



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Análisis de la Expresión Génica de la Resistencia a *Plum
pox virus* en Albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.)

D. Pedro Manuel Olivares Belchí
2016



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

**Análisis de la expresión génica de la resistencia a *Plum
pox virus* en albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.)**

Pedro Manuel Olivares Belchí

Licenciado en Biología

Murcia, 2016

Directores:

Dr. Pedro Martínez Gómez

Dr. Manuel Rubio Angulo

Dpto. Mejora Vegetal (CEBAS-CSIC)

Dpto. Mejora Vegetal (CEBAS-CSIC)

Agradecimientos

Deseo agradecer a todas las personas que han colaborado durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, en especial a:

Dr. Pedro Martínez Gómez, investigador del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS) por el enorme esfuerzo realizado en la dirección de esta tesis, así como por los enormes conocimientos transmitidos en el ámbito científico y filosófico.

Dr. Manuel Rubio Angulo, investigador del CEBAS, por formarme en las técnicas empleadas en esta investigación y por transmitirme sus profundos conocimientos en la materia.

Dr. Federico Dicenta, responsable del programa de Mejora de Almendro, por su dilatada experiencia y conocimiento del género *Prunus*.

Dr. José Egea y Dr. David Ruiz como responsables del programa de Mejora de Albaricoquero, por su aportación del material para llevar a cabo esta investigación.

A mis compañeros de laboratorio Eva, Jorge y Juan por compartir su experiencia.

Al **Dr. Werner Howad** del CRG de Barcelona por su colaboración en la aplicación de marcadores SSRs.

A **D. Manuel de Castro** de aScidea Bioinformatics Solutions de Barcelona por su colaboración en los trabajos de Bioinformática.

Al **Dr. Alfonso Albacete** del Departamento de Nutrición Vegetal del CEBAS-CSIC por su colaboración en las evaluaciones hormonales.

A la **Dra. Ana Rosa Ballester** del IATA-CSIC de Valencia por su colaboración en la aplicación de la qPCR.

Al **Dr. Luca Dondini** de la Universidad de Bolonia por su colaboración en el desarrollo y aplicación de marcadores SNPs mediante SNPlex.

Al Ministerio de Economía y Competitividad por los proyectos **“Análisis de la expresión génica de la resistencia al Plum pox virus, PPV (Sharka), en albaricoquero mediante la secuenciación masiva del transcriptoma (RNA-seq)”** (AGL2010-16335) y **“Bases genéticas y moleculares de la Resistencia múltiple a *Plum pox virus* (PPV) y *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) en albaricoquero”** (AGL2015-68021-R).

A la Fundación Séneca de la Región de Murcia por el proyecto **“Breeding stone fruit species assisted by molecular tools”** (19879/GERM/15) por la financiación recibida para la elaboración de esta Tesis Doctoral

Y por último a mi familia y amigos por el ánimo y apoyo que me han dado en todo momento.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
1. Antecedentes, justificación y objetivos	1
1.1. El albaricoquero	3
1.1.1. Descripción taxonómica de la especie	3
1.1.2. Descripción botánica de la especie	5
1.1.3. Origen diversidad genética y antecedentes del cultivo	8
1.1.4. Importancia económica y aprovechamientos	10
1.2. El virus causante de la sharka, <i>Plum pox virus</i> (PPV)	14
1.2.1. Taxonomía y descripción del virus	14
1.2.2. Funciones de las proteínas virales	17
1.2.3. Aislados de PPV	18
1.2.4. Sintomatología de la sharka	21
1.3. Origen de la sharka y situación actual en España	22
1.3.1. Situación actual de la enfermedad	22
1.3.2. Propagación de la sharka y métodos de control	24
1.3.3. Susceptibilidad varietal y fuentes de resistencia	25
1.4. Análisis de la resistencia al <i>Plum pox virus</i> en albaricoquero	29
1.4.1. Estudios genéticos y herencia del carácter	30
1.4.2. Estudios genómicos y análisis de QTLs	31
1.4.3. Estudios transcriptómicos y proteómicos	36
1.4.4. Técnicas de secuenciación masiva del transcriptoma (RNA-Seq)	39
1.8. Justificación y objetivos de la Tesis	40
2. Material biológico y condiciones experimentales	43
2.1. Material vegetal	45
2.1.1. Variedades de albaricoquero	45
2.1.2. Patrones de <i>Prunus</i>	47
2.2. Aislado de <i>Plum pox virus</i>	47
2.3. Condiciones experimentales controladas	48
2.3.1. Inoculación de los patrones mediante injerto	49
2.3.2. Ciclo de crecimiento artificial	50
2.4. Detección de PPV en albaricoquero	52
2.4.1. ELISA-DASI	52
2.4.2. RT-PCR	53
3. Polimorfismo genómico	55
3.1. Introducción y objetivos	57
3.2. Material vegetal	65
3.3. Metodología	65
3.3.1. Toma de muestras, extracción y cuantificación del ADN	65
3.3.2. Análisis de SSRs	66

3.3.3. Extracción de ARN, secuenciación e identificación de SNPs	69
3.3.4. Identificación de SNPs, diseño de cebadores y genotipado.	71
3.4. Resultados y discusión	73
3.4.1. Análisis SSR	73
3.4.2. Análisis SNP	75
3.4.2. Análisis SNPlex	77
3.5. Conclusiones	79
4. Análisis de la expresión génica	81
4.1. Introducción y objetivos	83
4.2. Material vegetal	88
4.3. Metodología	89
4.3.1. Extracción y secuenciación de RNA	90
4.3.2. Análisis bioinformático	91
4.3.3. Validación mediante qPCR	94
4.4. Resultados y discusión	97
4.4.1. Transcriptomas obtenidos mediante RNA-Seq	97
4.4.2. Análisis funcional de los genes expresados diferencialmente	98
4.4.3. Identificación de genes involucrados en la resistencia	102
4.4.4. Análisis de la validación de los perfiles de expresión mediante qPCR	109
4.5. Conclusiones	111
5. Cambios hormonales	113
5.1. Introducción y objetivos	115
5.2. Material vegetal	120
5.3. Metodología	120
5.4. Resultados y discusión	123
5.5. Conclusiones	127
6. Conclusiones generales	129
7. Bibliografía	133

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1.1. Producción y superficie nacional de cultivo de albaricoque de las comunidades autónomas más representativas	12
Tabla 1.2. Distribución, aislado y año de detección de la sharka por países	20
Tabla 1.3. Listado de especies en las que se ha detectado PPV	25
Tabla 3.1. Origen de los marcadores SSRs ensayados	67
Tabla 3.2. Protocolo (izquierda) y condiciones de PCR (derecha) empleadas en la amplificación de ADN	68
Tabla 3.3. Número total de SNPs y de INDELS detectados	75
Tabla 4.1. Principales aproximaciones al análisis transcriptómico en frutales del género <i>Prunus</i>	84
Tabla 4.2. Cebadores específicos diseñados mediante el programa Primer3Plus para la validación mediante qPCR	95
Tabla 4.3. Lecturas obtenidas usando RNA-Seq en los transcriptomas ensayados	97
Tabla 4.4. Genes expresados diferencialmente en las comparaciones de transcriptomas ensayadas	103
Tabla 5.1. Concentración de fitohormonas en las muestras analizadas de melocotonero 'GF305' y albaricoquero 'Real Fino' control e inoculado con PPV	124
Tabla 5.2. Relación de los valores hormonales entre plantas inoculadas y no inoculadas de cada una de las variedades analizadas	126

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1. Hojas, tallos, flores y frutos de albaricoquero.	6
Figura 1.2. Centros de origen (A y B), diversificación (C) y dispersión (D) de la especie albaricoquero.	9
Figura 1.3. Producción mundial de albaricoque. Los valores representan la producción en miles de toneladas para el año 2014.	11
Figura 1.4. Evolución de la exportación española de frutales de hueso (<i>Prunus</i>) durante el periodo 2009-2014	13
Figura 1.5. A la izquierda partículas virales purificadas de PPV. A la derecha, cuerpos de inclusión (Pinwheels) inducidos por PPV en células de <i>Nicotiana benthamiana</i> .	15
Figura 1.6. Estructura del genoma de PPV [ssRNA(+)], con la distribución de genes que lo componen.	16
Figura 1.7. Síntomas de sharka en hoja, fruto y hueso de diferentes especies de <i>Prunus</i>	21
Figura 1.8. Distribución de PPV en el mundo.	23
Figura 1.9. Distribución de los QTLs relacionados con la resistencia a PPV en el genoma de referencia.	35
Figura 1.10. representación esquemática de la regulación de la expresión génica en plantas.	37
Figura 1.11. Actividad oxidativa en los distintos compartimentos celulares en respuesta a PPV en albaricoquero.	39
Figura 2.1. Vista general de la colección de variedades de albaricoquero situada en la finca del CEBAS-CSIC, Cieza (Murcia)	45
Figura 2.2. Invernadero de condiciones controladas a prueba de insectos donde se realizan los ensayos (A); exterior (B) e interior (C) de la cámara frigorífica.	51
Figura 3.1. Espectrofotómetro tipo Nanodrop utilizado para la cuantificación del DNA	66
Figura 3.2. Secuenciador automático ABI Prism-3730 de 96 capilares y visualización de fragmentos de ADN.	69
Figura 3.3. Plataforma Sequenom IPLEX Mass Array utilizada y esquema resumen de la reacción de extensión IPLEX	72
Figura 3.4. Polimorfismo obtenido en la aplicación de SNPlex	73
Figura 3.5. Listado de SNPs identificados en 'Rojo Pasión' y no en 'Z5067'	76
Figura 3.6. Polimorfismo obtenido ne la aplicación de SNPlex	78
Figura 4.1. Laboratorio de análisis transcriptómico del CEBAS-CSIC	85
Figura 4.2. Material vegetal utilizado en los ensayos de expresión génica	88
Figura 4.3. Esquema del diseño experimental utilizado	89
Figura 4.4. Equipo de qPCR usado	96
Figura 4.5. Procesos biológicos (GO) de los genes expresados diferencialmente en las comparaciones RC vs. Ri, Zc vs. Zi, Rc vs. Zc y Ri vs. Zi.	99
Figura 4.6. Funciones moleculares (GO) de los genes expresados diferencialmente en las comparaciones RC vs. Ri, Zc vs. Zi, Rc vs. Zc y Ri vs. Zi.	100
Figura 4.7. Diagramas de Venn indicando número de genes expresados diferencialmente específicos y compartidos en las comparaciones ensayadas	105

Figura 4.8. Representación esquemática de los 61 SSRs nsayados y genes expresados diferencialmente	106
Figura 4.9. Representación esquemática de la interacción del PPV y el albaricoquero	108
Figura 4.10. Resultados RT-qPCR de los ocho genes seleccionados de la expresión diferencial.	109
Figura 5.1. Extractos con metanol de homogenado de hojas de 'GF305' inoculado y sin inocular. El tubo de color verde intenso presenta mayor cantidad de clorofila y pertenece a 'GF305' sin inocular, el otro tubo es de una extracción de 'GF305' inoculado con PPV	121
Figura 5.2. Equipo U-HPLC-MS/MS de ThermoFisher Scientific usado en los análisis hormonales.	122

Resumen

Resumen

Antecedentes, justificación y objetivos

El albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.) es una especie diploide con un genoma de $2n=2x=16$ cromosomas. Pertenece a la familia *Rosaceae* siendo una de las especies del género *Prunus* más importantes desde el punto de vista agrícola ya que representa el tercer frutal de hueso en importancia económica a nivel mundial después de melocotonero y ciruelo.

Esta tesis doctoral describe la respuesta diferencial a nivel genómico, transcriptómico y hormonal frente a PPV en dos variedades de albaricoquero, 'Rojo Pasión' (resistente) y 'Z506-7' (susceptible). En un primer capítulo sobre los antecedentes de la investigación en la resistencia a sharka se describirán las especies del género *Prunus* sobre las que esta resistencia ha sido estudiada, debido a que muchos de los estudios moleculares son extrapolables entre las distintas especies del género por lo que es conveniente establecer las relaciones entre las especies más importantes.

Polimorfismo genómico

A partir de los resultados del análisis de variaciones de variaciones de secuencia de microsatélites (Simple sequence repeat, SSRs) y variaciones de nucleótidos (SNPs) en el genoma de albaricoquero, basándonos en la secuenciación de alto rendimiento del RNA (RNA-Seq) y combinando la espectrometría de masas para el genotipado de SNPs, podemos decir que se trata de un enfoque que proporciona una alta flexibilidad, reproducibilidad y precisión en los ensayos, suponiendo una herramienta sólida para detectar diversidad de nucleótidos en regiones codificantes del genoma del *Prunus*. Además, el uso de regiones codificantes de DNA para el desarrollo de SNPs a partir del RNA-Seq representa una ventaja adicional, ya que las funciones de muchos de los genes identificados en el genoma del melocotonero son a menudo conocidas. Los SNPs validados identificaron un total de 267 combinaciones alélicas en los 37 genotipos, dándose para la mayoría de los SNPs 3 combinaciones alélicas en cada genotipo.

A pesar de esto, la naturaleza bi-alélica de los SNPs hace que la media del número de alelos por locus (2,8), la media observada de heterocigosidad (0,38) y el poder de discriminación (0,51) den valores más bajos que en el caso de los SSRs. Sin embargo, la disponibilidad de un mayor número de SNPs con respecto a SSRs hace que los SNPs sean una herramienta idónea para estudios de relaciones y diversidad genética entre variedades.

Los resultados obtenidos muestran sin lugar a dudas la gran influencia del LG 1 en la resistencia al PPV en albaricoquero. Estos datos nos ayudan a enfocar estudios dirigidos hacia zonas más concretas del genoma en la búsqueda de QTLs que controlen un mayor porcentaje de la variación del carácter, saturando otras zonas de interés fuera del *PPVres* y diseñando marcadores específicos que nos aporten información de la expresión fenotípica de determinados caracteres en cada uno de los descendientes de una población.

Análisis de Expresión génica

Desde el punto de vista metodológico, el RNA-Seq se ha mostrado como una herramienta muy poderosa en el análisis de la interacción PPV/albaricoquero aunque no parece ser la herramienta definitiva para resolver los problemas de expresión base ni los determinantes genéticos. El RNA-Seq se presenta como una herramienta complementaria a los estudios genómicos con menor cantidad de datos.

Las diferencias transcriptómicas a nivel de expresión de genes confirmaron que la susceptibilidad a PPV en albaricoquero es un proceso complejo basado en la batalla continua entre el virus (PPV) y la planta (*Prunus armeniaca*) a nivel de genes de resistencia del patógenos y a nivel de silenciamiento génico similar a la respuesta observada en melocotonero en trabajos anteriores.

La resistencia a PPV en albaricoquero es también un proceso complejo que también se basa en una batalla continua entre el virus (PPV) y la planta (*Prunus*) donde los genes *MATH* (control a larga distancia de los movimientos del virus) están involucrados junto a otros genes (efecto del fondo genético).

Otros genes candidatos implicados en la resistencia son *Pleiotropic drug resistance 9 gene*; *Cysteine-rich secretory proteins*, *Antigen 5 and Pathogenesis-related 1 protein (CAP)* y *Late embryogenesis abundant protein (LAE)*.

La respuesta de resistencia que se observa en el albaricoquero es diferente de la respuesta que se observa en ciruelos hipersensibles resistentes. Por tanto parece que si bien la susceptibilidad es un proceso similar entre especies la resistencia dependen de cada especie.

Cambios hormonales

La respuesta hormonal [análisis de las citoquininas *trans*-Zeatina (Z), Ribósido de Zeatina (ZR) e Isopentenil Adenina (iP); las giberelinas GA1, GA3 y GA4; las auxina Ácido Indolacético (IAA); el Ácido Jasmónico (JA); además del Ácido Abscísico (ABA), el Ácido Salicílico (SA) y el precursor del etileno Ácido-1-Aminociclopropano-1-Carboxílico (ACC)] en diferentes variedades de albaricoquero resistentes y susceptibles a PPV y en melocotonero GF305 control e inoculadas pusieron de manifiesto la importante implicación del SA y la citoquinina *trans*-Zeatina en la infección del virus en *Prunus*.

Es de destacar que tras la inoculación de la variedad de albaricoque 'Rojo Pasión' con PPV se produce un descenso de los niveles de ABA que puede ser el responsable de favorecer la señalización de la ruta del SA. El descenso del ABA favorece favorece las condiciones oxidativas dentro de la célula lo que a su vez induce la forma monomérica del NPR1, que es capaz de ser trascolada al núcleo e indicar la señalización de las respuestas mediadas por el SA.

1. Antecedentes, Justificación y Objetivos

1. ANTECEDENTES, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

1.1. El albaricoquero

1.1.1. Descripción taxonómica de la especie

El albaricoquero es un árbol frutal perteneciente a la familia *Rosaceae* y la subfamilia *Prunoideae*, se encuentra encuadrado dentro del género *Prunus* (frutales de hueso) y subgénero *Prunophora*.

La clasificación taxonómica de esta familia *Rosaceae* ha variado considerablemente (Potter y col., 2007) según el método seguido, pero casi todos los autores establecen en ella unos 90 géneros con unas 3.000 especies muy heterogéneas (rosa, fresa, manzano o almendro) aunque podemos destacar como característica común un receptáculo floral muy desarrollado. Esta familia a pesar de su diversidad se considera como monofilética y en la actualidad su taxonomía interna está siendo ajustada mediante estudios genéticos en base al DNA nuclear y cloroplástico (Potter y col., 2007). Dentro de esta familia se reconocen tres subfamilias *Rosoideae*, *Dryadoideae* y *Spiraeoideae*, esta última subfamilia incluye actualmente al género *Prunus* (Potter y col., 2007).

Taxonómicamente el género *Prunus* consta de más de 200 especies encuadradas en cinco subgéneros (Rehder, 1940) *Amygdalus* (melocotoneros y almendros), *Cerasus* (cerezos), *Prunus* (albaricoques y ciruelos), *Laurocerasus* y *Padus* (estos dos últimos géneros sin interés agrícola). No obstante, los estudios cladísticos basados en el DNA nuclear y cloroplástico indican la existencia de únicamente 4 subgéneros *Amygdalus*, *Cerasus*, *Prunus* y *Eplectocladus* (Bortiri y col., 2001; Potter y col., 2007).

Estos cuatro subgéneros se caracterizan por poseer un número básico de ocho cromosomas ($x=8$) que mediante poliploidía ha generado las distintas especies del género. De este modo encontramos especies diploides de *Prunus* como el almendro [*P. dulcis* D.A. Webb (anteriormente *P. amygdalus* Batsch)], melocotonero [*P. persica* (L.) Batsch], albaricoquero (*P. armeniaca* L.), el ciruelo japonés (*P. salicina* L.) y el cerezo dulce (*P. avium* L.) que contienen la dotación cromosómica $2n = 2x = 16$. Otras especies

han multiplicado por cuatro la dotación cromosómica original como el endrino (*P. spinosa* L.), el cerezo amargo (*P. cerasus* L.), o *P. fruticosa* Pall. ($2n = 4x = 32$); o incluso la han aumentado seis veces generando especies hexaploides como el ciruelo europeo [*P. domestica* L. y *P. insititia* L. ($2n = 6x = 48$)] (Bouhadida, 2007).

El abaratamiento de la secuenciación hasta 0,1 euro por Mb en 2013 (National Human Genome Research Institute) ha permitido la generalización de los estudios moleculares para el establecimiento de las relaciones taxonómicas mucho más resolutivos que los estudios morfológicos que fueron la base de su clasificación inicial, por lo que la clasificación interna del género está en continua modificación por el empleo de las nuevas herramientas moleculares.

La clasificación subgenérica de *Prunus* está lejos de ser comprendida (Bortiri y col., 2001; Lee y Wen, 2001). El subgénero *Prunus* presenta una elevada complejidad taxonómica (Hanelt, 1997; Nielsen y Olrik, 2001), debido a la enorme existencia de especies y grupos diferentes. La existencia de transiciones intermedias entre taxones y dentro de un mismo taxón, junto con los híbridos intermedios *P.insititia* - *P.domestica* y *P. insititia* - *P.spinosa*, genera una clasificación confusa (Woldring, 2000). Sin embargo, la posibilidad de cruzamiento entre distintas especies permite aumentar la plasticidad del género, lo que da lugar a la producción de nuevas variedades de interés agronómico a la vez que permite la transmisión de resistencias entre cultivares de una misma especie como es el caso del albaricoquero (Paunovic y col., 1988) o entre especies próximas como el melocotonero y el almendro (Rubio y col., 2003a).

Teniendo en cuenta el uso de características morfológicas para la clasificación de *Prunus*, el hueso es el elemento más estable y el que ha permitido establecer las relaciones más constantes en el tiempo (Woldring, 2000). Los índices obtenidos a partir del hueso han permitido identificar especies e incluso variedades (Van Zeist y Woldring, 2000; Nielsen y Olrik, 2001).

El género *Prunus* es uno de los más importantes desde el punto de vista agrícola, con más de 100 especies cultivadas (Potter y col., 2012). El género se divide en 5 subgéneros: *Prunus* (albaricoqueros y ciruelos), *Amygdalus* (melocotoneros y almendros) y *Cerasus* (cerezos) con gran interés agronómico, y *Laurocerasus* y *Padus* que no poseen especies de interés agrícola.

El género *Prunus* alberga gran número de especies frutales. Algunas de estas especies, emparentadas filogenéticamente con el albaricoquero, suponen una fuente secundaria de genes para su uso en mejora (Paunovic, 1988; Boonprakob y Byrne, 1990):

- *Prunus brigantiaca* (ciruelo alpino), deriva de *P. armeniaca*. Se cultiva en los Alpes franceses.
- *Prunus ansu* y *Prunus holosterica*, cultivadas en el Extremo Oriente. Algunos autores consideran que pertenecen a *P. armeniaca*.
- *Prunus mume* (albaricoquero japonés), cultivado en zonas húmedas de China y Japón. Es más resistente a las enfermedades de tipo fúngico que *P. armeniaca*.
- *Prunus sibirica* (albaricoquero siberiano) y *Prunus mandshurica* (albaricoquero de Manchuria), cultivadas al norte de Mongolia y caracterizadas por su resistencia al frío.

Actualmente el albaricoquero está clasificado como la especie *Prunus armeniaca* (Linneo), también denominada *Armeniaca vulgaris* (Lamark) (Layne y col., 1996). *P. armeniaca* presenta una gran diversidad de variedades, de las que más de 1.300 se encuentran en Europa (Ruiz y col., 2011). A nivel mundial se han descrito alrededor de 10.000 cultivares tipificados en 225 bancos de germoplasma según la Comisión de Recursos Fitogenéticos de la FAO (<http://faostat.fao.org>).

La mayoría de los albaricoqueros cultivados pertenecen a la especie *Prunus armeniaca* (Linneo), también denominada *Armeniaca vulgaris* (Lamark) (Forte, 1992). Dentro de la especie *P. armeniaca* existe una gran diversidad varietal. Sólo en Europa, hay descritos más de 1.300 cultivares diferentes (Ruiz y col., 2011). Por otro lado, existen descritas en el mundo alrededor de 10.000 accesiones de albaricoquero censadas en 225 bancos de germoplasma de todo el mundo, según la Comisión de Recursos Fitogenéticos de la FAO (<http://faostat.fao.org>).

1.1.2. Descripción botánica de la especie

El género *Prunus* fue descrito por Linneo en *Species Plantarum* (1753), en él se incluyen árboles y arbustos caducifolios (salvo algunas excepciones), con flores

hermafroditas formadas por cinco sépalos, cinco pétalos de colores rosados o blancos (en algunas especies rojizos), numerosos estambres (15-30) y un único ovario ínfero monocarpelar, aunque en algunas variedades tienen cinco carpelos (*Figura 1.1*).

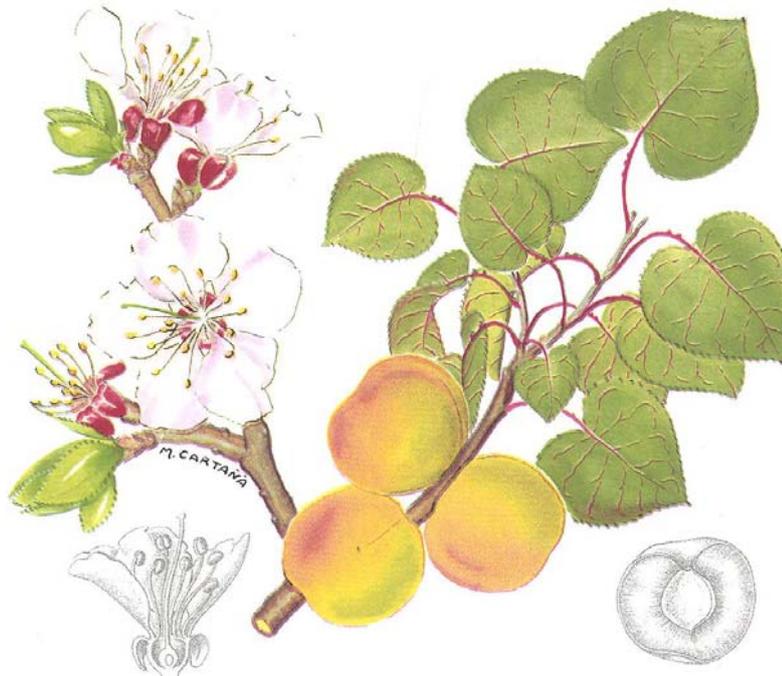


Figura 1.1. Hojas, tallos, flores y frutos de albaricoquero. Cortesía de M. Cartaña.

Este ovario tiene dos óvulos de los que uno degenera tras la antesis. Su fruto es una drupa generalmente con una semilla (ocasionalmente dos). De fuera a dentro encontramos un exocarpo que puede ser piloso como en melocotonero y almendro, o liso (ciruelo), a continuación aparece un mesocarpo que puede ser carnoso (melocotón y ciruelo) o coriáceo (almendro), la capa más interna es el hueso leñoso que protege a la semilla (Forte, 1992; Potter y col. ,2007). El albaricoquero es una especie diploide con un genoma de $2n=2x=16$ cromosomas, aunque se han encontrado algunos mutantes tetraploides. Si bien la auto-incompatibilidad floral es frecuente dentro del género *Prunus*, *P. armeniaca* es generalmente auto-compatible, aunque existe una gran variabilidad para este carácter dentro de la especie.

En general, las variedades cultivadas en el sur de Europa son auto-compatibles, mientras que las variedades cultivadas en América, Asia y Norte de África son auto-

incompatibles. La incompatibilidad es de tipo gametofítica determinada por una serie alélica (Burgos y col., 1997). También existen algunas variedades androestériles como 'Colorao' y 'Arrogantes'.

Desde el punto de vista botánico, el albaricoquero se ha descrito como un árbol de pequeño tamaño (5 a 10 m de altura) con la corteza rojiza, hojas simples, alargadas, ovaladas o redondeadas acabadas en punta abrupta, alternas con color brillante, rojizas cuando inician el desarrollo para volverse verde al madurar. Su peciolo está engrosado y a veces lleva una glándula. Además de las ramas principales, presenta diferentes tipos de ramos que configuran la forma y estructura natural del árbol: dardos, brindillas, ramos mixtos, ramos anticipados y chupones. Las hojas son simples y alternas, lisas, brillantes, de color rojizo cuando inician el desarrollo y verde intenso cuando son adultas, con el haz de color verde oscuro y más pálidas en el envés, de forma oval o redondeadas, algo acorazonadas, con el ápice agudo, irregularmente dentadas en los márgenes y poseen un peciolo largo, asurcado y glanduloso. Su longevidad supera los 50 años, aunque comercialmente su cultivo oscila entre los 25-30 años (Lichou y Audubert, 1992; Forte, 1992).

Sus flores se encuentran situadas, mayoritariamente, en ramos mixtos, con pedúnculo corto, con brácteas, pentámeras, con numerosos estambres, pétalos de color blanco rosáceo y hermafroditas (*Figura 1.1*). Estas flores presentan un con pedúnculo corto, con brácteas, pentámeras, con numerosos estambres, pétalos de color blanco rosáceo y hermafroditas con tendencia a la precocidad como la mayoría de las flores del género (*Figura 1.1*). Tras la fecundación del óvulo las paredes del ovario comienzan a crecer y diferenciarse encontrando en el interior un hueso o hueso lignificado, con forma aplanada, liso y dos surcos longitudinales, que alberga la semilla formada por dos cotiledones con cubiertas de color marrón (Mehlenbacher y col., 1991; Lichou y Audubert, 1992).

El fruto es una drupa de forma entre globosa u oval, con un surco ventral bien diferenciado, de tamaño variable, entre pequeño y mediano, ligeramente pubescente (*Figura 1.1*). El color de la piel varía del amarillo claro al anaranjado e incluso naranja-rojizo, y frecuentemente presenta una chapa de color rojizo en la zona expuesta al sol.

La pulpa o mesocarpo es carnososa y de color blanquecino, amarillento o anaranjado, aromática y azucarada, con un dulzor característico muy apreciado para consumo en fresco, así como para mermeladas, confituras, zumos y desecados como “orejones”, y puede estar adherida al hueso o libre (*Figura 1.1*). El hueso o hueso es lignificado, duro, de forma oval aplanada y con dos surcos bien definidos. La semilla es grande, con cubiertas de color marrón y cotiledones blancos (Lichou y Audubert, 1992).

Su consumo es en fresco, pero una gran parte de la producción mundial es preservada en seco, incluso en algunas zonas se conservan ahumados (Huebei). La mermelada de albaricoque también es otra utilidad importante, que puede usarse como adhesivo dulce en pasteles como en el famoso Sachertorte, o para glasear repostería. En oriente medio se deshuesan y se estofan para complementar al cordero (Mishmishia). En algunas regiones de China se cultiva por su semilla. Las semillas de albaricoquero se utilizan para aportar aromas a los ‘macaroons’ y galletas. En Japón también se cultivan por su valor ornamental, como *Prunus mume*.

La distribución del albaricoquero está restringida por sus características ecológicas, lo que limita su cultivo a regiones de clima templado desde el Mediterráneo hasta Europa central, Estados Unidos, China o Australia (Mehlenbacher y col., 1991).

1.1.2. Origen, diversidad genética y antecedentes del cultivo

El origen de la especie cultivada albaricoquero fue ubicado durante algún tiempo en Armenia en base a la rica cultura del albaricoquero en esta región donde hay evidencias arqueológicas de su cultivo desde el S. I d.C. (Faust, 1998). Los romanos lo llamaron *Mela armeniaca*, pero su origen armenio fue refutado por De Candolle (1885; 1886) debido a la inexistencia de albaricoqueros silvestres en Armenia, por lo que esta zona no puede ser su centro de origen. De Candolle establece el origen del albaricoquero en China, apareciendo en la literatura china desde 2.205 a.C. Vavilov en *Origin and Geography of Cultivated Plants* establece tres centros de origen para el albaricoquero, un primer centro en China (China central y el norte del Tibet), un segundo centro en Asia central (Afganistan y Uzbekistan) y un tercer centro en Asia

menor (Irán, el Cáucaso y Turquía), este último centro se considera secundario y origen las formas cultivadas actuales (Vavilov, 1951).

Otros autores consideran al centro de Asia central como el único centro primario a partir del que se originarían el centro de Asia menor y el centro de China a partir del desplazamiento al este y el oeste. Esta última descripción ha sido apoyada por datos moleculares de marcadores moleculares del tipo microsatelites (Maghuly, 2005) que han ubicado los cultivares de Asia central en una posición distinta dentro del dendrograma (Figura 1.2).

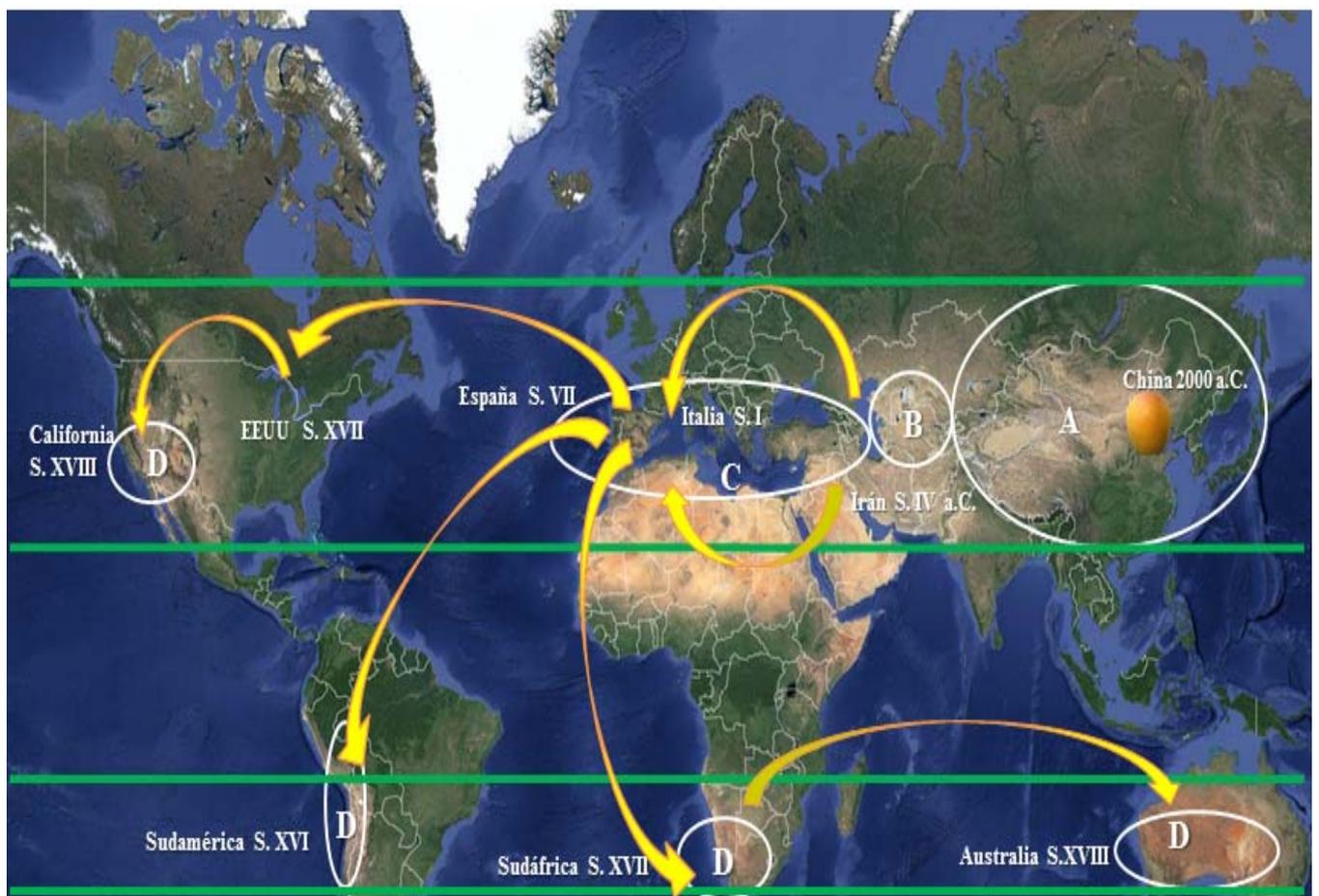


Figura 1.2. Centros de origen (A y B), diversificación (C) y dispersión (D) de la especie albaricoquero. Imagen del globo terráqueo © NASA, TerraMetrics. Datos del mapa © Google, INEGI (<https://www.google.es/maps>).

La expansión del albaricoquero desde Asia Central va en paralelo con las rutas comerciales y los procesos históricos que pusieron en contacto al Imperio Persa (uno de los núcleos de origen del albaricoquero) con Europa alrededor del el siglo IV a.C. con los ejércitos de Alejandro Magno (Layne y col., 1996).

Esta primera llegada a Europa se produciría a través de Armenia e Irán hasta llegar a Grecia e Italia, y la segunda en siglo VII desde Oriente Próximo hasta España mediante los árabes. Finalmente la expansión del albaricoquero hacia América se produciría desde Europa entre los siglos XVI y XVII (Faust y col., 1998).

La forma inicial de propagación era por semillas hasta que a principios del siglo XX comienza el desarrolló del injerto, esta técnica mejorada permitió el desarrollo clonal de un único individuo con unas características deseadas permitiendo de este modo el establecimiento de variedades diferenciadas y homogéneas típicas del cultivo moderno del albaricoquero. El establecimiento de las variedades con diferentes fenotipos adaptó el cultivo del albaricoquero a diferentes áreas de clima templado abarcando desde el Mediterráneo hasta Europa central, Estados Unidos, Australia o Sudáfrica (Mehlenbacher y col., 1991), las variedades adaptadas a cada clima seleccionaron características de crecimiento específicas que las hicieron inapropiadas para otros hábitats (Gulcan, 1997).

1.1.3. Importancia económica y aprovechamientos

La producción mundial de albaricoque alcanzó en 2014 2,34 millones de toneladas (Mt) (<http://faostat.fao.org>), siendo el albaricoquero el tercer frutal de hueso en cuanto a producción después de melocotones (16,5 Mt) y ciruelas (8,1 Mt). Hay que destacar que su producción está principalmente localizada en los países de la cuenca Mediterránea alcanzando entre todos ellos el 50% de la producción global.

Turquía es el productor más importante con una producción en 2014 que osciló en torno a 810.000 de toneladas (mt), aunque gran parte de su producción es albaricoque destinado a secado. Otros importantes productores son Irán (457 mt), Uzbequistán (430 mt), Argelia (319 mt) o Italia (198 mt) (*Figura 1.3*) (<http://faostat.fao.org>). España es uno de los principales productores mundiales de

albaricoque, cifrándose su producción en unas 131.000 toneladas anuales (<http://faostat.fao.org>), siendo el tercer productor de Europa tras Italia y Francia, y el noveno país a nivel mundial (<http://faostat.fao.org>) (Figura 1.3). Gran parte de la producción española está destinada al consumo en fresco, al contrario que ocurre en los casos de Turquía, Irán o Uzbekistán.

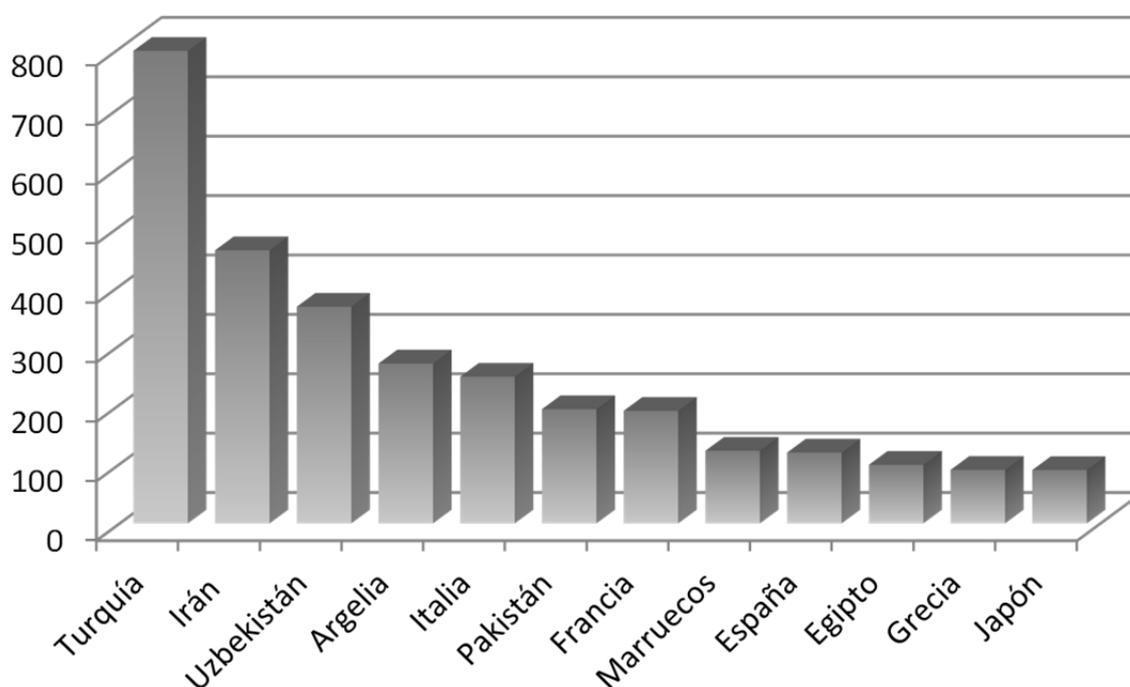


Figura 1.3. Producción mundial de albaricoque (<http://faostat.fao.org>). Los valores representan la producción en miles de toneladas para el año 2014.

El cultivo del albaricoquero tiene una gran tradición en España. En muchas áreas de nuestro país se dan unas condiciones edafoclimáticas particularmente idóneas para su cultivo, con resultados excelentes en cuanto a productividad, calidad y precocidad. El albaricoquero es el cuarto frutal de hueso en importancia en nuestro país tras el melocotonero, el almendro y el ciruelo. La superficie de cultivo actual es de unas 21.000 hectáreas, de las cuales 17.500 se encuentran en regadío y 3.500 en secano (MAGRAMA, 2014).

La Región de Murcia es con diferencia la principal zona productora, con aproximadamente el 64% de la producción nacional (unas 75.000 toneladas), seguida de Aragón, Castilla La Mancha, Comunidad Valenciana y Cataluña (MAGRAMA, 2014) (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Producción y superficie nacional de cultivo de albaricoque de las comunidades autónomas más representativas (MAGRAMA, 2014).

Comunidad Autónoma	Superficie		Producción	
	ha	%	Miles de toneladas	%
Región de Murcia	10.159	48,0	75,8	63,5
Aragón	3.102	14,6	9,9	8,3
Castilla La Mancha	1.717	8,1	9,7	8,1
Comunidad Valenciana	4.439	21,0	8,7	7,3
Cataluña	855	4,0	7,3	6,1
Andalucía	354	1,7	2,7	2,3
Extremadura	68	0,3	2,3	1,9
Resto de España	477	2,3	3,0	2,5
Total	21.172	100	119,4	100

Focalizando la producción en la Región de Murcia destacamos cuatro especies principales: albaricoquero (9.521 ha), melocotonero y nectarina (18.917 ha), ciruelo (1.221 ha) y almendro (104.636 ha). Datos magrama 2014.

España es el principal país exportador de frutas de hueso en fresco a nivel mundial. Los datos de exportación de estas frutas ofrecidos por la Federación Española de Asociaciones de Productores Exportadores de Frutas, Hortalizas, Flores y Plantas vivas (FEPEX) en el año 2014 indican un volumen de exportación de alrededor de 1,15 Mt de frutas (alrededor del 65% de la producción nacional), incluyendo 835 mt de melocotonero y nectarina, 116 mt de ciruela, 56 mt de albaricoquero, y 37 mt de cerezo (<http://www.fepex.es>). A las que hay que sumar las 85 mt de almendro (<http://www.magrama.gob.es>) (Figura 1.4). Estas cifras repercuten en un valor económico de estas exportaciones cifrado en más de 1.000 millones de euros (<http://www.fepex.es>).

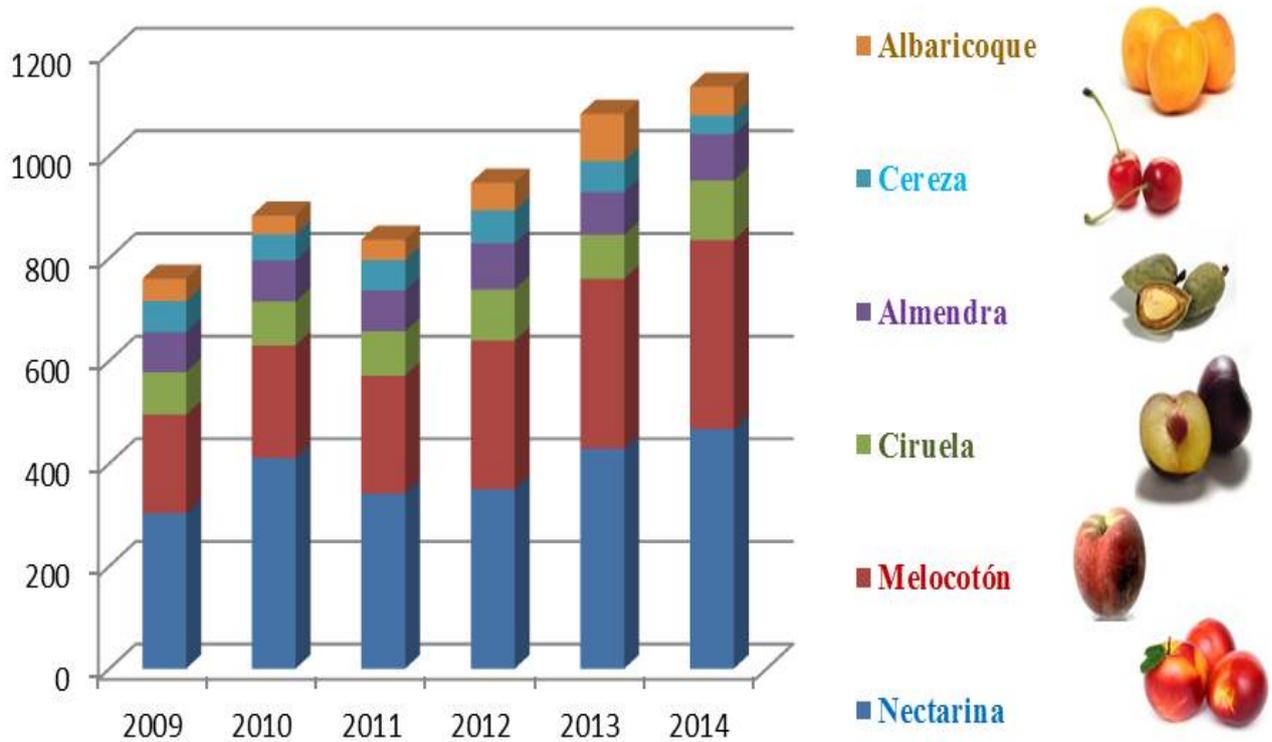


Figura 1.4. Evolución de la exportación española de frutales de hueso (*Prunus*) durante el periodo 2009-2014 (<http://www.fepex.es>).

