



Sociedad
Española
de **Ciencias**
Hortícolas

97

Septiembre
2024

ACTA DE HORTICULTURA

Comunicaciones Técnicas
Sociedad Española de
Ciencias Hortícolas

XI Congreso Nacional de
Mejora Genética de Plantas

Editores:
Margarita López Corrales
M^a Engracia Guerra Velo
María Ramos García
Antonio Jesús Galán Jiménez

Cáceres, 24-26 de septiembre de 2024

‘Alternative splicing’ como mecanismo de regulación en la expresión de los genes *DAM* en cerezo

N. Martínez-Romera^{1,2}, A. Wünsch^{1,2}, A.P. Gracia^{1,2,3}, M. Girón¹, A. Calle^{1,2,4}, A. Hedhly^{1,2,*}

¹ Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), 50059 Zaragoza, España.

² Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), 50013 Zaragoza, España.

³ Actualmente: Universidad de Zaragoza, Facultad de Veterinaria, 50013 Zaragoza.

⁴ Actualmente: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Fruitcentre, PCiTAL, Parc Agrobiotech Lleida, Parc de Gardeny, Edifici Fruitcentre, 25003 Lleida.

Palabras clave: *Prunus avium*, regulación postranscripcional, dormancia.

Resumen

El cerezo (*Prunus avium* L.) es un frutal de hueso de gran importancia económica que, como otros frutales del género, tiene un periodo de dormancia durante el invierno. En los últimos años, se ha visto que los factores de transcripción *DORMANCY-ASSOCIATED MADS BOX (DAM)* están implicados en la entrada y salida de dormancia, aunque se desconoce con precisión el mecanismo de regulación. En otros frutales de la familia de las Rosáceas (peral, ciruelo) se ha observado que el ‘alternative splicing’ (AS) podría estar implicado en la regulación de la expresión de los genes *DAM*. El objetivo de este trabajo es estudiar el patrón de expresión génica de los seis genes *DAM (DAM 1-6)* descritos en cerezo y elucidar si el AS es un mecanismo implicado en la regulación de estos genes en variedades de diferentes requerimientos de frío y fechas de floración. Para ello, se está analizando la expresión en tres variedades con diferentes requerimientos de frío en una serie temporal que abarca el periodo de reposo desde la formación de las yemas hasta su brotación. Este estudio se realiza mediante una serie de técnicas moleculares, entre ellas la RT-PCR. Resultados preliminares indican una regulación diferencial por AS de la expresión de algunos genes *DAM* en determinados momentos del desarrollo de las yemas. Los resultados obtenidos permitirán ampliar el conocimiento de la regulación génica que subyace la dormancia en cerezo, siendo esta información de interés para la selección de cultivares más resilientes y adaptados a los escenarios de inviernos más cálidos a los que se enfrenta la agricultura debido al cambio climático.

INTRODUCCIÓN

El cerezo (*Prunus avium* L.) es un frutal de hueso de gran importancia económica. En 2022 su producción mundial fue de 2,7 millones de toneladas en un área cosechada de 450.000 hectáreas, siendo España el sexto productor a nivel mundial con una producción de 110.000 toneladas (FAOSTAT, 2024). El cerezo, como otros frutales de hueso dentro del género, se caracteriza por poseer un periodo de dormancia como mecanismo de adaptación al frío invernal (Vimont et al., 2019), donde el crecimiento de sus yemas se detiene en los periodos más fríos del año. Este carácter es fundamental tanto para la producción y el correcto desarrollo del fruto como para la adaptación a distintas zonas climáticas (Cooke et al., 2012). Por este motivo, en los últimos años se han realizado numerosos estudios centrados en la genética, genómica y transcriptómica de la dormancia en distintas especies de frutales (Anderson, 2015; Vimont et al., 2019). Sin embargo, todavía no está claro cómo se regula este proceso.

En cerezo, se han identificado QTLs para fecha de floración y requerimientos de frío y se han identificado genes candidatos (Calle et al., 2020; Castède et al., 2015, 2014), entre los cuales se ha confirmado que los genes *DAM* parecen tener un papel relevante en este periodo de letargo (Goeckeritz and Hollender, 2021). En cerezo, se han identificado seis genes *DAMs (PavDAMI-6)* relacionados con la regulación de la dormancia (Wang et al., 2020; Calle et al. 2021). La implicación de los genes

DAM en el género *Prunus* fue identificada a partir de un genotipo de melocotonero ('Evergrowing') que no entra en reposo por delección en 4 de los 6 genes *DAM* (Bielenberg et al., 2008, 2004). Estos genes son homólogos al gen 'SHORT VEGETATIVE PHASE' (*SVP*) de *Arabidopsis*, el cual actúa junto a 'FLOWERING LOCUS C' (*FLC*) para regular negativamente a *FT* y *SOC1* y suprimir la floración (Searle et al., 2006). En la variedad local 'Cristobalina', que es autocompatible y presenta bajos requerimientos de frío y floración extra temprana, se han identificado mutaciones estructurales, SNPs e indels en la región de los genes *PavDAM*. Estas mutaciones son únicas en este genotipo, y están correlacionados con la floración temprana en las descendencias de esta variedad (Calle et al., 2021), pudiendo estar asociadas a una expresión diferencial de estos genes en esta variedad.

