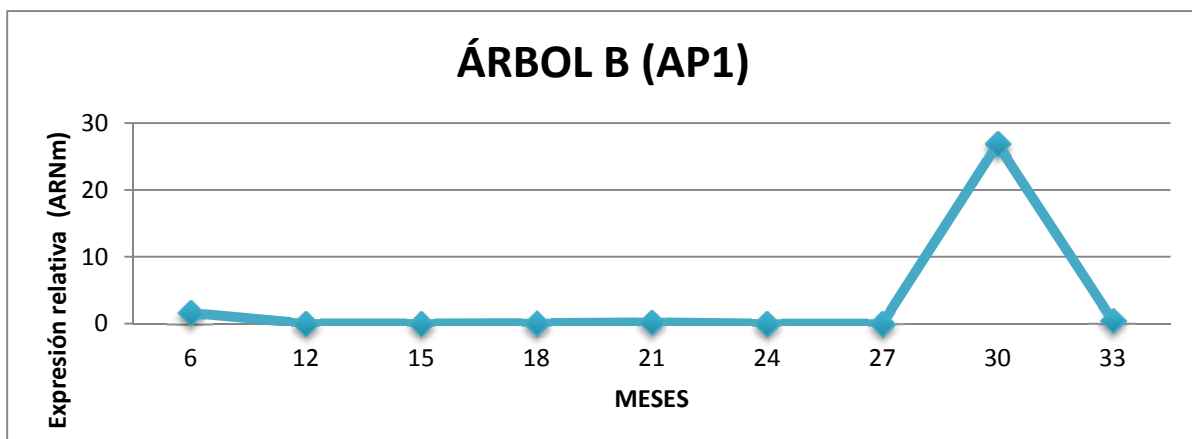


Figura 22. Expresión del Gen AP1, en el árbol B.

Las figuras 21 y 22 representan el comportamiento que tiene el gen AP1 en ambos árboles A y B, a lo largo del tiempo. Podemos observar que el gen no está expresado durante los primeros meses de desarrollo de la planta, mientras que aumenta la expresión de forma brusca llegando a su máximo en el mes 30. Esto tiene coherencia ya que ese gen está implicado en patrón donde surgen los órganos florales, diferenciando el meristemo floral (Vivian F. *et.al*; 1990). El patrón de expresión para ambos arboles con respecto al gen AP1 es casi idéntico, apareciendo el máximo de expresión en el mismo mes. No obstante el nivel de expresión de A es de 27 frente a B que alcanza un valor relativo de 15. Hasta que la planta no alcanza un tamaño adecuado, no se produce la expresión de AP1, por lo que la planta continuará en estado juvenil. De hecho, Fernández-Ocaña et al., 2010 y García López et al., 2014 sugieren que los genes comienzan a expresarse mucho antes de ejercer su misión en el olivo. Nuestros resultados vuelven a coincidir con esta afirmación.

4.1.6. Gen_17728 Desconocido

La figura 23 representa las curvas de fluorescencia en cada ciclo de amplificación y la curva de melting para el gen 17728 desconocido. Las medidas de fluorescencia se hicieron por tanto a 70°C. Este gen se eligió porque en el microarray de partida aparecía muy expresado en las primeras etapas del crecimiento, para inhibirse casi totalmente durante los últimos meses del estudio. Pensamos por ello que sería un gen interesante para estudiar su comportamiento, ya que apuntaba a ser un gen exclusivo de juvenilidad o bien que tuviese un papel represor sobre la floración de manera que al disminuir su expresión se indujera el proceso.