Del total de la producción nacional de albaricoque, en torno al 37 % (unas 44.000 toneladas) se exporta como fruta en fresco a terceros países, y el 63 % restante de producción se destina al mercado nacional en fresco (41%) y a la industria conservera (22%) (MAGRAMA, 2008-2012). El principal destino de las exportaciones de albaricoque es el mercado europeo, siendo Francia (24%), Alemania (23%) e Italia (16%) los principales países de destino, seguidos de Países Bajos, Polonia, Bélgica y Portugal.

Debemos destacar el incremento en la exportación en los últimos años a países como Reino Unido y Rusia, que están aumentando exponencialmente la importación de albaricoque español (Base de datos de Comercio Exterior, 2014).

La producción de albaricoquero presenta buenas expectativas para la exportación, se trata de un cultivo no saturado con posibilidades de expansión para lo que es necesario obtener nuevas variedades que permitan el escalonado de la producción y reunan las demandas de productores, distribuidores y consumidores.

La obtención de estas nuevas variedades se beneficiará enormemente del conocimiento de los procesos moleculares que rigen estos fenotípos gracias al desarrollo de técnicas como la secuenciación masiva de los transcriptomas.

La producción nacional de estos frutales (sobre todo albaricoquero y ciruelo, y en menor medida melocotonero) está seriamente amenazada el *Plum pox virus* (PPV), agente causal de la sharka, por lo que las nuevas variedades deben reunir entre sus características la resistencia a PPV como requisito para su continuidad comercial.

En este sentido, debemos reseñar el conjunto de variedades obtenidas por el CEBAS-CSIC de Murcia, que están acaparando buena parte de la renovación varietal del albaricoquero en España, dadas sus características de elevada calidad de fruto, auto-compatibilidad y sobre todo la resistencia al virus de la sharka. Entre ellas debemos destacar las variedades de maduración temprana ‘Mirlo Blanco’, ‘Mirlo Anaranjado’, ‘Mirlo Rojo’ y ‘Rojo Pasión’, las variedades de maduración media como ‘Murciana’, ‘Micaelo’ y ‘Valorange’, y las variedades de maduración tardía ‘Dorada’ y ‘Tardorange’ (Egea y col., 2004a; 2005ab; 2010b; Ruiz y col., 2010a).

1.2. El virus causante de la sharka, *Plum pox virus* (PPV)

1.2.1. Taxonomía y descripción del virus

El albaricoquero puede verse afectado por diversas enfermedades infecciosas entre las que destaca la sharka, producida por *Plum pox virus* (PPV), *Trichovirus* (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV), *Ilarvirus*, así como enfermedades causadas por viroides (Pallás y col., 2004, Melgarejo y col., 2010).

El *Plum pox virus* (PPV), pertenece al género *Potyvirus*, cuya etimología deriva de la especie tipo *Potato virus Y* (virus Y de la patata). Este género se ubica en la familia Potyviridae, que incluyen al 30% de los virus que afectan a plantas (van Regenmortel y col., 2000) con unos 200 miembros repartidos en seis géneros, de los cuales *Potyvirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Tritimovirus* y *Rymovirus* tienen su genoma formado por una sola cadena de RNA (Barnett, 1992), y *Bymovirus* con dos cadenas de RNA (Kashiwazaki y col., 1991). Los géneros de la familia *Potyviridae* se diferencian principalmente por el

medio de transmisión, *Potyvirus* y, *Macluravirus* se transmiten mediante pulgones, *Tritimovirus*, y *Rymovirus* por ácaros, *Bymovirus* por hongos y *Ipomovirus* por mosca blanca (Hull, 2002).

A nivel microscópico la familia *Potyviridae* se caracteriza por las inclusiones citoplasmáticas en forma de ruedas de molino (pinwheels) (Rubio-Huertos y López-Abellá, 1966), siendo su morfología un criterio taxonómico.

En el caso del PPV, el virión tiene forma de varilla flexible sin envoltura, de 680 a 900 nm de longitud y de 11 a 15 nm de ancho (*Figura 1.5*). Su estructura externa consta de unas 2000 unidades homoproteicas de 330 aminoácidos que rodea a un ssRNA de unos 10.000 nucleótidos (10 kb) y con polaridad de mensajero (Dougherty y Carrington, 1988).

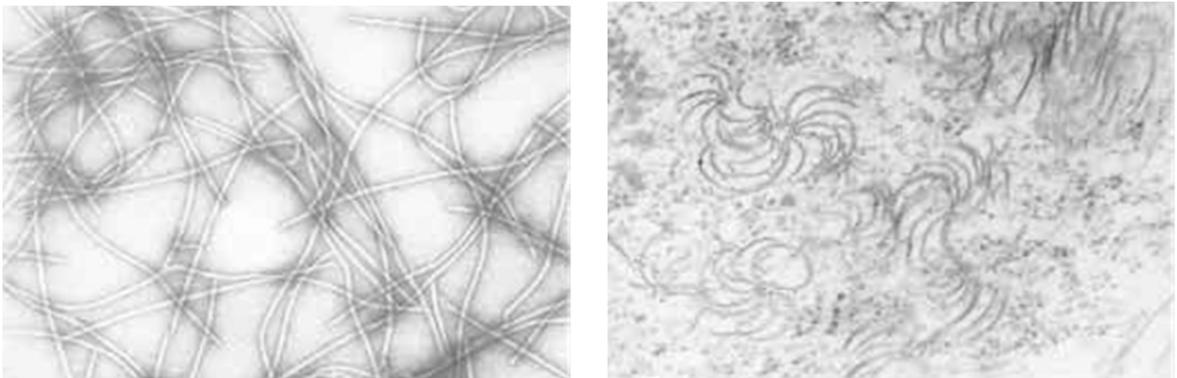


Figura 1.5. A la izquierda-partículas virales purificadas de PVY. A la derecha- cuerpos de inclusión («pinwheels») inducidos por PPV en células de *Nicotiana benthamiana*.

El ssRNA lleva en su extremo 5' la proteína VPg unida covalentemente (Laín y col., 1989) y en el 3' una cola poliadenilada (Hari y col., 1979; Verchot y col., 1991). El ssRNA se traduce en un polipéptido de 3.125-3.140 aminoácidos (355 kDa), que se divide en 10 proteínas mediante acción autocatalítica de la propia cadena polipeptídica (*Figura 1.6*). En el extremo 5' presenta una región no codificante de unos 200 nucleótidos altamente conservada dentro del género *Potyvirus* y que podría actuar en la encapsidación, traducción o replicación (Wu y Shaw, 1998). La región no traducida del extremo 3' presenta escasa conservación dentro del género y actúa en el

reconocimiento de la replicasa viral para iniciar la síntesis de la cadena de RNA(-) y proteger frente a la degradación (Haldemann-Cahill y col., 1998).

Desde el extremo amino al carboxilo de la poliproteína se diferencian los siguientes fragmentos: segmento P1 (proteasa), segmento iniciador de la transmisión HC-Pro (proteasa), segmento P3, segmento 6k1, segmento CI (proteína de cuerpos cilíndricos de inclusión), segmento 6k2, segmento N1a (proteína a de las inclusiones nucleares, proteasa), segmento N1b (proteína b de las inclusiones nucleares) y el segmento CP (proteína de la cápsida). El procesamiento autocatalítico por los tres segmentos con actividad proteasa (P1, HC-Pro y N1a) (Riechmann y col., 1992) tiene una elevada tendencia a generar cantidades equimoleculares de cada uno de los fragmentos (Restrepo y col., 1990), a excepción de las proteínas 6k1 y VPg que se generan a partir de los segmentos P3 y VPg-N1a, respectivamente, por acción de la proteasa N1a. Las proteínas que exceden las necesidades replicativas del virus formaran los cuerpos de inclusión cilíndricos compuestos por la proteína CI (actividad ATPasa y helicasa), las inclusiones cristalinas nucleares formadas por las proteínas N1a y N1b (actividad proteolítica y RNA-polimerasa) y las proteínas del factor de transmisión (HC-Pro) polimerizan en inclusiones citoplasmáticas amorfas (Figura 1.6).

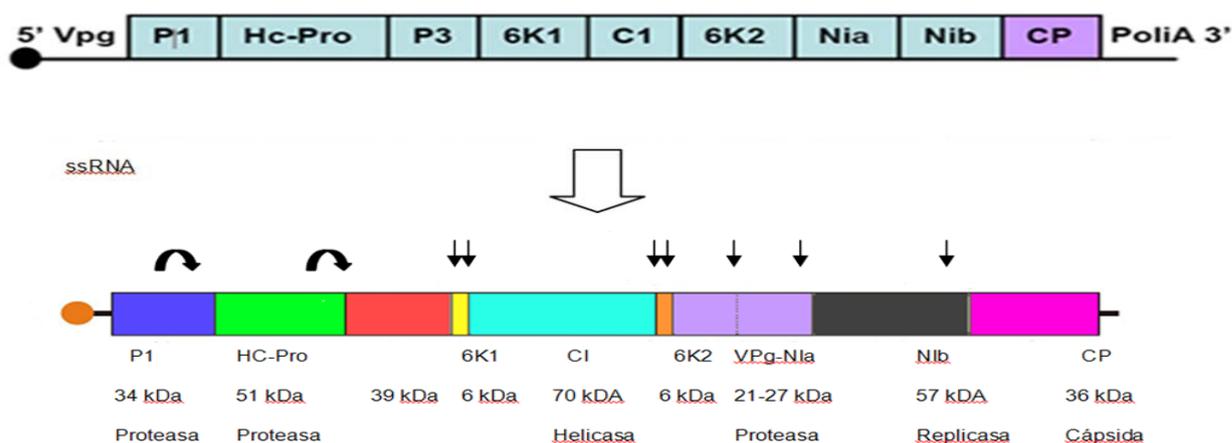


Figura 1.6. Estructura del genoma del PPV (ssRNA (+)) con la distribución de los genes que lo compone. Estructura de la poliproteína generada a partir de la traducción directa del ssRNA(+), aparecen representadas las diferentes regiones proteicas con los puntos de corte. Abreviaturas: P1 primera proteína, Hc-Pro proteína del factor asistente, P3 tercera proteína, 6K1 primer péptido 6K, C1 proteína de inclusión celular, 6K2 segundo péptido 6k, N1a proteína de inclusión nuclear "a", N1b proteína de inclusión nuclear "b", CP proteína de la cápsida.

1.2.2. Funciones de las proteínas virales

La proteína P1, además de la mencionada actividad proteasa participa en el movimiento célula a célula y en la supresión del silenciamiento génico producido por HC-Pro.

El factor de transmisión HC-Pro también llamado componente auxiliar (helper component) participa en el movimiento a larga distancia del virus, movimiento célula a célula (Rojas y col., 1997), en la unión al estilete de los pulgones a través de una región altamente conservada rica en cisteínas. Además, es responsable de algunos de los síntomas debido a la interferencia con el metabolismo de los miRNA (Kasschau y col., 2003). Esta proteína tiene capacidad supresora de silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS), ya que se ha comprobado su interferencia con la resistencia producida por RNA bicatenario generado a partir de repeticiones invertidas (Tenllado y col., 2003). Mutaciones en HC-Pro impiden el PTGS (González-Jara y col., 2005). Estudios realizados en *Nicotiana tabacum* en los que PPV no es capaz de realizar infecciones sistemáticas indican la incapacidad de HC-Pro de estimular el movimiento a larga distancia, ya que un transgén de HC-Pro en *N. tabacum* si produce movimiento a larga distancia (Sáenz y col., 2002). Por lo tanto HC-Pro participaría en la amplificación, movimiento sistémico del virus y supresión de PTGS en huéspedes.

La proteína P3 determina el rango de huéspedes (Suehiro y col., 2004). En laboratorio se ha encontrado como P3 y P3-6K1. El péptido 6k1 no se ha detectado *in vivo*. La proteína de las inclusiones cilíndricas CI, participa en movimientos célula a célula (Roberts y col., 1998), presenta actividad RNA helicasa, NTPasa y de unión al RNA, por lo que participa en la replicación viral (López y col., 2001).

El péptido 6k2 posee un dominio hidrófobo por lo que podría participar en la unión del complejo replicativo a la membrana.

La proteína NIa forma las inclusiones nucleares, resultado de un exceso de proteína. El mantenimiento del fragmento 6K2 bloquea su migración al núcleo. NIa tiene actividad proteasa, actuando sobre todos los puntos de corte tanto en *cis* como en *trans* de la poliproteína viral excepto los autoprosesados P1 y HC-Pro (Dougherty y Parks, 1991). NIa procesa en *trans* con baja eficiencia la separación entre los dominios VPg y NIapro.

La proteína VPg se une covalentemente al extremo 5' del RNA viral. Sus funciones son aportar estabilidad, protección frente a RNAasas, transporte subcelular, transporte a media y larga distancia (Schaad y col., 1977). Por último es de destacar su papel en la traducción viral ya que interacciona con el factor de iniciación de la traducción viral eIF(iso)4E (Wittmann y col., 1997), factor que es necesario para la infección (Lellis y col., 2002) y como posible fuente de resistencia.

La proteína b de las inclusiones nucleares (Nib), forma inclusiones nucleares, actúa como RNA polimerasa dependiente de RNA, tiene un dominio de unión a RNA (Merits y col., 1998) e interacciona con una proteína del huésped que se une a la poli-A, lo que podría afectar a la replicación.

La proteína de cápsida (CP), posee una región central altamente conservada que participa en la encapsidación del RNA viral, sus extremos presenta alta variabilidad dentro del género. Es de destacar que el extremo N-terminal participa en la transmisión del virus por los pulgones (López-Monya y col., 2000). Además interviene en los movimientos a corta y larga distancia dentro de la planta.

A modo de resumen de las funciones de las proteínas virales destacaremos que la traslocación de célula a célula depende de la interacción entre la proteína de la cápsida, el factor de transmisión o componente auxiliar Hc-Pro y la proteína CI que su exceso forma las inclusiones cilíndricas. La difusión sistémica depende de las proteínas de la cápsida, la Hc-Pro y la VPg del extremo 5'. Todas estas proteínas relacionadas con el movimiento se consideran determinantes del rango de huéspedes susceptibles.

Varias proteínas relacionadas con movimiento a larga distancia parecen ser responsables de neutralizar los mecanismos de defensa del huésped mediante silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) que consiste en el bloqueo de la replicación y la translocación del virus mediante a través de la degradación secuencia específica del RNA viral (Giunchedi y col., 2007).

1.2.3. Aislados de PPV

Los principales grupos de aislados descritos hasta la fecha de PPV son (Sochor y col., 2012; García y col., 2014):

- PPV-D (Dideron): originalmente descrito en albaricoquero en Francia, es el más abundante, se caracteriza por una menor agresividad y una baja velocidad de difusión. Afecta al albaricoquero, ciruelo y en menor medida al melocotonero.
- PPV-M (Marcus): descrito en melocotonero en Grecia, presenta alta agresividad y velocidad de difusión (Quiot y col., 1995). Afecta al melocotonero, albaricoquero y ciruelo. Esta variedad fue erradicada de España.
- PPV-EA (El Amar): originalmente descrito en albaricoquero en Egipto, tiene alta agresividad. Afecta al melocotonero, albaricoquero y ciruelo.
- PPV-C (Cherry): originalmente descrito en cerezo en Moldavia. Es el único PPV que afecta al cerezo en la naturaleza, aunque también afecta al melocotonero, albaricoquero y ciruelo. Se localiza en centro Europa.
- PPV-Rec (Rec): variedad recombinante entre PPV-M y PPV-D con un punto de rotura en el extremo carboxi terminal del gen Nib (Glasa y col., 2004).
- PPV-W (Winona): es una nueva cepa, aparentemente originada en el este de Europa y Rusia en 2011.
- PPV-T (Turkey): es una nueva cepa originada en Turquía en 2009.
- PPV-Pen (Pennsylvania): es una nueva cepa descrita en Turquía en Pensylvania en 2011.
- PPV-An (Anatolia): es una nueva cepa descrita en Estados Unidos en Pensylvania en 2012.
- PPV-CR (Cherry Russian): es una nueva cepa, aparentemente originada en el este de Europa y Rusia en cerezo en 2013.

La evolución de este virus ha tenido lugar mediante actos de recombinación. PPV-C y probablemente PPV-EA y PPV-W forman una línea evolutiva diferente de PPV-D y PPV-M que comparten la región 5' no codificante, P1 y HCPro (García y col., 2014).

En España los aislados más extendidos son los tipos Dideron (PPV-D) detectados inicialmente en el ciruelo japonés 'Red Beaut'. Los aislados tipo M están presentes en Francia e Italia además de la mayoría de los países del este de Europa, países con los que España tiene frecuentes intercambios comerciales con variedades de distintas especies de *Prunus* (Tabla 1.2). Debido a esto, los servicios de sanidad vegetal llevan a cabo muchas inspecciones para la detección temprana de la introducción del Tipo M. Gracias a esta vigilancia constante, en 2002 el Centro Vegetal de Zaragoza detectó PPV-

M en algunos melocotones de la variedad Royal Gem en el municipio de Caspe; constituyendo la primera observación de esta cepa en España. Después de análisis de laboratorio que confirmaron la presencia de PPV-M, empezó una rápida intervención para su erradicación, junto con la aplicación de normas legislativas para los organismos de cuarentena (Real Decreto 1.190/98, BOE 141 del 13 Junio del 1998).

Tabla 1.2. Distribución, aislados y año de detección de la sharka por países.

Año	País	Año	País
1917	Bulgaria (D, M)	1984	Portugal (D); España (D)
1935	Serbia (D, M, Rec)	1986	Siria (D, M)
1938	Hungría (D, M, C)	1987	Egipto (EA); Eslovenia (D, M)
1941	Rumania (D, M, C, Rec)	1988	Croacia (D, M)
1947	Albania (D, M, Rec)	1992	Chile (D)
1950	Eslovaquia (D, M)	1994	Estonia; Georgia
1952	República checa (D, M)	1995	Lituania (D); India
1956	Alemania (D, M)	1998	Noruega (D)
1961	Austria (D); Polonia (D, M)	1999	Estados Unidos. (D)
1962	Moldavia (C); Rusia (D, C)	2000	Canadá (D, W); China
1965	Holanda (D);Reino Unido (D)	2001	Jordania (M)
1967	Grecia(D,M); Suiza (D); Ucrania	2002	Túnez (D)
1968	Turquía (D, M, Rec, T)	2004	Bosnia-Herzegovina (D, M, Rec); Irán; Kazajistán (D); Argentina(D)
1970	Francia (D, M); Suecia	2006	Pakistán (D, Rec)
1973	Italia (D, M, C, Rec)	2007	Montenegro (D, M)
1974	Bélgica	2010	Japón (D)
1982	Chipre (M)	2011	Bielorrusia (D, M, Rec)

Esto permitió la eliminación del Tipo Marcus de Aragón, no habiendo sido detectadas plantas enfermas en los siguientes ocho años de controles (Capote y col., 2010), representando un ejemplo de la eficacia de la lucha preventiva y directa contra este patógeno (Cambra y col., 2003).

1.2.4. Sintomatología de la sharka

Los síntomas son variables dependiendo de la susceptibilidad del huésped, del tipo de aislado vírico y de las condiciones ambientales pero generalmente afecta a hojas y frutos.

Las infecciones mixtas con otros virus como *Prunus necrotic ringspot* o *Prune dwarf virus* pueden incrementar los síntomas.

En albaricoquero son típicos los anillos cloróticos o verde pálido como consecuencia de la infección por PPV, en las hojas se observan clorosis nerviales y en los frutos aparecen depresiones con colores pálidos con forma de anillo que pueden llegar a deformar el fruto e incluso desprenderse precozmente. El hueso también puede tener anillos cloróticos (*Figura 1.7*).

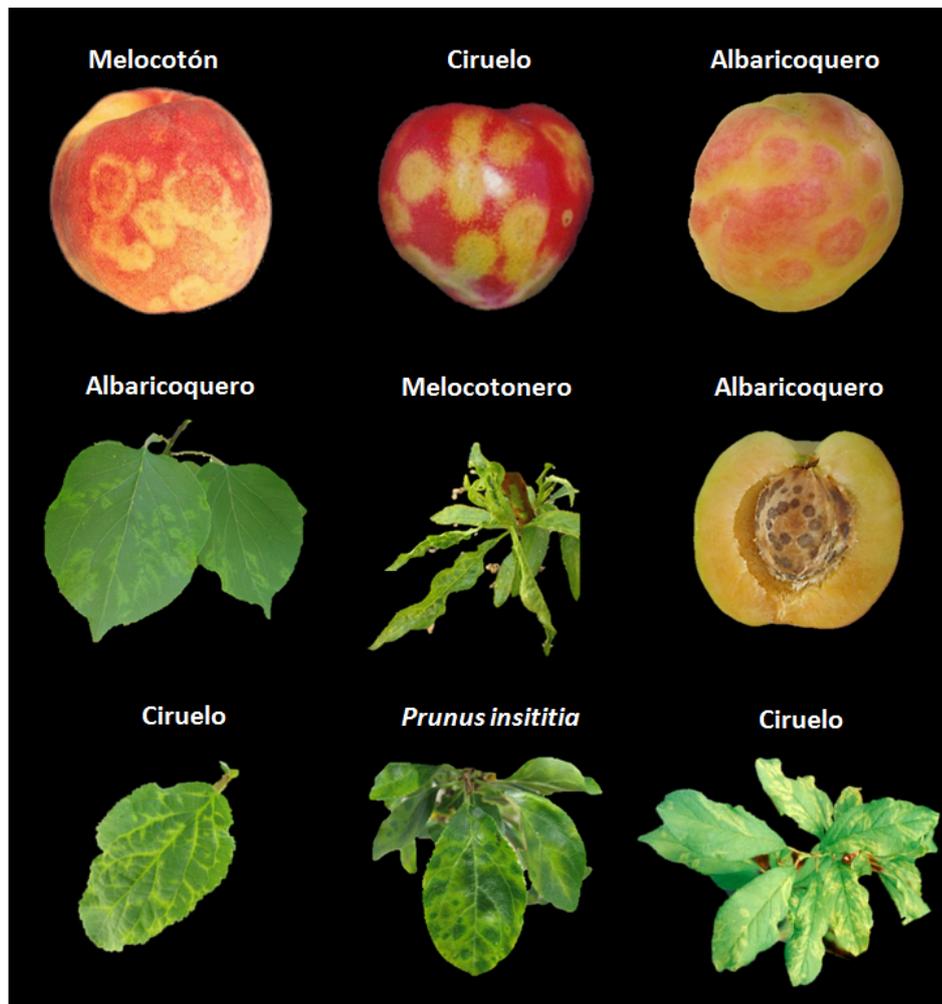


Figura 1.7. Síntomas de sharka en hoja, fruto y hueso de diferentes especies de Prunus.

En melocotonero los síntomas son muy variables dependiendo de la variedad, encontrándose clorosis nerviales, pequeñas manchas cloróticas y deformación de las hojas. En los frutos se aprecian anillos o bandas difusas de color pálido, y pueden caerse prematuramente.

En almendro la infección se considera asintomática en general, por lo que se ha considerado un posible donante de resistencia para melocotonero. En cerezo aparecen en las hojas anillos y patrones verde pálido, los frutos se deforman ligeramente con anillos cloróticos o necróticos y hendiduras, además de abscisión prematura.

En ciruelo las hojas tienen anillos o puntos cloróticos, con depresiones en frutos y la carne gomosa o necrotizada con aspecto rojizo o marrón.

1.3. Origen de la sharka y situación en España

1.3.1. Situación actual de la enfermedad

La sharka fue observada por primera vez en ciruelos en Bulgaria en 1917 (Atanassoff, 1932). En 1933 se detectó en albaricoque (Atanassoff, 1935), en melocotonero en 1961 (Németh, 1963), y en cerezo amargo en los ochenta (Kalashyan y col., 1994).

A partir de los años cuarenta la sharka estaba presente en la mayoría de los países de Europa del este. Extendiéndose en los años siguientes por el Mediterráneo, Oriente Medio, La India y Chile. En 1999 se detectó en Pensilvania (EEUU).

En España se detectó en 1984 de manera simultánea en las provincias de Sevilla, Murcia y Valencia, en albaricoquero, ciruelo y melocotonero, afectando actualmente a toda la cuenca mediterránea (Cambra y col., 1981; Llácer y col., 1985).

En estos momentos la enfermedad está prácticamente distribuida por todo el mundo (*Figura 1.8*).



Figura 1.8. Distribución de PPV (*Plum pox virus*) en el mundo.

En estos momentos la sharka constituye el principal problema económico para la producción de frutales del género *Prunus* como albaricoquero, melocotonero o ciruelo. Se estima que el coste que ha llevado asociado esta enfermedad en todo el mundo, durante los últimos 30 años, supera los 10.000 millones de euros (Cambra y col., 2006).

La sharka hace incomercializables los frutos afectados lo que ocasiona pérdidas cuantiosas. A todo esto hay que añadir en entre las medidas de control de la enfermedad está el arranque de los árboles afectados. Esta medida tiene un doble efecto, por un lado supone un gran desembolso económico por la administración la indemnización por el arranque de los árboles y por otro deja al agricultor sin capacidad productiva durante un largo periodo de tiempo. Por lo tanto la obtención de variedades resistentes a PPV generará un ahorro económico a la administración y supondrá una alternativa para la continuación de estos cultivos, además de publicitar la utilidad de los planes de I+D+i entre los agricultores.

1.3.2. Propagación de la sharka y métodos de control

El método principal de dispersión de la enfermedad son los áfidos, siendo varias las especies que pueden transmitir el PPV entre los árboles de una parcela e incluso de parcelas próximas. Los áfidos transmiten el PPV de manera no persistente por lo que no necesitan de un periodo de incubación facilitando de este modo la propagación. Los principales géneros transmisores del virus pertenecen a los géneros *Aphis* y *Brachycaudus*, en los que se incluyen a más de 20 especies capaces de transmitir al virus (Labonne y col., 2004; 2006). Los aislados de PPV transmisibles por áfidos presentan en el extremo amino terminal un motivo altamente conservado (Labonne y col., 2006).

La dispersión a larga distancia suele tener su causa en el movimiento de material vegetal infectado por el hombre, principalmente en los injertos. No se ha descrito la transmisión por semilla aunque el virus ha sido detectado en los cotiledones.

La sharka también puede afectar plantas herbáceas como por ejemplo *Lamium amplexicaule*, *Silene inflata*, *Campanula rapunculoides*, *Oenothera biennis*, *Vicia sativa*, *Pisum sativum*, *Melilotus spp.*, *Chenopodium Foetidum*, *Nicotiana clevelandii*. La transmisión desde estas plantas a los cultivos del género *Prunus* ha sido demostrada recientemente por lo que adquiere importancia el control de huéspedes herbáceos que se encuentran cerca de la parcela y que actúan como fuente de inóculo (Manachini, 2004; Manachini, 2007). Los árboles ornamentales y salvajes pertenecientes al género *Prunus* como *P. cerasifera*, *P. americana*, *P. glandulosa* o *P. spinosa* pueden actuar como reservorios locales del virus (Polák y col., 1997; Labonne y col., 2004; Polák y col., 2010) (Tabla 1.3).

El control de la enfermedad se se realiza principalmente mediante la detección precoz para lo que inicialmente se utilizaron métodos serológico (como el ELISA) y posteriormente análisis mediante PCR, la detección visual no es muy fiable ya que los anillos o manchas cloróticas son síntomas compartidos con otros virus. La identificación y control de los vectores como los áfidos y plantas reservorio también puede ser una medida para contener el avance de la enfermedad.

Tabla 1.3. Listado de especies en las que se ha detectado PPV.

Especie	Especie
<i>Campanula rapunculoides</i>	<i>Ranunculus acer</i>
<i>Chenopodium quinoa</i>	<i>Ranunculus arvensis</i>
<i>Lamium album</i>	<i>Ranunculus repens</i>
<i>Lamium amplexicaule</i>	<i>Silene vulgaris</i>
<i>Lamium purpureum</i>	<i>Solanum dulcamara</i>
<i>Lupinus albus</i>	<i>Trifolium incarnatum</i>
<i>Lycium barbarum</i>	<i>Trifolium pratense</i>
<i>Lycium halimifolium</i>	<i>Trifolium repens</i>
<i>Medicago lupulina</i>	<i>Zinnia elegans</i>
<i>Melilotus officinalis</i>	<i>Zinnia violácea</i>

El uso de plantas sanas certificadas es un elemento esencial para la protección de los cultivos (Keck y col., 1992). En las áreas infectadas se ha de proceder a arrancar los árboles enfermos con el fin de evitar la propagación descontrolada de la enfermedad, sin embargo esta medida no garantiza la erradicación de la enfermedad debido a la existencia de un periodo de ventana entre la infección y la aparición de los síntomas, además de la existencia de una gran variabilidad de malas hierbas que actúan de reservorio de virus, junto con la transmisión no persistente realizada por los áfidos (Dicenta y col., 1999a; 1999b).

En todas las áreas contaminadas se han realizado planes de erradicación que han supuesto el arranque de más de 1.300.000 árboles en los últimos 10 años. La sharka aun está presente en todas las áreas de cultivo de *Prunus* excepto Aragón y Navarra.

1.3.3 Susceptibilidad varietal y fuentes de resistencia

El éxito en la infección de una planta por PPV y por tanto que esta sea considerada como susceptible requiere que el virus sea capaz de replicarse y desplazarse sistémicamente por toda la planta.

El movimiento a larga distancia se ha observado en variedades de albaricoquero susceptibles a PPV, en variedad consideradas resistentes se ha descrito

movimiento a corta distancia (Dicenta y col., 2003). Mediante fluorescencia se han detectado partículas de PPV distribuidas en las venas principales de genotipos de albaricoqueros susceptibles, pero en variedades resistentes solo se detectó fluorescencia en grupos de células del mesófilo (Ion-Nagy, 2006). El virus se distribuye de manera desigual en la planta y la invasión total puede requerir varios años (Bodin-Ferri y col., 2002)

Estudios realizados en *Nicotiana tabacum* han demostrado que el virus es capaz de replicarse pero no puede realizar el movimiento sistémico, por lo que la capacidad de realizar movimientos a larga distancia es un determinante de susceptibilidad (Dicenta y col., 2003).

La generación de variedades resistentes a sharka ha sido buscada desde el descubrimiento de la enfermedad, pero son muy pocas las comunicaciones que presenten variedades con alto valor de resistencia. En este punto deberíamos diferenciar varios conceptos, así hablaríamos de inmunidad para indicar plantas que no pueden ser infectadas, resistencia para plantas donde la enfermedad se localiza en el lugar de la infección (siendo el grado de la localización el aspecto cuantitativo de la resistencia, lo que hace variar el grado de resistencia en distintas situaciones), hipersensibilidad cuando la planta produce una reacción muy susceptible que le genera resistencia y por último tolerancia donde la planta es totalmente infectada pero presenta pocos o ningún síntoma de la enfermedad (Hartmann, 1998).

Muchas de las fuentes consultadas no han especificado la definición del término resistencia, lo que hace difícil la comparación de las fuentes de resistencia entre los distintos estudios. Por otro lado la infección viene determinada por factores como el tipo de cepa o aislado de PPV usado en el inóculo, el método de inoculación, el tiempo desde la inoculación hasta la detección de virus o síntomas, la parte de la planta muestreada (ya que el virus muestra una distribución irregular, las partes con crecimiento activo presentan más síntomas), la época de muestreo en la que los síntomas pueden llegar a desaparecer como ocurre en algunos cultivos durante el verano (Lansac y col., 1982) y por último los métodos utilizados para la detección

(ELISA o PCR). Todo esto ha llevado a la clasificación de un mismo cultivar como resistente y susceptible según los procedimientos utilizados (Kegler y col., 1998).

En la naturaleza se han encontrado numerosas especies de *Prunus* en las cuales el virus se replica sin producir síntomas como ocurre en plantas de *P. armeniaca*, *P. glandulosa*, *P. insititia*, *P. persica*, *P. brigantina*, *P. laurocerasus*, *P. spinosa*, *P. salicina*, *P. tomentosa*, *P. triloba*, *P. avium* e *P. cerasus*, *P. amygdalus* en el cual el virus se replica pero sin inducir síntomas.

En cuanto a la resistencia del albaricoquero hay que resaltar que todas las variedades europeas son susceptibles a la sharka (Dosba y col., 1988a; 1988b; 1988c; Audergon y col., 1994; Dicenta y col., 1996). En cuanto a las variedades españolas sus síntomas son más evidentes en las variedades tempranas ('Currot', 'Palabras', 'Mauricios') que en las tardías ('Pepitos', 'Carrascal', y 'Velázquez')

Los primeros cultivares de albaricoquero resistentes procedían de Norteamérica (Karayiannis, 1989) principalmente de Estados Unidos ('Stark Early Orange', 'Stella', 'Henderson', 'NJA2', 'Goldrich', 'Sunglo') y Canada ('Hartcot', 'Harlayne', 'Veecot'). Desafortunadamente estas variedades resistentes presentan problemas para su cultivo en Europa presentando problemas como autoincompatibilidad, baja calidad del fruto y altos requerimientos de frío. Por todo esto en Europa se han desarrollado programas para obtener nuevas variedades resistentes así como caracterizar el nivel de resistencia de los cultivares actuales (Audergon y col., 1994; Egea y col., 1997). Fruto de estos programas de mejora son las variedades del IVIA de Valencia 'Moixent' y 'Dona Taronja', junto a las obtenidas por el CEBAS de Murcia 'Rojo Pasión', 'Murciana', 'Mirlo Naranja' y 'Mirlo Blanco' entre otras.

En cuanto al origen de la resistencia de las variedades norteamericanas se ha postuló que *Prunus mandshurica* podía ser el antecesor de las variedades 'Stark Early Orange' y 'Goldrich' (Badenes y col., 1996). *Prunus mandshurica* es una especie relacionada con el albaricoquero que crece en China y Mongolia y ha sido utilizada como fuente de resistencia frente al frío, pero en estudio para transmitir la resistencia frente a sharka al cultivar 'Currot' indicaba el efecto opuesto, lo que cuestiona que esta especie sea el origen de la resistencia a sharka en albaricoquero (Rubio y col., 2003b).

A pesar de todas las investigaciones para encontrar fuentes de resistencia en *Prunus* a lo largo de 50 años, hasta ahora solo se encontraron en unos pocos genotipos. En melocotonero, hasta la fecha y tras muchos y diversos screening de variedades realizados por numerosos grupos de investigaciones europeos, no se han encontrado fuentes de resistencia a PPV (Gabova, 1994; Escalettes y col., 1998; Pascal y col., 2002) pero la especie *P. davidiana* (especie silvestre relacionada con el melocotón) es resistente y puede actuar como fuente de resistencia (Kegler y col., 1998) aunque estudios recientes han demostrado que no es una fuente adecuada de resistencia (Rubio y col., 2010). Entre las variedades existen muchas diferencias del nivel de susceptibilidad, debido probablemente a resistencias parciales de tipo cuantitativo que limitan la replicación y disminuyen la velocidad de difusión de PPV en los tejidos de la planta, pero ninguna se presenta totalmente resistente.

En ciruelo una fuente de resistencia podría provenir de genotipos hipersensibles (Hartmann, 1998).

Además de las fuentes naturales de resistencia frente a PPV, desde la ingeniería genética se están llevando diferentes programas para obtener genotipos resistentes a PPV como la variedad de ciruelo 'Honey Sweet' obtenida mediante la clonación del gen de la cápside viral que ha demostrada una alta resistencia en estudios de campo y ha obtenido la aprobación por los organismos regulatorios de EEUU.

En albaricoquero se han descrito casos de de resistencia monogénica (Dicenta y col., 2000) y oligogénica (Dosba y col., 1988c; Dosba y col., 1991), pero la información sobre la resistencia y susceptibilidad es un poco contradictoria debido a los diferentes métodos de evaluación, la ubicación del cultivo y las cepas evaluadas.

Son muchos los genes candidatos que han sido amplificados por PCR, aislados y mapeados en el mapa de ligamiento de melocotón (especie modelo). Sin embargo hasta la fecha la resistencia no ha podido concretarse, mostrando un complejo patrón de herencia cuantitativa, siendo poligénica, en la que al menos hay implicados más de 3 genes (Decroocq y col., 2005).

Hay que recordar que los numerosos trabajos en resistencia de PPV en melocotonero, así como en otras especies, no siempre llevan a los mismos resultados, dejando multitud de dudas, debidas sobre todo a evaluaciones con un sólo tipo de

aislado, la metodología empleada para la inoculación, así como las técnicas de detección empleadas (visual, ELISA, RT-PCR) (Sansavini y col., 2006).

Polák y Oukropec (2010), después de 6 años de evaluación de híbridos interespecíficos, clasificaron como muy resistente a PPV GF677 (*P. amygdalus* X *P. persica*) y como resistente los híbridos 'Cadaman' (*P. davidiana* X *P. persica*) y 'Fire' (*P. amygdalus* X *P. persica*) confirmando que las especies *P. amygdalus* y *P. davidiana* resultan fuentes idóneas de resistencia a sharka.

Por otro lado, en varias plantas la resistencia a la infección por potyvirus ha sido relacionada con un gen recesivo del huésped que codifica por una forma mutada del factor de iniciación de la traducción 4E, lo que impide su unión a la proteína VPg del extremo 5' del RNA viral interfiriendo en su traducción.

Los programas de mejora intentan transmitir esta resistencia desde las fuentes identificadas a las variedades comerciales, pero este proceso es muy lento debido a los dilatados periodos juveniles y los largos protocolos para testar la resistencia.

Otra alternativa para generar resistencia a la sharka en frutales del género *Prunus* se basa en la transformación de plantas con el gen de la cápsida viral (CP) (Beachy y col., 1990) donde se ha conseguido generar una línea de ciruelo altamente resistente a sharka, C5, mediante la clonación de múltiples copias del transgen PPV-CP que da lugar a bajos niveles de PPV-CP RNA (Scorza y col., 1994) mediante un proceso de silenciamiento génico post-transcripcional. Esta resistencia actuaría como monogénica y dominante lo que aceleraría el proceso selectivo.

1.4. Análisis de la resistencia al *Plum pox virus* en albaricoquero

Los estudios de la resistencia a la sharka se iniciaron con el análisis de la segregación de esta característica al cruzar parentales susceptibles y resistentes, dentro de los programas de mejora basados en la genética clásica. Estos métodos fueron completados con la llegada de las primeras técnicas de análisis molecular que relacionaban el polimorfismo de la secuencia de DNA con la segregación de la resistencia. Finalmente, la llegada de las técnicas de secuenciación masiva del

transcriptoma han conseguido alcanzar un nivel superior en el conocimiento de los elementos moleculares responsables de la resistencia a la sharka en albaricoquero.

Los mecanismos de control genético de la resistencia frente a virus en plantas son dependiente del tipo de planta y virus (Fraser, 1990). Muchos estudios de resistencia se encuentran en discusión debido a los métodos empleados para su análisis e inoculación (Kegler y col., 1998).

1.4.1. Estudios genéticos y herencia del carácter

La genética clásica estudia la diversidad y el modo de herencia de los caracteres de los seres vivos, buscando relación entre carácter y gen para lo que realiza cruces controlados entre individuos para estudiar los datos de la segregación de esos caracteres en la descendencia.

La mayoría de los estudios genéticos de resistencia a potyvirus realizados en herbáceas muestran una herencia dependiente de un gen como en el caso de la patata (Barker y Harrison, 1984) o dos genes en el caso de híbridos interespecíficos de patata (Vallejo y col., 1995). Sin embargo en las plantas leñosas la resistencia parece tener un carácter más cuantitativo (Kegler y col., 1998).

La resistencia en albaricoquero sería un carácter complejo oligogénico (Dosba y col., 1991), la segregación de la resistencia entre las variedades 'Stark Early Orange' x 'Screara' generaría sólo tres híbridos resistentes a partir de una descendencia de 64 individuos. El mismo cruce en otro estudio publicado por Dosba en 1992, indicaba un progenie resistente del 29% ajustándose a un carácter dominado por dos genes. Estudios realizados sobre la segregación de la resistencia en 291 individuos obtenidos a partir de 20 cruces entre distintas variedades resistentes y susceptibles indicaban el carácter dominante y monogénico de la resistencia (Dicenta y col., 1999a). Un estudio sobre las progenies resultantes de los cruces Stark Early Orange x Stark Early Orange, Stark Early Orange x Bergeron y Bergeron x Bergeron indicaba que la segregación de la resistencia es dominante y controlada por tres genes (Guillet-Bellanger y Audergon, 2001). Otro estudio llamativo consistió en el cruce de la variedad susceptible 'Portici' con 'Stark Early Orange' de la que solo se obtuvo un descendiente resistente de una progenie de 108 a un aislado Tipo Marcus (Amenduni y col., 2004)

Estudios más recientes con 213 descendientes de tres cruces diferentes entre la variedad susceptible 'Polonais' y la resistente 'Stark Early Orange' (cruces entre si y autopolinizados) a los que se sometió a ajustes en el reparto de la resistencia con uno, dos o tres genes tanto resistentes como dominantes no indicó ningún resultado ajustado sin asumir un error superior al 20% en el genotipado de plantas resistentes (Rubio y col., 2007).

1.4.2. Estudios genómicos y análisis de QTLs

Tras la irrupción de las modernas técnicas moleculares que culminaron con la secuenciación del genoma humano, la investigación genética se propuso conocer el genoma de todas las especies de interés para la humanidad, entre ellas al melocotonero como especie representante del género *Prunus*. El objetivo de la genómica es conocer el contenido, evolución, origen, funcionamiento y estructura del genoma de los seres vivos (Martínez-Gómez y col., 2011a).

Los primeros estudios genómicos en *Prunus* tenían el objetivo de desarrollar marcadores moleculares distribuidos por todo el genoma de las distintas especies del género y de este modo establecer una caracterización estructural de los genomas. Además se pretendía establecer una relación entre los marcadores moleculares y las características agronómicas localizadas en una secuencia de DNA y conocer de este modo el contenido y distribución del genoma. Es decir, los marcadores moleculares son una herramienta para seguir la pista a un trozo de DNA. En los noventa aparecieron los primeros marcadores moleculares para el estudio del genoma, los RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) que se caracterizan por ser codominantes y muy abundantes en el genoma, pero tener que realizar digestiones enzimáticas que hacían el proceso tedioso junto con el abaratamiento de la secuenciación han convertido a esta técnica en obsoleta (Arús y col., 2005).

La irrupción de la PCR (Polymerase Chain Reaction) (Saiki y col., 1985) allanó el camino para el desarrollo de RPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs) marcadores de segunda generación más fáciles de aplicar lo que aumentó las posibilidades de caracterización y mapeo del genoma. Estos marcadores amplifican una región de DNA al azar no conocida previamente, lo que genera marcadores dominantes y poco

repetibles lo que limitó su uso.

Los marcadores AFLP (Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism) amplifican mediante PCR fragmentos de restricción lo que permite obtener un variado patrón de bandas distribuido por todo el genoma, sin embargo se trata de un procedimiento lento lo que limita su uso de manera rutinaria (Sorkheh y col., 2007).

Las dificultades en los marcadores mencionados ha hecho que actualmente la cartografía genómica se realice mediante marcadores SSR (Simple Sequence Repeat) también llamados microsatelites debido a su alto polimorfismo, abundancia en los genomas y carácter codominante (Gupta y col., 1996; Arús y col., 2005; Martínez-Gómez y col., 2011a).

Estos métodos basados en PCR están siendo sustituidos por nuevos marcadores desarrollados a partir de la secuenciación del DNA. Uno de los principales problemas para buscar marcadores moleculares basados en el conocimiento de la secuencia de los genomas radica en su tamaño. Inicialmente el genoma de *Prunus* fue estimado en 280 Mbp mediante técnicas de fluorescencia (Arumuganathan and Earle, 1991; Baird y col., 1994), esta estimación ha sido afinada mediante secuenciación a 227 Mbp (Sosinski y col., 2009; Verde y col., 2013). Tamaño considerado pequeño para un vegetal (Jackson y col. 2011), ya que se asemeja más al genoma de 115Mbp de *Arabidopsis thaliana* L. Heynh (2,4 veces más pequeño que el genoma de *Prunus*). En el otro extremo del reino vegetal tenemos *Abies piecea* con un genoma de 20 gigabases y con una estimación de 28.354 genes, similar al número de genes de *Arabidopsis thaliana*, cuyo genoma es 100 veces menor (Nystedt y col., 2013), este resultados se relacionan con acumulación de transposones y la falta de un mecanismo eficiente de eliminación.

Los estudios genómicos sobre la resistencia del albaricoquero a PPV basados en la secuenciación y transformación genética apuntan a tres posibles mecanismos moleculares de control de la resistencia:

a) El mapeado cromosómico del albaricoquero y su comparación con el genoma de referencia de melocotón ("Peach genome V1.0"; www.rosaceae.org/peach/genome) (Verde y col., 2013) sitúan la resistencia en la parte superior del grupo de ligamiento 1 (G1) y en una región de 10 cM (2.100.000 bp) entre

1 y 2 CM (370.000 a 700.000 bases) donde podría haber alrededor de 250 genes de los cuales han identificado solamente 6 transcritos. Estos trabajos apuntan a una resistencia con un gen mayor monogénica y dominante en albaricoquero con esta región como principal responsable (Zuriaga y col., 2013; Decrooq y col., 2014).

b) Estudios basados en la transformación de *Arabidopsis thaliana* han identificado como responsables de la resistencia a diferentes factores de iniciación de la traducción en eucariotas eIF4E, eIF4F, eIF4G y eIF4E y sus diferentes isoformas repartidas por todo el genoma. La resistencia sería poligénica (más de 3 genes) y recesiva en melocotón y dominante y oligogénica en albaricoquero aunque con un gen mayor. En este sentido, es conocida también la participación de componentes del complejo de iniciación de la traducción en eucariotas en la resistencia a potyvirus, siendo en más del 50% de los casos resistencia recesiva. Finalmente, los últimos estudios realizados, revelan la gran influencia del “background” genético del parental susceptible en la herencia de dicha resistencia (Decrooq y col., 2005; 2014).

c) Finalmente, otros estudios transformando el ciruelo ‘HoneySweet’ indican como responsable de la resistencia un transgen proveniente de la cápsida del PPV (PPV-CP) que induce silenciamiento génico y bloquea la dispersión sistémica del virus (Scorza y col., 1994). Este transgen se hereda como un gen mendeliano con un alelo simple dominante. Estos autores también hablan de la introducción de la resistencia en *Prunus* mediante “gene pyramiding”.

