



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Factores Moleculares Implicados en el
Sistema de Incompatibilidad Floral en Almendro
[*Prunus dulcis* (Miller) D. A. Webb]

D^a Eva María Gómez González

2017



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



TESIS DOCTORAL

“Factores moleculares implicados en el sistema de incompatibilidad floral en almendro [*Prunus dulcis* (Miller) D.A. Webb]”

Doctoranda:

Eva María Gómez González

Directores:

Dra. Encarnación Ortega Pastor

Dr. Federico Dicenta López-Higuera

Murcia, 2017



MINISTERIO
DE ECONOMÍA, INDUSTRIA
Y COMPETITIVIDAD



D. Federico Dicenta López-Higuera, Doctor por la Universidad de Murcia y **D^a Encarnación Ortega Pastor**, Doctora por la Universidad de Murcia, ambos adscritos al Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Factores moleculares implicados en el sistema de incompatibilidad floral en almendro [Prunus dulcis (Miller) D.A. Webb**”, realizada por **D^a. Eva María Gómez González**, Licenciada en Bioquímica, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de Mejora Vegetal del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC) de Murcia. Considerando que se trata de un trabajo original de investigación que reúne los requisitos establecidos en el RD 1393/2007, de 29 de octubre, estimamos que puede ser presentado para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Murcia, 31 de Mayo de 2017

Campus Universitario de Espinardo
30100 Espinardo, Murcia. ESPAÑA
Telf. (34) 968 396200
Fax.: (34) 968 396213



Agradecimientos

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias al disfrute de la beca FPI (BES-2011-050500), asociada al proyecto “Mejora genética del Almendro” (AGL2010-22197-C02-02) financiado por Ministerio de Economía y Competitividad. Ministerio que también ha financiado las estancias breves (EEBB-I-13-06087 y EEBB-I-15-09910) realizadas en el Centro Ricerca e Innovazione de la Fondazione Edmund Mach de San Michele all'Adige (Italia).

Realizar una tesis doctoral no es el camino de rosas que crees que va a ser cuando empiezas este período que ahora termina. Es un camino arduo y pedregoso, pero que se allana cada día gracias a muchas personas, que de una u otra manera hacen que no te desvíes de la senda o que vuelvas a ella tras haberla abandonado.

En primer lugar quiero agradecer a mis directores la posibilidad de realizar este trabajo bajo su directa supervisión. Gracias Encarna por la confianza que un día depositaste en mí animándome a cruzar toda España para venir a Murcia, todo empezó en ese momento. Gracias también por todo el apoyo recibido durante estos años, por los consejos y por todo lo que he aprendido de ti. Gracias por tus halagos y palabras de ánimo, siempre eran y serán bien recibidos. Gracias Federico por haberme permitido formar parte del Grupo de Mejora Genética de Frutales, no hubiera sido posible si no hubieras apostado por mí. Gracias por todo lo que me has enseñado y por los momentos en que cuestionabas cada resultado obtenido, tus reflexiones me hacían pensar y sentir que podía llegar lejos en la investigación. Gracias también por la ayuda recibida en este último período, sin ella no habría sido posible llegar a este punto.

Gracias a todo el Grupo de Mejora, he encontrado en vosotros el apoyo necesario en cada momento. Pepe, tu sabiduría ha calado hondo en mí. David, tu alegría, buen humor, compañía y albaricoques me han sacado más de una sonrisa. Pedro gracias por estar siempre dispuesto a ayudarme y compartir tus conocimientos conmigo, esto ha permitido resolver muchas cuestiones con facilidad. Bea, Jesús, gracias por tener siempre una palabra de ánimo. Alberto, el último en llegar al grupo pero pisando fuerte, gracias por hacerme reír cada día y “gracias por dejarme involuntariamente tu sitio durante este último periodo”. Me pediste que te agradeciera esto, pero siento decirte que ese sitio fue mío antes que tuyo, por tanto tienes que agradecerme tú a mí el haberlo ocupado.

Gracias Jorge, gracias Juan, me acogisteis como a una más en el grupo, me integrasteis en él y pasasteis a ser amigos más que compañeros. Gracias por el tiempo compartido.

Gracias Manolo por haberme dejado formar parte de momentos importantes de tu vida y gracias por todo el apoyo, la ayuda y los conocimientos transmitidos (muchos, aunque digas que no), nunca olvidaré todo lo aprendido de ti. Como tampoco olvidaré tus primeras palabras: “aquí llegas como una niña mimada”, gracias por mimarme a partir de ese momento tú también, por lo menos yo lo he sentido así.

Gracias Tere, ¿qué decir de ti? fuiste todo cuando llegué y lo has seguido siendo hasta ahora, incluso durante tu ausencia. Gracias por tu ayuda en el laboratorio, aprendí mucho contigo. Gracias por el trato recibido, por tus confianzas, por ser como eres y por tu entusiasmo al saber que volvía (me hizo muy feliz). Me llevo una gran amiga y una gran decoradora de interiores.

Gracias Eli, gracias Ángela, tardasteis en llegar pero mereció la pena. Encontré en vosotras unas amigas increíbles. Gracias por hacer más ameno el trabajo de laboratorio y gracias por el tiempo invertido juntas fuera del CEBAS. Gracias Eli, tu ayuda en el laboratorio fue muy necesaria y tu apoyo fuera de él inmejorable. Gracias Ángela por tu ayuda en este último periodo, por haberme acogido en tu casa, permitirme disfrutar del pequeño Marcos y tratarme como una más de tu familia.

Gracias a “esas manitas” y a mis niñas del CEBAS, a lo largo de estos años han pasado muchas por el grupo aunque ahora pocas perduramos. Gracias Pepa, Mariajo, Ana, Anais, Rocío, Elena, Gema, Sara, Chu, Irene y Ana, pasamos bonitos momentos juntas.

Gracias también a todos los que por no extenderme demasiado no voy a enumerar aquí, vosotros sabéis quienes sois, y todos habéis hecho mi estancia en el CEBAS más agradable y fácil.

Gracias a todos los amigos que dejé lejos al empezar este camino, habéis suplido vuestra ausencia recargando mis pilas cada vez que he vuelto a casa.

Gracias Miguel, porque este tiempo ha sido duro, pero hemos conseguido sobrellevar la distancia. Gracias por tu apoyo y paciencia, han sido necesarios en muchos momentos.

Y gracias familia, lo sois todo para mí. Mamá, papá, sin vosotros nunca habría llegado aquí, gracias a vuestro sacrificio pude estudiar lo que quería y venir a Murcia a continuar con mis sueños. Gracias por apoyarme siempre y dejarme volar, así he crecido un poquito más cada día. Gracias hermana, ¿qué sería de mí sin ti? Sin tu ayuda nada en mi vida habría sido igual, gracias por hacerme fácil el camino cada día. Los tres sois el mejor ejemplo que puedo seguir.



A mi familia

*"The rose is a rose,
And was always a rose.
But the theory now goes
That the apple's a rose,
And the pear is, and so's
The plum, I suppose.
The dear only knows
What will next prove a rose.
You, of course, are a rose -
But were always a rose."*

Robert Frost and the Challenge of Darwin de Robert Faggen

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
1. Introducción.	1
1.1. El almendro.	3
1.1.1. Clasificación taxonómica y características botánicas del almendro.	3
1.1.2. Origen y expansión del almendro.	5
1.1.3. Distribución e importancia económica del cultivo.	7
1.1.4. Problemática en la producción del almendro.	10
1.1.5. Mejora genética del almendro.	11
1.1.6. Futuro del almendro en España.	15
1.2. Incompatibilidad floral.	16
1.2.1. Incompatibilidad gametofítica basada en RNasas-S: genes implicados.	19
1.2.2. Funcionamiento del sistema gametofítico: modelos teóricos propuestos.	25
1.2.3. Incompatibilidad floral en el almendro.	29
1.2.4. Origen e importancia de la autocompatibilidad en el almendro.	34
1.3. Objetivos.	36
2. Material vegetal.	37
2.1. Variedades de almendro.	40
2.2. Selecciones de almendro.	41
2.3. Descendencias.	42
3. Metodología.	43
3.1. Determinación del fenotipo de incompatibilidad.	45
3.1.1. Polinización manual en campo.	45
3.1.2. Embolsado.	48
3.1.3. Determinación del cuajado de frutos.	48
3.1.4. Observación del crecimiento de los tubos polínicos mediante microscopía de fluorescencia.	51
3.2. Identificación del genotipo de incompatibilidad y actividad ribonucleasa.	51
3.2.1. Isoelectroenfoque de proteínas estilares.	52
3.2.2. PCR y electroforesis horizontal en geles de agarosa.	54
3.3. Determinación de la relación filogenética mediante marcadores tipo SSR.	57
3.4. Caracterización molecular del Locus <i>S_f</i>.	57
3.4.1. PCR inversa.	58
3.4.2. PCR de alta fidelidad.	61
3.4.3. Purificación de los productos de PCR.	63
3.4.4. Clonación.	63
3.4.5. Identificación de recombinantes positivos.	64

3.4.6.	Extracción y restricción de plásmidos.	65
3.4.7.	Secuenciación de plásmidos y análisis de secuencias.	65
3.5.	Caracterización transcriptómica del sistema de incompatibilidad.	66
3.5.1.	Extracción de ARN.	66
3.5.2.	Detección de la expresión de la RNasa <i>S_f</i> mediante RT-PCR.	67
3.5.3.	Secuenciación de ARN.	68
3.5.4.	Análisis de la expresión diferencial de transcritos de ARN.	69
3.5.5.	Validación de los datos de secuenciación de ARN mediante qPCR.	70
3.6.	Caracterización proteica del sistema de incompatibilidad.	71
3.6.1.	Extracción de proteínas de polen y pistilos.	72
3.6.2.	Análisis iTRAQ-LC-ESI-MSMS.	73
3.6.3.	Pseudo monitorización de reacción múltiple	77
4.	Caracterización <i>in vivo</i> del haplotipo <i>S_f</i>	79
4.1.	Introducción.	81
4.2.	Material vegetal y metodología.	82
4.2.1.	Material vegetal.	84
4.2.2.	Determinación del fenotipo de incompatibilidad.	85
4.2.3.	Determinación del genotipo S de los descendientes.	86
4.2.4.	Verificación del pedigrí mediante el uso de marcadores moleculares SSR.	87
4.2.5.	Isoelectroenfoque de proteínas estilares y tinción para actividad RNasa.	87
4.3.	Resultados	88
4.3.1.	Determinación del fenotipo de incompatibilidad.	88
4.3.2.	Determinación del genotipo S de los descendientes.	89
4.3.3.	Verificación del pedigrí mediante el uso de marcadores moleculares SSR.	93
4.3.4.	Isoelectroenfoque de proteínas estilares y tinción para actividad RNasa	93
4.4.	Discusión.	95
4.4.1.	Determinación del fenotipo de incompatibilidad	95
4.4.2.	Determinación del genotipo S de los descendientes	96
4.4.3.	Isoelectroenfoque de proteínas estilares y tinción para actividad RNasa	98
4.5.	Conclusiones.	98
5.	Caracterización molecular del <i>Locus-S_f</i>	101
5.1.	Introducción	103
5.2.	Material vegetal y metodología	104
5.2.1.	Material vegetal	105
5.2.2.	PCR inversa	105
5.2.3.	PCR de alta fidelidad	106
5.2.4.	Clonación y extracción de plásmidos	107
5.2.5.	Secuenciación y análisis de secuencias	108

5.2.6. Detección de la transcripción mediante RT-PCR	108
5.2.7. Cuantificación de los transcritos mediante qPCR	110
5.3. Resultados	110
5.3.1. Secuenciación de la <i>ARNasa-S_f</i> de la selección A2-198	111
5.3.2. Secuenciación del promotor de la <i>ARNasa-S_f</i> y <i>ARNasa-S_{fa}</i>	111
5.3.3. Secuenciación de la región intergénica <i>ARNasa-S_f/SFB_f</i>	112
5.3.4. Detección de los transcritos del <i>locus S_f</i>	118
5.3.5. Cuantificación de los transcritos del <i>locus S_f</i>	120
5.4. Discusión.	122
5.4.1. Secuenciación de la <i>ARNasa-S_f</i>	122
5.4.2. Secuenciación del promotor de la <i>ARNasa-S_f</i>	123
5.4.3. Secuenciación de la región intergénica <i>ARNasa-S_f/SFB_f</i>	125
5.4.4. Detección y cuantificación de los transcritos del <i>locus S_f</i>	127
5.5. Conclusiones.	130
6. Transcriptómica cuantitativa de pistilos con haplotipo <i>S_f</i>	131
6.1. Introducción.	133
6.2. Material vegetal y metodología.	134
6.2.1. Material vegetal	134
6.2.2. Extracción de ARN	135
6.2.3. Secuenciación de ARN	135
6.2.4. Análisis de la expresión diferencial de transcritos de ARN	136
6.2.5. Validación de los datos de secuenciación de ARN mediante qPCR	137
6.3. Resultados.	138
6.3.1. Análisis de los resultados de secuenciación	138
6.3.2. Identificación de los genes expresados diferencialmente, clasificación y anotación funcional	139
6.3.3. Genes candidatos implicados en el sistema de incompatibilidad y análisis de expresión mediante qPCR	140
6.4. Discusión	144
6.4.1. Análisis de los resultados de secuenciación	144
6.4.2. Expresión diferencial, clasificación y anotación funcional	145
6.4.3. Genes candidatos implicados en el sistema de incompatibilidad y análisis de expresión mediante qPCR	146
6.5. Conclusiones	150
7. Análisis proteómico cuantitativo en pistilos y anteras de almendros con el haplotipo <i>S_f</i>	153
7.1. Introducción.	155
7.2. Material vegetal y metodología.	155

7.2.1. Material vegetal.	157
7.2.2. Diseño experimental.	157
7.2.3. Extracción y cuantificación de proteínas.	158
7.2.4. Análisis de la expresión de proteínas mediante marcaje isobárico diferencial (iTRAQ).	159
7.2.5. Pseudo-Monitorización de reacción múltiple (MRM).	160
7.3. Resultados	160
7.3.1. iTRAQ de pistilos no polinizados y de anteras.	160
7.3.2. iTRAQ de pistilos polinizados.	162
7.3.3. Pseudo-Monitorización de reacción múltiple (MRM).	172
7.4. Discusión.	172
7.4.1. Clasificación funcional de las proteínas identificadas.	172
7.4.2. Localización genómica de las proteínas identificadas.	173
7.4.3. Proteínas expresadas diferencialmente.	174
7.4.4. Análisis MRM	178
7.5. Conclusiones.	179
8. Conclusiones generales.	181
9. Referencias bibliográficas	187
10. Anexos.	213

