

Mecanismos de regulación concertada en los procesos de desarrollo y resistencia a estrés en yema de melocotonero

A. Lloret, M.L. Badenes y G. Ríos.

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

Palabras clave: *Prunus persica*, latencia, epigenética, DAM (*DORMANCY-ASSOCIATED MADS-box*) y sorbitol.

Resumen

Los árboles frutales han desarrollado un mecanismo de latencia estacional con el fin de evitar el daño por frío en los meristemos. La salida de latencia requiere de la percepción cuantitativa y acumulativa del frío de un modo dependiente del genotipo, dando lugar al carácter denominado ‘necesidades de frío’, clave para la adaptabilidad ambiental de los frutales. Se han identificado genes de melocotonero con expresión diferencial en yemas en distinto estado de latencia. Los genes *DAM (DORMANCY-ASSOCIATED MADS-box)* ejercen una función clave en la regulación de la latencia a través de mecanismos epigenéticos. Por otro lado, el gen *PpeS6PDH* codifica una sorbitol 6-fosfato deshidrogenasa implicada en la síntesis de sorbitol. Se ha postulado la participación del sorbitol en la protección frente al estrés por frío y la desecación en yema latente. Por tanto, y debido a las condiciones climáticas adversas que se suceden durante el invierno, los genes con expresión diferencial en yema de melocotonero no están involucrados únicamente en procesos de latencia, sino que también se relacionan con procesos de resistencia a estrés. Además, también se ha visto que, a pesar de pertenecer a rutas diferentes, comparten mecanismos de regulación epigenéticos. Por lo tanto, existe una regulación concertada entre los procesos de desarrollo de la yema y los procesos de resistencia a estrés.

INTRODUCCIÓN

Durante los meses de invierno, los árboles frutales de climas templados activan una estrategia de supervivencia, para protegerse de las condiciones desfavorables del medio ambiente, denominada latencia. En esta etapa los árboles cesan su crecimiento y, mediante unas estructuras conocidas como yemas, protegen los meristemos de las condiciones climáticas adversas. Para que el árbol pueda salir de este estado tiene que cubrir un determinado requerimiento de frío que es dependiente de cada cultivar. El problema surge por el calentamiento global, ya que éste está afectando a la acumulación de frío y, por lo tanto, a la salida de latencia. Esto a su vez provoca una floración irregular e insuficiente y una consecuente pérdida de producción (Campoy et al, 2011). Debido a su importancia económica, este proceso está siendo estudiado en diferentes especies, aunque todavía el conocimiento es escaso y no se ha descrito ningún mecanismo común.

En nuestro grupo se han realizado distintos estudios transcriptómicos en yemas de melocotonero. Aunque durante la latencia parece que el árbol esté totalmente inactivo, en las yemas se están produciendo cambios en la expresión de múltiples genes. Uno de estos genes, denominado *PpDAM6*, pertenece a la familia de los genes *DAM (DORMANCY-ASSOCIATED MADS-box)* y codifica un factor de transcripción que, aunque todavía se desconocen sus dianas, es uno de los principales factores implicados en la regulación de la latencia (Leida et al, 2012). Por otro lado, el gen *PpeS6PDH* codifica una sorbitol-6-fosfato

deshidrogenasa implicada en la síntesis del sorbitol que ha sido relacionada con la resistencia a estrés por frío y desecación (Lloret et al, 2017).

En este estudio abordamos la existencia de mecanismos de regulación comunes de los procesos de latencia de la yema a través de *PpDAM6* y de tolerancia al estrés a través de *PpeS6PDH*, que implican la modificación específica de la cromatina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para los análisis se recogieron muestras de yema floral del cultivar 'Big Top' (3 de noviembre y 29 de diciembre de 2009 y 12 de enero, 16 de febrero y 2 de marzo de 2010). La comprobación del estado de latencia se realizó midiendo el número de yemas abiertas después de un ensayo de forzado, donde se pusieron varetas cortadas con un extremo en contacto con agua a 26°C durante 14 días. Se consideró que el cultivar había salido de latencia cuando más del 50% de las yemas estaban abiertas.

En el análisis de expresión, la extracción del RNA total se realizó partiendo de 60 mg de yemas florales y utilizando RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Durante la extracción se realizó un tratamiento para eliminar restos de DNA con RNase-Free DNase Set (Qiagen). Aproximadamente 500 ng de RNA se retrotranscribieron empleando PrimeScript RT Reagent Kit (Takara Bio). La PCR cuantitativa a tiempo real se realizó en StepOnePlus Real-Time PCR System (Life Technologies) utilizando SYBR premix Ex Taq (Tli RNaseH plus) (Takara Bio) en un volumen total de 20 L.