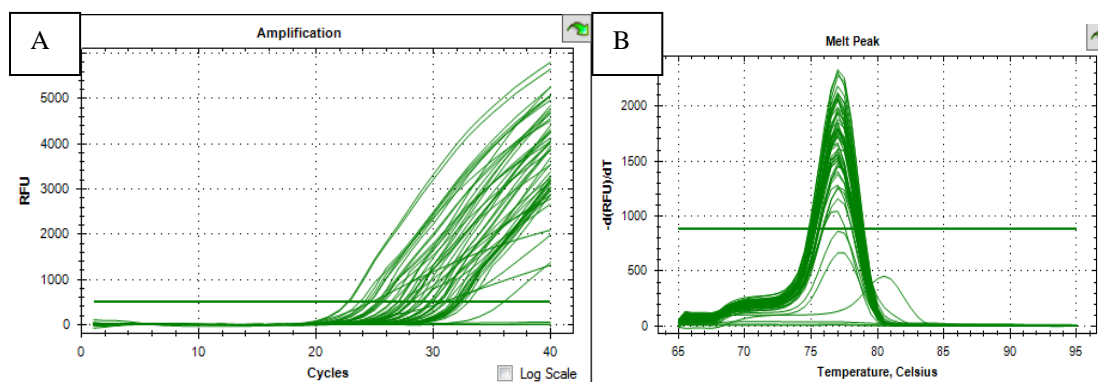


Figura 23. Amplificación y curva Melt para el gen 17728.

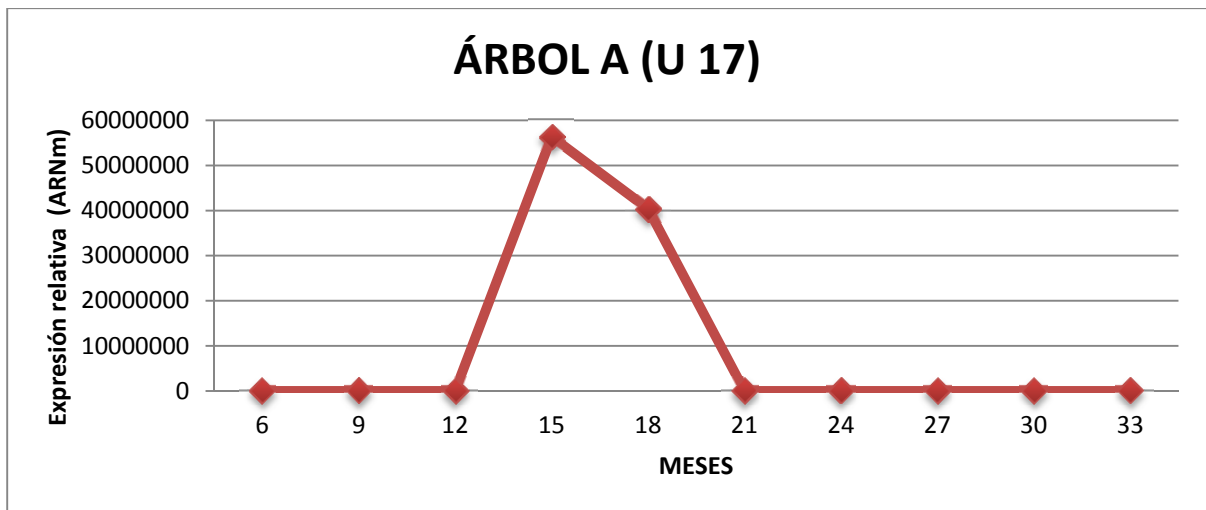


Figura 24. Expresión del Gen_17728, en el árbol A.