ÍNDICE FIGURAS

	Pág.
1. Introducción.	
1.1. Producción mundial de almendra en grano de los principales países productores durante la campaña 2015-2016 (INC 2016). Bajo la etiqueta Resto se engloba el resto de países productores, siendo los más importantes Irán, Túnez, Chile, Turquía, Marruecos, Italia y Grecia.	8
1.2. Producción española de almendra en grano de las mayores comunidades productoras 2012-2015 y producción estimada 2016* (Cooperativas Agro-alimentarias 2016).	9
1.3. Representación esquemática de la estructura de la <i>ARNasa-S</i> en <i>Prunus</i> . Cada región aparece representada con un cuadro coloreado y sus siglas en el interior. PS: péptido señal, C1-C5 y RC4: regiones conservadas, y RHV: región hipervariable. Las flechas indican la posición de los dos intrones presentes: el primero al finalizar el péptido señal y el segundo en la región hipervariable.	20
1.4. Representación esquemática de la estructura del <i>SFB</i> en <i>Prunus</i> . Cada región aparece representada con un cuadro coloreado y sus siglas en el interior. F-Box: motivo F-Box, V1-V2: regiones variables, y HVa/HVb: regiones hipervariables.	22
1.5. Primeros modelos de incompatibilidad: Modelo del receptor (a) y modelo del inhibidor (b). En cada modelo se representa una reacción compatible y una in-compatible, indicándose además las principales moléculas necesarias para su funcionamiento.	26
1.6. Modelos de degradación (a) y compartimentación (b). En cada modelo se representa una reacción compatible y una in-compatible, indicándose además las principales moléculas necesarias para su funcionamiento.	28
2. Material vegetal.	
2.1. Vista aérea de las parcelas experimentales (delimitadas en color amarillo), situadas en la Finca Tres Caminos (Santomera, Murcia). A. Parcelas con variedades de almendro, selecciones y descendientes de almendro en distinta fase de selección. B. Parcelas con descendencias de almendro obtenidas más recientemente, en una fase de selección inicial.	39
3. Metodología.	
3.1. Estados fenológicos del almendro según Felipe (1977). Aparecen los estados intermedios C-D y D-E, en este último fue cuando se tomaron las muestras para la realización de los distintos análisis.	46
3.2. Polinización controlada en campo. a) Detalle de la emasculación del botón floral. b) Pistilo emasculado. c) Polinización controlada realizada con la ayuda de un pincel.	47

3.3. Embolsado de ramas para la determinación del cuajado de los frutos. a) Momento del embolsado de la rama donde se aprecian botones florales b) Se observan las flores ya abiertas en el interior de la bolsa c) Momento de la retirada de la bolsa donde se aprecia en su interior algún fruto procedente de autopolinización.	48
3.4. Polinización controlada en laboratorio. a) Pistilos sobre espuma floral húmeda en bandeja con agua. b) Detalle de un pistilo tras ser polinizado, se aprecia como el estigma tiene un color amarillento debido al polen. c) Pistilo desprovisto del cáliz listo para ser procesado o conservado.	49
3.5. Esquema de una flor de almendro y observación del avance de los tubos polínicos en un pistilo polinizado, los cuales son visualizados gracias a la tinción de los depósitos de calosa que se producen durante el crecimiento del tubo polínico y que emiten fluorescencia al ser iluminados con luz ultravioleta. a) Crecimiento de los tubos polínicos en el estigma. b) Tubos polínicos en el segundo tercio del estilo. c) Detalle de los tubos polínicos en el ovario, tras una polinización compatible.	51
3.6. Procedimiento esquemático de la PCR inversa basado en la descripción de Ochman y col. 1988. La región conocida (<i>RNasa S_f</i>) se representa mediante un rectángulo rosado y la zona flanqueante (Promotor) no conocida mediante un rectángulo azul. El ADN es digerido con una enzima de restricción (los puntos de corte de la enzima se esquematizan con triángulos), posteriormente los fragmentos son “circularizados” con una ADN-ligasa que favorece la formación de círculos monoméricos. Estos fragmentos se amplifican mediante PCR, gracias a los cebadores complementarios a la RNasa, indicados en la figura con flechas verdes.	59
3.7. Esquema de la identificación y cuantificación de proteínas mediante análisis iTRAQ-LC-ESI-MSMS.	74
4. Caracterización <i>in vivo</i> del haplotipo <i>S_f</i>	
4.1. Ascendencia de las selecciones homocigóticas auto-compatibles (<i>S_fS_f</i>) obtenidas en el programa de mejora del CEBAS-CSIC. Los genotipos aparecen coloreados en función del parental para facilitar la observación del origen de los alelos <i>S_f</i> de las selecciones.	84
4.2. Genotipo <i>S</i> de las selecciones D05-187 e ITAP-1 y su descendencia mediante polinización directa. Los indicadores superiores corresponden a: M, Marcador de peso molecular 1Kb+ DNA Ladder (Invitrogen); 1, D05-187 (<i>S_fS_f</i>); 2, ITAP-1 (<i>S₁₁S_f</i>); 3-15 descendencia.	89
4.3. Zimograma correspondiente al IEF de proteínas estilares, tras tinción para actividad RNasa, de las selecciones ITAP-1 y A2-198, junto con las dos	94

variedades de referencia, para los alelos S11 y S12, Del Cid y Marcona.

5. Caracterización molecular del *Locus-Sf*

5.1. Esquema de la estructura genómica de la parte caracterizada del *locus-Sf* de almendro. Se indican los tamaños (pb) de las zonas secuenciadas en esta tesis y la orientación de la *ARNasa-S_f*, del *SFB_f* y del ORF identificado en la región intergénica *ARNasa-S_f/SFB_f*. 111

5.2. Secuencia correspondiente a la región promotora de la *ARNasa-Sf*, *ARNasa Sf* y región intergénica *ARNasa Sf/SFBf* de la selección A2-198. Cada zona aparece coloreada de un modo diferente: promotor (gris), regiones 5' y 3' UTR de la *ARNasa-Sf* (azul) y *ARNasa-Sf* (negro), región intergénica (verde). Promotor: Las zonas sombreadas corresponden a sus elementos característicos. *ARNasa-Sf* : Las zonas sombreadas corresponden a sus motivos conservados. Las bases donde se localiza el inicio de la transcripción (IT) aparecen subrayadas. Con +1 se indica el punto de inicio de la traducción. El final de la traducción se marca con un asterisco (*). 114

5.3. Secuencia correspondiente a región intergénica *ARNasa-S_f/SFB_f* de la selección A2-198. Las bases sombreadas en negro corresponden a la inserción de timinas, no presentes en el resto de material analizado. La amplia región sombreada en verde corresponde al ORF y las bases coloreadas anteriores a esta zona corresponden a elementos característicos de los promotores. Las bases donde se localiza el inicio de la transcripción (IT) aparecen subrayadas. Con +1 se indica el punto inicio de la traducción. El final de la traducción se marca con asterisco (*). 115

5.4. Alineación de la región intergénica *ARNasa-S_f/SFB_f* de A2-198, Tuono, ITAP-1 y Vivot, donde se observan diferencias entre el material auto-compatible y el incompatible. La zona encuadrada en rojo podría ser la responsable de la diferencia de fenotipo observada entre la *ARNasa S_f* y el *S_{fa}*. 116

5.5. P Productos obtenidos mediante RT-PCR para la *ARNasa-S_f* y la *ARNasa-S_{fa}* con los cebadores específicos S_fC2-F2 y S_fC3-R2. 118

5.6. Productos obtenidos mediante RT-PCR para el ORF de la región intergénica *ARNasa-S_f/SFB_f* en pistilos no polinizados de las selecciones A2-198 (A) e ITAP-1 (I) y en pistilos polinizados correspondientes a los cruzamientos A2-198×A2-198 (A×A) e ITAP-1×A2-198 (I×A). 119

5.7. Cuantificación de la expresión de la *ARNasa-S_f* y *ARNasa-S_{fa}* en pistilos sin polinizar de las selecciones A2-198 (A) e ITAP-1 (I) y en pistilos polinizados de los cruzamientos A2-198×A2-198 (A×A) e ITAP-1×A2-198 (I×A). 120

5.8. Cuantificación de la expresión del *SFB_f* en pistilos sin polinizar de las selecciones A2-198 (A) e ITAP-1 (I) y en pistilos polinizados de los 121

cruzamientos A2-198xA2-198 (AxA) e ITAP-1xA2-198 (IxA).

5.9. Cuantificación de la expresión del ORF de la región intergénica *ARNasa-S_f/SFB_f* en pistilos sin polinizar de las selecciones A2-198 (A) e ITAP-1 (I) y en pistilos polinizados de los cruzamientos A2-198xA2-198 (AxA) e ITAP-1xA2-198 (IxA).

122

6. Análisis transcriptómico de pistilos con haplotipo S_f

6.1. Ontología genética de los genes expresados diferencialmente en cada condición. De dentro a fuera los círculos concéntricos representan comparación de pistilos sin polinizar (A2-198 *versus* ITAP-1), comparación pistilo sin polinizar frente a polinización compatible (A2-198 *versus* A2-198xA2-198), comparación pistilo sin polinizar frente a polinización incompatible (ITAP-1 *versus* ITAP-1xA2-198); comparación polinización compatible frente a polinización incompatible (A2-198xA2-198 *versus* ITAP-1xA2-198). **a)** Distribución en base a los componentes celulares. **b)** Distribución en base a la función molecular. **c)** Distribución en base al proceso biológico.

141

6.2. Validación del análisis de RNAseq mediante qPCR. Se muestran los valores relativos de expresión mediante qPCR en el eje principal (valores representados con las barras) junto con los valores normalizados obtenidos del análisis de la expresión de los datos de secuenciación con el programa DESeq package en el eje secundario (valores representados con la línea) para cada condición. A: pistilos sin polinizar de A2-198, I: pistilos sin polinizar de ITAP-1, AxA: Auto-polinización de A2-198 e IxA: Polinización de ITAP-1 con A2-198.

142

7. Análisis proteómico cuantitativo en pistilos y anteras de almendros con el haplotipo S_f

7.1. Clasificación funcional de las proteínas expresadas diferencialmente en pistilos (A) y anteras (B) de A2-198 (auto-compatible, AC) e ITAP-1 (auto-incompatible, AiC). Las figuras de la derecha indican el número de proteínas que aparecen sobre-expresadas o reprimidas en A2-198 en cada grupo funcional.

162

7.2. Clasificación funcional de las proteínas expresadas diferencialmente en pistilos A2-198 (auto-compatible, AC) e ITAP-1 (auto-incompatible, AiC). La figura de la derecha indica el número de proteínas que aparecen sobre-expresadas o reprimidas en A2-198 en cada grupo funcional

167

7.3. Clasificación funcional de las proteínas expresadas diferencialmente en pistilos polinizados (A) A2-198 x A2-198 (auto-polinización compatible) y (B) ITAP-1 x A2-198 (polinización incompatible) frente a sus homólogos no polinizados A2-198 e ITAP-1. Las figuras de la derecha indican el número de proteínas que aparecen sobre-expresadas o reprimidas en las polinizaciones

168

en cada grupo funcional.

7.4. Clasificación funcional de las proteínas expresadas diferencialmente tras una polinización compatible, A2-198 x A2-198 frente a una incompatible, ITAP-1 x A2-198. 170

7.5. Porcentaje de proteínas sobre-expresadas en A2-198 x A2-198 (polinización compatible) e ITAP-1xA2-198 (polinización incompatible) clasificadas en base a la posible función que desempeñan. 171

ÍNDICE TABLAS

	Pág.
1. Introducción.	
1.1. Tabla resumen de grupos de incompatibilidad de variedades de almendro.	32
2. Material vegetal.	
2.1. Descendencias estudiadas, año de plantación y árboles obtenidos.	42
4. Caracterización fenotípica del haplotipo <i>S_f</i>	
4.1. Cruzamientos realizados para la determinación de las relaciones de incompatibilidad en el material estudiado.	83
4.2. Observación de pistilos polinizados mediante microscopía de fluorescencia 96 horas después de polinizarlos. Las letras A-J se corresponden con cada pistilo analizado, y las cifras 0-4 hacen referencia a la parte del pistilo que alcanza el tubo polínico (0: estigma; 1: primer tercio del estilo; 2: segundo tercio del estilo; 3: tercer tercio del estilo; 4: ovario). Con un guion (-) ausencia de polen en el estigma.	90
4.3. Estudio del fenotipo de incompatibilidad mediante polinización controlada en campo. Se indica para ello el número de flores polinizadas, los frutos a los 60 días tras la polinización y porcentaje de frutos cuajados en este tiempo.	91
4.4. Segregación del genotipo <i>S</i> en las descendencias estudiadas y análisis Chi-cuadrado (χ^2).	92
4.5. Análisis de marcadores SSR en Marta, ITAP-1 y seis de sus descendientes elegidos al azar (D1-D6).	93
5. Caracterización molecular del locus-<i>S_f</i>	
5.1. Descripción de algunos elementos <i>cis</i> localizados en la región promotora de la <i>ARNasa-S_f</i> .	113
5.2. Descripción de algunos elementos <i>cis</i> localizados en la región promotora del ORF localizado en la región intergénica la <i>ARNasa-S_f/SFB_f</i> .	117
6. Análisis proteómico cuantitativo en pistilos y anteras de almendros con el haplotipo <i>S_f</i>	
6.1. Estadísticos de las lecturas obtenidas y de su mapeo frente al genoma del melocotonero <i>Prunus pérsica</i> v 1.0.	138

<p>6.2. Genes expresados diferencialmente en el estudio de transcriptómica diferencial del RNAseq. Para cada condición se indica el número total de genes, si se encuentran sobre-expresados o no y los transcritos que comparten con cada una de las otras condiciones analizadas.</p>	140
<p>6.3. Genes expresados diferencialmente en el estudio de transcriptómica diferencial del RNAseq que han sido analizados mediante qPCR. Para cada uno de ellos se indica la localización, la descripción de la secuencia y los estadísticos de la alineación frente al genoma del melocotonero.</p>	144
<p>7. Análisis proteómico cuantitativo en pistilos y anteras de almendros con el haplotipo S_r</p>	
<p>7.1. Disposición de las muestras analizadas en cada experimento iTRAQ. Se indica el marcaje con el reactivo iTRAQ-4-plex[®] para cada tratamiento, lo que permite establecer las comparaciones. Los tratamientos de cada cruzamiento corresponden con el análisis de las anteras y pistilos no polinizados de cada selección y con los pistilos polinizados de ITAP-1 y A2-198 con A2-198.</p>	159
<p>7.2. Proteínas expresadas diferencialmente en los dos experimentos, agrupadas según su función. Las proteínas reprimidas en la primera condición de cada comparación aparecen sombreadas en rojo, y las sobre-expresadas en verde. Cada accesión proteica se encuentra relacionada con la descripción de la proteína (según la base de datos UniProtKB/SwissProt) y su localización en el genoma del melocotonero (<i>Prunus persica</i> Whole Genome v1.0).</p>	163



1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL ALMENDRO

El almendro es un cultivo emblemático en la agricultura española, siendo el segundo cultivo frutal en extensión después del olivar. Tradicionalmente se ha implantado en terrenos marginales, siendo cultivado en régimen de secano. Sin embargo, en los últimos años se ha establecido en España un elevado número de plantaciones de almendro, la mayoría de ellas bajo régimen de regadío, obteniéndose importantes producciones gracias a las buenas prácticas en el manejo del cultivo y a la introducción de nuevas variedades mejor adaptadas a las condiciones climatológicas en cada zona. En este nuevo contexto del cultivo del almendro es necesario incidir en las actividades de investigación, experimentación y transferencia que permitan obtener variedades mejoradas, que incrementen la productividad y la calidad del producto y así consolidar las nuevas plantaciones en riego como una alternativa de cultivo de alta rentabilidad.

