

Patrón de expresión de los genes *ParPMC1* y *ParPMC2* asociados con la resistencia a Sharka en albaricoquero

H. Gómez-Martínez, M.L. Badenes y E. Zuriaga¹

¹ Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Valencia, España

Palabras clave: PPV, *Prunus armeniaca*, potyvirus, *plum pox virus*, MATHd, PCR

Resumen

La Sharka, enfermedad provocada por el *plum pox virus* (PPV), es el factor más limitante para el cultivo de los frutales del género *Prunus* a nivel mundial. A pesar de los esfuerzos realizados hasta el momento, el desarrollo de variedades resistentes constituye la única solución a largo plazo para combatir la enfermedad. Sin embargo, las únicas fuentes de resistencia disponibles hasta el momento son unas pocas variedades norteamericanas de albaricoque (*Prunus armeniaca* L.). Recientemente, combinando datos genéticos, genómicos y transcriptómicos, describimos que la resistencia en estas variedades está asociada con el silenciamiento de 2 genes parálogos de tipo MATH (*ParPMC1* y *ParPMC2*). En el presente estudio se analiza el patrón de expresión de dichos genes empleando diferentes tejidos y variedades de albaricoque como primer paso para la caracterización funcional de los mismos.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de la Sharka afecta a los frutales de hueso suponiendo el factor más limitante del cultivo y la mayor causa de pérdidas. El *Plum pox virus* (PPV) es el potyvirus causante de la enfermedad, se transmite por áfidos de forma no persistente y ha sido detectado en Europa, Asia, América y África (Capote et al., 2006). Los síntomas consisten en manchas cloróticas en forma de anillo en hojas y frutos, deteriorando su aspecto e impidiendo su comercialización. El desarrollo de variedades resistentes constituye la única solución a largo plazo para combatir la enfermedad. Sin embargo, se han identificado muy pocas las fuentes de resistencia, tan solo algunas variedades norteamericanas de albaricoque (*Prunus armeniaca* L.) (Martínez-Gómez et al., 2000).

Recientemente, combinando datos genéticos, genómicos y transcriptómicos, logramos identificar 2 genes de tipo MATH en el locus de resistencia *PPVres* localizado en la parte superior del grupo de ligamiento 1 de albaricoque (Zuriaga et al., 2018). Dichos genes fueron nombrados como '*Prunus armeniaca PPVres MATHd-containing*' genes (*ParPMC*). En el locus *PPVres* hay anotados 29 genes de acuerdo con el genoma de melocotón, especie de referencia en genómica de Rosáceas (www.rosaceae.org). Empleando WGS de 10 variedades resistentes y 14 susceptibles, únicamente los genes *ParPMC1* y *ParPMC2* mostraron variantes en acoplamiento con la resistencia. Además, ambos genes mostraron expresión diferencial, empleando tanto RNAseq como qRT-PCR, al comparar variedades susceptibles y resistentes, no observando expresión en estas últimas. Por todo ello, *ParPMC1* y *ParPMC2* se pueden considerar como genes de susceptibilidad del huésped (recesivos) cuyo silenciamiento confiere resistencia a PPV. Con el fin de comprender mejor el mecanismo de resistencia estamos realizando la caracterización funcional de estos genes. En este sentido, en este trabajo se pretende analizar el patrón de expresión de los mismos en diferentes tejidos tanto en variedades susceptibles como resistentes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Se ha utilizado material de 3 genotipos resistentes: ‘Goldrich’, ‘Lito’, ‘Dama Rosa’ y 3 susceptibles: ‘Katy’, ‘Mitger’ y ‘A28’, pertenecientes a la colección de germoplasma del IVIA (Valencia). En el laboratorio con ayuda de un bisturí se separaron los diferentes tejidos: xilema y floema de las varetas, y peciolo y limbo de las muestras de hoja. Todos los tejidos se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido hasta la extracción.

