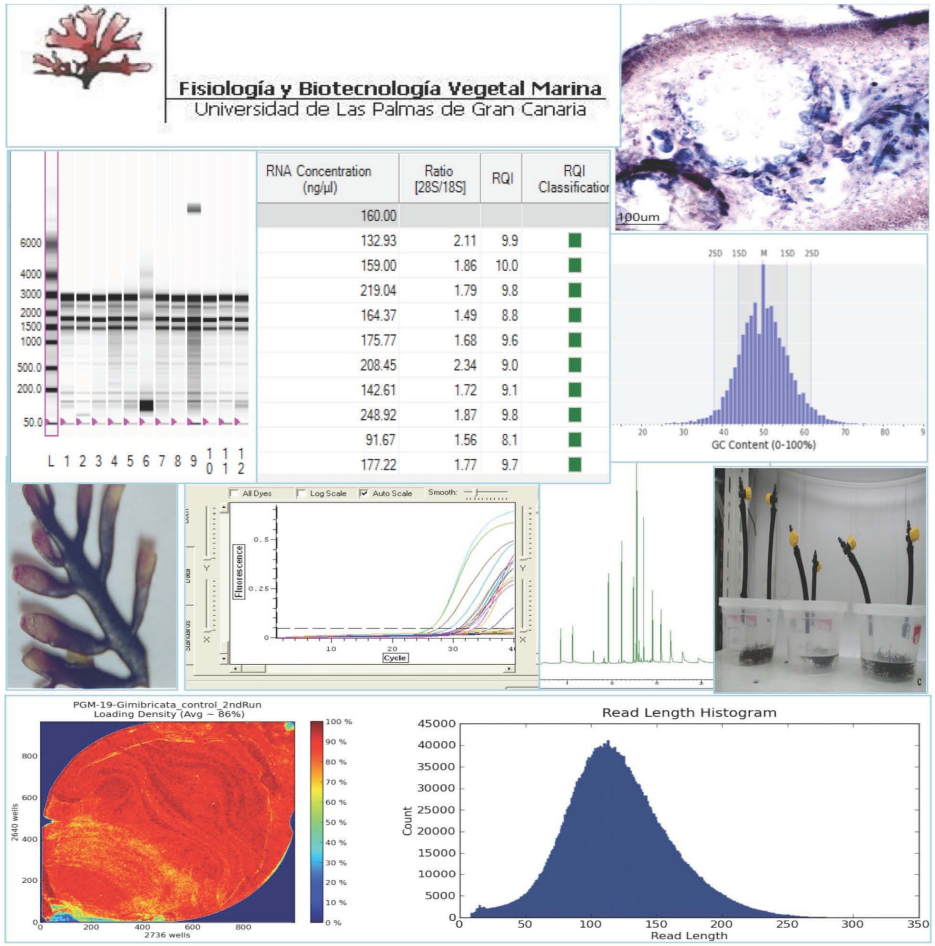
MOLECULAR PHYSIOLOGY OF MARINE MACROALGAE: DIVING INTO THE GENOME OF RED ALGAE



RAFAEL ROBAINA ROMERO
PILAR GARCÍA JIMÉNEZ

CULTIVO IN VITRO

GENÓMICA DE MACROALGAS



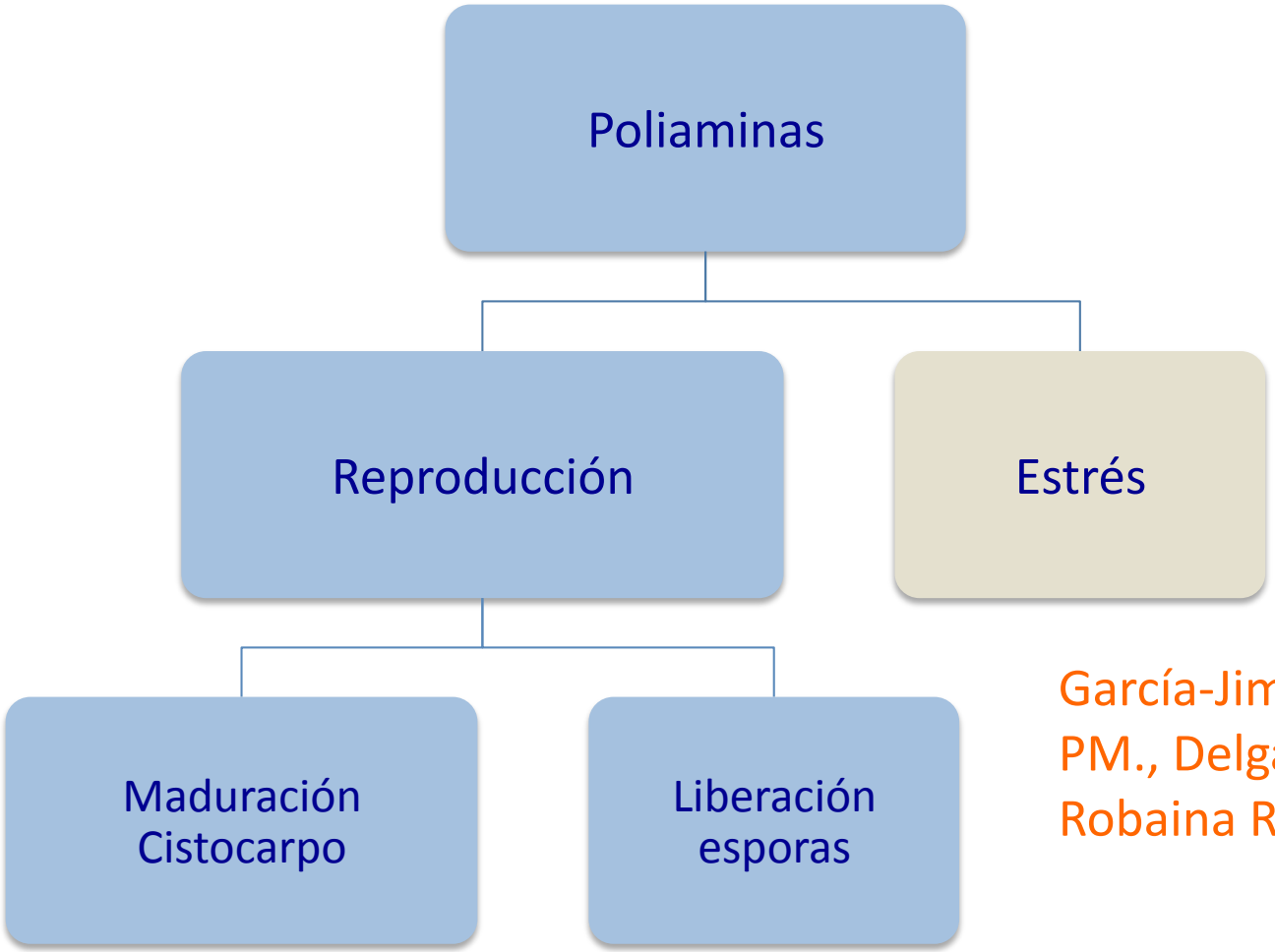
PAPEL DE FUENTES DE CARBONO Y DE LA LUZ

PGR´S:
POLIAMINAS

COMPUESTOS VOLÁTILES

ETILENO
JASMONATOS
OXILIPINAS

García-Jiménez P., Rodrigo M., Robaina R.R. 1998.
Marián FD, García-Jiménez P., Robaina R.R. 2000 a,b
Guzmán Urióstegui A, García-Jiménez P, Marián F.D, Robledo D, Robaina R.R. 2002

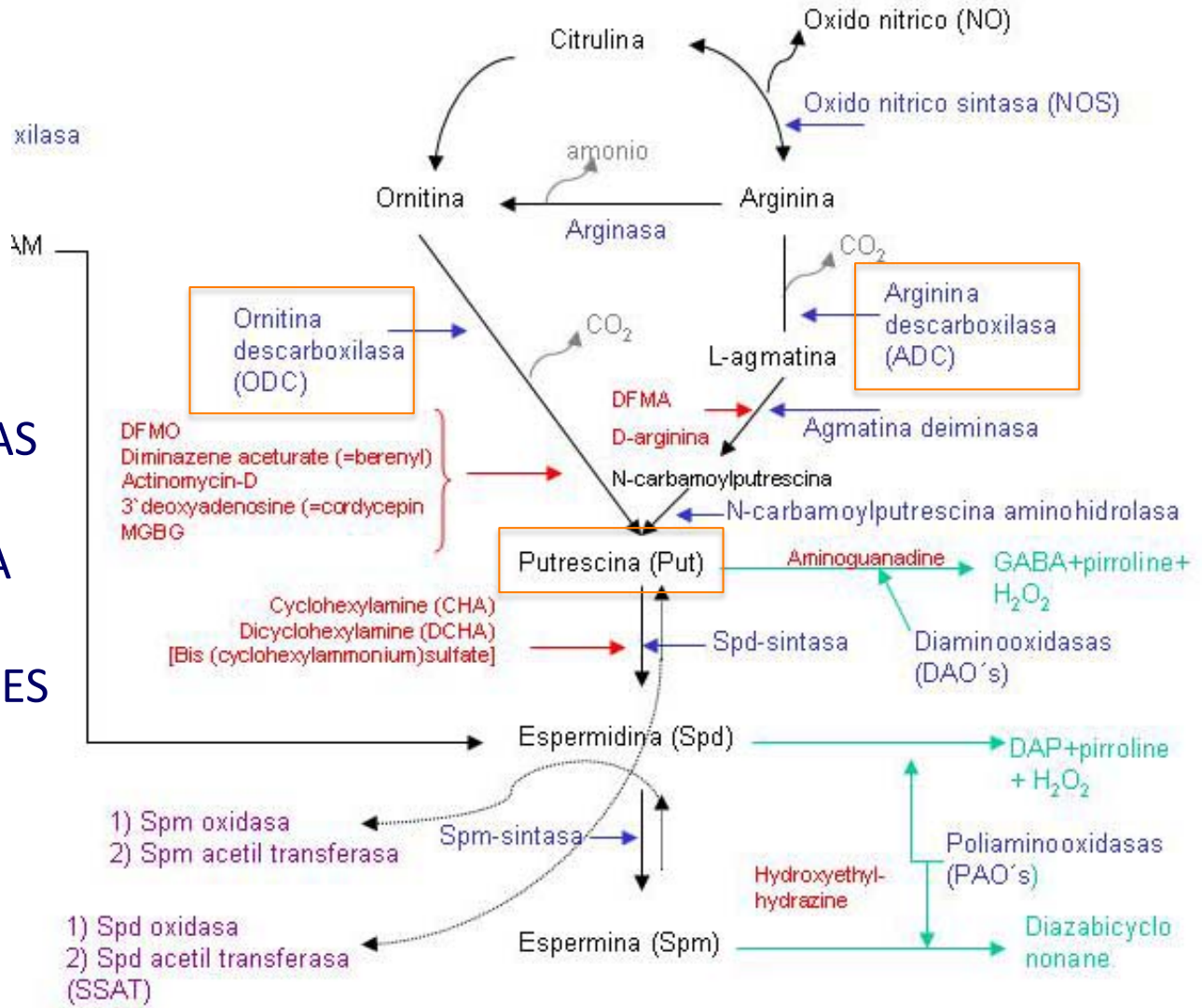


García-Jiménez P., Just PM., Delgado AM., Robaina RR 2007.

