

Expresión del gen *GEBPL* en pistilos de almendro (*Prunus dulcis*) y su relación con la auto(in)compatibilidad floral



Ana Blaya Acosta, José Antonio González Acosta, Inmaculada Méndez Raja

Tutores: Encarnación Ortega Pastor¹, Ángela Sánchez Prudencio¹, Eladio Sanz Romero²

¹CEBAS-CSIC, ²IES Domingo Valdivieso



INTRODUCCIÓN

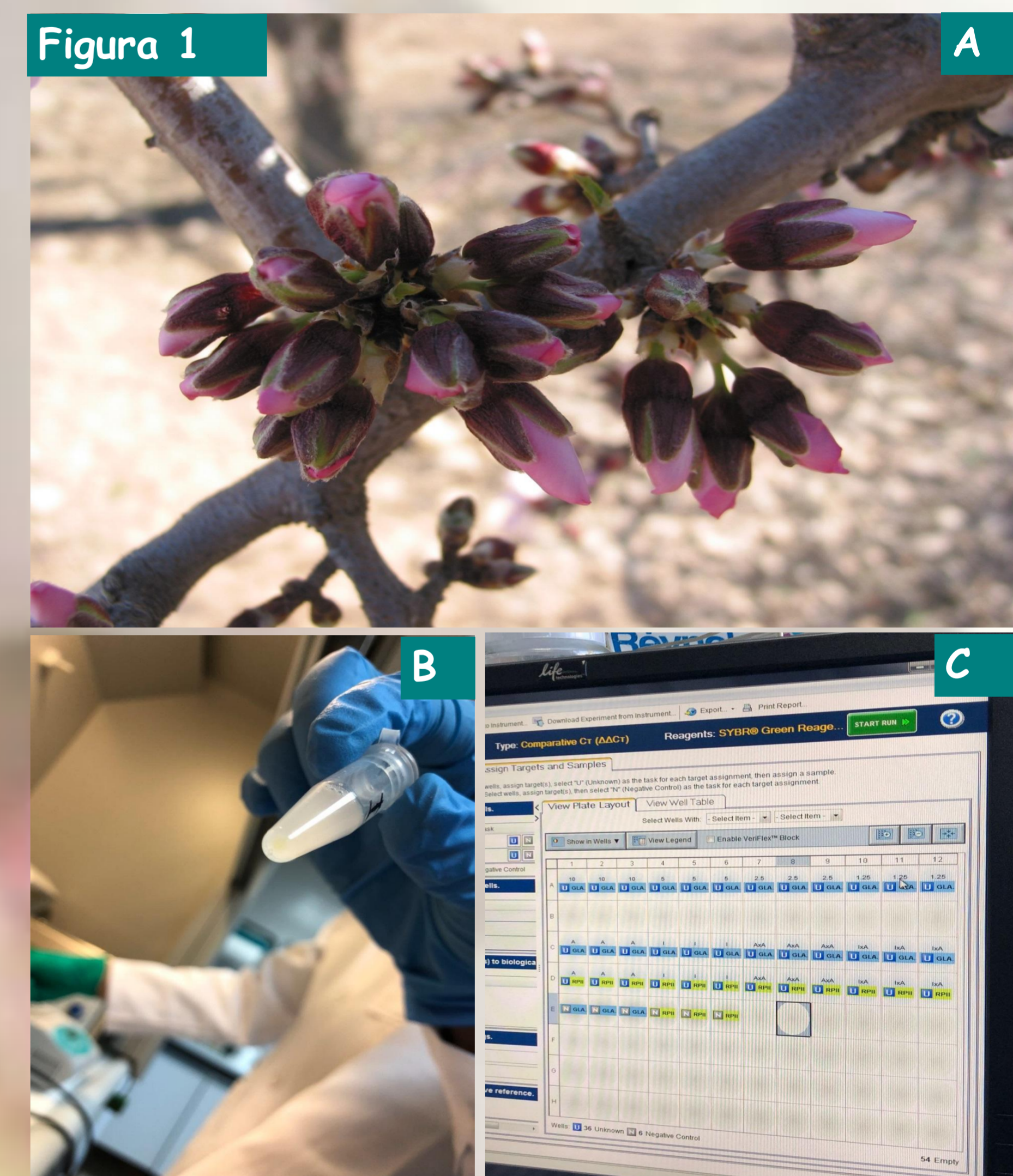
Al igual que muchas especies de angiospermas, el almendro cultivado [*Prunus dulcis* (Miller) D.A. Webb] presenta un sistema de incompatibilidad floral de tipo gametofítico controlado por el locus *S*, el cual constituye una barrera pre-cigótica que impide la autofecundación y favorece la diversidad genética. Aunque en almendro se han identificado algunos componentes de este sistema (genes *ARNasa-S* y *SFB*), todavía son muchas las incógnitas sobre el funcionamiento exacto del mismo. Recientemente se ha observado que hay variedades de almendro con el genotipo *S_f* (tradicionalmente asociado a auto-compatibilidad) que presentan un fenotipo auto-incompatible, y que en las variedades auto-compatibles la *RNasa-S_f* carece de actividad. Este material vegetal ha sido utilizado en estudios proteómicos y transcriptómicos, que han identificado proteínas y genes diferencialmente expresados en interacciones compatibles e incompatibles (Gómez et al., 2015; Gómez et al., 2016). Algunos de estos genes/proteínas han sido identificados como candidatos a componentes del sistema de incompatibilidad floral en almendro. Este es el caso del gen *GEBPL* (*GLABROUS1* enhancer-binding protein-like).