La aplicación de los marcadores moleculares junto con la segregación de las características agronómicas dio lugar a la elaboración de mapas de ligamiento genético (para características cualitativas) y QTL (Quantitative Trait Loci, para características cuantitativas). (Arús y col., 2005; Martínez-Gómez y col., 2007; Peace y Norelli, 2009).

Un QTL es una región del genoma responsable de la variación de carácter que puede ser relacionada con la variación alélica de un marcador (Asins, 2002; Collard y col., 2005). Se trata de una herramienta útil cuando no es posible obtener información específica sobre unos genes o loci específicos, pero si se dispone de marcadores que permiten seguir la composición alélica realizar su mapeo (Bertin y col., 2010; Olukolu y Kole, 2012; Soriano y col., 2008; 2012).

El análisis de QTLs sigue siendo una de los procedimientos más importantes en los estudios preliminares para la identificación de características agronómicas en *Prunus*. Esta herramienta junto con la secuenciación del genoma de referencia del melocotonero y los datos cada vez más abundantes de secuenciación masiva de transcriptomas establecen nuevas posibilidades para la aplicación de QTL en la identificación de los procesos moleculares responsables de múltiples características de interés (Martínez-Gómez y col., 2012) y facilitar las estrategias de hibridación vegetal (Dirlewanger y col., 2012; Boopathi, 2013). Sin embargo, el uso de los QTLs en mejora vegetal está limitado por la dispersión de la información en muchas publicaciones y la falta de procedimientos estandarizados. Con el fin de superar estas limitaciones se han desarrollado bases de datos de QTLs de *Prunus* para facilitar la comparación de la información y un meta-análisis de la información distribuida en las publicaciones (Hu y col., 2012). La Base de Datos del Genoma de *Rosaceae* (GDR, www.rosaceae.org, Jung y col., 2008) es la base de datos que integra la información genética, genómica y de cruzamientos de las especies de esta familia. La base de datos ESTree (www.itb.cnr.it/estree/) está especializada en datos de la genómica funcional de *Prunus*. Actualmente GDR contiene 885 QTLs relacionados con diferentes características agronómicas en múltiples especies dentro de la familia *Rosaceae* y 700 QTLs en *Prunus*.

Todos los marcadores relacionados con la resistencia a PPV que han sido estudiados en distintas especies han sido integrado en ocho pseudocromosomas formando un mapa de referencia genético del género *Prunus*. Respecto a los estudios de ligamiento, si bien al principio se localizó un “Quantitative Trait Loci” (QTL) mayor en el grupo de ligamiento (G) G1 como responsable de la resistencia a PPV en albaricoquero; trabajos posteriores identificaron otras regiones implicadas en los grupos 3 y 5, lo que apoyaría las tesis de resistencia poligénica (*Figura 1.9*).

Los estudios de segregación realizados con numerosos marcadores moleculares han permitido identificar varios QTLs relacionados con la resistencia a sharka en distintas especies del género. El QTLs más representativo se encuentra en el grupo de ligamiento (LG) 1 y se considera responsable de la resistencia a PPV en albaricoquero (Vilanova y col., 2003). Otros QTLs aparecen en los grupos 3 y 5 (Lambert y col., 2007;

Lalli y col., 2008; Sicard y col., 2008; Soriano y col., 2008). Se han realizado estudios más específicos que relacionan los QTLs con la resistencia a diferentes aislados de PPV en el LG1 de albaricoquero tipo D y tres asociados a aislados tipo M, y un QTL menor en el LG5 asociado a resistencia al tipo D (Pilarová y col., 2010) (Figura 1.9).

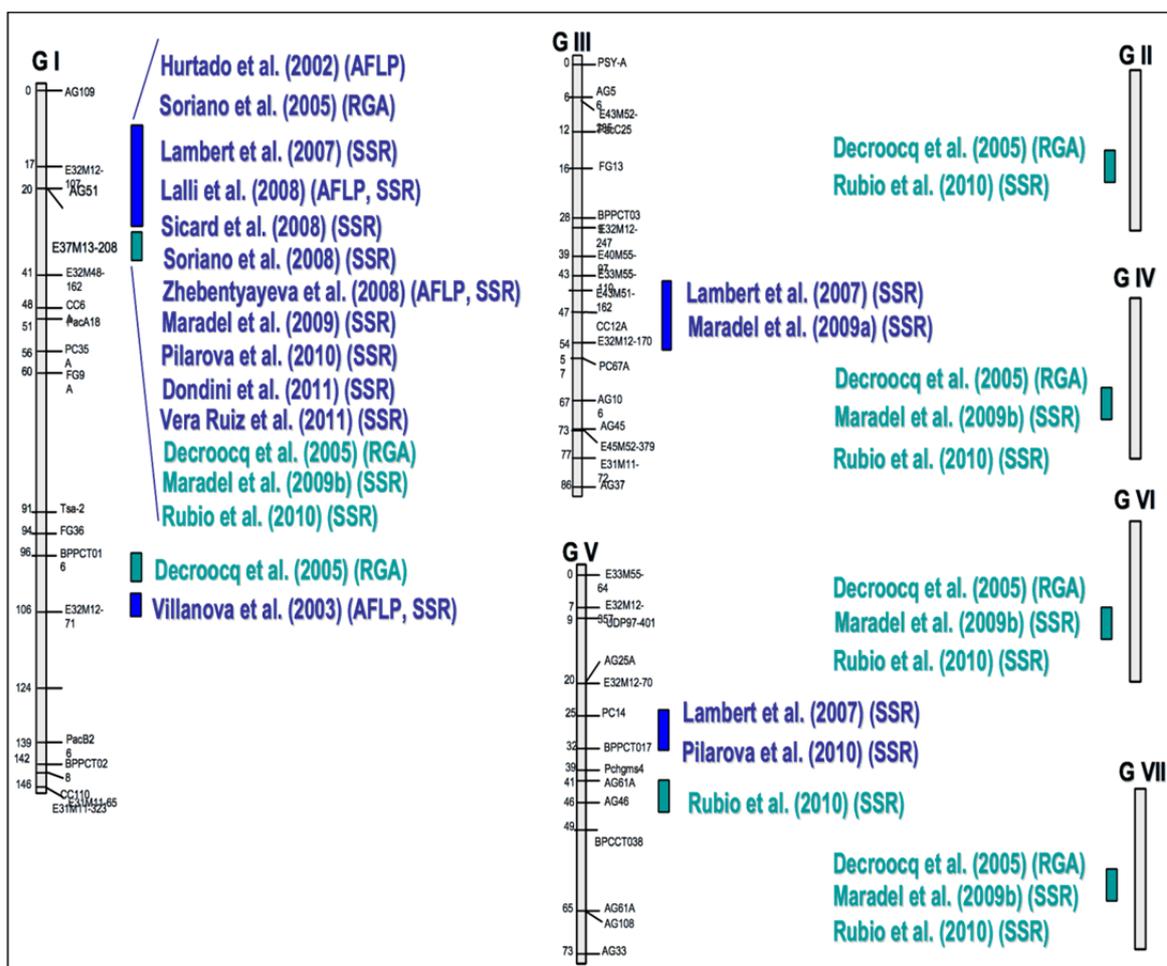


Figura 1.9. Distribución de los QTLs (entre paréntesis se indican los marcadores moleculares utilizados) relacionados con la resistencia a PPV en los grupos de ligamiento del genoma de Prunus indicando la referencia del estudio. En verde se indican los QTLs descritos en *P. davidiana* y en azul en albaricoquero.

Toda esta información sobre la resistencia a PPV en albaricoquero indica que se trata de un tipo de resistencia cuantitativa y parcial (Soriano y col., 2008). La diversidad genética del material estudiado dificulta la caracterización de las regiones responsables de la resistencia. (Rubio y col., 2010). La saturación de los mapas de ligamientos con más marcadores moleculares permitirá reducir el tamaño de los QTL responsables de la

resistencia y poder conocer los loci responsables de esas características (Sicard y col., 2008).

En melocotonero (concretamente en la especie próxima *P. davidiana*) se han descrito hasta 7 QTLs (ver figura adjunta donde se indica la localización de los QTLs ligados a la resistencia a PPV en albaricoquero y *P. davidiana* (Figura 1.9)).

1.4.3. Estudios transcriptómicos y proteómicos

El transcriptoma (RNA) es una expresión flexible del genoma (DNA) capaz de ajustarse a las necesidades del desarrollo y de los requerimientos medioambientales de los organismos vivos. El transcriptoma está constituido físicamente por el RNA tanto codificante como no codificante. El RNA es una molécula mucho menos estable que el DNA lo que facilita poder ajustar su número de copias mediante reciclaje. El RNA que podemos encontrar en un organismo puede ser codificante como es el caso del llamado RNA mensajero (mRNA) que puede representar un 5% del total, pero mayoritariamente es RNA llamado no codificante. Este último RNA puede ser estructural como el de transferencia (tRNA) (5-10% del total) y el ribosómico (rRNA) ARNr que puede representar hasta un 85% del RNA total. A su vez podemos hablar dentro del RNA no codificante del RNA regulador (3-5% del total) que incluye siRNA (pequeño de interferencia) (20 nt), micro RNA (miRNA) (20-25 nt), snoRNA (de 60 a 300 nt) y otras clases de RNA como el small nuclear (snRNA), Piwi-interacting RNA (piRNA) o scRNA (Bompfünnewerer y col., 2004; Kim, 2005; Gingeras, 2011; Atkins y col., 2011; Rodin y col., 2011; Watson y col., 2014) (Figura 1.10).

El transcriptoma presenta una mayor diversidad que el genoma del que se origina ya que a partir de una misma región de DNA se pueden generar varias molecular de RNA y este RNA puede ser nuevamente procesado para volver a aumentar su diversidad. El nudo gordiano del proceso de transcripción y expresión del ADN en un fenotipo concreto consiste en la traducción del mRNA maduro a la proteína; junto con la presencia de RNA no codificante y no regulatorio como el rRNA y tRNAARNt; y la regulación post-transcripcional y post-trasduccional (epigenética) de este mRNA por parte de pequeños RNA no codificantes pero sí reguladores (miRNA, siRNA, piRNA, snRNA o snoARN) (Figura 1.10) (Martínez-Gómez y col., 2012). Las

proteínas y el ARN forman una serie de redes que afectan a la expresión del ADN. Es esencial la comprensión del transcriptoma como molde para las proteínas y como elemento regulador para comprender los procesos de respuesta de la célula.

Es esencial la comprensión del genoma como molde para las proteínas y como elemento regulador para comprender los procesos de respuesta de la célula (Blencowe y col., 2009). El genoma presenta una mayor diversidad que el genoma del que se origina ya que a partir de una misma región de DNA se pueden generar varias molecular de RNA y este RNA puede ser nuevamente procesado para volver a aumentar su diversidad (Kapustin y col., 2008; Hallegger y col., 2010).

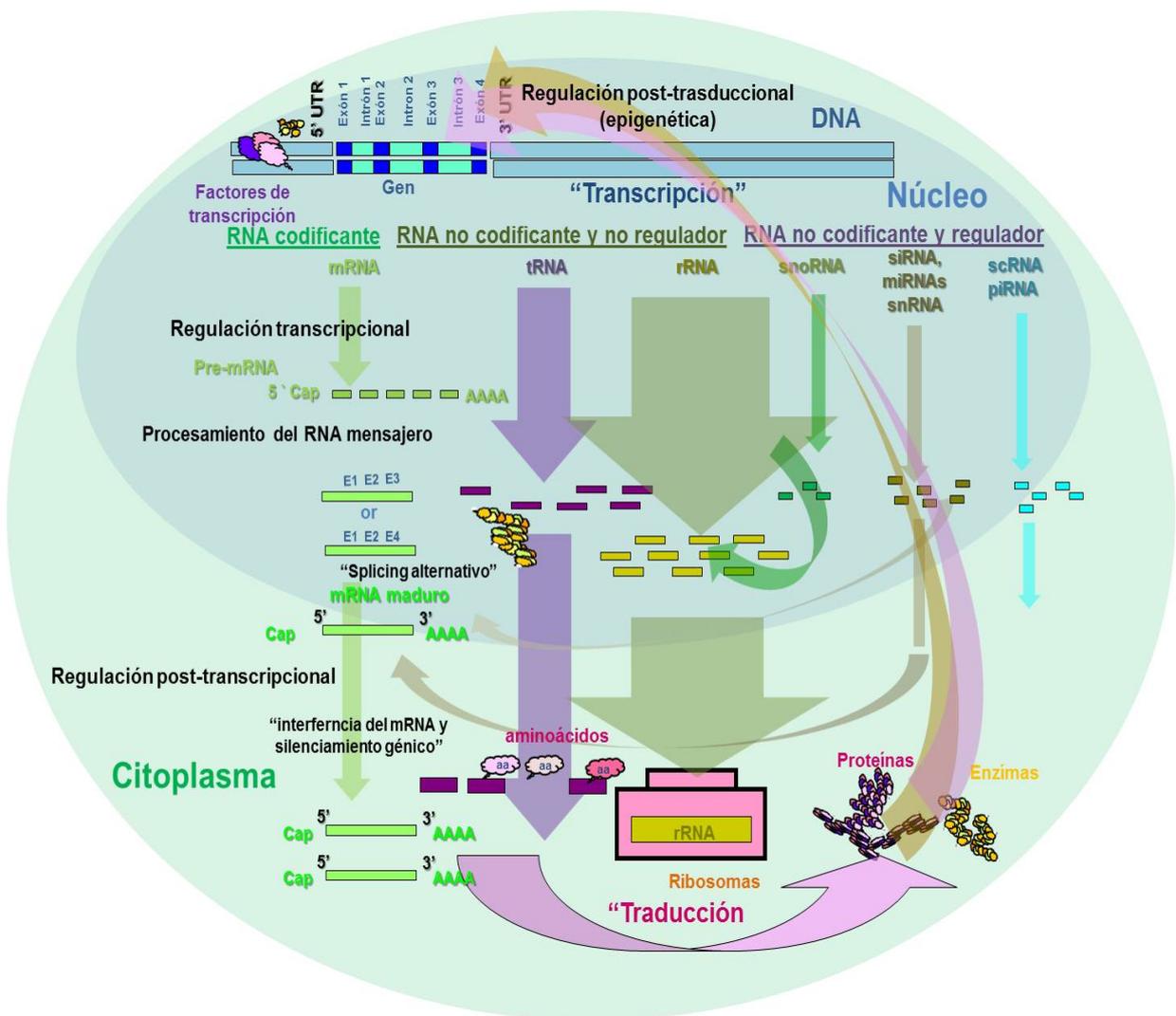


Figura 1.10. Representación esquemática de la regulación de la expresión génica en plantas. Adaptación de los trabajos de Atnis y col., 2011; Martínez-Gómez y col., 2012 y Rodin y col., 2011).

En melocotonero se han descrito 25.000 genes y se estima que a partir de ellos se generen casi un millón de proteínas distintas (Peace y Norelli, 2009), por lo que deben tener lugar multitud de procesos de 'splicing' alternativo a partir de un mismo gen así como procesos madurativos. Llegándose a describir 838 'splicing' alternativos en 26.689 genes codificantes de proteínas (Sosinski y col., 2010; Verde y col., 2013).

La enorme variabilidad de las proteínas generadas a partir de la limitada región codificante queda en manos de el RNA regulador del que hay numerosas referencias sobre su actuación a nivel transcripcional ('splicing' alternativo) y post-transcripcional (silenciamiento) (Bompfünnewerer y col., 2004; Matzke y col., 2004; Hodges y col., 2005; Chapman and Carrington, 2007; Newman, 2008).

El análisis del proteoma para obtener marcadores proteómicos se inició en la mitad de los 70 (Klose, 1975) y desde entonces ha sido muy usado en el análisis de especies de *Prunus*. Inicialmente se identificaban isoenzimas mediante electroforesis unidimensional teniendo la ventaja de ser un carácter codominante, pero esta técnica sólo permitía analizar muy pocos loci y estos además tenían escaso polimorfismo (Martínez-Gómez y col., 2007). Esta técnica ha sido muy poco utilizada en *Prunus* (Cánovas y col., 2004; Neilson y col., 2010).

Posteriormente se desarrolló la electrophoresis bidimensional que permite la separación de las proteínas en función del peso molecular y el pH. Los últimos avances en este campo vienen de espectrometría de masas que identifica pequeños péptidos tras la digestión de la muestra (Peace and Norelli, 2009). Las masas de los péptidos a continuación serán identificadas en una base de datos para finalmente deducir su identidad. Esta técnica ha sido muy poco utilizada en *Prunus* (Cánovas y col., 2004; Neilson y col., 2010).

Los resultados sugieren que la mayor capacidad antioxidante de las variedades de albaricoquero podría estar asociada, entre otros factores, con su resistencia a PPV.

Por otro lado en estudios de proteínas mediante electroforesis en 2D, encontraron que la infección por PPV produce la inducción de una proteína similar a la taumatina, así como la disminución de la mandelonitrilo liasa (MDL) en la apoplasto en

melocotonero (Díaz-Vivancos y col., 2006; Clemente-Moreno y col., 2015) (Figura 1.11).

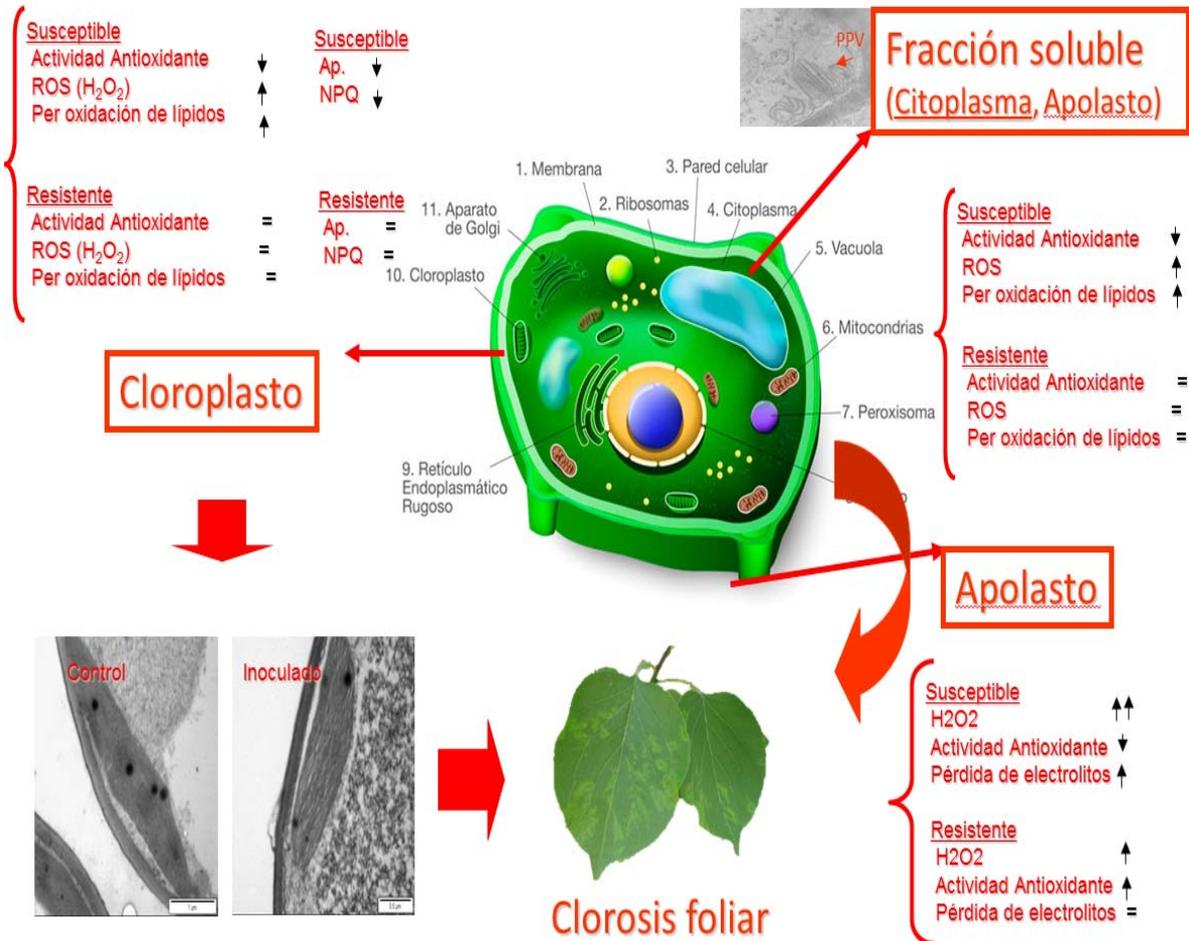


Figura 1.11. Actividad oxidativa en los distintos compartimentos celulares en respuesta a PPV en albaricoquero y melocotonero.

En la Figura 1.11 se indican los cambios metabólicos observados en variedades de albaricoquero resistentes y susceptibles en citoplasma, cloroplasto y apolasto o espacio intercelular.

1.4.4. Técnicas de secuenciación masiva del transcriptoma (RNA-Seq)

Los estudios moleculares dentro del *Prunus* se han orientado principalmente al ADN, siendo muy escasas las investigaciones sobre transcriptómicas basadas en el RNA (Dirlewanger y col. 2004, 2009; Shulaev y col. 2008; Peace and Norelli 2009). Los

estudios transcriptómicos en *Prunus* se han realizado principalmente en melocotonero (Abbott 2012; Pozzi and Vecchiatti 2009), almendro (Martínez-Gómez y col. 2007; Arús y col. 2009), albaricoquero (Folta and Gardiner 2009), cerezo (Dirlewanger y col. 2009); y ciruelo (Esmenjaud and Dirlewanger 2007). Todos estos estudios han permitido el primer mapa físico del genoma del melocotonero, que es la especie referente para el género (Zhebentyayeva y col., 2008).

Este mapa inicial constaba de 2.138 contigs repartidos en 15.655 BAC (cromosomas artificiales de bacterias). Recientemente la secuenciación del genoma completo del melocotón por el IPGI (The International Peach Genome Initiative, quedando la secuencia disponible en <http://www.rosaceae.org> (Sosinski y col., 2010; Verde y col., 2013) que ofrece nuevas oportunidades para realizar estudios genómicos y transcriptómicos en las distintas especies del género debido al alto grado de sintenia dentro del género (Dirlewanger y col., 2004; Jung y col., 2009).

1.5. Justificación y Objetivos de la Tesis

El albaricoquero es un cultivo con enorme importancia económica en nuestro país y la Región de Murcia, su cultivo no está saturado y presenta buenas expectativas para la exportación, por lo que puede suponer una fuente de crecimiento económico. El principal factor limitante de este cultivo y de los demás cultivo del género *Prunus* es la sharka, cuyo única forma de control definitivo es generar variedades resistentes. La propagación de la sharka supone un enorme coste económico para los productores al hacer inercializables los frutos de esta especie.

Los métodos tradicionales de obtención de variedades leñosas requieren múltiples cruces para seleccionar genotipos donde confluyan características agronómicas deseadas junto con la resistencia, lo que dilata enormemente el proceso. El aumento de los conocimientos moleculares sobre la resistencia a sharka permitirá hacer selecciones en fase de plántula lo que ahorra tiempo y recursos económicos derivados del mantenimiento de cada uno de los ejemplares a estudiar.

La mejora genética clásica consiste en el cruzamiento de variedades con la intención de aunar en un único genotipo aquellas características que más nos interesen. Para ello, tras los cruzamientos es necesario esperar periodos de al menos 3 años para poder llevar a cabo un primer fenotipado de la población de estudio, realizando este proceso durante 2 o 3 años más. Esto supone una espera de entre 5 y 6 años para obtener unos resultados robustos del fenotipo que nos permitan la selección de genotipos de interés y por tanto la obtención de nuevas variedades.

En base a esta problemática de la sharka y la obtención de nuevas variedades de albaricoquero resistentes, el objetivo general de esta tesis es aumentar los conocimientos moleculares a nivel genómico, transcryptómico y hormonal sobre la resistencia a sharka. Además se persiguen los siguientes objetivos específicos:

- Recopilar información sobre los distintos estudios genéticos, genómicos, transcryptómicos y proteómicos sobre la resistencia a sharka en PPV en *Prunus*
- Identificar nuevos marcadores SSR y SNP asociados con la resistencia a sharka en albaricoquero.
- Identificar genes con expresión diferencial entre la variedad resistente 'Rojo Pasión' y susceptible 'Z506-7' de albaricoquero, mediante la secuenciación masiva y comparación de sus transcriptomas. Mediante la comparación de estos transcriptomas entre si, antes y después de ser inoculados con PPV. Para conocer los mecanismos moleculares de la resistencia.
- Identificar los perfiles hormonales en la variedad resistente 'Rojo Pasión' y susceptible 'Z506-7' de albaricoquero antes y después de la infección, y establecer relaciones con la susceptibilidad y resistencia.

2. Material biológico y condiciones experimentales

2. MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES EXPERIMENTALES

2.1 Material vegetal

2.1.1. Variedades de albaricoquero

Las variedades ensayadas en esta Tesis pertenecen a la Colección de Variedades de Albaricoquero del CEBAS-CSIC y los árboles se encuentran en la finca experimental que el CEBAS-CSIC posee en el municipio de Cieza localizada en el sureste español entre los municipios de Cieza y Calasparra (Murcia) (lat. 37º N, long. 1º E). La finca se encuentra situada a 310 m de altitud, cercana de la ribera del río Segura limitando al norte con un importante macizo montañoso (*Figura 2.1*).



Figura 2.1. Vista general de la colección de variedades de albaricoquero situada en la finca del CEBAS-CSIC, en Cieza (Murcia).

La pluviometría media en el área donde se encuentra ubicada la finca experimental se sitúa en torno a los 300 mm de lluvia anuales. En cuanto a las características climáticas, debemos indicar que este emplazamiento se caracteriza por una acumulación media-alta de frío invernal la mayoría de los años, suficiente para satisfacer las necesidades de frío de la mayoría de las variedades de albaricoquero favoreciendo una adecuada ruptura del letargo invernal. No obstante, las oscilaciones en cuanto a la cantidad de frío acumulado y los periodos de acumulación de frío son notables, lo que afecta notablemente a las fechas de

floración y consiguientemente a las fechas de maduración. A continuación se describen las variedades de albaricoquero utilizadas en esta memoria:

Bergeron: Variedad francesa obtenida en el INRA, autocompatible, de floración y maduración tardía. La fruta es de buen tamaño y tiene cierta acidez, presentando alta productividad y buena aptitud industrial, con gran capacidad para la conservación en frío.

Búlida: Variedad murciana autocompatible y fundamentalmente cultivada en nuestra región. Su fruto, de tamaño medio, se destina principalmente a la conserva, aunque en las zonas de recolección precoz se comercializa en fresco. Es la variedad más importante tanto a nivel regional como nacional. Presenta una gran susceptibilidad a viruela, mostrando fuertes síntomas de la enfermedad.

Currot: Variedad valenciana autocompatible incluida dentro del grupo de los valencianos tempranos, que madura la primera quincena de mayo. Aunque los primeros años no muestra una gran productividad, posteriormente comienza a producir bien y esta producción se estabiliza. Sus frutos son de calibre pequeño y de color amarillo claro.

Goldrich: Variedad de origen estadounidense, obtenida en la Universidad de Washington del cruzamiento Sunglo x Perfection. Es autoincompatible y muy productiva. Su fruto es grande, tiene cierta acidez y un color anaranjado.

Mauricio: Variedad española, principalmente cultivada en la Región de Murcia. Es autocompatible, de maduración precoz, productiva y con una aceptable calidad del fruto.

Orange Red: Procedente del programa de mejora de New Jersey del cruzamiento de Largerdi Mashhad (de origen iraní) con NJA2, también obtenida en New Jersey. Es autoincompatible, presentando buena calidad gustativa y un aspecto muy atractivo, con carne naranja y chapa roja.

Rojo Pasión: Variedad obtenida en el CEBAS-CSIC de Murcia, descendiente del cruzamiento Orange Red x Currot. Es autocompatible, de maduración precoz y muy productiva. Su fruto es de carne naranja claro y de buena calidad gustativa, con una chapa roja y un tamaño aceptable para su época de maduración tan temprana.

Valorange: Variedad obtenida en el CEBAS-CSIC de Murcia del cruzamiento Orange Red x Currot. Es una variedad autocompatible, muy productiva y de maduración intermedia. Su fruto es anaranjado, con notable chapa roja y de gran calidad gustativa. Resistente a PPV.

Z506-7: Selección obtenida en el CEBAS-CSIC de Murcia del cruzamiento Goldrich x Lito. Es autocompatible, con un fruto anaranjado de gran calidad. Se caracteriza por su elevada susceptibilidad a PPV.

2.1.2. Patrones de *Prunus*

Los patrones utilizados fueron elegidos por ser susceptibles a PPV y por ser los utilizados tradicionalmente en los ensayos de resistencia a virus en frutales de hueso.

Melocotonero 'GF305': Patrón franco seleccionado en la estación experimental de la "Grande Ferrade" de Burdeos. Como patrón comercial es muy poco utilizado y destaca por su gran vigor y la rápida entrada en producción de la variedad. Es utilizado frecuentemente como indicador biológico en los sistemas de cuarentena y en la evaluación de la resistencia a virosis de frutales. Las plantas empleadas en esta tesis proceden de semillas facilitadas por "Pèpinières Serge Lafond S.A.R.L." (Valréas, Francia).

Albaricoquero 'Real Fino': Como la mayoría de albaricoqueros francos, induce longevidad y elevada productividad a las variedades, si los suelos son adecuados. Generalmente prefieren suelos sueltos, profundos y bien drenados. No se conocen incompatibilidades con las variedades de albaricoquero. Uno de los inconvenientes principales de su uso es que induce un desarrollo vegetativo excesivo. Las plantas utilizadas en nuestros ensayos proceden de semillas de Real Fino obtenidas en la industria conservera de Pliego en Murcia.

2.2. Aislado del *Plum pox virus*

El aislado utilizado será el tipo Dideron (D) 3.30-RB/GF-IVIA, procedente de ciruelo 'Red Beaut' que llegó a nuestro laboratorio a través del IVIA de Valencia, conservado en melocotonero 'GF305' desde hace 20 años y considerado

representativo de la población de aislados de PPV en España. Este aislado de PPV 3.30-RB/GF-IVIA fue secuenciado completamente mediante RNA-Seq (Rubio y col., 2015) e introducido en la base de datos del NCBI como la accesión del NCBI número KJ849228.1.

2.3. Condiciones experimentales de cultivo

El cultivo del material vegetal tuvo lugar en la finca del CEBAS-CSIC de Santomera, bajo condiciones de invernadero con doble puerta y mallas laterales a prueba de áfidos para evitar infecciones no controladas del material experimental. Las condiciones de riego variaban según las necesidades hídricas de acuerdo con la temperatura. También se disponía de una malla de sombreo aluminizada y de un sistema de enfriamiento (“cooling”) para controlar el reducir el estrés durante los meses más extremos.

El material vegetal fue cultivado en macetas de 3,5 litros con un 80% de turba y un 20% de perlita.

Se obtuvo un patrón de albaricoquero ‘Real Fino’ sobre el que se injertó el material a analizar. Estos patrones se obtuvieron germinando huesos de albaricoquero estratificados 90 días en vermiculita a 7 °C. Previamente las semillas fueron desinfectadas con TMTD al 2% durante 20 minutos e hidratadas durante 24 horas.

Dos meses tras la germinación del patrón se procedió a la inoculación del virus PPV-D cepa 3.30 RB/GF-IVIA (GenBank: KJ849228.1) mediante un injerto en escudete de corteza de ‘Real Fino’ con fuertes síntomas de sharka y con crecimiento activo por su efectividad en la transmisión del virus (Martínez-Gómez y col., 2000). El estado no lignificado de la corteza de estos patrones favorece una mejor efectividad de transmisión del virus desde el injerto.

Se realizaron cuatro inoculaciones de patrones ‘Real Fino’. Se mantuvieron dos plantas de semillero adicionales como control. Dos meses más tarde se injertaron seis réplicas de clones ‘Rojo Pasión’ y ‘Z506-7’ en patrones ‘Real Fino’ previamente infectados. Un mes después del injerto las plantas fueron sometidas a un periodo de

dormancia artificial en oscuridad a 7°C durante dos meses para luego ser transferidos a un invernadero. Los síntomas de sharka fueron valorados de 0 (sin síntomas) a 5 (máxima intensidad de síntomas).

2.3.1. Inoculación de los patrones mediante injerto

Este proceso consiste en cortar pequeñas cortezas o chapas del tallo de la planta fuente de inóculo con una navaja e introducirlas en pequeños cortes realizados en el tallo de los patrones sanos. Luego se recubren con parafilm para proteger el injerto, evitando de esta forma el desprendimiento de la corteza y mejorando su conexión con los vasos conductores de la planta.

Anteriormente a la inoculación de las plantas sometidas al proceso de evaluación de resistencia a PPV. Estos experimentos tuvieron lugar durante un ciclo de crecimiento de las plantas, y se llevaron a cabo en un invernadero en condiciones controladas.

El injerto es posible realizarlo en dos modalidades: a “yema viva” (mayo) y a “yema dormida” (febrero y septiembre). Nuestra injerta de variedades de albaricoquero se realizó sobre los patrones previamente inoculados con el aislado PPV-D y tuvo lugar en octubre de 2011 a “yema dormida” tras el ciclo de frío y un mes aproximadamente de crecimiento en invernadero.

El método que se utilizó es el injerto del tipo escudete, consistente en la colocación de una yema de la variedad en el patrón mediante un corte en forma de “T” en el tallo y sujetándola con una cinta de plástico que más tarde se cortó para facilitar el crecimiento en grosor de la planta (*Figura 2.2*).

Se injertaron 6 repeticiones de cada una de las variedades en los patrones inoculados, escogiendo 3 melocotoneros GF305 y 3 albaricoqueros Real Fino (*Figura 2.6*). De esta forma, hemos trabajado con 102 plantas injertadas con nuestras 17 variedades comerciales de albaricoquero.

2.3.2. Ciclo de crecimiento artificial

Una vez obtenido el patrón, inoculado e injertado con la variedad correspondiente, las plantas se mantuvieron en un invernadero de condiciones controladas a prueba de insectos, con sistema de refrigeración "cooling" y malla de sombreo (Figura 2.2).

El riego en los primeros estados vegetativos fue manual, con una frecuencia dependiente del crecimiento de cada planta. Cuando éste estuvo más avanzado, se llevo a cabo mediante un programador apoyado por riegos manuales en función de las necesidades de las plantas. El abonado se realizó por fertirrigación cada mes aproximadamente.

Aunque el invernadero se encontraba en condiciones de aislamiento, se realizó un control fitosanitario preventivo al objeto de mantenerlo en perfectas condiciones sanitarias (Figura 3.6). La aplicación de los tratamientos se realizó mensualmente, alternando tres tratamientos diferentes para garantizar la ausencia de otras plagas o enfermedades que pudieran interferir en los ensayos de evaluación.

Los frutales de hueso poseen un crecimiento cíclico anual, con una entrada en letargo en invierno y crecimiento el resto del año. Con la intención de acelerar este ciclo natural, y por tanto la evaluación de los resultados, las plantas fueron sometidas a ciclos de crecimiento artificial, alternando periodos de letargo inducido en cámara fría a 7 °C y periodos de crecimiento en invernadero. Así, es posible realizar dos ciclos anuales, uno en primavera y otro en otoño (Figura 2.2).

La germinación de las semillas se llevó a cabo entre diciembre y enero en cámara fría a 7 °C. A principios de febrero se sembraron en macetas y se dispusieron en el invernadero en condiciones controladas produciéndose el primer crecimiento vegetativo de las plántulas hasta julio. El 1 de este mes se introdujeron en cámara fría induciéndoles el letargo. Tras dos meses de frío, los patrones se llevaron al invernadero donde experimentaron un segundo periodo de crecimiento en el que se inocularon con PPV y se injertaron las variedades de albaricoquero.

Tras otro periodo de frío, los patrones injertados crecieron de nuevo en invernadero hasta julio (Figura 2.3).

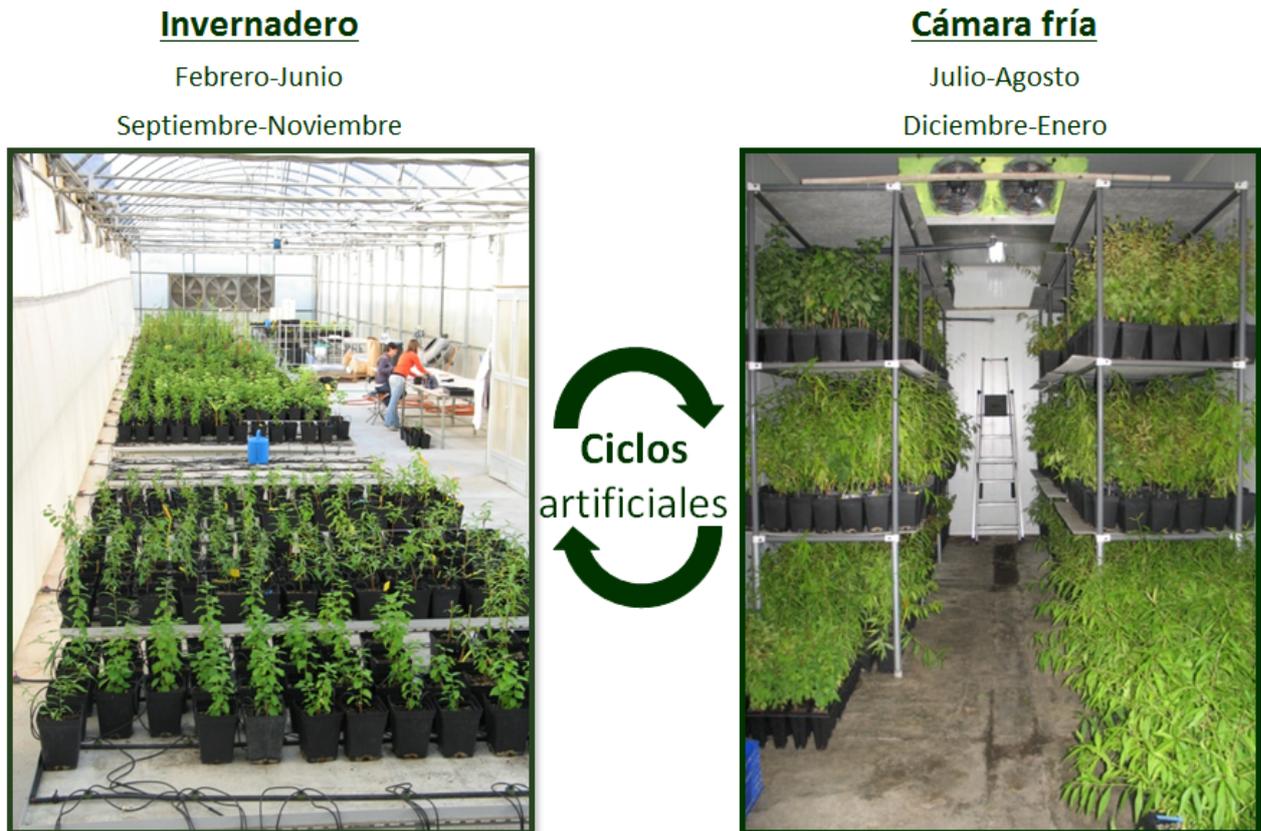


Figura 2.2. Invernadero de condiciones controladas a prueba de insectos donde se realizan los ensayos e interior de la cámara frigorífica donde se indujeron los periodos de letargo y se procedió a la estratificación de las semillas.

Como se ha indicado, PPV experimenta un mayor crecimiento dentro de la planta en tejidos jóvenes con crecimiento activo y sin condiciones estresantes de temperatura, por lo que el muestreo de hoja de las variedades para la evaluación se realizó a mediados de Abril.

2.4.-Detección del PPV

2.4.1. ELISA-DASI

La presencia de PPV fue confirmada mediante DASI-ELISA con el anticuerpo monoclonal específico 5B-IVIA/AMR (Plant Print Diagnostics SL, Valencia, Spain). La variante usada fue el ELISA-DAS (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay - Double Antibody Sandwich) que es la técnica más utilizada para la detección de la sharka (Lommel y col., 1982; Albrechtova, 1990).

Se seleccionaron hojas jóvenes en crecimiento para asegurarnos la detección del virus (Albrechtova, 1990) ya que PPV tiene una distribución errática y escasa dentro de las especies del género *Prunus* (Audergon y col., 1989). Se analizaron hojas de los patrones y de las plantas injertadas tanto controles como inoculadas.

Esta prueba consta de las siguientes fases:

- *Tapizado*: se añaden inmunoglobulinas específicas en tampón carbonato para que recubran el fondo de los pocillos. Estas inmunoglobulinas son específicas para la proteína de la cápside del virus. Se incubaron durante cuatro horas a 30 °C.

- *Adición de la muestra*: se tritura la muestra con el tampón de extracción. El extracto resultante es depositado en los pocillos para ser incubado 16 horas a 4 °C. Las muestras con proteína de la cápside del virus se unirán de al anticuerpo del tapizado. A continuación se lavará con tampón AFT+Tween 20.

- *Adición del anticuerpo monoclonal*: en cada pocillo se añaden los anticuerpos monoclonales específicos de PPV (5B-IVIA/AMR) disueltos en tampón que se unirán a los antígenos de la cápside viral que hayan sido fijados en la fase previa. Se incuban 2 horas a 37 °C.

- *Adición de anticuerpos anti-ratón conjugados con fosfatasa alcalina*: estos anticuerpos son añadidos a cada pocillo para que se unan a los anticuerpos monoclonales de la etapa anterior. Incubación dos horas a 37°C.

- *Revelado y lectura de la reacción de la fosfatasa*: se añade a cada pocillo el sustrato de la fosfatasa alcalina (*p*-nitrofenilfosfato). Los pocillos con el anticuerpo conjugado con la fosfatasa alcalina producirán una reacción con un producto amarillo. Incubación 60 minutos. La placa se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación se midió su densidad óptica (DO) a 405 nm. La muestra se considerada positiva (ELISA +) si su DO a los 60 minutos supera dos veces la DO media de los controles negativos (Sutula y col., 1986).

2.4.2. RT-PCR

Para corroborar la detección del virus se utilizó la técnica RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) (Wetzel y col., 1991) ya que PPV es un virus de RNA. Esta prueba se compone de las siguientes fases:

-*Extracción del RNA*: mediante el kit comercial de extracción de RNA Rneasy Plant Mini Kit (QIAGEN).

-*Retrotranscripción del ARN*: el paso de RNA a cDNA se realizó mediante la retrotranscriptasa AMV (Promega). Se tomán 4 microlitros de la solución con RNA y 2,5 microlitros de cebadores antisentido para la PCR. Se incuba 3 minutos a 85°C y después se deja a 50°C durante 25 minutos para que se linealice la cadena de RNA y se unan los oligonucleótidos.

-*Amplificación de la cadena de cDNA*: el cDNA de la fase anterior se incuba con oligonucleótidos específicos para la proteína de la cápside VP337 (5' CTCTGTGCCTCTTCTTG 3') y VP338 (5' CAATAAAGCCATTGTTGGATC 3') (Martínez-Gómez y col., 2003; Sánchez-Navarro y col., 2005) y se somete a una serie de ciclos de amplificación en el termociclador Mastercycler de EPPENDORF.

-*Visualización de los resultados:* tras la amplificación las muestras son analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. El DNA fue teñido con bromuro de etidio y a continuación se visualizan con luz UV. Si se ha producido amplificación se observará una banda de 313 pb correspondiente al tamaño entre los cebadores VP-337 y VP-338.

3. Polimorfismo genómico

3. POLIMORFISMO GENÓMICO

3.1. Introducción y objetivos

La caracterización genotípica mediante marcadores moleculares implica una serie de técnicas que permiten caracterizar los genotipos de interés en cualquier especie a nivel de su ADN. Estas metodologías generan patrones (polimorfismos) empleados para identificar especies, variedades o individuos. Asimismo se pretende asociar dichos polimorfismos de DNA a características de interés pomológico o agronómico, previa construcción de mapas de ligamiento genético, mediante el desarrollo de marcadores moleculares específicos que nos permitan la selección de genotipos de interés a nivel de vivero y por tanto acelerar y mejorar la eficiencia de los programas de mejora genética clásica. Es la denominada mejora asistida por marcadores moleculares (Arús y col., 2005). Las características idóneas para un marcador son las siguientes:

- Económico, rápido, consistente, de fácil desarrollo y aplicación
- Aplicable sin conocer la secuencia a estudiar
- Detección a partir de muestras pequeñas
- Polimórfico y co-dominante
- Transferible en cruzamientos e introgresiones
- Ausencia de influencia ambiental, efectos epistáticos y pleiotrópicos

Tipos de marcadores moleculares aplicados

En sentido estricto podemos describir los marcadores moleculares como los dedicados al análisis del ADN, si bien al inicio de utilización de la técnica se incorporaron los marcadores de isoenzimas (proteínas) en esta denominación (Arús y col., 2005; Martínez-Gómez y col., 2007; 2012). Los marcadores de DNA presentan importantes ventajas frente a los proteicos (isoenzimas), ya que no se ven afectados por variaciones ambientales ni de desarrollo, muestran la base misma de la variación de los individuos, permiten seleccionar regiones concretas del DNA para estudios determinados, el número de polimorfismos detectables es teóricamente ilimitado y permiten analizar tanto la información que se expresa como la que no.