REPRODUCCIÓN

- LAS POLIAMINAS ESTÁN IMPLICADAS EN EVENTOS REPRODUCTIVOS Y DE ESTRÉS.

- 2 ENZIMAS RELACIONADAS CON SU SÍNTESIS:
ODC RELACIONADA CON LA REPRODUCCIÓN
ADC ACTIVA EN SITUACIONES DE ESTRÉS



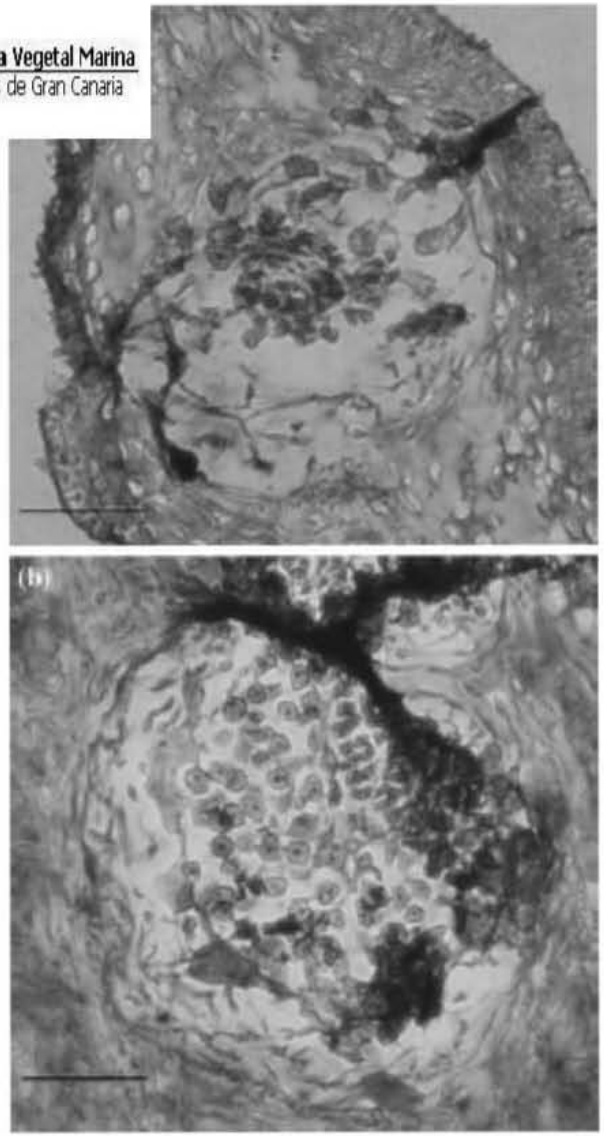
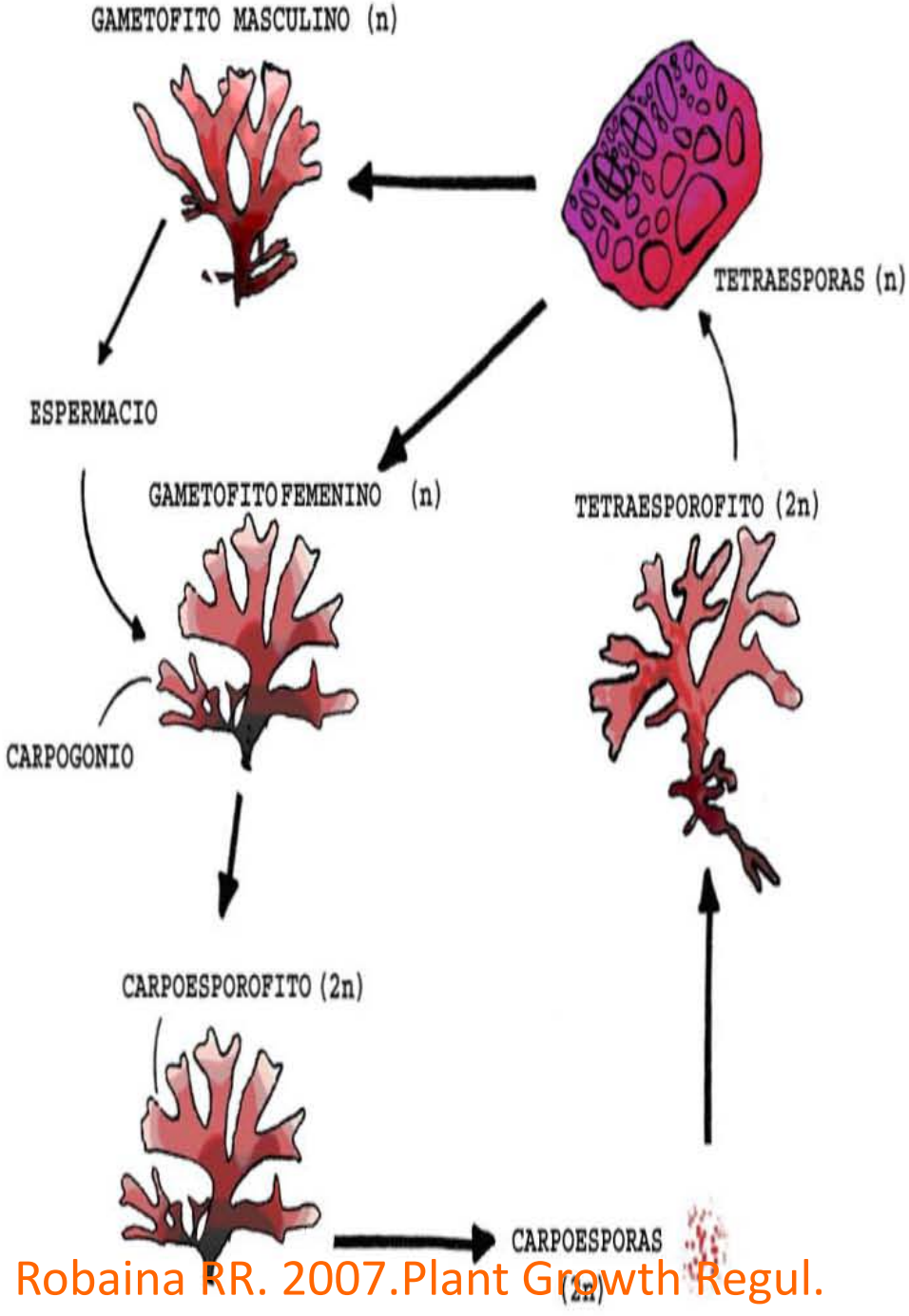


Fig. 2 Light micrographs of sections from explants of *Grateloupia* (a) cystocarp detected after 7 days in explants cultivated control PES for comparison to that developed in explants cultivated in spermine (b). Note profusely divided carpogonial branches and mature carposporangia. *Scale bars*: 120 μm



Sacramento AT., García-Jiménez P., Robaina RR. 2007.Plant Growth Regul. 53: 147-154

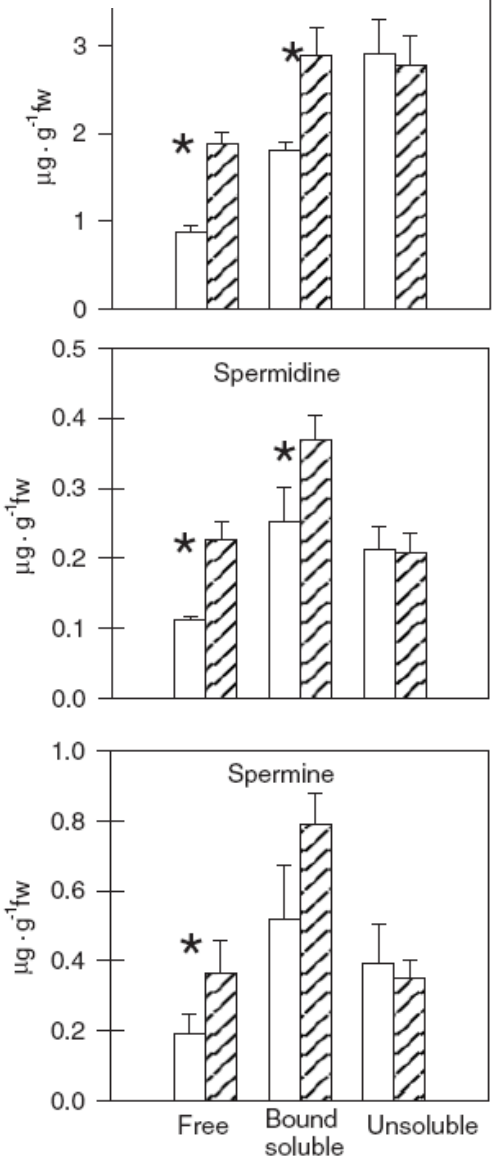


FIG. 2. Contents of PAs in the free, bound, soluble and insoluble fractions in infertile samples (i.e. axes from female gametophyte without evident carpogonia [solid bars]) and fertile female gametophyte with cystocarps (open bars). $n = 3$; vertical bars are SE. $^{*}P < 0.05$.

Las cantidades de PAs son inferiores en talos fértiles

TABLE 1. ADC and ODC enzymatic activities (nmol $^{14}CO_2$ liberated · mg^{-1} protein · h^{-1}) in samples from fertile and infertile axes of the thalli ($n = 30$).

	Substrate	
Sample	L-Arginine	L-Ornithine
Fertile	n.d. to 0.73	0.10–2.63
Infertile	0.08–5.15	0.02–16.6
Effect of the inhibitor DFMO on infertile		
– DFMO	0.85 ± 0.12	1.56 ± 0.82
+ DFMO	0.73 ± 0.08	0.15 ± 0.07[a]

Data are the range of activities observed. n.d., not detected. Data in DFMO experiments came from crude extracts of infertile thalli, divided into subsamples with or without inhibitor. Data are means ± SE from $n = 4$ samples.
[a] $P < 0.05$.

Las actividades de las enzimas de síntesis se correlacionan con los niveles de PAs

Sacramento AT., García_Jiménez P., Alcázar R., Tiburcio AF., Robaina RR. 2004. J. Phycol. 40: 887-894

¿QUÉ OCURRÍA DURANTE EL DESARROLLO DEL CISTOCARPO?

Máximos en PAs hasta el día 5, a partir de ahí los cistocarpos comienzan a ser evidentes y los niveles de PAs caen.