Extracción RNA

La extracción de RNA se realizó en 50 mg de material molido y se utilizó el kit Plant/Fungi Total RNA Purification (Norgen, Valencia, ON, Canadá). Para el tratamiento con RNasa se utilizó RNase-Free DNase Set (Qiagen, Valencia, CA, USA). La calidad y cantidad de RNA se comprobó por electroforesis en gel de agarosa y en espectrofotómetro Nanodrop ND-100 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

RT-PCR

Para la retrotranscripción se emplearon 500 ng de RNA y se utilizó el kit PrimeScript RT Reagent (Perfect Real Time) usando cebadores oligo-d(T) (Takara Bio, Otsu, Japon) en un volumen total de 10 µl. Para las amplificaciones se emplearon 2 µl del cDNA obtenido en el paso anterior (diluido 1:10) junto con 1X DreamTaq Buffer (ThermoFisher), 1,25 mM de Cl₂Mg, 0,1 mM de dNTPs, 1U de polimerasa DreamTaq (ThermoFisher) y 0,25 µM de cada cebador en un volumen total de 20 µL. El mix se incubó a 95°C durante 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 55°C y 45 segundos a 72°C, y finalmente un ciclo de 5 minutos a 72°C. Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha analizado el patrón de expresión de 4 genes en diferentes tejidos de genotipos de albaricoque resistentes y susceptibles a PPV. Según los datos disponibles hasta el momento, la resistencia a PPV en albaricoquero parece estar relacionada con el movimiento a larga distancia del virus en la planta (Ion-Nagy et al., 2006). Por ellos, se han incluido en este trabajo tejidos relacionados con el transporte como xilema y floema, además de peciolo y limbo. Los genes analizados son los genes de susceptibilidad, *ParPMC1* y *ParPMC2*, y el gen *ParP-5* perteneciente al mismo cluster de genes MATH pero que no está involucrado en la resistencia (Zuriaga et al, 2018). Además, se ha empleado la Actina como gen de referencia, comprobando que existía amplificación en todos los casos.

En el caso del peciolo (Figura 1) se observó expresión en todas las muestras para los genes *ParPMC2* y *ParP-5*. Sin embargo no se mostró expresión en el caso del gen *ParPMC1*, observando únicamente una banda débil en el caso de los genotipos susceptibles pero de un tamaño inferior al esperado (109 bases según el genoma de melocotón) (Fig. 1). Una situación similar se observa en el caso de las muestras de limbo, pero en este caso dicha banda aparece en todas las muestras (salvo el control negativo) (Fig. 2). El resto de genes amplifican en todas las muestras, tanto resistentes como susceptibles. En el caso de las muestras de floema, se observa una menor amplificación generalizada (Fig. 3). En el caso de *ParPMC1* se observa el mismo tipo de amplificación que en los casos anteriores, que no corresponde al tamaño esperado, mientras que en el caso de *ParPMC2* únicamente se observa expresión en la muestra resistente de ‘Goldrich’. El gen *ParP-5* muestra amplificación en el caso de ‘Mitger’. Para este tipo de tejido sería recomendable emplear

otro tipo de gen de referencia, puesto que la Actina no amplifica de forma uniforme en las muestras analizadas. Por último, en el caso del tejido de xilema (Fig. 4), el patrón observado coincide con el obtenido en el caso de las muestras de limbo. *ParPMC2*, *ParP-5* y la *Actina* amplifican en todas las muestras, mientras que *ParPMC1* no muestra amplificación.

Este ensayo es el primer paso para la caracterización del patrón de expresión de estos genes, que permitirá profundizar en el conocimiento del mecanismo de resistencia a PPV en albaricoquero.

Referencias

- Capote, N., Cambra, M., Llácer, G., Petter, F., Platts, L., Roy, A., Smith, I. 2006. Current status of Plum pox virus and Sharka disease worldwide. EPPO Bull. 36: 205–18.
- Ion-Nagy, L., Lansac, M., Eyquard, J.P., Salvador, B., Garcia, J.A., Le Gall, O., Hernould, M., Schurdi-Levraud, V., Decroocq, V. 2006. PPV long-distance movement is occasionally permitted in resistant apricot hosts. Virus Res. 120:70-8.
- Martínez-Gómez, P., Dicenta, F., Audergon, J.M. 2000. Behaviour of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars in the presence of Sharka (Plum pox potyvirus): a review. Agronomie. 20:407–22.
- Zuriaga, E., Romero, C., Blanca, J.M., y Badenes, M.L. 2018. Resistance to plum pox virus (PPV) in apricot (*Prunus armeniaca* L.) is associated with down-regulation of two MATHd genes. BMC Plant Biology:18:25.