Tras el proceso de extracción del DNA la separación de los fragmentos estudiados se realiza en geles de agarosa o acrilamida visualizándose con diferentes técnicas de tinción. Más recientemente se están utilizando secuenciadores de capilaridad para este análisis de polimorfismos. Podemos encontrar 2 grandes grupos de marcadores de ADN, los RFLPs y los basados en la técnica de la PCR.

SSRs (Simple Sequence Repeats)

Los microsatélites también llamados Sequence Tagged Microsatellite Sites (STMS) o SSRs (Gupta y col., 1996) son repeticiones en tandem de secuencias de DNA de 1 a 6 pares de bases como repeticiones imperfectas (interrumpidas) o juntas con otro tipo de repetición. Estos fragmentos de DNA repetidos están flanqueados por secuencias de copia única o simple, que proporcionan el punto de partida para la amplificación específica por PCR. Los cebadores complementarios a las secuencias únicas en las que flanquean regiones pueden ser designados para amplificar productos de copia única. Los marcadores tipo microsatélite incluidos dentro de los marcadores de segunda generación son los más utilizados por los investigadores en las técnicas basadas en la PCR para el mapeo del genoma en plantas. Estos marcadores han sido descritos como los mejores marcadores de DNA para la evaluación de la diversidad genética entre especies de plantas (1).

SNPs (Single Nucleotide Polymorphism)

Los SNPs son marcadores bi-alélicos de nueva generación que desenmascaran polimorfismos entre individuos debido a variaciones de un solo nucleótido. Estas variaciones de un solo nucleótido surgen debido a mutaciones puntuales. La detección de SNPs requiere de algunos ensayos previos de automatización. Esta técnica está siendo usada en métodos basados en geles y sin gel para detectar abundantes polimorfismos (Martínez-García y col., 2013a; 2013b; 2013c).

Sin embargo, se requiere una adecuada información de la secuencia. En el caso de los métodos basados en geles, se diseñan cebadores específicos lo que da lugar a la amplificación de alelos positivos debido a la coincidencia exacta de imprimación. En el caso de los métodos basados en la ausencia de gel, las regiones

más adecuadas son amplificadas siendo las diferencias detectadas por técnicas tales como la desnaturalización mediante “High Performance Liquid Chromatography (HPLC)” o “Matrix-Assisted” Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass spectrometry (MALDI-TOF MS)”.

Ambas técnicas son extremadamente sensibles y son capaces de detectar diferencias de un solo nucleótido. Los marcadores tipo SNP que presentan algunas ventajas con respecto a los marcadores tipo SSR, están siendo últimamente utilizados cada vez más en el mapeo y detección de QTLs en especies del género *Prunus*, tal y como se describe en los trabajos de Martínez-García y col. (2013a, 2013b, 2013c) o Eduardo y col. (2013) en diferentes poblaciones de melocotonero.

Además, los diferentes marcadores moleculares observados en diferentes mapas del género *Prunus*, sugieren altos niveles de sintenia (Jung y col., 2009), lo que nos permite el uso de estos marcadores entre distintas especies del género *Prunus*. La mayoría de los caracteres de calidad del fruto son generalmente heredados cuantitativamente y controlados por varios genes (poligénicos).

Estos caracteres cuantitativos varían de forma continua y normalmente se rigen por un número de genes. La naturaleza de los caracteres cuantitativos es que su expresión está controlada por varios o decenas de loci cuantitativos (QTLs) que tienen un efecto pequeño sobre el carácter. Así pues, el objetivo del mapeo de QTLs es determinar los loci que son responsables de las variaciones de estos caracteres cuantitativos y encontrar los genes que los influyen. La determinación del número, localización e interacción de estos loci son el objetivo final junto con la identificación de los genes implicados y sus funciones.

En estos estudios moleculares, los marcadores SSR (Simple Sequence Repeat) han llegado a ser los más importantes para la mejora de plantas debido a su alta variabilidad, naturaleza multialélica, herencia co-dominante, reproducibilidad, abundancia relativa, cubren una zona extensa del genoma, localización específica en el cromosoma, automatización y genotipado de alto rendimiento (Campoy y col., 2011).

Uno de los objetivos más importantes en la aplicación de los marcadores moleculares en especies de interés agrícola ha sido la construcción de mapas de ligamiento genético y detección de QTLs. Estos mapas nos sirven para identificar diferentes regiones

en los cromosomas que controlan caracteres simples (único gen) o caracteres cuantitativos (varios genes) usando el análisis de QTLs (Collard y col., 2005). Los estudios sobre identificación de QTLs relacionados con calidad del fruto en albaricoquero son escasos. Ruiz y col. (2010b) describieron el primer estudio identificando varios QTLs ligados a fecha de floración, fecha de maduración, peso del fruto, peso del hueso, color de fondo de piel, firmeza, contenido en azúcares y acidez. Más recientemente, Campoy y col. (2011b) identificaron un QTL asociado a fecha de floración y Socquet-Juglard y col. (2012) varios QTLs ligados al contenido en sólidos solubles, color de fondo de piel y forma de la fruta.

Los últimos avances tecnológicos en el genotipado de especies fundamentalmente con el uso de los SNPs han dado lugar a una importante disminución tanto del tiempo como de los costes del genotipado (Tavassolian y col., 2010; Ahmad y col., 2011; Martínez-García y col., 2013a; 2013b).

En el caso de Martínez-García y col. (2013b) en las poblaciones de melocotonero Pop-DF y Pop-DG logran mapear 1037 y 738 SNPs respectivamente, localizando importantes QTLs asociados a textura harinosa y tonalidades rojizas de la pulpa en el LG 4, pardeamiento de pulpa en el LG 5, así como también susceptibilidad a daños por frío. La alta densidad de estos mapas nos da una idea del potencial que llegan a tener las plataformas de alto rendimiento para el mapeo genético de SNPs, lo que supone sin duda alguna una herramienta muy potente para la detección de QTLs y genes candidatos ligados a caracteres de calidad del fruto en cualquier especie del género *Prunus*.

Por tanto, se está produciendo un incremento en el uso de los SNPs, los cuales a pesar de su naturaleza bialélica (proporcionando menos información por locus) pueden cubrir amplias zonas del genoma, ya que la abundancia de los mismos es bastante alta pudiendo utilizar un gran número de SNPs en el mapeo (Martínez-García y col., 2013a; 2013b).

Paralelamente, surge la posibilidad de construir mapas combinando la baja densidad y alta variabilidad de los SSRs con la alta densidad y baja variabilidad de los SNPs. Entre los primeros mapas que combinan SSRs y SNPs para la detección de QTLs y genes candidatos destacan los elaborados por Dhanapal y col. (2012) que identificaron 142 genes candidatos relacionados con la susceptibilidad a daños por frío en

melocotonero, y Eduardo y col. (2013) en otra población de melocotonero identifican importantes QTLs relacionados con compuestos orgánicos volátiles.

El fundamento de este enfoque es que los SSRs pueden actuar como un marco de referencia de los SNPs siendo mapeados de forma conjunta en cada grupo de ligamiento. Esto da lugar a mapas de mayor densidad y precisión, siendo más apropiados para la detección de QTLs. Las actuales y modernas plataformas de genotipado de SNPs que son casi totalmente automatizadas hacen que la tasa de error sea mucho menor que en el caso de los SSRs, aunque cabe destacar que es necesaria una mayor densidad de SNPs para tener igual o mayor precisión que en el caso de los SSRs.

Sin embargo, se ha demostrado que cuando las tasas de error en el genotipado son bajas, se pueden construir mapas muy precisos tanto con SSRs como con SNPs, por lo que en algunos casos tenemos que eliminar aquellos marcadores que muestren errores de genotipado antes de proceder con el análisis de los grupos de ligamiento (Martínez-García y col., 2013a). El sistema de genotipado de poblaciones mediante la técnica SNPlex combinando la técnica PCR y la espectrometría de masas, se trata de uno de los métodos más eficientes, ya que nos aporta precisión en el genotipado, flexibilidad en el diseño de los ensayos, mapas altamente saturados (en una única reacción de PCR se llegan a amplificar hasta 48 SNPs) y costes no muy elevados (De la Vega y col., 2005).

Desarrollo de QTLs (Quantitative TraitLoci)

Los programas de mejora en *Prunus* se han dirigido a la obtención de variedades con diferentes características organolépticas adecuadas a los diferentes mercados, variedades con distintos periodos de maduración, adaptaciones a distintos climas y resistencia a enfermedades. El principal reto de estos programas reside en las características fisiológicas específicas como un extendido período juvenil (de tres a diez años dependiendo de la especie), procesos de dormancia y respuestas diferenciales influenciadas por las condiciones ambientales. Estos retos en el cultivo hacen de la obtención de nuevas variedades un procedimiento caro, de larga duración en el que hay que manipular poblaciones muy grandes para realizar posteriormente la selección (Gradziel, 2012). Por estos motivos la investigación en la mejora de especies ha buscado el desarrollo de marcadores moleculares que ayuden en el proceso de selección que están siendo muy útiles en la mejora de las distintas especies de *Prunus*

(Arus y col., 2005; Abbott, 2012). Estos marcadores moleculares han permitido obtener patrones polimórficos que pueden ser asociados con las características de interés en nuestro caso la resistencia a PPV.

La elección de los marcadores moleculares ha ido evolucionando en base a sus características económicas, facilidad de uso, grado de polimorfismo, codominancia y ausencia de influencia ambiental. Actualmente todos los marcadores moleculares se basan en la detección del DNA y se describen a continuación:

Estos métodos se basan en la extracción de DNA que será digerido con enzimas de restricción para posteriormente ser revelado en un gel de agarosa que mostrara un perfil de bandas por tamaños y son considerados los marcadores de primera generación. Las diferencias en los puntos de corte puede deberse a mutaciones puntuales, deleciones, inserciones, inversiones o translocaciones en el DNA. Por tanto estos marcadores son codominantes y permiten determinar si caracteres relacionados se relacionan de forma homocigótica o hererocigótica. Estos marcadores permitieron un gran desarrollo de los mapas de ligamiento (Viruel y col., 1995).

Estas técnicas se basan en la extracción de DNA para ser amplificado. Entre ellas encontramos los marcadores de segunda generación (RAPDs y SSR) y los de nueva generación (SNP).

RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), utiliza oligonucleótidos de 9 a 12 pb generados al azar (Welsh y McClelland, 1990), cada oligonucleótido produce de uno a diez fragmentos que serán detectados en geles de agarosa (Winter y Kahl, 1995).

Los SSR son repeticiones en tandem de 1 a 6 pb que se encuentran flanqueadas por regiones de copia única sobre las que se alinean cebadores para iniciar la amplificación mediante PCR lo que genera fragmentos de distinto tamaño según el número de repeticiones en tandem. Estos marcadores son abundantes, polimórficos, codominantes por los que se consideran los mejores marcadores de DNA para evaluar la diversidad de características de las especies vegetales (Campoy y col., 2011).

Los SNP (Single Nucleotide Polymorphism) son marcadores que se basan en la variación de un único nucleótido (naturaleza bialélica) generalmente debido a mutaciones puntuales. Su utilización necesita el conocimiento preciso de la secuencia a

amplificar ya que requiere cebadores específicos que alinean en su última basa con nucleótido polimórfico permitiendo de este modo la amplificación. Estos marcadores aparecen tanto en regiones no codificantes como en codificantes.

Todos estos marcadores se han utilizado en estudios de segregación donde se analiza la relación entre carácter y marcador lo que ha permitido realizar mapas de ligamiento y QTLs (Quantitative Trait Loci) responsables de estos caracteres lo que facilita las estrategias de mejora de especies (Boopathi, 2013).

Un QTL es una región genómica responsable de la variación de un carácter de manera asociada con la variación de un marcador (Asins, 2002). Existen gran cantidad de QTLs de distintas especies y poblaciones de *Prunus*, en las que se reconocen regiones responsables de la variación de características del fruto como peso, cantidad de sólidos solubles, azúcares; y resistencia a enfermedades.

La secuenciación del genoma de referencia del melocotonero junto los datos cada vez mayores de distintos transcriptomas de distintas especies y variedades de *Prunus* genera nuevas posibilidades de aplicación de los QTLs.

Identificación de QTLs ligados a la resistencia a PPV

Respecto a la base genómica de la resistencia a PPV en albaricoquero, Hurtado y col. (2002), identificaron marcadores QTL (Quantitative Trait Loci) en el grupo de ligamiento 1 (LG1) del albaricoquero como responsable de la resistencia a PPV mediante el uso de AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms). Posteriormente, también mediante el uso de AFLPs y SSRs (Simple Sequence Repeats) se identificó este mismo QTL y otros QTLs en el LG1 y LG5 (Vilanova y col., 2003; Lambert y col., 2007; Lalli y col., 2005; Zebentyayeva y col., 2008; Marandel y col., 2009; Dondini y col., 2011). En el LG1 Pilarová y col. (2010) identificaron dos QTLs vinculados con la resistencia a la cepa Dideron de PPV y tres QTLs para la resistencia a la cepa Marcus.

Estos autores también identificaron un QTL menor en el LG1 relacionado con la resistencia a la cepa Dideron. Posteriormente varios marcadores moleculares del QTL del LG1 relacionados con la resistencia a PPV fueron identificados por Dondini y col. (2011); Vera-Ruiz y col. (2011) y Soriano y col. (2012). Estos autores también han

indicado que los alelos de resistencia SSR cosegregan con la resistencia a PPV. Recientemente, Zuriaga y col. (2013) describió una región genómica de 194 kb en el LG1 (pseudocromosoma 1 del genoma de referencia del melocotonero entre las posiciones 8.050.805-8.244.925) del locus sinténico *PPVres*. Estos autores también describieron una familia de genes con dominios homologos a la Meprina y TRAF-C (MATH) como candidatos de resistencia que coinciden con hallazgos previos (Cosson y col. 2010). Además hay que destacar recientes estudios que muestran la posibilidad de un segundo locus involucrado en el control de la resistencia (Rubio y col., 2014; Decroocq y col., 2014).

A nivel genómico el objetivo a alcanzar en este capítulo es identificar marcadores moleculares SSR y SNP a partir de las cuatro comparaciones (Rc vs. Ri, Zc vs. Zi, Rc vs. Zc y Ri vs Zi) entre los transcriptomas resiste y sensible a PPV de los genotipos de albaricoquero 'Rojo Pasión' y 'Z506-7', respectivamente. Se pretende mejorar la metodología y el análisis de los SSR y SNP a partir de RNA-Seq para su aplicación en el genotipado de la resistencia a PPV en albaricoquero. La obtención de nuevos polimorfismo de tipo SSR y SNP permitirá incrementar la saturación en los mapas de ligamiento con lo que se podrá reducir la longitud de las secuencias QTLs facilitando el conocimiento de los loci responsables de las características estudiadas, en nuestro caso resistencia a PPV.

Además, el objetivo de este capítulo ha sido la mejora de la eficiencia y flexibilidad de la metodología de desarrollo y análisis de SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) combinando RNA-Seq y la técnica SNPlex para el genotipado de diferentes variedades de albaricoquero. Además, los SNPs diseñados son aplicados en la caracterización molecular y estudio de relaciones y diversidad genética en variedades de albaricoquero como aplicación previa al mapeo genético de poblaciones.

3.2. Material vegetal

El material vegetal consistió básicamente en dos genotipos de albaricoquero ‘Rojo Pasión’ y ‘Z506-7’ obtenidos del cruce entre el cultivar norteamericano ‘Orange Red’ (genotipo resistente a PPV) y el cultivar español ‘Currot’ (genotipo susceptible a PPV) (Martínez-Gómez y col., 2000). Estos genotipos se ensayaron para los estudios de SSRs y secuenciación masiva. El genotipo ‘Rojo Pasión’ es autocompatible, floración temprana con frutos de tamaño medio y forma oblonga, piel amarilla con una intensa mancha roja y una liminosa carne naranja caracterizada por su resistencia a PPV (Egea y col., 2004). En cuanto a ‘Z506-7’, es también autocompatible, de floración temprana con un fruto similar al del cultivar ‘Rojo Pasión’ pero caracterizado por su gran susceptibilidad a PPV (Rubio y col., 2014). Además se utilizaron otras 13 variedades de albaricoquero resistentes (‘Goldrich’, ‘Mirlo Blanco’, ‘Mirlo Anaranjado’, ‘Mirlo Rojo’, ‘Murciana’, ‘Orange Red’, ‘Rojo Pasión’, y ‘Valorange’) y susceptibles (‘Bergeron’, ‘Búlida’, ‘Currot’, ‘Mauricio’, y ‘Z5067’) a PPV en los ensayos de SNPlex.

3.3 Metodología

El proceso de caracterización molecular de los diferentes genotipos consiste en la toma de muestras de hoja, extracción y cuantificación previa del ADN, amplificación del ADN, y análisis del producto de PCR obtenido en secuenciador ABBI y geles de agarosa Metaphor®.

3.3.1. Toma de muestras, extracción y cuantificación del ADN

Las hojas para la extracción del DNA se recolectaron en mayo de los brotes más sanos y jóvenes, ya que esto nos garantiza una buena tasa de división celular aumentando el rendimiento de la extracción del ADN. La extracción del DNA se realizó según el protocolo descrito por Doyle y Doyle (1987). Para ello, se utilizaron aproximadamente 50 mg de hoja en polvo congelado, mezclándose con una solución de 750 µl de tampón de extracción CTAB a 65 °C y dejando incubar a la misma temperatura durante 5 minutos. Posteriormente la solución se mezcló con

un volumen de 750 μl de cloroformo isoamilalcohol (24:1), centrifugando las muestras a 12.000 rpm durante 10 minutos.

A continuación se extrajo cuidadosamente la fase líquida superior y le añadimos 450 μl de isopropanol a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente se centrifuga a 12.000 rpm durante 5 minutos para recuperar el precipitado de ADN, que es lavado con 400 μl de etanol al 70 % y resuspendido e incubado en 50 μl de TE con RNasa (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. La concentración de DNA fue cuantificada mediante el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA) (230-280 nm) siendo cada muestra diluida a la concentración final de 30 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (Figura 3.1).

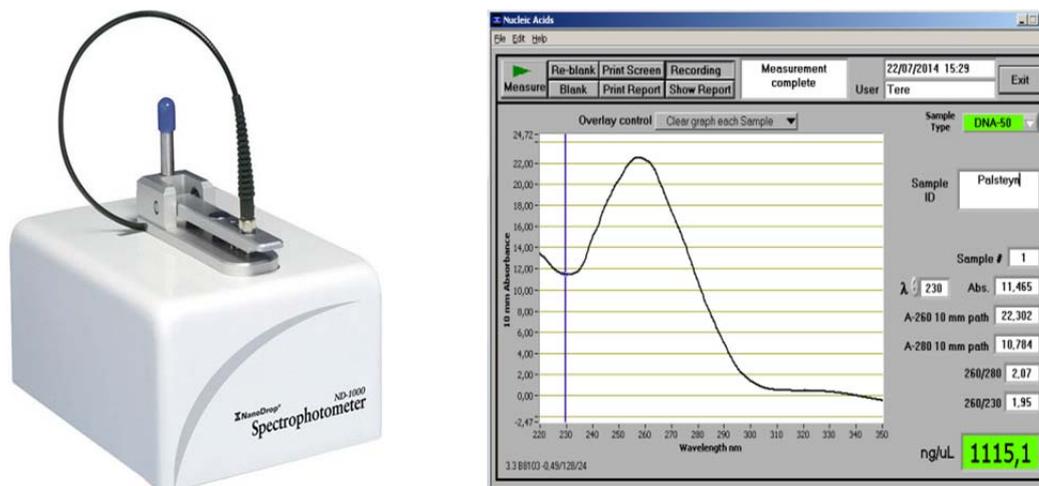


Figura 3.1. Espectrofotómetro tipo Nanodrop utilizado para la cuantificación del DNA (izquierda) y curva patrón óptima de DNA (derecha.)

3.3.2. Análisis de SSRs

El método de amplificación fue mediante la reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR (*polymerase chain reaction*), técnica de biología molecular desarrollada en 1983 por Kary Mullis, utilizando para ello termocicladores tipo Eppendorf.

El DNA total genómico fue aislado mediante el procedimiento descrito por Doyle y Doyle (1987).

El DNA genómico extraído del albaricoquero fue amplificado mediante PCR usando 61 par de primers flanqueando los microsatelites previamente clonados y secuenciados en melocotonero (Cipriani y col., 1999; Sosinski y col., 2000; Aranzana y col., 2002; Dirlewanger y col., 2002; Yamamoto y col., 2002), almendro (Testolin y col., 2004; Howad y col., 2005), albaricoquero (Deroocq y col. 2003; Messina y col. 2004; Soriano y col., 2012), cerezo (Downey and Iezzoni, 2000; Cantini y col., 2001; Sosinski y col., 2000) y ciruelo (Mnejja y col., 2004) (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Origen de los marcadores SSRs ensayados y polimorfismos obtenidos entre los dos genotipos ensayados ‘Rojo Pasión’ (resistente a PPV) y ‘Z506-7’ (susceptible a PPV).

SSRs	Referencia	Especies	Nº evalados	SSRs polimórficos	Alelos detectados	Alelos polimórficos
AMPA	Hagen y col. (2002)	Melocotonero	2	0 (0%)	4	0 (0%)
aprigms	www.rosaceae.org	Albaricoquero	1	1 (100%)	3	2 (66%)
BPPCT	Dirlewanger y col. (2002)	Melocotonero	4	3 (75%)	10	6 (60%)
CPPCT	Aranzana y col. (2002)	Melocotonero	8	1 (12%)	14	2 (14%)
CPSCT	Mnejja y col. (2004)	Ciruelo	8	1 (12%)	13	2 (15%)
EPDCU	Howad y col. (2005)	Almendro	5	2 (40%)	8	2 (25%)
EPPCU	Howad y col. (2005)	Almendro	7	1 (14%)	11	1 (9%)
M	Yamamoto y col. (2002)	Melocotonero	2	1 (50%)	7	2 (28%)
MA	Yamamoto y col. (2002)	Melocotonero	3	0 (0%)	5	0 (0%)
Pac	Decroocq y col. (2003)	Albaricoquero	1	0 (0%)	2	0 (0%)
PceGA	Downey and Iezzoni (2000)	Cerezo	1	1 (100%)	2	1 (50%)
pchcms	Sosinski y col. (2000)	Melocotonero	2	1 (50%)	4	2 (50%)
pchgms	Sosinski y col. (2000)	Melocotonero	3	1 (33%)	6	3 (50%)
PGS	Soriano y col. (2012)	Albaricoquero	3	3 (100%)	7	4 (57%)
PMS	Cantini y col. (2001)	Cerezo	1	0 (0%)	1	0 (0%)
Pr	www.rosaceae.org	Melocotonero	2	1 (50%)	6	2 (33%)
PS	Sosinski y col. (2000)	Cerezo	2	0 (0%)	3	0 (0%)
UDA	Testolin y col. (2004)	Almendro	2	0 (0%)	4	0 (0%)
UDAp	Messina y col. (2004)	Albaricoquero	1	1 (100%)	3	2 (66%)
UDP	Cipriani y col. (1999)	Melocotonero	3	1 (33%)	5	2 (40%)
Total			61	19 (32%)	119	33 (28%)

Las reacciones de la PCR se realizaron en un volumen de 10 µl. La mezcla de reacción contenía 1x tampón de reacción (BIOLINE, London, UK); 1.5 mM MgCl₂; 0.4 µM de primers F y R (el primer “forward” fue etiquetado con un fluorocromo); 0.05 mM de cada dNTP; 1 U de BIOTAQ™ DNA Polimerasa (BIOLINE, London, UK); y 80 ng de DNA genómico.

En la *Tabla 3.2* se describen el protocolo de PCR llevado a cabo, así como las condiciones de amplificación del DNA empleadas en los termocicladores.

Tabla 3.2. Protocolo (izquierda) y condiciones de PCR (derecha) empleadas en la amplificación de ADN

Reactivos	Volúmenes	Fases	T °C	Tiempo (35 ciclos)
Agua	13,8µl	Desnaturalización	95	2'
Buffer 10×	2µl	Desnaturalización	95	30''
MgCl ₂ (50mM)	0,4µl	Anillamiento	51-60	30''
dNTPs (10mM)	0,4µl	Extensión	72	1'20''
F (10mM)	0,4µl	Extensión	72	5'
R (10mM)	0,4µl	Conservación	4	∞
Taq polimerasa	0,1µl			
DNA (30ng/µl)	2,5			
Total	20µl			

Los parametros de la reacción fueron los siguientes: un ciclo de 95 °C durante 1 min; 35 ciclos de 94 °C durante 15 sec, AT (temperatura de alineamiento) de 15 sec, y 72 °C durante 1 min; y un ciclo final de 72 °C durante 2 min.

Las reacciones de la PCR se realizaron en GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), y los productos de amplificación se analizaron mediante el secuenciador ABI PRISM® 3130xl (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

La electroforesis capilar se llevó a cabo en el secuenciador automático ABI Prism 3730 de 96 capilares (Hospital de Sant Orsola, Bolonia, Italia) (*Figura 3.2*) mezclando las reacciones de PCR marcadas previamente con los cuatro fluorocromos (VIC, FAM, NED y PET) en la proporción 1:1:1:2, diluyendo 4 µl del producto final con 5,8 µl de formamida y 0,2 µl de Liz (Gen Scan 500 LIZ-250) obteniendo un volumen final de 10 µl de producto para analizar en el secuenciador.

Los fragmentos fueron evaluados usando el software Peak Scanner versión 1.0. El set de microsatélites fue organizado en grupos de marcadores con la misma

temperatura de annealing y por diferencia de tamaño para intentar hacer lecturas múltiples de hasta 8 marcadores.

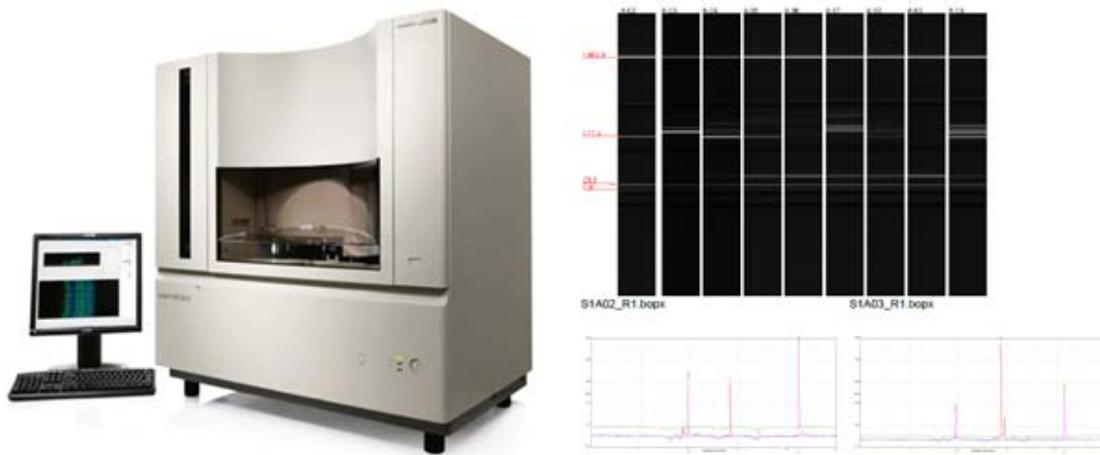


Figura 3.2. Secuenciador automático ABI Prism-3730 de 96 capilares y visualización de fragmentos de DNA en el software Peak Scanner 1.0.

3.3.3. Extracción de ARN, secuenciación e identificación de SNPs

El RNA total fue extraído usando RNeasy Plant Mini Kit® (Qiagen, Hilden, Germany) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La calidad y cantidad del RNA total de las muestras fue evaluado usando el espectrofotómetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, EE.UU.) y normalizado a la misma concentración (200 ng/μl). Posteriormente 5 μl de cada muestra fueron enviadas al Centro de Regulación Genómica (CRG, Barcelona, España) para la preparación de las librerías y secuenciación del ARN. El ARNm fue obtenido usando Sera-mag® (Thermo Scientific, Wilmington, EE.UU.). Las librerías de ADNc fueron preparadas de acuerdo con los protocolos de Illumina. Fragmentos de alrededor de 300 pb fueron extraídos de geles de agarosa previamente enriquecidos con PCRs de 16 ciclos. Finalmente las librerías de ADNc fueron secuenciadas usando el secuenciador Illumina HiSeq2000 (100 PE, Paired end).

Previamente, para filtrar y eliminar las regiones de baja calidad se utilizó el programa Fastx-Toolkit, una herramienta desarrollada por la empresa aScidea®. Las lecturas o 'reads' de alta calidad que pasaron por el filtro fueron alineadas con *P.*

persica genome v1.0 disponible en la base de datos de *Rosaceae* (GDR) (Verde y col., 2013) usando Tophat 1.4.0 (Trapnell y col., 2009) y Bowtie 0.12.7 (Lindner y Friedel, 2012).

El análisis de las variaciones en los archivos de mapeo de las lecturas fue realizado usando Samtools 0.1.18 (Li y col., 2009). Después del filtrado de SNPs se obtuvieron diferencias de alta calidad con resultados de calidad superiores a 20 y en el caso de los INDEL superiores a 50.

Se procederá a la secuenciación masiva de 4 transcriptomas correspondientes a los genotipos de albaricoquero 'Rojo Pasión' (resistente a PPV) y 'Z506-7' (susceptible a PPV) control e inoculados. Así pues tendríamos Transcriptoma 1: 'Rojo Pasión' control; Transcriptoma 2: 'Rojo Pasión' inoculado con PPV y sin síntomas; Transcriptoma 3: 'Z506-7' control y Transcriptoma 4: 'Z506-7' inoculado con PPV cogiendo muestras de hojas que muestren síntomas. La idea es compara los transcriptomas con el genoma de referencia del melocotonero (www.rosaceae.org) a la hora de identificar SNPs.

Se realizó la extracción del RNA total mediante el kit Rneasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se evaluó la cantidad y calidad de las muestras mediante el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, EEUU) para obtener concentraciones de 200 ng/microlitro en todas las muestras. De cada muestra se extrajeron 5 microlitros para ser enviados al Centro de Regulación Genómica de Barcelona para la elaboración de las librerías y la secuenciación del RNA. La extracción del mRNA se realizó con el kit Sera-mag (Thermo Scientific, Wilmington, EEUU) y la elaboración de las librerías en base al protocolo de Illumina. Tras 16 ciclos de PCR para enriquecer las muestras se extrajeron fragmentos de 300 pb a partir de su separación en geles de agarosa. Las librerías fueron secuenciadas con el secuenciador Illumina HiSeq2000 (100 PE, Paired end).

Las lecturas obtenidas fueron filtradas para eliminar las regiones con baja calidad mediante el programa Fastx-Toolkit desarrollado por aScidea. Las lecturas de alta calidad fueron alineadas en el genoma de referencia del melocotonero (*P. persica* genome v1.0) mediante el programa Tophat 1.4.0 (Trapnell y col., 2009) y Bowtie 0.12.7 (Lindner y Friedel, 2012).

3.3.4. Identificación de SNPs, diseño de cebadores y genotipado de SNPs mediante SNPlex.

Las lecturas en formato BAM obtenidas después del RNA-Seq fueron organizadas en 7 librerías diferentes (4 procedentes de 'Rojo Pasión' y 3 de 'Z506-7') que han sido procesadas por SAMtools (samtools.sourceforge.net) con el fin de mostrar su alineamiento con el genoma del melocotonero (Lindner y Friedel, 2012). Las variantes de alta calidad se obtuvieron tras el filtrado de los SNPs con puntuaciones de calidad > 20 y con valores INDEL > 50.

La información de estas librerías de 'Rojo Pasión' y 'Z506-7' ha sido usada para recuperar las secuencias circundantes a los SNPs procedentes de los datos de re-secuenciación, llevando a cabo una selección manual de las mismas para mejorar la caracterización del genoma del albaricoquero. El consenso de secuencias fue obtenido mediante Lasergene SeqMan Pro (DNASTAR, Madison WI, EE.UU.) y BLASTed comparando con el genoma del melocotonero (http://www.rosaceae.org/tools/ncbi_blast) para seleccionar sólo aquellos SNPs que eran únicos en el genoma del *Prunus*.

Cada secuencia flanqueante ha sido también visualizada en Gbrowse, herramienta disponible en la web de Phytozome (<http://www.phytozome.net/cgi-bin/gbrowse/peach/>) para recuperar información sobre las anotaciones del transcriptoma y excluir todas las secuencias con dominios repetidos (LTR finder, Repeats consensus, RepBase, Repeat prediction). Las regiones de 'Target sequence' de alrededor de 200 pb fueron seleccionadas para reducir la posibilidad de la presencia de intrones desconocidos en las secuencias seleccionadas y maximizar la posibilidad de obtener polimorfismos de SNP.

El DNA genómico fue extraído de brotes de hojas jóvenes usando el protocolo con CTAB descrito por Doyle y Doyle (1987) y cuantificado mediante el espectrofotómetro NanoDrop® 2000. El genotipado fue realizado mediante tecnología DNA Mass Array (Jurinke y col., 2002) usando la plataforma Sequenom (Gabriel y Ziaugra, 2004). Tres SNPlex independientes de 36, 34 y 31 SNPs fueron diseñadas por el software Mass ARRAY Assay Design 3.1 (disponible en la plataforma Sequenom) lo que supuso el análisis de 101 SNPs de los 136 diseñados.

La lectura y detección de los polimorfismos amplificados en la plataforma del SEQUENOM (Figura 3.3) fue llevada a cabo mediante la técnica de espectrometría de masas (MALDI-TOF), la cual identifica el SNP por diferencia de masas. Se trata de una técnica de análisis cualitativo a partir de la cual podemos distinguir polimorfismos de una sola base (A, T, C y G) por diferencia de masas en las muestras previamente amplificadas (Gabriel y col., 2009).

Debemos de tener en cuenta que la espectrometría de masas tiene muy poco en común con las técnicas clásicas de espectrofotometría, ya que no se trata de un método espectroscópico. En la espectrometría de masas no se utiliza ningún tipo de radiación, por lo que básicamente no puede ser considerada como una técnica espectroscópica.

A diferencia de las espectroscopías clásicas, en la espectrometría de masas durante la obtención del espectro tienen lugar procesos químicos, con lo que la muestra utilizada se destruye y no puede recuperarse; este hecho no es un inconveniente grave, ya que la cantidad de muestra necesaria para la obtención de un espectro de masas es pequeñísima (del orden del μg).

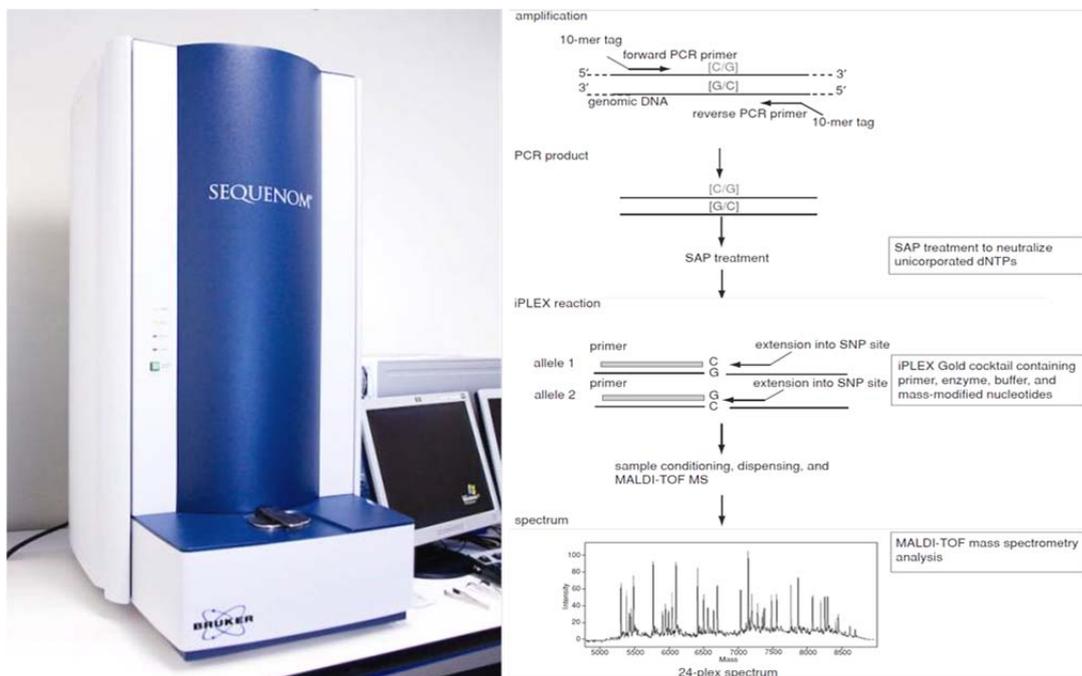


Figura 3.3. Plataforma Sequenom iPLEX Mass Array utilizada y esquema resumen de la reacción de extensión iPLEX (Gabriel y col., 2009).

3.4. Resultados y discusión

3.4.1. Análisis de SSRs

Aplicamos 61 marcadores SSR a los genotipos resistente ‘Rojo Pasión’ y susceptible ‘Z506-7’. Se detectó que 19 (32%) de los marcadores SSR eran polimórficos. Además, de los 122 alelos SSR identificados, solo 22 (18%) resultó ser polimórfico (Tabla 3.2; Figura 3.4).

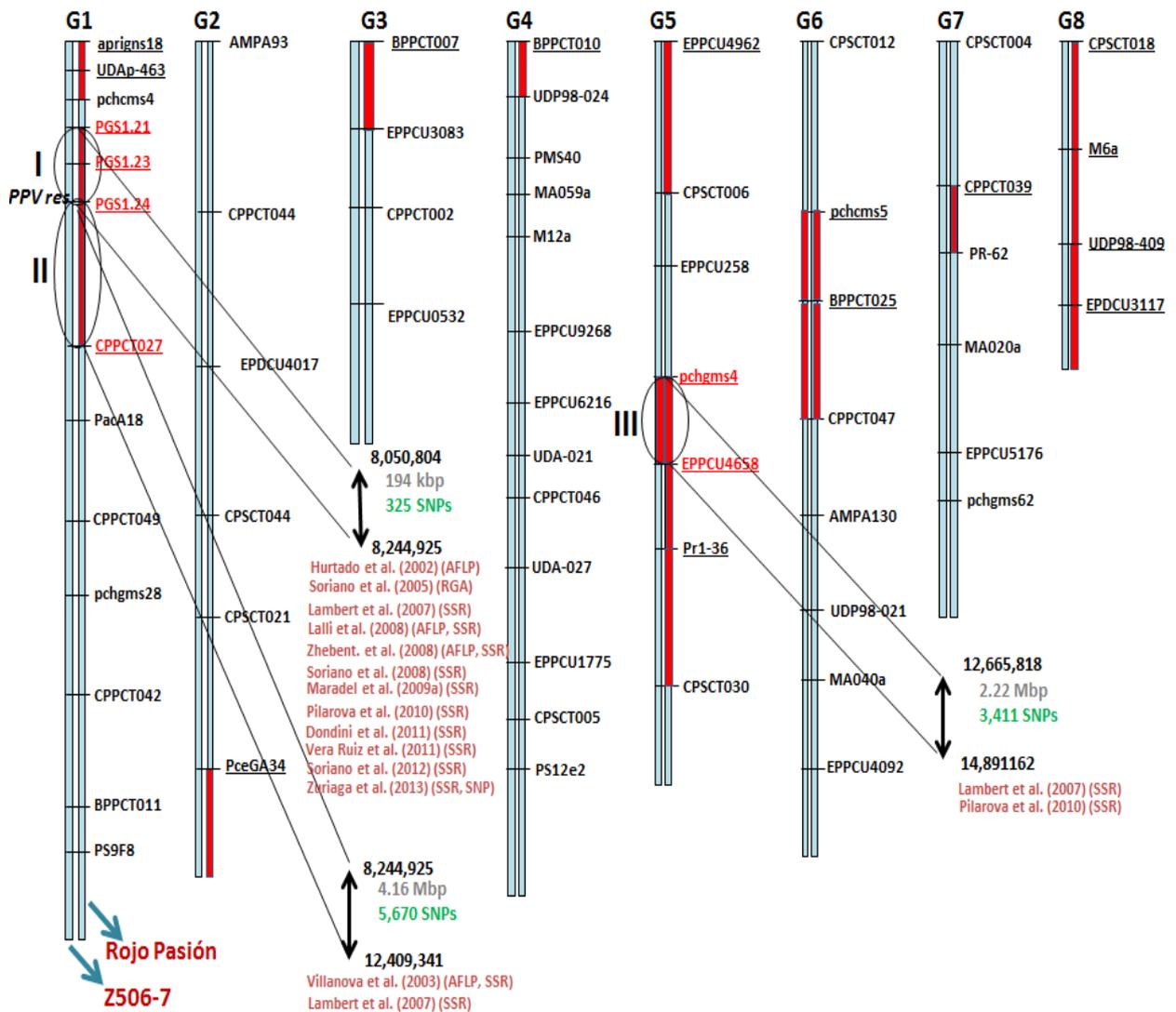


Figura 3.4. Representación esquemática de los 61 marcadores SSR ensayados en los 4 grupos de ligamiento (G) de los genotipos de albaricoquero ‘Rojo Pasión’ (resistente a PPV) y ‘Z506-7’ (Z, susceptible a PPV) indicando las 3 principales regiones donde se ha descrito la resistencia a PPV en albaricoquero. Las cajas con diferente color indican las regiones con SSR polimórficos. Se han subrayado los SSRs descritos ligados a la resistencia a PPV en albaricoquero. También en verde se indican los SNPs polimórficos identificados en las regiones de interés.

En las regiones clave del LG1, LG3 y LG5 descritas como candidatas para la resistencia a PPV, estos marcadores han resultado ser polimórficos (Figura1). Estas regiones fueron descritas como responsables putativos de la resistencia a PPV en albaricoquero por distintos autores, entre estas regiones se incluyó la región *PPVres* del pseudocromosoma 1, posiciones 8.050.804-8.244.925 (SSRs polimórficos PGS1.21, PGS1.23 y PGS1.24) y posiciones 8.244.926-8.409.341 (SSR polimórfico CPPCT027) y otra en el pseudocromosoma 5, entre las posiciones 12665818-14489483 (SSRs polimórficos pchgms4 and EPPCU4658).

Es interesante destacar que los SSRs asociados a QTL relacionados con la resistencia a PPV descritos por diferentes autores eran polimórficos en los genotipos resistente y susceptible, PGS1.21, PGS1.23 y PGS1.24 (Soriano y col., 2012) y Pchgms4 y EPPCU4658 (Lambert y col., 2007). Además, el genotipo resistente ‘Rojo Pasión’ tenía el alelo SSR de 226 pb del marcador PGS1.21 (Información suplementaria Tabla S1) usado para la selección asistida de marcadores (MAS) por Rubio y col. (2014).

Por otro lado, estos resultados dan una idea sobre las diferencias genómicas encontradas en los dos genotipos ensayados, gracias a que las diferencias genómicas que aportan los marcadores SSR son mayores que las diferencias fenotípicas donde se estudian características pomológicas y fenomenológicas. La conexión entre el fenotipo (conjunto de características observables) y el genotipo parece ser un camino complejo debido a diferentes factores como los cambios de expresión génica o la influencia ambiental (Bertin y col. 2010; Martínez-Gómez y col., 2012).

Los niveles de heterocigosidad observados en los descendientes de cruces entre el genotipo español ‘Currot’ (susceptible a PPV) y el genotipo norteamericano ‘Orange Red’ (resistente a PPV) también confirmaron su adecuada utilización en los programas de mejora de germoplasma europeos, incrementando la variabilidad genética de los genotipos locales como indicó Sánchez-Pérez y col. (2006). El uso de genotipos norteamericanos puede aumentar la heterocigosidad de los programas de cruzamientos de los albaricoqueros españoles.

3.4.2. Análisis de SNPs

Las lecturas limpias RNA-Seq que se obtuvieron en los cuatro tratamientos fueron usadas para identificación de polimorfismos de un único nucleótido, SNP (Single nucleotide polymorphism), y para detectar inserciones/delecciones (INDEL) en las regiones transcritas mediante el uso del genoma de referencia del melocotonero. Se identificaron un total de 283.057 y 293.565 variantes en las regiones transcritas (exones) en las variedades ‘Rojo Pasion’ y ‘Z506-7’ respectivamente, de las que 277.792 y 287.626 fueron SNPs (98%) y 5.266 y 5.939 INDELS (2%) respectivamente. La densidad de SNP fue de un SNP por 1.0 kb. La mayor densidad de SNPs se encontró en el pseudocromosoma 1, con 63.140 y 65.402 SNPs identificados en ‘Rojo Pasion’ y ‘Z506-7’ respectivamente, seguido por el pseudocromosoma 6 y 4, con más de 30.000 SNPs identificados en cada pseudocromosoma en los dos genotipos ensayados (*Tabla 3.3; Figura 3.4*).

Tabla 3.3. Número total de SNPs y de inserciones/delecciones (INDEL) identificadas usando RNA-Seq en los dos albaricoqueros ensayados ‘Rojo Pasion’ (resistente a PPV) y ‘Z506-7’ (susceptible a PPV). Número de SNPs identificados en las tres regions descritas como responsables de la Resistencia a PPV en albaricoquero.

