

La floración del olivo: clonación, cuantificación de la expresión génica y análisis del polimorfismo entre cultivares de los genes *leafy* y *apetala*

CARMEN GARCÍA-LIMONES¹, YOSELÍN BENÍTEZ^{1,2}, PILAR HERNÁNDEZ³, ANTONIO MARTÍN³, CARMEN DEL RÍO⁴, JUAN M CABALLERO⁴, HAVA F RAPOPORT³, JOSÉ LUIS CABALLERO¹, JUAN MUÑOZ-BLANCO¹, GABRIEL DORADO^{1*}

¹Dep. Bioquímica y Biología Molecular, Campus Rabanales, Córdoba; ²Delbruck Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory, One Bungtown Road, New York (USA), ³Instituto de Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Córdoba; ⁴CIFA «Alameda del Obispo», IFAPA, CICE (Junta de Andalucía), Córdoba

RESUMEN

El período juvenil es el tiempo que tardan en florecer las plantas obtenidas por germinación de semillas. En olivo (*Olea europaea*) es de unos 15 años, habiéndose disminuido hasta cuatro mediante forzado del crecimiento en campo. La utilización de costosos sistemas de forzado en invernadero (luz continua, fertirrigación y poda adecuada) ha permitido obtener las primeras floraciones a los 28 meses de la germinación, período todavía largo para las necesidades de los programas de mejora genética de esta especie. Por tanto, la floración temprana del olivo y el control de la misma son objetivos deseables en el cultivo del olivo. Sin embargo, no existen estudios moleculares sobre el período juvenil y la floración del olivo. En este trabajo se han estudiado tales procesos, mediante la clonación y cuantificación de la expresión de *leafy* y *apetala*. Se trata de dos genes que están implicados en el desarrollo

ABSTRACT

The period of time since an olive seed germinates and the olive tree (*Olea europaea*) blooms is called the juvenile period. This term may take about 15 years. The use of expensive forced flowering systems in greenhouses (continuous light, irrigation, nutrients, and appropriate pruning) may reduce such period to 28 months, which is still a long time for the breeding of the olive tree. Therefore, the early flowering of the olive tree and its control are desirable targets in the olive tree cultivation. Nevertheless, there are no molecular studies on the juvenile period and flowering of the olive tree. In this work such processes have been studied, by means of the cloning and quantification of the gene expression of *leafy* and *apetala*. They are genes involved in the development of buds and flowers. To that aim, a «Rapid Amplification of cDNA Ends» (RACE) has been carried out to clone

de yemas y flores. Para ello se ha llevado a cabo una amplificación de cDNA (RACE; del inglés, «Rapid Amplification of cDNA Ends»), que ha permitido clonar ambos genes. Posteriormente se ha cuantificado la expresión génica de los mismos mediante PCR a tiempo real (QRT-PCR; del inglés, «Quantitative Real-Time PCR»). Estos genes funcionan como interruptores genéticos de desarrollo del meristemo y posible diferenciación a flor. Así, es necesaria la expresión de *apetala* para que se desarrollen las yemas vegetativas, mientras que la expresión adicional de *leafy* provoca la diferenciación a flor de dicha yema. Una vez que se ha producido la diferenciación a flor, sólo es necesaria la expresión de *apetala*, para producir los distintos órganos florales. Hemos comprobado que el perfil de expresión espacio-temporal de estos genes varía a lo largo del año, con un perfil consistente que presenta varios máximos anuales. Los ramos no cargados de un año son los que normalmente generan flores al año siguiente. La yemas de dichos ramos presentan una mayor expresión génica de ambos genes; y en especial de *leafy*, respecto de las yemas de los ramos cargados (que no darán flores al año siguiente). Ello está de acuerdo con el modelo de interruptor genético propuesto para dichos genes. Por otro lado, existe polimorfismo genético (SNPs) en los genes *leafy* y *apetala* de diferentes cultivares de olivo.