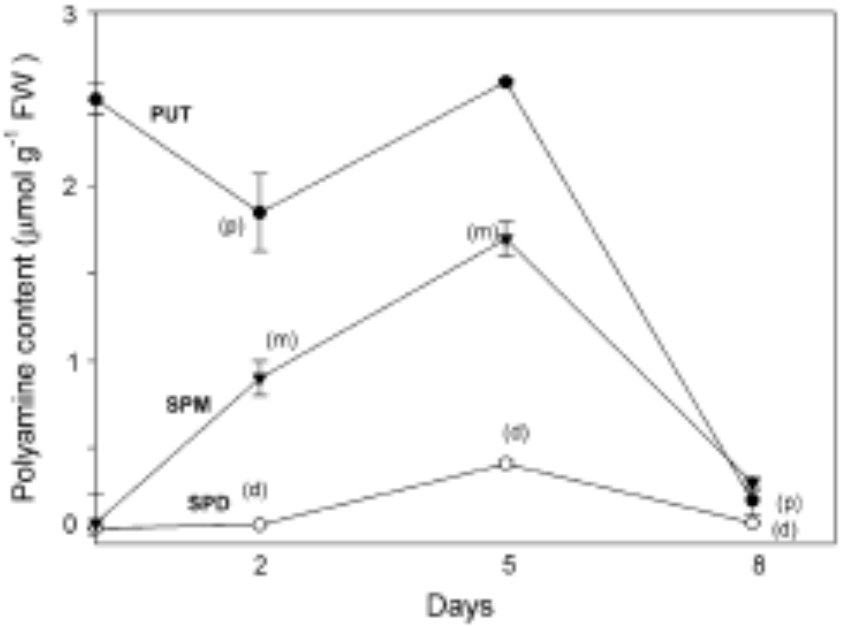


Fig. 1 Concentrations of endogenous polyamines during cystocarp maturation in *Grateloupia*. PUT—free putrescine (*filled circle*), SPD—spermidine (open circle), SPM—spermine (*inverted filled triangle*). Data are mean concentrations of polyamines from samples retrieved from cultures at days 0, 2, 5 ($n = 3$) and 8 ($n = 2$). Based on Kruskal–Wallis tests, (*p*) indicates a significant difference in putrescine from day 0 at $p = 0.05$; (*d*) a significant difference in spermidine from day 0 at $p = 0.05$; and (*m*) a significant difference in spermine from day 0 at $p = 0.05$

Sacramento AT., García-Jiménez P., Robaina RR. 2007.

Table 1 Activities of enzymes involved in the metabolism of polyamines in thalli of *Grateloupia* after 8 days of cystocarp development

	Percentage of fertile thalli[a]	Number of cystocarps, mm^{-2} (n = 55)	ODC pmol h^{-1} mg^{-1} protein (n = 2–4)	DAO	PAO
Day 0	None[b]	None[b]	2.5 ± 1	31 ± 10	7 ± 3
Day 8	Up to 50%	1.91 ± 0.1	0.74 ± 0.04*	384 ± 76*	120 ± 18*

ODC—L-ornithine decarboxylase (pmol $^{14}CO_2$ mg^{-1} protein h^{-1}), DAO—diamine oxidase (pmol ^{14}C-pyrroline mg^{-1} protein h^{-1}), PAO—polyamine oxidase (pmol ^{14}C-pyrroline mg^{-1} protein h^{-1})

* Significant differences from day 0 at p = 0.05

[a] Weight of infertile axes that became fertile as percentage of total weight of thalli in culture

[b] Cystocarps not evident under stereomicroscope

Máxima actividad en la enzima biosintética previo a la formación cistocarpos

Actividad catalítica máxima posterior al desarrollo de los cistocarpos

Sacramento AT., García-Jiménez P., Robaina RR. 2007.



Infértil



Fértil

0,02-16,6 0,10-2,63

nmol $^{14}CO_2 mg^{-1}$ proteina h^{-1}

2 ± 0,01 0,9 ± 0,01

μgPUT g fw

¿HAY MENOS TRANSCRITOS DE **ODC** A MEDIDA QUE SE DESARROLLA EL CISTOCARPO?

Fisiología y Biotecnología Vegetal Marina
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

MEDIDA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA
CUÁNTO SE EXPRESA (qPCR)

RNA

RT-PCR

cDNA

Secuencias consenso: NCBI, CLUSTALW

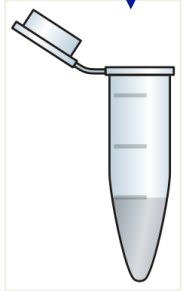
DISEÑO DE PRIMERS

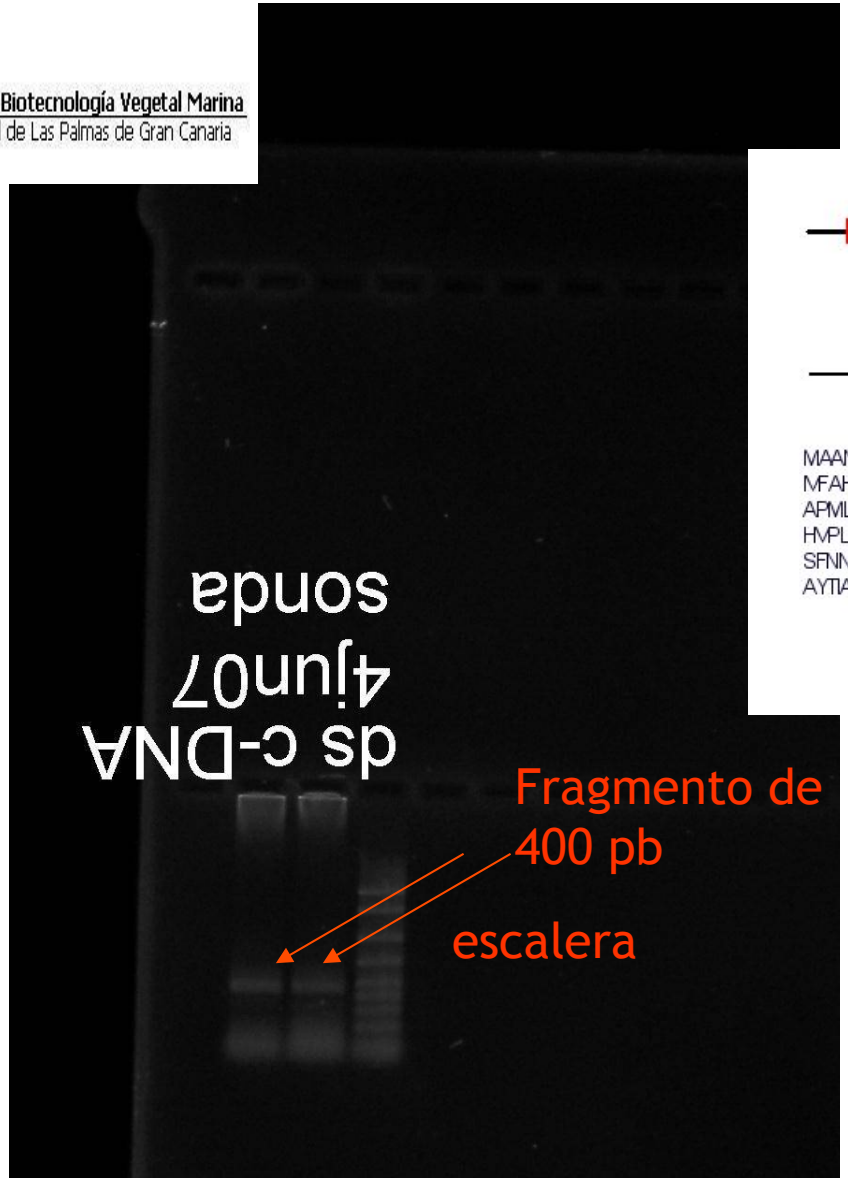
Forward y Reverse

DISEÑO DE SONDA a partir del gen ODC

Sonda de hidrólisis

Sybr-Green







0.1 Kb

MAANYLWVRSALLSLQAFTEKMPRVRPFYAVKCNPDPVMLRVLANLGCGFDCASAKEMATVLDMGVEAES
MFAHPCKRPLDLEFAIETNVTRMTFDCVDELEKVAAECPHAELVLRIRADDPSAVVQFGHKYGADPQTE
APMLLAAAKQLEMNVVGVSFHVGSGSQSCDAYPLAVEAARRVFDQAADLGYEMQLLDLGGGFWGRFDATG
HVPLEDVSEAINSALDRFFPVNSSGRKVEVIAEPGRYFAEACTTMYALVTTVKDRPDGSRSYYITDGVYG
SFNNLVYDHGSVTAKVLRGPGMPPVQPVETETRLPSTVFGPTCDGVDLIFKDVPMPLLRRGDWLQFPNFG
AYTIAGACAFNGLPVDNPDIMYVVWSEEPTGSWEHSVAMLRKGADKDNPALQAPEHHLCFVADLHDLESIC

Extracción banda
Purificación

Secuenciación

BLAST: Comprobación fragmento de ODC

OK?...continuamos

CLONACIÓN

Aislamiento de RNA-cDNA

Tailing

GEN

Inserción (*Ligation*)