	‘Rojo Pasion’	‘Z506-7’	‘Rojo Pasion’ vs. ‘Z506-7’
Total SNPs	283.057	293.565	--
Región I (PPVres) (194,804 bp) (scaffolld 1: 8,050,804 to 8,244,925)	325	289	90
Región II (4,164,415 bp) (scaffolld 1: 8,244,926 to 12,409,341)	5.670	6.278	--
Región II (1,823,665 bp) (scaffolld 5: 12,665,818 to 14,489,483)	3.411	5.561	--
INDELS	5.266	5.939	--

También se hemos identificado 124 SNP específicos del genotipo resistente ‘Rojo Pasión’ en la región PPVres del pseudocromosoma 1 (región de 194 kb) (Tabla 3.3; Figura 3.5).

Rojo Pasión	Z506-7								
8050076	8052480	8079220	8080915	8098885	8102192	8128757	8141580	8151590	8211104
8050105	8052482	8079246	8081232	8099056	8102205	8128992	8141581	8151664	8211389
8050826	8052768	8079397	8081294	8099641	8102499	8129061	8143201	8205868	8211678
8051546	8052785	8079589	8081328	8099660	8102700	8129201	8143205	8205872	8211897
8052480	8053155	8080435	8081356	8099699	8102722	8129427	8143337	8206025	8211936
8052482	8053174	8080825	8081409	8099722	8104902	8129750	8149224	8206176	8211952
8053010	8053284	8080840	8081574	8099764	8104934	8129857	8149678	8206227	8212445
8053155	8053313	8080863	8081614	8099839	8105043	8130341	8149702	8206280	8212513
8053174	8054379	8080915	8081634	8100435	8105320	8130525	8150116	8206336	8212613
8053284	8054389	8081232	8081707	8100504	8105401	8130597	8156940	8208379	8212655
8053313	8054463	8081294	8082869	8100528	8106286	8131100	8156943	8208428	8212661
8054389	8054703	8081328	8082970	8100805	8106483	8131467	8157030	8208439	8212712
8054463	8054704	8081356	8082995	8100832	8106489	8131618	8157303	8208491	8212855
8054703	8054842	8081409	8084217	8100900	8106862	8131664	8157625	8208634	8212869
8054704	8054923	8081455	8084702	8100920	8106879	8131699	8157918	8208640	8213136
8055102	8055102	8081574	8084762	8101006	8106940	8131862	8159041	8208738	8213180
8055126	8055126	8081614	8085444	8101042	8107037	8131876	8159427	8208773	8213497
8055348	8055187	8081634	8085447	8101090	8107092	8131910	8159788	8208967	8213743
8055399	8055426	8082869	8085508	8102205	8114360	8132149	8159857	8209745	8213928
8055426	8055478	8082970	8092686	8102634	8114361	8132241	8160172	8209772	8213971
8055490	8055490	8082970	8092686	8102719	8116148	8132357	8160384	8209806	8213976
8055578	8055578	8082995	8092708	8102722	8116239	8132940	8160438	8210832	8214385
8059013	8059013	8084217	8092844	8102959	8116325	8133035	8205021	8210893	8214707
8059158	8059158	8084702	8092981	8102959	8116325	8133035	8205021	8211029	8214814
8059233	8059233	8085508	8093006	8104338	8116353	8133146	8205354	8211104	8214875
8059240	8059240	8092686	8093026	8104404	8116427	8133162	8205604	8211389	8214899
8059288	8059296	8092708	8093049	8105272	8116494	8133375	8205614	8211501	8214923
8059296	8059306	8092844	8093095	8105275	8116519	8133900	8205868	8211897	8215182
8059306	8059572	8092925	8093155	8105320	8116533	8133901	8205872	8211936	8215224
8059383	8061375	8092928	8094548	8105390	8122718	8134561	8206025	8211952	8215289
8059410	8061444	8092981	8095452	8105401	8122743	8134610	8206176	8212116	8215350
8059572	8062485	8093006	8095470	8106483	8125019	8134882	8206227	8212400	8215443
8059623	8062700	8093049	8097517	8106513	8125030	8135090	8206280	8212445	8215475
8059775	8062771	8093095	8098342	8106833	8128556	8135431	8206336	8212513	8215587
8060836	8063320	8093222	8098362	8106879	8128560	8141596	8206491	8212613	8215623
8061033	8063615	8095290	8098375	8106940	8130453	8141601	8206499	8212712	8215661
8062485	8063672	8095447	8098884	8106977	8131862	8141645	8208379	8212855	8215668
8062703	8063708	8095452	8098885	8107037	8131876	8142217	8208428	8212869	8215749
8062771	8077459	8114360	8131910	8114361	8132724	8142226	8208491	8213136	8215800
8062902	8077638	8114361	8132724	8114361	8132724	8143337	8208634	8213180	8215814
8063344	8077719	8114507	8133035	8114507	8133035	8143408	8208640	8213497	8215869
8063575	8077847	8115154	8133063	8115154	8133063	8148379	8208722	8213716	8216211
8063615	8078815	8115199	8133064	8115199	8133064	8148388	8208738	8213743	8216307
8063672	8079220	8116075	8133146	8116075	8133146	8149091	8208773	8213928	8216382
8063708	8079246	8116148	8133162	8116148	8133162	8149675	8209772	8213971	8216400
8077638	8079397	8116239	8134561	8116239	8134561	8149747	8210666	8213976	8216471
8077647	8079589	8116325	8134583	8116325	8134583	8149762	8210711	8214385	8216481
8077719	8080825	8116353	8134610	8116353	8134610	8149910	8210832	8214707	8216607
8077910	8080840	8116494	8135492	8116494	8135492	8149918	8210893	8214814	8216613
		8116519	8135514	8116519	8135514	8150116	8211029	8214875	8216667
		8116533	8135545	8116533	8135545	8151590	8211104	8214899	8216850
		8128708	8135591	8128708	8135591	8151664	8211389	8214923	8216853
								8215182	8216939

Figura 3.5. Listado de SNPs (en negro) identificados en ‘Rojo Pasión’ y no en ‘Z5067’.

En otras especies de *Prunus*, Koepke y col. (2012) identificaron 2.243 SNPs en cerezo mediante el uso de RNA-Seq. Además, Wang y col. (2013) identificaron 9.587 SNPs diferentes, la mayoría no caracterizados previamente, analizando diferentes genotipos de melocotonero mediante RNA-Seq. Por otro lado, la frecuencia de SNPs en las secuencias de DNA genómico es muy superior a las observadas en las regiones transcritas. Aranzana y col. (2012) identificaron una media de un SNP cada 598 pb en *Prunus*, siendo esta variabilidad superior en las regiones no codificantes (un SNP cada 390 pb no codificantes) que en las regiones codificantes (un SNP cada 1.850 pb codificantes).

Uno de los 124 SNPs diferentes identificados en el genotipo resistente 'Rojo Pasión' en la posición 8.232.989 del genoma de referencia del melocotonero está en consonancia con los SNPs identificados en esta región por Zuriagay col. (2013) tras la secuenciación completa del genoma de nueve genotipos de albaricoquero resistentes y susceptibles, aunque ninguno ni 'Orange Red' ni 'Currot' fueron incluidos en estos nueve genotipos. A lo anterior hay que añadir los siete SNPs que se identificaron en 'Rojo Pasión' con un solo pb diferente respecto a los datos de Zuriaga y col. (2013) en las posiciones 8080435; 8081455; 8097511, 8099699, 8106977, 8115154 and 8133375. Además, algunos de estos 124 SNPs específicos coinciden con los dos SNPs identificados en las posiciones 8156254 y 8157485 del genotipo resistente 'Lito' usado para MAS de la resistencia a PPV por Decroocq y col. (2014)

3.4.3. Análisis de SNPLex

Los 95 SNPs polimórficos fueron utilizados para el análisis de la diversidad genética de 37 genotipos de albaricoquero. La heterocigosidad observada en estos cultivares osciló entre 0,19 de 'Yamagata3' y 0,95 de 'Rojo Pasión' (sólo 5 marcadores desarrollados en 'Z506-7' fueron monomórficos en esta variedad), valores que llegarían a 1 si sólo tuviéramos en cuenta los marcadores procedentes de 'Rojo Pasión' (Figura 3.6).

Como era de esperar, el alto nivel de heterocigosidad de 'Rojo Pasión' se debió a que la mayoría de marcadores fueron desarrollados a partir de transcriptomas resecuenciados de esta variedad (79 de los 95 validados). Por esta misma razón los

niveles de heterocigosidad de varios cultivares ('Yamagata 3', 'Bergeron', 'Harcot' y 'Kioto') fueron más bajos que los observados en variedades relacionadas con 'Rojo Pasión' ('Mirlo Anaranjado', 'Valorange', 'Murciana' y 'Mirlo Blanco').

Estos resultados coinciden con otros trabajos descritos en cultivares de albaricoquero utilizando marcadores SSRs (Sánchez-Pérez y col., 2006). Estos autores observaron un rango de heterocigosidad de 0,24 a 0,65 en los parentales usados en los programas de mejora, así como el aumento de la heterocigosidad en el caso de los descendientes procedentes de los cruces complementarios.

Variedad	SI_1.761.101	SI_5.542.439	SI_9.687.151	SI_11.325.551	SI_13.282.432	SI_14.071.595	SI_17.542.722	SI_20.067.081	SI_21.385.614
Bergeron	nc	CT	TT	AA	TT	CA	CC	CT	TT
Búlida	CC	CC	TT	GA	AT	CA	CT	CT	GT
Currot	CC	CT	TT	AA	TT	CC	CT	CC	TT
Mauricio	CC	CC	TT	GA	AT	CA	CT	CT	GT
Z50607	CC	CT	TT	AA	TT	CC	CT	CC	TT
Goldrich	CC	CC	TC	GG	AT	CA	CT	TT	TT
Mirlo Blanco	GC	CC	CC	GA	AA	AA	CC	CT	GT
Mirlo Anaranjado	GC	CC	TC	GA	AT	CA	CT	TT	GG
Mirlo Rojo	GC	CC	TC	GG	AA	AA	CC	nc	GT
Murciana	CC	CT	TC	GA	AT	CA	CT	CC	TT
Orange Red	GG	CC	CC	GG	AA	AA	CC	TT	GT
Rojo Pasión	GC	CT	TC	GA	AT	CA	CC	CT	GT
Valorange	GC	CT	TC	GA	AT	CA	CC	nc	TT

Variedad	SI_23.746.169	SI_27.742.963	SI_31.065.373	SI_32.252.927	SI_36.001.839	SI_36.89.497	SI_38.382.339	SI_45.557.783	SI_40.540.558
Bergeron	CC	GG	GG	GG	AA	CC	CC	GG	AA
Búlida	TC	TT	GT	GA	GG	CT	CC	GG	GG
Currot	TT	TT	TT	AA	GG	CT	CC	GT	GG
Mauricio	TC	TT	GT	GA	GG	CC	CC	GG	GG
Z50607	TT	TT	TT	AA	GG	CT	CC	GT	GG
Goldrich	TC	GT	TT	GG	AA	CC	TC	GG	AA
Mirlo Blanco	CC	GT	GG	GG	GG	CT	TC	GG	AG
Mirlo Anaranjado	TC	GT	GT	GA	GG	CC	TC	GG	AG
Mirlo Rojo	CC	GT	GG	GG	GG	CT	TC	GG	AG
Murciana	TC	TT	GT	GA	GA	CT	CC	GG	AG
Orange Red	CC	GT	GG	GG	GA	CC	TC	GG	AA
Rojo Pasión	TC	GT	GT	GA	GG	CT	TC	GT	AG
Valorange	TC	TT	GT	GA	GA	CT	TC	GG	AG

Figura 3.6. Polimorfismo obtenido en la aplicación de SNPlex en diferentes variedades de albaricoquero susceptibles (en verde) y resistentes (en rojo) al PPV dentro del Scaffold 1 y colindando con la región del PPVres.

Los resultados obtenidos revelan que estudios futuros podemos focalizarlos en la búsqueda de genes candidatos de la resistencia a PPV en otro locus diferente al de *PPVres*, sobre todo en los grupos de ligamiento (LG) 1 y 5. Hemos de resaltar que como hemos señalado anteriormente, un buen número de autores localizan diferentes QTLs de resistencia a PPV en estos grupos.

Por tanto, el LG 1 se perfila como uno de los más importantes en lo que respecta a la resistencia al PPV en albaricoquero y en otras especies del género *Prunus*. Otra posibilidad para avanzar en este sentido puede derivarse de la secuenciación del genoma completo del melocotonero [*Prunus persica* (L.), Batsch] llevada a cabo por International Peach Genome Initiative (IPGI) (www.rosaceae.org/peach/genome) de cara a buscar otros SNPs.

3.5. Conclusiones

- I. A partir de los resultados obtenidos, podemos considerar el trabajo de mapeo genético realizado con marcadores tipo SSRs como preliminar, ya que no se trata de mapas muy saturados. Sin embargo, el fenotipado de 3 años y el hecho de que muchos marcadores mapeados sean polimórficos en ambos parentales le da mayor robustez y relevancia a los QTLs detectados.
- II. Los resultados obtenidos muestran sin lugar a dudas la gran influencia del LG 1 en la resistencia al PPV en albaricoquero en el locus denominado *PPVres*.
- III. Estos datos nos ayudan a enfocar estudios dirigidos hacia zonas más concretas del genoma en la búsqueda de QTLs que controlen un mayor porcentaje de la variación del carácter, saturando otras zonas de interés fuera del *PPVres* y diseñando marcadores específicos que nos aporten información de la expresión fenotípica de determinados caracteres en cada uno de los descendientes de una población.

- IV.** A partir de los resultados del análisis de variaciones de secuencia de nucleótidos (Single nucleotide polymorphisms, SNPs) en el genoma de albaricoquero basado en la secuenciación de alto rendimiento de RNA (RNA-Seq), y combinando la técnica SNPlex para el genotipado de SNPs, fueron utilizados 101 SNPs organizados en 3 SNPlex para su aplicación en el análisis de diversidad genética y mapeo genético en albaricoquero.
- V.** Este enfoque proporciona alta flexibilidad, reproducibilidad y precisión en los ensayos, lo que nos hace considerar la secuenciación de RNA como una forma eficiente para generar marcadores moleculares de alta calidad en albaricoquero, suponiendo una herramienta sólida para detectar diversidad de nucleótidos en regiones codificantes del genoma.
- VI.** El uso de regiones codificantes de DNA para el desarrollo de SNPs a partir del RNA-Seq representa una ventaja adicional en el conocimiento de la expresión de la resistencia a PPV en albaricoquero, ya que las funciones de muchos de los genes identificados en el genoma del melocotonero son a menudo conocidas.

4. Análisis de expresión génica

4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

4.1. Introducción y Objetivos

Los estudios iniciales en el transcriptoma de *Prunus* se orientaron al desarrollo y alineamiento de ESTs (Expressed sequence tags) y al análisis de los genes candidatos en melocotonero (Yamamoto y col., 2002), albaricoquero (Decroocq y col. 2003; Grimplet y col. 2005) y almendro (Jiang y Ma 2003). Actualmente la base de datos del genoma Rosaceae (GDR) contiene más de 100.000 ESTs de distintas especies de *Prunus* (principalmente melocotonero) (Jung y col., 2004; 2008; 2009; Horn y col., 2005; Cabrera y col., 2009). Otra aproximación posterior fue la de la hibridación de mRNAs mediante las técnicas de cDNA-AFLP. Posteriormente se han desarrollado técnicas de análisis masivo de genes. La primera de las cuales fue el desarrollo del microarray, chips con unos miles de secuencias conocidas. Durante los últimos años, sin embargo, las llamadas metodologías de alto rendimiento (“high-throughput”) para la secuenciación del DNA (DNA-Seq, en 2005) y cDNA proveniente del ARN (RNA-Seq, en 2008), están causando una revolución en la investigación biológica. Además, la tercera generación de estos ultra secuenciadores pretende ser capaz de determinar la composición de bases de ADN de una sola célula. Todos estos proyectos de secuenciación han permitido generar unos 6.000 SNPs, que representados en el genoma de *Prunus* suponen una frecuencia de 0,007 SNPs/100bp (Meneses y col., 2007, <http://www.rosaceae.org>) (Jung y col., 2004; 2009). También se dispone de bases de datos con análisis de expresión cuantitativa de colecciones de ESTs de diferentes tejidos, genotipos y estados de desarrollo clasificados de acuerdo con el programa Gene Ontology (GO) (Vendramin y col., 2007; Lazzari y col., 2008).

En estos momentos disponemos de información precisa sobre la constitución de DNA o RNA de una planta sin necesidad de un clonaje previo. Las nuevas tecnología de secuenciación están generando una enorme cantidad de datos cuyo manejo y almacenamiento son posibles mediante un desarrollo similar de los medios informáticos (Martínez-Gómez y col., 2011). Posteriormente los trabajos de análisis masivo han continuado mediante la denominada búsqueda *in silico* utilizando avanzadas herramientas bioinformáticas para analizar los datos de las bases de datos existentes. También se dispone de bases de datos con análisis de expresión cuantitativa

de colecciones de ESTs de diferentes tejidos, genotipos y estados de desarrollo clasificados de acuerdo con el programa Gene Ontology (GO) (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Principales aproximaciones al análisis transcriptómico en frutales del género *Prunus*.

	Año	Base molecular	Datos generados
Análisis de genes candidatos (CGs)	1998	Secuenciación de mRNA	Entre 5 y 30 genes por ensayo
Identificación de Expressed sequence tags (ESTs)	2002	Secuenciación de mRNA e introducción en bases de datos	Alrededor de 100,000 identificados diferentes bases de datos
cDNA-AFLP	2006	Hibridación de secuencias de RNA y posterior secuenciación	Entre 5 y 30 genes por ensayo
Microarray	2006	Hibridación de secuencias de RNA en chips con secuencias conocidas	Entre 2,000 y 10,000 genes por ensayo (chip)
Secuenciación masiva (RNA-Seq)	2010	Ultra-secuenciación de RNA	Cientos de millones de lecturas por ensayo
Búsqueda <i>In silico</i> de genes o Expressed sequence tags (ESTs)	2012	Búsqueda y análisis de secuencias de mRNA en bases de datos	Miles o cientos de genes por ensayo

En estos momentos podríamos pues hablar de una nueva “era” en los estudios sobre la genética de los frutales del género *Prunus* (albaricoquero, almendro, melocotonero, ciruelo, etc.) y su aplicación en el desarrollo de nuevas variedades dentro de los distintos Programas de Mejora Genética. En este nuevo contexto (post-genómico) se presentan una serie de nuevos desafíos biológicos y oportunidades en la aplicación de toda la gama de las ciencias ómicas como la transcriptómica, en el desarrollo de estrategias eficaces de selección asistida por marcadores en *Prunus*. Estas oportunidades son de especial interés en el caso de *Prunus*, donde el conocimiento de la asociación entre genes y caracteres agronómicos es bastante limitado. En este contexto, se ha puesto en marcha un laboratorio de análisis transcriptómico de frutales de hueso dentro del Grupo de Mejora Genética de Frutales del CEBAS-CSIC de Murcia

(Figura 4.1). Este laboratorio tiene como objetivo el análisis transcriptómico en frutales del género *Prunus* y el desarrollo de aplicaciones a los programas de mejora. Está dedicado a los trabajos de extracción del RNA para su posterior envío a los diferentes servicios de secuenciación masiva tanto de mRNA como de miRNA existentes en España y Europa; además del análisis bioinformático de los datos obtenidos mediante secuenciación y la validación de los datos obtenidos mediante RT-PCR cuantitativa (qPCR) o semicuantitativa (RT-PCR) ensayando los genes de interés uno a uno.

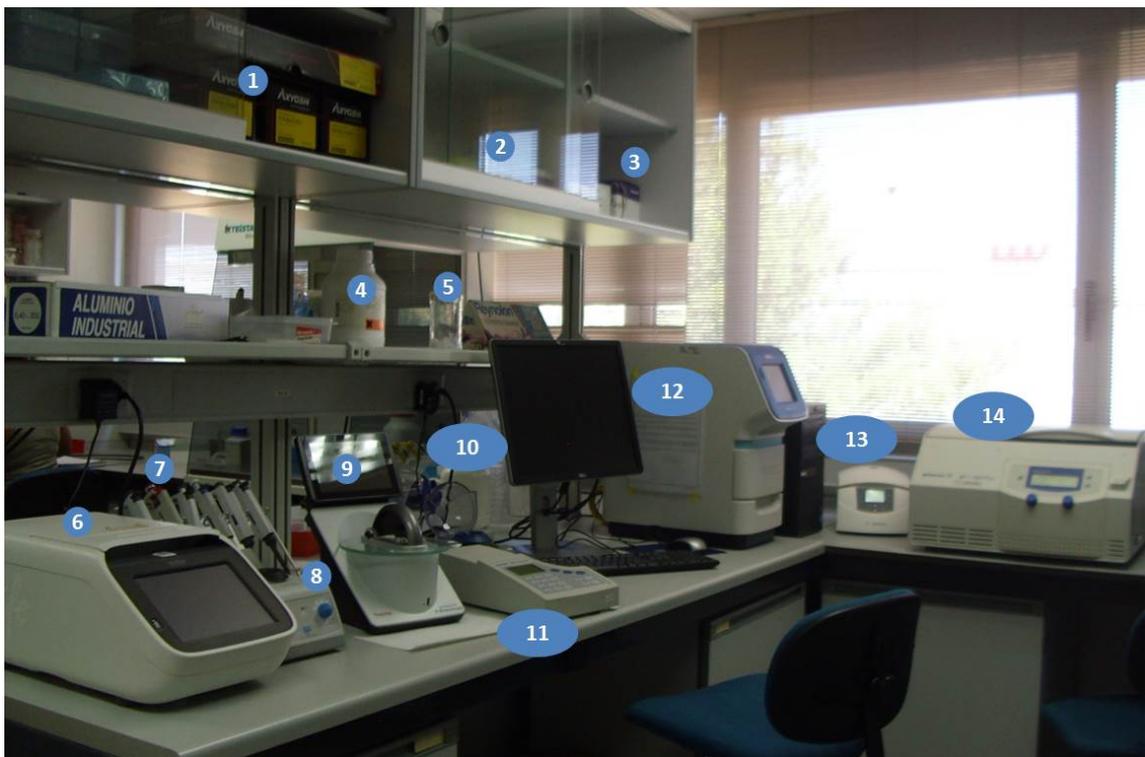


Figura 4.1. Laboratorio de análisis transcriptómico del Grupo de Mejora Genética de Frutales del CEBAS-CSIC de Murcia: 1. Placas PCR; 2. Puntas de pipeta con filtro; 3. Kits de extracción de ARN y amplificación mediante qPCR; 4. Reactivos; 5. Tubos Eppendorf; 6. Termociclador convencional PCR semicuantitativa; 7. Micropipetas; 8. Vórtex; 9. Nanodrop; 10. Minifuga; 11. Biofotómetro; 12. Termociclador PCR cuantitativa (qPCR); 13 Centrífuga; 14. Ultracentrífuga refrigerada..

En el caso de especies del género *Prunus*, la secuenciación del transcriptoma (RNA-Seq) ha sido aplicada en melocotonero para facilitar y aislar genes que controlan diferentes caracteres agronómicos del árbol y el fruto (Wang y col., 2013; Chen y col., 2014; Sanhueza y col., 2015). También se ha utilizado para estudiar los genes

implicados en la patogénesis de *Xanthomonas arboricola* (Socquet-Juglard y col., 2013) o *Lasiodiplodia theobromae* (Gao y col., 2016) en melocotonero. En otras especies, esta tecnología ha sido utilizada en el análisis de expresión génica de la dormancia de la yema en albaricoquero japonés (Zhong y col., 2013), el desarrollo del fruto (Alkio y col., 2014) y calidad del fruto (Wei y col., 2015) en cerezo dulce, o la resistencia al frío en almendro (Mousavi y col., 2014).

El RNA-Seq está sirviendo también para identificar SNPs en estas regiones exómicas y en muchos casos en genes que han sido anotados en el genoma de referencia del melocotonero que como hemos comentado en el futuro se pueden asociar a caracteres agronómicos de interés mediante análisis de QTLs (Quantitative trait loci) y MTLs (Mendelian trait loci) (Salazar y col. 2014). Entre las especies secuenciadas se encuentra el melocotonero la cual sirve de genoma de referencia de los estudios genéticos donde comparamos la expresión diferencial entre una situación normal y otra atípica, como una enfermedad, y de este modo podemos conocer los genes que participan en el proceso de defensa, por ejemplo. En *Prunus*, se estima la existencia de 27.852 genes que son responsables de las distintas características. La secuenciación del genoma completo del melocotón representa el principal hito de la era de la genómica en especies de *Prunus*. En 2010 se publicó en la red la primera secuencia completa de un genoma de *Prunus*, proveniente de un genotipo de melocotonero (www.rosaceae.org) (Verde y col., 2013). Esta información permite localizar en estos genomas de referencia los genes expresados, lo que puede ser más importante que los QTLs y MTLs desarrollados mediante la genética clásica de ligamiento que son en estos momentos la fuente más extensa de información sobre la genómica funcional de estas especies arbóreas.

Finalmente, como marcadores para selección asistida estas técnicas de análisis del ARN están en proceso de desarrollo con un gran potencial pero con una aplicación actual muy reducida en comparación con los marcadores de DNA. Un ejemplo reciente de aplicación de técnicas de qPCR para el análisis de la expresión de un carácter como la época de floración en almendro ha sido presentado por Prudencio y col. (2016). El almendro florece como respuesta a una pauta establecida de bajas y altas temperaturas después de la ruptura del letargo invernal. Estas necesidades de frío y

calor garantizan que en cada zona la floración tendrá lugar en un momento favorable para la polinización. Prudencio y col. (2016) han ensayado en yemas de flor la expresión de varios genes en dos variedades de almendro, una de floración tardía ('Penta') y otra de floración temprana ('Desmayo Largueta'), durante 10 fechas diferentes antes y después de la salida del letargo. Después del letargo de las yemas la inducción en la expresión de algunos genes se reduce drásticamente. Estos resultados ponen de manifiesto el papel de estos genes en el mantenimiento de la dormancia y el uso potencial de un marcador mediante la aplicación de la qPCR para detectar la salida del letargo en la especie almendro.

Estudios más recientes basados en el análisis de la secuenciación masiva de alta resolución (RNA-Seq) para el estudio de la resistencia al PPV se han realizado en otras especies, entre las que se encuentra la variedad hipersensible de ciruelo japonés "Jojo" (*Prunus domestica* L.) (Rodamilans y col., 2014), y del análisis de la interacción de melocotonero-PPV [*P. pérsica* (L.) Batsch] (Rubio y col., 2015).

Rodamilans y col. (2014) identificaron mediante RNA-Seq 3.020 genes expresados diferencialmente tras la inoculación del ciruelo resistente "Jojo", que mostraba una respuesta de hipersensibilidad, de los que 154 fueron caracterizados como genes potenciales de resistencia, de los que 10 estaban incluidos en el tipo NBS-LRR. En melocotonero se han descrito 1.554 genes expresados diferencialmente tras analizar las hojas de melocotonero GF-305 que había sido inoculado previamente (Rubio y col. 2015).

La infección temprana sin síntomas de la hoja de melocotonero se asocia con la inducción de genes relacionados con la resistencia a patógenos como los genes de la ruta del ácido jasmónico, los genes de proteínas resistencia, quitinasas, así como proteínas Lys-M. En cambio, cuando el virus está instalado se detectó la sobreexpresión de los genes de la proteína Dicer 2a que podrían representar una respuesta de supresión del silenciamiento por las proteínas víricas HCPro y P1.

El objetivo de este trabajo ha sido la mejora de el análisis de la expresión génica de la resistencia/susceptibilidad a PPV en albaricoquero suando técnicas de secuenciación masiva del mRNA (RNA-Seq). En este capítulo de la Tesis Doctoral

analizaremos los cambios de expresión génica en las hojas de albaricoquero resistente (“Rojo Pasión”) y susceptible (“Z506-7”) en respuesta a la infección por PPV mediante el uso de la técnica de secuenciación masiva Illumina (RNA-Seq).

4.2. Material vegetal

El material vegetal utilizado en los ensayos de análisis de la expresión génica proviene de dos genotipos de albaricoquero con características fenotípicas muy similares (autocompatibles, floración temprana, piel amarilla con chapa roja y carne anaranjada) pero con diferencia en su susceptibilidad a la sharka, ‘Rojo Pasión’ (resistente) y ‘Z506-7’ (susceptible), ambos proceden del cruce entre la variedad norteamericana ‘Orange Red’ (resistente, R) y la variedad española ‘Currot’(susceptible, S) (Figura 4.2).

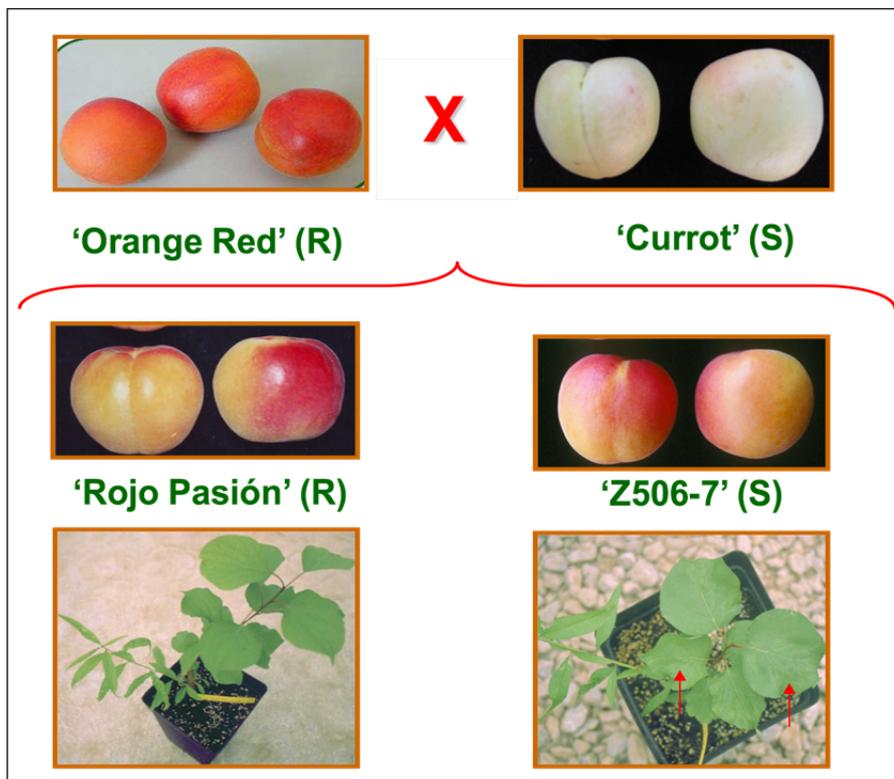


Figura 4.2. Material vegetal utilizado en los ensayos de expresión génica.

Estas variedades ensayadas ‘Rojo Pasión’ y ‘Z506-7’ fueron injertadas en patrones ‘Real Fino’ cultivados en maceta, en un invernadero de condiciones controladas a prueba de insectos. En cuanto a ‘Z506-7’, es también autocompatible, de floración temprana con un fruto similar al del cultivar ‘Rojo Pasión’ pero caracterizado por su gran susceptibilidad a PPV (Rubio y col., 2014). Por último añadir que los semilleros utilizados como patrón pertenecían al cultivar ‘Real Fino’.

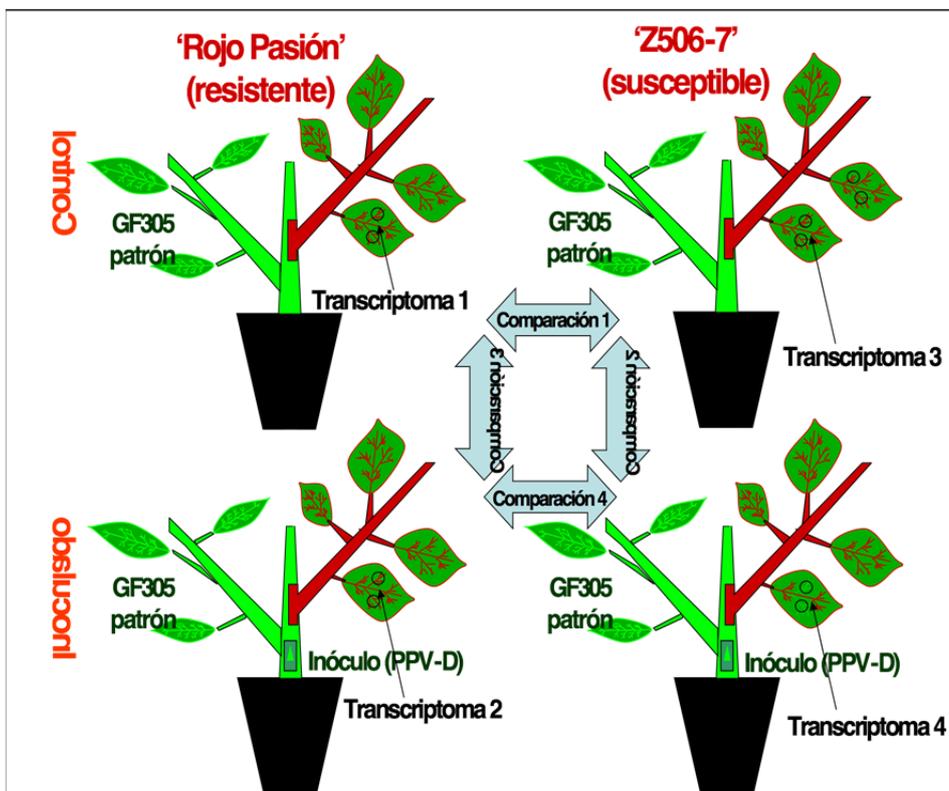


Figura 4.3. Esquema del diseño experimental experimental.

4.3. Metodología

Se procederá a la secuenciación masiva de 4 transcriptomas correspondientes a los genotipos de albaricoquero ‘Rojo Pasión’ (resistente a PPV) y ‘Z506-7’ (susceptible a PPV) control e inoculados. Así pues tendríamos Transcriptoma 1: ‘Rojo Pasión’ control;

Transcriptoma 2: 'Rojo Pasión' inoculado con PPV y sin síntomas; Transcriptoma 3: 'Z506-7' control y Transcriptoma 4: 'Z506-7' inoculado con PPV cogiendo muestras de hojas que muestren síntomas. La idea es comparar los transcriptomas entre sí realizando 4 comparaciones diferentes (*ver figura adjunta donde se indican los transcriptomas a analizar*) (Figura 4.3).

4.3.1. Extracción y secuenciación RNA

Se realizó la extracción del RNA total mediante el kit Rneasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo las introducciones del fabricante. A continuación se evaluó la cantidad y calidad de las muestras mediante el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, EEUU) para obtener concentraciones de 200 ng/microlitro en todas las muestras. De cada muestra se extrajeron 5 microlitros para ser enviados al Centro de Regulación Genómica de Barcelona para la elaboración de las librerías y la secuenciación del RNA. La extracción del mRNA se realizó con el kit Sera-mag (Thermo Scientific, Wilmington, EEUU) y la elaboración de las librerías en base al protocolo de Illumina. Tras 16 ciclos de PCR para enriquecer las muestras se extrajeron fragmentos de 300 pb a partir de su separación en geles de agarosa. Las librerías fueron secuenciadas con el secuenciador Illumina HiSeq2000 (100 PE, Paired end).

Las hojas muestreadas fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C, y el RNA total fue extraído mediante el Rneasy Plant Mini Kit® (Qiagen, Hilden, Germany). La calidad y cantidad del RNA total fue medida usando el espectrofotómetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA) y normalizados a la misma concentración (5µg, 200 ng/µl). Las muestras de RNA fueron enviadas al Parque Científico de Madrid (España) (<http://www.fpcm.es/es/servicios-a-la-id/servicios/genomica>) para la elaboración de la librería y la secuenciación del RNA. Las librerías de cDNA fueron secuenciadas mediante la Illumina HiSeq2000 obteniendo secuencias de 100 pares de bases.

4.3.2. Análisis bioinformático

Las lecturas obtenidas fueron filtradas para eliminar las regiones con baja calidad mediante el programa Fastx-Toolkit desarrollado por aScidea. Las lecturas de alta calidad fueron alineadas en el genoma de referencia del melocotonero (*P. persica* genome v1.0) mediante el programa Tophat 1.4.0 (Trapnell y col., 2009) y Bowtie 0.12.7 (Lindner y Friedel, 2012).

El análisis informático de las lecturas RNA-Seq se realizó mediante el software FastQC. Se realizó un preprocesamiento de las lecturas con el sistema fastx-toolkit (<http://www.ascidea.com/>) para filtrar las regiones de baja calidad. Las lecturas de alta calidad fueron mapeadas en el genoma de referencia de *P. persica* v1.0 obtenido de Genome database for Rosaceae (GDR, <http://www.rosaceae.org/peach/genome>) mediante Tophat 1.4.0 (Trapnell y col., 2009) y Bowtie 0.12.7 (Lindner y Friedel, 2012).

Las técnicas de secuenciación masiva generan gran cantidad de datos que permiten monitorizar los cambios de expresión génica en diferentes situaciones experimentales. Las secuenciaciones de un número creciente de genomas están mostrando a una gran fracción de genes con funciones biológicas específicas compartidas en todos los seres vivos eucariotas (Ashburner y col., 2000). Estas funciones están siendo clasificadas en tres categorías: procesos biológicos (conjunto de procesos moleculares con un principio y un final), funciones moleculares (actividades moleculares de un gen a nivel molecular) y componentes celulares (partes de la célula o del ambiente extracelular). Las lecturas de los transcriptomas una vez limpiadas y alineadas deben ser caracterizadas e interpretadas con el fin de darle sentido biológico. La bioinformática ha desarrollado varios programas para analizar el enriquecimiento en la expresión de los transcriptomas, siendo la herramienta mas usada Gene Ontology (GO) como fuente de anotación, que controla el sistema de vocabulario describiendo las funciones génicas a nivel molecular.

La aplicación GO contiene una gran base de datos con las caracterizaciones de los genes y proteínas. Esta base de datos es de libre acceso y se puede consultar a través de <http://amigo1.geneontology.org/cgi-bin/amigo/go.cgi>. Se han desarrollado herramientas GO específicas para agricultura como EasyGO, que fue sustituida por AgryGO, ambas herramientas caracterizan el enriquecimiento como SEA (Singular

enrichment analysis). Los resultados se obtienen en diferentes formatos como tablas HTML, archivos de texto tabulados, entre otros, lo que facilita las comparaciones cruzadas de los resultados de datos provenientes de múltiples grupos experimentales, en nuestro caso los datos de expresión transcriptómica de albaricoquero resistente y susceptible a PPV bajo condiciones experimentales y control.

El análisis de significación biológica se basó en Gene Ontology (GO) (Ashburner y col., 2000) mediante AgriGO (Du y col., 2010) y GeneCodis (Carmona-Saez y col., 2007). Por último, variant calling analysis from read mapping files was performed using Samtools 0.1.18 (Li y col., 2009). Las variantes de alta calidad se obtuvieron tras el filtrado de los SNPs con puntuaciones de calidad > 20 y con valores INDEL > 50.

GO también permite representar los resultados de expresión en diagramas de barras y en árboles jerarquizados, que se describen a continuación. El diagrama de barras representa los términos sobreexpresados en tres categorías, en el eje de ordenadas muestra el porcentaje de genes mapeados en cada término GO, que es calculado dividiendo el número de genes mapeados en cada término GO entre el número de genes totales de su lista. El diagrama de barras también muestra el porcentaje de genes de la lista de referencia, en nuestro caso cualquiera de los transcriptomas a comparar. En cuanto a la representación mediante árboles jerárquicos, aparecen los términos GO sobreexpresados en categorías de procesos biológicos generados a partir de SEA, mostrando su identificación GO ID, la definición del término, su información estadística y su nivel de enriquecimiento relacionado con la caja en la que aparece el término.

La expresión diferencial (DE) de los genes fue calculada con el programa Cufflinks 1.3.0 (Trapnell y col., 2010). El programa Cufflinks compara la expresión de transcritos generados bajo distintas condiciones. El protocolo se inicia con las lecturas iniciales que deberán ser ensambladas para generar una lista de genes de genes expresados diferencialmente.

El número de lecturas generadas a partir de RNA-Seq en un transcriptoma depende de la densidad de esas secuencias en las muestras analizadas. Esas lecturas son sometidas a un protocolo formado por un conjunto de softwares TopHat que alinea las lecturas de RNA-Seq al genoma de referencia mediante el software Bowtie

(alineador de lecturas contras de propósito general) y descubre los lugares de corte. Estos alineamientos son ensamblados mediante el paquete de programas Cufflinks. Este paquete contiene una secuencia de programas que empieza por el ensamblaje de los transcritos (Cufflinks), seguido de la comparación de los ensamblajes transcritos con las anotaciones previas (Cuffcompare), combinación de dos o más transcriptomas (Cuffmerge) y por último busca genes expresados diferencialmente y los procesamientos de corte y empalme diferenciales (Cuffdiff). Estos programas necesitan realizar las comparaciones con un genomas de referencia y solo trabajan con datos de Illumina o SOLiD además de requerir el manejo de UNIX, aunque actualmente hay interfaces que facilitan su manejo.

El protocolo comienza con las lectura directamente secuenciadas por RNA-seq y finaliza con la visualización del análisis. Para empezar las lecturas de cada transcriptoma son mapeadas en el genoma de referencia con el programa TopHat. Los archivos de alineamiento generados por TopHat son aptos para ser ensamblados con el software Cufflinks. Los transcriptomas ensamblados de cada condición son combinados mediante Cuffmerge. Finalmente las lecturas y los ensamblados de cada transcriptoma son el sustrato para que Cuffdiff calcule los niveles de expresión y la significación estadística en los cambios observados. Cuffdiff también agrupa los transcritos en grupos de significado biológico (transcritos que comparten el mismo lugar de inicio de la transcripción) e identifica los genes con regulación diferencial tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. El número genes identificados como diferencialmente expresados o regulados depende totalmente de las condiciones comparadas. Comparaciones entre replicas no deben generar casos de expresión diferencial, pero en comparaciones entre distintos tejidos o tratamientos se detentan cientos o miles de genes con distintos niveles de expresión. El alto nivel de sensibilidad de RNA-Seq junto con los programas comentados permite identificar genes con una expresión diferencial menor a dos veces.

Una aclaración que debe ser expuesta relacionada con el cálculo del nivel de expresión a partir de las lecturas radica en que el número de lecturas de un transcrito es proporcional a su abundancia en la muestra. Debido a que los fragmentos de cDNA son seleccionados en base a su tamaño para la construcción de las librerías, lo que

produce que los transcritos más largos produzcan más fragmentos para ser secuenciados que los transcritos cortos. Para el cálculo del nivel de expresión correcto, Cufflinks cuenta el número de lecturas que mapean en cada transcrito y normaliza su abundancia en base a la longitud del transcrito. De igual modo, la secuenciación de la misma librería en dos ocasiones distintas puede producir distintos volúmenes de esas lecturas. Estos dos motivos hacen necesario la normalización del número de lecturas cada análisis para que puedan ser comparados. Para la normalización las lecturas se expresan como fragmentos por kilobase de transcrito por millón de fragmentos mapeados (FPKM, o RPKM para secuenciaciones de un solo extremo), los valores de expresión FPKM son directamente proporcionales a la abundancia.

Cuando un gen se procesa de manera alternativa generando múltiples isoformas en la misma muestra, muchas de las lecturas que mapean a ese gen también mapearán exones constitutivos de esa isoforma dificultando el cálculo del número de lecturas de cada transcrito. Una misma secuencia exónica puede proceder de la misma o de distintas isoformas, para lo que los programas Cufflinks y Cuffdiff utilizan un modelo estadístico lineal que estima una abundancia a cada transcrito en base a la máxima probabilidad.

La lista resultante de isoformas diferencialmente expresadas fue filtrada mediante los valores $\ln(\text{fold_change}) > 2$ y < -2 y un q-value de 0.05. FPKM (Fragments per kilobase pair of exon model per million fragments) que fueron usados para normalizar y cuantificar el nivel de expresión genética.

4.3.3. Validación mediante qPCR

Los datos de expresión diferencial procedentes del análisis RNA-Seq fueron validados mediante qPCR en un nuevo experimento con nuevas plantas replicas de las expuestas en material biológico. El RNA total se extrajo de las hojas usando el kit Rneasy Plant Mini Kit® en tres plantas control (Rc y Zc) y tres inoculadas (Ri y Rc). Este kit fue usado para examinar los patrones de expresión de los genes seleccionados. La retrotranscripción se llevó a cabo con el kit PrimeScript® Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen, Applied Biosystems, Madrid, España). Se seleccionaron ocho genes con

expresión diferencial en los distintos tratamientos relacionados con la susceptibilidad (previamente descritos por Rubio y col., 2015) o resistencia (previamente descritos por Zuriaga y col., 2013) con q-values < 0.05 y altos valores RPKM para validar los datos del análisis RNA-Seq (Tabla 4.1). Los cebadores específicos de esos ocho genes fueron diseñados con el programa Primer3Plus (Untergasser y col., 2012).

Tabla 4.2. Cebadores específicos diseñados mediante el programa Primer3Plus para la validación mediante qPCR.

