

PROYECTO: GENOMICA DE FRUTALES DE HUESO: SELECCION DE PATRONES Y VARIEDADES DE ALMENDRO CON ALTA CALIDAD DE FRUTO ADAPTADOS AL CAMBIO CLIMATICO

ORGANISMO FINANCIADOR



CONVOCATORIA

Programa Estatal de I+D+I orientada a los Retos de la Sociedad y específicamente dentro del Reto de Seguridad y Calidad Alimentaria, Actividad Agraria Productiva y Sostenible, Sostenibilidad de los Recursos Naturales e Investigación Marina y Marítima del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación, 2013-2016

<https://www.boe.es/boe/dias/2013/11/21/pdfs/BOE-A-2013-12253.pdf>

REFERENCIA

RTA2014-00062

INVESTIGADOR PRINCIPAL

M^a José Rubio Cabetas

EQUIPO DE TRABAJO



- José Manuel Alonso Segura
- M^a Ángeles Sanz García
- Gloria Estopañán
- Ángel Fernandez Martí
- Beatriz Bielsa Pérez
- M^a Teresa Espiau Ramírez



- José Javier Escartín



- Jesús García Brutón
- Ignacio Padiál Ortíz



- Amit Dhingra



- Michelle Wintherson

FECHA INICIO

Septiembre 2015

FECHA FINAL

Septiembre 2019

RESÚMEN DEL PROYECTO

El cultivo del almendro está sufriendo una revolución a nivel mundial. Dentro de esta modernización del cultivo y sus nuevos modelos en intensivo y superintensivo, las obtenciones varietales del programa de mejora de almendro del CITA han respondido de manera satisfactoria. La mayoría de variedades españolas de almendro son de floración muy temprana o temprana, siendo ello un riesgo debido a que en la mayoría de zonas de cultivo la incidencia de las heladas es muy importante, destruyendo muy a menudo la cosecha de estas variedades. Además, como es sabido, las variedades tradicionales españolas son autoincompatibles, por lo que requieren de otra variedad para que actúe como polinizadora. Para ello las dos variedades deben florecer simultáneamente, lo cual no ocurre siempre para un par de variedades, cuyo solape puede variar según las condiciones climáticas del año. Frente a todos estos problemas, el programa de mejora de almendro del CITA ha considerado tanto la autocompatibilidad y la floración tardía dos objetivos básicos. Las posibilidades de obtener descendientes extratardíos son actualmente elevadas. Sin embargo, no sólo la floración tardía es interesante para evitar el daño de las heladas, sino también la propia resistencia a la helada del material vegetal evaluado, diferente en cada variedad y codificada genéticamente. Este carácter reviste una importancia fundamental en relación a la expansión del cultivo hacia el interior, empezando por la difusión de 'Guara' a finales de los años 1980, la cual es en la actualidad la variedad de referencia en todas las zonas productoras de almendro, y, recientemente, con las variedades de floración extra-tardía como 'Diamar' ('Mardía') y 'Vialfas'.

Por otra parte, actualmente la gama de patrones existentes para la Almondicultura moderna no es suficiente para dar respuesta a las distintas condiciones del cultivo. Desde el programa de mejora de patrones del CITA, uno de los objetivos básicos planteados es la combinación de tolerancias a estreses abióticos en nuevos híbridos interespecíficos para obtener portainjertos adaptados a un amplio rango de condiciones edafoclimáticas. La sequía es uno de los principales estreses abióticos con un gran impacto ecológico y socioeconómico, especialmente en cultivos como *Prunus* en nuestro país. Existe una necesidad urgente de identificar portainjertos tolerantes a la sequía que puedan responder a cambios en la disponibilidad de agua. Bajo esta premisa, se estudió la respuesta adaptativa de tolerancia a la sequía en genotipos de *Prunus* mediante tres enfoques: (i) Comprender los mecanismos fisiológicos implicados en el estrés hídrico considerando la eficiencia del uso del agua (EUA) en distintos genotipos; (ii) determinar la inducción bioquímica relacionada con el ácido abscísico (ABA) para establecer relaciones entre las respuestas fisiológicas y bioquímicas; y (iii) elucidar la respuesta genética a niveles transcriptómicos (a corto y largo plazo) y proteómico (a corto plazo) para identificar genes candidatos relacionados con la sequía.

