

# SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES PARA OBTENER ALBARICOQUES AUTOCOMPATIBLES

Juan Vicente Muñoz-Sanz<sup>1,2</sup>, Inmaculada López<sup>1</sup>, María L. Badenes<sup>1</sup>, Carlos Romero<sup>3</sup>, Elena Zuriaga<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias

<sup>2</sup>Rijk Zwaan ES

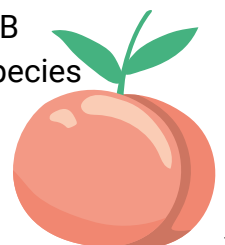
<sup>3</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas

## 1. Control genético de autocompatibilidad en albaricoque

La autoincompatibilidad es una estrategia reproductiva en plantas que favorece la fecundación cruzada, frente a la endogamia, mediante el rechazo del polen propio. La autoincompatibilidad en angiospermas puede clasificarse básicamente en dos tipos: esporofítica y gametofítica. En ambos casos está controlada por una pequeña región del genoma o locus denominada locus S. El locus S contiene al menos dos genes ligados que codifican las proteínas determinantes femenina y masculina, cuya interacción en el pistilo dispara el proceso de rechazo del polen (Iwano and Takayama, 2012). En el caso de los frutales de hueso (género *Prunus*) como el albaricoque, al igual que en el resto de Rosaceas, la autoincompatibilidad es del tipo gametofítico. En este sistema el reconocimiento del polen como propio viene determinado por la coincidencia entre el genotipo del locus S en el polen (haploide) y el genotipo del locus S en el pistilo al que llega (diploide) (Figura 1). Es decir, cuando un grano de polen llega al estigma, el tubo polínico comienza a desarrollarse a través del estilo para tratar de alcanzar el ovario y fecundar al óvulo, pero será rechazado si su único haplotipo-S (o alelo S) coincide con cualquiera de los dos haplotipos-S del pistilo diploide que ha sido polinizado. En caso de no existir coincidencia, el tubo polínico crecerá con normalidad y podrá llegar a fecundar al óvulo.

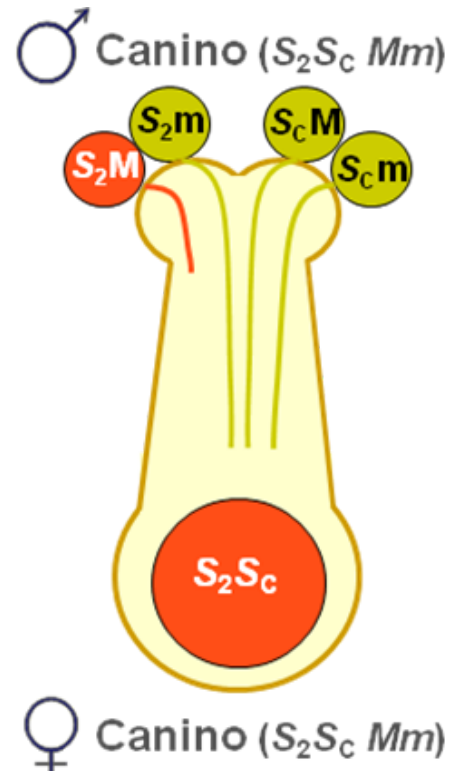
En *Prunus*, aunque el mecanismo molecular no está completamente dilucidado, se sabe que la proteína determinante femenina es una S-ARNasa que se expresa en el pistilo, se introduce en el tubo polínico y desarrolla una actividad citotóxica que provoca la degradación (o rechazo) del polen reconocido como propio. El determinante masculino es una proteína tipo Fbox (denominada SFB en *Prunus*) que se expresa en el polen y que presumiblemente protege a la S-ARNasa propia de la degradación por inhibidores presentes en el polen propio permitiendo que actúe. Recientemente en el IVIA identificamos un gen modificador no ligado al locus S denominado ParMDO (locus M) que se expresa en el polen y codifica una oxidoreductasa con un dominio DsbA (Muñoz-Sanz et al., 2017b). ParMDO no participa en el reconocimiento específico determinado por S-ARNasa y SFB pero también es necesario para el sistema. Así pues, estos tres genes, S-ARNasa, SFB y ParMDO, son esenciales para el funcionamiento de la incompatibilidad gametofítica en *Prunus*.

El albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.) se considera una especie mayoritariamente autoincompatible, aunque se han descrito numerosos cultivares autocompatibles (Muñoz et al., 2017a). Esta autocompatibilidad se debe a mutaciones en los genes SFB y ParMDO, si bien en otras especies de *Prunus* también se han



# SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES PARA OBTENER ALBARICOQUES AUTOCOMPATIBLES

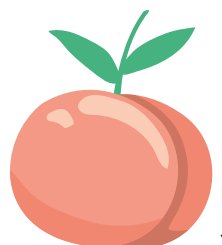
identificado mutaciones en la S-ARNasa que confieren autocompatibilidad. Las formas mutadas (o alelos mutados) de los genes SFB y ParMDO se identificaron en el IVIA y se denominan SFBc (Sc) y ParMDO-m (m), respectivamente, y ambas se caracterizan por la presencia de una inserción de 358 bases (elemento transponible tipo MITE) que trunca sus lecturas, provocando que las proteínas codificadas no sean funcionales (Muñoz-Sanz et al., 2017b; Vilanova et al., 2006). En la Figura 1 se ilustra la autofecundación del cultivar tradicional autocompatible 'Canino', portador de ambas mutaciones, y el efecto de los genes SFB y ParMDO (y sus mutaciones) en el fenotipo de rechazo/aceptación del polen. Los gametos masculinos portadores de las mutaciones Sc, m o ambas pueden crecer sin problemas en el pistilo de 'Canino' mientras que el gameto S2M, que no es portador de ninguna mutación, es rechazado merced a la presencia del alelo S2 en el pistilo. En resumen, mediante la comprobación de la presencia de cualquiera de los dos alelos mutados SFBc o ParMDO-m podemos determinar que una variedad de albaricoque es autocompatible. Por ello, el desarrollo de marcadores moleculares para genotipar la presencia de estas inserciones ha permitido la aplicación de la selección asistida para identificar individuos autocompatibles en fases tempranas del programa de mejora de albaricoquero del IVIA, así como nuevas fuentes de autocompatibilidad. A continuación se detalla el protocolo para realizar dicho genotipado.



**Figura 1: Esquema del sistema de autoincompatibilidad gametofítica en albaricoque.** Se muestran los 4 gametos masculinos (polen) posibles en función de los loci S y M en el cultivar 'Canino' y su capacidad de desarrollo sobre el propio pistilo de 'Canino'.

## 2. Protocolo de selección asistida por marcadores de la autocompatibilidad mediante la detección de los alelos Sc y ParMDO-m:

Recientemente hemos propuesto un protocolo de extracción de DNA de alto rendimiento que no precisa el uso de robots, en el que podemos procesar 384 muestras cada 2 jornadas laborables (Polo et al. 2020). El ADN obtenido con dicho protocolo (ver 2.1) puede emplearse, tras diluirse 1:10, para identificar accesiones autocompatibles mediante PCR y electroforesis en agarosa.



# SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES PARA OBTENER ALBARICOQUES AUTOCOMPATIBLES

## 2.1 Extracción de ADN

Se trata de una adaptación del método de Doyle y Doyle (1987) para la utilización de tiras de tubos de 8 pocillos de 1.2 ml (VWR International), de forma que podemos manejar fácilmente 24 tiras de tubos, lo que corresponde a 192 muestras al mismo tiempo. Para cada muestra a analizar se colectan dos discos de hoja y se van colocando en los tubos junto con 3 bolitas de vidrio. Las muestras se congelan empleando nitrógeno líquido y se almacenan a -20°C hasta el momento de la extracción. El tejido congelado se tritura durante 1 min con una frecuencia de 26/seg empleando un Qiagen TissueLyser 85210 (Qiagen, Hilden, Germany). Se añade 340 µl de CTAB (con 0,2% de β-mercaptoetanol) y se incuba 40 min a 65°C, agitando suavemente cada 10 min. Se centrifuga brevemente para evitar que se produzcan salpicaduras al abrir los tubos, se añade 340 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se mezcla invirtiendo los tubos. Se centrifuga a 4°C durante 10 min a 3000 rpm y la fase acuosa se transfiere a una nueva tira de tubos. Se añade 1,5 volúmenes de etanol 100% y 15 mM de acetato de amonio, se agita suavemente y se deja precipitar hasta el día siguiente a -20°C. A continuación se centrifuga a 4°C durante 10 min a 3000 rpm y se elimina el sobrenadante invirtiendo los tubos. Se añade 300 µl de etanol 70% y se centrifuga de nuevo a 4°C durante 10 min a 3000 rpm. Se descarta el sobrenadante y se deja secar al aire. Finalmente se resuspende el precipitado en 70 µl de TE. El ADN

obtenido se diluye 1:10 y puede utilizarse directamente para la PCR.

## 2.2 Genotipado del alelo SFBc

La PCR para identificar SFBc se realiza en un volumen final de 20 µL con 1 × DreamTaq buffer, 0.2 mM de cada dNTP, 1U de DreamTaq DNA polimerasa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0.25 µM de cada cebador (RFBc-F:5'-GAGGAGTGCTACAACTAAGC-3' y SFBins-R:TCAAGAACTTGTTGGATTGCG-3') y 2 µL de ADN (dilución 1:10). La amplificación se lleva a cabo siguiendo el siguiente programa:

- desnaturalización inicial: 2 min a 95°C,
- 35 ciclos de amplificación:
  - desnaturalización: 95°C 45 seg,
  - anillamiento: 52°C 1 min,
  - extensión: 72°C 90 seg,
- extensión final: 72°C 10 min.