1.1.1. Clasificación taxonómica y características botánicas del almendro

El almendro cultivado se clasifica taxonómicamente de la siguiente forma:

Reino: *Plantae*

División: *Tracheophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Rosales*

Familia: *Rosaceae*

Subfamilia: *Prunoideae*

Género: *Prunus* L.

Subgénero: *Amygdalus* (L.) Focke

La denominación actual de esta especie es [*Prunus dulcis* (Miller) D.A. Webb], la cual fue propuesta en 1964 por el Comité General de Nomenclatura Botánica ante la gran diversidad de denominaciones y clasificaciones asignadas hasta esa fecha por distintos autores (Linnaeus, 1753; Webb, 1967; Batsch, 1801; Archangeli, 1882). Son aceptados como sinónimos de la denominación principal: *Prunus amygdalus* (Batsch) y [*Prunus communis* (L.) Archangeli] (Punt, 1964).

El almendro es un árbol de hoja caduca, porte erecto o abierto, madera dura y corteza oscura y agrietada, cuyo tamaño varía en función de la variedad de que se trate, el medio y las técnicas de cultivo. Presenta hojas oblongas y aserradas y flores aisladas o agrupadas, cuya pigmentación va del blanco al rosa en función de la variedad. Su fruto, la almendra, cuya parte comestible es la semilla, posee forma más o menos ovalada, en función de la variedad, con una leve punta y se clasifica botánicamente como una drupa de exocarpo (epidermis) veloso, mesocarpo (corteza, pellarza) carnosos pero finos y endocarpo (cáscara) endurecido. El mesocarpo presenta un crecimiento limitado, volviéndose seco, correoso y dehiscente cuando la fruta está madura. Por su parte, la dureza del endocarpo maduro varía en función del genotipo.

La almendra posee la mayor densidad de nutrientes de todos los frutos secos. Es una excelente fuente de ácidos grasos esenciales (mayormente monoinsaturados, suponiendo el ácido oleico el 70%), vitaminas (ácido fólico y vitamina E principalmente), minerales (siendo los más abundantes el potasio, fósforo, calcio y magnesio) y fibra. Debido a su gran calidad nutritiva, su consumo se asocia a la prevención de enfermedades de corazón, de algunos tipos de cáncer y la formación de cataratas (Gradziel y Martínez-Gómez, 2013).

1.1.2. Origen y expansión del almendro

Son varias las teorías que se han propuesto en cuanto al origen del almendro cultivado, generando con ello gran controversia en este sentido. Aunque, en general, el origen se sitúa en las regiones montañosas de Asia Central, hay divergencia de opiniones sobre su filogenia. Numerosos botánicos rusos propusieron la teoría de la evolución de especies frutales cultivadas a partir de ancestros silvestres, estableciendo que el almendro cultivado surgió a partir de dos poblaciones naturales con individuos de semilla dulce localizadas en la cordillera Kobet Dag (situada entre lo que hoy es Irán y Turkmenistán), y en las faldas de las montañas de Tian Shan (entre la actual Kirguistán y el oeste de China) (Vavilov, 1930; Denisov, 1988; Kester y col., 1991). El área de distribución natural habría tenido lugar entonces a través de las zonas del cultivo inicial, desapareciendo gradualmente la distinción entre la forma cultivada y silvestre del almendro.

Según otros autores, el almendro cultivado procede de hibridaciones naturales entre las especies silvestres *Prunus fenzliana* Fritsch, *Prunus bucharica* Korschinsky, y *Prunus kuramica* Korschinsky (Evreinoff, 1958; Wilsie, 1966; Grasselly, 1976; Kester y col., 1991). Posteriormente Ladizinsky (1999) indicó que sólo *P. fenzliana* Fritsch sería la especie a partir de la cual se originó el almendro. Sin embargo, aunque el uso de marcadores moleculares en estudios filogenéticos ha corroborado esta teoría en algún caso (Zeinalabedini y col., 2010), en los últimos años ha aparecido un consenso general que considera como especie inicial a *P. fenzliana*, pero con contribuciones a través de hibridaciones interespecíficas que incluirían a *P. bucharica*, *P. kuramica*, y *P. triloba* (Gradziel, 2011; Zeinalabedini y col., 2010; Fernández i Martí y col., 2015).

La proximidad de estas poblaciones naturales de almendros a los centros de civilización hizo posible su cultivo y posterior distribución desde estos centros primarios de expansión. La dispersión posterior tuvo lugar en tres

etapas: asiática, mediterránea y californiana (Grasselly, 1976; Kester y col., 1991; Kester y Gradziel, 1996):

- La etapa asiática incluye todo el proceso de domesticación inicial y la posterior difusión a través de Asia central y sudoccidental gracias a las principales rutas comerciales. En la literatura hebrea hay datos de almendras en el 2000 a. C.
- Durante la etapa mediterránea los navegantes griegos, fenicios y romanos distribuyeron el cultivo a partir de su llegada a Grecia (200-300 a. C.) por toda la cuenca Mediterránea. Dos mil años de cultivo continuo en zonas geográficas distintas y aisladas han derivado en la formación de ecotipos que han evolucionado de manera natural y dirigida hacia lo que ahora son variedades bien adaptadas a cada región.
- La etapa californiana comenzó a mediados del siglo XVIII como una extensión del cultivo mediterráneo, utilizando un germoplasma de cáscara dura llevado desde España en las primeras misiones. Sin embargo, no fue hasta el siglo XIX cuando se introdujeron los primeros injertos y semillas de variedades de cáscara blanda procedentes del Languedoc francés (Kester y col., 1990; Gradziel y Kester, 1996), que conforman las bases del cultivo actual. Nonpareil es la variedad de almendro que más se cultiva actualmente en California, y además es utilizada como genitor en los programas de mejora californianos, lo que deriva en la principal característica de estos cultivos, su cáscara blanda. Durante la primera mitad del siglo XIX el almendro fue llevado a regiones de Australia y coincidiendo con el cambio de siglo a Sudáfrica y Sudamérica (Argentina y Chile principalmente), cultivándose en zonas de clima mediterráneo y con variedades y sistemas de producción californianos (Gradziel, 2011). A mediados del siglo XX la práctica del injerto se generalizó en los países mediterráneos y en California, lo que produjo una estabilización del

material vegetal mediante la multiplicación de numerosas variedades locales. Muchas de las cuales constituyen el material de partida para los diferentes programas de mejora de esta especie.

1.1.3. Distribución e importancia económica del cultivo

El almendro cultivado presenta una gran capacidad de adaptación a ambientes muy diversos, estando presente en todos los países de la cuenca mediterránea y oriente próximo, así como en otras zonas de clima mediterráneo como California, Argentina, Chile, Sudáfrica y Australia.

Superficie y producción mundial

La superficie mundial dedicada al cultivo del almendro en 2014, según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2017), fue estimada en 1 732 099 ha, de las cuales prácticamente el 75% se encuentra repartido entre España (527 058 ha), Estados Unidos de América (EEUU) (352 077 ha), Túnez (194 620 ha) y Marruecos (159 100 ha).

La Figura 1.1 muestra la producción de almendra grano a nivel mundial en la campaña 2015-2016 (INC 2016). El mayor productor fue EEUU con 859 000 t (79%) seguido de Australia 85 000 t (8%) y de España 66 000 t (6%).

Teniendo en cuenta estos datos de superficie y producción podemos observar que una mayor superficie de cultivo no se correlaciona siempre con una mayor producción. Esto es debido a que la productividad por hectárea es mucho mayor (hasta 20 veces) en EEUU y Australia (2000 kg grano/ha) que en España (unos 100 kg de grano/ha). Estas enormes diferencias de productividad se deben fundamentalmente a que las plantaciones americanas y australianas se cultivan

en regadío y con un elevado grado de tecnificación, mientras que en España, la mayor parte del cultivo es en secano.

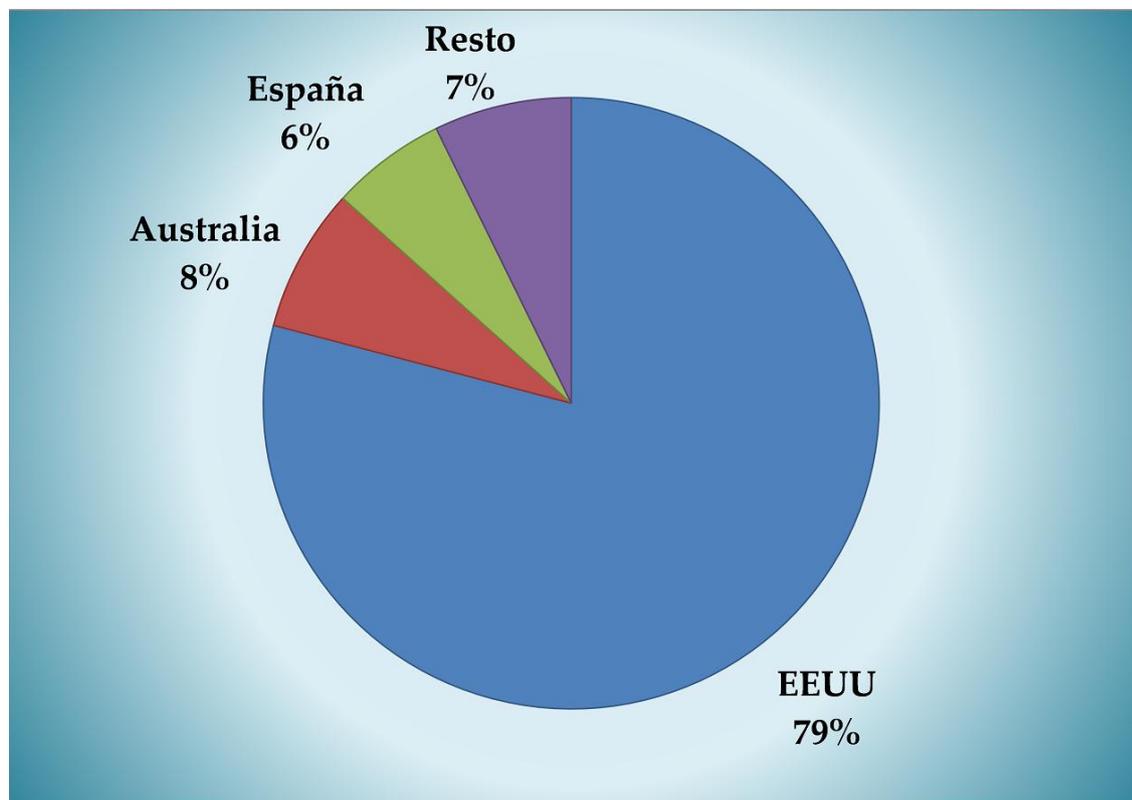


Figura 1.1. Producción mundial de almendra en grano de los principales países productores durante la campaña 2015-2016 (INC 2016). Bajo la etiqueta Resto se engloba el resto de países productores, siendo los más importantes Irán, Túnez, Chile, Turquía, Marruecos, Italia y Grecia.

Superficie y producción española

Según el anuario del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente 2015, la superficie de almendro en 2014 en España era de 527 029 ha, siendo Andalucía (156 510 ha) la comunidad autónoma con mayor superficie cultivada, seguida de la Comunidad Valenciana (96 492 ha), Aragón (66 424 ha) y la Región de Murcia (63 831 ha).

La producción española se concentra principalmente en la región mediterránea (Andalucía, Baleares, Cataluña, Comunidad Valenciana y Murcia),

Aragón y Castilla la Mancha. La producción nacional de almendra en grano en 2015, según Cooperativas Agroalimentarias (CCAA), fue de 52 319 t. La comunidad que más producción tuvo en ese año fue Andalucía (13 330 t), seguida de Aragón (12 848 t), y Castilla la Mancha (7662 t) (Figura 1.2).