Mediante el estudio fenotípico del contenido foliar en cenizas y la discriminación del isótopo de Carbono 13 ($\Delta^{13}C$), relacionados negativamente con el EUA, se ha conseguido identificar seis especies silvestres de *Prunus* con el mejor EUA de un total de 48 genotipos de *Prunus*.

Se determinó la respuesta de 'Garnem' y de otros genotipos híbridos evidenciándose los diferentes mecanismos de evitación a la sequía presentes que permiten mantener el contenido hídrico, a pesar de la disminución del potencial hídrico foliar (LWP). Además, se confirmó la respuesta bioquímica producida a las 24 h mediante la acumulación foliar de ácido abscísico (ABA), ratificando el papel clave de dicha fitohormona en la respuesta a la sequía, y específicamente, en la regulación estomática en 'Garnem'.

Por otro lado, se han podido comprobar las diferencias de comportamiento existentes entre la respuesta a estrés hídrico en condiciones controladas y en campo. Aunque se produce una respuesta fisiológica similar, los árboles no experimentaron un nivel de estrés severo necesario para desencadenar una respuesta bioquímica basada en la producción de ABA.

El estudio molecular se realizó mediante cuatro enfoques diferentes. En primer lugar, el análisis de las regiones promotoras de dos genes relacionados con la sequía, *PpDhn2* y *DREB2B* reveló el importante

papel de los elementos *cis* identificados no solo en la sequía, sino también su posible implicación en el estrés a las bajas temperaturas. Además, se realizó el estudio filogenético en una colección de *Prunus*.

En segundo lugar, con el análisis transcriptómico en raíz de 'Garnem' sometido a estrés hídrico, se han identificado genes involucrados en las cascadas de señalización y control transcripcional, genes osmoprotectores y los genes implicados en el transporte de agua e iones.

En tercer lugar, el análisis proteómico reveló cambios significativos en los niveles de abundancia de una serie de proteínas en raíz de 'Garnem' a las 24 h de estrés. De las cuales, 15 fueron identificadas en diferentes procesos biológicos, descritos en el análisis transcriptómico.

Finalmente, mediante un análisis con microsatélites (SSRs) en cuatro progenies híbridas, se identificó una región genómica específica de almendro diferente de melocotón y ciruelo. Esta región podrá ser útil a nivel de genómica comparativa para identificar genes de interés codificados por el almendro.

Este estudio molecular ha permitido elegir ocho genes candidatos para la selección de portainjertos *Prunus* tolerantes a la sequía. Estos fueron el gen de la proteína LEA, los genes *PpDhn1*, *PpDhn2* y *DREB2B*, además de los DEGs: *ERF023*; *LRR receptor-like serine/threoninekinase ERECTA* y *NF-YB3*, por su relación con el mejor UEA; y finalmente el DEG *Myb44*, represor de la fosfatasa *PPC2*, validado mediante RT-qPCR.

En general, estos resultados pueden contribuir a mejorar el conocimiento existente sobre los cambios fisiológicos, bioquímicos y moleculares en respuesta a la sequía. La comprensión de las estrategias de evitación y tolerancia será de ayuda para la propuesta de nuevos retos en la mejora de la tolerancia a la sequía en portainjertos *Prunus*.

