

## **Relación entre cascadas inmunitarias dependientes de ácido salicílico y el principal locus de control genético de la apirenia en la vid**

C. Royo<sup>1</sup>, P. Carbonell-Bejerano<sup>1</sup>, N. Diestro<sup>1</sup>, R. Torres-Pérez<sup>1</sup>, J.A. Cabezas<sup>2</sup>, M. Tornel<sup>3</sup>, J. Carreño<sup>3</sup> y J.M. Martínez-Zapater<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV), CSIC-UR-CAR, Finca La Grajera, Ctra. de Burgos Km. 6, 26007 Logroño (La Rioja). Email: carolina.royo@icvv.es

<sup>2</sup> Centro de Investigación Forestal (CIFOR), INIA-UPM, Madrid

<sup>3</sup> Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), ITUM, La Alberca (Murcia)

### **Resumen**

La estenospermocarpia determinada por el locus *SdI* es el principal origen de uva sin semilla para el mercado de la uva de mesa. A pesar de la identificación previa del locus *SdI*, la variación genética responsable y los mecanismos moleculares relacionados no se conocen completamente. El análisis de QTL en una progenie F<sub>1</sub> de ‘Red Globe’ (RG) x ‘Crimson Seedless’ (CS) de 282 individuos identificó el locus *SdI*, localizado en el grupo de ligamiento 18 (LG 18), como el QTL con efecto mayor para el rasgo de la apirenia, explicando entre 71-83 % de la variación en peso seco de las semillas en los tres años analizados. Con el fin de delimitar al máximo la posición de este locus, realizamos un rastreo de individuos recombinantes en la progenie RGxCS entre los marcadores delimitantes del QTL *SdI*. Mediante el genotipado con SNP de estos individuos, pudimos mapear la posición del locus en una región de 1.6 Mb. Adicionalmente, el mapeo fino realizado en una progenie F<sub>1</sub> de ‘Napoleon’ (NA) x CS permitió restringir la posición de *SdI* a un intervalo de 380 kb. Para comprender la naturaleza del locus *SdI*, se realizó un análisis transcriptómico comparando individuos con semillas y apirenos en la progenie F<sub>1</sub> RGxCS que fueron seleccionados de acuerdo a su correspondiente genotipo en el QTL *SdI*. Mediante un análisis de RNA-seq se comparó el transcriptoma de esbozos y semillas extraídos de frutos en estadio guisante. Estos análisis pusieron de manifiesto la activación de respuestas a patógenos en los genes inducidos en los esbozos de los individuos apirenos. Entre ellos, un gen localizado en la zona del QTL se halló altamente inducido y de manera alelo-específica. Este gen muestra similitud con receptores inmunes que en otras especies de plantas desencadenan respuestas de defensa a través de la síntesis de ácido salicílico (SA). De hecho, los niveles de SA fueron significativamente mayores en los esbozos de individuos apirenos respecto a las semillas. Estos resultados sugieren la participación de respuestas autoinmunes mediadas por SA en el aborto de semillas responsables de la apirenia determinada por el locus *SdI*.

**Palabras clave:** Estenospermocarpia, *Vitis vinifera*, respuesta a patógenos.

### **INTRODUCCIÓN**

La apirenia es un rasgo muy apreciado en cultivares destinados a la producción de uva de mesa o pasas. Hay dos clases de apirenia (Stout, 1936), partenocarpia y

estenospermocarpia. En la partenocarpia no se inicia el desarrollo de la semilla, produciendo frutos pequeños principalmente destinados al mercado de las pasas. La estenospermocarpia produce frutos de tamaño adecuado para su consumo como uva de mesa y se caracteriza por la detención del desarrollo de las semillas y embriones, y la degeneración del endospermo, produciendo esbozos. La mayoría de variedades apirenas comerciales son descendientes de ‘Sultanina’ de quien han heredado la estenospermocarpia determinada por el locus *SdI* (*Seed development Inhibitor*) localizado en el LG 18 (Cabezas et al., 2006). Sin embargo, la variación genética responsable todavía se desconoce. Con el objetivo de identificar las posibles mutaciones que causan la apirenia se delimitó el QTL *SdI* mediante un mapeo fino en dos progenies procedentes de cruzamientos con el cultivar CS, descendiente de ‘Sultanina’, y paralelamente, se diseñó una comparación transcriptómica para caracterizar el proceso y detectar genes candidatos.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Material vegetal**

El material de partida fueron dos progenies F<sub>1</sub> (RGxCS de 282 individuos y NAXCS de 250), ambas ubicadas en la finca ‘Cuatro vientos’ de ITUM (Blanca, Murcia). Las progenies y los parentales estaban formados en parral sobre pie franco.