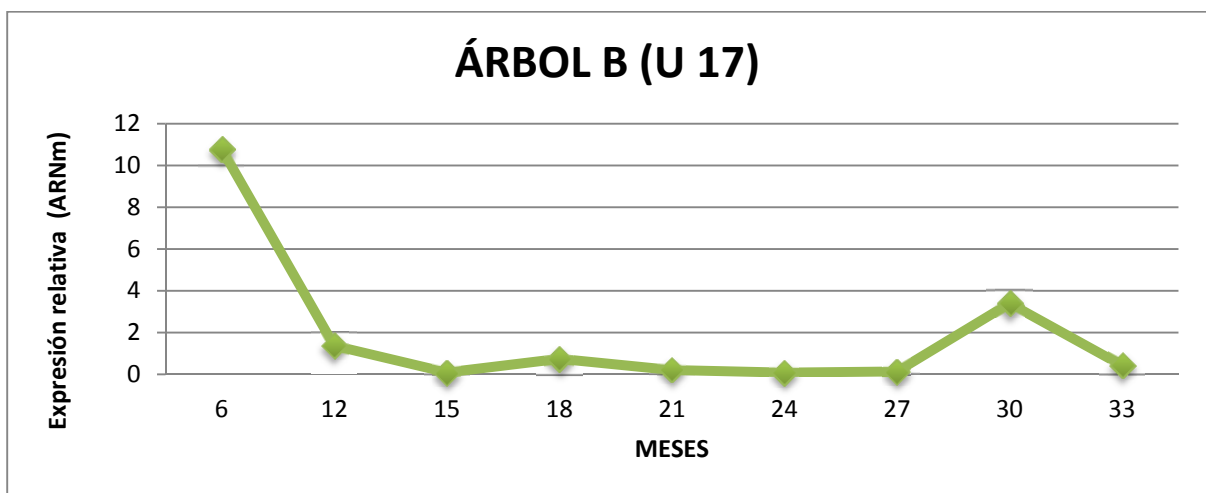


Figura 25. Expresión del Gen_17728, en el árbol B.

Las figuras 24 y 25 representan el comportamiento de 17728 desconocido en ambos árboles, A y B, a lo largo del tiempo. Podemos observar que es un gen que se expresa en las primeras etapas del crecimiento para el árbol B y luego hay un pequeño pico de expresión en el mes 30, mientras que en el árbol A la máxima expresión se produce en el mes 12 cuando la planta está en sus primeros estadios de crecimiento. Los patrones de expresión que aparecen para los dos árboles no son los mismos. Es necesario investigar acerca de este gen, su caracterización, y su comportamiento y expresión en más individuos y a lo largo de un mayor número de meses.

4.1.7. Gen_24412 Desconocido

La figura 26 representa las curvas de fluorescencia en cada ciclo de amplificación y la curva de melting para el gen 24412 desconocido. Las medidas de fluorescencia se hicieron por tanto a 74°C. En el mapa de calor que nos aporta el microarray de partida, este gen aparece muy inducido en los últimos meses testados en nuestro experimento. Parece tener un papel importante en la etapa adulta ya que aparece únicamente a partir de una edad determinada.

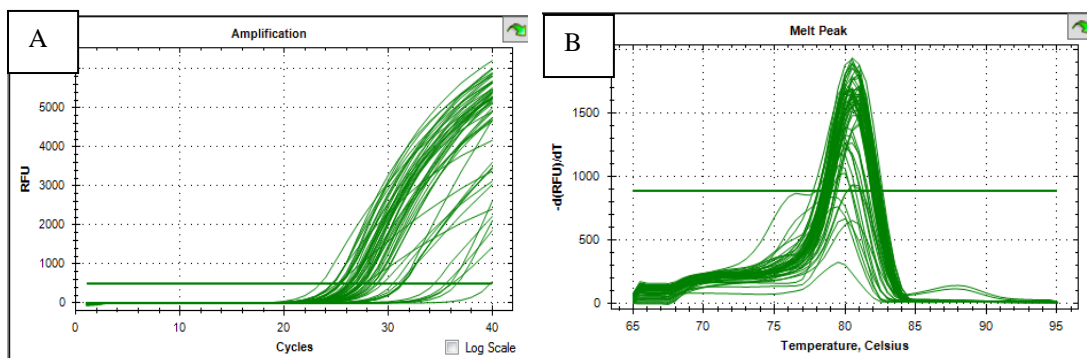


Figura 26. Amplificación y curva Melt para el gen 24412.