Genes Estudiados		
Descripción	Forward	Reverse
Endoribonuclease Dicer homologue 2a	CCAGCACCTATCACCATG AATATAA	GGCCAGCCCCGCAT
Protein kinase superfamily protein	TCTACAGCCGCTATTGAA TGCTC	GCGAAGCCAAGCGTTTTTT
Squamosa promoter-binding-like protein 12	CCAGAGGAAAATCAGCAA GAAATT	GCTGTCTAAGATAGTGCCA GGGA
Transporter: NtPDR3//pleiotropic drug resistance 9	GGGACACAATTGAGCTG GTAAGA	AGGAGTGGGAAAATACAA GTCCTTT
Ubiquitin-like superfamily protein	ATCGCAAATACCCAGAT CGA	CTTTTCCATTTCAGGCAGGT CT
TRAF-like family protein	CCAGCACCTATCACCATG AATATAA	GGCCAGCCCCGCAT
Unknown protein (ORF)	AAAGACAAAGAACCGGCT GC	CACGTGATCTGCACGCCA
Mediator complex subunit 21	TCACTACCATCGGAACGC TG	GGGTAATTCGGAGAGATTC GG
Genes de Referencia		
Descripción	Forward	Reverse
Expansin-A8	CCCTCCTCCAGCACTTT G	CTGCACCTCCAACGTTTGT G
Actin	GTTATTCTTCATCGGCGTC TTCG	CTTCACCATTCCAGTTCCAT TGTC
18S rRNA*	GTTACTTTTAGGACTCCGC C	TTCCTTTAAGTTTCAGCCTT G

Las reacciones de RT-qPCR se realizaron con LightCycler de Life Technologies (Figura 4.4) usando SYBR Green para visualizar las amplificaciones del cDNA. La reacción se sometió a un ciclo inicial de 5 minutos a 95 °C, seguido de 45 ciclos de 10 s a 95 °C, 5 s a 58 °C, y 10 s a 72 °C. Para cada par de cebadores y para cada muestra se valoró la eficiencia (E) de la PCR y el ciclo de cuantificación (Cq) mediante el software LinRegPCR versión 2014.2 (Ruitjer y col., 2009). La especificidad del amplicón fue

examinada mediante el análisis de la curva de fusión. La expresión génica relativa (relative gene expression, RGE) para un gen de interés (gene of interest, GOI) se calculo usando la ecuación modificada $E_{GOI}^{\Delta(Cq_{GOI})} / E_{REF}^{\Delta(-Cq_{REF})}$ from Pfaffl (2001). Para cada muestra se realizaron tres replicas biológicas independientes con al menos dos replicas técnicas.



Figura 4.4. Equipo de qPCR usado.

El Cq para el factor de normalización de referencia (REF) se calculó tomando la media geométrica de los tres genes de referencia: el rRNA de 18S de meloconero (Rasori y col., 2002); la actina; y la expansina (Tong y col., 2009). Para calcular el efecto del cultivar y la infección se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una dimensión. Las medias fueron separadas aplicando el test LSD de Fisher protegido con $p < 0.05$. El análisis se realizó con el software Statgraphics Plus 5.1 (MANugistics Inc. Rockville, MD, EEUU). Las correlaciones entre los distintos valores RPKM de la RNA-Seq y los valores RGE de la qPCR fueron calculados usando el coeficiente de correlación de Pearson.

4.4. Resultados y discusión

4.4.1. Transcriptomas obtenidos mediante RNA-Seq de muestras de albaricoquero q

Los genotipos de albaricoquero ‘Rojo Pasión’ (resistente a PPV) y ‘Z506-7’ (susceptible a PPV) fueron injertados en plantas de semillero de albaricoquero ‘Real Fino’ sanas (control) e inoculadas. Posteriormente fueron analizadas para infección sistémica de PPV mediante ELISA y RT-PCR. El RNA total de los controles Rojo Pasión y Z506-7, así como sus replicas infectadas fue secuenciado.

Las muestras de RNA fueron fragmentadas y ligadas con adaptadores antes de sintetizar el cDNA y de ser amplificado mediante PCR para su secuenciación. Un total de 1.209 millones de lecturas de extremos apareados de 100 pb fueron generadas a partir de las siete muestras analizadas (*Tabla 4.3*). A estas primeras lecturas se les eliminaron las secuencias adaptadoras, las lecturas vacías y las secuencias de baja calidad. Como resultado se obtuvieron 1.163 millones de lecturas de alta calidad (96%), que fueron denominadas como lecturas limpias.

Tabla 4.3. Lecturas obtenidas usando RNA-Seq en los transcriptomas de dos albaricoqueros ensayados e ‘Rojo Pasión’ (resistente a PPV) y ‘Z506-7’ (susceptible a PPV) control e inoculados..

Muestras	Lecturas limpias	Lecturas mapeadas <i>P. persica</i> v 1.0	Lecturas mapeadas Genoma del PPV
‘Z506-7’ control-1 (Zc-1)	172,167,692 (96%)	121,897,300 (70.3%)	0 (0.0%)
‘Z506-7’ control-2 (Zc-2)	177,433,648 (96%)	127,044,113 (71.7%)	0 (0.0%)
‘Z506-7’ inoculado-1 (Zi-1)	169,306,217 (96%)	114,750,138 (67.4%)	8,416,611 (4.9%)
‘Z506-7’ inoculado-2 (Zi-2)	168,574,941 (96%)	108,567,566 (64.3%)	10,453,472 (6.2%)
‘Rojo Pasión’ control-1 (Rc-1)	141,354,468 (96%)	92,423,368 (65.2%)	0 (0.0%)
‘Rojo Pasión’ inoculado-1 (Ri-1)	175,799,070 (95%)	124,637,608 (70.8%)	0 (0.0%)
‘Rojo Pasión’ inoculado-2 (Ri-2)	158,922,500 (95%)	112,178,376 (70.8%)	0 (0.0%)
Total	1,163,558,536 (96%)	801,498,469 (68.8%)	18,870,083 (1.6%)

Mediante alineamiento iterativo se mapeó con éxito el 68,8% de las lecturas limpias en el genoma de referencia del melocotonero v1.0 (www.rosaeae.org), mientras un 32,2% de las lecturas limpias no fue reconocida por ninguna región de los

ocho pseudocomosomas. De las lecturas no mapeadas, 18,86 millones de lecturas (5,3%), pertenecientes al genoma del PPV se obtuvieron en las dos muestras de albaricoquero 'Z506-7' inoculadas y con síntomas de sharka.

Estas lecturas no mapeadas podrían contener nuevas uniones de empalme así como secuencias pertenecientes a fuentes de contaminación (Philippe y col., 2013). El porcentaje de mapeo en el genoma de referencia obtenido en este trabajo es similar al 70% de lecturas no mapeadas comunicadas en otros estudios con albaricoquero (Martínez-Gómez y col., 2011) y menor a los datos obtenidos en melocotonero por Wang y col. (2013) (89%) y Rubio y col. (2014) (85%).

En la misma línea hay que señalar que este porcentaje de mapeo es mayor que los datos previamente obtenidos en albaricoquero japonés (*P. mume* Sieb. y Zucc.) donde se obtuvo un 50% de mapeo de las lecturas (Zhong y col., 2013). Estos resultados confirman el alto nivel de sintenia en los genomas del género *Prunus* (Jung y col., 2009), así como la utilidad del genoma del melocotonero como genoma de referencia para los estudios de RNA-Seq en distintas especies de *Prunus*.

4.4.2. Análisis funcional de los genes expresados diferencialmente mediante el sistema Gene Ontology (GO)

Los 2.502 DEGs filtrados que se identificaron en las comparaciones realizadas entre los genotipos de albaricoquero control e inoculado 'Rojo Pasión' y 'Z506-7' fueron asignados con uno o más términos GO.

En todos los casos la asignación GO cayó dentro de amplias categorías para dos de los tres dominios funcionales principales de GO, procesos biológicos (BP) (*Figura 4.5*) y funciones moleculares (MF) (*Figura 4.6*). En el árbol genealógico, los términos de la categoría BP son mucho más generales que los términos específicos de la categoría MF. Además, cuantos más genes se obtienen en cada comparación (Zc vs. Zi, Rc vs. Ri, Zc vs. Rc, y Zi vs. Ri), más probable es obtener más genes sobrerrepresentado en las categorías BP o MF.



Figura 4.5. Caracterizaciones de los procesos biológicos (GO) de los genes expresados diferencialmente en las comparaciones Zc-Zi, Rc-Ri, Zc-Rc y Zi-Ri.

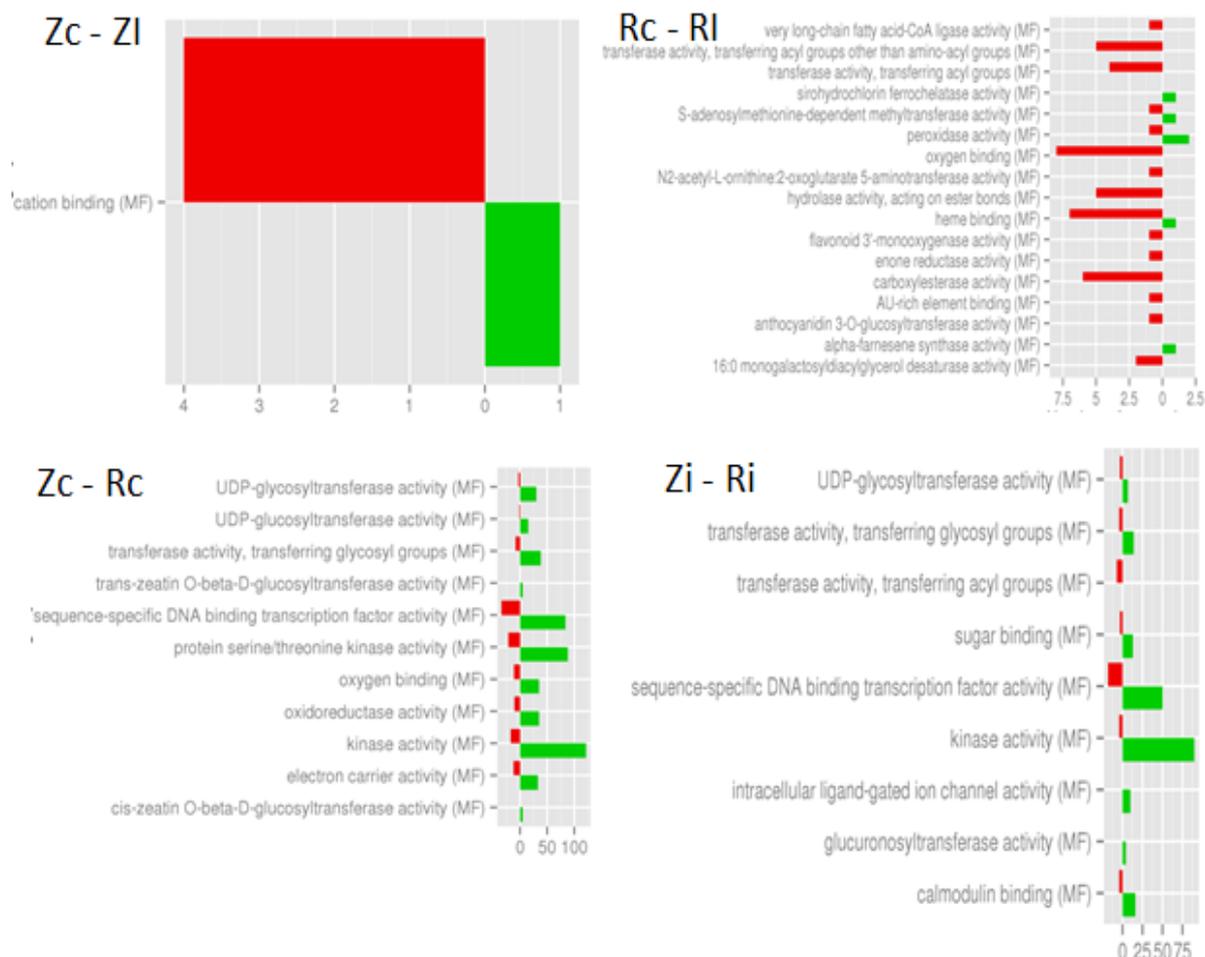


Figura 4.6. Caracterizaciones de las funciones moleculares (GO) de los genes expresados diferencialmente en las comparaciones Zc vs. Zi, Rc vs. Ri, Zc vs. Rc y Zi vs. Ri.

Un total de 11 caracterizaciones diferentes significativas GO se obtuvieron para el genotipo control de albaricoquero 'Z506-7' y (Zc vs. Zi) inoculado, 10 pertenecientes para procesos biológicos (Figura 4.5) y uno para funciones moleculares (Figura 4.6). Por otro lado, se obtuvo un total de 30 caracterizaciones diferentes significativas GO para el genotipo control de albaricoquero 'Rojo Pasión' control e inoculado (Rc vs. Ri), 13 para procesos biológicos (Figura 4.5) y 17 para funciones moleculares (Figura 5). Y un total de 21 caracterizaciones diferentes significativas GO para el control 'Rojo Pasión' y 'Z506-7' (Zc vs. Rc), 10 para los procesos biológicos (Figura 4.6) y 11 para las funciones moleculares (Figura 5); y 19 caracterizaciones diferentes significativas GO para los genotipos inoculados 'Rojo Pasión' y 'Z506-7' (Zi vs. Ri), 10 para procesos

biológicos (*Figura 4.5*) y 9 para las funciones moleculares (*Figura 4.6*). Esto significa que es mucho menos probable que dos genes caigan dentro de la misma categoría BP y MF.

En estas figuras se han incluido solo los términos que han aparecido sobreexpresados con un p-value <0,05 en el test hipergeométrico y un valor <0.05 en el test múltiple FDR (False Discovery Rate) mostrados de los datos filtrados. Teniendo en cuenta estos datos, obtuvimos en dos de las cuatro comparaciones 500 genes (Rc vs. Zc y Ri vs. Zi) y en otros dos con menos de 500 genes DE filtrados (incluyendo Zc vs. Zi y Rc vs. Ri). De los cuatro gráficos MF, hay dos términos que claramente tienen suficientes genes DE (hasta 60). Los otros dos gráficos, incluyendo Zc vs. Zi tienen muy pocos genes sobrerrepresentados como términos DS (hasta 6).

Curiosamente, en el gráfico de enriquecimiento GO de Zc vs. Zi hubo un término sobrerrepresentado significativamente con cuatro genes (cation binding) a nivel de función molecular (*Figura 4.6*). La Rc vs. Ri tuvo pocas comparaciones DEG pero claramente relacionadas, así que parece que hay unas pocas rutas bien definidas afectadas por la infección de PPV. En la comparación Zc vs. Zi parece que los genes DE no se agrupan tan bien definidos y casi cada uno de los genes DE pertenecen a una categoría diferente de MF, haciendo casi imposible encontrar términos sobrerrepresentados significativamente.

Estos resultados GO son consistentes con la hipótesis de que el estrés marca la transición desde crecimiento y reproducción a respuestas fisiológicas y metabólicas para la defensa (Bilgin y col., 2010).

En general, podemos afirmar que las hojas de albaricoquero en las que el virus se ha acumulado y los síntomas se han desarrollado parecen tener escasa representación de genes involucrados en los procesos celulares y una alta representación de genes relacionados con las actividades catalíticas, actividades reguladoras del metabolismo y actividades relacionadas con procesos biológicos.

En relación con la susceptibilidad observada en albaricoquero, Rubio y col. (2014) analizaron un genotipo de melocotonero susceptible, describiendo varios genes asociados con la expresión de los síntomas de sharka en esta especie relacionados con

la respuesta a los estímulos bióticos, al metabolismo de carbohidratos y lípidos, así como a la regulación negativa de la actividad catalítica. A esto hay que añadir, los hallazgos de Wang y col. (2005) en los que se identificó una expresión alterada de genes en hojas de melocotonero involucradas en la defensa, el transporte celular y la síntesis de proteínas, y de proteínas con función de unión tras la infección con PPV. En especies herbáceas, Babu y col. (2008) identificaron en *Arabidopsis* genes con expresión diferencial tras la infección con PPV que estaban involucrados con el metabolismo de azúcares solubles, del almidón y de aminoácidos, cloroplastos, destino proteico, proteínas de almacenamiento y desarrollo, síntesis proteica y componentes asociados a la pared celular. En esta misma línea, Dardick (2007) describió genes expresados diferencialmente con un alto grado de asociación con los procesos patogénicos en *Nicotiana*.

Por último, describiremos el comportamiento del genotipo resistente ‘Rojo Pasión’, en el que Schurdi-Levraudy col. (2006) describió genes expresados diferencialmente codificando proteínas involucradas en el metabolismo, transducción de señales, defensa, estrés y conexiones intra/intercelulares tras la inoculación con PPV de la variedad parcialmente resistente ‘Goldrich’.

4.4.3. Identificación de genes involucrados en la resistencia y la susceptibilidad

Los datos del RNA-Seq muestran que la susceptibilidad a PPV en albaricoquero es un proceso complejo con cientos o miles de genes involucrados (Tabla 4) que reflejan la batalla continua entre el virus (PPV) y la planta *Prunus* a nivel de resistencia frente al patógeno y de silenciamiento génico. De los 256 genes filtrados expresados diferencialmente tras la inoculación de los genotipos susceptibles ‘Z506-7’ solo 17 fueron similares a los observados por Rubio y col. (2014) en el estudio del genotipo de melocotón susceptible y un total de 239 genes se consideraron específicos de albaricoquero.

Es de destacar que la mayoría de los genes clave relacionados con la susceptibilidad mencionados por Rubio y col. (2014) también se expresaban diferencialmente en nuestros genotipos de albaricoquero susceptibles (comparaciones

Zc vs. Zi), entre estos genes se incluye la glucan endo-1,3-beta-glucosidasa (ppa005142m) y una proteína relacionada con la patogénesis [PR-4BB (ppa012991m)] que presentaban niveles de expresión con alta significación ($q\text{-val}<0.05$) y la *endoribonucleasa Dicer homolog 2a* (ppa020875m), la *alleno oxido sintasa*(ppa004133m), la *S-adenosylmethionina sintasa 2*(ppa015634m),la *ubiquitin carboxi-terminal hidrolasa* (ppa020875m) y el alérgeno mayor *Pu av1* (ppa012678m) con menores niveles de expresión y menor significación ($q\text{-val}>0.05$)(Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Genes expresados diferencialmente (ED) totales y filtrados identificadas usando RNA-Seq en los dos albaricoqueros ensayados e ‘Rojo Pasión’ (resistente a PPV) y ‘Z506-7’ (susceptible a PPV) control e inoculados.

Comparaciones	Genes ED totales	Genes ED filtrados
‘Z506-7’ control vs. ‘Z506-7’ inoculated	1,980	256
‘Z506-7 control’ vs. ‘Rojo Pasión’ control	7,488	1,283
‘Z506-7’ inoculated vs. ‘Rojo Pasión’ inoculated	2,945	782
‘Rojo Pasión’ control vs. ‘Rojo Pasión’ inoculated	740	181

Estos procesos infectivos en albaricoquero y en melocotonero (Rubio y col. 2014) se asociaron con la inducción de genes relacionados con la resistencia a patógenos como la glucan endo-1,3-beta-glucosidasa, PR-4B, S-AdoMet sintetasa y la ubiquitin carboxi-terminal hidrolasa. También es de destacar que en el locus de resistencia (PPVres) Zuriaga y col. (2013) describieron en albaricoquero genes similares a los que confieren resistencia contra potivirus, como la S-AdoMet sintetasa y la ubiquitin carboxi-terminal hidrolasa.

El S-Adenosil metionina (SAM), dador general de grupos metilo en citosol, cloroplastos y mitocondria, es necesario para la síntesis de fenilpropanoides ya que es el principal grupo dador utilizado por la OMTs (o-difenol-O-metiltransferasas) en la biosíntesis de mono-lignol. Shen y col. (2002) publicaron que los genes SAM presentaban una alta expresión en tejidos muy lignificados lo que sugiere que la lignificación consume gran cantidad de SAM.

Por otro lado, la expresión diferencial de la endoribonucleasa Dicer proteína 2a, similar a lo observado en melocotonero (Rubio y col. 2014), podría sugerir un silenciamiento génico que sería suprimido por las proteínas virales HCPro y P1 (Valli y col., 2006).

Respecto a la resistencia a PPV en albaricoquero hay que señalar que también es un proceso complejo basado en la batalla continua entre el virus y la planta. El locus de resistencia PPVres descrito por Zuriaga y col.,(2013) en melocotonero contiene un total de 31 transcritos putativos.

Algunos de los genes clave relacionados con la resistencia mencionada por Zuriaga y col., (2013) también se expresaban diferencialmente en nuestros genotipos de albaricoquero resistentes (comparaciones Rc vs. Ri) aunque con una función desconocida en la que incluiremos los genes ppa000229 con un niveles de expresión con alta significación ($q\text{-val}<0.05$) y ppa008951, ppb020867 y ppa03116 con menores niveles de expresión y menor significación ($q\text{-val}>0.05$).

Estos resultados indican que los genes MATH (control a larga distancia del movimiento del virus) están involucrados en la resistencia pero probablemente junto con otros genes (efecto del fondo genético). Estos autores también describieron la familia de genes MATH (Meprin and TRAF-C homology domain) como posibles candidatos para la resistencia coincidiendo con observaciones previas (Cosson y col., 2010). Por último, recientes studios subrayan la posibilidad de un segundo locus involucrado en el control de esta característica (Rubio y col., 2014; Decroocq y col., 2014).

Un total de 13.153 genes expresados diferencialmente (DEGs) fueron identificados en las comparaciones llevadas a cabo en 'Rojo Pasión' y 'Z506-7' control e inoculado, 'Rojo Pasión' control vs. 'Rojo Pasión' inoculado (Rc vs. Ri), 'Z506-7' control vs. 'Z506-7' inoculado (Zc vs. Zi), 'Rojo Pasión' control vs. 'Z506-7' control (Rc vs. Zc) y 'Rojo Pasión' inoculado vs. 'Z506-7' inoculado (Ri vs. Zi). Sin embargo, tras la filtración de los datos que incrementando la significación estadística ($q\text{-val} < 0.05$) un total de 2.502 DEGs fueron observados en las cuatro comparaciones realizadas (Tabla 4.3; Tablas S3; S4; S4; S5 y S6, ver información suplementaria). Un total de 164, 239, 803 y 239 DEGs filtrados fueron específicos para Rc vs. Ri, Zc vs. Zi, Rc vs. Zc y Ri vs. Zi, respectivamente (Figura 4.7; Figura 4.8).

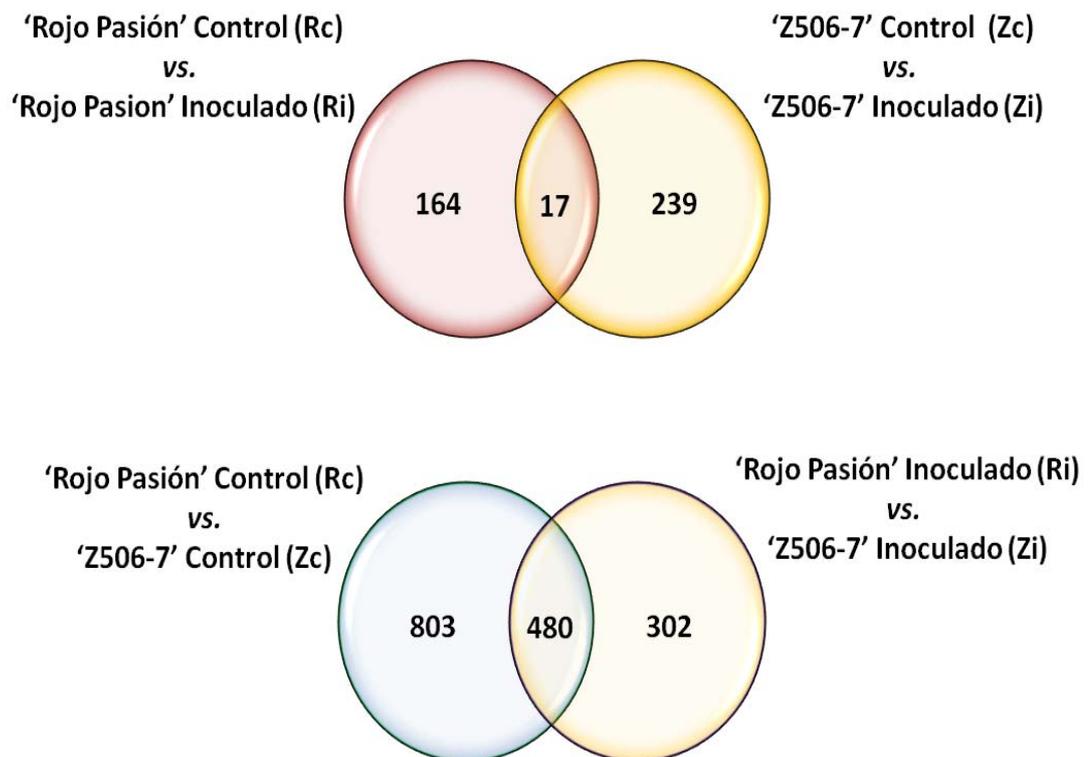


Figura 4.7. Diagramas de Venn indicando el número de genes expresados diferencialmente específicos y compartidos para las comparaciones Rc vs. Ri, Zc vs. Zi, Rc vs. Zc y Ri vs. Zi.

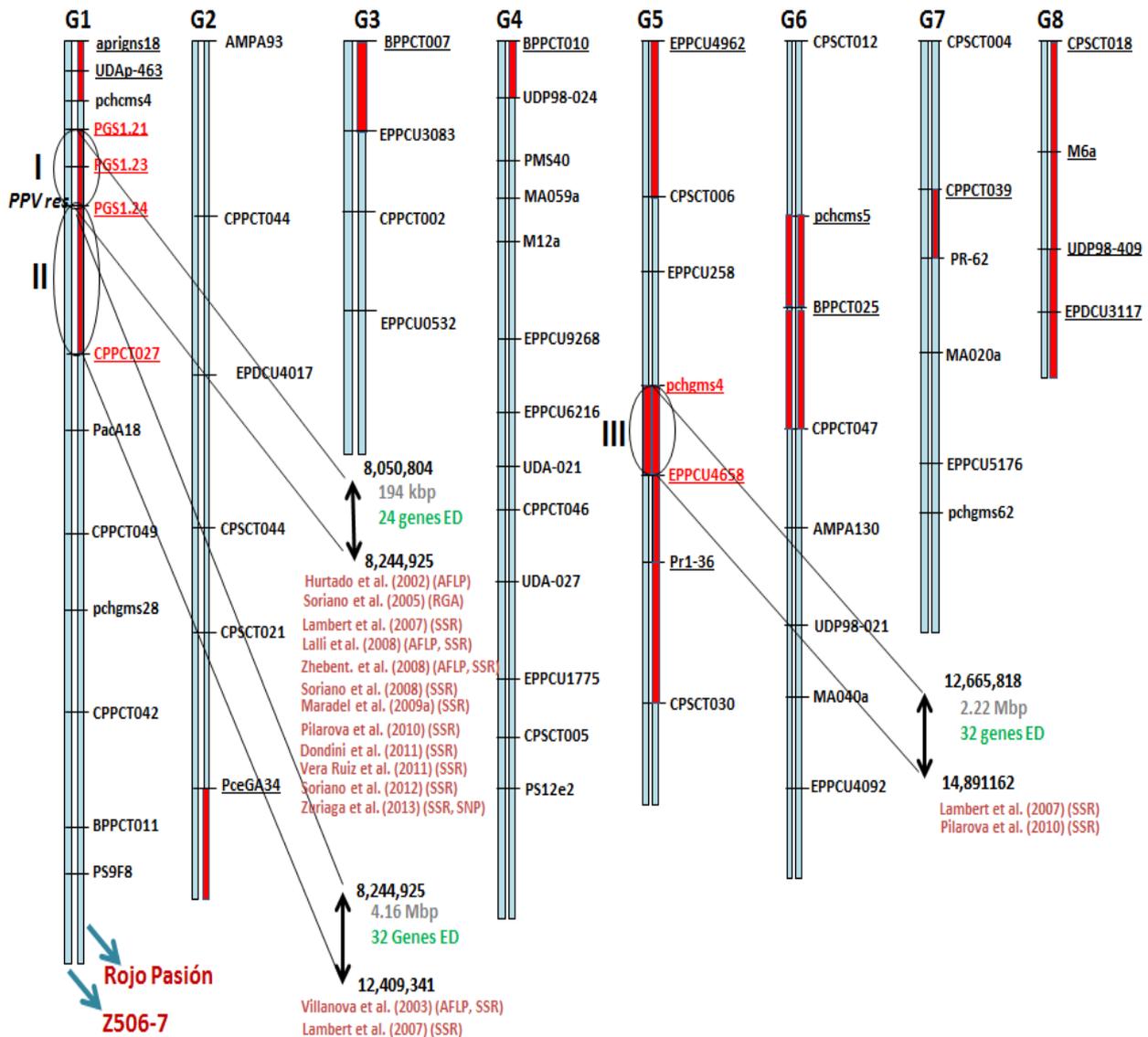


Figura 4.8. Representación esquemática de los 61 marcadores SSR ensayados en los 4 grupos de ligamiento (G) de los genotipos de albaricoquero ‘Rojo Pasión’ (resistente a PPV) y ‘Z506-7’ (Z, susceptible a PPV) indicando las 3 principales regiones donde se ha descrito la resistencia a PPV en albaricoquero. También en verde se indican los genes expresados diferencialmente (ED) en las regiones de interés.

El filtrado de los genes expresados diferencialmente incrementa el poder de detección desde genes con una expresión moderada a alta, aunque se observó una pequeña pérdida de genes de baja expresión (Rau y col., 2013).

En contraste con estos resultados, el análisis de los genes expresados diferencialmente presentan el inconveniente de no aclarar si los genes con bajo número de lecturas son escasamente expresados o es un artefacto del método (Wagner y col. 2013). Para confirmar la naturaleza de la baja expresión obtenida en los genes de interés identificados en el análisis de los DEGs totales hay que realizar la verificación de los niveles de expresión mediante qPCR.

Las enormes diferencias observadas en los niveles de expresión están en consonancia con las diferencias observadas a nivel genómico mediante el uso de marcadores SSR en lugar de características pomológicas y fenomenológicas de los genotipos ensayados.

Del total de genes DEG, 88 están localizados en las diferentes regiones descritas como posibles responsables para la resistencia a PPV incluyendo la *PPVres* y otras regiones del LG1 y LG5 (Figura 4.8).

Estos resultados ponen de manifiesto que la respuesta temprana a la infección por PPV en melocotonero y albaricoquero está asociada a una inducción de genes relacionados con la resistencia a patógenos como ácido jasmónico, proteínas de resistencia, quitinasas, citoquininas o proteínas Lys-M. En cambio, cuando el virus se había establecido, se observaba una sobreexpresión de genes *Dicer protein 2a* que podían evidenciar también una respuesta de silenciamiento génico de la planta suprimida mediante las proteínas HCPro y P1 de PPV. Este fenómeno de silenciamiento génico puede ser la causa de la eliminación de síntomas del virus en plantas susceptibles ya infectadas. Por otro lado, acerca de la resistencia a PPV en albaricoquero, los resultados obtenidos indican que genes tipo RTM [Restricted *Tobacco etch virus* (TEV) movement] dentro de la familia de genes de homología de dominio MATH parecen ser los principales implicados en el control de esta resistencia. Además de estos genes, otros genes candidatos implicados en la resistencia son *Pleiotropic drug resistance 9 gene*; *Cysteine-rich secretory proteins*, *Antigen 5 and Pathogenesis-related 1 protein (CAP)* y *Late embryogenesis abundant protein (LAE)* (Figura 4.9).

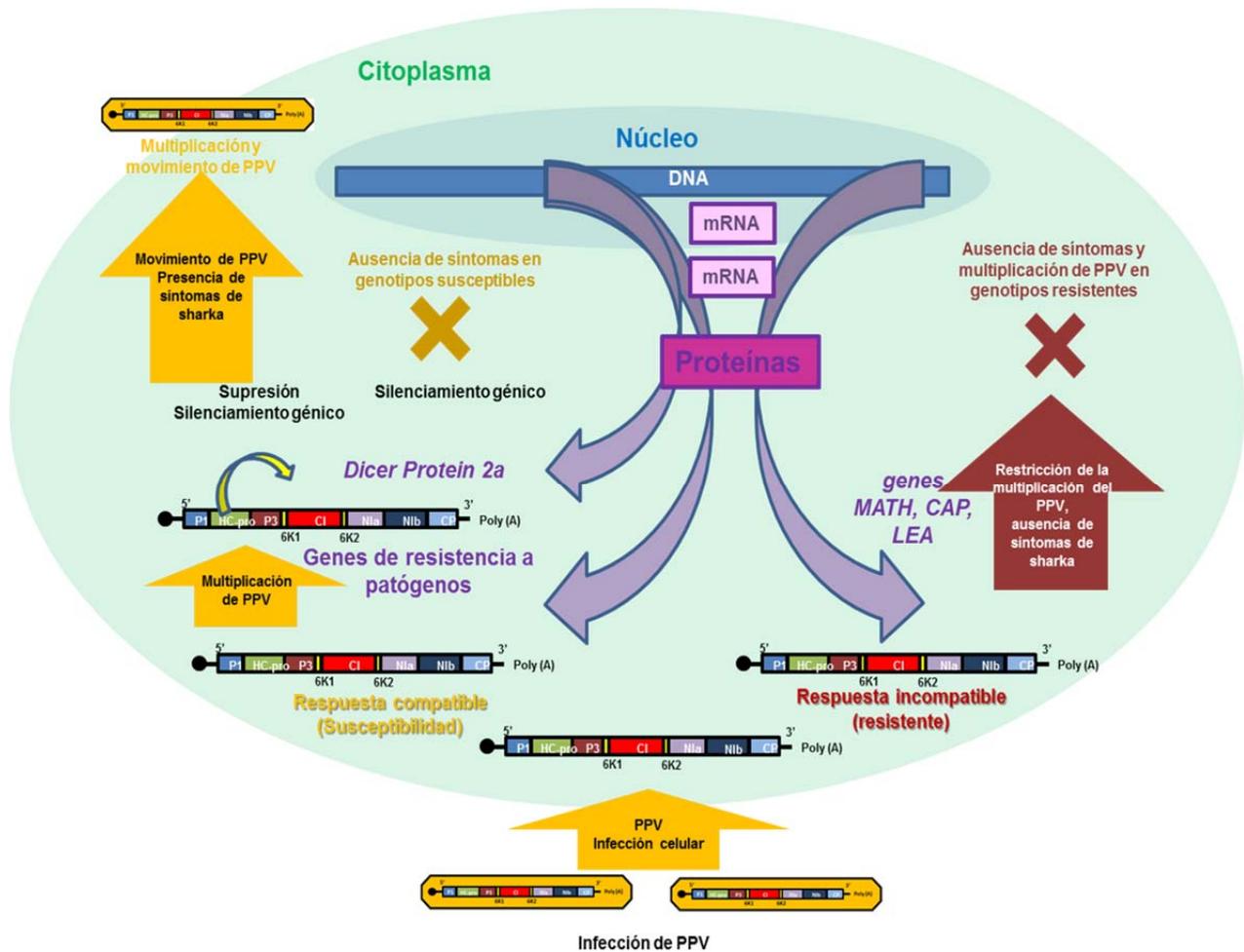


Figura 4.9. Representación esquemática de la interacción entre PPV (*Plum pox virus*) y frutales del género *Prunus* estudiada mediante la secuenciación masiva de diferentes transcriptomas de genotipos de albaricoquero susceptibles y resistentes.

Estos datos apoyan los estudios previos obtenidos mediante microarray. El análisis mediante microarray de genotipos compatibles e incompatibles de plantas de melón infectadas con *Watermelon mosaic virus* (WMV, *Potexvirus*) han mostrado que la remodelación del transcriptoma debido a la infección por WMV parece tener un mayor efecto en el genotipo resistente que en el susceptible (González-Ibeasy col., 2012). En este sentido, Rodamilans y col. (2014) describieron 3.020 genes expresados diferencialmente tras la inoculación con PPV de la variedad hipersensible resistente 'Jojo' y Rubio y col. (2014) describieron 1554 DEGs en el melocotonero susceptible 'GF305' tras la infección con PPV. Además confirman los datos obtenidos en melocotonero por Rubio y col. (2015).

4.4.4. Análisis de la validación de los perfiles de expresión génica mediante qPCR

Los resultados mediante qPCR de los ocho genes seleccionados fueron similares a los obtenidos mediante RNA-Seq (*Figura 4.10*). El coeficiente de correlación de Pearson entre los valores RPKM (reads per kilobase pair of exon model per million fragmen) obtenidos en la RNA-Seq y los valores relativos a la expresión génica de la qPCR obtenidos para los ocho genes ensayados oscilaban entre 0.61 (ppa021156m) y 1.00 (ppb022195m, ppa013116m y ppa000690) con un valor medio de 0.91.

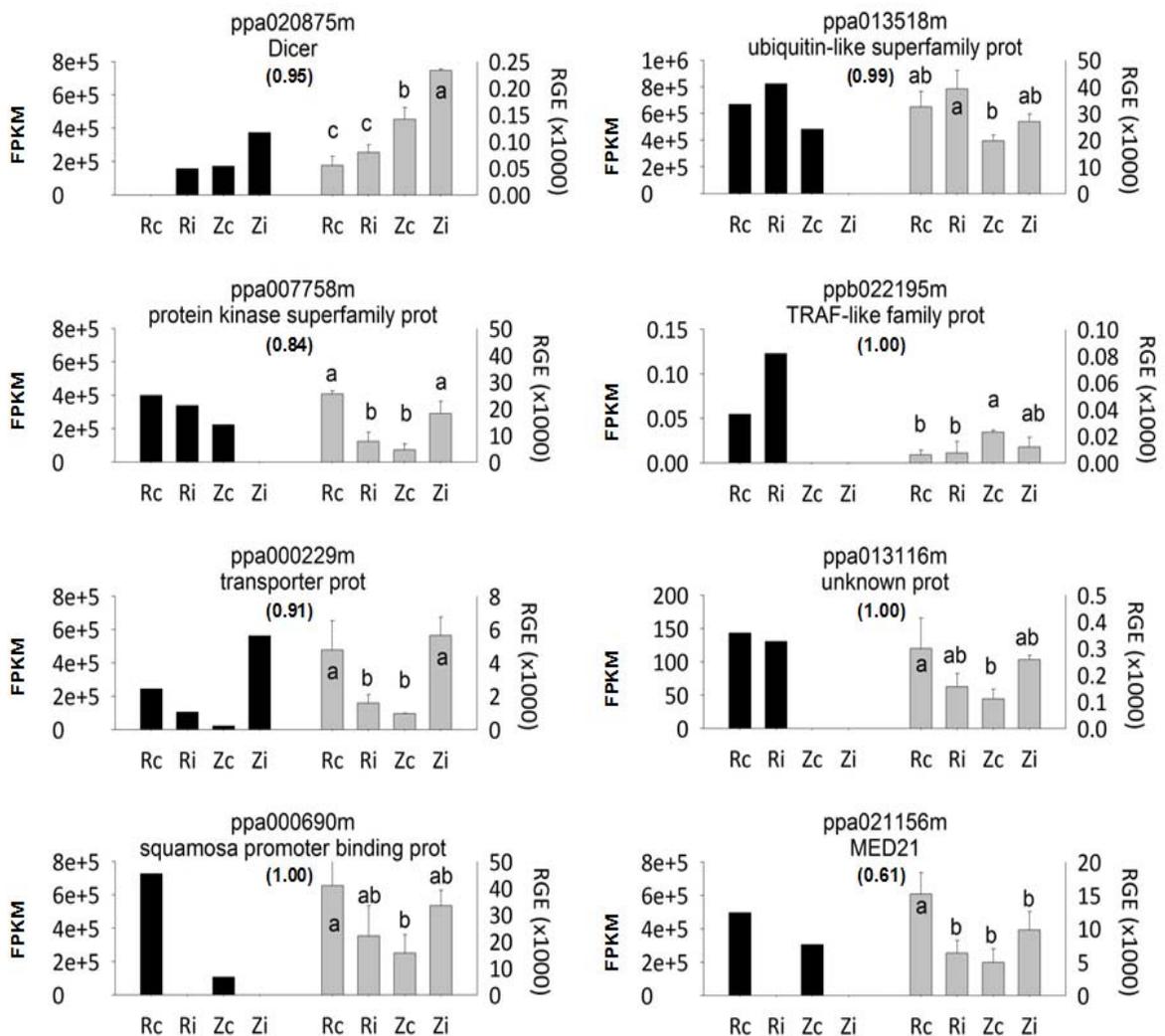


Figura 4.10. Resultados RT-qPCR de los ocho genes seleccionados de la expresión diferencial (ppa020875, ppa007758, ppa000690, ppa000229, ppa013518, ppa0222254, ppa013116 y ppa021156). Los gráficos incluyen los resultados de expresión diferencial de RNA-Seq.

Las diferencias en los niveles de expresión detectados entre RNA-Seq y qPCR podrían deberse a los bajos niveles de expresión de los genes analizado y al sesgo bioinformático, que incluiría elección de alineamientos, estimación de la expresión del transcrito, etc (Labaj y col., 2011). Otros factores que explicarían esta discrepancia incluirían la naturaleza dinámica del transcriptoma (Martínez-Gómez y col., 2012) que es mayor en caso de genotipos susceptibles en presencia del virus lo que produce un gran aumento del tipo de respuestas de la planta en función de la acumulación del virus así como de la presencia de síntomas (Rubio y col., 2015).

La expresión de genes codificantes para la proteína de la superfamilia de la proteínkinasa (ppa007758m), el transportador proteico (ppa000229m), y el *MED21* (ppa021156m) fue menor en las hojas inoculadas con PPV que en las no inoculadas del genotipo resistente 'Rojo Pasión' (Figura 4.5). Respecto al genotipo susceptible, se produjo un aumento en la expresión de varios genes entre los que se encuentra la ribonucleasa Dicer (ppa020875), la superfamilia protein kinasa (ppa007758m) y el transportador proteico (ppa000229m) en las hojas del genotipo susceptible 'Z506-7' tras la inoculación con PPV, al compararlo con las hojas no inoculadas. Finalmente se detectaron niveles de expresión similares tanto en hojas inoculadas y no inoculadas en el genotipo 'Z506-7' de los genes codificantes de la superfamilia tipo ubiquitina (ppa013518); de las proteínas de la familia tipo TRAF (ppb022195); de la proteína desconocida (ppa013116m); de la proteína de unión al promotor de esquamosa (ppa000690) y MED21 (ppa021156m) (Figura 4.10).

El análisis de la expresión génica mediante qPCR indicó un aumento de expresión del gen condificador de la proteína Dicer 2a en el genotipo susceptible, lo que indicaría la supresión de los mecanismos de silenciamiento génico de la planta mediante las proteínas virales HCPro y P1. Por otro lado, en el genotipo resistente, los resultados mostraban un aumento de la expresión de los genes con dominio homólogo MATH (incluyendo las proteínas de la familia tipo TRAF) ubicadas dentro de la región PPVres del grupo de ligamiento 1, como involucrados en la resistencia a PPV en albaricoquero.

Esta respuesta de resistencia que se observa en el albaricoquero es diferente de la respuesta que se observa en ciruelos hipersensibles resistentes (Rodamilans y col., 2014).

4.5. Conclusiones

- I. Desde el punto de vista metodológico, el RNA-Seq se ha mostrado como una herramienta muy poderosa en el análisis de la interacción PPV/albaricoquero aunque no parece ser la herramienta definitiva para resolver los problemas de expresión base ni los determinantes genéticos.
- II. La técnica del RNASeq Esta es una herramienta complementaria a los estudios genómicos con menor cantidad de datos.
- III. Las diferencias transcriptómicas a nivel de expresión de genes confirmaron que la susceptibilidad a PPV en albaricoquero es un proceso complejo basado en la batalla continua entre el virus (PPV) y la planta (*Prunus armeniaca*) a nivel de genes de resistencia a patógenos y a nivel de silenciamiento génico similar a la respuesta observada en melocotonero.
- IV. La resistencia a PPV en albaricoquero es también un proceso complejo que también se basa en una batalla continua entre el virus (PPV) y la planta (*Prunus*) donde los genes *MATH* (control a larga distancia de los movimientos del virus) están involucrados junto a otros genes (efecto del fondo genético) dentro del locus *PPVres*.
- V. Otros genes candidatos implicados en la resistencia son *Pleiotropic drug resistance 9 gene*; *Cysteine-rich secretory proteins*, *Antigen 5 and Pathogenesis-related 1 protein (CAP)* y *Late embryogenesis abundant protein (LAE)*
- VI. La respuesta de resistencia que se observa en el albaricoquero es diferente de la respuesta que se observa en ciruelos hipersensibles resistentes.

5. Cambios hormonales

5. CAMBIOS HORMONALES

5.1. Introducción y Objetivos

El control de la respuesta a un medio cambiante incluyendo estreses bióticos y abióticos tiene lugar a través de mediadores químicos que producen cambios en el comportamiento celular. Estas sustancias se denominan fitohormonas, actúan a baja concentración y su acción puede tener lugar en el órgano donde se sintetizan o actuar a larga distancia. Las fitohormonas intervienen controlando numerosos procesos de la fisiología vegetal, como la germinación y el crecimiento. Además se ha descrito su papel en la respuesta a estrés biótico y abiótico (Santino y col., 2013).

En la actualidad están apareciendo numerosos estudios que describen la compleja interacción entre virus y planta así como los cambios hormonales inducidos que modulan la resistencia o susceptibilidad. La respuesta inmune de la planta tiene lugar a varios niveles. La primera línea de defensa tiene lugar a nivel de la pared celular mediante la detección de patrones moleculares asociados a microorganismos (microorganism-associated molecular pattern, MAMPs) por parte de los receptores de reconocimiento de los patrones (pattern-recognition receptors, PRRs). Los patógenos pueden sortear esta primera línea de defensa mediante el desarrollo de moléculas efectoras capaces de suprimir la acción de proteínas inmunitarias de la planta, tal como fue descrito con las proteínas AvrPto1 de *Pseudomonas syringae* (Spoel y Dong, 2008).

La respuesta de la planta frente a las proteínas efectoras del patógeno se lleva a cabo mediante el desarrollo de proteínas que actúan como receptores intracelulares de los efectores del patógeno, estos receptores se denominan proteínas de resistencia (R) y activan la inmunidad mediada por efector (effector trigger immunity, ETI). Esta segunda línea de defensa desencadenará una respuesta hipersensible con apoptosis de las células infectadas así como la producción de moléculas antimicrobianas (enzimas hidrolíticas, quitinasas, glucanasas,...) en los tejidos circundantes. La defensa mediada por efector se basa en el reconocimiento entre el efector del patógeno y el receptor de la célula vegetal, por tanto se trata de una inmunidad específica lo que desencadena esta respuesta inmunitaria. Tras el reconocimiento del patógeno se

puede desencadenar inmunidad frente a un amplio rango de patógenos, este estado se denomina activación sistémica de la inmunidad (systemic activation of immunity, SAR) y se establece en base a la liberación de ácido salicílico a partir del tejido infectado que viajará por el floema hacia el resto de la planta (Spoel y Dong, 2008). El ácido salicílico es degradado mediante la expresión constitutiva de la silicilato hidrolasa que inhibe la SAR.