both genes. Furthermore, their gene expression has been analyzed by a «Quantitative Real-Time PCR» (QRT-PCR) approach. These genes work like genetic switches of the meristem development and further flower differentiation. Thus, the expression of *apetala* is required for the vegetative buds to developed, whereas the additional expression of *leafy* causes the differentiation to flower of such buds. Once the differentiation to flower has taken place, the expression of *apetala* is only necessary to produce the different floral organs. We have verified that the space-time profile of expression of these genes varies throughout the year, with a consistent profile displaying several peaks along the year. The branches not loaded in a particular year are expected to produce flowers the following year. The buds of such branches show a higher gene expression of both genes; and in particular of *leafy*, with respect to the buds of the loaded branches (that will not give flowers the following year). This is in agreement with the proposed model of genetic switches for such genes. On the other hand, there is polymorphism (SNPs) in the genes *leafy* and *apetala* from different olive tree cultivars.

INTRODUCCIÓN

Se denomina periodo juvenil al transcurrido desde que germina la semilla hasta que la planta florece. El olivo (*Olea europaea*), al igual que otros árboles, se caracteriza por presentar un periodo juvenil largo, de al menos 12-13 años (Bellini, 1993), de sólo 4-5 en climas de mayor duración de la estación vegetativa, especialmente con adecuados sistemas de poda (Lavee *et al.*, 1996). Mediante costosos sistemas de crecimiento forzado (luz continua, agua, nutrientes, poda) se han conseguido las primeras floraciones 28 meses después de la germinación, con más de un 93% de las plantas florecidas a los 65 meses (Santos-Antunes *et al.*, 2005), lo que sigue representando una dificultad para el mejorador (retraso en la evaluación de la progenie de un cruzamiento). Por otro lado, no se han realizado estudios moleculares sobre el periodo juvenil y la floración del olivo.

Se han llevado a cabo estudios en otros árboles, en relación al efecto de fitohormonas, condiciones del cultivo (fotoperiodo, nutrición, temperatura, etc) e injertos (Pillitteri *et al.*, 2004). En general las plantas suelen necesitar un estímulo medioambiental para pasar del estado vegetativo al reproductor. No obstante, se sabe poco de los mecanismos genéticos y moleculares implicados en dicha transición en árboles (Pillitteri *et al.*, 2004). Ello no es sorprendente, dadas las dificultades inherentes a este tipo de investigación con árboles.

Sin embargo, se han identificado numerosos genes implicados en el paso de la fase vegetativa a la floral y en el desarrollo de las yemas florales en el caso de las plantas herbáceas, y en particular en el jaramago (*Arabidopsis thaliana*). Así, los genes *leafy* (*LFY*) y *apetala* (*API*) determinan la identidad del meristemo floral (Mandel y Yanofsky, 1995; Pelaz *et al.*, 2001). Una de las ventajas de *Arabidopsis* es su rápido tiempo de generación para una planta superior y la existencia de mutantes. Existen plantas con genes *leafy* y *apetala* reprimidos o inactivos, en las que las flores son sustituidas por tallos o estructuras similares. Otra de las ventajas de *Arabidopsis* es que se transforma muy fácilmente. Los transgénicos que sobreexpresan dichos genes se caracterizan por una floración temprana y la transformación de tallos en flores (Mandel y Yanofsky, 1995; Blazquez *et al.*, 1997). Estos genes están bastante conservados entre las plantas. Tanto es así que las plantas de *Arabidopsis* transformadas con ellos (genes heterólogos) tienen fenotipos similares a los indicados anteriormente para genes homólogos (Coen *et al.*, 1990; Berbel *et al.*, 2001; Carmona *et al.*, 2002; Wada *et al.*, 2002; Calonje *et al.*, 2004). Esta conservación estructural y funcional puede ser empleada para clonar dichos genes en nuevas especies, como el olivo.