PLÁSMIDO

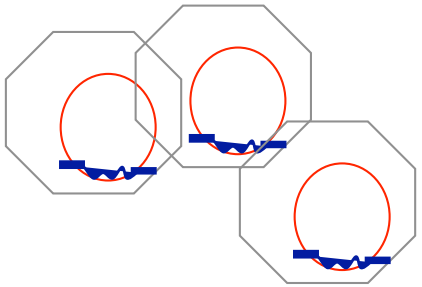
PLÁSMIDO + GEN

Transformación bacteria

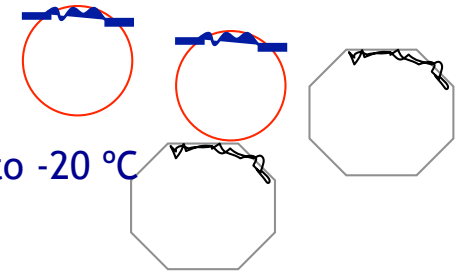
BACTERIA *E. coli*

BACTERIA *E. coli* + PLÁSMIDO + GEN

Crecimiento bacteria

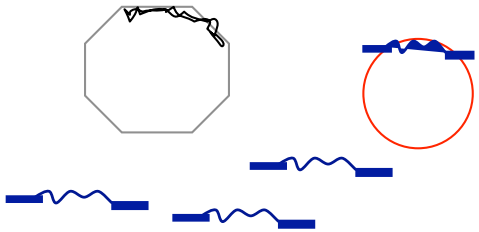


Lisis Bacteria

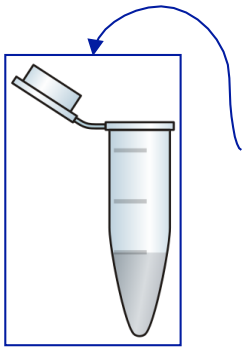


Almacenamiento -20 ºC

Separación plásmido - gen



REAL-TIME PCR: valoración



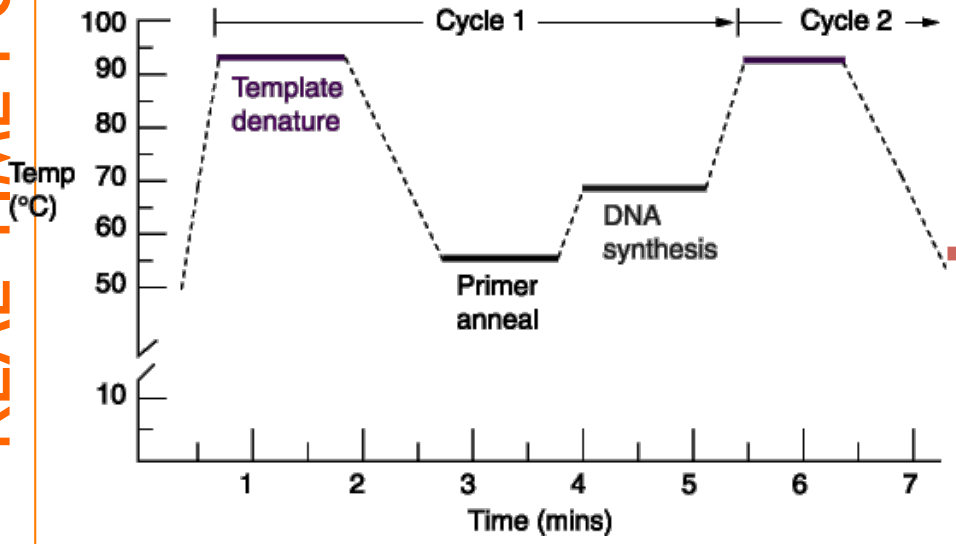
ss cDNA*

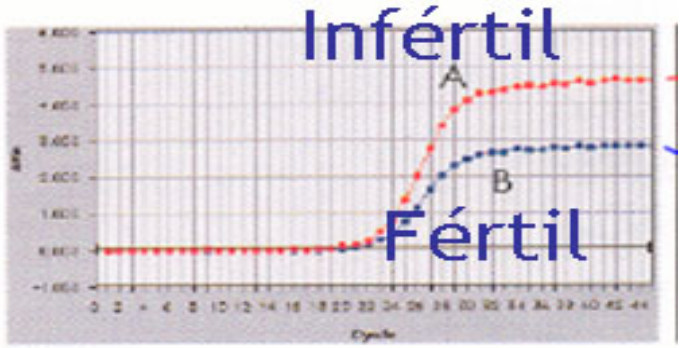
Primers

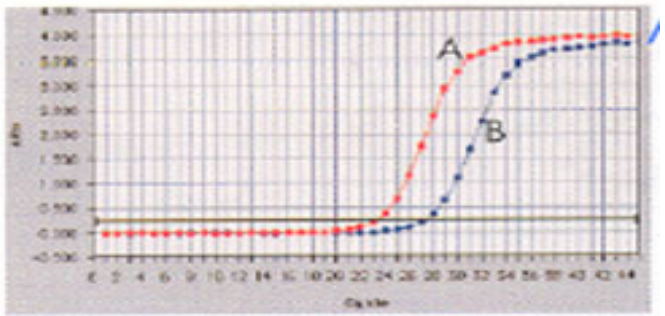
Marcador SyberGreen



q-PCR







NATURALEZA

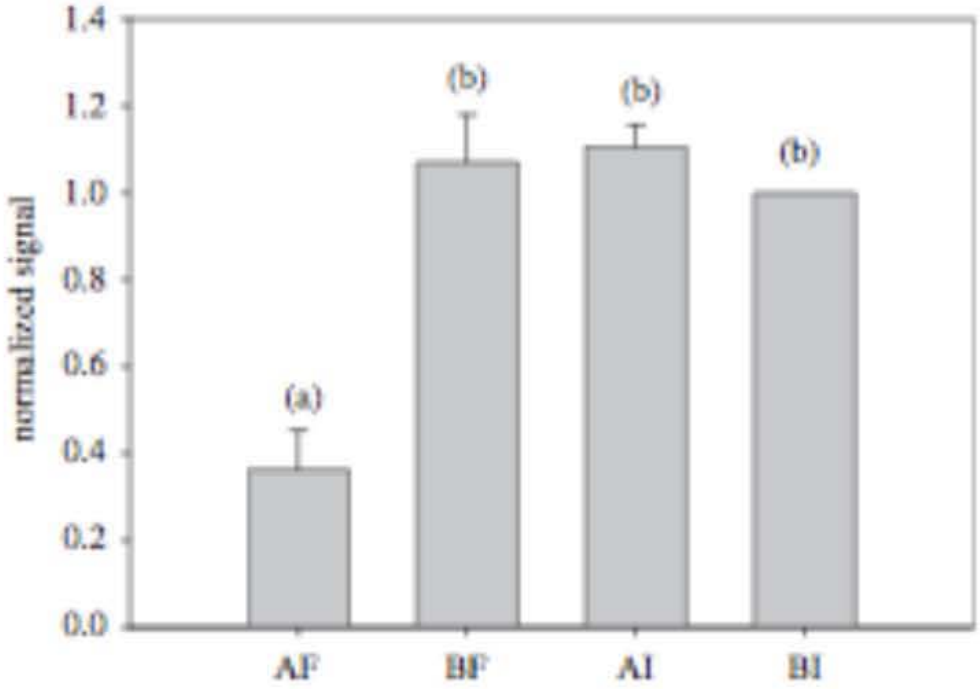
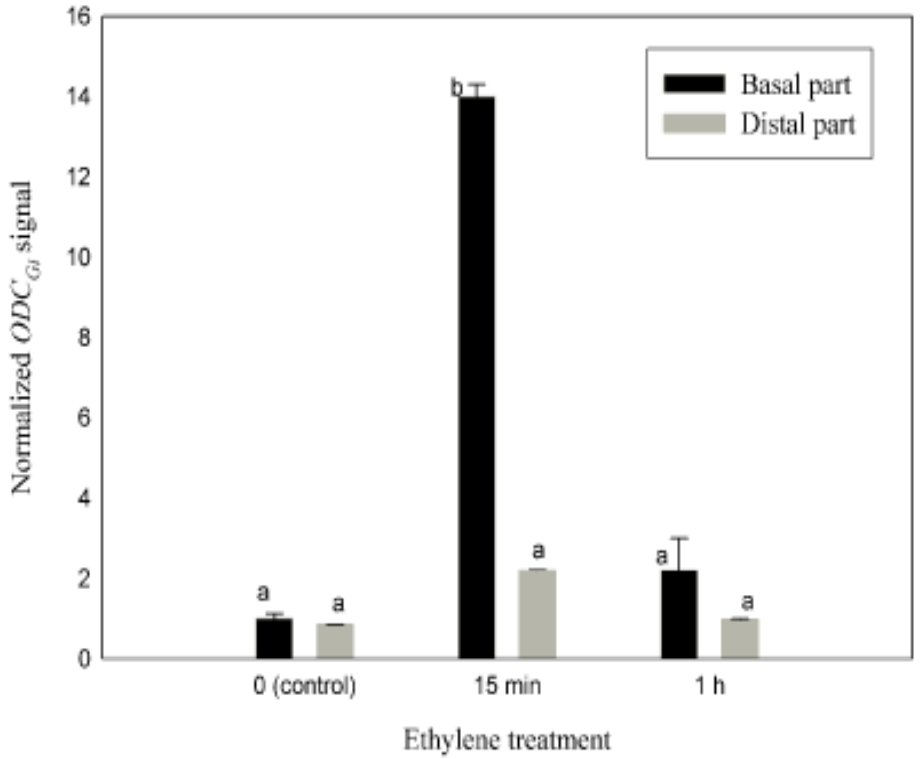


Figure 4. Normalized expression of the GlODC transcripts in fertile (F) and infertile (I) thalli and their respective apical (A) and basal parts (B). Data are values relative to the expression observed in basal infertile (BI). Values are means ± SE of four separate experiments. Different letters indicate significant differences ($p = 0.05$).

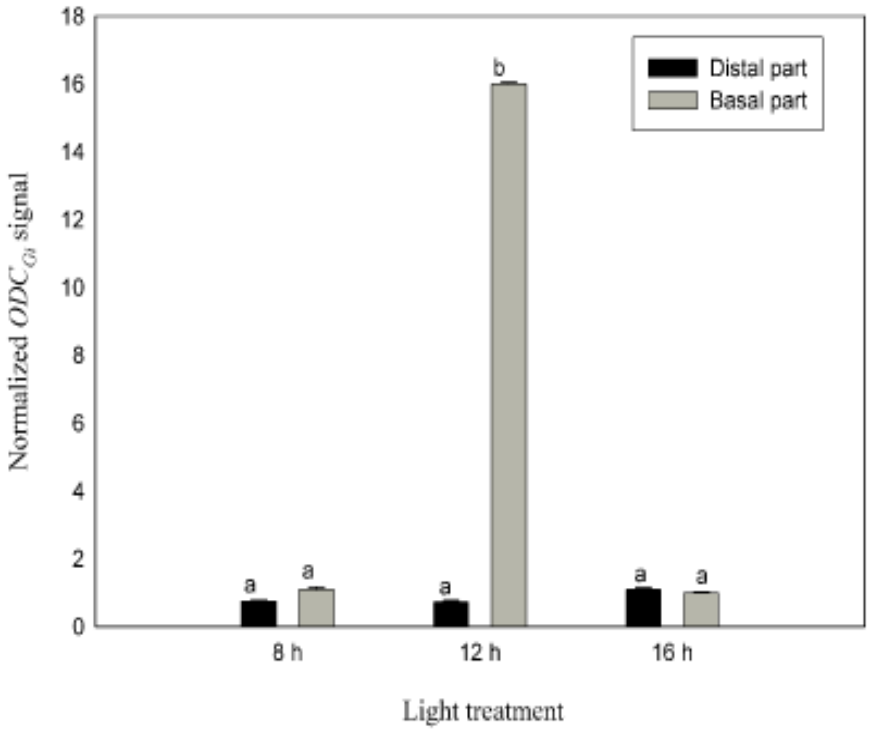
García-Jiménez P., García-Maroto F., Garrido-Cádenas J., Ferrándiz C., Robaina RR (2009). J Plant Physiol 166: 1745—1754

IN VITRO

ETILENO



FOTOPERIODO



Robaina RR, García-Jiménez P. (2013). EN REVISIÓN

Fisiología y Biotecnología Vegetal Marina
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

MEDIDA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA
DÓNDE SE EXPRESA (*ISH*)

INMOBILIZACIÓN DEL TEJIDO

Control del fijador empleado y sus tiempos.