El objetivo de este trabajo es analizar mediante PCR cuantitativa (qPCR) la expresión del gen *GEBPL* en pistilos de almendro sin polinizar y polinizados (interacciones compatible e incompatible), para determinar así su posible implicación en el sistema de incompatibilidad floral del almendro.

MATERIAL Y MÉTODOS

El material vegetal utilizado fueron pistilos sin polinizar de las selecciones de almendro A2-198 (auto-compatible *S_fS_f*) e ITAP-1 (auto-incompatible *S₁₁S_f*) y pistilos polinizados (A2-198 x A2-198: polinización compatible e ITAP-1 x A2-198: polinización incompatible). Los pistilos se obtuvieron de flores a punto de abrir (Figura 1A). El ARN de estas muestras fue extraído usando el método CTAB indicado en Gómez et al. (2016) (Figura 1B), y posteriormente cuantificado en un gel de agarosa al 1%. Para obtener el ADNc necesario en la qPCR se usó la enzima SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen) siguiendo el protocolo que se indica en su manual. Los primers específicos fueron diseñados a partir de la secuencia del gen *GEBPL* usando la herramienta online Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>).

La qPCR (Figura 1C) se llevó a cabo usando el reactivo Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) que se incubó junto con los primers específicos y el ADNc según las siguientes condiciones de reacción: 20 seg. a 95°C (desnaturalización), 40 ciclos de 95°C durante 1 seg, 60°C durante 20 seg. y la determinación final de la curva de disociación del producto de qPCR (15 seg. a 95°C, 1 min. a 60°C y 15 seg. a 95°C). El análisis de las curvas de disociación permitió examinar la especificidad de amplificación de cada par de cebadores. Para la normalización de la expresión del gen analizado se utilizó el gen de referencia RP II (control interno). La eficiencia de la qPCR (E) y el ciclo umbral o punto de corte (*C_t*) fueron calculados usando el programa StepOne Software v2.3.

