

MEJORA GENÉTICA DE PATRONES DE *PRUNUS* RESISTENTES A ESTRESSES ABIÓTICOS: ESTUDIO DE GENES IMPLICADOS EN LA TOLERANCIA A LA ASFIXIA RADICULAR

M. L. Amador y M. J. Rubio-Cabetas

Unidad de Fruticultura. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA)
Carretera de Montañana, 930. 50059 Zaragoza

Palabras clave: anoxia, cDNA, fermentación etanólica, hipoxia, secuencias nucleotídicas.

Resumen

En este trabajo se han realizado estudios comparativos del gen que codifica la enzima Piruvato decarboxilasa (PDC), involucrada en la ruta de la fermentación etanólica, en dos genotipos de *Prunus*, mirobolan (*P. cerasifera*): 'P2175' y el híbrido almendro x melocotonero (*P. amygdalus* x *P. persica*): 'Felinem', tolerante y sensible a la asfixia radicular respectivamente. Una vez sometidos a condiciones de hipoxia y anoxia, el cDNA de ambos genotipos fue amplificado y comparado obteniéndose el extremo 3' terminal, e igualmente se ha realizado el estudio de la actividad enzimática.

INTRODUCCIÓN

Los patrones que mejor se han adaptado a las condiciones mediterráneas han sido los híbridos almendro x melocotonero, (GF-677) y los nuevos híbridos GxN 'Garnem' y 'Felinem' resistentes a nematodos. Posteriormente nuevo material interespecífico ha sido creado involucrando nuevos genotipos de *Prunus* (Rubio-Cabetas et al., 2005) con el fin de introducir resistencias a caracteres abióticos, entre ellos la tolerancia a la asfixia radicular. Este tipo de estrés está generado por el escaso drenaje producido en los suelos pesados o lluvias en épocas desaconsejadas. Como consecuencia de este estrés se genera un ambiente anaerobio alrededor de las raíces que desencadenan una serie de mecanismos que permiten a las plantas sobrevivir durante un cierto tiempo, entre los que destacan la activación de las rutas fermentativas (Liu et al. 2005). La más importante de todas estas vías es la fermentación etanólica, donde actúan dos enzimas: la piruvato decarboxilasa y la alcohol deshidrogenasa. El objetivo de este trabajo es realizar un estudio comparativo del gen de la piruvato decarboxilasa, así como, la medida de la actividad enzimática en dos genotipos diferentes, uno tolerante y otro sensible a la asfixia radicular bajo condiciones de hipoxia y anoxia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plantas propagadas 'in vitro' del híbrido 'Felinem' y 'P.2175' fueron sometidas a condiciones de hipoxia y anoxia. El tratamiento de hipoxia se llevó a cabo aplicando a las plantas a un gas con baja concentración de oxígeno. El experimento de anoxia se hace por medio de cultivo hidropónico al que se le ha eliminado el suministro de oxígeno. Los análisis moleculares se han realizado bajo condiciones de hipoxia en raíces tomadas a diferentes tiempos: 0 horas (tratamiento control), 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 6 horas y 8 horas. El RNA de raíz fue extraído y convertido a cDNA que se amplificó con cebadores diseñados a partir de ESTs de *Prunus* descritos en la base de datos del genoma de Rosaceas. El fragmento obtenido fue analizado mediante BLAST y CLUSTLW2 con el fin de encontrar homologías con las PDC de otras especies y poder determinar el tipo de enzima de esta familia génica al cual pertenece nuestro fragmento.

El extremo 3' se obtuvo después de la amplificación con cebadores diseñados a partir de secuencias homologas de la base de datos ESTree de *Prunus* y posterior secuenciación y alineamiento del fragmento obtenido. La medida de la actividad de este enzima Piruvato decarboxilasa se ha medido tanto en plantas tolerantes como sensibles bajo condiciones de hipoxia y anoxia, para ello se han tomado muestras de raíces a los mismos tiempos mencionados anteriormente. La actividad enzimática se mide mediante el protocolo descrito por Mohanty y Ong (2003) con algunas modificaciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la amplificación inicial del cDNA de ambos genotipos se obtuvo un fragmento de 900 pb. La secuenciación de este fragmento y la comparación con las secuencias presentes en la base de datos revela una mayor homología con la PDC de *Fragaria x ananassa* (Fig. 1). Después de la obtención del extremo 3' se ha obtenido un fragmento de 1776 pb en el caso de 'P.2175' y de 1773 pb de 'Felinem'. La secuencias nucleotídicas y amioacídicas de ambas PDC de cada uno de los dos genotipos fueron comparadas encontrándose diferencias nucleotídicas pero no aminoácidos, lo que implica que la sustitución de nucleótidos en cada una de las secuencias no se traduce en un cambio en los aminoácidos, que permitiría distinguir la función de la proteína en el genotipo tolerante del sensible. La diferencia de la medida de la actividad enzimática se muestra tanto en el genotipo sensible como tolerante. Estos resultados sugieren que la diferencia entre Mirobolan 'P.2175' y el híbrido 'Felinem' se encuentra en el grado de expresión de la PDC en cada uno de ellos, que será analizado con la Real Time-PCR.

REFERENCIAS

Liu, F., Vantoai, L., Moy, P. M., Bock., G, Linford, L.D., Quackenbus, J. 2005. Global transcription profiling reveals comprehensive insights into hypoxic response in Arabidopsis. *Plant Physiology* 137: 1115-1129.

Mohanty B., and Ong B. 2003. Contrasting Effects of Submergence in Light and Dark on Pyruvate Decarboxylase Activity in Roots of Rice Line Differing in Submergence Tolerance. *Annals of Botany* 91: 291-300.

Rubio-Cabetas, M.J.; Gomez Aparisi, J.; Xiloyannis, C.; Dichio, B.; Tuzio, A.C. ; Kleinhentz, M.; Esmenjaud, D. 2005. Valoración de nuevas selecciones de portainjertos de melocotonero resistentes a los nematodos agalladores. *Fruticultura Profesional*. N 152. Especial Melocotonero III. 53-58.

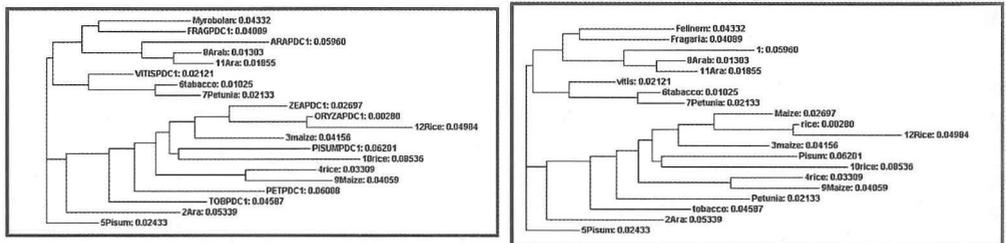


Figura 1. Árbol filogenético de la Piruvato decarboxilasa de Mirobolan 'P2175' y el híbrido 'Felinem', mostrando una mayor homología con la piruvato de la *Fragaria x ananassa*