### **Análisis fenotípico**

Durante tres años (2007-2009) se registró el peso seco de las semillas por baya y se evaluó cualitativamente la apirenia en la progenie de RGxCS. El año 2012 se fenotipó cualitativamente la apirenia en la progenie de NAXCS.

### **Análisis de QTL**

En la progenie RGxCS se obtuvo el genotipo de 82 marcadores SSR y 102 SNP con los que se construyeron mapas genéticos. Esto, junto a los datos de fenotipo descritos se utilizó para realizar un análisis de QTL sobre los datos de fenotipo descritos.

### **Mapeo fino**

En primer lugar se designaron marcadores 1.7 y 1.6 Mb aguas arriba y aguas abajo, respectivamente, del marcador VMC7F2 ligado al locus *SdI*. Cada marcador contenía una diana de restricción asociada al alelo del locus *SdI* ligado a la apirenia. Posteriormente se rastreó la zona acotada secuenciando marcadores SNP internos.

### **Análisis transcriptómico**

Se realizó un análisis de RNA-seq comparando semillas y esbozos seminales en desarrollo (extraídos de frutos en desarrollo de 10-12 mm) de individuos de la progenie F<sub>1</sub> RGxCS seleccionados según su fenotipo de apirenia/semilla y el genotipo del locus *SdI* procedente de CS correspondiente al grupo fenotípico. En la medida de lo posible, se trató de seleccionar individuos que compartiesen el mismo alelo procedente de RG para poder identificar polimorfismos específicos del alelo de la apirenia en el locus *SdI*. Se compararon tres individuos con semilla frente a tres apirenos. Se obtuvo RNA de semillas y esbozos usando el kit RNeasy de QIAGEN. Para la secuenciación de RNA se construyeron genotecas de cDNA independientes para cada individuo y fueron secuenciadas en lecturas de 100 pb emparejadas. En el análisis de expresión diferencial y la búsqueda de polimorfismos de secuencia entre individuos con semilla y apirenos se utilizó el protocolo de análisis desarrollado por nuestro grupo para tales fines (Royo et al., 2016).

### **Cuantificación de SA**

Se cuantificaron los niveles de SA en semillas y esbozos de individuos de la progenie seleccionados del mismo modo y en el mismo estado de desarrollo que para el RNA-seq. Además, se analizaron esbozos del progenitor CS y semillas del progenitor RG. La cuantificación se realizó en el Servicio de Análisis de Hormonas Vegetales del IBMCP.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Variación fenotípica y control genético de apirenia en la progenie de RGxCS**

La presencia/ausencia de semillas en las progenies RGxCS y NAxCS fue del 50 % aproximadamente. En la progenie RGxCS se localizó un QTL de efecto mayor en el LG 18 que coincide con el locus *SdI* descrito anteriormente y que explicó entre 72-81 % de la variación en el peso seco de semillas.

Mapeando la recombinación en individuos de la progenie RGxCS recombinantes en torno al locus *SdI*, se acotó el locus a un intervalo de 1.6 Mb entre los marcadores diseñados en las posiciones chr18:25247035 y chr18:26938045 (Fig.1). Para delimitar más finamente la mutación, se realizó otro mapeo de recombinación en la progenie NAxCS, restringiendo el locus *SdI* a 380 kb (Fig.1).

### **Identificación de posibles genes y mutaciones responsables de la apirenia**

Un análisis de RNA-seq identificó 3057 genes con expresión diferencial entre semillas y esbozos (cambio >2 veces y FDR <5 % en EdgeR), con 2426 genes inducidos en esbozos y 631 reprimidos. Entre los genes inducidos en esbozo destaca el enriquecimiento de genes con funciones relacionadas con la respuesta a patógenos (genes R, familia NBS-LRR, señalización de SA, señalización de jasmónico, señalización de etileno, etc.). Los genes inducidos en esbozo también están enriquecidos en genes de funciones relacionadas con la fotosíntesis en relación con el color verdoso de las semillas e indicando una diferenciación distinta a la de la semilla. Entre los genes reprimidos en esbozo se halló un enriquecimiento de funciones relacionadas con el desarrollo de la semilla y su cubierta y con la acumulación de reservas, incluyendo genes de crecimiento, metabolismo de reservas y de fenilpropanoides y factores MADS.

Dentro del intervalo de confianza del locus *SdI* acotado mediante mapeo fino no se halló ningún gen con diferencias de expresión significativas. El gen *AGL11* previamente propuesto como posible responsable del fenotipo de la apirenia (Mejia et al., 2011) mapea dentro del intervalo (Fig.1), pero no alcanzó los umbrales de significación (reprimido 1.93 veces en esbozos con un FDR= 5.06 %) y no se hallaron diferencias de expresión alélicas, descartando la presencia de mutaciones en *cis* responsables de su represión. En cambio, próximo al intervalo acotado se encontró un gen *TIR-NBS-LRR-TIR* (Fig.1) inducido casi 300 veces en individuos apirenos (FDR=10<sup>-6</sup>). La activación constitutiva o sobreexpresión de homólogos de este gen desencadena una respuesta hiperinmune dependiente de SA y enanismo (Zhang et al., 2003). En los datos de RNA-seq solo se identificó un haplotipo del gen *TIR-NBS-LRR-TIR* expresado en esbozos mientras que la expresión detectada en semillas fue nula, indicando que puede existir una mutación en *cis* causante de su sobreexpresión.