Inclusión en parafina

Cortes seriados montados en portas

CONSTRUCCIÓN DE LA SONDA PARA HIBRIDACIÓN

Vector + inserto **ODC.**
Almacenado -20 ºC

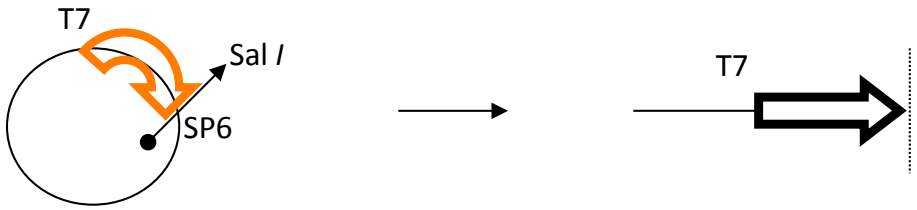


Linearización con enzimas de restricción

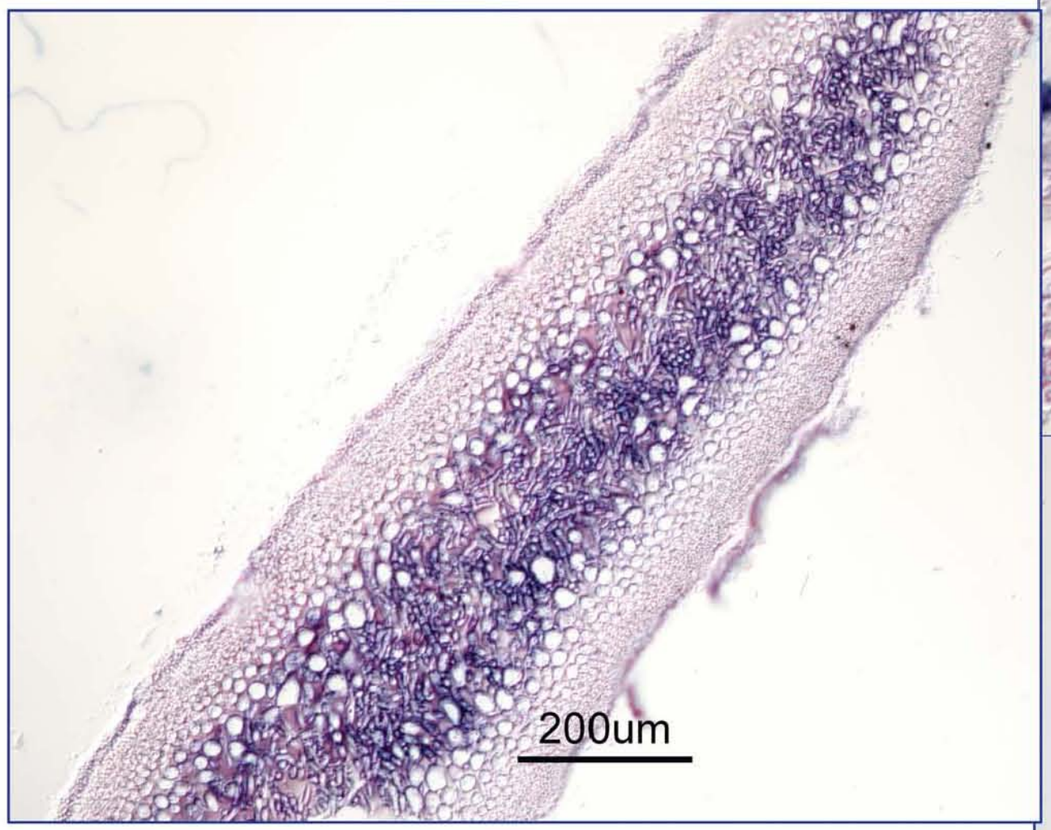
Transcripción *in vitro*

ADN → ARN

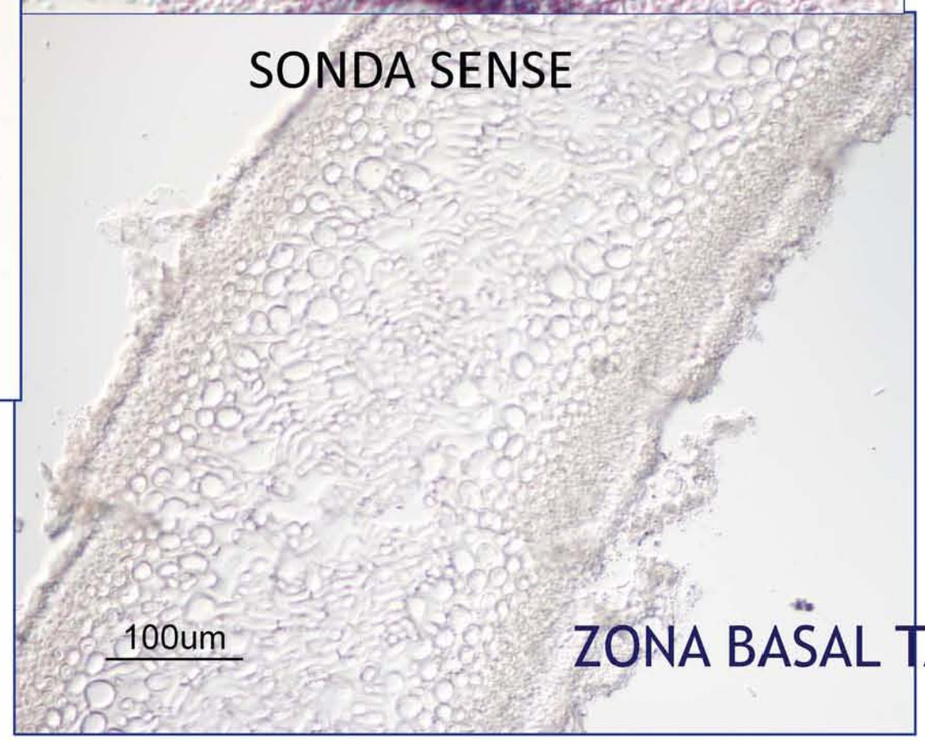
Pre- e hibridación



Fisiología y Biotecnología Vegetal Marina
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria





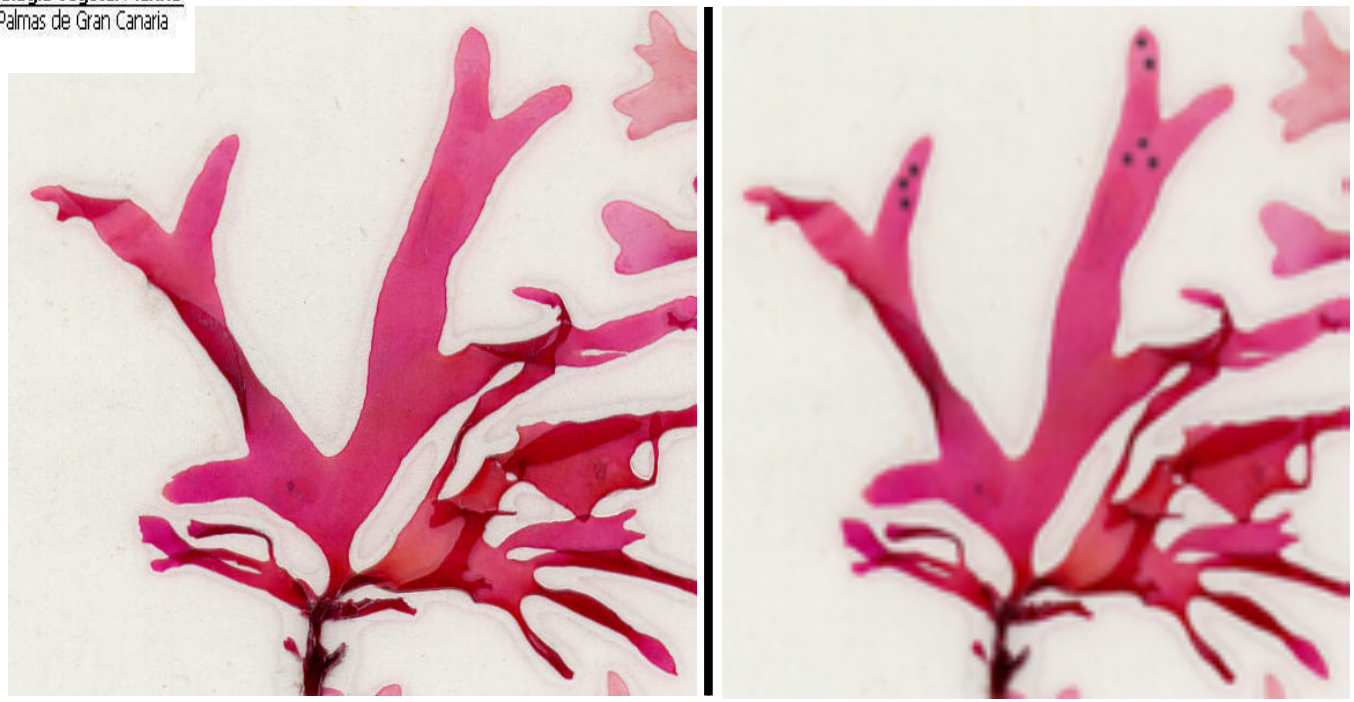


García-Jiménez P., et al., (2009).

0.3 µm
pp
B

100µm

50 µm
A



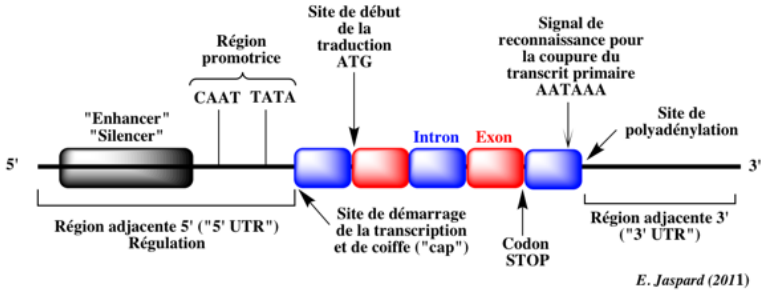
DIFERENCIACIÓN DEL CISTOCARPO

•Nº transcritos disminuye hacia la zona apical del talo.

•La expresión es dependiente de la formación del cistocarpo.

•Existe una expresión diferencial del gen de la ODC.

HACIA DÓNDE VAMOS?