Para realizar la inmunoprecipitación se siguió el protocolo descrito en Leida et al, (2012). Se utilizó 4g de yemas florales por muestra y se inmunoprecipitaron dos réplicas independientes para cada fecha. El entrecruzamiento, aislamiento de la cromatina y sonicación se realizó de acuerdo a Saleh et al (2008). Después de la sonicación, se consiguieron fragmentos de cromatina de unas 500 pb. Las muestras de cromatina, diluidas junto con las Dynabead-protein G (Invitrogen) unidas al anticuerpo anti-trimethyl-histone H3 (Lys27) (Millipore), fueron incubadas durante toda la noche a 4°C y en rotación. Después de los lavados se eluyó la muestra (98mM NaHCO₃, 1% SDS), y se revertió el entrecruzamiento a 65°C y en presencia de proteinasa K. Finalmente, el DNA inmunoprecipitado fue purificado con High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) y analizado por PCR cuantitativa a tiempo real.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los factores de transcripción DAM son los factores reguladores de la latencia más conocidos en melocotonero (Bielenberg et al, 2008) y, entre ellos, DAM6 ha sido el más relacionado con la salida de latencia (Leida et al, 2010). En la Fig. 1 B se observa que el nivel de expresión de *DAM6* en el cultivar Big Top disminuye durante todo el desarrollo de la yema reproductiva, pero la bajada de expresión más drástica ocurre en el último punto y corresponde cuando la yema sale de latencia, confirmando los resultados de los trabajos anteriores.

Por otro lado, el patrón de expresión de la *PpeS6PDH* es bastante diferente, ya que en los primeros estadios del desarrollo de la yema aumenta para luego disminuir (Fig. 1 B). De hecho, el nivel más bajo de expresión coincide, al igual que en el caso de *DAM6*, con la salida de latencia. Este gen codifica una enzima que participa en la síntesis del sorbitol. El sorbitol es el azúcar transportable de la planta, por lo que se suele producir en los órganos fotosintéticos, como la hoja, y transportarse hasta los órganos que necesitan energía, como podrían ser las raíces. Sin embargo, en yema de melocotón se ha comprobado que, consecuentemente con la expresión de *PpeS6PDH*, también aumenta la cantidad de sorbitol

total en yema, un órgano que no es fotosintético. Además, en ensayos de estrés en yemas bajo diferentes condiciones, se ha visto que la *PpeS6PDH* aumenta su expresión, por lo que posiblemente la función de este azúcar en la yema sea la de actuar como soluto compatible, confiriendo tolerancia a estrés por frío y por desecación, los dos estreses principales del invierno (Lloret et al, 2017).

Estos resultados permiten afirmar que en yema de melocotonero se encuentran genes con expresión diferencial que intervienen en procesos de tolerancia a estrés además de los implicados en latencia.

Así mismo, en los dos casos, los patrones de expresión concuerdan perfectamente con el patrón de enriquecimiento en la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3) en las zonas promotoras del gen (Fig. 1 A, C). La H3K27me3 es una modificación que está asociada al silenciamiento génico. Ambos genes están trimetilados en el último punto del desarrollo, cuando las yemas salen de latencia. Este dato concuerda perfectamente con el patrón de expresión que se ha obtenido en el cultivar 'Big Top', ya que en los últimos puntos es cuando los dos genes tienen un nivel de expresión más bajo.

A pesar de participar en procesos diferentes, *DAM6* y *PpeS6PDH* se encuentran regulados por mecanismos de modificación de la cromatina comunes en el mismo estado de desarrollo de la yema, lo cual pone en evidencia la regulación concertada de los procesos fisiológicos comunes a yema reproductiva, y plantea nuevas perspectivas en el estudio de la latencia de la yema en frutales.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)-FEDER (RF2013-00043-C02-02).

Referencias

- Bielenberg D. G., Wang Y., Li Z., Zhebentyayeva T., Fan S., Reighard G. L., Scorza R., and Abbot A. G. 2008. Sequencing and annotation of the evergrowing locus in peach (*Prunus persica* [L.] Batsch) reveals a cluster of six MADS-box transcription factors as candidate genes for regulation of terminal bud formation. *Tree Genet. Genome*. 4:495-507
- Campoy J. A., Ruiz D., and Egea J. 2011. Dormancy in temperate fruit trees in a global warming context: A review. *Sci. Hort.* 130:357-372.
- Leida C., Conesa A., Llácer G., Badenes M. L., and Ríos G. 2012. Histone modifications and expression of *DAM6* gene in peach are modulated during bud dormancy release in a cultivar-dependent manner. *New Phytol.* 193:67-80.
- Leida C., Terol J., Martí G., Agustí M., Llácer G., Badenes M. L., and Ríos G. 2010. Identification of genes associated with bud dormancy release in *Prunus persica* by suppression subtractive hybridization. *Tree Physiol.* 30, 655-666.
- Lloret A., Martínez-Fuentes A., Agustí M., Badenes M. L., and Ríos G. 2017. Chromatin-associated regulation of sorbitol synthesis in flower buds of peach. *Plant. Mol. Biol.* 95:507-517.
- Saleh A., Alvarez-Venegas R., and Avramova Z. 2008. An efficient chromatin immunoprecipitation (ChIP) protocol for studying histone modifications in *Arabidopsis* plants. *Nat. Protoc.* 3:1018-1025