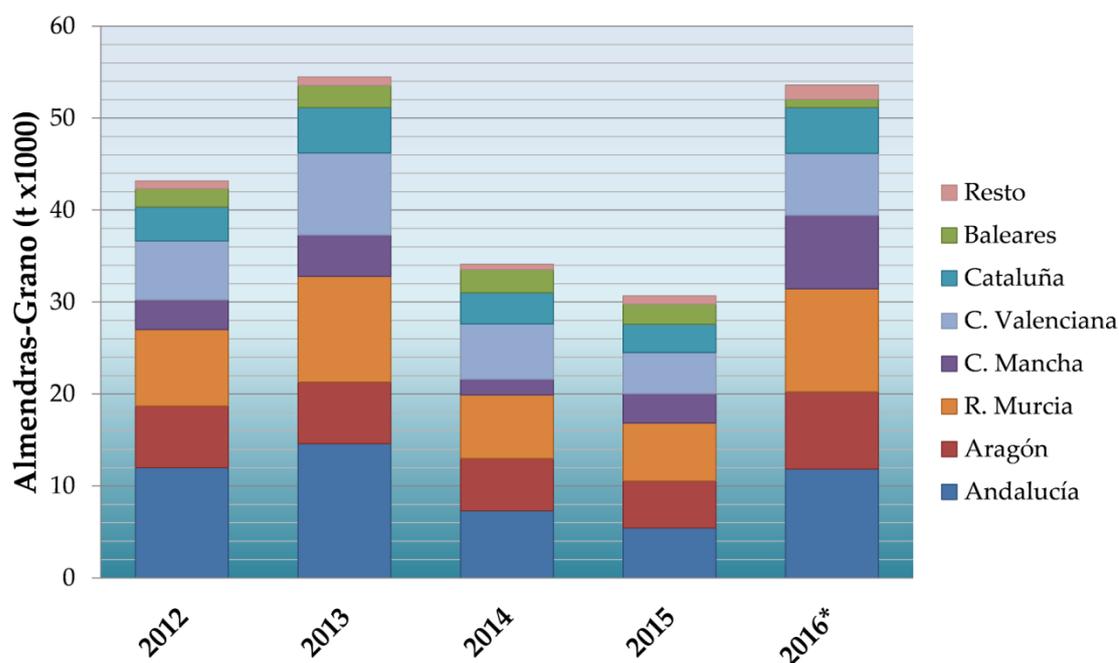


Figura 1.2. Producción española de almendra en grano de las mayores comunidades productoras 2012-2015 y producción estimada 2016* (Cooperativas Agro-alimentarias 2016).

La producción anual ha sido muy variable a lo largo de los últimos años (Figura 1.2) debido principalmente al efecto de los factores climáticos (heladas y sequías) sobre el cultivo. El interés creciente por este cultivo, consecuencia del aumento de los precios de la almendra debido a la alta demanda, está suponiendo un aumento muy significativo de la superficie cultivada y la incorporación de grandes fincas con dotaciones importantes de agua. Ello va a repercutir enormemente en la producción española en los próximos años que podría alcanzar las 100 000 t.

1.1.4. Problemática en la producción del almendro

Al igual que ocurre en muchos otros cultivos, son muchos los factores que influyen en la producción del almendro, destacando el material vegetal, las condiciones ambientales y las técnicas de cultivo (García, 1986).

El éxito de la plantación dependerá en gran medida del material vegetal utilizado, tanto de la variedad como del patrón. La variedad va a determinar en gran medida la producción, calidad del fruto y los costes de cultivo, condicionados, a su vez, por el medioambiente y las prácticas culturales. La elección del patrón va a estar determinada por la compatibilidad con la variedad elegida, el tipo de suelo (permeabilidad, contenido en sales, presencia de patógenos) y las condiciones climáticas o de cultivo (secano o regadío).

Aplicar las técnicas de cultivo adecuadas es tan importante como la elección del material. El diseño de la plantación, el tipo de poda, los tratamientos fitosanitarios y la dotación de riego harán que una plantación sea más o menos rentable. La producción está directamente relacionada con la cantidad de agua disponible para el árbol. A pesar de que el almendro ha sido considerado como una especie rústica de secano, el déficit hídrico reduce enormemente la producción y la calidad de la almendra (Egea y col., 2010). Esto provoca enormes pérdidas en cultivos de secano, que pueden solventarse con el riego adecuado y la introducción de variedades de maduración temprana, cuyos frutos se desarrollan por completo antes de los periodos de más sequía.

Las condiciones ambientales durante la floración también afectan a la producción del almendro a varios niveles. En primer lugar, las heladas tardías producen daños en flores y frutos jóvenes, ocasionando la pérdida parcial o total de la cosecha. En segundo lugar las bajas temperaturas, el viento, las lluvias y la niebla impiden que los insectos polinizadores realicen un transporte efectivo del polen y retrasan la dehiscencia de las anteras, afectando negativamente a la polinización. Para minimizar estos problemas se recomienda el uso de las nuevas

variedades de floración tardía y auto-compatibles (Ortega y col., 2006; Martínez-García y col., 2011; Dicenta y col., 2016). Teniendo en cuenta todo esto, resulta evidente que caracteres como la floración tardía y la auto-compatibilidad, junto con la calidad del fruto y la elevada densidad de producción, sean objetivos primordiales dentro de los programas de mejora del almendro.

1.1.5. Mejora genética del almendro

Según el Diccionario de Ciencias Hortícolas (Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, SECH, 1999) la mejora genética vegetal es “la aplicación de técnicas genéticas para la obtención de variedades vegetales que superan en productividad, resistencia, calidad, etc. a las ya existentes”. Se trata por tanto de un proceso de creación y selección, donde sólo las mejores plantas de una población tendrán continuidad.

Caracteres de interés en la mejora genética del almendro

Los caracteres de interés en un programa de mejora se establecen en base a tres objetivos principales: aumentar los rendimientos de producción, mejorar la calidad del producto y disminuir los costes de producción (Gradziel y Martínez-Gómez, 2013).

El principal carácter a considerar en la mejora del almendro es la elevada productividad. Para conseguirla, el primer requisito es garantizar la elevada producción de flores como paso imprescindible para obtener un elevado número de frutos. Además, esta producción floral y de frutos debe de ser estable año tras año lo que depende de la variedad, pero también del cultivo.

La auto-compatibilidad floral es uno de los caracteres más importantes que determinan la producción en las condiciones de cultivo españolas, con floraciones frecuentemente bajo condiciones desfavorables y ausencia de

polinizadores. Este carácter facilita el cuajado de los frutos al permitir la fecundación de la flor con su propio polen. Además, la estructura de la flor debe de permitir la llegada pasiva del polen al estigma para eliminar así la necesidad de insectos polinizadores y poder realizar plantaciones monovarietales, lo que facilitará el manejo de la plantación (Dicenta y col., 2000b; Ortega y col., 2016).

La floración tardía y extra-tardía es también un factor importante que asegurará la producción de almendras en zonas con riesgo de heladas. La obtención de las nuevas variedades extra-tardías está permitiendo la expansión del cultivo a zonas muy frías donde el cultivo del almendro nunca se había considerado.

Otros caracteres muy importantes son la maduración temprana, la resistencia a enfermedades o la facilidad de poda.

La calidad de la almendra también es un objetivo de mejora, a pesar de que es difícil definir un modelo específico de calidad, debido a las diferentes preferencias del consumidor y al uso concreto al que va destinada la almendra. En general se buscan semillas medianas o grandes, ya que esto puede repercutir en la cosecha final, aunque para algunos usos concretos se requieren tamaños muy grandes o pequeños. En cuanto a la forma, se buscan semillas con forma similar a las variedades comerciales Desmayo Langueta (alargada) y Marcona (redondeada). Las semillas dobles no son deseadas, ya que presentan deformaciones, además de dificultar el proceso de repelado. El tegumento se prefiere de color claro y fino para obtener un mayor rendimiento.

Además de los rasgos físicos de la almendra, cada vez se tiene más en cuenta su composición química debido a los aspectos beneficiosos que se le atribuyen en relación a la salud humana. Aunque estos aspectos aún no se han incorporado de forma rutinaria en las nuevas variedades, están siendo cada vez más objeto de atención, no sólo por parte de los obtentores de variedades, sino también por parte de los productores, procesadores y consumidores.

Relacionado con los costes de producción se encuentran el vigor, porte y ramificación del árbol que condicionan las labores de poda o las posibilidades de mecanización del cultivo. Igualmente, la resistencia a plagas y a enfermedades son caracteres interesantes que nos permiten un ahorro en productos fitosanitarios y una producción más saludable para el consumidor, que alcanza mayores precios en el caso de la agricultura ecológica.

Programas de mejora genética del almendro

Los primeros países que desarrollaron programas de mejora varietal del almendro fueron Estados Unidos (en 1925), y la antigua Unión Soviética (en 1932). Estos países eran los más avanzados científica y tecnológicamente, y con zonas aptas para el cultivo de esta especie. Posteriormente se iniciaron programas de mejora en la cuenca mediterránea. En países como España, Francia e Italia se han obtenido resultados importantes, mientras que en Bulgaria, Grecia, Israel, Marruecos, Túnez, Turquía y Rumanía, los programas desarrollados han sido de menor envergadura, sin excesiva continuidad, ni obtención de resultados (Kester y Gradziel, 1996). Australia se ha unido posteriormente a la lista de países que desarrollan programas de mejora varietal de almendro (Wirthensohn y Sedgley, 2002). Actualmente la mejora genética del almendro se desarrolla fundamentalmente en Estados Unidos, Australia y España.

La mejora del almendro en Estados Unidos se inició en 1925 en la Universidad de California (Davis) dando lugar a numerosas variedades. Algunas de ellas son simplemente selecciones como Nonpareil, Texas (Mission), Ne Plus Ultra y Peerless (Kester y col., 1984), mientras que otras ya provienen de programas de mejora, como sería el caso por ejemplo de Butte, Ruby, Sonora, Winters o SuitHeart (Gradziel y col., 2007; Gradziel, 2011b; Gradziel y Martínez-Gómez, 2013). Además, existen nuevas variedades de obtentores privados como Shasta o Independence, siendo esta última la única auto-compatible.

El programa de mejora más reciente se inició en 1995 en la Universidad de Adelaida (Australia). El objetivo principal de este programa es la obtención de variedades auto-compatibles y con buena calidad del fruto (Bertozzi y col., 1998; Sedgley y Collins, 2002). Para la obtención de individuos auto-compatibles se han utilizado entre otras las variedades Marta y Antoñeta, obtenidas en el CEBAS-CSIC de Murcia.

En España, la mejora genética se centra en tres programas distintos llevados a cabo en Aragón, Cataluña y la Región de Murcia, que comparten un objetivo común: la obtención de variedades auto-compatibles y de floración tardía.

La investigación sobre el almendro se inició en Zaragoza en 1966 en el CIDADE, actual Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), sentando las bases para el posterior programa de mejora que se iniciaría en 1974 (Felipe y Socias i Company, 1985). En este programa se obtuvieron primeramente las variedades Guara, Aylés y Moncayo, posteriormente las variedades auto-compatibles Blanquerna, Cambra y Felisia, y más recientemente las variedades Soleta, Belona, Mardía y Vialfas (Felipe y Socias i Company, 1987; Socias i Company y Felipe, 1999, 2006; Socias i Company y col., 2008; Socias i Company y col., 2016). Recientemente, mediante marcadores moleculares tipo SSR, se ha demostrado que, al igual que Supernova (Marchese y col., 2008), Mazzeto y Truoto, Guara es realmente la variedad autóctona Tuono (Dicenta y col., 2015).

En Cataluña el programa de mejora fue iniciado en 1975 en el Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Centro Mas de Bover, en Reus (Vargas y col., 1984). Fruto de este programa fueron las variedades Masbovera, Glorieta y Francolí (Vargas y Romero, 1994), todas ellas auto-incompatibles excepto Francolí (López y col., 2005). La auto-compatibilidad se introdujo posteriormente cómo objetivo principal, obteniéndose las variedades Constantí,

Vairo y Marinada. De esta época es también la variedad auto-incompatible Tarraco (Vargas y col., 2006).

El programa de mejora del almendro del Departamento de Mejora Vegetal del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS)-CSIC de Murcia se inició en 1971 con un trabajo de prospección del material vegetal a nivel regional, nacional e internacional (Egea y col., 1985; Egea y García, 1988). En 1975 se estableció una colección de 81 variedades, y en 1985 se realizaron los primeros cruzamientos intervarietales con el objetivo de mantener las características deseables de los materiales autóctonos (productividad, calidad de la almendra y cáscara dura) e incorporar la floración tardía de las variedades francesas y rusas, y la auto-compatibilidad de las variedades italianas de Apulia. Fruto de esta etapa son las variedades Marta y Antoñeta, de floración tardía y auto-compatibles (Egea y col., 2000). Posteriormente, se le da un nuevo impulso al programa con el objetivo de obtener variedades auto-compatibles, pero en este caso de floración extra-tardía, obteniéndose Penta y Tardona (Dicenta y col., 2009). Más recientemente se ha presentado la variedad extra-tardía y auto-compatible Makako (II Congreso Nacional de Fruticultura, Murcia).

1.1.6. Futuro del almendro en España

Pese a los importantes logros de los programas de mejora de almendro españoles, el cultivo de esta especie en España no ha experimentado el desarrollo que cabría esperar, situándose su producción muy por debajo de la estadounidense, por las causas señaladas anteriormente: floración temprana, incompatibilidad floral y cultivo en secano. Sin embargo, la situación está mejorando enormemente con el cultivo de las nuevas variedades auto-compatibles y de floración tardía o extra-tardía desarrolladas en los programas de mejora y con el establecimiento de modernas plantaciones en regadío, impulsadas por los elevados precios de la almendra en los últimos años. Sin

embargo, todavía en 2014 la superficie de almendro cultivado en secano en España era de 480 259 ha frente a las 46 770 ha de regadío (Ministerio de Agricultura y Medioambiente, 2015).

En secano los rendimientos son bajos y el agricultor no invierte en mejoras, estableciéndose una situación cíclica de la que no hay salida. Sin embargo, las nuevas plantaciones modernas, con buen suelo, riego, abonado y tratamientos fitosanitarios se están obteniendo producciones similares a las obtenidas en Estados Unidos o Australia.

Teniendo en cuenta que la investigación para la obtención de nuevas variedades ha resultado muy fructífera (Dicenta y col. 2010), sólo queda realizar una transferencia eficiente para cambiar la mentalidad del agricultor, convenciéndolo de que invertir en el cultivo del almendro es rentable, siempre en función de las posibilidades de cada uno. Gracias a esta labor de transferencia en los últimos años, e impulsado por los elevados precios, el número de este tipo de explotaciones tecnificadas ha aumentado significativamente, situándose actualmente el cultivo del almendro en un momento de enorme auge.

1.2. INCOMPATIBILIDAD FLORAL

La incompatibilidad floral es un mecanismo genético de reconocimiento específico y rechazo del polen incompatible, cuya función principal es evitar la autofecundación (auto-incompatibilidad) o la fecundación con polen de individuos genéticamente emparentados (inter-incompatibilidad) (Bateman, 1952). De esta forma, la incompatibilidad impide la consanguinidad y favorece la heterocigosis, por lo que es una ventaja evolutiva (Whitehouse, 1950). Sin embargo la incompatibilidad puede suponer un inconveniente para el cultivo de especies frutales como el almendro, pues puede evitar el cuajado de frutos, lo que debe tenerse en cuenta en el diseño de la plantación.