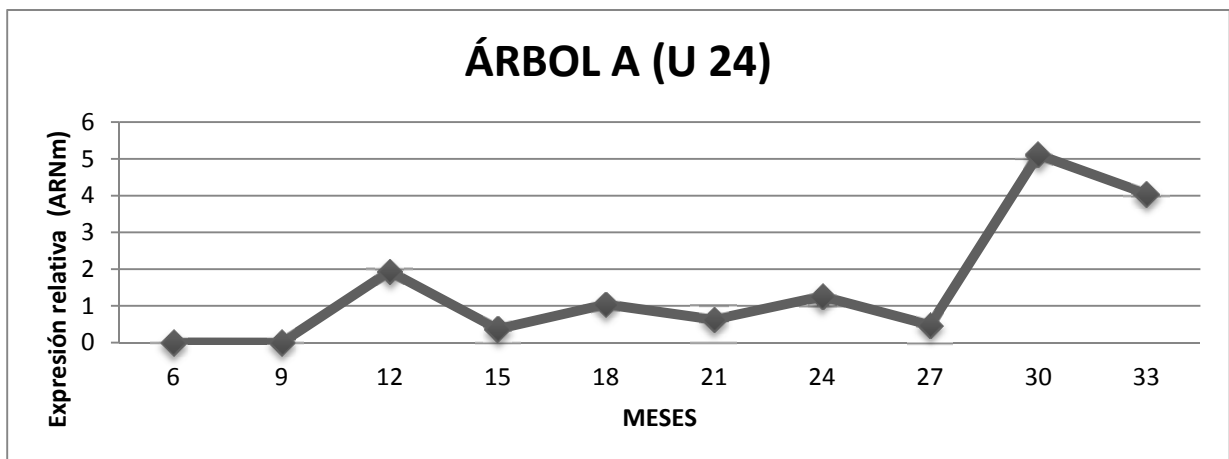


Figura 27. Expresión del Gen_24412, en el árbol A.

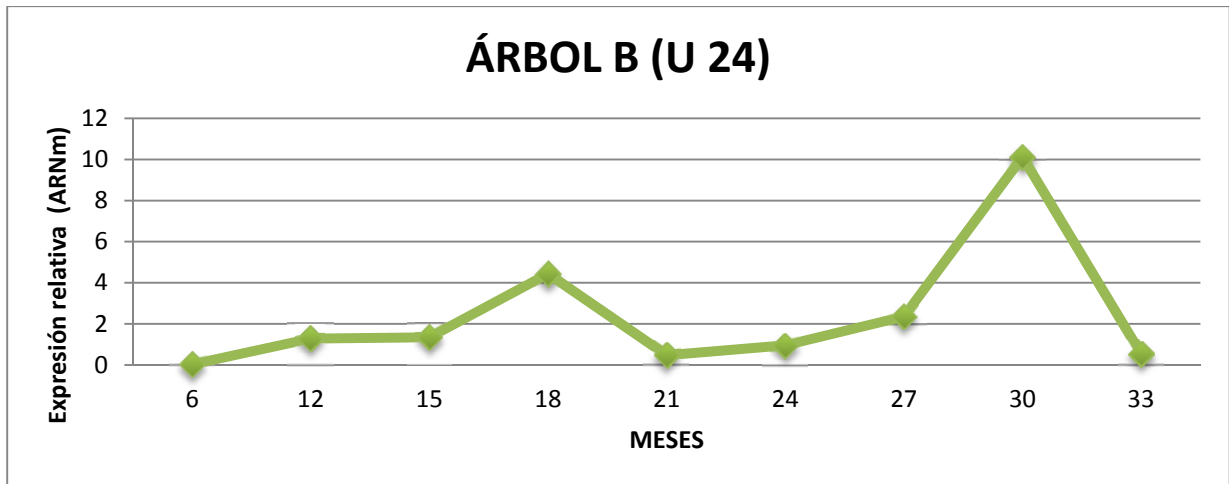


Figura 28. Expresión del Gen_24412, en el árbol B.

Las figuras 27 y 28 representan el comportamiento de 24412 desconocido en ambos árboles, 12 y 14, a lo largo del tiempo. Podemos observar que es un gen que no se expresa en las primeras etapas del crecimiento en ninguno de los dos árboles, y su máxima expresión se produce a partir del mes 27 en ambos casos. El patrón de expresión de este gen en los dos árboles es el mismo. Según este patrón nos atrevemos a sugerir que este podría estar involucrado en la floración.

5. DISCUSIÓN

En trabajos llevados a cabo anteriormente, se sugiere que los cambios génicos que sufren los árboles, en concreto el olivo, se dan sobre el mes 15 (Fernández Ocaña *et al.*, 2010; García López, MC; *et. al*; 2014), por lo que se puede decir que es sobre estos meses donde se produce el cambio de transición del árbol de juvenil a adulto. Se pudo observar que un número de genes mostraron cambios bastantes estables a lo largo del crecimiento, mientras que otros genes sufrieron una serie de picos de expresión en los 15 meses primeros, combinándose de 9-12 o de 12-15 pero sin más cambios en el resto de meses en los que se produce el crecimiento de la planta. Todos los genes analizados muestran un patrón de expresión similar o idéntico entre ellos, salvo el gen U17.