Las infecciones víricas en plantas susceptibles ocasionan una disrupción hormonal en la que se inducen de manera simultánea hormonas con acción antagónica (Alazem y Lin, 2015), a diferencia de las variedades resistentes en las que la acumulación de las hormonas antagónicas muestra un patrón secuencial. El eje de comunicación hormonal dentro de la planta se polariza en dos rutas hormonales antagonistas, por un lado la ruta del ácido salicílico y por otro la del ácido jasmónico/etileno. En el estudio de la respuesta al estrés biótico están incorporándose otras hormonas como las auxinas, los brasinosteroides, las citoquininas y el ácido abscísico que tenían atribuido un papel en el crecimiento y desarrollo y cada vez son más relevantes en la interacción entre virus y planta (Denancé y col., 2013). A continuación describiremos de manera detallada el papel de las hormonas en las interacciones entre virus y planta.

El ácido salicílico participa en el establecimiento de la resistencia local y sistémica (Vlot y col., 2009). Además de jugar un papel importante en la resistencia mediada por las proteínas R participa en la regulación de los RNA pequeños de interferencia (small interfering RNA, siRNA) y favorece la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la síntesis de las proteínas PR, los depósitos de calosa, así como la respuesta hipersensible relacionada con la apoptosis de las células infectadas o próximas a la zona de infección (Baebler y col., 2014). Todos estos procesos conducen a la mencionada SAR. Mutaciones en la ruta de síntesis o de señalización del ácido salicílico generan plantas susceptibles a infecciones virales incluso con la presencia de los genes R (Lewsey y col., 2008).

La sobreexpresión de los genes de síntesis del ácido salicílico o su aplicación exógena mejora la inmunidad basal retrasando el establecimiento de la infección viral (Chern y col., 2005). Otra forma de resistencia relacionada con el ácido salicílico se

denomina resistencia extrema (RE) caracterizada por la eliminación del virus y la ausencia de lesiones necróticas en plantas que poseen genes R. Este tipo de resistencia se ha descrito en plantas de tomate infectadas con TBSV (Tomato bushy stunt virus) en las que la denominada proteína P19 forma un complejo con un siRNA para desencadenar la RE mediante el silenciamiento del RNA supresor viral del TBSV (Sansregret y col., 2013). Se han descrito en líneas transgénicas que sobreexpresan las proteínas víricas supresoras P1/HC-Pro una reducción de la respuesta mediada por ácido salicílico así como de los niveles de siRNA derivados de PPV (Alamillo y col., 2006). Las proteínas involucradas en la producción de los RNA de pequeño tamaño (dicer-like proteins, DCL) parecen ser independientes de la resistencia mediada por ácido salicílico en Arabidopsis, donde se han descrito mutantes DCL que reducían el título viral en tratamientos con ácido salicílico (Lewsey y Carr, 2009), lo que parece indicar que el ácido salicílico desencadena varios mecanismos de defensa independientes de DCL.

El ácido jasmónico participa en la respuesta frente a necrotrofos e insectos (Thaler y col., 2004). Junto con el etileno participa en la regulación de la resistencia sistémica inducida (ISR), utilizada por microbios no patógenos como las rizobacterias. El bloqueo de la síntesis de ácido jasmónico favorece la acumulación de virus en los estadios iniciales de la infección. La aplicación de ácido jasmónico al inicio de la doble infección PVY-PVX favoreció la resistencia frente a estos virus, sin embargo, su aplicación en estadios no iniciales favoreció la susceptibilidad (García-Marcos y col., 2013). Estudios en *Nicotiana benthamiana* donde se realizó un pretratamiento con ácido jasmónico seguido por otro de ácido salicílico mostraron un incremento de la resistencia frente a TMV (Zhu y col., 2014).

El ácido abscísico además de su función en la maduración de la fruta y la germinación participa en la defensa frente a patógenos de una forma muy variada dependiendo del estado de la infección. Se ha descrito su papel defensivo en los estadios iniciales de la infección a través del cierre de los estomas o favoreciendo la formación de depósitos de calosa. Su activación en fases más avanzadas de la infección suprime la inducción de ROS, así como la traducción de la señalización de los ácidos jasmónico y salicílico (Ton y col., 2009). Los estudios del papel ácido abscísico en la

interacción entre el virus y la planta son escasos. Los niveles de ácido abscísico en plantas infectadas son variados, en cultivares de patata resistente a PVY (Kovac y col., 2009) los niveles de ABA eran iguales en plantas infectadas y no infectadas, en cambio en tomate resistente a TMV los niveles de ABA era superiores a los de las líneas susceptibles (Fraser y Whenham, 1989). El ABA participa en la defensa contra virus se produce a través de la inhibición de la beta-1,3-glucanasa, enzima que degrada el beta-1,3-glucano (calosa). Otro campo de estudio del papel del ABA en la interacción entre virus y planta se produce a nivel de la maquinaria de silenciamiento de RNA, que es considerada la causa de la resistencia de tipo no hospedador y es la función menos conocida del ABA.

El etileno ha sido una de las hormonas con doble acción, senescencia y respuesta frente a necrotrofos (Graham y col., 2012). El etileno no parece esencial para el establecimiento de la resistencia de plantas frente a virus, existen varios artículos que lo describen como responsable en el desarrollo de los síntomas como ocurre en pepino infectado con CMV (Marco y Levy, 1979). Estudios en *N. tabacum* han detectado la presencia del precursor del etileno, ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico), acumulado localmente en los alrededores de las áreas necróticas, indicando su contribución a la formación de la lesión (Delaat y Valoon, 1983), sin embargo, la aplicación previa a la infección con ACC evitó la formación de lesiones. La aplicación exógena de ácido jasmónico y salicílico contribuye a la reducción de la carga viral (Clarke y col., 1998) según el momento de realización del tratamiento, aunque en general se asume una acción antagonista del ácido jasmónico y el etileno contra la respuesta antiviral mediada por ácido salicílico.

La auxinas juegan un papel clave en el crecimiento vegetal y la dominancia apical, numerosas infecciones virales ocasionan enanismo, curvatura en las hojas o pérdida de la dominancia apical, síntomas similares a los mutantes con alteraciones en la biosíntesis o señalización de las auxinas (Kazan y Manners, 2009). Algunos virus manipulan factores relacionados con las auxinas como medio para favorecer su propia replicación y diseminación, tal y como ocurre con los factores ARF, cuya disfunción retrasa la diseminación sistémica y la severidad de los síntomas (Jay y col., 2011).

La acción de las citoquininas a nivel fisiológico se sintetiza en inducir la proliferación celular y retrasar la senescencia. A nivel inmunológico juegan un importante papel en la resistencia frente a biotrofos junto con el ácido salicílico actuando de manera sinérgica en su ruta de señalización. El efecto antibiotrófo de las citoquininas se ha descrito como dependiente del ácido salicílico e incluso dosis-dependiente (Argueso y col., 2012).

Las giberelinas participan en la germinación, elongación del tallo y floración. Su papel en la respuesta inmune vegetal parece depender del balance entre ácido salicílico y ácido jasmónico/etileno (Robert-Seilaniantz y col., 2007). En la biosíntesis de las giberelinas participa la ent-kaureno oxidasa (Helliwell y col., 1998), esta enzima interactúa con proteínas de la cápside viral del RDV (Rice dwarf virus) reduciendo de este modo los niveles de GA1 y la biosíntesis de fitoalexinas promoviendo la replicación viral (Zhu y col., 2005).

Respecto a las bases hormonales de la infección por PPV en *Prunus* los datos de los que disponemos en la actualidad son muy escasos. Únicamente se ha estudiado el efecto de la infección en los niveles de SA. La acumulación de SA activa una serie de proteínas reguladoras como NPR1/NIM y factores de transcripción que controlan la expresión de genes de defensa como los genes de las proteínas PR (Pathogens Related) (Vallad y Goodman, 2004).

Resultados recientes de secuenciación masiva de mRNA en plantas de melocotonero 'GF305' mostraron que la respuesta temprana a la infección por el PPV no parece estar mediada por SA, ya que está asociada, como se comentó con anterioridad, a una inducción de genes implicados en la biosíntesis y la señalización de jasmonatos (Rubio y col., 2015). En este sentido, se sabe que la resistencia sistémica inducida (ISR) depende de rutas reguladas por las hormonas etileno (ET) y ácido jasmónico (JA) (Vallad y Goodman, 2004). Mediante electroforesis en 2D se ha detectado una proteína similar a la taumantina y un descenso de la mandelonitrilo liasa (MDL) en el apoplasto del melocotonero (Díaz-Vivancos y col., 2006). En respuesta a la infección por PPV la MDL descompone el mandelonitrilo en benzaldehído y cianuro, el benzaldehído puede ser oxidado fácilmente *in vivo* para producir ácido benzoico que es el precursor del SA. Estos datos sugieren que la disminución de la

actividad MDL puede generar una disminución de la biosíntesis de SA en las plantas susceptibles inoculadas.

En este capítulo describiremos el papel de las principales hormonas vegetales en la respuesta de distintas variedades de *Prunus* frente a PPV. Entre los objetivos de este capítulo encontramos describir como la infección viral con PPV altera la producción hormonal en melocotonero GF305 (susceptible) y en las variedades de albaricoquero 'Real Fino' (susceptible), 'Z506' (susceptible) y 'Rojo Pasión' (resistente).

5.2. Material vegetal

El material vegetal ensayado es el melocotonero 'GF305', patrón seleccionado en la estación experimental de la Grande Ferrade de Buerdeos como indicador biológico de diferentes virus como PPV, PNRSV o ACLSV y el albaricoquero 'Real Fino', patrón de origen español muy susceptible a PPV. Sobre estos patrones se injertaron los albaricoques 'Rojo Pasión' y 'Z506-7'. Se cultivaron siete ejemplares de cada una de estas cuatro variedades, a tres de ellas se les inoculó mediante injerto en chapa el aislado PPV RB3.30-IVIA-CEBAS, un aislado de tipo Dideron procedente de ciruelo japonés 'Red Beaut' colectado en los años ochenta en la Región de Murcia y conservado en melocotonero 'GF305' en la colección de aislados del IVIA de Valencia. El material vegetal fue cultivado en invernadero tal y como se describe en el capítulo 2 dedicado al material y métodos.

5.3. Metodología

Se recolectaron tres hojas de tres ejemplares de las ocho combinaciones ('GF305', 'Real Fino', 'Rojo Pasión' y 'Z5067', control e inoculados) que habían terminado la elongación para obtener un homogenado (*Figura 5.1*) a partir del cual se analizaron las hormonas vegetales.

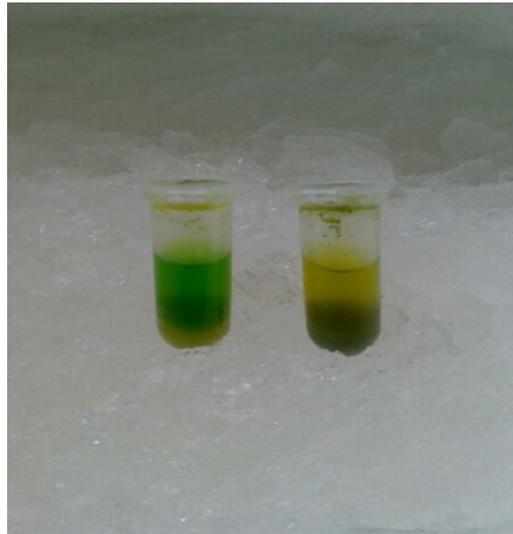


Figura 5.1. Extractos con metanol de homogenado de hojas de 'GF305' inoculado y sin inocular. El tubo de color verde intenso presenta mayor cantidad de clorofila y pertenece a 'GF305' sin inocular, el otro tubo es de una extracción de 'GF305' inoculado con PPV.

Las principales clases de fitohormonas, citoquininas (zeatina, Z, ribósido de zeatina, ZR e isopenteniladenina, iP), giberelinas (GA1, GA3 y GA4), la auxina ácido indolacético (AIA), ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA), ácido jamónico (JA) y el precursor del etileno ácido 1-aminociclopropano (ACC) se extrajeron y se analizaron de acuerdo con el método de Albacete y col. (2008; 2010) con algunas modificaciones. Un gramo de material vegetal fresco (hoja) se homogeneizó en nitrógeno líquido y se añadieron 53ml de mezcla fría (-20 °C) de extracción (metanol:agua, 80:20). La mezcla se incubó a 4 °C durante 30 min y los sólidos se separaron por centrifugación (20.000 g , 15 min, 4 °C). A continuación se realizó una re-extracción a 4°C durante 30 min con X ml de buffer de extracción y los sólidos se volvieron a separar por centrifugación.

Los sobrenadantes de las dos extracciones que se realizaron por muestra se combinaron y se llevaron a sequedad con un evaporador rotativo UNIVAPO (UNIEQUIP, Planegg, Alemania). Los residuos secos se reconstituyeron añadiendo 1 ml de una solución de metanol:agua (80:20) utilizando un baño de ultrasonidos para facilitar re-suspensión (SELECTA, Barcelona, Spain).

Los análisis se llevarán a cabo en un sistema de HPLC / MS que consiste en un Agilent 1100 Series HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.) (Figura 5.2) equipado con una placa de L - así inyector automático y una bomba capilar, y conectado a una trampa de iones Agilent XCT Plus espectrómetro de masas (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.) utilizando un electrospray(ESI) de la interfaz.

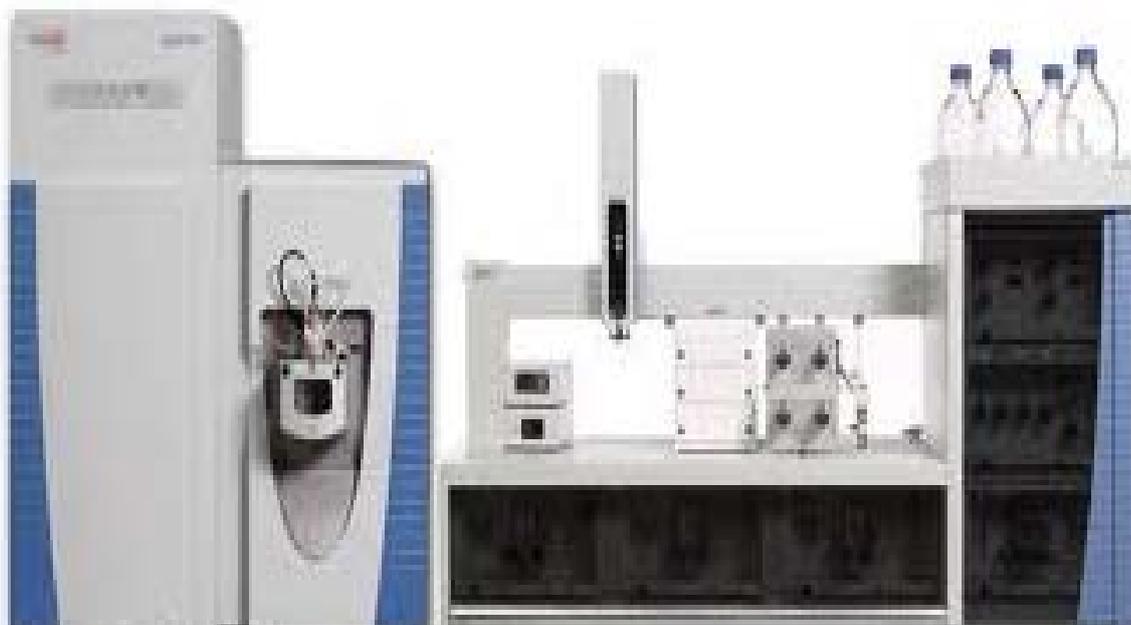


Figura 5.2. Equipo U-HPLC-MS/MS de ThermoFisher Scientific usado en los análisis hormonales

Diez microlitros (μl) de extracto se inyectaron en un sistema U-HPLC-MS compuesto por un U-HPLC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) usando una interfaz de ionización mediante electrospray (ESI). Los espectros de masa fueron obtenidos con el software Xcalibur versión 2.2 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Para cuantificar los niveles de fitohormonas, se realizaron curvas de calibración para cada una de los compuestos analizados (1, 10, 50, and $100 \mu\text{g l}^{-1}$) corrigiéndose con $10 \mu\text{g l}^{-1}$ de estándares internos deuterados. Los porcentajes de recuperación para todas las hormonas analizadas oscilaron entre el 92 y el 95% (Figura 5.2.)

5.4. Resultados y discusión

En este ensayo no fue posible la identificación de algunas de las hormonas evaluadas como RZ, iP, GA1 y ACC. La *Tabla 5.1* muestra los valores de concentración de las hormonas detectadas en las muestras analizadas de melocotonero 'GF305' y en las variedades de albaricoquero 'Real Fino', 'Rojo Pasión' y 'Z506-7' control e inoculadas con PPV.

En general se observan diferencias de concentración hormonal en las muestras control e inoculadas de las especies de *Prunus* evaluadas melocotonero y albaricoquero.

Podemos observar una gran disminución de *trans*-zeatina al inocular PPV principalmente en el melocotonero 'GF305' y en albaricoquero 'Real Fino' donde la concentración llega a disminuir unas 14 y 35 veces respectivamente. En el resto de variedades de albaricoquero ['Rojo Pasión (resistente a PPV) y 'Z506-7' (susceptible a PPV)] la disminución de *trans*-zeatina es similar (2 veces aproximadamente). El efecto de la inoculación de PPV produce una disminución en todos los ensayos tanto resistentes como susceptibles.

En cuanto a las giberelinas, solo conseguimos el análisis parcial de la G3 y G4, donde obtuvimos resultados similares entre los controles y los inoculados con PPV por lo que aparentemente estas hormonas no tienen papel relevante en el establecimiento de la respuesta inmune en *Prunus*. Además entre los síntomas de la sharka en este género no se detectan alteraciones en el crecimiento ni en ninguna característica controlada por las giberelinas.

Los resultados obtenidos con el análisis de la auxina AIA, también fueron parciales. Entre los datos obtenidos no se encontraron diferencias entre los controles y las plantas inoculadas con PPV en las variedades 'Real Fino' y 'Z506-7'. Por lo tanto podemos descartar el papel de la auxina AIA en la sintomatología producida por PPV en estos frutales.

La variación en la concentración de ABA al inocular con PPV sí que fue muy significativa entre las variedades susceptibles 'Real Fino' y 'Z506-7' en comparación con la variedad resistente 'Rojo Pasión'. Las variedades susceptibles presentaban valores

similares de ABA tras la inoculación, sin embargo en la variedad resistente disminuyó unas cinco veces la concentración de ABA tras la inoculación con PPV. Por lo tanto el ABA no participa en el establecimiento de los síntomas en este ensayo, aunque la sharka produce en algunos casos abscisión de hojas y frutos de forma precoz y podamos esperar un aumento de su concentración en las variedades susceptibles. No obstante, el ABA parece tener un papel relevante en el establecimiento de la respuesta inmune frente a PPV en 'Rojo Pasión' que disminuye los niveles de la hormona hasta cinco veces en comparación con las plantas control, siendo el único caso donde se produce una disminución significativa en la concentración de ABA.

Tabla 5.1. Concentraciones de fitohormonas (expresados en $ng \cdot g^{-1}$ de peso fresco) en el melocotonero 'GF305' y en los albaricoqueros 'Real Fino', 'Rojo Pasión' y 'Z506-7' control e inoculados con PPV. Los valores son la media de 5 repeticiones \pm desviación estándar.

Promedios	<i>trans</i> -Zeatina	GA3	GA4	Ácido Indolacético	ABA	Ácido Salicílico	Ácido Jasmónico
Melocotonero							
GF305 control	73,014 $\pm 10,426$	NF	0,134 $\pm 0,000$	NF	NF	4,610 $\pm 1,911$	1,420 $\pm 0,598$
GF305 inoculado	5,062 $\pm 2,356$	0,042 $\pm 0,001$	0,013 $\pm 0,001$	0,063 $\pm 0,002$	3,991 $\pm 1,135$	0,750 $\pm 0,159$	0,232 $\pm 0,074$
Albaricoquero							
Real Fino control	3,352 $\pm 1,355$	0,036 $\pm 0,000$	0,105 $\pm 0,002$	0,060 $\pm 0,002$	5,211 $\pm 1,361$	1,047 $\pm 0,099$	0,035 $\pm 0,001$
Real Fino inoculado	0,092 $\pm 0,018$	0,109 $\pm 0,002$	0,105 $\pm 0,002$	0,056 $\pm 0,001$	6,518 $\pm 1,634$	6,898 $\pm 2,819$	0,027 $\pm 0,003$
Rojo Pasión control	11,861 $\pm 3,967$	NF	0,015 $\pm 0,001$	0,069 $\pm 0,004$	2,927 $\pm 0,402$	1,362 $\pm 0,324$	0,038 $\pm 0,002$
Rojo Pasión inoculado	5,038 $\pm 1,189$	0,085 $\pm 0,04$	0,008 $\pm 0,001$	NF	0,489 $\pm 0,094$	1,201 $\pm 0,220$	0,053 $\pm 0,014$
Z506 control	17,778 $\pm 5,486$	0,376 $\pm 0,137$	NF	0,066 $\pm 0,003$	2,810 $\pm 0,095$	1,110 $\pm 0,147$	0,096 $\pm 0,025$
Z506 inoculado	8,594 $\pm 3,648$	0,084 $\pm 0,007$	0,019 $\pm 0,001$	0,087 $\pm 0,005$	2,658 $\pm 0,292$	0,890 $\pm 0,184$	0,042 $\pm 0,007$

El ácido salicílico presenta una importante disminución en el melocotonero 'GF30', aunque en otros ensayos de este grupo de investigación presentaba un aumento. En cuanto al comportamiento de esta hormona en las variedades de albaricoquero los resultados son confusos, ya que entre las variedades susceptibles encontramos un aumento de unas seis veces tras inocular PPV en 'Real Fino' y una variación casi nula al inocular el virus en 'Z506', esta última variedad muestra niveles similares de ácido salicílico tras la inoculación.

Los niveles esperados de ácido salicílico en la variedad resistente de albaricoquero eran altos debido a que esta hormona se considera esencial para el establecimiento de la resistencia local y sistémica frente a un amplio número de patógenos biótrosos y víricos en vegetales (Vlot y col., 2009)

Sin embargo el albaricoquero resistente 'Rojo Pasión' no presentaba ningún incremento en los niveles de ácido salicílico. Solo se detectó un incremento en la concentración de esta hormona en la variedad de albaricoquero sensible a PPV 'Real Fino'. Esto resultados indican que el ácido salicílico por sí solo no desencadena a la respuesta inmune frente a PPV en *Prunus*.

Por último, el ácido jasmónico, únicamente mostró una importante disminución tras la inoculación de PPV en 'GF305'. En cambio, en albaricoquero no se observaron diferencias tras la inoculación ni en las variedades susceptibles ni en las resistentes.

Algo similar ocurre en la inducción de la floración mediada por las dos conformaciones del fitocromo. Teniendo en cuenta este tipo de funcionamiento fisiológico en plantas podemos realizar una comparación de las hormonas analizadas de la *Tabla 5.1* en función de su aumento o disminución, para ello hemos obtenidos los cocientes entre las plantas inoculadas con PPV y sin inocular de las variedades sensibles (melocotonero 'GF305'; albaricoqueros 'Real Fino' y 'Z506') y resistentes (albaricoquero 'Rojo Pasión').

Los valores positivos indican un aumento de la hormona al inocular con PPV y los valores negativos un descenso hormonal por efecto de la inoculación. En la *Tabla 5.2* se representan estos cocientes.

Tabla 5.2. Relación de los valores hormonales entre plantas inoculadas y no inoculadas de cada una de las variedades analizadas. Los valores negativos representan el descenso en la concentración hormonal al inocular, representa el cociente control/inoculado. Los valores positivos indican un aumento en la concentración de las hormonas, se obtienen del cociente inoculado/control.

Promedios	<i>trans</i> - Zeatina	GA3	GA4	Ácido Indolacético	ABA	Ácido Salicílico	Ácido Jasmónico
Melocotonero							
GF305 inoculado/control	-14,42	NF	-10,3	NF	NF	-6,14	-6,12
Albaricoquero							
Real Fino inoculado/control	-35,28	+3,03	---	-1,070	+1,25	+6,58	-1,29
Rojo Pasión inoculado/control	-2,35	NF	-1,87	NF	-5,98	-1,55	+1,39
Z506 inoculado/control	-2,06	-4,47	NF	+1,261	-1,05	-1,247	-2,28

Analizando la variación (cocientes entre variedades inoculadas y no inoculadas con PPV) conjunta de ABA, ácido salicílico y ácido jasmónico en las variedades estudiadas se aprecia que la mayor diferencia entre resistencia y susceptibilidad a PPV proviene del descenso en ABA mientras que los ácidos jasmónico y salicílico se mantienen estables, luego cabría esperar que este descenso en ABA hiciese a la variedad resistente ‘Rojo Pasión’ más sensible a sus propios niveles de ácido salicílico o jasmónico para el establecimiento de la resistencia frente a PPV. Por otro lado el ABA en estados avanzados de la infección vírica puede inducir la supresión de los ROS y de las vías de señalización de los ácidos salicílico y jasmónico (Ton y col., 2009), por lo tanto si los niveles de ABA disminuyen se favorece la acción inmune mediada por estas hormonas. En conclusión podemos decir que el ABA tiene un papel negativo en la respuesta a la infección en plantas con genes de resistencia frente a PPV.

Esta variación en los perfiles hormonales establece la respuesta sistémica adquirida (SAR).

Además observamos un papel del ácido salicílico, etileno (mediante el análisis de ACC), giberelinas, auxinas, citoquininas, ácido abscísico y ácido jasmónico en el establecimiento de la respuesta inmune frente a PPV en melocotonero 'GF305' y en distintas variedades de albaricoquero.

Además hemos establecido relaciones entre los perfiles hormonales de las distintas situaciones experimentales y la expresión génica obtenida en el capítulo de transcriptómica, en concreto corroborar en *Prunus* si la represión de la replicación viral producida por el ácido salicílico está mediada por siRNA tal y como se ha descrito en otras especies (Campos y col., 2014).

5.5. Conclusiones

- I. El estudio del balance hormonal en diferentes variedades de albaricoquero y en melocotonero GF305 control e inoculadas con PPV pusieron de manifiesto la importante implicación del SA y la citoquinina *trans*-Zeatina en la infección del virus en *Prunus*.
- II. Es de destacar que tras la inoculación de la variedad de albaricoque 'Rojo Pasión' con PPV se produce un descenso de los niveles de ABA que puede ser el responsable de favorecer la señalización de la ruta del SA.
- III. El descenso del ABA favorece las condiciones oxidativas dentro de la célula lo que a su vez induce la forma monomérica del NPR1, que es capaz de ser trascolada al núcleo e indicar la señalización de las respuestas mediadas por el SA.

6. Conclusiones generales

6. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

A partir de los resultados obtenidos, podemos considerar el trabajo de mapeo genético realizado con marcadores tipo SSRs como preliminar, ya que no se trata de mapas muy saturados. Sin embargo, el fenotipado de 3 años y el hecho de que muchos marcadores mapeados sean polimórficos en ambos parentales le da mayor robustez y relevancia a los QTLs detectados. Los resultados obtenidos muestran sin lugar a dudas la gran influencia del LG 1 en la resistencia al PPV en albaricoquero en el locus denominado *PPVres*.

Desde el punto de vista metodológico, la RNA-Seq se ha mostrado como una herramienta muy poderosa en el análisis de la interacción PPV/albaricoquero aunque no parece ser la herramienta definitiva para resolver los problemas de expresión base ni los determinantes genéticos.

La RNA-Seq es una herramienta complementaria a los estudios genómicos con menor cantidad de datos.

Las diferencias transcriptómicas a nivel de expresión de genes confirmaron que la susceptibilidad a PPV en albaricoquero es un proceso complejo basado en la batalla continua entre el virus (PPV) y la planta (*Prunus armeniaca*) a nivel de genes de resistencia del patógenos y a nivel de silenciamiento génico similar a la respuesta observada en melocotonero.

La resistencia a PPV en albaricoquero es también un proceso complejo que también se basa en una batalla continua entre el virus (PPV) y la planta (*Prunus*) donde los genes *MATH* (control a larga distancia de los movimientos del virus) están involucrados junto a otros genes (efecto del fondo genético).

Otros genes candidatos implicados en la resistencia son *Pleiotropic drug resistance 9* gene; *Cysteine-rich secretory proteins*, *Antigen 5 and Pathogenesis-related 1 protein (CAP)* y *Late embryogenesis abundant protein (LAE)*

La respuesta de resistencia que se observa en el albaricoquero es diferente de la respuesta que se observa en ciruelos hipersensibles resistentes.

La respuesta hormonal [análisis de las citoquininas *trans*-Zeatina (Z), Ribósido de Zeatina (ZR) e Isopentenil Adenina (iP); las giberelinas GA1, GA3 y GA4; las auxina Ácido Indolacético (IAA); el Ácido Jasmónico (JA); además del Ácido Abscísico (ABA), el Ácido Salicílico (SA) y el precursor del etileno Ácido-1-Aminociclopropano-1-Carboxílico (ACC)] en diferentes variedades de *Prunus armenia* y en melocotonero GF305 control e inoculadas pusieron de manifiesto la importante implicación del SA y la citoquinina *trans*-Zeatina en la infección del virus en *Prunus*.

Es de destacar que tras la inoculación de la variedad de albaricoque 'Rojo Pasión' con PPV se produce un descenso de los niveles de ABA que puede ser el responsable de favorecer la señalización de la ruta del SA. El descenso del ABA favorece favorece las condiciones oxidativas dentro de la célula lo que a su vez induce la forma monomérica del NPR1, que es capaz de ser trascolada al núcleo e indicar la señalización de las respuestas mediadas por el SA.

7. Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott AG. 2012.** Retrospect and prospects. In: Kole C, Abbott AG (eds) *Genetics, genomics and breeding of stone fruits*. CRC, New York, 378–402.
- Ahmad R, Parfitt DE, Fass J, Ogundiwin E, Dhingra A, Gradziel TM, Crisosto CH. 2011.** Whole genome sequencing of peach (*Prunus persica* L.) for SNP identification and selection. *BMC Genomics* 12: 569.
- Alamillo J M, Saenz P, García JA. 2006.** Salicylic acid-mediated and RNA-silencing defense mechanisms cooperate in the restriction of systemic spread of plum pox virus in tobacco. *The Plant journal* 48: 217-227.
- Alazem M, Lin NS. 2015.** Roles of plant hormones in the regulation of host–virus interactions. *Molecular plant pathology*, 16: 529-540.
- Albacete A, Ghanem ME, Martínez-Andújar C, Acosta M, Sánchez- Bravo J, Martínez V, Lutts S, Dodd IC, Pérez-Alfocea F. 2008.** Hormonal changes in relation to biomass partitioning and shoot growth impairment in salinized tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *J Exp Bot* 59: 4119–4131.
- Albacete A, Ghanem ME, Dodd IC, Pérez-Alfocea F. 2010.** Principal component analysis of hormone profiling data suggests an important role for cytokinins in regulating leaf growth and senescence of salinized tomato. *Plant Signal Behav.* 5: 45–48.
- Albrechtova L. 1990.** Determination of Plum pox virus in the tissues of peach trees by ELISA during vegetation period. *Zahradnictvi* 17: 251-262.
- Alkio M, Jonas U, Declercq M, Van Nocker S, Knoche M. 2014.** Transcriptional dynamics of the developing sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit: sequencing, annotation and expression profiling of exocarp-associated genes. *Horticulture Research* 1: 11
- Amenduni T, Bazzoni A, Minafra A, Savino V. 2004.** Evaluation of the susceptibility of seedlings from apricot crosses to the Marcus strain of Plum pox virus. *Acta Horticulturae* 657: 305-308.
- Aranzana MJ, García-Mas J, Carbo J, Arus P. 2002.** Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. *Plant Breeding* 121: 87–92.
- Aranzana MJ, Illa E, Howad W, Arús P. 2012.** A first insight into peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] SNP variability. *Tree Genetics Genomes* 8: 1359-1369.
- Argueso CT, Ferreira FJ, Epple P, To JP, Hutchison CE, Schalle GE. 2012.** Two-component elements mediate interactions between cytokinin and salicylic acid in plant immunity. *Plos Genet* 8: e1002448.
- Arumuganathan K, Earle ED. 1991.** Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Molecular Biology Reporter* 9: 229-241.
- Arús P, Howad W, Mnejja M. 2005.** Marker development and marker-assisted selection in temperate fruit trees. En *In the wake of the double helix: From the green revolution to the gene revolution*. Tuberosa R, Phillips R L and Gale M (Editors). Avenue Media, Bologna, Italy, 309-325.

- Arús P, Gradziel T, Margarida Oliviera M, Tao R. 2009.** Genomics of Almond. Genetics and Genomics of Rosaceae. In *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models* .Volume 6: 187-219.
- Ashburner M, Ball C A, Blake J A, Botstein D, Butler H, Cherry J M, Davis A P, Dolinski, Dwight S S, Eppig J T, Harris M A, Hill D P, Issel-Tarver R, Lewis S, Matese J E, Richardson J E, Ringwald M, Rubin G M, Sherlock G. 2000.** Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* 25: 25–29.
- Asins MJ, Mestre P, García J E, Dicenta F, Carbonell E A. 2002.** Genotype x environment interaction in QTL analysis of an intervarietal almond cross by means of genetic markers. *Theor Appl Genet* 89: 358–364.
- Atkins JF; Brennan RM, Gesteland RF. 2011.** RNA worlds : from life's origins to diversity in gene regulation. Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor. Laboratory Press.
- Atanasoff D. 1932.** Plum Pox. A new virus disease. *Yearbook University of Sofia. Faculty of Agriculture and Sylviculture* 11: 46-49.
- Atanasoff D. 1935.** Old and new virus diseases of trees and shrubs. *Phytopath.* 8: 197-233.
- Audergon JM, Monestiez P, Labonne G, Quiot JB. 1989.** Virus de la sharka. Repartition spatiale du virus dans un arbre. *2 Rencontres de Virologie Végétale*. Aussois.
- Audergon JM, Dosba F, Karayiannis I, Dicenta F. 1994.** Amélioration de l'abricotier pour la résistance à la sharka. *Bulletin EPPO* 24: 741-748.
- Babu M, Griffiths J S, Huang T S and Wang A. 2008.** Altered gene expression changes in *Arabidopsis thaliana* leaf tissues and protoplast in response to Plum pox virus infection. *BMC Gen.* 9: 325.
- Badenes ML, Asins MJ, Carbonell EA, Llácer G. 1996.** Genetic diversity in apricot, *Prunus armeniaca*, aimed at improving resistance to plum pox virus. *Plant Breeding* 115: 133-139.
- Baebler Š, Witek K, Petek M, Stare K, Tušek-Žnidarič M, Pompe-Novak M, Morgiewicz K. 2014.** Salicylic acid is an indispensable component of the Ny-1 resistance-gene-mediated response against Potato virus Y infection in potato. *Journal of Experimental Botany* 65: 1095-1109.
- Baird WV, Estager AS, Wells JK. 1994.** Estimating nuclear DNA content in peach and related diploid species using laser flow cytometry and DNA hybridization. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 119: 1312-1316.
- Barker H, Harrison BD. 1984.** Expression of genes for resistance to Potato virus Y in potato plants and protoplasts. *Ann. Appl. Biol.* 105: 539-545.
- Barnett OW. 1992.** A summary of potyvirus taxonomy and definitions (pp. 435-444). Virology. Ed. Springer Vienna.
- Beachy RN, Loesch-Fries S, Tumer NE. 1990.** Coat protein-mediated resistance against virus infection. *Annual Review Phytopathology* 28: 451-472.

- Bertin N, Martre P, Genard M, Quillot B and Salon C. 2010.** Under what circumstances can process-based simulation models link genotype to phenotype for complex traits? Case-study of fruit and grain. *J. Exp. Bot.* 61: 955–967.
- Bilgin D, Zhu J, Clough S J, Ort D R and DeLucia E H. 2010.** Biotic stress globally down regulates photosynthesis genes. *Plant Cell. Environ.* 33: 1597–1613.
- Blencowe, A., Tan, J. F., Goh, T. K., & Qiao, G. G. 2009.** Core cross-linked star polymers via controlled radical polymerisation. *Polymer* 50: 5-32.
- Bodin-Ferri M, Costes E, Quiot J B and Dosba F. 2002.** Systemic spread of Plum pox virus (PPV) in mariana plum GF8-1 in relation to shoot growth. *Plant Pathology* 51: 142-148.
- Bompfünnewerer AF, Flamm C, Fried C, Fritzch G, Hofacker I L, Lehmann J, Missal K, Mosig A, Müller B, Prohaska S J, Stadler B M R, Stadler P F, Tanzer A, Washietl S, Witwer C. 2004.** Evolutionary patterns of non-coding RNAs. *Theory in Biosciences* 123: 301-369.
- Boonprakob P, Byrne D. 1990.** Mume, a possible source of genes in apricot breeding. *Fruit Varieties Journal* 44: 108-113.
- Boopathi N M. 2013.** Genetic Mapping and Marker Assisted Selection: Basics, Practice and Benefits. Springer, New York. 293 pp.
- Bortiri E, Oh S H, Jiang J G, Baggett S, Granger A, Weeks C, Buckingham M, Potter D, Parfitt DE. 2001.** Phylogeny and systematics of *Prunus* (Rosaceae) as determined by sequence analysis of ITS and the chloroplast trnL-trnF spacer DNA. *Systematic Botany* 26: 797–807.
- Bouhadida M, Martin J P, Eremin G, Pinochet J, Moreno M A and Gogorcena Y. 2007.** Chloroplast DNA diversity in *Prunus* and its implication on genetic relationships. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 132: 670-679.
- Burgos L, Egea J, Guerriero R, Viti R, Monteleone P, Audergon JM. 1997.** The self-compatibility trait of the main apricot cultivars and new selections from breeding programmes. *Journal of Horticultural Science* 72: 147-154.
- Cabrera A, Kozik A, Howad W, Arus P, Iezzoni AF, van der Knaap E. 2009.** Development and bin mapping of a Rosaceae Conserved Ortholog Set (COS) of markers. *BMC Genomics* 10: 562.
- Cambra M, Llácer G, Gella R. 1981.** Prospección de la sharka en España mediante la técnica inmuno-enzimática ELISA. *Anales INIA Serie Agricultura* 16: 161-173.
- Cambra M, Crespo Alarcón J, Gorrís Grancha M T, Olmos Castelló A, Cambra Álvarez M. 2003.** Detección y erradicación del virus de la sharka tipo Marcus en Aragón. *Vida rural* 16: 50-55.
- Cambra M, Capote N, Myrta A, Llácer G. 2006.** Plum pox virus and the estimated costs associated with sharka disease. *EPPO Bull.* 36: 202–204.
- Campos L, Granell P, Tarraga S, Lopez-Gresa P, Conejero V, Belles J M, y col. 2014.** Salicylic acid and gentisic acid induce RNA silencing-related genes and plant resistance to RNA pathogens. *Plant Physiology Biochemistry* 77: 35-43.

- Campoy JA, Ruiz D, Egea J, Rees DJG, Celton JM, Martínez-Gómez P. 2011.** Inheritance of flowering time in apricot (*Prunus armeniaca* L.) and analysis of linked quantitative trait loci (QTLs) using simple sequence repeat (SSR) markers. *Plant Molecular Biology Reporter* 29: 404-410.
- Cánovas FM, Dumas-Gaudot E, Recorbet G, Jorin J, Mock H P, Rossignol M. 2004.** Plant proteome analysis. *Proteomics* 4: 285-298.
- Cantini C, Iezzoni AF, Lamboy WF, Boritzki M, Struss D. 2001.** DNA fingerprinting of tetraploid cherry germplasm using simple sequence repeats. *J Am Soc Hort Sci*, 126: 205–209.
- Capote N, Cambra M A, Botella P, Gorris M T, Martínez M C, López-Quílez A, Cambra M. 2010.** Detection, characterization, epidemiology and eradication of Plum Pox Virus Marcus type in Spain. *Journal of Plant Pathology* 92: 619-628.
- Carmona-Saez P, Chagoyen M, Tirado F, Carazo J M, y Pascual-Montado A. 2007.** GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Gen. Biol.* 8:R3.
- Chapman EJ, Carrington JC. 2007.** Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature Reviews Genetics* 8: 884-896.
- Chapman EJ, Carrington J C. 2012.** Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature Reviews Genetics* 8: 884-896.
- Chen Y, Mao Y, Liu H, Yu F, Li S, Yin T. 2014.** Transcriptome differentially expressed genes relevant to variegation in peach flowers. *PLOS ONE* 9: e90842
- Chern M, Fitzgerald HA, Canlas PE, Navarre DA, Ronald PC. 2005.** Overexpression of a rice NPR1 homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 511-520.
- Cipriani G, Lot G, Huang WG, Marrazo MT, Peterlunger E, Testolin R. 1999.** AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. *Theor Appl Genet* 99: 65–72.
- Clarke SF, Burritt DJ, Guy PL. 1998.** Influence of plant hormones on virus replication and pathogenesis-related proteins in *Phaseolus vulgaris* L. infected with white clover mosaic potyvirus. *Physiol. Mol. Plant Pathology* 53: 195-207.
- Clemente-Moreno MJ, Hernández JA, Díaz-Vivancos P. 2015.** Sharka: how do plants respond to *Plum pox virus*. *Journal of Experimental Botany* 66: 25-35.
- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang ECK. 2005.** An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica* 142: 169-196.
- Cosson P, Sofer L, Le QH, Léger V, Schurdi-Levraud V, Whitham SA, Yamamoto ML, Gopalan S, Le Gall O, Candresse T, Carrington J C y Revers F. 2010.** RTM3, which control long-distance movement of Potyviruses, is a member of a new plant gene family encoding a meprin and TRAF homology domain-containing protein. *Plant Physiol.* 154: 222–232.

- Dardick C. 2007.** Comparative expression profiling of *Nicotiana benthamiana* leaves systemically infected with three tree viruses. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20: 1004–1007.
- De Candolle ALPP. 1855.** *Géographie botanique raisonnée*. Imprimerie de L. Martinet.
- De Candolle ALPP. 1886.** Origin of cultivated plants. D. Appleton and Company, 1, 3 and 5 bond street, New York, USA, 468 pp.
- De La Vega FM, Lazaruk KD, Rhodes MD, Wenz MH. 2005.** Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan SNP genotyping assay and the SNPlex genotyping system. *Mutant Res* 573: 111–135
- Decroocq V, Fave MG, Hagen L, Bordenave L, Decroocq S. 2003.** Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 912-922.
- Decroocq V, Foulongne M, Lambert P, Le Gall O, Mantin C, Pascal T, Shurdi-Levraud V, Kervella J. 2005.** Analogues of virus resistance genes map to QTLs for resistance to sharka disease in *Prunus davidiana*. *Molecular Genetics and Genomics* 272: 680-689.
- Decroocq S, Chague A, Lambert P, Roch G, Audergon JM, Geuna F, Salava J. 2014.** Selecting with markers linked to the PPVres major QTL is not sufficient to predict resistance to Plum Pox Virus (PPV) in apricot. *Tree Genetics & Genomes* 10: 1161-1170.
- Decroocq S, Chague A, Lambert P, Roch G, Audergon J M, Geuna F, Chiozzotto R, Bassi D, Dondini L, Tartarini S, Salava J, Krska B, Palmisano F, Karayiannis I and Decroocq V. 2014.** Selecting with markers linked to the PPVres major QTL is not sufficient to predict resistance to Plum pox virus (PPV) in apricot. *Tree Genet. Genomes* 10: 85-95.
- Delaat A M M and Vanloon L C. 1983.** Regulation of Ethylene Biosynthesis in Virus-Infected Tobacco- Leaves .3. The Relationship between Stimulated Ethylene Production and Symptom Expression in Virus-Infected Tobacco-Leaves. *Physiol. Plant Pathol.* 22, 261-273.
- Denancé N, Sánchez-Vallet A, Goffner D, Molina A. 2013.** Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Frontiers in Plant Science* 4: 32.
- Díaz-Vivancos P, Rubio M, Mesonero V, Periago PM, Ros-Barceló A, Martínez-Gómez P, Hernández JA. 2006.** The apoplastic antioxidant system in *Prunus*: Response against long-term Plum pox virus infection. *Journal of Experimental Botany* 57: 3813-3824.
- Dicenta F, García JE, Gella R, Martínez-Gómez P. 1996.** Resistencia al virus de la sharka. Un carácter a mejorar en los albaricoqueros españoles. *ITEA* 92: 131-143.
- Dicenta F, Pérez-Campoy PJ, Martínez-Gómez P, García-Brunton J, Abad E. 1999a.** Plum pox virus situation in Murcia (Spain). *Acta Horticulturae* 488: 769-774.