Para explicar la transición producida durante la evolución desde la auto-incompatibilidad hasta la auto-compatibilidad en algunas especies angiospermas, Levin (1996) propone un estado intermedio caracterizado por un aparente fenotipo auto-incompatible que presenta una baja producción frutal tras la auto-polinización. Esta variabilidad en la expresión de la auto-incompatibilidad se ha denominado auto-incompatibilidad parcial o pseudocompatibilidad (Stephenson y col., 2000). En la bibliografía hay descritos algunos casos de incompatibilidad parcial en almendro (Tufts y Philp, 1922; Ryabov y Rikhter, 1934; Gagnard, 1954; García, 1978). Sin embargo, en ninguno de estos estudios se comprobó el verdadero origen de los frutos obtenidos, supuestamente de autofecundación. Actualmente esto es posible mediante marcadores moleculares. Martínez-García y col. (2011), estudiando diversas variedades auto-incompatibles de almendro durante varios años, demostraron que en todos los casos los supuestos frutos de auto-fecundación fueron realmente contaminaciones con polen de otras variedades. Esta debió de ser la situación de los trabajos citados anteriormente. Pese a esto, hay autores que siguen manteniendo este término (Socias i Company y col., 2013).

Básicamente se distinguen dos tipos de incompatibilidad floral: esporofítica y gametofítica, ambas controladas por el locus *S*, pero con diferencias en cuanto a la determinación del fenotipo (de Nettancourt, 2001). En el sistema esporofítico, el fenotipo del polen está determinado por el genotipo diploide de la antera de la que procede, es decir que la incompatibilidad está determinada por los dos alelos *S* presentes en el esporófito. Por lo general, tanto el reconocimiento como el rechazo del polen se producen en el estigma. Este tipo de incompatibilidad se ha identificado en las familias *Brassicaceae*, *Asteraceae*, *Convolvulaceae*, *Betulaceae*, *Caryophyllaceae*, *Polemoniaceae* y *Malvaceae*, aunque la mayor parte de los estudios moleculares se han centrado casi exclusivamente en las especies de la familia *Brassicaceae*, y concretamente en el

género *Brassica* (Tian y col., 2013; Wang y col., 2014). En este sistema el locus *S* es extremadamente complejo conteniendo hasta 14 genes (Watanabe y col., 2000). Sin embargo, sólo dos genes altamente polimórficos parecen ser necesarios para el funcionamiento del mecanismo de incompatibilidad: el determinante femenino SRK (S-locus receptor kinase), y el determinante masculino SCR (S-locus cysteine rich protein) (Stein y col., 1991; Schopfer y col., 1999). A parte de estos dos genes, la mayoría de haplotipos *S* tiene en el locus *S* otro gen polimórfico que se expresa en el estigma denominado SLG (S-locus glycoprotein) (Nasrallah y col., 1985), el cual parece actuar como co-receptor del determinante masculino (Takasaki y col., 2000).

El sistema de incompatibilidad gametofítico es el más común y ha sido identificado en especies de las familias *Solanaceae*, *Rosaceae*, *Scrophulariaceae*, *Papaveraceae*, *Poaceae*, *Ranunculaceae*, *Leguminosae* y *Onagraceae* (Franklin y col., 1995). En este tipo de incompatibilidad el fenotipo del polen está determinado por su propio genotipo haploide. A nivel molecular se han descrito dos mecanismos de incompatibilidad gametofítica, que se distinguen principalmente por la identidad del producto del locus *S* expresado en el pistilo. Uno de ellos es el sistema basado en ARNasa-S, originalmente descubierto y extensivamente caracterizado en la familia *Solanaceae*, y posteriormente en *Rosaceae* y *Scrophulariaceae* (McCubbin y Kao, 2000). El reconocimiento y rechazo del polen se producen en el estilo debido a la degradación del RNA ribosómico del tubo polínico incompatible por parte de la ARNasa-S (Anderson y col., 1986; McClure y col., 1989), mecanismo en el que participaría el producto del gen *S* del polen, la proteína SFB.

En el otro tipo de sistema gametofítico, identificado en la familia *Papaveraceae*, la inhibición del crecimiento del polen incompatible es muy rápida y tiene lugar en el estigma (Franklin-Tong y Franklin, 2003). En este caso, el gen *S* del pistilo codifica para una glicoproteína-S (Lawrence y col.,

1978) que interacciona con el producto del gen *S* en el polen, que parece ser un receptor de membrana plasmática denominado PrpS (Wheeler y col., 2009). Esta interacción inicia una cadena de señalización dependiente de calcio (Franklin-Tong y col., 1993), que culmina en la muerte celular programada del polen incompatible (Thomas y Franklin-Tong, 2004). Además, en especies con incompatibilidad gametofítica basada en ARNasa-S se ha identificado una familia de proteínas denominada SPH, con una estructura similar a las glicoproteínas-S de *Papaveraceae*, las cuales parecen estar implicadas en otros aspectos de la señalización célula-célula (Ride y col., 1999).

1.2.1. Incompatibilidad gametofítica basada en ARNasas-S: genes implicados

El gen *S* en el pistilo

Las ARNasas-S fueron identificadas por primera vez en 1981 en *Nicotiana alata* (*Solanaceae*) por Bredemeijer y Blaas, quienes las describieron como glicoproteínas de 30KDa que cosegregaban con el genotipo *S* del pistilo. Una posterior clonación indicó que presentaban regiones homólogas al dominio catalítico de las ribonucleasas tipo T2 de hongos (Anderson y col., 1986), presentando además al igual que éstas, actividad ribonucleasa (McClure y col., 1989). Estas ARNasas-S son las responsables del rechazo del polen en el estilo ya que degradan el RNA ribosómico del tubo polínico e inhiben su crecimiento (McClure y col., 1990; Ioerger y col., 1991)

La clonación y secuenciación de varias ARNasas-S permitió distinguir dentro de su estructura cinco regiones conservadas (C1-C5) y dos regiones hipervariables (HVa y HVb) (Haring y col., 1990; Ioerger y col., 1991). En las

regiones conservadas C2 y C3 aparecen conservados los residuos de histidina, considerados necesarios para la actividad catalítica (Haring y col., 1990).

Estos estudios pioneros en Solanáceas sirvieron como modelo para la posterior identificación de las ARNasas-S en Rosáceas. Usando en esta familia técnicas de isoelectroenfoque y electroforesis bidimensional para identificar las proteínas en extractos estilares, y confirmar su localización exclusiva en el estilo mediante “inmunoblotting” (Bošković y Tobutt, 1996; Tao y col., 1997).

La secuenciación de *ARNasas-S* de los géneros *Malus*, *Pyrus* y *Prunus*, permitió determinar su estructura (Sassa y col., 1996; Tao y col., 1997; Ushijima y col., 1998; Tao y col., 1999; Zuccherelli y col., 2002; Ortega y col., 2006; Sanzol y col., 2006). Al igual que en Solanáceas, las *ARNasas-S* de Rosáceas presentan cinco regiones conservadas, pero una sólo región hipervariable (RHV), a la que se asocia la especificidad de reconocimiento del polen, situada entre las regiones C2 y C3, la cual presenta un intrón altamente polimórfico. Además de este intrón, las especies del género *Prunus* presentan otro de menor polimorfismo, que se localiza entre el péptido señal y la región conservada C1 (Igic y Kohn, 2001). Todas las regiones son similares a las de solanáceas excepto la región C4 que parece exclusiva de esta familia, denominándose RC4 (Figura 1.3.).

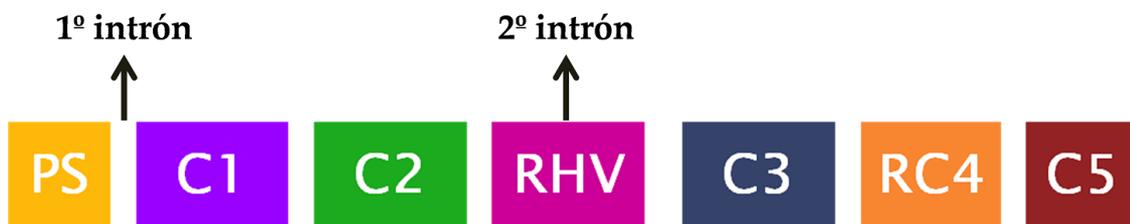


Figura 1.3. Representación esquemática de la estructura de la *ARNasa-S* en *Prunus*. Cada región aparece representada con un cuadro coloreado y sus siglas en el interior. PS: péptido señal, C1-C5 y RC4: regiones conservadas, y RHV: región hipervariable. Las flechas indican la posición de los dos intrones presentes: el primero al finalizar el péptido señal y el segundo en la región hipervariable.

El gen S en el polen

En los años posteriores al descubrimiento de las ARNasas-S las investigaciones se orientaron hacia la identificación del producto del gen S en el polen de las distintas familias. Lo que se consiguió gracias a la secuenciación de regiones genómicas próximas a las ARNasas-S. De este modo en *Antirrhinum* se identificó el gen *SLF* (S-Locus F-box), expresado exclusivamente en la antera (Lai y col., 2002). En especies del género *Prunus* se ha identificado un gen similar, el gen *SFB* (S-haplotype-specific F-box), expresado en polen y con una elevada diversidad alélica (Entani y col., 2003; Ushijima y col., 2003). Por otro lado, en *Petunia inflata* se ha identificado el gen *PiSLF* expresado en anteras, polen maduro y tubos polínicos (Sijacic y col., 2004), demostrándose además su identidad mediante transformación genética. También en especies del género *Malus* se ha identificado más recientemente un gen de características similares (*SLF*) localizado en el locus S y expresado en el polen (Cheng y col., 2006).

Todos estos genes al parecer codifican para proteínas con un motivo caja-F (F-box), por lo que se ha propuesto que la proteína SLF podría ser una ligasa tipo E3, que formaría parte del complejo SCF (SKP1–Cullin–F-box), intermediario en la ubiquitinación de proteínas para la posterior degradación mediante la vía del proteasoma 26S (Sijacic y col., 2004).

Mediante el análisis y la comparación de las secuencias de alelos del gen *SFB* del género *Prunus* se ha determinado que su estructura presenta además de un motivo F-box, dos regiones variables (V1 y V2) y dos regiones hipervariables (HVa y HVb) que podrían ser los sitios de interacción con las ARNasas-S (Ikeda y col., 2004) (Figura 1.4.).

En los últimos años, múltiples genes F-box denominados *SFBBs* (S locus F-box brothers) se han identificado, en los géneros *Malus* y *Pyrus*, como posibles candidatos del gen S del polen (Sassa y col., 2007). De manera que cada SFB, en

colaboración con el resto, sería responsable del reconocimiento y la inhibición de una o varias ARNasas-S.

Además, en especies del género *Prunus* (*P. avium*, *P. mume* y *P. armeniaca*) se han identificado mutaciones correspondientes a inserciones o deleciones en el gen *SFB* que provocan pérdida de especificidad del polen (Sonneveld y col., 2004; Ushijima y col., 2004; Vilanova y col., 2006; Marchese y col., 2007).



Figura 1.4. Representación esquemática de la estructura del *SFB* en *Prunus*. Cada región aparece representada con un cuadro coloreado y sus siglas en el interior. F-Box: motivo F-Box, V1-V2: regiones variables, y HVa/HVb: regiones hipervariables.

Factores modificadores del locus S

Diversos resultados experimentales indican que, además de los productos del locus *S*, en la incompatibilidad gametofítica basada en ARNasas-S intervienen otras proteínas, denominadas factores modificadores. Estos modificadores al parecer están codificados fuera del locus *S* y se expresan en el pistilo y en el polen, donde interactúan con las ARNasas-S y la proteína *SFB*. Hasta la fecha sólo han sido identificadas y caracterizadas como factores modificadores 3 proteínas en la familia *Solanaceae*, aunque se han identificado diversas proteínas candidatas (McClure y Franklin-Tong, 2006; Jiménez-Durán y col., 2013).

Uno de estos factores es la proteína HT-B (High Top-Band), identificada en *Nicotiana* (McClure y col., 1999) Se trata de una proteína de bajo peso molecular, con un dominio rico en asparagina y que se expresa específicamente en estilos. Mediante estudios de transformación genética se ha visto que la inhibición de su expresión resulta en una interacción compatible, de lo que se deduce su

implicación en el sistema de incompatibilidad (McClure y col., 1999). Posteriormente se han identificado también genes homólogos a HT-B en especies de los géneros *Solanum* y *Petunia* (Kondo y col., 2002; O'Brien y col., 2002; Sassa e Hirano, 2006; Puerta y col., 2009).

Otro factor modificador es la proteína 120k, glicoproteína cuya denominación hace referencia a su peso molecular en kDa. Es muy abundante en la matriz extracelular del estilo, desde donde es incorporada al tubo polínico (Lind y col., 1996). Esta proteína se une a las ARNasas-S y al igual que ocurre con HT-B, su expresión desencadena una reacción incompatible, con la interrupción del crecimiento del tubo polínico (Hancock y col., 2005). Ensayos de inmunolocalización muestran que las proteínas 120k, HT-B y ARNasa-S, son incorporadas a los tubos polínicos durante la polinización (Goldraij y col., 2006).

El último factor modificador identificado claramente como tal es NaStEP (*Nicotiana alata* Stigma-Expressed protein). Se trata de un inhibidor de proteasas tipo Kunitz altamente expresado en estigmas de especies auto-incompatibles de *Nicotiana* (Bussot y col., 2008). Mediante ensayos de transformación génica se ha podido observar que cuando se suprimía la expresión de NaStEP, se interrumpía el rechazo del polen de manera específica (Jiménez-Durán y col., 2013). Esta proteína es incorporada al tubo polínico rápidamente (6h), estando su función relacionada con el sistema de endomembranas del tubo polínico, habiéndose observado que en una polinización incompatible NaStEP estabiliza la proteína HT-B impidiendo su degradación y con ello el crecimiento del tubo polínico, lo que está de acuerdo con el modelo de compartimentación (Goldraij y col., 2006; Jiménez-Durán y col., 2013).

Otro gen candidato es NaTrxh (*N. alata* thioredoxin h) que codifica para una tiorredoxina h del subgrupo II, que se expresa principalmente en especies auto-compatibles de *Nicotiana*. Esta proteína es secretada al tejido transmisor de la matriz extracelular del estilo, ubicación que compartiría con las ARNasas-S.

