

## Análisis de la estructura genómica del locus S en *Prunus armeniaca* L. identificación y secuenciación de dos alelos S

Romero C<sup>1</sup>, Vilanova S<sup>1</sup>, Soriano JM<sup>1</sup>, Burgos L<sup>2</sup>, Llácer G<sup>1</sup>, Badenes ML<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Apdo. 46113 Moncada, Valencia  
svilano@ivia.es

<sup>2</sup> Dpto. de Mejora Genética y Patología Vegetal. CEBAS-CSIC, 4195-30.080 Murcia

El albaricoquero, como el resto de las Rosáceas, tiene un sistema gametofítico de auto-incompatibilidad controlado por un solo locus, altamente polimórfico, llamado locus S (Burgos et al., 1998). El locus S contiene un gen que codifica glicoproteínas con actividad ribonucleasa en los pistilos y un gen desconocido que controla la función del polen. La adecuada caracterización del locus S es fundamental para la comprensión de las bases moleculares de la autoincompatibilidad en Rosáceas. Además, la determinación del genotipo S es muy útil para seleccionar polinizadores compatibles y facilitar los programas de mejora. La identificación y caracterización de los alelos S en almendro y cerezo (Tao et al., 1997 y 1999) ha permitido realizar esta determinación de una forma rápida mediante PCR. El uso de genotecas ha facilitado también la identificación de genes del locus S (McCubbin et al., 2000). Este trabajo describe la identificación y caracterización de los alelos S1 y S2 de albaricoquero a partir de una genoteca BAC (Bacterial Artificial Chromosome) construida con la variedad 'Goldrich' (Vilanova et al., 2002).

### MATERIALES Y MÉTODOS

La sonda C6-C5 (≈300 pb) se amplificó mediante PCR usando ADN genómico de albaricoquero y los cebadores Pru-C6 y Pru-C5, diseñados a partir de regiones conservadas en las secuencias de los ADNs codificantes de S-ARNasas de cerezo (Vilanova et al., 2002). Los filtros de la genoteca BAC de albaricoquero se hibridaron con esta sonda marcada con  $\alpha^{32}\text{P}$  dCTP. El ADN de los clones positivos detectados se extrajo mediante lisis-alcalina, se digirió con *HindIII*, se separó electroforéticamente en un gel de agarosa al 0,7% y se transfirió a una membrana de nylon, hibridándose después con la sonda C6-C5 marcada con digoxigenina. Los fragmentos de ADN positivos detectados se aislaron a partir de geles de agarosa y se subclonaron en el vector Bluescript cortado con *HindIII*. Los clones obtenidos están siendo secuenciados en el servicio de secuenciación del IBMCP de la UPV utilizando el cebador universal T7 y cebadores específicos diseñados a partir de las secuencias consenso obtenidas para cada grupo de clones. Estas secuencias se están comparando mediante análisis Blast y Blast X con las existentes en bases de datos.

### RESULTADOS

El cribado de la genoteca BAC con la sonda C6-C5 identificó 8 clones positivos. Los resultados obtenidos con FPC V6.2 (Fingerprint Contig software) mostraron la presencia de un solo "contig" y la estimación del tamaño de los insertos mediante la digestión con *NotI* ha permitido establecer que el conjunto de estos 8 clones cubre aproximadamente unas 180 kb de la región cromosómica que contiene el gen S-ARNasa. La digestión con *HindIII* del ADN de los 8 clones se hibridó de nuevo con la sonda C6-C5 identificando dos bandas positivas de alrededor de 6,6 y 6,0 kb en seis y dos de los clones BAC respectivamente. Estos fragmentos se subclonaron en el vector bluescript y la

secuenciación parcial de los clones obtenidos demostró que todas las bandas de 6,6 kb eran idénticas entre sí pero distintas a las de 6,0 kb. Para obtener la secuencia completa de estos fragmentos se escogieron 4 clones del primer grupo (con la banda de 6,6 kb): A1-4, D1-3, G1-9, H1-12; y 2 del segundo (con la banda de 6,0 kb): B1-7 y F1-3. Las secuencias consenso obtenidas a partir de estos clones, llamadas G1 y G2, se compararon mediante análisis Blast y Blast X con las existentes en bases de datos, verificando que se trata de S-ARNasas que presentan una elevada homología con las obtenidas a partir de *Prunus avium* y *Prunus amygdalus* e incluso con las de otras especies más alejadas como *Nicotiana glauca*.

## DISCUSIÓN

Aunque la tipificación molecular de los alelos S ya se ha conseguido en almendro y cerezo (Tao et al., 1997 y 1999), en albaricoquero todavía no se habían identificado y hasta ahora para genotipar cultivares se usaban los ensayos de ribonucleasas estilares (Burgos et al., 1998). El desarrollo de las técnicas para la construcción de genotecas ya ha permitido la identificación de fragmentos genómicos ligados al locus S en *Petunia inflata* (McCubbin et al., 2000). Con el fin de encontrar la región genómica del locus S en albaricoquero se cribó una genoteca BAC usando una sonda (C6-C5) homologa a los alelos S de cerezo (Vilanova et al., 2002). Los ADNs de los 8 clones positivos detectados se digirieron e hibridaron con la sonda C6-C5 identificando dos bandas positivas de tamaño diferente. Este patrón puede deberse al polimorfismo del locus S ya que los genes identificados en *Prunus* que codifican ARNasas contienen intrones de longitudes distintas (Tao et al., 1999). Teniendo en cuenta que las secuencias consenso G1 y G2, correspondientes a los dos grupos de clones obtenidos, presentan una alta homología con las de los alelos S presentes en bases de datos, y que la genoteca BAC utilizada en este trabajo fue construida usando ADN del cultivar 'Goldrich', cuyo genotipo es S1S2 (Burgos et al., 1998), las dos bandas positivas obtenidas deben corresponder a los alelos S1 y S2. En el futuro la caracterización completa de la región genómica del locus S en albaricoquero permitirá desarrollar un sistema de tipificación molecular de alelos S de gran aplicación en programas de mejora y ampliará nuestra comprensión de la biología de la polinización en Rosáceas.

- Burgos L, Pérez-Tornero O, Ballester J, Olmos E (1998) Detection and inheritance of stylar ribonucleases associated with incompatibility alleles in apricot. *Sex Plant Reprod* 11:153-158
- McCubbin AG, Wang X, Kao TH (2000) Identification of self-incompatibility (S-) locus linked pollen cDNA markers in *Petunia inflata*. *Genome* 43: 619-627
- Tao R, Yamane H, Sassa H, Gradziel TM, Dandekar AM, Sugiura A (1997) Identification of stylar RNAses associated with gametophytic self-incompatibility in Almond (*Prunus dulcis*). *Plant Cell Physiol* 38(3):304-311
- Tao R, Yamane H, Sugiura A (1999) Molecular typing of S-alleles through identification, characterization and cDNA cloning for S-RNAses in sweet cherry. *J Am Soc Hort Sci* 124(3):224-233
- Vilanova S, Romero C, Abernathy D, Abbott AG, Burgos L, Llacer G, and Badenes ML (2002) Construction and application of a bacterial artificial chromosome (BAC) library of *Prunus armeniaca* L. in the identification of clones linked to the self-incompatibility locus. *Mol Gen Genet* (submitted).