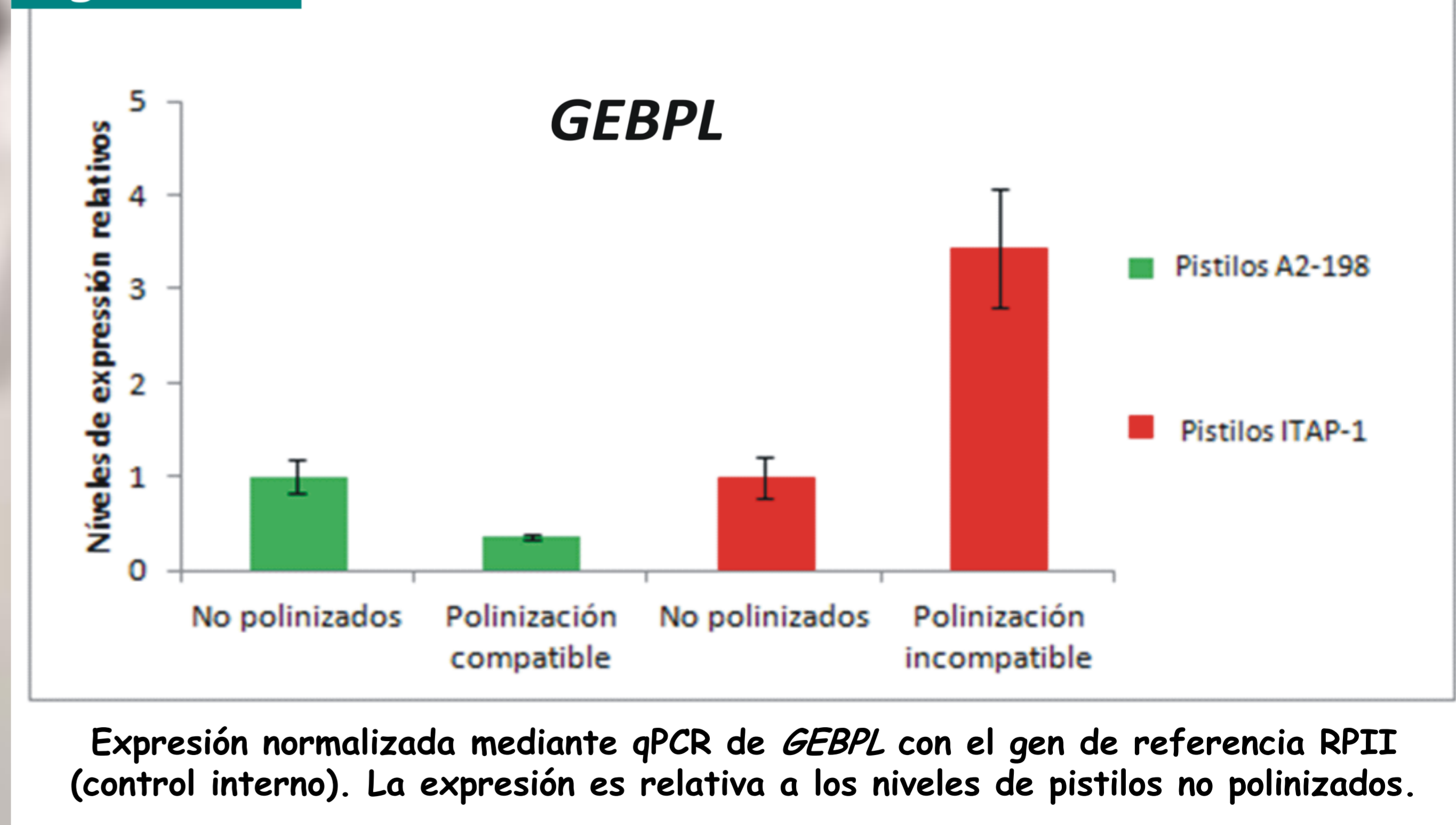


RESULTADOS Y CONCLUSIÓN

Mediante qPCR, y utilizando los primers específicos diseñados en este trabajo (Primer forward: 5'-ATGGCACCCAAGCGCC-3'; Primer reverse: 5'-CTAATGCTCAGATGACTTTAACGCC-3'), se obtuvieron los perfiles de expresión del gen *GEBPL* en distintas muestras de pistilos (Figura 2). Como puede observarse en esta figura, tras la polinización compatible (A2-198 x A2-198) disminuye la expresión de *GEBPL*, en cambio tras la polinización incompatible (ITAP-1 x A2-198) aumenta su expresión. Estos resultados apoyan la hipótesis de la implicación del gen candidato *GEBPL* en el sistema de incompatibilidad floral del almendro.

Partiendo de estos resultados, son necesarios futuros análisis complementarios que nos permitan conocer la función de *GEBPL* en el mecanismo responsable de la (in)compatibilidad floral, ya que hasta la fecha este gen sólo ha sido asociado en *Prunus* sp. con la iniciación de los tricomas en la epidermis del fruto (Cao et al., 2016).

Figura 2



BIBLIOGRAFÍA

- Cao et al. (2016) Genome-wide association study of 12 agronomic traits in peach. *Nature Communications*. DOI:10,1038/ncomms13246,
Gómez et al. (2015) iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of pistils and anthers from self-incompatible and self-compatible almonds with the *S_f* haplotype. *Molecular Breeding* 35:120.
Gómez et al. (2016) Transcriptomic analysis of floral incompatible and compatible reactions in *Prunus dulcis*. II ISHS Workshop on Floral Biology and S-Incompatibility in Fruit Species, Murcia, Mayo 2016.