Mediante experimentos *in vitro* se ha comprobado que reduce a las ARNasas-S, bien mediante alteraciones estructurales o en el tráfico de éstas a los tubos polínicos. Aunque su función como modificador se ha estudiado en detalle, todavía no se conoce con exactitud (Juárez-Díaz y col., 2006; Avila-Castañeda y col., 2014). Sin embargo sí que está demostrada la participación de proteínas similares (THL1 y THL2) en el rechazo del polen en *Brassica* (Haffani y col., 2004).

Aunque todos los factores modificadores citados anteriormente se referían al pistilo, diferentes estudios genéticos y bioquímicos también han identificado potenciales genes modificadores en el polen (Huang y col., 2006; Zhao y col., 2010).

Como se ha indicado anteriormente el determinante S del polen codifica para proteínas con motivo F-box que formaría parte del complejo SCF, de manera que el resto de proteínas que forman parte de este complejo serían en principio candidatos a modificadores. El hallazgo de la proteína AhSSK1 (*Antirrhinum hispanicum* SLF-interacting Skp1-like1) (Huang y col., 2006) pone de manifiesto que este gen podría actuar como adaptador entre el SLF y la proteína Cullin1, los cuales podrían tener una gran responsabilidad en la ubiquitinación de la ARNasa-S. Posteriormente se ha identificado la proteína PhSSK1 (*Petunia hybrida* SLF-interacting Skp1-like1) equivalente a la anterior, expresada en polen y que actuaría también como un adaptador en el complejo SCF (Zhao y col., 2010). Además de estos factores modificadores, aparecen otros como los PPMs (polen part mutants), ajenos al locus S que confieren autocompatibilidad en distintas variedades de *Prunus armeniaca* (Vilanova y col., 2006; Dondini y col., 2012; Zuriaga y col., 2013) o *Prunus avium* (Wünsch y Hormaza, 2004; Cachi y Wünsch, 2011; Cachi y Wünsch, 2014).

En la búsqueda de los posibles factores modificadores han jugado también un papel importante los distintos estudios transcriptómicos y proteómicos llevados a cabo en los últimos años, que muestran la expresión diferencial de

proteínas tras interacciones polen-pistilo compatibles e incompatibles (Yuan-Qing y Rong-Cai, 2003; Miao y col., 2013; Feng y col., 2009; Chalivendra y col., 2013; Martínez-García y col., 2015).

1.2.2. Funcionamiento del sistema gametofítico: modelos teóricos propuestos

Se ha determinado que en una reacción incompatible, las ARNasas-S entran en los tubos polínicos actuando como citotoxinas e inhibiendo específicamente el crecimiento del polen incompatible (McClure y col., 1989). Sin embargo, todavía se desconoce el funcionamiento exacto de este mecanismo, siendo una incógnita tanto el papel de la mayoría de componentes del sistema, como su identidad. Para comprender cómo funciona la incompatibilidad gametofítica es necesario conocer la interacción entre sus componentes y su funcionamiento específico. Para responder a estas cuestiones a lo largo de las últimas décadas se han propuesto varios modelos teóricos que tratan de integrar toda la información disponible. Estos modelos se describen a continuación.

1. Modelo del receptor: Fue propuesto antes de la identificación del gen *S* del polen en las familias *Solanaceae* y *Brassicaceae* por Thomson y Kirch (1992) (Figura 1.5a). Se propuso la hipótesis de que el producto del gen *S* en el polen era un receptor de la membrana plasmática o de la pared celular del tubo polínico que permitía la entrada específica de las ARNasas-S con un haplotipo idéntico al suyo, previniendo de este modo el crecimiento de los tubos polínicos tras la autopolinización. Experimentos posteriores han concluido que es poco probable que el producto del gen *S* en el polen sea un receptor y que la interacción de la ARNasa-S con los tubos polínicos no es alelo-específica, ya que experimentos de inmunolocalización han mostrado

que las ARNasas-S se localizan tanto en tubos polínicos propios como ajenos (Luu y col., 2000).

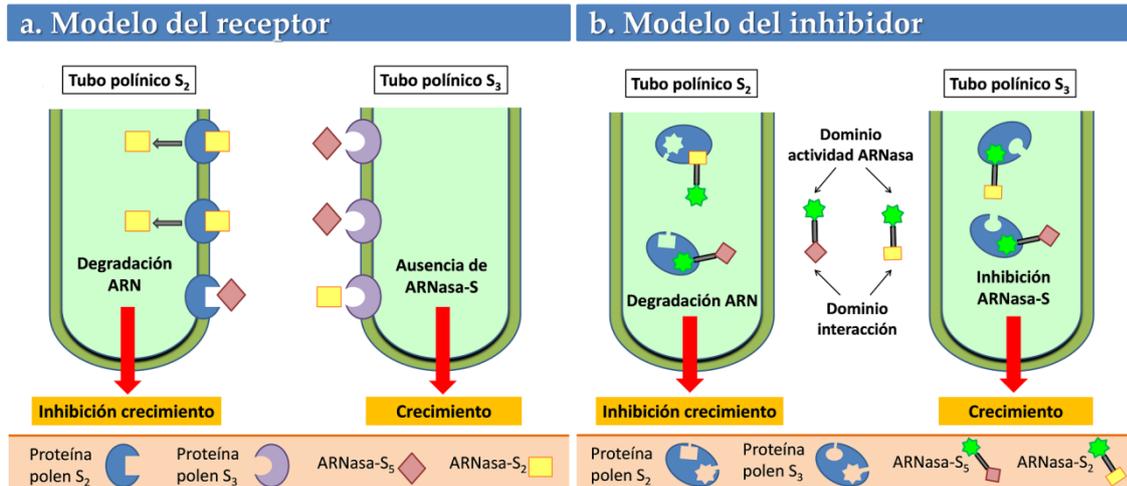


Figura 1.5. Primeros modelos de incompatibilidad: Modelo del receptor (a) y modelo del inhibidor (b). En cada modelo se representa una reacción compatible y una incompatible, indicándose además las principales moléculas necesarias para su funcionamiento.

2. Modelo del inhibidor: Este modelo es contemporáneo al anterior, aunque posteriormente ha sufrido numerosas modificaciones. En una primera versión se sugirió que todas las ARNasas-S entrarían en el citoplasma del tubo polínico, donde se encontraría localizado el producto del gen S del polen, el cual inhibiría específicamente la actividad de las ARNasas-S con un genotipo idéntico al suyo (Thomson y Kirch, 1992). Posteriormente, surgió la hipótesis de que el producto del gen S del polen sólo era capaz de distinguir entre las ARNasas-S propias y las ajenas, y que la inhibición de estas glicoproteínas debería estar producida por alguna otra proteína (Luu y col, 2000) (Figura 1.5b).
3. Modelo de degradación proteica: Este modelo es coetáneo a la identificación del gen S del polen por Qiao y col (2004), cuyo producto es una proteína

con motivo F-box denominada SLF/SFB. Según este modelo la compatibilidad es resultado de la degradación de la ARNasa-S ubiquitinada específicamente mediante la vía del proteasoma 26S. Es decir, las ARNasas-S con haplotipo distinto al del polen serían degradadas, mientras que las de haplotipo similar al del polen no se degradarían y ejercerían su efecto citotóxico impidiendo el crecimiento del tubo polínico (Figura 1.6a). Este modelo no es aceptado actualmente porque predice que la degradación de las ARNasas-S con genotipo distinto al del polen es la base para la incompatibilidad, sin embargo hay experimentos que muestran que no sólo las ARNasas-S propias están presentes en los tubos polínicos (Hua y Kao, 2006). Además, este modelo tampoco tiene en cuenta la presencia de otros factores implicados en el sistema de incompatibilidad, de manera que la obtención de nuevos resultados experimentales llevaron a proponer el siguiente modelo alternativo.

4. Modelo de compartimentación: Fue propuesto por Goldraij y col. (2006), y sugiere que las ARNasas-S entran en la zona luminal del polen mediante un sistema de endomembranas. En el caso de una polinización incompatible, la proteína HT-B permanecería estable facilitando el transporte de la ARNasa-S del sistema de endomembranas al citoplasma, donde ejercería su citotoxicidad inhibiendo el crecimiento del tubo polínico. Sin embargo, en una polinización compatible, la proteína HT-B se degradaría y la ARNasa-S se encontraría compartimentalizada sin mantener contacto con el RNA polínico (Figura 1.6b). El factor 120k jugaría también un papel esencial en el sistema de incompatibilidad en un paso posterior al transporte de las ARNasas-S al tubo polínico, aunque su papel concreto en el mecanismo está aún por dilucidar (Goldraij y col., 2006). NaStEP (*Nicotiana alata* Stigma-Expressed Protein), factor descrito más recientemente, también formaría

parte de este modelo (Jiménez-Durán y col., 2013) estabilizando a la proteína HT-B en el caso de polinizaciones incompatibles.

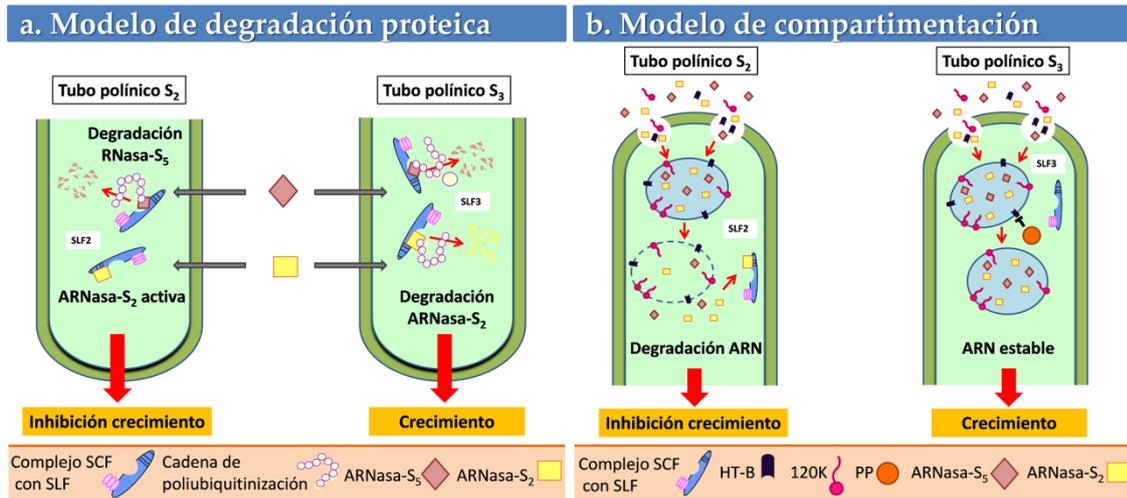


Figura 1.6. Modelos de degradación (a) y compartimentación (b). En cada modelo se representa una reacción compatible y una in-compatible, indicándose además las principales moléculas necesarias para su funcionamiento.

5. Modelos recientes: Estudios recientes indican que en los géneros *Pyrus* y *Malus* (*Rosaceae*) hay varios genes que codifican para *SFBBs* (*S* locus F-box brothers) expresados específicamente en el polen y ligados al locus *S* (Sassa y col., 2007). Estos descubrimientos han cuestionado si el nuevo “modelo colaborativo de reconocimiento no propio” propuesto en *Petunia* (*Solanaceae*) (Kubo y col., 2010) podría explicar también el funcionamiento del sistema de incompatibilidad en estas especies. Según este modelo cada proteína *SFB* es responsable del reconocimiento y la inhibición de una o varias *ARNasas-S*, y el conjunto de genes *F-box* en un haplotipo *S* es suficiente para reconocer e inhibir todas las *ARNasas-S* excepto la que posee el mismo haplotipo *S*. Nuevos estudios en peral y manzano sugieren que este modelo colaborativo basado en el reconocimiento de *ARNasas-S* ajenas mediante múltiples factores consiste en una interacción competitiva

entre los SFBs presentes en el polen siendo estos los causantes del mecanismo de incompatibilidad (Kakui y col., 2011; Minakawa y col., 2014). Sin embargo, este modelo no sería aplicable a *Prunus sp.*, ya que parece que en este género un sólo SFB actúa en el polen como determinante *S* (Ushijima y col., 2004; Sonneveld y col. 2005), siendo las mutaciones en el gen SFB las que se asocian a la auto-compatibilidad (Tao e Iezzoni, 2010).

1.2.3. Incompatibilidad floral en el almendro

El almendro es una especie diploide con un número de cromosomas $2n=16$ (Federov, 1969) que presenta incompatibilidad gametofítica controlada por el locus *S* multialélico (Tao e Iezzoni, 2010). La mayoría de las variedades de almendro son auto-incompatibles e incompatibles con las variedades que presentan el mismo genotipo *S* (Tufts y Philp, 1922). Esta auto-incompatibilidad que para muchas especies es una ventaja, para el cultivo del almendro es un inconveniente, pues la parte comercial es la semilla, y ésta sólo se obtiene si se produce la fecundación del óvulo.

En los estudios iniciales sobre la incompatibilidad en almendro se utilizaron cruzamientos controlados. De este modo Crossa-Raynaud y Grasselly (1985) mediante un estudio realizado en variedades europeas, propusieron la existencia de seis alelos *S* de incompatibilidad (S_1, S_2, S_3, S_4, S_7 y S_8) y un alelo *S* responsable de la autocompatibilidad (S_f). Poco después, un estudio similar fue llevado a cabo con variedades americanas, proponiéndose cuatro alelos (S_a, S_b, S_c y S_d) (Kester y col., 1994).

Dado que se conocía que proteínas estilares con actividad ribonucleasa estaban implicadas en el mecanismo de incompatibilidad floral (McClure y col. 1989) la separación de éstas mediante técnicas electroforéticas permitió determinar el genotipo *S* de numerosas variedades (Bošković y col., 1997; 1999;

2003). Sin embargo, el alelo S_f de las variedades auto-compatibles no presenta actividad ribonucleasa, por lo que en los zimogramas obtenidos aparecía una sola banda en el caso de genotipos auto-compatibles heterocigóticos y ninguna en los homocigóticos (Bošković y col., 1999; Dicenta y col., 2002).