Se confirma en todos los genes el mapa de calor aportado por el microarray, es decir, los genes que aparecían reprimidos durante la etapa adulta (CAF y U17) en nuestras muestras procedentes de dos árboles distintos aparecen también reprimidos y, de la misma forma, los genes que en el microarray aparecían inducidos durante los últimos meses del estudio (SOC1, MADS Box, U24, COL y AP1), confirmamos que también se sobreexpresan en nuestros dos árboles hacia la etapa adulta.

Concretando con los genes analizados en nuestro proyecto, el **gen CAF** (Fig.9 y Fig.10), con respecto a estudios llevados a cabo anteriormente, sabemos que se trata de un gen que inhibe la división celular de los meristemos florales, por lo debería estar suprimido en los meses en los que se produjera la floración y solo expresado durante los meses en los que se produce el crecimiento de la planta. También tiene gran importancia en la defensa de la planta por lo que para que el desarrollo de la planta fuera óptimo, este gen debería estar expresado en los primeros meses para producir una respuesta defensiva frente a patógenos (Wenxing, L; Changbao, L *et. al*; 2009). Esto tiene un paralelismo con respecto a nuestros resultados, ya que este gen está muy expresado durante los primeros meses de crecimiento y luego baja su expresión para que se pueda producir la floración.

Los **genes correspondientes a la caja MADS** en nuestros resultados la expresión se produce de forma tardía (Fig.12 y Fig.13), en los últimos meses, lo cual concuerda mucho con estudios anteriores, debido a la importancia que tienen los

factores de transcripción de la caja MADS con respecto a la activación o a la inhibición de la transcripción de determinados genes implicados en la floración y que dichos genes están expresados durante los meses de en los que se produce la floración de los árboles (Gilbert, SF; 2003). Si nos fijamos este gen se ha expresado de manera puntual en un momento concreto a lo largo del tiempo. Puede ser que este gen este solo implicado en la formación de los órganos florales o en un hecho muy concreto dentro de la etapa adulta.

Hay que decir que la sobreexpresión del gen **CO-LIKE** inhibe a CO por lo tanto inhibe la expresión del **gen SOC1** por lo que estos genes están muy relacionados. El gen CO-LIKE en estudios anteriores llevados a cabo por Tofiño, Romero y Cabal, se mantiene constante durante todo el proceso de crecimiento, mientras que en nuestro experimento el gen experimenta un aumento paulatino hasta llegar a su máxima expresión en los dos árboles en el mes 30 (Fig.19 y Fig.20). Al relacionarlo con el gen SOC1, en estudios anteriores (Liu, C; Zhou, J; et al; 2007) la máxima expresión del gen se produce en el mes 15 en Arabidopsis de tipo salvaje, mientras que en nuestro proyecto, la expresión del gen en los dos árboles cambia, ya que el gen tiene muy pequeños picos de expresión durante los primeros meses, mientras que se produce un máximo pico de expresión en el caso del árbol A (Fig.18) se produce en el mes 30, mientras que en el árbol B (Fig.19) el pico de expresión en el mes 21.

En estudios llevados anteriormente con el **gen AP1**, se identificó que se trata de un gen tiene la función de definir el patrón a partir del cual surgen los órganos florales y así como el desarrollo del meristemo floral (Vivian F. Irish, *et. al;* 1990), lo concuerda con nuestros resultados puesto que el gen está muy reprimido en los primeros meses y se produce su máximo pico en los últimos actuando de la misma forma en los dos árboles, ya que será el tiempo en el que comenzara la etapa de floración, en nuestro caso, del olivo.

El gen desconocido **17728** se encuentra expresado durante las primeras etapas del desarrollo (Fernández Ocaña, A; García López *et. al;* 2010), por lo que se puede decir que está relacionado con la etapa juvenil siendo un gen exclusivo de dicha etapa (Fig.25) con un aumento de la expresión en los primeros meses, y disminuye paulatinamente en los consiguientes. Mientras que en el árbol 12 (Fig.24) el aumento de la expresión es en el mes 12 y luego disminuye. Podemos decir que

no hay mucha diferencia entre un árbol y otro con un intervalo de unos 3 meses en los que se produce la expresión y que está muy correlacionado con lo estudiado anteriormente sobre la expresión de este gen.