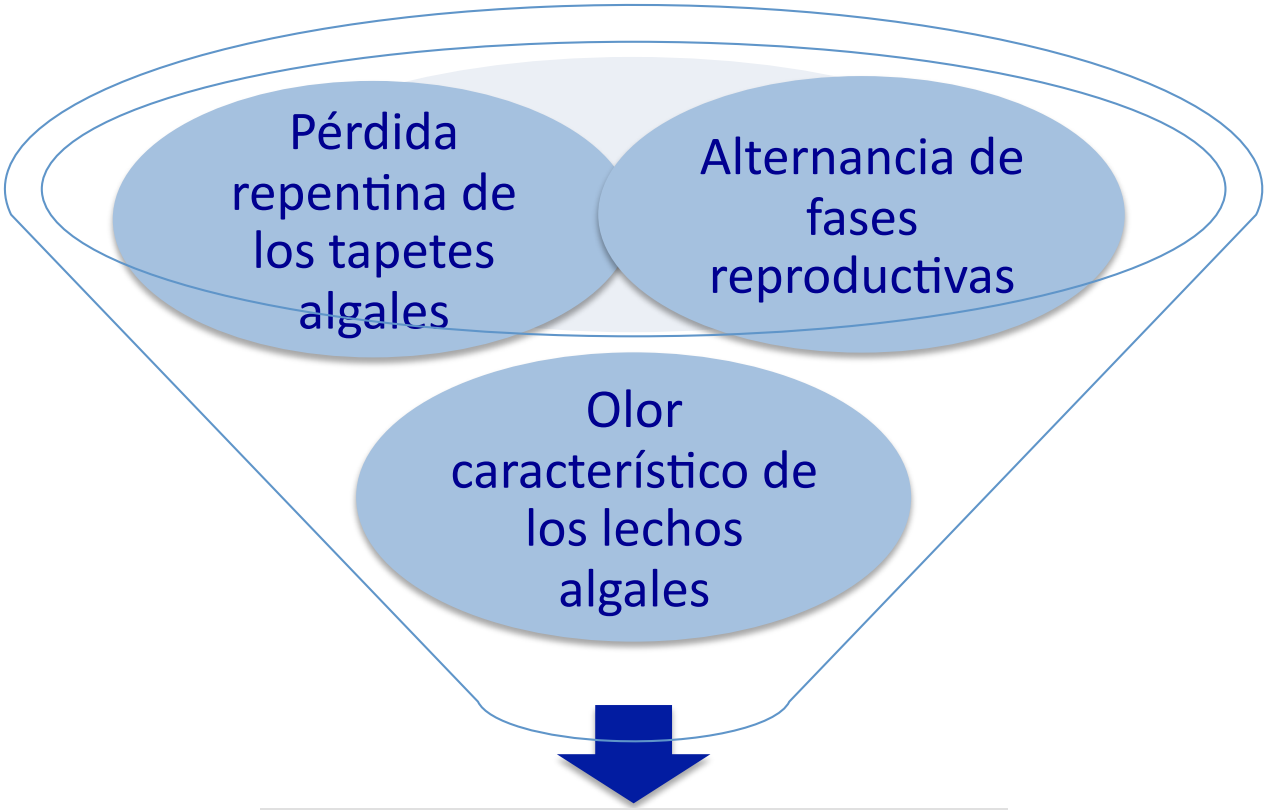
5' UTR-ODC: REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA. FACTORES REGULADORES



VOLÁTILES

Compuestos Orgánicos Volátiles

Existen evidencias de señales gaseosas que afectarían también a la reproducción



¿Compuestos orgánicos volátiles?

HACIA DÓNDE VAMOS? **VOLÁTILES**

Table 2. Classification of volatile organic compounds released by *G. arbuscula* according to their principal functional groups and the enzyme pathways putatively involved in their generation.

Compound class	*Group classification as defined in our study*	*Principal functional group*	*Some representative compounds*	*Main putative enzyme pathways*	*References*
METHYL ALKYL COMPOUNDS	Group I	Metoxy group R-O-CH_3	Proline methoxy carbonyl	Methyltransferases	Loreto and Schnitzler 2010
		Methyl group -CH_3	4 heptanol 2 methyl Pentane 3 methyl	Methyltransferases	Roje, 2006
AMINES	Group II	Amines -NH_2; -NH; -N	Ethylamine, Diethylamine, Trimethylamine, Dimethylamine	Aminetransferases	Roje, 2006
ETHYLENE	Group III	Ethylene CH_2=CH_2	Ethylene	ACC synthase, ACC oxidase, DMSP lyase (?)	Yang and Hoffmann 1984
LIPID OXIDATION	Group IV	Alkenes -C=C-	1,4 Octadieno pentanone	Lipoxygenases	Holopainen and Gershenzon 2010; Lerdau *et al.*, 1997
		Ketones -C=O			
		Carboxylic acid -COOH	Acetic acid, Propanoic acid, Linoleic acid		Loreto and Schnitzler 2010

García-Jiménez P., Brito-Romano O., Robaina RR. 2013.
J Phycol 49: 661-669

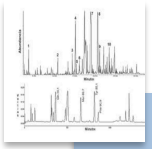
ETILENO

Fisiología y Biotecnología Vegetal Marina
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria



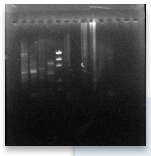
PERCEPCIÓN

- Nivel fisiológico
- Nivel molecular



SÍNTESIS

- Síntesis de etileno
- Rutas enzimáticas



GENES

- Receptores
- Otros

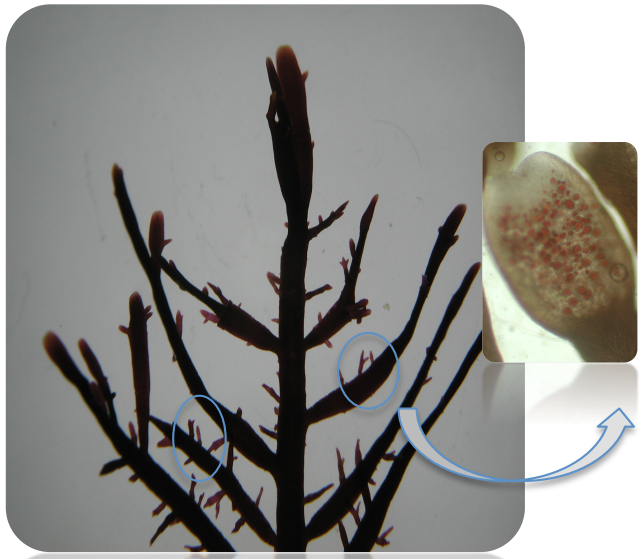
García-Jiménez P, Robaina RR. 2012. J Phycol. 48:710-715.

García-Jiménez P., Brito-Romano O., Robaina RR. 2013. J Phycol 49: 661-669

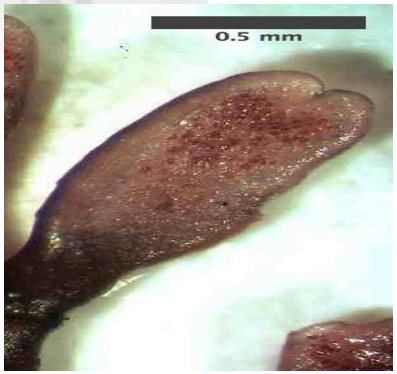
EFECTO DEL ETILENO EN LA TETRAESPOROGÉNESIS

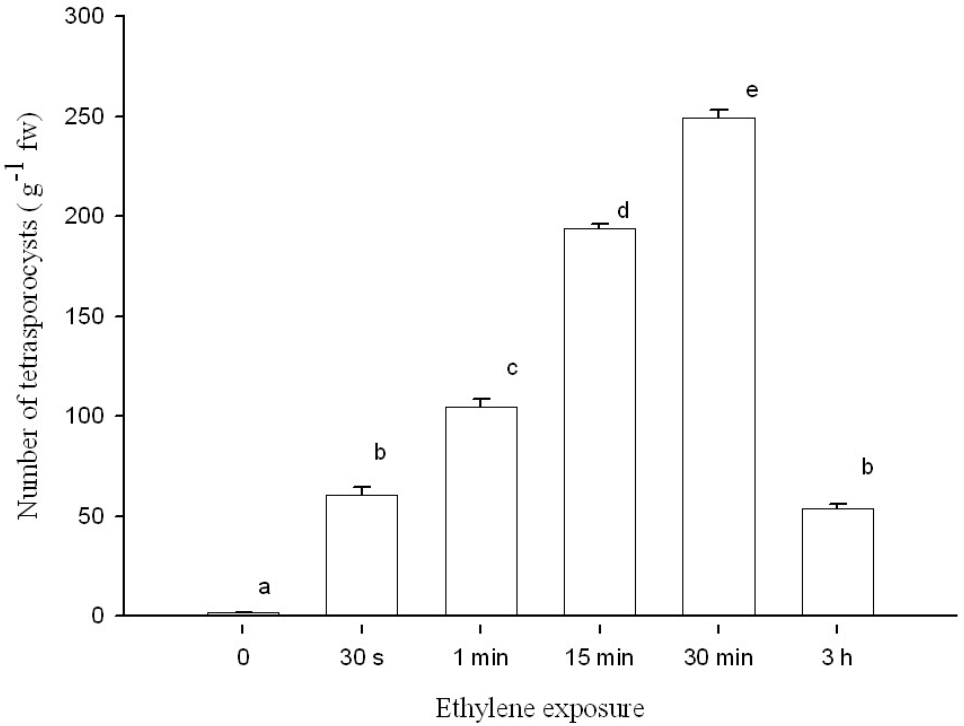
1. Incremento en el nº de ramas tetraesporangiales maduras