Los datos de RNA-seq también se rastrearon buscando polimorfismos de secuencia en los transcritos expresados. Dentro del intervalo que delimita el locus *SdI* se identificaron tres variantes específicas de individuos apirenos para las que se predijo un

efecto deletéreo en las proteínas codificadas por los transcritos afectados. Dos de estas mutaciones se acumularon en la zona del centro activo de una proteína fosfopanteteína adenilil-transferasa (*PPAT*) (Fig.1), Arg151Cys y Gln195Leu. En *Arabidopsis*, esta proteína está relacionada con el almacenamiento de lípidos en semilla (Rubio et al., 2013) y por tanto es concebible que estas mutaciones podrían generar efectos dominantes en la actividad de la enzima relacionadas con el aborto del endospermo. Otra mutación deletérea se encontró en el gen *AGL11*, Arg197Leu, aunque Mejía y col. (2011) la descartó como responsable de la apirenia al encontrarla también en un cultivar con semilla.

### **Análisis de hormonas**

Se trató de comprobar si la respuesta génica hiperinmune detectada en los esbozos puede ser dependiente de SA. Se midieron los niveles de SA en semillas y esbozos de individuos de la progenie RGxCS seleccionados del mismo modo y en el mismo estado de desarrollo que para el RNA-seq. Se observó que los esbozos presentan unos niveles de SA 20 veces mayor que las semillas como promedio, indicando su posible papel en la respuesta hiperinmune observada a nivel del transcriptoma, y posiblemente también en la falta de desarrollo de la semilla. En conjunto, los resultados apuntan a que mutaciones en regiones reguladoras del gen *TIR-NBS-LRR* todavía por identificar y/o dos mutaciones puntuales en el gen *PPAT* podrían desencadenar una respuesta hiperimmune dependiente de SA que conllevaría la degeneración del endospermo y el aborto del desarrollo de la semilla.

### **Agradecimientos**

El trabajo está financiado por el proyecto BIO2011-26229 y BIO201459324-R.

### **Referencias**

- Cabezas, J.A., Cervera, M.T., Ruiz-García, L., Carreño, J. and Martínez-Zapater, J.M. 2006. A genetic analysis of seed and berry weight in grapevine. *Genome* 49 (12):1572-1585.
- Mejía, N., Soto, B., Guerrero, M., Casanueva, X., Houel, C., de los Ángeles Miccono, M., Ramos, R., Le Cunff, L., Boursiquot, J.M., Hinrichsen, P. and Adam-Blondon, A.F. 2011. Molecular, genetic and transcriptional evidence for a role of VvAGL11 in stenospermocarpic seedlessness in grapevine. *BMC Plant Biology* 11:57.
- Royo, C., Carbonell-Bejerano, P., Torres-Pérez, R., Nebish, A., Martínez, Ó., Rey, M., Aroutiounian, R., Ibáñez, J. and Martínez-Zapater, J.M. 2016. Developmental, transcriptome, and genetic alterations associated with parthenocarpy in the grapevine seedless somatic variant Corinto blanco. *J. Exp. Bot.* 6:259-273.
- Rubio, S., Whitehead, L., Larson, T.R., Graham, I.A. and Rodriguez, P.L. 2008. The Coenzyme A Biosynthetic Enzyme Phosphopantetheine Adenylyltransferase Plays a Crucial Role in Plant Growth, Salt/Osmotic Stress Resistance, and Seed Lipid Storage. *Plant Physiology* 148(1):546-556.
- Stout, A.B. 1936. Seedlessness in grapes. *N. Y. Agric. Exp. Sta. Tech. Bull.* 238:1-68.
- Zhang, Y., Goritschnig, S., Dong, X. and Li, X. 2003. A Gain-of-Function Mutation in a Plant Disease Resistance Gene Leads to Constitutive Activation of Downstream Signal Transduction Pathways in suppressor of npr1-1, constitutive 1. *The Plant Cell* 15(11):2636-2646.

**Figuras**



Fig. 1. Fragmento del LG 18 donde se localiza el QTL *SdI*. Se indica el segmento en el que se acota el locus tras el mapeo fino (*SdI* locus) y la posición de los genes candidatos (*TIR-NBS-LRR*, *PPAT*, *AGL11*) a portar la mutación causante de la apirenia según el análisis transcriptómico.