El 'alternative splicing' AS es un mecanismo de regulación postranscripcional donde se sintetizan varios transcritos de una misma secuencia génica. En plantas, estos mecanismos se han relacionado con la regulación de la respuesta frente estreses bióticos y abióticos, en la regulación de la floración e incluso en la regulación del reloj circadiano (Szakonyi and Duque, 2018). El AS ha sido observado como mecanismo de regulación de los genes *DAM* en peral y ciruelo (Li et al., 2021; Quesada-Traver et al., 2020). El objetivo de este trabajo es investigar si el AS puede estar involucrado en la regulación de la expresión de los genes *PavDAM* en genotipos con fenotipos diferenciados (altos vs bajos requerimientos de frío) de cerezo. En este trabajo se presentan resultados preliminares obtenidos en el estudio de la expresión de genes *DAM* en una serie temporal desde la entrada hasta la salida de dormancia en tres variedades de cereza (incluida 'Cristobalina'), con requerimientos de frío y salida de dormancia diferente, y su posible regulación mediante AS.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal utilizado fueron yemas reproductivas de tres variedades de cerezo ('Cristobalina', 'Burlat' y 'Vic') que tienen distintos requerimientos de frío, y que fueron recogidas durante el periodo que abarca la entrada y salida de dormancia, desde octubre a febrero. Se recogieron muestras de cada variedad en siete fechas durante 2019 y 2020 (29/10, 26/11, 13/12, 03/01, 20/01, 06/02 y 20/02) por triplicado. 'Cristobalina' fue la variedad más temprana en salir del reposo, seguida de 'Burlat' con necesidades intermedias de frío y 'Vic' con altas necesidades de frío (resultados no presentados).

A partir de las yemas recogidas, se extrajo RNA utilizando el kit 'RNeasy Plant Mini Kit' (Qiagen). La calidad y cantidad de RNA fue cuantificada mediante espectrofotometría (Nanodrop, Thermo Fisher). A partir del RNA se sintetizó DNAc (DNA complementario) mediante transcripción reversa utilizando el kit 'High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit' (Applied Biosystems). El DNAc obtenido fue amplificado mediante PCR (RT-PCR) con parejas de cebadores diseñados para amplificar cada uno de los 6 genes *DAM* que se han descrito en cerezo (Wang et al., 2020). Los productos de PCR fueron separados y visualizados en geles de agarosa Metaphor al 3%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de investigar si el AS está involucrado como una forma de regular la expresión de los genes *DAM*, en este trabajo se ha analizado la expresión de los genes *PavDAMI-6* en una serie temporal a lo largo del periodo de dormancia en tres variedades de cerezo con diferentes fenotipos de requerimientos de frío. Para ello, se ha realizado un análisis de RT-PCR ('reverse transcription'-PCR) en busca de variaciones en los transcritos en las diferentes variedades y/o puntos de muestreo. Los resultados preliminares indican que podría haber AS en algunos de los genes y algunos de los tiempos. No se observó AS en los genes *DAM-1,2,5* y *6*. Sin embargo, en el gen *DAM-3* se observaron varias bandas en las tres variedades y para todos los puntos temporales, lo que parece indicar una regulación postranscripcional mediante AS para este gen. Además, en el gen *PavDAM-4*, se observa un posible AS en todos los tiempos muestreados, pero sólo en la variedad 'Cristobalina', lo que podría indicar que esta variedad tiene una expresión diferente al resto para este gen. Esta posible diferencia podría estar relacionado con su salida temprana de dormancia. En el trabajo de Calle *et al.* (2021) se observaron mutaciones específicas en la región reguladora del gen *PavDAM-4*.

El AS como mecanismo de regulación en genes *DAMs* también se ha visto en otros cultivos como peral y ciruelo (Li et al., 2021; Quesada-Traver et al., 2020). Los resultados preliminares obtenidos en este trabajo en cerezo apuntan a la posible regulación de la expresión de los genes *DAMs* por AS también en cerezo, y también a una posible incidencia diferencial a lo largo del reposo invernal en función de las necesidades de frío de la variedad. Por este motivo, el AS podría ser un mecanismo importante en la regulación de la dormancia en cerezo.