Tabla1. Cebadores empleados

Gen	Cebadores	Secuencia 5'-3'
<i>ParPMC1</i>	F	AGAATACTGGCACGTACTTTGCTC
	R	GTCAGTAAAAGCTTTGAGGGAGAG
<i>ParPMC2</i>	F	TGCCAACTCATTACACGTTC
	R	GTGCTCTTTCACATTCTTGCTC
<i>Par-5</i>	F	TCTTCCTCCAGGCTCTAAAATCTAT
	R	AAATCCTAGCGTTATGAATCTCCAC
<i>Actina</i>	ACT3	CTTCTTACTGAGGCACCCCTGAAT
	ACT4	AGCATAGAGGGAGAGAACTGCTTG

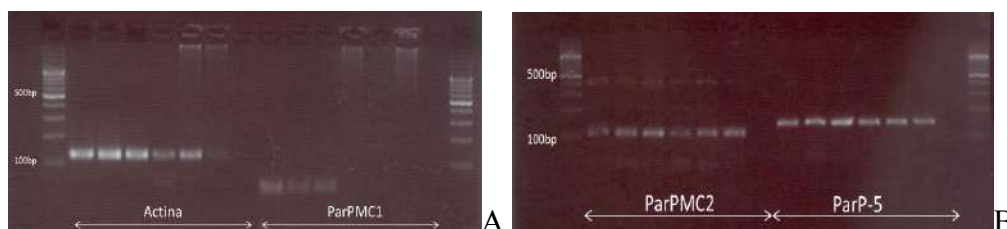


Fig 1. Amplificación de las muestras de peciolo. Las muestras siguen el siguiente orden: 'Katy', 'Mitger', 'A28', 'Dama Rosa', 'Lito', 'Goldrich' y control negativo.

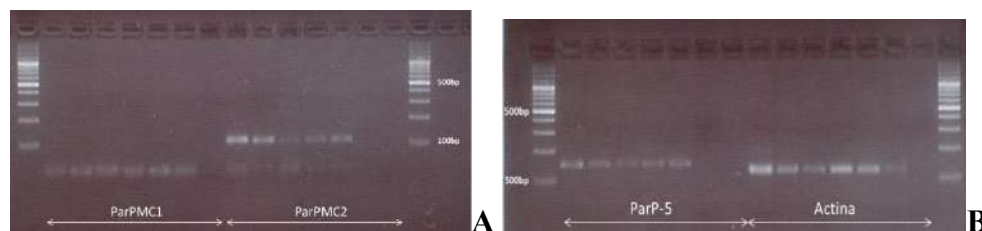


Fig 2. Amplificación de las muestras de limbo. Las muestras siguen el siguiente orden: 'Katy', 'Mitger', 'A28', 'Dama Rosa', 'Lito', 'Goldrich' y control negativo.

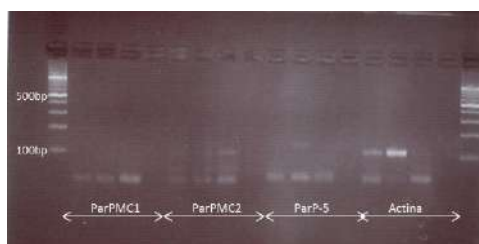


Fig 3. Amplificación de las muestras de floema. Las muestras siguen el siguiente orden: 'Katy', 'Mitger', 'Goldrich' y control negativo.

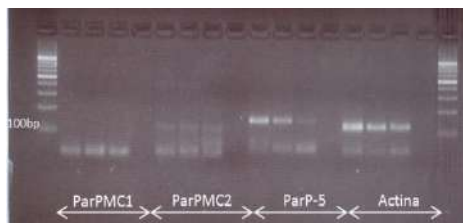


Fig 4. Amplificación de las muestras de xilema. Las muestras siguen el siguiente orden: 'Katy', 'Mitger', 'Goldrich' y control negativo.