Y finalmente el **gen_24412** sobre este gen no hay apenas investigaciones anteriores, y en nuestro trabajo, la expresión del gen es prácticamente igual en los dos árboles produciéndose un pico de expresión en los últimos meses. Debido a la poca información que tenemos sobre este gen en estudios anterior sugerimos que deberíamos realizar más investigaciones para concretar cuál es la función de este gen con respecto a la floración del olivo.

6. CONCLUSIONES

Después de llevar a cabo este trabajo podemos resumir las siguientes conclusiones:

- 1) El estudio mediante RT-PCR llevado a cabo en este trabajo para los genes CAF1, SOC 1, CO-LIKE, 22169 con dominios MADS, 17728 desconocido y 24412 desconocido, confirma el comportamiento que mostraban en el microarray de partida.
- 2) Se ha observado la expresión de siete genes mediante RT-PCR a lo largo del tiempo, utilizando meristemas de dos ejemplares distintos recogidos a los 3, 6, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 y 33 meses de edad con el fin de determinar el punto de máxima expresión de cada gen, o en su caso, desde que momento comienza el aumento de la expresión de dichos genes en el tiempo. La mayor parte de estos genes son exclusivos de la etapa adulta o juvenil por lo que sus puntos máximos de expresión se dan al inicio del proceso de plántula o bien a partir del mes 24 en adelante. Alguno de estos genes tiene su máxima y puntual expresión en el mes 15, como es el caso del gen desconocido 24412 y del gen SOC1.
- 3) Los genes CAF1 y 17728 desconocido muestran una inhibición de su expresión muy clara en la etapa adulta, por lo que podrían ser genes específicos de la etapa juvenil del olivo, que actuarían como represores de la floración durante la juvenilidad. El gen desconocido 17728 que se inhibe durante la etapa adulta necesita de un estudio más profundo.
- 4) Los genes CO-LIKE, SOC 1 y AP1 muestra un aumento considerable de la expresión en los últimos meses del estudio. Estos genes son conocidos en la literatura y están implicados en la morfogénesis de los meristemas florales y por tanto en la transición de la planta en la etapa adulta. El gen desconocido 24412 necesita de estudios más profundos para investigar su comportamiento y misión en la planta.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K. y Araki, T. (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science*. 309, 1052-1056.
- Abril Díaz, N; Bárcena Ruiz, JA; Fernández Reyes, E; Galván Cejudo, A; Jorrín Novo, Jesús; Peinado Peinado, J; Meléndez-Valdés, FT; Túnez Fiñana, I; Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Córdoba.
- Azcón-Bieto, J, Talón, M .(2008). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Edición: 2ª .J. Azcón-Bieto, M. Talón. Editorial: McGraw-Hill Interamericana ; Barcelona: Edicions Universitat de Barcelona.
- Bastow R, Mylne JS, Lister C, Li ppman Z, Martienssen RA y Dean C. (2004). Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. *Nature* 427 : 164-7
- Blázquez, M.A. & Weigel, D. (2000) Integration of floral inductive signals in Arabidopsis. *Nature* 404: 889-892.
- Blázquez, MA. (2003). Regulación del tiempo de floración por luz y temperatura. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC) Universidad Politécnica de Valencia.
- Blázquez, MA. (2000). Bases moleculares de la floración. España.
- Bonilla, E; Párraga, M; López, LA; Escolar, F; Maxo del, J. (2001). Cuantificación de la expresión génica a partir de un número limitado de células mediante RT-PCR en tiempo real.
- Borner, R; Kampmann, G; Chandler, J; Gleißner, R; Wisman, E; Apel, K; Siegbert, M.(2000). A MADS domain gene involved in the transition to flowering in Arabidopsis. *The Plant Journal* (2000) 24(5), 591±599.
- Conde Hernández, J; Benjumena Maira, A; Fernández Delgado, L; Prieto Rochel, R; Chapurro Martinez, A; Calle de la Toral, A. *Oleáceas*. Servicio Regional de Inmunología y Alergia. Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla.
- El mundo de las plantas. Botanica on-line S.L. 1991-2014.
- Exner, V; Taranto, P; Schönrock, N; Gruißem, W; Hennig, L. (2006). Chromatin assembly factor CAF-1 is required for cellular differentiation during plant development. *Development* 133, 4163-4172 (2006) doi:10.1242/dev.02599.