- Dicenta F, Pérez-Campoy P J, Martínez-Gómez P, García-Brunton J, Botella M A. 1999b.** Natural spread of sharka disease in fruit tree orchards in Murcia (Spain). *Acta Horticulturae* 488: 775-778.
- Dicenta F, Martínez-Gómez P, Burgos L, Egea J. 2000.** Inheritance of resistance to Plum pox potyvirus (PPV) in apricot, *Prunus armeniaca*. *Plant Breeding* 119: 161-164.
- Dicenta F, Martínez-Gómez P, Rubio M, Audergon JM. 2003.** Localisation and movement of Plum pox virus in apricot stem tissues. *Annals of Applied Biology* 142: 99-105.
- Dirlewanger E, Cosson P, Tavaud M, Aranzana M, Poizat C, Zanetto A, Laigret F. 2002.** Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 105: 127-138.
- Dirlewanger E, Graziano E, Joobeur T, Garriga-Calderé F, Cosson P, Howad W, Arús P. 2004.** Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 9891-9896.
- Dirlewanger E, Claverie J, Iezzoni AF, Wünsch, A. 2009.** Sweet and sour cherries: linkage maps, QTL detection and marker assisted selection. En *Genetics and genomics of Rosaceae*. Springer New York. pp. 291-313
- Dirlewanger E, Quero-García J, Le Dantec L, Lambert P, Ruiz D, Dondini L, Illa E, Quilot-Turion B, Audergon JM, Tartarini S, Letourmy P, Arús P. 2012.** Comparison of the genetic determinism of two key phenological traits, flowering and maturity dates, in three *Prunus* species: peach, apricot and sweet cherry. *Heredity* 109: 280-292.
- Di Nicola-Negri E, Tavazza M, Salandri L, Ilardi V. 2010.** Silencing of Plum pox virus 5' UTR/P1 sequence confers resistance to a wide range of PPV strains. *Plant cell Reports* 29: 1435-1444.
- Dobrev P, Kamínek M. 2002.** Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *J. Chrom.* 950: 21-29.
- Dondini L, Lain O, Vendramin V, Rizzo M, Vivoli D, Adami M, Boscia, D. 2011.** Identification of QTL for resistance to plum pox virus strains M and D in Lito and Harcot apricot cultivars. *Molecular Breeding* 27: 289-299.
- Dosba F, Lasac M, Desvignes JC. 1988a.** Plum pox virus PPV. Virus de la variole du prunier. *Phytoma* 395, 31-32.
- Dosba F, Maison P, Lasac M, Audergon JM, Massonié G. 1988b.** Recherche de gènes de résistance a la sharka (PPV) chez l'abricotier. En *Agriculture. L'abricotier*. Ed. J M Audergon. INRA Monfavet. 69-72.
- Dosba F, Lasac M, Maison P, Massonnie G, Audergon J M. 1988c.** Tolerance to Plum Pox Virus in apricot. *Acta Horticulturae* 235: 275-281.

- Dosba F, Denise F, Maison P, Massonie G, Audergon JM. 1991.** Plum Pox Virus resistance of apricot. *Acta Horticulturae* 293: 569-579.
- Dosba F, Orliac S, Dutrannoy F, Maison P, Massonie G, Audergon JM. 1991.** Evaluation of resistance to plum pox virus in apricot trees. En *XV International Symposium on Fruit Tree Diseases* 309: 211-220.
- Dosba F, Orliac S, Dutrannoy F, Maison P, Massonié G, Audergon JM. 1992.** Evaluation of resistance to plum pox virus in apricot trees. *Acta Hort* 309: 211-220.
- Dougherty W G, Carrington J C. 1988.** Expression and function of potyviral gene products. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26: 123-143.
- Dougherty WG, Parks TD. 1991.** Post-translational processing of the tobacco etch virus 49-kDa small nuclear inclusion polyprotein: Identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains. *Virology* 183: 449-456.
- Downey S, Iezzoni A. 2000.** Polymorphic DNA markers in black cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry, peach and sour cherry. *J Am Soc Hort Sci* 125: 76-80.
- Doyle JJ, Doyle N. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15.
- Du Z, Zhou X, Ling Y, Zhang Z, Su Z. 2010.** agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Research* 8: 310.
- Eduardo I, Chietera G, Pirona R, Pacheco I, Troglio M. 2013.** Genetic dissection of aroma volatile compounds from the essential oil of peach fruit: QTL analysis and identification of candidate genes SNP maps. *Tree Genet Genomes* 9: 189-204
- Egea J, Burgos L, Martínez-Gómez P, Dicenta F. 1997.** Apricot breeding for sdharna resistance at CEBAS-CSIC (Murcia, Spain). *Acta Horticulturae* 488: 153-158.
- Escalettes V, Dosba F, Lansac M, Eyquard JP, Monet R. 1998.** Genetic resistance to PPV in peaches. *Acta Horticulturae* 465: 689-697.
- Esmenjaud, D., & Dirlewanger, E. 2007.** Plum. En *Fruits and Nuts*. Springer Berlin Heidelberg. pp. 119-135.
- Faust M, Suranyi D, Nyujto. 1998.** *Origin and dissemination of apricot*. books.google.com.
- Fernández-Fernández MR, Martínez-Torrecuadrada JL, Casal JI, García JA. 1998.** 60 Development of an antigen presentation system based on plum pox potyvirus. *FEBS Lett.* 427: 229-235.
- Folta KM, Gardiner SE. 2009.** Genetics and Genomics of Rosaceae. *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models* 6: 34-42.
- Fraser RSS, Whenham RJ. 1989.** Abscisic-Acid Metabolism in Tomato Plants Infected with Tobacco Mosaic-Virus - Relationships with Growth, Symptoms and the Tm-1 Gene for Tmv Resistance. *Physiol. Mol. Plant Pathology* 34: 215-226.
- Fraser RSS. 1990.** The genetics of resistance to plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* 28: 179-200.

- Gabriel S, Ziaugra L. 2004.** SNP genotyping using Sequenom MassARRAY 7K platform. *Current Protocols Human Genetics* 2: 12.
- Gabova R. 1994.** Evaluation of peach and nectarine cultivars in Bulgaria for their resistance to Plum pox potyvirus. *Bulletin EPPO* 24: 755-760.
- Gao L, Wang YT, Li Z, Zhang Z, Ye JL, Li GH. 2016.** Gene Expression Changes during the Gummosis Development of Peach Shoots in Response to *Lasiodiplodia theobromae* Infection Using RNA-Seq. *Frontiers in Physiology* 7: 170
- García JA, Glasa M, Cambra M, Candresse T. 2014.** Plum pox virus and sharka: A model potyvirus and a major disease. *Molecular Plant Pathology* 15: 226–241.
- Garcia-Marcos A, Pacheco R, Manzano A, Aguilar E, Tenllado F. 2013.** Oxylin biosynthesis genes positively regulate programmed cell death during compatible infections with the synergistic pair potato virus X–potato virus Y and Tomato spotted wilt virus. *J. Virol.* 87: 5769–5783.
- Gingeras TR. 2011.** Origin of phenotypes: Genes and transcripts. *Genome Res* 17: 682–690.
- Giunchedi L, Conti M, Gallitelli D, Martelli G P. 2007.** *Elementi di Virologia Vegetale.* Piccin. Ed. Springer.
- Glasa M, Palkovics L, Kominek P, Labonne G, Pittnerova S, Kudela O, Candresse T, and Subr Z. 2004.** Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of Plum pox virus (PPV) are genetically very similar and form a unique PPV subgroup. *J. Gen. Virol.* 85: 2671-2681.
- González-Ibeas D, Canizares J, and Aranda M A. 2012.** Microarray analysis shows that recessive resistance to Watermelon mosaic virus in Melon is associated with the induction of defense response genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25: 107–118.
- González-Jara P, Atencio F A, Martínez-García B, Barajas D, Tenllado F, and Díaz-Ruíz J R. 2005.** A single amino acid mutation in the Plum pox virus HC-Pro gene abolishes both synergistic and silencing suppression activities. *Phytopathology* 65: 112-114.
- Gradziel T M. 2012.** *Breeding plantation tree crops: temperate species.* Ed. Springer, New York, 1–31.
- Graham LE, Schippers JHM, Dijkwel PP, Wagstaff C. 2012.** Ethylene and Senescence Processes. *Annual Plant Reviews* 5: 305-341.
- Grimplet J, Romieu C, Sauvage FX, Lambert P, Audergon JM, Terrier N. 2003, September.** Transcriptomics and proteomics tools towards ripening markers for assisted selection in apricot. *Acta Horticulturae* 663: 291-296.
- Guillet-Bellanger I, Audergon JM. 2001.** Inheritance of the Stark Early Orange apricot cultivar resistance to Plum pox virus. *Acta Horticult.* 550: 111–115.
- Gulcan R. 1997.** The importance of germplasm evaluation on fruit trees indigenous in Near East. *Acta Horticulture* 441: 129–135.
- Gupta PK, Balyan HS., Sharma PC, Ramesh B. 1996.** Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. *Current Science* 45: 45-54.

- Halleger M, Llorian M, Smith C W. 2010.** Alternative splicing: global insights. *FEBS Journal* **277**, 856–866
- Haldeman-Cahill R, Daròs JA, Carrington JC. 1998.** Secondary structures in the capsid protein coding sequence and 3' nontranslated region involved in amplification of the tobacco etch virus genome. *Journal of virology* **72**: 4072-4079.
- Hanelt P. 1997.** European wild relatives of Prunus fruit crops. *Bocconea* **7**: 401–408.
- Hari V, Siegel A, Rozek C, Timberlake WE. 1979.** The RNA of tobacco etch virus contains poly (A). *Virology* **92**: 568-571.
- Hartmann W. 1998.** Hypersensitivity – a possibility for breeding sharka resistant plum hybrids. *Acta Horticulturae* **472**: 429–431.
- Helliwell CA, Sheldon CC, Olive MR, Walker AR, Zeevaart JA, Peacock W. 1998.** Cloning of the Arabidopsis ent-kaurene oxidase gene GA3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 9019-9024.
- Hodges E, Molaro A, Dos Santos CO, Thekkat P, Song Q, Uren P, Park J, Butler J, Rafii S, McCombie WR, Smith AD y Hannon GJ. 2005.** Directional DNA methylation changes and complex intermediate states accompany lineage specificity in the adult hematopoietic compartment. *Mol. Cell.* **134**: 451–460.
- Horn R, Lecouls AC, Callahan A, Dandekar A, Garay L, McCord P, Jung S. 2005.** Candidate gene database and transcript map for peach, a model species for fruit trees. *Theoretical and Applied Genetics* **110**: 1419-1428.
- Howad, W., Yamamoto, T., Dirlwanger, E., Testolin, R., Cosson, P., Cipriani, G., ... & Arus, P. 2005.** Mapping with a few plants: using selective mapping for microsatellite saturation of the Prunus reference map. *Genetics*, **171**(3), 1305-1309.
- Hu Z-L, Park CA, Fritz ER, Reecy JM. 2012.** Invited Lecture at the 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. 2010. QTLdb:A Comprehensive Database Tool Building Bridges between Genotypes and Phenotypes. Leipzig, Germany.
- Hull R. 2002.** *Matthews' Plant Virology*, 4th edn. San Diego: Academic Press.
- Ion-Nagy L, Lansac M, Eyquard J P, Salvador B, Garcia J A, Le Gall O, Hernould M, Schurdi-Levraud V, Decroocq V. 2006.** PPV long-distance movement is occasionally permitted in resistant apricot hosts. *Virus Research* **120**: 70–78.
- Jackson SA, Iwata A, Lee SH, Schmutz J, Shoemaker R. 2011.** Sequencing crop genomes: approaches and applications. *New Phytologist* **191**, 915-925.
- Jay F, Wang Y, Yu A, Taconnat L, Pelletier S, Colot V, y col. 2011.** Misregulation of auxin underlies the developmental abnormalities caused by three distinct viral silencing suppressors in Arabidopsis. *Plos Pathog.* **7**: e1002035.
- Jiang YQ, Ma RC. 2003.** Generation and analysis of expressed sequence tags from almond (*Prunus dulcis* Mill.) pistils. *Sexual Plant Reproduction* **16**: 197-207.

- Jung S, Jesudurai C, Staton M, Du Z, Ficklin S, Cho I, Main D. 2004.** GDR (Genome Database for Rosaceae): integrated web resources for Rosaceae genomics and genetics research. *BMC bioinformatics* 5: 130.
- Jung S, Staton M, Lee T, Blenda A, Svancara R, Abbott A, Main D. 2008.** GDR (Genome Database for Rosaceae): integrated web-database for Rosaceae genomics and genetics data. *Nucl. Acid. Res.* 36: D1034–D1040.
- Jung S, Jiwan D, Cho I, Lee T, Abbott A, Sosinski B, Main D. 2009.** Synteny of Prunus and other model plant species. *BMC Genomics* 10: 76.
- Jung JH, Seo PJ, Kang SK, Park J. 2011.** miR172 signals are incorporated into the miR156 signaling pathway at the SPL3 /4 /5 genes in Arabidopsis developmental transitions. *Plant Molecular Biology* 76: 35-45.
- Jurinke C, Van Den Boom D, Cantor CR, Köster H. 2002.** Automated genotyping using the DNA MassArray™ technology. En *PCR Mutation Detection Protocols*. Humana Press. pp. 179-192.
- Kalashyan YA, Bilkey ND, Verderevskaya TD, Rubina EV. 1994.** Plum pox potyvirus on sour cherry in Moldova. *EPPO bulletin* 24: 645-649.
- Kashiwazaki S, Minobe Y, Hibino H. 1991.** Nucleotide sequence of barley yellow mosaic virus RNA 2. *Journal of General Virology* 72: 995–999.
- Kasschau KD, Xie Z, Allen E, Llave C, Chapman EJ, Krizan KA, Carrington, J. C. 2003.** P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Developmental cell* 4: 205-217.
- Kapustin Y, Souvorov A, Tatusova T, Lipman D. Splign. 2008.** Algorithms for computing spliced alignments with identification of paralogs. *Biol Direct* 3: 20.
- Karayiannis I. 1989.** Susceptibility of apricots cultivars to Plum pox virus in Greece. *Acta Horticulturae* 235: 271-274.
- Kazan K, Manners J, M. 2009.** Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends in plant science* 14: 373-382.
- Keck M, Stöger A, Russ K. 1992.** Investigations on the spread of sharka in view of a systematic virus control. *Acta Horticulturae* 309: 135-137.
- Kegler H, Fuchs E, Grüntzig M, Schwarz S. 1998.** Some results of 50 years of research on the resistance to plum pox virus. *Acta virologica* 42: 200-215.
- Kim SY, He Y, Jacob Y, Noh Y S, Michaels S, Amasino R. 2005.** Establishment of the vernalization-responsive, winter-annual habit in Arabidopsis requires a putative histone H3 methyl transferase. *Plant Cell* 17: 3301–3310.
- Klose J. 1975.** Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26: 231-243.
- Koepke T, Schaeffer S, Krishnan V, Jiwan D, Harper A, Whiting M, Oraguzie N, Dhingra A. 2012.** Rapid gene-based SNP and haplotype marker development in non-model eukaryotes using 3'UTR sequencing. *BMC Genomics* 13: 18.

- Kovac M, Muller A, Milovanovic Jarah D, Milavec M, Duchting P and Ravnikar M. 2009.** Multiple hormone analysis indicates involvement of jasmonate signaling in the early defense of potato to potato virus Y. *Biol. Plant.* 53: 195-199.
- Krüssmann G. 1986.** Manual of cultivated broad-leaved trees and shrubs. Vol. 3. Portland: Timber Press.
- Kuitert W. 1999.** Japanese flowering cherries. Portland: Timber Press.
- Labaj PP, Leparc GG, Linggi BL, Markille LM, Wiley HS, Kreil DP. 2011.** Characterization and improvement of RNA-Seq precision in quantitative transcript expression profiling. *Bioinformatic* 27: i383–i391.
- Laín S, Riechmann J, García JA. 1989.** The complete nucleotide sequence of plum pox potyvirus RNA. *Virus research* 13: 157-172.
- Lalli DA, Decroocq V, Blenda A V, Schurdi-Levraud V, Garay L, Le Gall O, Damsteegt V, Reighard G L and Abbott AG. 2005.** Identification and mapping of resistance gene analogs (RGAs) in Prunus: a resistance map for Prunus. *Theor. Appl. Genet.* 111: 1504–1513.
- Lalli DA, Abbott AG, Zhebentyayeva TN, Badenes ML, Damsteegt V, Polák J, Krska B, Salava J. 2008.** A genetic linkage map for an apricot (*Prunus armeniaca* L.) BC₁ population mapping Plum pox virus resistance. *Tree Genet Genomes* 4: 481–493.
- Lansac M, Bernhard R, Massonie G, Maison P, Kerlan C, Dunez J, Morvan G. 1982.** La sharka: connaissances actuelles. *Journ. Franc. Etud. Info.* Paris. 452-468.
- Lambert P, Dicenta F, Rubio M and Audergon J M. 2007.** QTL analysis of resistance to sharka disease in the apricot (*Prunus armeniaca* L.) 'Polonais' x 'Stark Early Orange' F1 progeny. *Tree Genet. Genomes* 3: 299–309.
- Layne REC, Bailey CH, Hough LF. 1996.** Apricots. In: J. Janick and J.N. Moore (eds), Fruit breeding. Vol. 1. Wiley. New York.
- Labonne G, Boeglin M and Monsion B. 2004.** Evaluation of three ornamental Prunus as reservoirs of PPV. *Acta Hortic.* 657: 255-259.
- Labonne G, Dallot, S. 2006.** Epidemiology of sharka disease in France. *EPPO Bulletin* 36: 267-270.
- Lazzari B, Caprera A, Vecchietti A, Merelli I, Barale F, Milanesi L, Pozzi C. 2008.** Version VI of the ESTree db: an improved tool for peach transcriptome analysis. *BMC bioinformatics* 9: S9.
- Lee S, Wen J. 2001.** A phylogenetic analysis of Prunus and the Amygdaloideae (Rosaceae) using ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany* 88: 150-160.
- Leida C, Ríos G, Soriano J M, Pérez B, Llácer G, Crisosto C H, Badenes M L. 2011.** Identification and genetic characterization of an ethylene-dependent polygalacturonase from apricot fruit. *Postharvest Biology and Technology* 62: 26–34.

- Lellis AD, Kasschau KD, Whitham SA, Carrington JC. 2002.** Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF (iso) 4E during potyvirus infection. *Current Biology* 12: 1046-1051.
- Lewsey M, Palukaitis P and Carr J P. 2008.** Plant–Virus Interactions: Defence and Counter-Defence. *Annual Plant Reviews* 34: 134-176.
- Lewsey MG, Carr JP. 2009.** Effects of DICER-like proteins 2, 3 and 4 on cucumber mosaic virus and tobacco mosaic virus infections in salicylic acid-treated plants. *Journal General Virology* 90: 3010-3014.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Durbin R. 2009.** The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25: 2078-2079.
- Lichou J, Audubert A. 1992.** L'abricotier. *Ed. Ctifl*.
- Lindner R, Friedel CC. 2012.** A comprehensive evaluation of alignment algorithms in the context of RNA-seq. *PLoS One* 7: e52403.
- López L, Urzainqui A, Domínguez E, García JA. 2001.** Identification of an N-terminal domain of the plum pox potyvirus CI RNA helicase involved in self-interaction in a yeast two-hybrid system. *Journal of General Virology* 82: 677-686.
- López-Moya JJ, Fernández-Fernández MR, Cambra M, García JA. 2000.** Biotechnological aspects of plum pox virus. *Journal of Biotechnology* 76: 121-136.
- Llácer G, Cambra M, Laviña A. 1985.** Detección y primeros estudios del virus de la sharka en España. *Anales Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias* 28: 157-166.
- Lommel SA, McCain AH, Morris TJ. 1982.** Evaluation of Indirect-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. *Phytopatology* 72: 1018-1022.
- Maghuly F, Borroto Fernandez E, Ruthner S, Pedryc A, Laimer M. 2005.** Microsatellite variability in apricots (*Prunus armeniaca* L.) reflects their geographic origin and breeding history. *Tree Genetics & Genomes* 1: 151-165.
- MAGRAMA** (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). 2014. Datos extraídos del Anuario de estadística agraria (2008-2012). <http://www.magrama.gob.es>.
- Manachini B, Casati P, Aliverti I, Cinanni L. 2004.** Trasmisión de PPV-M to *Prunus persica* by *Brachycaudus schwartzi* and *Phorodon humuli* (Hem., Aphididae). Blackwell Verlag 128(9/10).
- Manachini B, Casati P, Cinanni L, Bianco P. 2007.** Role of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) and Its Secondary Hosts in Plum Pox Virus Propagation. *J. Econ. Entomol.* 100: 1047-1052.
- Marandel G, Salava J, Abbott A, Candresse T, Decroocq V. 2009.** Quantitative trait loci meta-analysis of Plum pox virus resistance in apricot (*Prunus armeniaca* L.): new insights on the organization and the identification of genomic resistance factors. *Molecular Plant Pathology* 10: 347-360.

- Marco S, Levy D. 1979.** Involvement of Ethylene in the Development of Cucumber Mosaic Virus- Induced Chlorotic Lesions in Cucumber Cotyledons. *Physiol. Plant Pathol.* 14: 235-244.
- Martínez R, Carbonell-Barrachina AA. 2012.** Chemical, functional and quality properties of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) as affected by mulching. *Scientia Horticulturae* 134: 114-120.
- Martínez-García PJ, Parfitt DE, Bostock RM, Fresnedo-Ramírez J, Vázquez-Lobo A. 2013a.** Application of genomic and quantitative genetic tools to identify candidate resistance genes for brown rot resistance in peach. *PLoS ONE* 7: e78634
- Martínez-García PJ, Parfitt DE, Oguniwin EA, Fass J, Chan HM. 2013b.** High density SNP mapping and QTL analysis for fruit quality characteristics in peach (*P. persica* L.). *Tree Genet Genomes* 9: 19–36
- Martínez-García PJ, Fresnedo-Ramírez J, Parfitt DE, Gradziel TM, Crisosto CH. 2013c.** Effect prediction of identified SNPs linked to fruit quality and chilling injury in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Plant Mol Biol* 81: 175–188.
- Martínez-Gómez P, Audergon J M, Dicenta F. 2000.** Efficiency of inoculation of peach GF305 seedlings with Plum Pox Virus by different methods. *Acta Virol.* 44: 329-33
- Martínez-Gómez P, Rubio M, Dicenta F, Aparicio F, and Pallás V. 2003.** Comparative analysis of three diagnostic methods for the evaluation of Plum pox virus (PPV) resistance in apricot breeding programs. *Acta Hort.* 622: 353–357.
- Martínez-Gómez P, Sánchez-Pérez R, Dicenta F, Howad W, Arús P, Gradziel TM. 2007.** Almond. En *Fruits and Nuts*. Springer Berlin Heidelberg. pp. 229-242.
- Martínez-Gómez P, García-Ibarra A, Hernández J A, Rubio M. 2011a.** An Integrated Genomic, Proteomic and Transcriptomic Approach to Plum Pox Virus Resistance in *Prunus*. *Acta Horticulturae* 899: 81-86.
- Martínez-Gómez P, Crisosto CH, Bonghi C, Rubio M. 2011b.** New approaches to *Prunus* transcriptome analysis. *Genetica* 139: 755-769.
- Martínez-Gómez P, Sanchez-Pérez R, Rubio M. 2012.** Clarifying Omics Concepts, Challenges, and Opportunities for *Prunus* Breeding in the Postgenomic Era. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 16: 1-16.
- Matzke M, Aufsatz W, Kanno T, Daxinger L, Papp I, Mette MF, Matzke AJ. 2004.** Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Biochimica y Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 167: 129-141.
- Mehlenbacher SA, Cocciu V, Hough LF. 1991.** Apricots. En: Moores JN, Ballington R Jr (eds) *Genetic resources of temperate fruit and nut crops*. ISHS, Wageningen, 65–107.
- Melgarejo P, García-Jiménez J, Jordá MC, López MM, Andrés MF, Duran-Vila N. 2010.** Patógenos de plantas descritos en España. *Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino*, 2.
- Meneses C, Jung S, Arús P, Howad W. 2007.** In silico analysis and first applications of SNPs from the GDR database in peach. *XII EUCARPIA Fruit Section Symposium, Zaragoza (Spain)* September 2007, p. 160.

- Merits A, Guo D, Saarma M. 1998.** VPg, coat protein and five non-structural proteins of potato A potyvirus bind RNA in a sequence-unspecific manner. *Journal of General Virology* 79: 3123-3127.
- Messina R, Lain O, Marrazzo MT, Cipriani G, Testolin R. 2004.** New set of microsatellite loci isolated in apricot. *Molecular Ecology Notes* 4: 432-434.
- Mnejja M, Garcia-Mas J, Howad W, Badenes ML, Arús P. 2004.** Simple-sequence repeat (SSR) markers of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) are highly polymorphic and transferable to peach and almond. *Molecular Ecology Notes* 4: 163-166.
- Mousavi S, Alisoltani A, Shiran B, Fallahi H, Imani A, Houshmand S. 2014.** De Novo Transcriptome Assembly and Comparative Analysis of Differentially Expressed Genes in *Prunus dulcis* Mill. in Response to Freezing Stress. *PLOS One* 10: e104541.
- Németh M. 1963.** Field and greenhouse experiments with plum pox virus. *Phytopathologia Mediterranea* 2: 162-166.
- Newman A J. 2008.** RNA interaction in mRNA splicing. Encyclopedia of Life Sciences, <http://www.els.net/WileyCDA/>.
- Nielsen J, Orlík DC. 2001.** A morphometric analysis of *Prunus spinosa*, *P. domestica* ssp. *insititia*, and their putative hybrids in Denmark. *Nordic Journal of Botany* 21: 349–363.
- Neilson KA, Gayani Gammulla C, Mirzaei M, Imin N, Haynes PA. 2010.** Proteomic analysis of temperature stress in plants. *Proteomics* 10: 828–845.
- Nystedt B, Street NR, Wetterbom A, Zuccolo A, Lin YC, Scofield DG, Vezzi F, Delhomme N, Giacomello S, Alexeyenko A. 2013.** The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. *Nature* 497: 579–584.
- Olukolu BA, Kole C. 2012.** Molecular mapping of complex traits. 126–157. En: C. Kole and A. G. Abbott (eds.). *Genetics, genomics and breeding of stone fruits*. CRC Press, Florida.
- Pallás V, Más P, Sánchez-Navarro JA. 2004.** Detection of plant RNA viruses by non-isotopic dot-blot hybridization. En *Plant Virus Protocols: From Virus Isolation to Transgenic Resistance*. Edited by G. Foster & S. Taylor. Totowa: Humana Press. Pp. 461–468.
- Pascal T, Pfeiffer P, Kervella J. 2002.** Preliminary observations on the resistance to sharka in peach and related species. *Acta Horticulturae* 592: 699-704.
- Paunovic SA. 1988.** Apricot germplasm, breeding, selection, cultivar, rootstock and environmental. *Acta Horticulturae* 209: 13-28.
- Peace C, Norelli J. 2009.** Genomics approaches to crop improvement in the Rosaceae. In *Genetics and genomics of Rosaceae*. Springer New York. pp. 19-53
- Pfaffl MW. 2001.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: e45-e45.

- Pilarová P, Marandel G, Decroocq V, Salava J, Krska B and Abbott A G. 2010.** Quantitative trait analysis of resistance to Plum pox virus resistance in apricot F₁ “Harlayne” x “Vestar”. *Tree Genet. Genomes* 6: 467–475.
- Philippe N, Salson M, Commes T, and Rivals E. 2013.** CRAC: an integrated approach to the analysis of RNA-Seq. *Genome Biol.* 14: R30.
- Polák J, Oukropec I, Kominek P, Krska B, Bittóová M. 1997.** Detection and evaluation of resistance of apricots and peaches to Plum pox virus. *Journal of Plant Disease and Protection* 104: 466-473.
- Polák J, Oukropec I. 2010.** Identification of interspecific peach and Prunus sp. hybrids resistant to Plum pox virus infection. *Plant Protection Science* 46: 139-144.
- Potter D, Eriksson T, Evans R, Oh S, Smedmark J, Morgan D, Kerr M, Robertson K, Arsenault M, Dickinson T and Campbell D. 2007.** Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Systematics and Evolution* 266: 5-43.
- Potter D. 2012.** Basic information on the stone fruit crops. En *Genetics, Genomics and Breeding of Stone Fruits*. C. Kole, and A.G. Abbott eds. CRC Press, New York, USA. 1–21
- Pozzi C, Vecchiotti A. 2009.** Peach structural genomics. En *Genetics and genomics of rosaceae*. Springer New York. pp. 235-257.
- Prudencio AS, Del Cueto J, Dicenta F, Sánchez-Pérez R, Martínez-Gómez P. 2016.** Análisis de la expresión génica durante la salida del letargo de las yemas de flor en almendro. X Jornadas de Fruticultura-SECH (FrutiSech2016). Enero de 2016. Murcia
- Quiot JB, Labonne G, Boeglin M, Adamolle C, Renaud L Y, Candresse T. 1995.** Behaviour of two isolates of Plum pox virus inoculated on peach and apricot trees. First results. *Acta Horticulturae* 386: 290-294.
- Rasori A, Ruperti B, Bonghi C, Tonutti P, Ramina A. 2002.** Characterization of two putative ethylene receptor genes expressed during peach fruit development and abscission. *Journal of Experimental Botany* 53: 2333-2339.
- Rau A, Gallopin, M, Celeuz, G, Jaffrézic, F. 2013.** Data-based filtering for replicated high-throughput transcriptome sequencing experiments. *Bioinformatics* 29: 2146–2152.
- Rehder A. 1940.** A manual of cultivated trees and shrubs hardy in North America exclusive of the subtropical and warmer temperate regions, 2nd ed. Macmillan, New York, New York, USA.
- Restrepo MA, Freed DD, Carrington JC. 1990.** Nuclear transport of plant potyviral proteins. *The Plant Cell* 2: 987-998.
- Riechmann, J. L., Laín, S., García, J. A. 1992.** Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology* 73: 1-16.
- Robert-Seilaniantz A, Navarro L, Bari R and Jones J D. 2007.** Pathological hormone imbalances. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 372-379.

- Rodamilans B, San León D, Mühlberger L, Candresse T, Neumüller M, Oliveros J C and García J A. 2014.** Transcriptomic analysis of *Prunus domestica* undergoing hypersensitive response to Plum pox virus infection. *PLoS ONE* **9**, e100477.
- Rodin A, Szathmáry E, Rodin S. 2011.** On origin of genetic code and tRNA before translation. *Rodin y col. Biology Direct* **6**, 14.
- Roberts IM, Wang D, Findlay K, Maule AJ. 1998.** Ultrastructural and temporal observations of the potyvirus cylindrical inclusions (CIs) show that the CI protein acts transiently in aiding virus movement. *Virology* **245**: 173-181.
- Rubio M, Martínez-Gómez P, Dicenta F. 2003a.** Resistance of almond cultivars to Plum pox virus (sharka). *Plant Breeding* **122**: 462-464.
- Rubio M, Dicenta F, Martínez-Gómez P, 2003b.** Susceptibility to sharka in *Prunus mandshurica* x *P. armeniaca* seedlings. *Plant Breeding* **122**: 465-466
- Rubio M, Martínez-Gómez P, Audergon JM, Dicenta F. 2007.** Testing genetic control hypotheses for Plum pox virus resistance in apricot. *Sci. Hort.* **112**: 361–365.
- Rubio M, Pascal T, Bachellez A, Lambert, P. 2010.** Quantitative trait loci analysis of Plum pox virus resistance in *Prunus davidiana* P1908: new insights on the organization of genomic resistance regions. *Tree Genetics Genomes* **6**: 291-304.
- Rubio M, Ruiz D, Egea J, Martínez-Gómez P, Dicenta F. 2014.** Opportunities of marker assisted selection for Plum pox virus resistance in apricot breeding. *Tree Genet. Genomes* **10**: 513–525.
- Rubio M, Rodríguez-Moreno L, Ballester A R, Castro M, Bonghi C, Martínez-Gómez P. 2015.** Analysis of gene expression changes in peach leaf tissues in response to Plum pox virus infection using RNA-Seq. *Mol. Plant Pathol.* **16**: 164–176.
- Rubio-Huertos M, López-Abella D. 1965.** Ultrastructure of pepper cells infected with a virus and its localization in same. *Microbiologia Espanola* **19**: 77-86.
- Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, Van den Hoff MJB, Moorman AFM. 2009.** Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research* **37**: e45-e45.
- Ruiz D, Martínez-Gómez P, Rubio M, Petri C, Larios A, Campoy JA, Egea J (2011)** Application of Biotechnology Tools to Apricot Breeding. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology* **5**: 101-117
- Rojas MR, Zerbini FM, Allison RF, Gilbertson RL, Lucas WJ. 1997.** Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* **237**: 283-295.
- Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MB, Moorman AFM. 2009.** Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* **37**: e45.
- Sáenz P, Salvador B, Simón-Mateo C, Kasschau KD, Carrington JC, García JA. 2002.** Host-specific involvement of the HC protein in the long-distance movement of potyviruses. *Journal of Virology*, **76**: 1922-1931.

- Saiki RKS, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Amheim N. 1985.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction analysis for diagnosis of sickle-cell anaemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Salazar JA, Ruiz D, Campoy JA. 2014** Quantitative Trait Loci (QTL) and Mendelian Trait Loci (MTL) analysis in *Prunus*: A breeding perspective and beyond. *Plant Molecular Biology Reporter* 32: 1-18
- Sánchez-Pérez R, Martínez-Gómez P, Dicenta F, Egea J, Ruiz D. 2006.** Level and transmission of genetic heterozygosity in apricot, explored by simple sequence repeat markers. *Genet. Res. Crop Evol.* 53: 763–770.
- Sánchez-Navarro J A, Aparicio F, Herranz M C, Minafra A, Myrta A and Pallás V. 2005.** Simultaneous detection and identification of eight stone fruit viruses by one-step RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology* 111: 77-84.
- Sanhueza D, Vizoso P, Bali I, Campos-Vargas R, Meneses C. 2015.** Transcriptomic analysis of fruit stored under cold conditions using controlled atmosphere in *Prunus persica* cv. "Red Pearl". *Frontiers in Plant Science* 6: 788
- Sansavini S, Ganberuini A, Bassi D. 2006.** Peach breeding, genetics and new cultivar trends. *Acta Horticulturae* 713: 23–48.
- Sansregret R, Dufour V, Langlois M, Daayf F, Dunoyer P, Voinnet O, y col. 2013.** Extreme resistance as a host counter-counter defense against viral suppression of RNA silencing. *Plos Pathog.* 9: e1003435.
- Santino A, Taurino M, De Domenico S, Bonsegna S, Poltronieri P, Pastor V, Flors V. 2013.** Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a) biotic stresses. *Plant Cell Reports* 32: 1085-1098.
- Schaad MC, Lellis AD, Carrington JC. 1997.** VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *Journal of virology*, 71: 8624-8631.
- Schurdi-Levraud V, Hullot C, Wawrzyńczak D, Mathieu E, Eyquard J P, le Gall O and Decroocq V. 2006.** Plum pox virus induces differential gene expression in the partially resistant *Prunus armeniaca* cv. Goldrich. *Gene* 374: 96–103.
- Scorza R, Ravelonandro M, Callahan A M, Cordts J M, Fuchs M, Dunez J, Gonsalves D, 1994.** Transgenic plums (*Prunus domestica* L.) express the plum pox virus coat protein gene. *Plant Cell Rept.* 14: 18-22.
- Shen B, Li C, Tarczynski MC. 2002.** High free-methionine and decreased lignin content result from a mutation in the Arabidopsis S-adenosyl-L-methionine synthetase 3 gene. *Plant J.* 29: 371–80.
- Shualey V, Cortes D, Miller G, Mittler R. 2008.** Metabolomics for plant stress response. *Physiologia Plantarum* 132: 199-208.
- Sicard O, Loudet O, Keurentjes J J, Candresse T, Le Gall O, Revers F and Decroocq V. 2008.** Identification of quantitative trait loci controlling symptom development during infection in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21: 198–207.
- Sochor J, Babula P, Adam V, Krska B, Kizek R. 2012.** Sharka: The Past, The Present and The Future. *Viruses* 4: 2853–2901.

- Sorkheh K, Shiran B, Gradziel TM, Epperson BK, Martínez-Gómez P, Asadi E. 2007.** Amplified fragment length polymorphism as a tool for molecular characterization of almond germplasm: genetic diversity among cultivated genotypes and related wild species of almond, and its relationships with agronomic traits. *Euphytica* 156: 327-344.
- Soriano JM, Vera-Ruiz EM, Vilanova S, Martínez-Calvo J, Llácer G, Badenes ML, Romero C. 2008.** Identification and mapping of a locus conferring Plum pox virus resistance in two apricot improved linkage maps. *Tree Genet. Genomes* 4: 391–402.
- Soriano JM, Domingo ML, Zuriaga E, Romero C, Zhebentyayeva T, Abbott A, Badenes ML. 2012.** Identification of simple sequence repeat markers tightly linked to Plum pox virus resistance in apricot. *Mol. Breed.* 30: 1017–1026.
- Sosinski B, Gannavarapu M, Hager LD, Beck LE, King GJ, Ryder CD, Rajapakse S, Baird WV, Ballard RE, Abbott AG. 2000.** Characterisation of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Theor Appl Genet* 101: 421–428.
- Sosinski B, Shulaev V, Dhingra A, Kalyanaraman A, Bumgarner R, Rokhsar D, Verde I, Velasco R, Abbott AG: 2009.** Rosaceous Genome Sequencing: Perspectives and Progress. En *Genetics and Genomics of Rosaceae, Plant Genetics and Genomics: Crops and Models* 6. Edited by: Foltá KM, Gardiner SE. Springer Science+Business Media, LLC. Pp 601–615.
- Sosinski B, Verde I, Morgante M, Rokhsar D 2010.** The international peach genome initiative. A first draft of the peach genome sequence and its use for genetic diversity analysis in peach. *5th International Rosaceae genomics conference. November 2010. Stellenbosch* (South Africa), O46
- Spoel SH, Dong X. 2008.** Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host & Microbe* 3: 348-351.
- Suehiro N, Natsuaki T, Watanabe T, Okuda S. 2004.** An important determinant of the ability of Turnip mosaic virus to infect Brassica spp. and/or Raphanus sativus is in its P3 protein. *Journal General Virology* 85: 2087-2098.
- Sutula CL, Gillet JM, Morrissey SM, Ramsdell DC. 1986.** Interpreting ELISA Data and Establishing the Positive-Negative Threshold. *Plant Disease* 70: 722-726.
- Tavassolian I, Rabiei G, Gregory D, Mnejja M, Wirthensohn MG, Hunt PW, Wu SB. 2010.** Construction of an almond linkage map in an Australian population Nonpareil× Lauranne. *BMC Genomics* 11: 551.
- Tenllado F, Martínez-García B, Vargas M, Díaz-Ruíz JR. 2003.** Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. *BMC Biotechnology* 3: 3.
- Testolin R, Messina R, Lain O, Marrazzo MT, Cipriani G. 2004.** Microsatellites isolated in almond from an AC-repeat enriched library. *Molecular Ecology Notes* 4: 459-461.

- Thaler JS, Owen B, Higgins VJ. 2004.** The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiology* 135: 530-538.
- Tong Z, Gao Z, Wang F, Zhou J, Zhang Z. 2009.** Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. *BMC Molecular Biology* 10: 71.
- Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. 2009.** TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25: 1105-1111.
- Ton J, Flors V and Mauch-Mani B. 2009.** The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in Plant Science* 14: 310-317.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth B C, Remm M, and Rozen S G. 2012.** Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40: e115.
- Vilanova S, Romero C, Abbott AG, Llácer G, Badenes ML. 2003.** An apricot (*Prunus armeniaca* L.) F2 progeny linkage map based on SSR and AFLP markers, mapping plum pox virus resistance and self-incompatibility traits. *Theor. Appl. Genet.* 107: 239-247.
- van Regenmortel MH, Fauquet CM, Bishop DH, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Wickner RB. 2000.** *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Academic Press.
- Vavilov NI. 1951.** The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. *Soil Science*, 72: 482.
- Vallad GE, Goodman RM. 2004.** Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science* 44: 1920-1934.
- Vallejo RL, Collins WW, Young JB. 1995.** Inheritance of Resistance to Potato Virus Y and Potato Virus X in Hybrid *Solanum phureja* × *S. stenotomum* Diploid Potatoes. *Journal of Heredity* 86: 89-93.
- Valli A, Martín-Hernández A M, López-Moya J J, and García J A. 2006.** RNA silencing suppression by a second copy of the P1 serine protease of cucumber vein yellowing Ipvirus, a member of the family Potviridae that lacks the cysteine protease HCPro. *J. Virol.* 80: 10055–10063.
- Van Zeist W, Woldring H. 2000.** Plum (*Prunus domestica* L.) varieties in late-and post-medieval Groningen: the archaeobotanical evidence. *Palaeohistoria* 39: 563–576.
- Vera-Ruiz EM, Soriano JM, Romero C, Zhebentyayeva T, Teril J, Zuriaga E, Llácer G, Abbott A G and Badenes M L. 2011.** Narrowing down the apricot Plum pox virus resistance with the peach genome syntenic region. *Mol. Plant Pathol.* 12: 535–547.
- Vendramin E, Dettori MT, Giovinnazzi J, Micali S, Quarta R, Verde I. 2007.** A set of EST-SSRs isolated from peach fruit transcriptome and their transportability across *Prunus* species. *Molecular Ecology Notes* 7: 307-310.

- Verchot J, Koonin EV, Carrington JC. 1991.** The 35-kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. *Virology* 185: 527-535.
- Verde I, Abbott A, Scalabrin S, Jung S, Shu S, Marroni F, Zhebentyayeva T, Dettori M, Grimwood J, Cattanoro F, Zuccolo A, Rossini L, Jenkins J, Vendramin E, Meisel LA, Decroocq V, Goodstein DM, Xuan P, Del Fabbro C, Aramini V, Copeti D, González S, Falchi R, Lucas S, Mica E, Maldonado J, Lazzari B, Schmutz J, Morgante M, Rokhsar D. (2013)** The high-quality draft of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. *Nat Genetics* 45: 487–494.
- Viruel MA, Messeguer R, De Vicente MC, Garcia-Mas J, Puigdomenech P, Vargas F, Arús P. 1995.** A linkage map with RFLP and isozyme markers for almond. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 964-971.
- Vlot A C, Dempsey D A and Klessig D F. 2009.** Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47: 177-206.
- Wagner GP, Kin K, Lynch VJ. 2013.** A model based criterion for gene expression calls using RNA-Seq data. *Theory Biosci.* 132: 159–169.
- Wang Y, Georgi L L, Zhebentyayeva N, Reighard G L, Scorza R, and Abbott A G. 2002.** High throughput targeted SSR marker development in peach (*Prunus persica*). *Genome* 45: 319-328.
- Wang A, Chapman P, Chen L, Stobbs L W, Brown DCW, Brandle JE. 2005.** A comparative survey, by expressed sequence tag analysis, of genes expressed in peach leaves infected with Plum pox virus (PPV) and free from PPV. *Can. J. Plant Pathol.* 27: 410–419.
- Wang L, Zhao S, Gu C, Zhou Y, Zhou H, Ma J, Cheng J, and Han Y. 2013.** Deep RNA-Seq uncovers the peach transcriptome landscape. *Plant Mol. Biol.* 83: 365–377.
- Watson JD, Gann A, Baker TA, Levine M, Bell SP, Harrison SC 2014.** Molecular Biology of the gene. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA. 872 pp.
- Wei HR, Chen X, Zong XJ, Shu HR, Gao DS, Li QZ. 2015.** Comparative Transcriptome Analysis of Genes Involved in Anthocyanin Biosynthesis in the Red and Yellow Fruits of Sweet Cherry (*Prunus avium* L.). *PLOS One* 10: e0121164
- Welsh J, McClelland M. 1990.** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18: 7213-7218.
- Wetzel T, Candresse T, Ravelonandro M, Dunez J. 1991.** A polymerase chain reaction assay adapted to Plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods* 33: 355-365.
- Winter P, Kahl G. 1995.** Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11: 438-448.
- Wittmann S, Chatel H, Fortin M G, Laliberté JF. 1997.** Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic

- initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology* 234: 84–92.
- Woldring H. 2000.** On the origin of plums: a study of sloe, damson, cherry plum, domestic plums and their intermediates. *Palaeohistoria* 39: 535–562.
- Wu X, Shaw JG. 1998.** Evidence that assembly of a potyvirus begins near the 5' terminus of the viral RNA. *Journal of General Virology* 79: 1525–1529.
- Yamamoto T, Mochida K, Imai T, Shi YZ, Ogiwara I, Hayashi T. 2002.** Microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] derived from an enriched genomic and cDNA libraries. *Molecular Ecology Notes* 2: 298–301.
- Zagrai I, Capote N, Ravelonandro M, Cambra M, Zagrai L, Scorza R. 2008.** Plum pox virus silencing of C5 transgenic plums is stable under challenge inoculation with heterologous viruses. *Journal of Plant Pathology* 7: S63–S71.
- Zhebentyayeva TN, Swire-Clark G, Georgi L L, Garay L, Jung S, Forrest S, Blenda A V, Mook J, Horn R, Howad W, ArúsP, Abbott A G. 2008.** A physical framework map for peach, a model Rosaceae species. *Tree Genetics Genomes* 5: 19–23.
- Zhong W, Gao Z, Zhuang W, Shi T, Zhang Z, Ni Z. 2013.** Genome-wide expression profiles of seasonal bud dormancy at four critical stages in Japanese apricot. *Plant Molecular Biology* 83: 247–264.
- Zhu SF, Gao F, Cao XS, Chen M, Ye GY, Wei C H. 2005.** The rice dwarf virus P2 protein interacts with ent-kaurene oxidases in vivo, leading to reduced biosynthesis of gibberellins and rice dwarf. *Plant Physiology* 139: 1935–1945.
- Zhu F, Xi D H, Yuan S, Xu F, Zhang D W and Lin H H. 2014.** Salicylic acid and jasmonic acid are essential for systemic resistance against tobacco mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27: 567–577.
- Zuriaga E, Soriano J M, Zhebentyayeva T, Romero C, Dardick C, Cañizares J and Badenes ML. 2013.** Genomic analysis reveals MATH gene(s) as candidate for Plum pox virus (PPV) resistance in apricot. *Mol. Plant Pathol.* 13: 663–677.

