



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<sup>a</sup> Engracia Guerra Velo**  
**María Ramos García**  
**Antonio Jesús Galán Jiménez**

**Cáceres, 24-26 de septiembre de 2024**

# Incompatibilidad polen-pistilo en ciruelo japonés: avances metodológicos para la identificación de los alelos *S*

A. Torres <sup>1,2\*</sup>, M. E. Guerra <sup>3</sup>, J. Rodrigo <sup>1,2</sup> y A. Hedhly <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciencia Vegetal, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Zaragoza.

<sup>2</sup> Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Zaragoza;

<sup>3</sup> Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX) Finca La Orden, Badajoz.

\*Autor para correspondencia: adlmtorres@cita-aragon.es

**Palabras claves:** *Prunus salicina*, clonación, secuenciación, *S-RNasas*, *SFB*.

**Resumen** El ciruelo japonés (híbridos de *Prunus salicina* Lindl.) presenta un sistema de incompatibilidad gametofítico que impide la autofecundación y favorece la polinización cruzada. Este sistema está regulado por el locus multi-alélico *S*, formado por dos genes estrechamente ligados, uno expresado en el pistilo (*S-RNasa*) y otro en el polen (*SFB*). La identificación de los alelos *S* de incompatibilidad es fundamental para conocer las necesidades de polinización de cada variedad y la idoneidad de los parentales en programas de mejora. En las últimas décadas, los alelos *S* se han identificado por amplificación de PCR de intrones con cebadores degenerados diseñados en regiones conservadas en los exones de los genes *S-RNasa* y la posterior identificación por tamaño de bandas. Sin embargo, esta metodología no es lo suficientemente precisa para aquellos genes que se diferencian con poco polimorfismo de longitud. Para diferenciar los alelos de tamaño similar, se ha recurrido a la clonación de los genes *SFB* y *S-RNasa* seguida por secuenciación Sanger. Aprovechando el abaratamiento de los métodos de secuenciación masiva de nueva generación (NGS), hemos desarrollado una metodología bioinformática que nos ha permitido identificar de forma más precisa los alelos *S* que no se podían diferenciar con los métodos anteriores. En este trabajo se han identificado los alelos *S* en las variedades de ciruelo japonés ‘Joana Red’ y ‘Ambra’ tanto por tamaño de bandas como por clonación y/o NGS. Las tres técnicas se han revelado complementarias, permitiendo la determinación del genotipo *S* y su agrupación inequívoca en el correspondiente grupo de incompatibilidad.

## INTRODUCCIÓN

El ciruelo japonés está conformado por variedades puras de *P. salicina* Lindl. e híbridos de *P. salicina* con otras especies de *Prunus* (Guerra & Rodrigo, 2015), y presenta un sistema de incompatibilidad gametofítica (GSI) que previene la autofecundación y promueve la polinización cruzada (De Nettancourt, 2001). Este sistema de incompatibilidad está regulado por un locus *S* multi-alélico, formado por dos genes estrechamente ligados: el gen de la ribonucleasa *S-RNasa*, que se expresa en el pistilo y determina su especificidad (Tao et al., 1999), y el gen de la proteína *SFB* con una caja F, que determina la especificidad del polen (Ushijima et al., 2003). Este mecanismo condiciona tanto la auto(in)compatibilidad de cada variedad como las relaciones de incompatibilidad entre variedades, ya que las variedades auto-incompatibles con el mismo genotipo *S* son incompatibles entre sí, siendo necesario el cruce con otras variedades compatibles para fructificar (Herrera et al., 2021).

Inicialmente, los métodos para caracterizar la reacción de incompatibilidad implicaban la polinización manual y la observación del crecimiento de los tubos polínicos bajo un microscopio de fluorescencia. Posteriormente, la identificación de los alelos *S-RNasa* y *SFB* por clonación y secuenciación de los genes permitió obtener las primeras secuencias del alelo *S*, a partir de las cuales se desarrollaron diferentes técnicas de PCR (Halász et al., 2006; Yamane & Tao, 2009). Asimismo, para determinar el haplotipo *S* se diseñaron cebadores degenerados trans-específicos que permitieron la identificación de los alelos por tamaño de bandas amplificadas por PCR y que reflejaban el polimorfismo de longitud

de los 2 intrones de la *S*-RNasa. Hasta la fecha se han descrito 57 alelos *S* (42 *S*-RNasa y 15 *SFB*) (Hedhly et al., 2023), lo que ha permitido asignar más de 200 variedades a 26 grupos de incompatibilidad (Guerra & Rodrigo, 2015). Los últimos avances en las técnicas de secuenciación del genoma completo mediante secuenciación de nueva generación (NGS) están abriendo nuevas vías y enfoques para el desarrollo de procedimientos de genotipado *S* (Genete et al., 2020).