La morfología y fisiología de la floración del olivo ha sido estudiada con detalle (Barranco et al., 2004). Así, se sabe que ocurre en yemas axilares de brotes crecidos el año previo a la floración. El olivo presenta además una alternancia anual en la floración; fenómeno conocido como *vecería* (Rapoport, 2004). No es fácil distinguir morfológicamente una yema vegetativa de un floral antes de su brotación (pasado el periodo invernal o vernalización). No obstante, parece que ambos tipos de yemas no son iguales, ya que existen diferencias histoquímicas o morfogenéticas entre ellas antes del invierno. Estos trabajos sugieren que ya se ha podido realizar una expresión génica diferencial entre ambos tipos de yemas, para su desarrollo vegetativo (brote o tallo) o como flor. Dado que los genes *leafy* y *apetala* están directamente implicados en estos procesos, su estudio molecular puede ayudar a determinar los mecanismos implicados en la diferenciación de las yemas vegetativas y florales (Chawla y Dorado, 2006). La clonación de dichos genes abre también las puertas para acortar el periodo juvenil a un año o menos, además de eliminar el problema de la *vecería*.

En este trabajo se ha empleado la amplificación de cDNA (RACE; del inglés «Rapid Amplification of cDNA Ends»), para clonar y secuenciar los genes *leafy* y *apetala*. Posteriormente se ha cuantificado la expresión génica de los mismos mediante PCR a tiempo real (QRT-PCR; del inglés «Quantitative Real-Time PCR»). De este modo ha sido posible analizar el perfil de expresión de ambos genes a lo largo de varios años.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se han utilizado árboles de olivo de la variedad 'Picual' del «Centro de Formación e Investigación Agraria» (CIFA) «Alameda del Obispo», Córdoba, dependiente del «Instituto de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica» (IFAPA). En los árboles se seleccionaron ramos no cargados y ramos cargados, del crecimiento del año anterior, de los que se tomaron muestras de yemas durante dos años. La yemas axilares fueron aisladas de la parte distal, intermedia y basal (en el caso de los brotes de ramos no cargados) y de la parte distal (desde el fruto hasta el ápice) en los ramos cargados. También se tomaron muestras de yemas apicales y de chupones como controles, debido a la baja o nula probabilidad de floración de las mismas, respectivamente. Durante los meses de marzo y abril siguientes a cada periodo de toma de muestras (una vez comenzado el desarrollo de inflorescencias) se tomaron muestras de flores y de yemas retrasadas (que no habían florecido), de ramos que presentaban crecimiento vegetativo y de ramos con crecimiento floral.

Los cDNAs de los genes *leafy* y *apetala* han sido aislados a partir de RNA total obtenido de yemas de olivo mediante la estrategia RACE, usando el sistema «SMART RACE cDNA Amplification Kit» (BD Biosciences/Clontech).

Los estudios de expresión de los genes *leafy* y *apetala* se han realizado mediante QRT-PCR a tiempo real (Quesada et al., 2004) en un termociclador iCycler (Bio-Rad). Para ello se aislaron muestras de RNA de los diferentes tipos de yemas utilizando el sistema «Total RNA Mini Kit» (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Las muestras de RNA fueron retrotranscritas utilizando cebadores reversos específicos que hemos diseñado. Como gen control interno («housekeeping») para normalizar la expresión de los genes diana se utilizó un interespaciador 16S-23S del rRNA de olivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han clonado y secuenciado los mRNAs (cDNAs) de los genes *leafy* y *apetala* de olivo. La comparación de dichas secuencias y las de los péptidos deducidos para sus zonas codificantes con las secuencias de GenBank empleando el algoritmo BLAST, mostró una elevada identidad con proteínas tipo LEAFY y MADS-box de otras plantas, confirmando su identidad.

Se ha cuantificado la expresión génica de *leafy* y *apetala* en diferentes tipos de yemas (apicales y axilares) de olivo durante varios años, lo cual ha permitido determinar sus perfiles anuales característicos.