2. Ablandamiento de los talos expuestos a 3h etileno

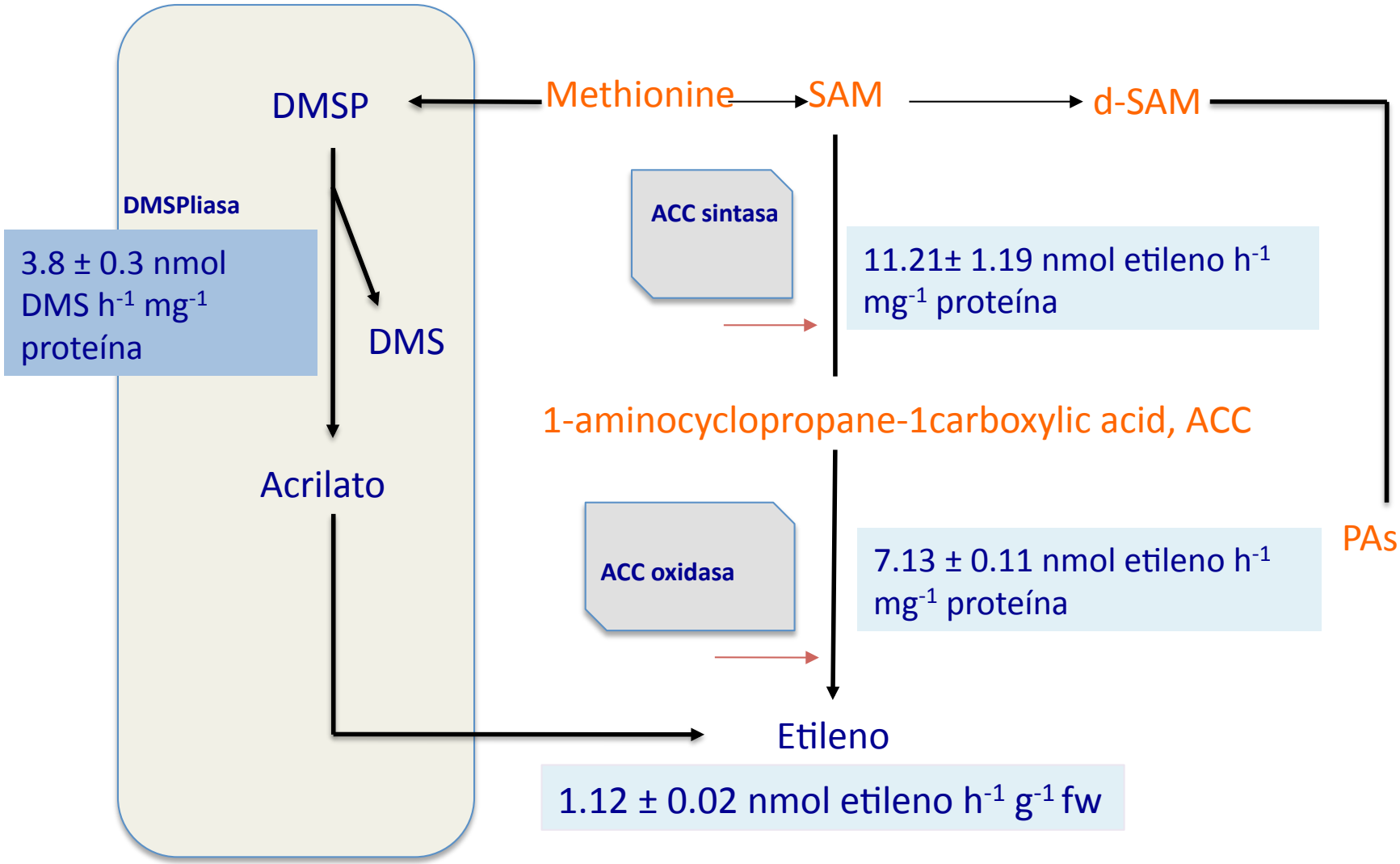








SÍNTESIS: ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE ACS SINTASA, ACO , OXIDASA, DMSPlyase



Transcritos (mg RNA mL^{-1}) de talos en los diferentes tratamientos de etileno. Transcritos son la media de 5 medidas ± SE.

Exposure time to ethylene	Transcripts (µg mL^{-1})
0	12.27 ± 1.31 (a)
30 s	12.50 ± 1.29 (a)
15 min	16.11 ± 1.39 (b)
30 min	20.84 ± 1.86 (c)
3 h	61.94 ± 1.40 (d)

GENES: El etileno incrementa los niveles de RNA, bien de genes inespecíficos como de otros relacionados con la percepción y síntesis del etileno.

RECEPTORES DE ETILENO

ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS Receptores Etileno
IDENTIFICACIÓN DOMINIO GAF, HIS-KIN, REC
SECUENCIAS CONSENSO
DISEÑO PRIMERS



SENSOR QUINASAS (His-Kin)

PROTEÍNAS DE MEMBRANA. PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS

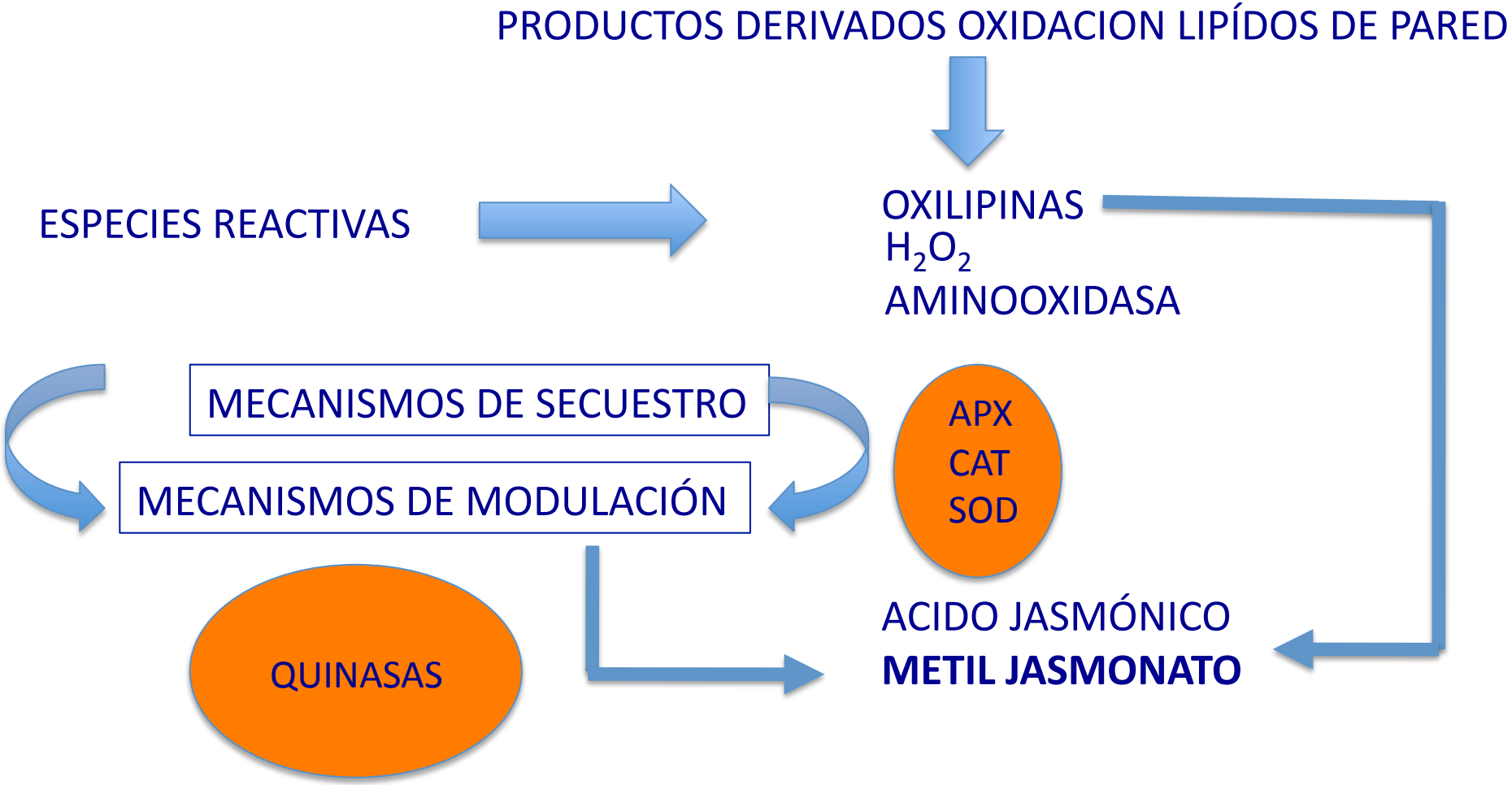
AAA-ATPase



- NO SECUENCIAS DE RECEPTORES DE ALGAS DEPOSITADAS EN NCBI
- POSIBLE NO HOMOLOGÍAS CON PLANTAS SUPERIORES

Fisiología y Biotecnología Vegetal Marina
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

OXILIPINAS, TRANSFERASAS, ESPECIES REACTIVAS

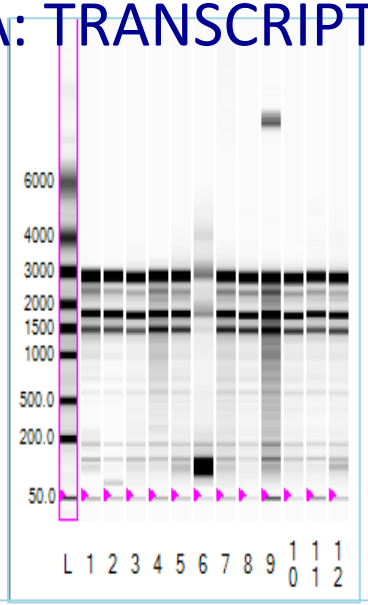


Fisiología y Biotecnología Vegetal Marina
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

DÓNDE ESTAMOS AHORA?