PUBLICACIONES CIENTÍFICO-TÉCNICAS

- Bielsa B, Lleida C, Rubio-Cabetas MJ. 2016 Physiological characterization of drought stress response and expression of two transcription factors and two LEA genes in three *Prunus* genotypes. *Scientia Horticulturae.*, 213, 260-269, <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304423816305659>
- Badenes ML, Fernandez i Marti A, Ríos G, Rubio-Cabetas MJ. 2016. Application of Genomic Technologies to the Breeding of Trees. *Front. Genet.* 7:198. doi: 10.3389/fgene.2016.00198. <http://hdl.handle.net/10532/3523>
- Bielsa B, Bassett C, Glenn DM, Rubio-Cabetas MJ. 2018. Assessing field *Prunus* genotypes for drought responsive potential by Carbon isotope discrimination and promoter analysis - *Agronomy.* 8(4), 42. <http://hdl.handle.net/10532/4034>
- Socias i Company R, Estopañan G, Juan T, Alonso JM, Kodad O. 2018. Aspectos cualitativos de las composiciones de los cultivares de almendro de Mallorca (España). *ITEA Inf. Tec. Econ. Agrar.* 114 (1), 17 - 32. <http://hdl.handle.net/10532/3975>
- Rubio-Cabetas MJ, Pons C, Bielsa B, Amador ML, Marti C and Granell A. 2018. Performed and induced mechanisms underlies the differential responses of *Prunus* rootstock to hypoxia *Journal of Plant Physiology.* 228, 134-149. <http://hdl.handle.net/10532/4076>
- Kodad O, Socias i Company R, Alonso Segura, JM. 2018. Genotypic and environmental effects on tocopherol content in almond. *Antioxidants.* 7(1),6, <http://hdl.handle.net/10532/3971>
- Bielsa B, Hewitt S, Reyes-Chin-Wo S, Dhingra A, Rubio-Cabetas MJ. 2018. Identification of water use efficiency related genes in 'Garnem' almond-peach rootstock using time-course transcriptome analysis. *PLoS ONE* 13(10): e0205493. <http://hdl.handle.net/10532/4255>
- Bielsa B, Garcia-Brunton J, Sanz MA, Rubio-Cabetas MJ. Caracterización de la respuesta adaptativa a sequía de dos cultivares de melocotonero en condiciones de aridez. *ITEA- Inf. Tec. Econ. Agrar.* (En prensa), Vol. xx: 1-19 <http://hdl.handle.net/10532/4662>
- Bielsa B, Sanz MA, Rubio-Cabetas MJ. Uncovering early response to drought by proteomic, physiological and biochemical changes in the almond × peach rootstock 'Garnem' *Functional Plant Biology*(En prensa) <http://www.publish.csiro.au/FP/justaccepted/FP19050>
- Alioto T, Alexiou KG, Bardil A, Barteri F, Castanera R, Cruz F, Dhingra A, Duval H, Fernández i Martí A, Frias L, Galán B, Garcia JL, Howad W, Gómez- Garrido J, Gut M, Julca I, Morata; J, Puigdomènech P, Ribeca P, Rubio-Cabetas MJ, Vlasov A, Wirthensohn M, Garcia- Mas J, Gabaldón T, Casacuberta JM, Arús P. Transposons played a major role in the diversification between the closely related almond and peach genomes: Results from the almond genome sequence. *The Plant Journal.* (En prensa) <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tpj.14538>

ARTÍCULO DE DIVULGACIÓN

- Alonso Segura JM, Rubio-Cabetas MJ, Socias i Company R. 2018. El almendro: diversidad de marcos de plantación. *Agricultura.*1014, pp. 100 - 105. <http://hdl.handle.net/10532/4808>
- Bielsa B, Fernandez i Marti A, Rubio-Cabetas MJ. 2016. Identificación de regiones genómicas de almendro en progenies de híbridos interespecíficos. VIII Congreso de Mejora Genética de Plantas, SECH. Vitoria, España. 12-14 Junio. 2016. *Actas de Horticultura* 74. 2016. Pp 147-148. <http://hdl.handle.net/10532/3340>

- Bielsa B, Rubio-Cabetas MJ. 2018. Caracterización del potencial de tolerancia a sequía en los patrones de Prunus L. 'Garnem' y Mirobolán 'P.2175'. IX Congreso de Mejora Genética de Plantas, SECH. Murcia, España. 18-20 septiembre. Actas de Horticultura 80. 2018. Pp 230-233. <http://hdl.handle.net/10532/4217>
- Bielsa B, Hewitt S, Reyes Chin-Wo S, Dhingra A, Rubio-Cabetas MJ. 2018. Cambios transcriptómicos en la raíz del híbrido almendro x melocotonero 'Garnem' bajo estrés hídrico revelan genes de respuesta y tolerancia a sequía. IX Congreso de Mejora Genética de Plantas, SECH. Murcia, España. 18-20 septiembre. 2018. Actas de Horticultura 80. Pp 234-236. <http://hdl.handle.net/10532/4218>
- Bielsa B, Montesinos A, Rubio-Cabetas MJ, Dodd RS y Fernández i Martí A. 2018. Diversidad y evolución molecular de genes de respuesta a sequía en almendro y otras plantas leñosas. IX Congreso de Mejora Genética de Plantas, SECH. Murcia, España. 18-20 septiembre. Actas de Horticultura 80. 2018. Pp 237-239. <http://hdl.handle.net/10532/4219>
- Arnal, N, Fernandez i Marti A, Rubio-Cabetas MJ. 2018. Role of key-flowering genes in Prunus dwarfing rootstocks. Acta Horticulturae 1219: 133-136. https://www.actahort.org/books/1219/1219_22.htm