En este trabajo se han identificado los alelos *S* en 'Joana Red' y 'Ambra' para comparar el avance de las metodologías tanto por tamaño de bandas como por clonación y NGS para la determinación de su genotipo *S*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se extrajo ADN de hojas jóvenes de las variedades 'Joana Red' y 'Ambra'. Para el material vegetal procedente de La Orden, Badajoz (CICYTEX) se utilizó el kit comercial Speedtools (Biotools, Madrid, España) y para el material vegetal procedente de La Almunia, Zaragoza (Viveros Mariano Soria) se utilizó DNeasy (Plant Mini Kit, Qiagen, Hilden, Alemania) con una modificación en los primeros pasos con CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) para la precipitación de los ácidos nucleicos.

### Determinación de Alelos *S* por Tamaño de Bandas

Las reacciones de PCR para identificar *S*-RNasas por electroforesis se realizaron en un volumen de 20 µl por muestra, que contenía 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM dNTP, 0,2 µM de cada cebador y 0,5 U de la ADN polimerasa *Taq* DNA Polymerase native (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EE. UU.). La amplificación se realizó como está descrito en Tao et al. (1999) y se usaron los cebadores Pru-C2 y Pru-C5rev. Se separaron los fragmentos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5%.

### Determinación de Alelos *S* por Clonación

Se realizaron las reacciones de PCR para la clonación de las *S*-RNasas y *SFBs* en un volumen de 50 µl, con las concentraciones descritas en el apartado anterior y las mismas condiciones del termociclador para *S*-RNasa. La amplificación de los *SFBs* se llevó a cabo como está descrito en Zhang et al. (2007) y se usaron los cebadores PsSFB-F1 y PsSFB-R1. Los fragmentos correspondientes a los alelos se purificaron utilizando FavorPrep Gel/PCR (Favorgen Biotech Corporation, Ping-Tung, Taiwán). La clonación se realizó utilizando CloneJET PCR Cloning Kit con células competentes DH10B (Thermo Scientific, St Leon-Rot, Alemania). Se secuenciaron por secuenciación Sanger y el análisis de secuencias se realizó con el software Geneious Prime 2024.0.5.

### Next -Generation Sequencing (NGS) y Reconstrucción del Locus *S*

El ADN extraído (50-200 ng/µL) se utilizó para secuenciar con el sistema Illumina NovaSeq 6000 a 100x de cobertura usando 150-pb de lecturas finales emparejadas. Las secuencias obtenidas se filtraron contra una base de datos de *Prunus S*-loci (1374 secuencias seleccionadas de *Prunus S*-RNasa y *SFB*) utilizando el algoritmo 'kmerRefFilter' (Genete et al., 2020). Se retuvieron solo las lecturas coincidentes con secuencias de los loci *S* del género *Prunus*. Las lecturas genómicas filtradas de cada cultivar se ensamblaron *de novo* utilizando Spades y VelvetOptimiser y se analizaron en Geneious Prime. Se realizó un análisis BLAST y se identificaron los 4 alelos de cada genotipo, y se retuvo aquellas secuencias ensambladas con alta similitud a secuencias depositadas en el NCBI. Los alineamientos de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos se llevaron a cabo con Clustal Omega 1.2.2.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para confirmar los genotipos obtenidos anteriormente utilizando combinaciones de cebadores degenerados 'Joana Red' (*SrSs*) y 'Ambra' (*SbSo*) (Guerra et al., 2009), en este trabajo se clonó y se

secuenció por el método Sanger muestras de ambas variedades. Se obtuvieron secuencias parciales de los alelos SFBc/SFBc (Figura 1) y *Sc*-SRN en ‘Joana Red’, y solo el alelo *SFBb* en ‘Ambra’. Los alelos obtenidos en ‘Joana Red’ no coinciden con el genotipado realizado por polimorfismo de bandas, lo que puede deberse a errores en la denominación del material vegetal en las distintas plantaciones o la existencia de homonimias (Guerra et al., 2009), ya que las muestras utilizadas en ambos trabajos son de diferente procedencia [La Almunia, Zaragoza, en este trabajo, y de La Orden (CICYTEX, Badajoz en (Guerra et al., 2009)]. Para abordar esta discrepancia, se secuenció el genoma de las dos variedades en material procedente de La Orden, y se determinó su genotipo ensamblando *de novo* los alelos de auto-incompatibilidad. Las secuencias de alelos *S* obtenidas en ‘Joana Red’ representan alelos con secuencias no descritas anteriormente, y por tanto confirman el genotipo de ‘Joana Red’ - La Orden como *SrSs* (Guerra et al., 2009). Estas secuencias tienen alta similitud con alelos *S* de otras especies de *Prunus* como haplotipo 3 en *P. persica* (*SFB3*), los haplotipos 5 y 11 en *P. armeniaca* (*SFB11*, *SFB5*), el haplotipo 12 en *P. cerasifera* (*S12*-RNasa), y el haplotipo 16 en *P. tenella* (*SFB16*). El hecho de que el genotipo ‘Joana Red’ - La Orden difiere del genotipo de ‘Joana Red’ - Zaragoza establecido por secuenciación Sanger indica que se trata de homonimias y no son la misma variedad. Por otro lado, en ‘Ambra’, se obtuvo los haplotipos *SbSe*, confirmando solamente uno de los dos alelos descritos anteriormente (*Sb*).