Recientemente la disponibilidad de secuencias de ADN de numerosos alelos de *ARNasa-S* ha hecho posible que se hayan diseñado cebadores que permiten la identificación y caracterización del genotipo *S* (Tao y col., 1999; Tamura y col., 2000; Sonneveld y col., 2001; Channuntapipat y col., 2002; Sutherland y col., 2004). En la actualidad, estos marcadores son utilizados por los mejoradores de manera rutinaria gracias a su rapidez y bajo coste para realizar los trabajos selección precoz en vivero. Así se identifica el genotipo *S* de las descendencias obtenidas evitando tener que llevar a campo aquellos descendientes auto-incompatibles no deseados. Esta selección precoz supone un gran ahorro de tiempo y dinero en los trabajos de mejora (Ortega y col., 2016). Los primeros cebadores obtenidos en *Prunus* fueron diseñados utilizando un reducido número de secuencias de una única especie (Tao y col., 1999; Tamura y col., 2000; Channuntapipat y col., 2002), por lo que presentan limitaciones para la identificación del genotipo *S* (Ortega y col., 2005). La posterior disponibilidad de un mayor número de secuencias ha permitido diseñar cebadores consenso más eficientes (Sonneveld y col., 2001; Sutherland y col., 2004) que amplifican un mayor número de alelos en diferentes especies del género *Prunus* y permiten determinar de manera fiable el genotipo. Ortega y col. (2005) describen un método de PCR utilizando dos pares de cebadores que amplifican las regiones del primer y segundo intrón de las *ARNasas-S* con el cual han se ha identificado el genotipo de numerosas variedades de almendro. Además de los cebadores anteriores también se han desarrollado cebadores específicos para determinados alelos de *ARNasa-S* de almendro (Tamura y col., 2000; Ma y Oliveira, 2001; Chanuntapipat y col., 2002, 2003; Sánchez-Pérez y col., 2004; Gómez y col., 2015).

Mediante el uso de técnicas de isoelectroenfoque (IEF) y PCR, hasta la fecha, se han identificado y caracterizado 53 *ARNasas-S* en variedades de almendro (Ushijima y col., 1998; Bošković y col., 2003; Ortega y col., 2006; Bošković y col., 2007; Halász y col., 2008; Kodad y col., 2008; Halász y col., 2009; Hafizi y col., 2013; Mousavi comunicación personal; Gómez y col., en evaluación). Durante la caracterización se ha podido observar que algunas de las *ARNasas-S* identificadas mediante IEF como distintas, han resultado tener secuencias idénticas (Bošković y col., 2003; Ortega y col., 2006). En otras ocasiones se han denominado igual dos *ARNasas-S* de secuencia distinta (Halász y col., 2008; Kodad y col., 2008), o se han atribuido distintos genotipos a variedades con el mismo nombre (Hafizi y col., 2013; Mousavi comunicación personal).

Toda esta información sobre los genotipos *S* de las distintas variedades de almendro ha permitido establecer grupos de inter-incompatibilidad floral (CIGs), que incluyen a variedades incompatibles entre sí pero compatibles con las de otros grupos. Esta información es de gran ayuda a la hora de planificar los cruzamientos en los programas de mejora, así como para realizar el diseño de plantaciones comerciales.

Hasta la fecha todas las tablas de CIGs establecidas habían sido una mera actualización de la propuesta anteriormente, sin que en ningún caso se hubiera integrado toda la información en una sola tabla, evitando así las incongruencias producidas al no tener en cuenta todos los genotipos disponibles o los solapamientos de los distintos grupos. Sin embargo, Gómez y col. (en evaluación) han agrupado todos los datos disponibles en una sola tabla (Tabla 1.1), en la cual han sido establecidos ocho nuevos grupos y se ha eliminado el grupo que contenía la variedad Jeffries, así como el grupo XXXI de Hafizi y col. (2013), compuesto por dos variedades cuyo genotipo *S* parece no ser el mismo según las secuencias de *ARNasas-S* publicadas por los mismos autores en la bases de datos NCBI.

Tabla 1.1. Tabla resumen de grupos de incompatibilidad de variedades de almendro.

CIG	Variedades	Genotipo S
I	Galaxy, Golden State, Grace, IXL, Long IXL, Mckinlay's Magnificent, Nonpareil, Riedenhore, Shahrodi-16, Shahrodi-18, Tardy Nonpareil, West Steyn	S ₇ S ₈
II	Ballico, Bulbunte, Garbi, Glorieta, Languedoc, Shahrekord-E1, Texas (=Mission), Wawona	S ₁ S ₅
III	Baxendale, Durango, Granada, Harvey, Le Grand, Mono, Robson, Sauret 2, Thompson, Wassum, Woods Colony	S ₅ S ₇
IV	Aldrich, Jenette, Merced, Ne Plus Ultra, Norman, Pearl, Price, Ripon, Rosetta, Sano, Yalda-1, Yalda-2	S ₁ S ₇
V	Carmel, Jubilee, Livingston, Monarch, Reams, Sauret 1, Tioga	S ₅ S ₈
VI	Avalon, Bigelow, Blue Gum, Butte, Dottie Won, Duro Amarelo, Folsom, Grace, G-99, Kutsch, Monterey, Northland, Plateau, Rivers Nonpareil, Sultana	S ₁ S ₈
VII	A-2, Eureka, Kapareil, Shahrodi-15, Solano, Sonora, Vesta	S ₈ S ₁₃
VIII	Azar, Ferragnès, Ferralise, Mourisca, Shahrodi-12	S ₁ S ₃
XIX	Harpareil, Jordanolo	S ₇ S ₁₄
X	Drake, Kochi, Shahrodi-17, Smith XL, Tétényi Kedvenc	S ₆ S ₈
XI	Abizanda, Fritz, Peerless, Ruby, Rumbeta-2, Selvatica Favata	S ₁ S ₆
XII	Anxaneta, Tarragones	S ₂ S ₉
XIII	Ardéchoise, Coop, Desmayo Langueta, Pep de Juneda, Zahaf	S ₁ S ₁₀
XIV	Achaak, Alnem88, Ferrastar, Kerman-20, Poost Nazok Naeen	S ₂ S ₁₀
XV	Pajarera-2, Pestañeta (=Pestanhiet)	S ₁₂ S ₂₃
XVI	Malagueña, Muel, Pau, Planeta Fina, Planeta Roja, Verdeta	S ₂₂ S ₂₃
XVII	Garrigues, Pajarera-1	S ₁₃ S ₂₇
XVIII	AS1, Marcona Flota	S ₈ S ₁₂
XIX	Belle d'Aurons, Peraleja	S ₃ S ₂₃
XX	Bartre, Castañera	S ₃ S ₅
XXI	Masbovera, Moncayo, Tarraco	S ₁ S ₉
XXII	Casanova, Coelhinha, Ferraduel, K-11-40, Shahrodi-8, Zarghan-7	S ₁ S ₄
XXIII	Chellastone, Milow, Monaghay-e-Najafabad	S ₇ S ₁₃
XXIV	Parada, Pestañeta Menuda	S ₁₁ S ₂₂
XXV	A-92, Khorshidi, Pierce	S ₈ S ₂₃
XXVI	Alzina, Garondes	S _{fa} S ₃₆
XXVII	Eriane, Szigetcsépi 55 (3/9)	S ₁₁ S _{31H}
XXVIII	Nikitskyi, Óriás Kagyló (4/4)	S ₃₆ S ₃₇
XXIX	Cristomorto, Cuore, Sahand, Zarghan-8	S ₁ S ₂
XXX	Aï, Shahrodi-6	S ₃ S ₄
XXXI	Tokyo, Yazd-11, Yazd-13	S ₆ S ₇
XXXII	Carretas Bajas, Yazd-2, Yazd-103	S ₄ S ₁₂
XXXIII	K-16-8, Shokoufeh	S ₃ S ₈
XXXIV	G-1, Mashhad-30	S ₄ S ₇
XXXV	K-10-15, Zanzan-2	S ₈ S ₉
XXXVI	Harir, Shekoofe	S ₄ S ₂₄
XXXVII	K-1-16, Shamshiri	S ₇ S ₂₄
XXXVIII	Mashhad-17, Safari	S ₆₂ S ₆₃

Tabla 1.1. (Continuación)

CIG	Variedades	Genotipo S
XXXIX	Monagha, Sefied	S ₇ S ₅₆
XL	CEBAS I, Verdeal	S ₄ S ₁₃
XLI	Shahrodi-4, Tardive de la Verdere	S ₃ S ₉
XLII	Bonita, Don Peppino	S ₁ S ₂₁
XLIII	Angones, Bronte 1	S ₁₀ S ₂₂
XLIV	Lisciannarisa, Nivera Selvaggia	S ₁₈ S ₂₁
XLV	Del Cid, Esperanza Forta	S ₁₂ S ₂₂
XLVI	Colorada, Nano	S ₁₂ S ₂₈
XLVII	Nambaredda, Pauet, Szigetcsépi 58	S ₆ S ₁₀
XLVIII	K-12-4, Mollar de Tarragona	S ₁ S ₁₂
XLIX	Carreró, G-25, Verd	S ₁₂ S ₂₇
L	Caima, Tardaneta	S ₅ S ₁₂
O	A5 Shahrekord (S ₂ S ₁₂), Abdolla (S ₅₄ S ₅₇), Angelica (S ₅ S ₃₃), Asperilla (S ₁₀ S ₂₇), Atascada (S ₅ S ₂₂), Atocha (S ₁₃ S ₂₂), Avellanera Gruesa (S ₂₂ S ₂₆), Bagher (S ₈ S ₁₁), Barunissa (S ₃₅ S ₅₁), Belardino (S ₂ S ₁₁), Bertina (S ₆ S ₁₁), Bianculidda di Pezzino (S ₁₈ S ₅₁), Biota (S ₅ S ₁₃), Boa Costa (S ₈ S ₂₁), Bonita de São Brás (S ₈ S ₂₂), Carrion (S ₅ S ₁₄), Castilla (S ₆ S ₂₂), Cavalera (S ₁₀ S ₃₁), Chiatta (S ₁₃ S ₃₈), Colossal (S ₇ S ₁₁), Cupani Piccola (S ₇ S ₅₁), Don Filippo (S ₂₁ S ₃₀), Fascionello (S ₁₈ S ₅₂), Fina del Alto (S ₂₈ S ₂₉), Fournat de Brezenaud (S ₂₄ S ₂₇), Fura Saco (S ₄ S ₂₃), G-11 (S ₁₄ S ₂₂), G-2 (S ₅ S ₅₆) ^p , G-11 (S ₁₄ S ₂₂), Gabaix (S ₁₀ S ₂₄), Gr-16 (S ₂ S ₆₀), Haj Mirzaei (S ₄ S ₉), Haji Badam (S ₉ S ₄₆), Hajmirzaei (S ₉ S ₂₃), Harriot (S ₆ S ₁₄), Holouei (S ₁₃ S ₅₅), ITAP-1 (S ₇ S ₁₁), , Jiménez Salazar (S ₂₁ S ₂₆), Jordi (S ₅ S ₆), K-10-11 (S ₉ S ₂₄), Kerman-1 (S ₂₂ S ₂₄), Kerman-19 (S ₁₁ S ₂₃), Kerman-5 (S ₄ S ₂₁), Khorshidi (S ₄ S ₈), La Mona (S ₂₃ S ₂₅), Liso (S ₁₀ S ₂₃), Mamaei (S ₆₁ S ₆₃), Marcona (S ₁₁ S ₁₂), Marcona de San Joy (S ₂₂ S ₂₇), Marie Dupuy (S ₆ S ₃₉), Mashhad-13 (S ₁₂ S ₂₄), Mashhad-40 (S ₅₇ S ₅₉), Mashhad-8 (S ₄ S ₂₇), Mashhad-91 (S ₂ S ₂₄), Menut (S ₁₀ S ₁₃), Moldavskiy 810 (S ₆ S ₂₈), Moldavskiy 812 (S ₂₇ S _{31H}), Mollar (S ₈ S ₂₄), Mollar de la Princesa (S ₂₄ S ₅₃), Monagha-dirgol (S ₅₄ S ₆₀), Mullisa Piccola (S ₁₀ S ₁₁), Nerone (S ₆ S ₁₈), Nivera Manza (S ₂ S ₅), Óriás Kagyló (4/3) (S ₆ S ₂₅), Padre (S ₁ S ₁₈), Padre Santo (S ₃ S ₁₀), Pané-Barquets (S ₁ S ₃₄), Parque Samá (S ₁ S ₃₅), Piatta Mollisa (S ₆ S ₂₇), Pizzuta d'Avola (S ₁₈ S ₂₃), Planeta de las Garrigues (S ₂₂ S ₃₅), Ponç (S ₆ S ₂₇), Poostnazok (S ₅₅ S ₅₉), Pou d'Establiments (S ₁₂ S ₃₃), Pozdnyi (S ₂₄ S ₃₉), Primorskiy (S ₅ S ₉), Rabie (S ₇ S ₂₇), Ramillete (S ₆ S ₂₃), Redonda de Palma (S ₃ S ₂₅), Retsou (S ₂ S ₃), Rizsangi (S ₂ S ₁₃), Rof (S ₅ S ₂₃), Rumbeta (S ₁₁ S ₂₁), Scumissa (S ₁ S ₂₅), Shahrekord-Ar (S ₅₆ S ₆₃), Shahrekord-G2 (S ₁₀ S ₅₆), Shahrodi-21 (S ₁₃ S ₂₄), Sher Badam (S ₁₃ S ₄₅), Shiraz-46 (S ₁₁ S ₂₄), Shirbadam (S ₂ S ₄), Somerton (S ₁ S ₂₃), Szigetcsépi 55 (52/18) (S ₂₈ S ₃₈), Szigetcsépi 92 (S ₂₂ S ₃₆), Tejada-2 (S ₁ S ₂₂), Tejari (S ₂₄ S ₅₄), Tendra Amarga (S ₂₁ S ₂₃), Tétényi Bótermő (S ₈ S _{31H}), Tétényi Keményhjú (S ₆ S ₁₃), Tío Martín (S ₂₃ S ₂₇), Titán (S ₈ S ₁₄), Totsol (S ₈ S ₃₁), Verruga (S ₅ S ₁₀), Vinoslivyi (S ₁₁ S ₃₆), Vivot (S ₆ S ₂₃), Winters (S ₁ S ₁₄), Yazd-15 (S ₁₃ S ₆₃), Yazd-17 (S ₅₇ S ₅₈), Yazd-21 (S ₆ S ₅₇), Yosemite (S ₈ S ₁₀), Zanjan-1 (S ₂₄ S ₆₃)	

1.2.4. Origen e importancia de la auto-compatibilidad en el almendro

Aunque tradicionalmente el almendro se ha considerado una especie auto-incompatible, se han identificado algunas variedades auto-compatibles. Ya en 1976 Grasselly y Olivier descubrieron en la región italiana de Apulia una población natural de variedades auto-compatibles a partir de las cuales se sentaron las bases de la auto-compatibilidad en los programas de mejora.