Posteriormente las muestras pueden visualizarse por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Si la variedad analizada tiene el alelo SFBc obtendremos una banda de ~1400 bases (Figura 2A) y por tanto será autocompatible. Al utilizar cebadores específicos de la secuencia de SFBc cualquier otro alelo S no se amplificará, excepto el alelo SFB8 (forma alélica no mutada ancestro de SFBc) que produciría un fragmento de ~1000 bases fácilmente distinguible de SFBc. El tamaño de los fragmentos amplificados se estima por comparación con un patrón de bandas de 100 bp (GeneRuler Plus DNA ladder Thermo Fisher).



# SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES PARA OBTENER ALBARICOQUES AUTOCOMPATIBLES

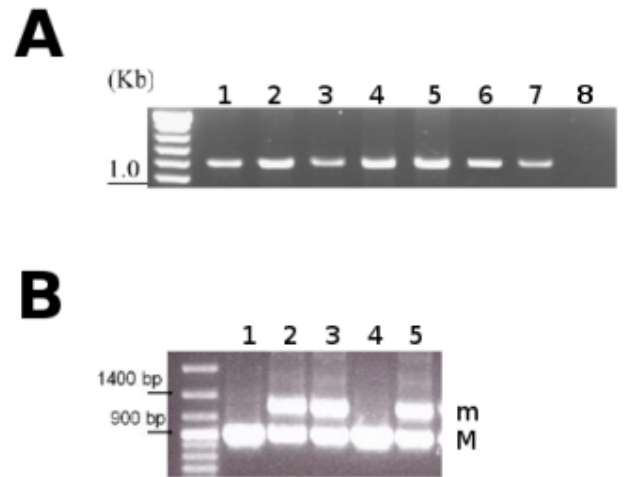
## 2.3 Genotipado del alelo ParMDO-m

La PCR para identificar ParMDO-m se realiza en un volumen final de 20  $\mu$ l incluyendo 2  $\mu$ l de DreamTaq buffer, 0,2 mM de cada dNTP, 0,25  $\mu$ M de cada cebador (ParMDO-F2: 5' TTTGGCCTGTTTTGGAACC-3' y ParMDO-R2: 5'-ATACAAAGATGGGCGCTGA-3'), 1 U de polimerasa DreamTaq DNA (Thermo Fisher) y 2  $\mu$ l de DNA (diluido 1:10). El programa de la PCR consta de:

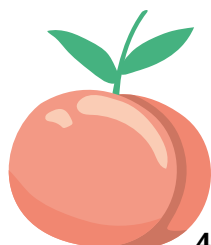
- desnaturalización inicial: 2 min a 95°C,
- 35 ciclos de amplificación:
  - desnaturalización: 95°C 30 seg,
  - anillamiento: 55°C 30 seg,
  - extensión: 72°C 1 min,
- extensión final: 72°C 10 min.

Posteriormente las muestras pueden visualizarse por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El tamaño de los fragmentos amplificados se estima por comparación con un patrón de bandas de 100 bp (GeneRuler Plus DNA ladder Thermo Fisher).

La banda correspondiente al alelo con la inserción (m) tiene un tamaño de ~1300 bases y su amplificación nos indica que la variedad es autocompatible (Figura 2B). El alelo no mutado (M) producirá una banda de ~900 bases.



**Figura 2: Genotipado de los alelos SFBc y ParMDO-m que confieren autocompatibilidad en albaricoque. A: Alelo SFBc.** La inserción está presente en las muestras 1-7. Las muestras 1-3 corresponden con el genotipo SCSC, 4-5 son S2SC, 6 es S7SC, 7 es S5SC y 8 es S1S2 (imagen modificada de Vilanova et al., 2006). **B: Alelo ParMDO-m.** Las muestras 2, 3 y 5 corresponden a genotipos autocompatibles por la presencia de la inserción. Las muestras 1 y 4 solo portan el alelo ParMDO no mutado (imagen modificada de Muñoz-Sanz et al., 2017b).



## BIBLIOGRAFÍA

---

Doyle JJ, Doyle JL. (1987). A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 19, 11–15.

Iwano M, Takayama S. (2012). Self/non-self discrimination in angiosperm selfincompatibility. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 78–83.

Muñoz-Sanz JV, Zuriaga E, Badenes ML, Romero C. (2017b). A disulfide bond A-like oxidoreductase is a strong candidate gene for self-incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca*) pollen. *J Exp Bot.*, 68, 5069-5078.

Muñoz-Sanz JV, Zuriaga E, López I, Badenes ML, Romero C. (2017a). Self-(in)compatibility in apricot germplasm is controlled by two major loci, S and M. *BMC Plant Biology* 17, 82.

Polo-Oltra Á, Romero C, López I, Badenes ML, Zuriaga E. (2020). Cost-Effective and Time-Efficient Molecular Assisted Selection for PPV Resistance in Apricot Based on ParPMC2 Allele-Specific PCR. *Agronomy*, 10(9), 1292.

Vilanova S, Badenes ML, Burgos L, Martínez-Calvo J, Llácer G, Romero C. (2006) Self-compatibility of two apricot selections is associated with two pollen part mutations of different nature. *Plant Physiol.* 42, 629-641.