Estos resultados han puesto en evidencia algunos inconvenientes del método tradicional de genotipado por PCR-electroforesis, así como de la clonación y secuenciación Sanger de alelos *S*. Así como los pro y contras de cada una de las técnicas utilizadas para genotipado. Las tres técnicas utilizadas en ‘Joana Red’ y ‘Ambra’ se han revelado complementarias y su efectividad depende de factores como el origen del material vegetal, y la disponibilidad en la base de datos de secuencias similares en el género *Prunus*.

### **Agradecimientos**

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PID2020-115473RR-I00 financiado por MICIU/AEI/10.13039/501100011033/ y el Gobierno de Aragón – Fondo Social Europeo, “El FSE invierte en tu futuro” [Grupo Consolidado A12–17R]

### **Referencias**

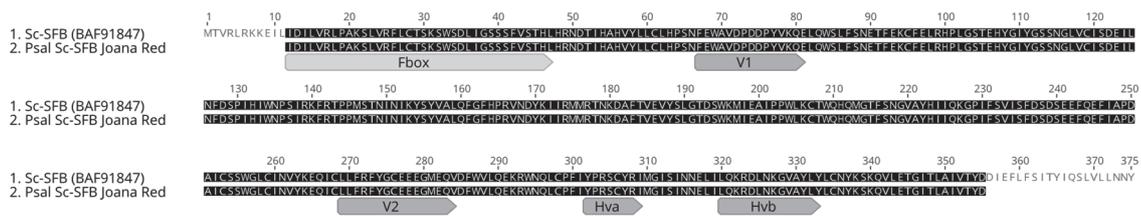
- De Nettancourt. 2001. Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants. Springer-Verlag, Berlin.
- Genete, M, Castric, V., Vekemans, X. (2020). Genotyping and *de novo* discovery of allelic variants at the brassicaceae self-incompatibility locus from short-read sequencing data. *Mol Biol Evol*; 37. doi:10.1093/molbev/msz258.
- Guerra, M.E. & Rodrigo, J. 2015. Japanese plum pollination: A review. *Scientia Horticulturae*. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.10.032.
- Guerra, M.E., Rodrigo, J., López-Corrales, M. & Wunsch, A. (2009). S-RNase genotyping and incompatibility group assignment by PCR and pollination experiments in Japanese plum. *Plant Breeding* 128(3):304 – 311. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2008.01552.x>
- Halász, J. & Hegedüs, A. 2006. A critical evaluation of methods used for S-genotyping: From trees to DNA level. *Int. J. Hortic. Sci.* 2006, 12, 19–29.
- Hedhly, A., Guerra, M.E., Grimplet, J. & Rodrigo, J. 2023. S-Locus Genotyping in Japanese Plum by High Throughput Sequencing Using a Synthetic S-Loci Reference Sequence. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 3932. <https://doi.org/10.3390/ijms24043932>
- Herrera, S., Hormaza, J. I., Lora, J., Ylla, G. & Rodrigo, J. (2021). Molecular characterization of genetic diversity un apricot cultivars: current situation and future perspectives. *Agronomy*, 11(9), 1714.

Tao, R., Yamane, H., Sugiura, A., Murayama, H., Sassa, H., & Mori, H. (1999). Molecular typing of S-alleles through identification, characterization and cDNA cloning for S-RNases in sweet cherry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124, 224-233.

Ushijima, K., Sassa, H., Dandekar, A. M., Gradziel, T.M. Tao, R. & Hirano, H. (2003). Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: Identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism. *The Plant Cell*, 15, 771-781.

Yamane, H. & Tao, R. (2009). Molecular Basis of Self-(in)compatibility and Current Status of S-genotyping in Rosaceous Fruit Trees. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 2009, 78, 137–157.

Zhang, S.-L., S.-X. Huang, H. Kita Shiba, & T. Nishio. (2007). Identification of S-haplotype-specific F-box in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). *Sex. Plant Reprod.* 20:1–8.



**Figura 1.** Clonación del alelo SFBc de ‘Joana Red’. La secuencia está alineada con la secuencia SFBc (BAF91847). Están representadas las regiones F-box, variables (V1, V2) e hipervariables (Hva, Hvb).