LIBROS Y CAPÍTULOS DE LIBRO

- Battle I, Iglesias I, Cantin CM, Badenes ML, Rios G, Ruiz D, Dicenta F, Egea J, Lopez-Corrales M, Guerra ME, Alonso JM, Socias i Company R, Rodrigo J, García Montiel F, García Brunton J. 2018. Frutales de hueso y pepita. En: Influencia del cambio climático en la mejora genética de plantas (García Brunton J, Pérez Tornero O, Cos Terrer JE, Ruiz García L, Sánchez López E.(eds.)) pp: 79-132. Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Sociedad Española de Genética. ISBN 978-84-948233-8-1. <http://hdl.handle.net/10532/4241>
- Rubio-Cabetas MJ, Felipe AJ, Reighard GL. 2017. Rootstock Development, En: Almonds. Botany, Production and Uses. (Socias i Company R, Gradziel TM (eds.)), pp. 209-227. CABI, USA. ISBN978-1-780643540 <https://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20173201050>
- Rubio-Cabetas MJ, Felipe AJ, Bordas M. 2017. Propagation Techniques En: Almonds. Botany, Production and Uses. (Socias i Company R, Gradziel TM (eds.)), pp. 228-239. CABI, USA. ISBN978-1-780643540 <https://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20173201051>

TRABAJOS EN CONGRESOS, CONFERENCIAS... RELACIONADOS CON EL PROYECTO

- Bielsa B, Rubio-Cabetas MJ, Felipe AJ, Gómez-Aparisi J, Socias i Company R. 2015. Rootstock trial of eight GxN interespecific hybrids in almond. XVI Grempa Meeting, 12-14 May 2015 Meknes (Morocco) <http://hdl.handle.net/10532/2960>
- Rubio-Cabetas MJ. 2015. Almond Rootstocks: Overview. XVI Grempa Meeting, 12-14 May 2015 Meknes (Morocco) <http://hdl.handle.net/10532/2959>
- Alioto T, Cruz F, Gómez Garrido J, Frias L, Ribeca P, Alexiou K, Howad W, Morata J, Casacuberta Suñer JM, Rubio-Cabetas MJ, Gut M, Galán B, Garcia JL, Dhingra A, Duval H, Fernández i Martí A, Wirthensohn M, Arús P. A Draft Assembly of the Almond Genome. International Plant & Animal Genome XXIV. January 9-13 2016.San Diego, CA (USA). <http://hdl.handle.net/10532/3175>
- Bielsa B, Fernandez i Marti A, Rubio-Cabetas MJ. Identification of almond genomic regions in four 3-way interspecific hybrid progenies. 8th International Rosaceae Genomics Conference. RGC8 12-14 julio, 2016. Angers (Francia) <http://hdl.handle.net/10532/3316>

Bielsa B, Hewitt S, Maldonado J, Reyes Chin-Wo S, Fernandez i Marti A, Silva H, Dhingra A, Rubio-Cabetas MJ. Transcriptome analysis of 'Garnem' rootstock by RNA-seq reveals genes and gene ontologies involved in drought response. International Plant & Animal Genome XXV. January 13-17 2017. San Diego, CA, (USA). <http://hdl.handle.net/10532/4809>

Bielsa B, Rubio-Cabetas MJ, Dodd RS, Fernandez i Marti A. Diversity and molecular Evolution of different drought responsive genes in almond and several woody plants. VII International Almond Symposium. 2-7 de november 2017 Adelaida (Australia) <http://hdl.handle.net/10532/4810>

Montesinos A, Grimplet J, Fernandez i Marti A, Rubio-Cabetas, MJ. Preliminary study on genes involved in vigor and development in Prunus rootstock-scion interactions. XXVII International Plant & Animal Genome. January 2019 San Diego, CA, EEUU. <http://hdl.handle.net/10532/4807>