- Fernández Ocaña, A; García López, MC; Jiménez Ruiz, J; Saniger, L; Macías, D; Navarro, F; Oya, R; Belaj, A; Rosa de la, R; Corpas, FJ; Barroso Barroso, J; Luque, F. (2010). Identification of a gene involved in the juvenile-to-adult transition (JAT) in cultivated olive trees. *Tree Genetics & Genomes* (2010) 6:891–903.
- Fernández Ocaña, A. (2012-2013). Departamento: Biología animal, Biología Vegetal y Ecología. Área de conocimiento: Fisiología Vegetal. Universidad de Jaén.
- García López, MC; Vidoy, I; Jiménez Ruiz, J; Muñoz Mérida, A; Fernández Ocaña, A; Rosa de la, R; Bautista Barroso, J; Navarro, F; Trelles, O; Beuzón, R; Barceló, A; Valpuesta, V; Luque, F. (2014). Genetic changes involved in the juvenile-to-adult transition in the shoot apex of *Olea europaea* L. occur years before the first flowering. *Tree Genetics & Genomes* (2014) 10:585–603.
- Gilbert, SF. (2003). *Biología del desarrollo*. 7ª Edición. Editorial Panamericana.
- Hepworth, S. R., Valverde, F., Ravenscroft, D., Mouradov, A. y Coupland, G. (2002). Antagonistic regulation of flowering-time gene *SOC1* by *CONSTANS* and *FLC* via separate promoter motifs. *EMBO J.* 21, 4327-4337.
- Hisamatsu, T. y King, R. W. (2008). The nature of flowering signals in *Arabidopsis* II. Roles for *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) and gibberellin. *J. Exp. Bot.* 59, 3821-3829.
- Hopkins, W.; Hüner, N. (2004). Introduction to plant physiology. John Wiley ed., Inc, MA, USA. 560 p.
- Jacobsen, SE; Running, MP; Meyerowitz, EM. (1991). Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in *Arabidopsis* causes unregulated cell division in floral meristems. 1999 Dec;126(23):5231-43.
- Jacobsen, SE; Running, MP; Meyerowitz, EM. (1999). Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in *Arabidopsis* causes unregulated cell division in floral meristems. Dec;126 (23):5231-43.
- Kempin S. A., Savidge B. y Yanofsky M. F. (1995). Molecular basis of the cauliflower phenotype in *Arabidopsis*. *Science*. 267, 522-525.
- Lavee, S., N. Avidan, A. Haskal and A. Ogrdovich (1996). Juvenility period reduction in olive seedlings: A tool for enhancement of breeding. *Olivae* 60: 33-41. Santos-Antunes, F., L.

- Lee, J; Lee. I. (2010). Regulation and function of SOC1, a flowering pathway integrator. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 61, No. 9, pp. 2247–2254, 2010 doi:10.1093/jxb/erq098.
- Li, D., Liu, C., Shen, L., Wu, Y., Chen, H., Robertson, M., Helliwell, C. A., Ito, T., Meyerowitz, E. M. y Yu, H. (2008). A repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. *Dev. Cell.* 15, 110-120.
- Liu, C; Zhou, J; Bracha-Drori, K; Yalovsky, S; Ito, T; Yu, H. (2007). Specification of *Arabidopsis* floral meristem identity by repression of flowering time genes. *Development* 2007; 134:1901-1910.
- Mandel M. A., Gustafson-Brown C., Savidge B. y Yanofsky, M. F. (1992). Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene APETALA1. *Nature.* 360, 273-277.
- Marchat, LA; Castañón Sánchez, CA. El mensajero de la célula.
- Marcos, D. (2012). El ciclo del olivo. Reportaje número 12. Logroño, La Rioja.
- Mathieu, J., Yant, L. F., Mürdter, F., Küttner, F. y Schmid, M. (2009). Repression of flowering by the miR172 target SMZ. *PLoS Biol.* 7, e1000148.
- Moon, J; Suh, S; Lee; h; Choi, K; Bong Hong, C; Paek, N; Kim, S; Lee, I. (2003). The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* (2003) 36, 613-623.
- Münster, T; Pahnke, J; Rosa, D. (1997). Floral homeotic genes were recruited from homologous MADS-box genes preexisting in the common ancestor of ferns and seed plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2415-2420.
- Muñoz-Mérida A, Cañada A, González-Plaza JJ, Blanco AM, García-López MC, Rodríguez JM, Pedrola L, Sicardo MD, Hernández ML, De la Rosa R, Belaj A, Gil-Borja M, Luque F, Martínez-Rivas JM, Pisano DG, Trelles O, Valpuesta V, Beuzón CR (2013). De novo assembly and functional annotation of the olive (*Olea europaea*) transcriptome. *DNA Res* . doi: 10.1093/dnares/dss036.
- 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.
- Schnorrock, N; Exner, V; Probst, A; Grisse, W; Hennig, L. (2006). Functional Genomic Analysis of CAF-1 Mutants in *Arabidopsis thaliana*. 281:9560-9568. *J. Biol. Chem.* doi: 10.1074/jbc.M513426200 originally published online February 1, 2006.
- Scortecci KC, Michaels SD y Amasino RM. (2001). Identification of a MADS-box gene, FLOWERING LOCUS M, that represses flowering. *Plant J* 26: 229-36