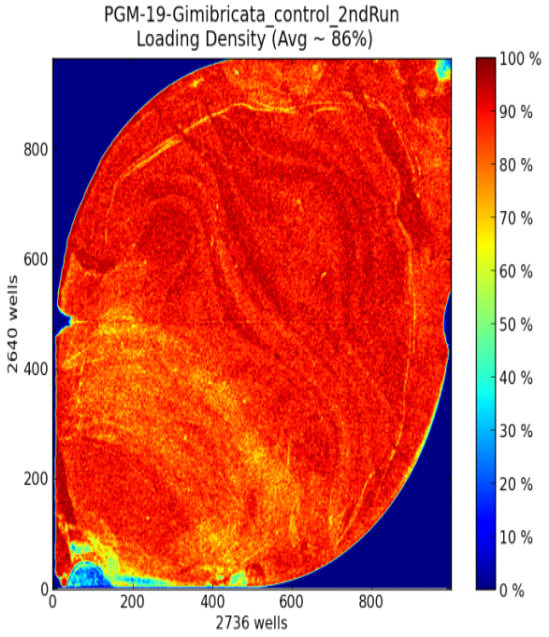
SECUENCIACIÓN MASIVA: TRANSCRIPTOMA

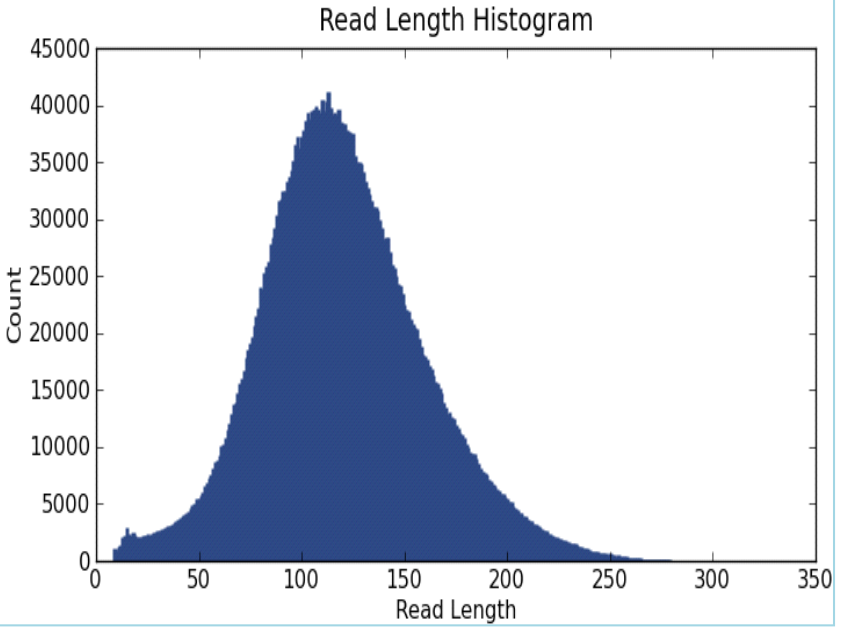
- RNA de excelente calidad



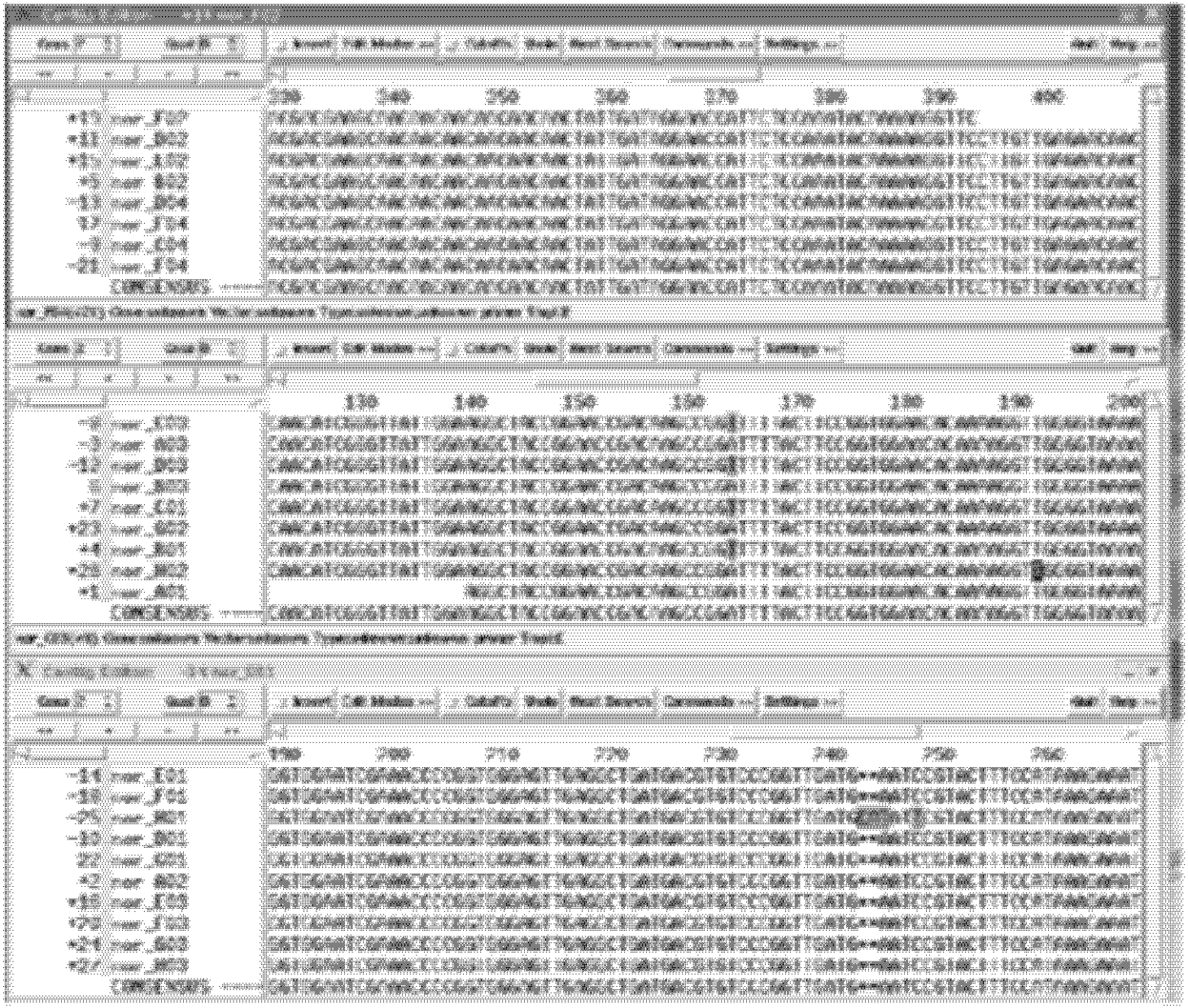
Well ID	Sample Name	RNA Area	RNA Concentration (ng/µl)	Ratio [28S/18S]	RQI	RQI Classificatior
L	Ladder	248.53	160.00			
1	Sample 1	206.48	132.93	2.11	9.9	
2	Sample 2	246.98	159.00	1.86	10.0	
3	Sample 3	340.25	219.04	1.79	9.8	
4	Sample 4	255.33	164.37	1.49	8.8	
5	Sample 5	273.03	175.77	1.68	9.6	
6	Sample 6	323.80	208.45	2.34	9.0	
7	Sample 7	221.52	142.61	1.72	9.1	
8	Sample 8	386.66	248.92	1.87	9.8	
9	Sample 9	142.39	91.67	1.56	8.1	
10	Sample 10	275.29	177.22	1.77	9.7	

Carga homogénea de RNAm
Distribución homogénea de las lecturas: *contigs*

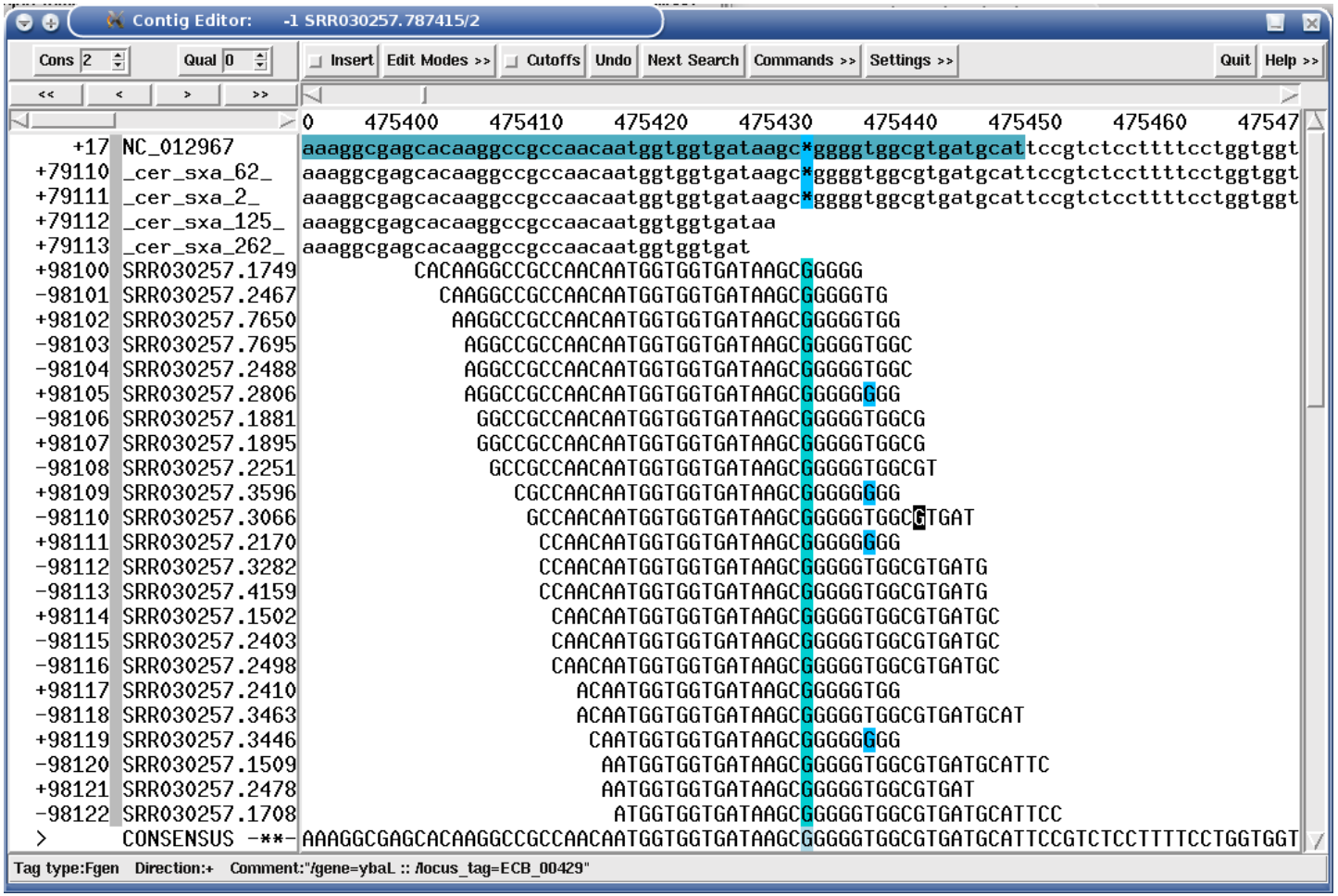




Lecturas de las secuencias
(READS)

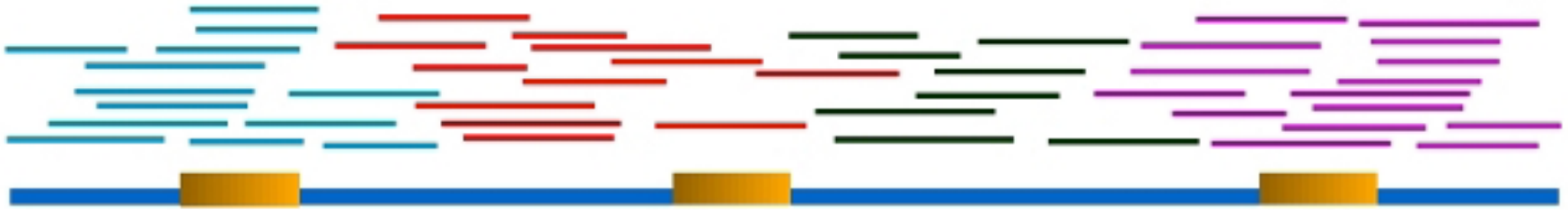


Alineación de las secuencias y mediante su solapamiento, la secuencia final va creciendo (CONTIGS)



Ensamblaje de las secuencias

Permitirá ir rellenado con secuencias intermedias hasta obtener el transcriptoma



El transcriptoma nos va a permitir

•Ir ensamblando nuevas secuencias bajo diversas condiciones experimentales hasta obtener un transcriptoma completo o "casi completo": **transcriptoma de referencia.**

• Análisis funcional basado en anotación de términos *gene ontology* a tres niveles (función molecular, componente celular y proceso biológico) .

• Determinación de función molecular para cada secuencia mediante *blast search* contra las bases de referencias NR y NT del NCBI.

•Conocer qué genes se expresan bajo determinadas condiciones.

•Cuantificar esos genes.

•Ver cómo se modifican las secuencias. Estudiar SNPs.

•….



Fisiología y Biotecnología Vegetal Marina
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

RAFAEL ROBAINA ROMERO
PILAR GARCIA JIMENEZ