Así, la mayor inducción de la expresión génica de *leafy* se observó durante los meses de enero, febrero y abril. Además, dichos incrementos se observaron en las yemas de los ramos no cargados (RNC, que posiblemente se vayan a diferenciar a flores) respecto de las yemas de los ramos cargados (RC, que posiblemente se vayan a diferenciar a hojas o tallos). También se observaron niveles altos de expresión de *leafy* tras la floración (marzo), pero sólo en yemas no florecidas de ramos con desarrollo vegetativo (retrasadas de RV) y con desarrollo floral (retrasadas de RF). Existió una baja expresión de *leafy* en las flores de marzo y abril. Todo ello indica que *leafy* funciona como un interruptor génico: es necesaria su expresión para que la yema pase del estado vegetativo al reproductivo, pero una vez desarrollada la inflorescencia, sólo se expresa en las yemas retrasadas que aún no se han diferenciado a flores. Por tanto es un gen que determina la diferenciación a flor.

Por su parte, el patrón de expresión de *apetala* fue diferente. Dicho gen no se indujo en el periodo de noviembre a enero. Al igual que *leafy*, se indujo en las yemas de ramos no cargados (RNC basales) respecto de las yemas de ramos cargados. La expresión máxima de *apetala* se observó en las flores de marzo y abril. Ello indica que este gen está implicado en el desarrollo de los órganos florales, como sucede en otras plantas.

También se han amplificado secuencias genómicas de *leafy* y *apetala* de diferentes cultivares de olivo ('Arbequina', 'Dolce Agogia', 'Domat', 'Frantoio', 'Gordal de Sevilla', 'Hojiblanca', 'Leccino', 'Lechín de Sevilla', 'Manzanilla de Sevilla' y 'Picual'), habiéndose encontrado polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs; del inglés «Single Nucleotide Polymorphisms») en dichos genes. Estos marcadores moleculares (Dorado, 2001, 2006; Dorado et al., 2001) pueden ser útiles para identificación de las variedades de olivo.

Este trabajo constituye el primer estudio molecular de la floración del olivo. Estos conocimientos son importantes para entender mejor la biología del periodo juvenil y su paso a periodo reproductivo, así como para poder diseñar estrategias que acorten dicho periodo. El largo periodo juvenil del olivo representa un elevado costo para mejoradores de olivo, ya que todavía deben esperar de dos a cinco años para producir la primera fructificación en árboles obtenidos a partir de semillas. Nuestro trabajo ha demostrado que los genes *leafy* y *apetala* pueden emplearse como marcadores de desarrollo del meristemo vegetativo y floral.

De este modo se puede diagnosticar el comportamiento de las yemas y su futuro desarrollo a madera o flor, en función de los niveles basales de expresión de dichos genes. Asimismo, pueden emplearse para diagnosticar el comportamiento de las yemas de distintos cultivares de olivo, su respuesta frente a diferentes tratamientos de floración, así como para determinar las dosis, tiempos y momentos óptimos de aplicación. Estos avances posibilitan también la obtención de olivos de floración temprana y sin vecería mediante biotecnología (Dorado, 2002).

AGRADECIMIENTOS

Financiado por Proyectos CAO00-018-C7-1 y CAO00-018-C7-3, Grupo PAI CTS-413 (Junta de Andalucía) y proyecto Oliv-Track QLRT-2001-02386 (Unión Europea).