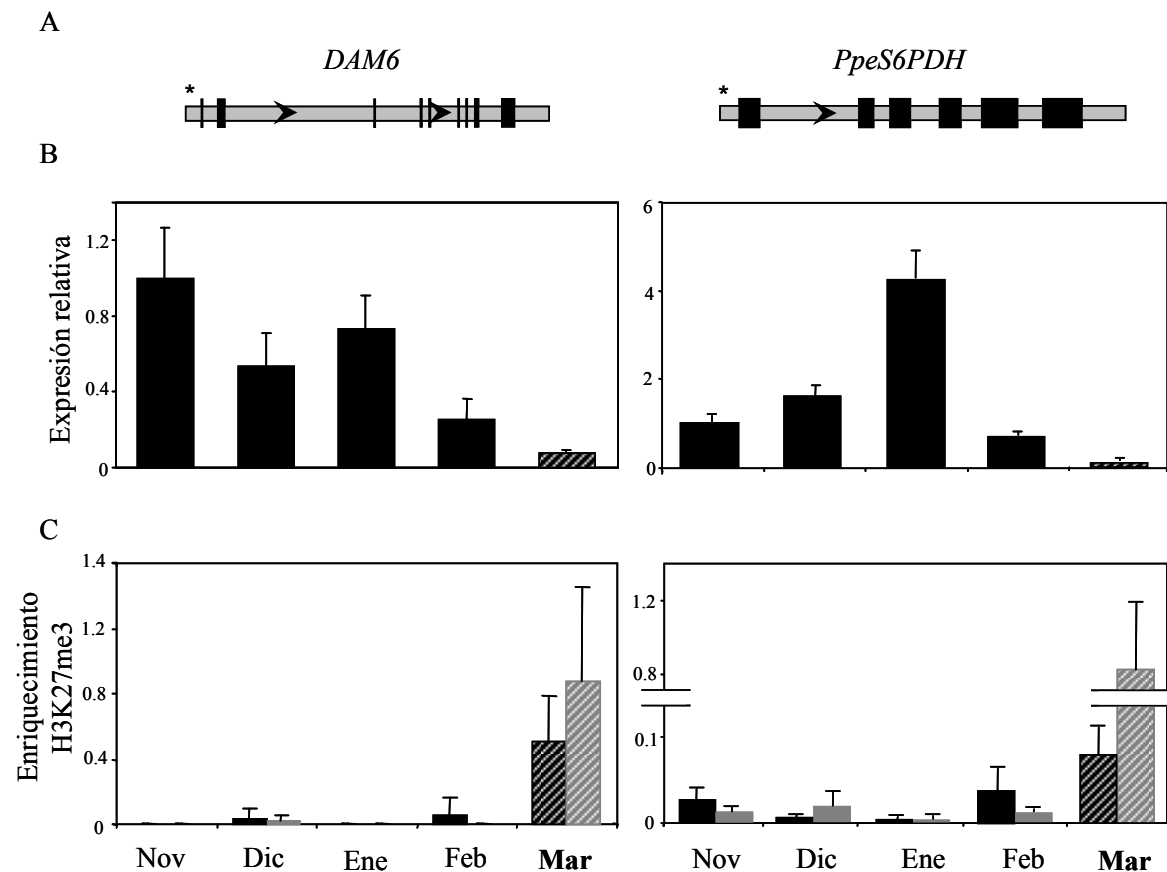


Fig. 1. Regulación de *DAM6* y *PpeS6PDH* en yema reproductiva durante la latencia. **A.** Estructura génica de *DAM6* y *PpeS6PDH*. Los rectángulos negros indican la localización y el tamaño de los exones y el asterisco marca la zona que se ha analizado por qPCR en las muestras inmunoprecipitadas. **B.** Expresión relativa de *DAM6* y *PpeS6PDH* a lo largo del desarrollo de la yema floral de 'Big Top'. Actina-like y SAND-like han sido usados como genes de referencia y se han analizado tres réplicas biológicas con dos réplicas técnicas cada una. **C.** Análisis de las zonas promotoras enriquecidas en la modificación H3K27me3 a lo largo del desarrollo de la yema. Cada barra corresponde a una réplica biológica. Las barras marcadas con rayas corresponden a la muestra de 'Big Top' que han salido de latencia.