- Somma, M. Analisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. Sesión nº4. Extracción y purificación de ADN.
- Tofiño, A; Romero, HM; Cabal, D. aspectos moleculares de la inducción y desarrollo floral.
- Tofiño, A; Romero, HM; Cabal, D. Aspectos moleculares de la inducción y el desarrollo floral. Artículo científico.
- Vivian F. Irish and Ian M. Sussex. (1990). Function of the *apetala-1* Gene during Arabidopsis Floral Development. *The Plant Cell*, Vol. 2, 741-753, August 1990 O 1990 American Society of Plant Physiologists.
- Wang, J.-W., Czech, B. y Weigel, D. (2009). miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*. 138, 738-749.
- Wenxing, L; Changbao, L; Fang, L; Hongling, J; Shuyu, L; Jiaqiang, S; Xiaoyan, W; Chuanyou, L. (2009). The *Arabidopsis* homologs of CCR4-associated factor 1 show mRNA deadenylation activity and play a role in plant defence responses. *Cell Research* (2009) 19:307-316.
- Wu, M.F., Sang, Y., Yamaguchi, A., Yamaguchi, N., Parker, J.E., Parcy, F., Jensen, S.T., Li, H., and Wagner, D. (2011). *LEAFY* target genes reveal floral regulatory logic, cis Motifs, and a link to biotic stimulus response. *Developmental Cell* 20: 430–443.
- Xiao-Fei Cheng and Zeng-Yu Wang. (2009). Overexpression of *COL9*, a *CONSTANS LIKE* gene, delays flowering by reducing expression of *CO* and *FT* in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* (2005) 43, 758–768.
- Yamaguchi, A., Wu, M.-F., Yang, L., Wu, G., Poethig, R. S. y Wagner, D. (2009). The microRNA-regulated SBP-box transcription factor *SPL3* is a direct upstream activator of *LEAFY*, *FRUITFULL* and *APETALA1*. *Dev. Cell*. 17, 268-278.
- Yant, L., Mathieu, J., Dinh, T. T., Ott, F., Lanz, C., Wollmann, H., Chen, X. and Schmid, M. (2010). Orchestration of the floral transition and floral development in *Arabidopsis* by the bifunctional transcription factor *APETALA2*. *Plant Cell*. 22, 2156-2170.
- Yoo, S. J., Chung, K. S., Jung, S. H., Yoo, S. Y., Lee, J. S. y Ahn, J. S. (2010). *BROTHER OF FT AND TFL1 (BFT)* has *TFL1*-like activity and functions redundantly with *TFL1* in inflorescence meristem development in *Arabidopsis*. *Plant J*. 63, 241-253.
- Zambrano Rodriguez, JA. (2013). Caracterización funcional del gen *VOZ1*, su papel en el control de la arquitectura de la inflorescencia a través de la regulación de *TFL1*. Universitat Politècnica de Valencia. Departamento de Biotecnología. Valencia.