BIBLIOGRAFÍA

- BARRANCO D, FERNÁNDEZ-ESCOBAR R, RALLO L (eds) (2004): «El Cultivo del Olivo». 5ª ed. Mundi-Prensa (Madrid).
- BELLINI E (1993): Variabilidad genética y heredabilidad de algunos caracteres en las plantas de semilla de olivo obtenidas por cruzamiento. *Olivae* 49: 21-34.
- BERBEL A, NAVARRO C, FERRÁNDIZ C, CANAS LA, MADUENO F, BELTRÁN JP (2001): Analysis of *PEAM4*, the pea *API* functional homologue, supports a model for *API*-like genes controlling both floral meristem and floral organ identity in different plant species. *Plant Journal* 25: 441-451.
- BLÁZQUEZ MA, SOOWAL LN, LEE I, WEIGEL D (1997): *LEAFY* expression and flower initiation in *Arabidopsis*. *Development* 124: 3835-3844.
- CALONJE M, CUBAS P, MARTÍNEZ-ZAPATER JM, CARMONA MJ (2004): Floral meristem identity genes are expressed during tendril development in grapevine. *Plant Physiology* 135: 1491-1501.
- CARMONA MJ, CUBAS P, MARTÍNEZ-ZAPATER JM (2002): *VFL*, the grapevine *FLORICAULA/LEAFY* ortholog, is expressed in meristematic regions independently of their fate. *Plant Physiology* 130: 68-77.
- CHAWLA HS, DORADO G (eds) (2006): «Plant Genomics: Concept and Application». Science Publishers (Nueva York). En prensa.
- COEN ES, ROMERO JM, DOYLE S, ELLIOTT R, MURPHY G, CARPENTER R (1990): *FLO-RICAULA*: a homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell* 63: 1311-1322.
- DORADO G (2001): Marcadores moleculares. *Fruticultura Profesional* 120 (Especial Olivicultura III): 82-87.
- DORADO G (ed) (2006): «Molecular Markers, PCR, Bioinformatics and Ancient DNA - Technology and Applications». Science Publishers (Nueva York). En prensa.
- DORADO G, CABALLERO JL, MUÑOZ BLANCO J (2001): «Fingerprinting» mediante marcadores moleculares en biotecnología: descripción, aplicaciones y perspectivas. En: Caballero JL, Valpuesta V, Muñoz Blanco J (eds). «Introducción a la Biotecnología Vegetal: Métodos y Aplicaciones». Capítulo 7, pp 163-195. Colección Mayor. Publicaciones Obra Social y Cultural CajaSur (Córdoba).
- DORADO PÉREZ G (2002): La Biotecnología y la Industria Alimentaria. *Endocrinología y Nutrición* 49 (Especial Nutrición): 53-56.
- LAVEE S, AVIDAN N, HASKAL A, OGDROVICH A (1996): Juvenility period reduction in olive seedlings - a tool for enhancement of breeding. *Olivae* 60:33-41.

- MANDEL MA, YANOFSKY MF (1995): A gene triggering flower formation in *Arabidopsis*. *Nature* 377: 522-524.
- PELAZ S, GUSTAFSON-BROWN C, KOHALMI SE, CROSBY WL, YANOFSKY MF (2001): *APETALA1* and *SEPALLATA3* interact to promote flower development. *Plant Journal* 26: 385-394.
- PILLITTERI LJ, LOVATT CJ, WALLING LL (2004): Isolation and characterization of a *TERMINAL FLOWER* homolog and its correlation with juvenility in *Citrus*. *Plant Physiology* 135: 1540-1551.
- QUESADA JM, CASADO A, DÍAZ C, BARRIOS L, CUENCA-ACEVEDO R, DORADO G (2004): Allele-frequency determination of *BsmI* and *FokI* polymorphisms of the *vdv* gene by quantitative real time-PCR (QRT-PCR) in pooled genomic DNA samples. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 89-90: 209-214.
- RAPOPORT HF (2004): Botánica y morfología. En: Barranco D, Fernández-Escobar R, Rallo L (eds): «El Cultivo del Olivo». 5ª ed. Capítulo 2. Mundi-Prensa (Madrid).
- SANTOS-ANTUNES F, LEÓN L, DELAROSA 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.
- WADA M, CAO QF, KOTODA N, SOEJIMA J, MASUDA T (2002): Apple has two orthologues of *FLORICAULA/LEAFY* involved in flowering. *Plant Molecular Biology* 49: 567-577.