Este trabajo preliminar es la base para la clonación y secuenciación de los transcritos alternativos con el fin de comprender el mecanismo de AS e identificar con precisión las isoformas y cuantificar su expresión. Se espera que los resultados permitan ayudar a descifrar el complejo mecanismo de regulación de la dormancia.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es parte de los proyectos de I+D+i PID2019-103985RR-I00 financiado por MICIU/AEI /10.13039/501100011033 y PID2022-137105OR-I00, financiado por MICIU/AEI /10.13039/501100011033 y por FEDER, UE, y ayuda PREP2022-000496 financiada por MICIU/AEI /10.13039/501100011033 y por el FSE+

REFERENCIAS

- Anderson, J.V. 2015. *Advances in Plant Dormancy*. Springer International Publishing, Cham.
- Bielenberg, D.G., Wang, Y., Li, Z., Zhebentyayeva, T., Fan, S., Reighard, G.L., Scorza, R., Abbott, 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. Genomes* 4, 495–507.
- Bielenberg, D.G., Wang, Y., Fan, S., Reighard, G.L., Scorza, R., Abbott, A.G. 2004. A deletion affecting several gene candidates is present in the Evergrowing peach mutant. *J. Hered.* 95, 436–444.
- Calle, A., Cai, L., Iezzoni, A., Wünsch, A. 2020. Genetic dissection of bloom time in low chilling sweet cherry (*Prunus avium* L.) using a multi-family QTL approach. *Front. Plant Sci.* 10, 1647.
- Calle, A., Grimplet, J., Le Dantec, L., Wünsch, A. 2021. Identification and characterization of *DAMs* mutations associated with early blooming in sweet cherry, and validation of DNA-based markers for selection. *Front. Plant Sci.* 12, 621491.
- Castède, S., Campoy, J.A., Dantec, L.L., Quero-García, J., Barreneche, T., Wenden, B., Dirlewanger, E. 2015. Mapping of candidate genes involved in bud dormancy and flowering time in sweet cherry (*Prunus avium*). *PLOS ONE* 10, e0143250.
- Castède, S., Campoy, J.A., García, J.Q., Le Dantec, L., Lafargue, M., Barreneche, T., Wenden, B., Dirlewanger, E. 2014. Genetic determinism of phenological traits highly affected by climate change in *Prunus avium*: flowering date dissected into chilling and heat requirements. *New Phytol.* 202, 703–715.
- Cooke, J.E.K., Eriksson, M.E., Junttila, O. 2012. The dynamic nature of bud dormancy in trees: environmental control and molecular mechanisms. *Plant Cell Environ.* 35, 1707–1728.
- FAOSTAT, 2024. “Food and Agriculture Organization of the United Nations.”
- Goeckeritz, C., Hollender, C.A. 2021. There is more to flowering than those *DAM* genes: the biology behind bloom in rosaceous fruit trees. *Curr. Opin. Plant Biol.* 59, 101995.
- Li, J., Yan, X., Ahmad, M., Yu, W., Song, Z., Ni, J., Yang, Q., Teng, Y., Zhang, H., Bai, S. 2021. Alternative splicing of the dormancy-associated *MADS*-box transcription factor gene *PpDAM1* is associated with flower bud dormancy in ‘Dangshansu’ pear (*Pyrus pyrifolia* white pear group). *Plant Physiol. Biochem.* 166, 1096–1108.
- Quesada-Traver, C., Guerrero, B.I., Badenes, M.L., Rodrigo, J., Ríos, G., Lloret, A. 2020. Structure and expression of bud dormancy-associated *MADS*-box genes (*DAM*) in European plum. *Front. Plant Sci.* 11, 1288.

- Searle, I., He, Y., Turck, F., Vincent, C., Fornara, F., Kröber, S., Amasino, R.A., Coupland, G. 2006. The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in Arabidopsis. *Genes Dev.* 20, 898–912.
- Szakonyi, D., Duque, P. 2018. Alternative splicing as a regulator of early plant development. *Front. Plant Sci.* 9, 382146.
- Vimont, N., Fouché, M., Campoy, J.A., Tong, M., Arkoun, M., Yvin, J.-C., Wigge, P.A., Dirlewanger, E., Cortijo, S., Wenden, B. 2019. From bud formation to flowering: transcriptomic state defines the cherry developmental phases of sweet cherry bud dormancy. *BMC Genomics* 20, 974.
- Wang, J., Gao, Z., Li, H., Jiu, S., Qu, Y., Wang, L., Ma, C., Xu, W., Wang, S., Zhang, C. 2020. Dormancy-Associated MADS-Box (*DAM*) Genes Influence Chilling Requirement of Sweet Cherries and Co-Regulate Flower Development with *SOC1* Gene. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 921.