La auto-compatibilidad es un carácter fundamental para los mejoradores ya que proporciona numerosas ventajas (Dicenta y col., 2000b):

- Permite el cultivo de plantaciones monovarietales, sin necesidad de introducir variedades inter-compatibles de floración coincidente, aunque su introducción mejora la productividad.
- No es obligatorio instalar colmenas en la plantación (aunque siempre es recomendable), para que se lleve a cabo la polinización cruzada.
- No es necesaria una climatología favorable que permita el vuelo de insectos polinizadores.
- La recolección de toda la plantación se puede realizar simultáneamente y almacenar conjuntamente toda la producción.
- No es necesaria la introducción de una variedad polinizadora, generalmente menos interesante, que vaya en detrimento del número de árboles de la variedad principal.

Todas estas ventajas han hecho de la auto-compatibilidad un objetivo fundamental para los mejoradores, que han introducido este carácter en las descendencias principalmente mediante el cruzamiento entre una variedad auto-compatible y una variedad auto-incompatible (Socias i Company y Felipe, 1992; Duval y Grasselly, 1994; García y col., 1996; Godini y Palasciano, 1997; Vargas y col., 1997; Gradziel y Kester, 1998; Ortega y Dicenta, 2003; Dicenta y col. 2009).

Aunque a día de hoy se desconoce el origen del alelo S_f en almendro, se han propuesto distintas hipótesis para explicar la auto-compatibilidad en esta especie. La primera de ellas propone que la auto-compatibilidad pudo aparecer como consecuencia de una mutación natural en el locus S , y que posteriormente se habría mantenido durante los procesos de selección llevados a cabo por los agricultores, que observaron su incidencia positiva sobre la producción (Graselly y Olivier, 1976). Sin embargo, otros autores defienden que la auto-compatibilidad apareció en el almendro cultivado mediante su hibridación con el almendro silvestre *Prunus webbii* (Spach) Vierh. (Godini, 1979; Socias i Company, 1984; Reina y col., 1986; Yamashita y col., 1987). Posteriormente Bošković y col. (2007) sugirieron que el alelo S_f era consecuencia de una mutación puntual en la región C2 del alelo S_{30} , aunque dicha hipótesis quedó invalidada al conocerse que esta mutación se debía a un error de secuenciación, de manera que los alelos denominados como S_{30} y S_f son el mismo. Recientemente Fernández i Martí y col., (2014) han propuesto que el origen de la auto-compatibilidad del alelo S_f está determinado por alteraciones epigenéticas fuera del locus S , aunque debido a que la información genética de la que se dispone es escasa, por el momento no es posible asociar esta alteración con el locus S .

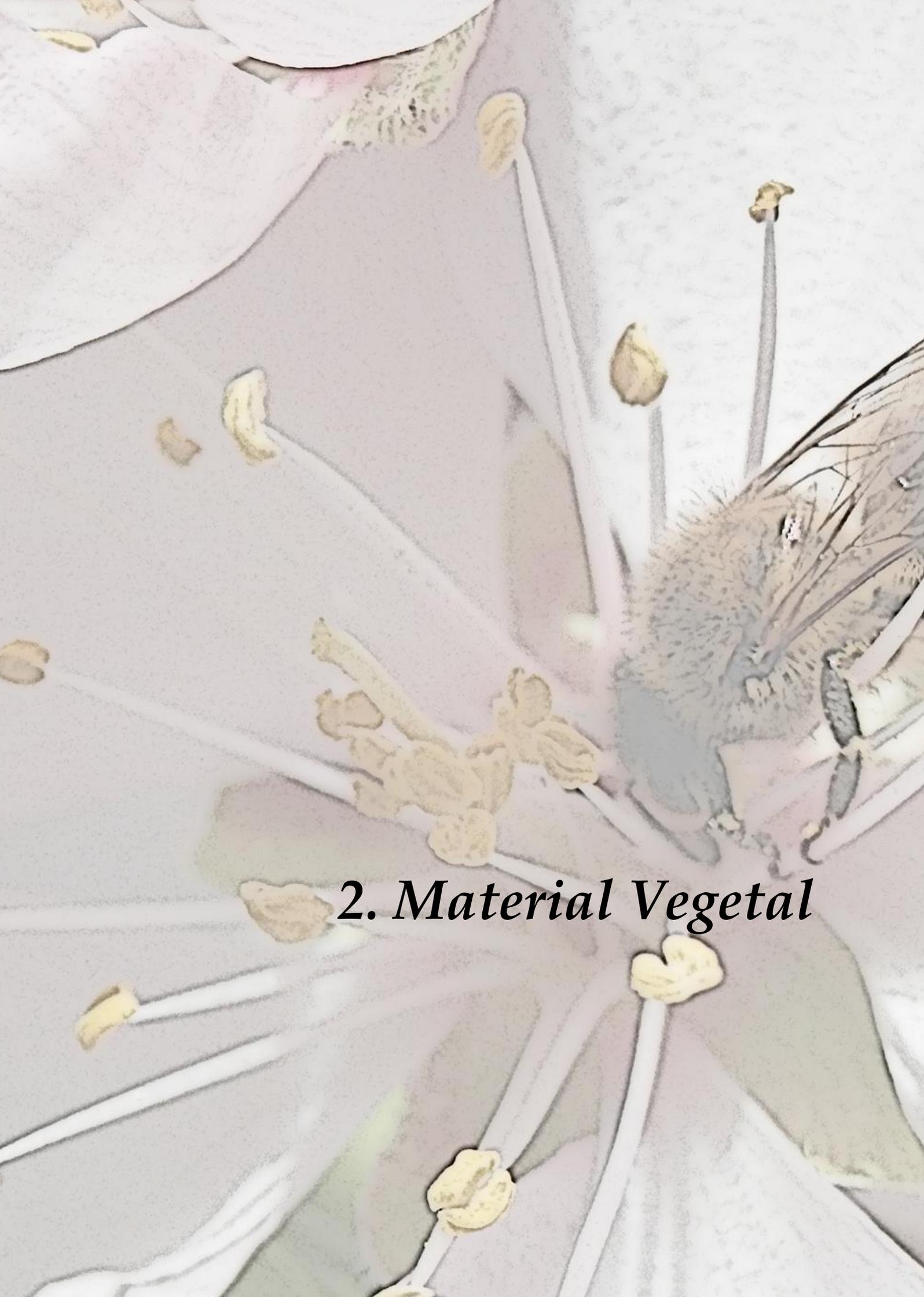
Por otro lado, en los últimos años se han identificado algunas variedades que aunque presentan el haplotipo S_f no tienen, como cabría esperar, fenotipo auto-compatibile, (Kodad y col., 2009; Kodad y col., 2010; Fernández i Martí y col., 2010; Martínez-García y col., 2011). Estos hechos apoyan la posible implicación de factores modificadores en el sistema de incompatibilidad del almendro localizados fuera del locus S y que causan la auto-compatibilidad, como ocurre en determinadas variedades de albaricoquero (Vilanova y col., 2006; Zuriaga y col., 2013) y cerezo (Wünsch y Hormaza, 2004; Cachi y Wünsch, 2014). Además, estudios de genética de

asociación indican que estos factores podrían estar localizados en almendro en los grupos de ligamiento 6 y 8, pues es en estas regiones donde se han encontrado dos QTLs fuera del locus *S* que afectarían al sistema de incompatibilidad (Fernández i Martí y col., 2011).

1.3. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta memoria es avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares de la incompatibilidad floral en almendro. Para ello, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar fenotípicamente el haplotipo *S_f* en variedades con distinto fenotipo y estudiar la distribución genotípica de su descendencia.
- Caracterizar molecularmente el haplotipo *S_f* en variedades con distinto fenotipo
- Analizar, mediante transcriptómica comparativa, pistilos de variedades con haplotipo *S_f* y distinto fenotipo y su validación mediante expresión génica.
- Determinar el perfil proteómico de pistilos y anteras de variedades con haplotipo *S_f* y distinto fenotipo, y estudiar su relación con el mecanismo de incompatibilidad floral en almendro.



2. Material Vegetal

2. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal estudiado en esta tesis doctoral se compone de diversas variedades de almendro incluidas en la colección de variedades de almendro del CEBAS-CSIC, de selecciones y descendencias obtenidas en nuestro programa de mejora y de una selección de material autóctono de almendro del Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete (ITAP).

Los árboles utilizados para los análisis se encuentran en la finca experimental del CEBAS-CSIC “Tres Caminos” (Figura 2.1), situada en el término municipal de Santomera (Murcia), a una altitud de 130 metros, con veranos muy calurosos e inviernos suaves, en los que las temperaturas mínimas normalmente superan los 0°C. El cultivo se realiza con riego localizado y con unos marcos de plantación de 4x5 metros para las colecciones y de 3x1 metros para las descendencias.

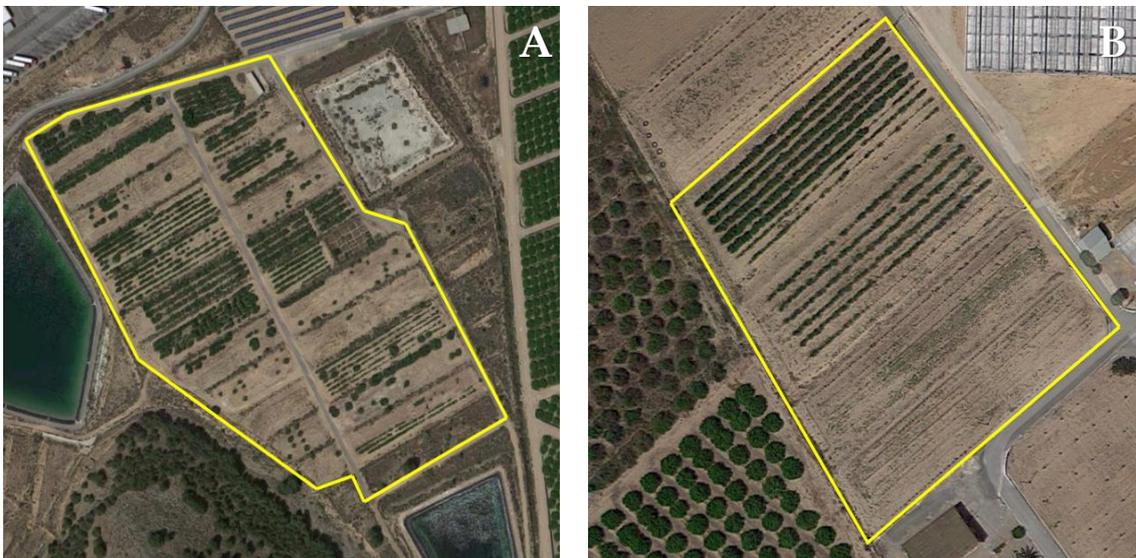


Figura 2.1. Vista aérea de las parcelas experimentales (delimitadas en color amarillo), situadas en la Finca Tres Caminos (Santomera, Murcia). **A.** Parcelas con variedades de almendro, selecciones y descendientes de almendro en distinta fase de selección. **B.** Parcelas con descendencias de almendro obtenidas más recientemente, en una fase de selección inicial.

2.1. VARIEDADES DE ALMENDRO

En este trabajo se han utilizado diferentes variedades de almendro, cuyas características se describen a continuación.

- **Del Cid:** variedad auto-incompatible ($S_{12}S_{22}$) de origen desconocido, que presenta una época de floración media (tres días antes que Marcona) y vigor alto. Su época de maduración es media y su productividad alta. Presenta frutos de cáscara muy dura y de forma similar a Marcona.
- **Ferraduel:** variedad auto-incompatible (S_1S_4) de origen francés, obtenida por Grasselly (INRA) del cruzamiento Cristomorto×Aï. De floración tardía y muy vigorosa, tiene una época de maduración media y elevada productividad.
- **Lauranne:** variedad francesa auto-compatible (S_3S_f) obtenida en 1978 en el INRA, procedente del cruzamiento Ferragnès×Tuono. De floración tardía y vigor medio, tiene una época de maduración media y una buena productividad. La cáscara es dura y su semilla de tamaño medio.
- **Marcona:** variedad originaria del levante español, probablemente de la provincia de Alicante. Es auto-incompatible ($S_{11}S_{12}$), de porte medio, floración temprana y maduración media. Variedad muy productiva en ocasiones, pero algo alternante. Presenta frutos redondeados de cáscara dura muy apreciados por su calidad.
- **Marta:** variedad obtenida en el programa de mejora del CEBAS-CSIC, procede de un cruzamiento realizado en 1985 entre Ferragnès y Tuono. Es auto-compatible (S_1S_f), florece unos días antes que Ferragnès y posee maduración temprana. Variedad muy productiva con árboles de gran

vigor y porte erecto, presenta un buen comportamiento frente a las heladas tardías y sus frutos son de cáscara dura.

- **Tuono:** variedad italiana auto-compatible (S_1S_f) de origen desconocido, que presenta floración tardía y vigor medio. Su época de maduración es temprana, y presenta una elevada productividad, con frutos de cáscara dura, sabor ligeramente amargo y presencia de semillas dobles.
- **Vivot:** originaria de Mallorca, es una variedad auto-incompatible ($S_{23}S_{fa}$), de floración temprana (una semana antes que Marcona) y vigorosa. Es una variedad muy productiva, de maduración tardía, que presenta frutos con cáscara muy dura.

2.2. SELECCIONES DE ALMENDRO

- **A2-198:** selección auto-compatible homocigótica (S_fS_f), de floración tardía obtenida en el CEBAS-CSIC mediante la autofecundación de la selección C1-322, procedente del cruzamiento Tuono×Genco.
- **D01-188:** selección auto-compatible heterocigótica ($S_{11}S_f$), de floración temprana, obtenida en el CEBAS-CSIC del cruzamiento Antoñeta×Marcona.
- **D05-187:** selección auto-compatible homocigótica (S_fS_f), de floración extra-tardía y amarga, obtenida en el CEBAS-CSIC de la polinización libre de la selección D00-349.

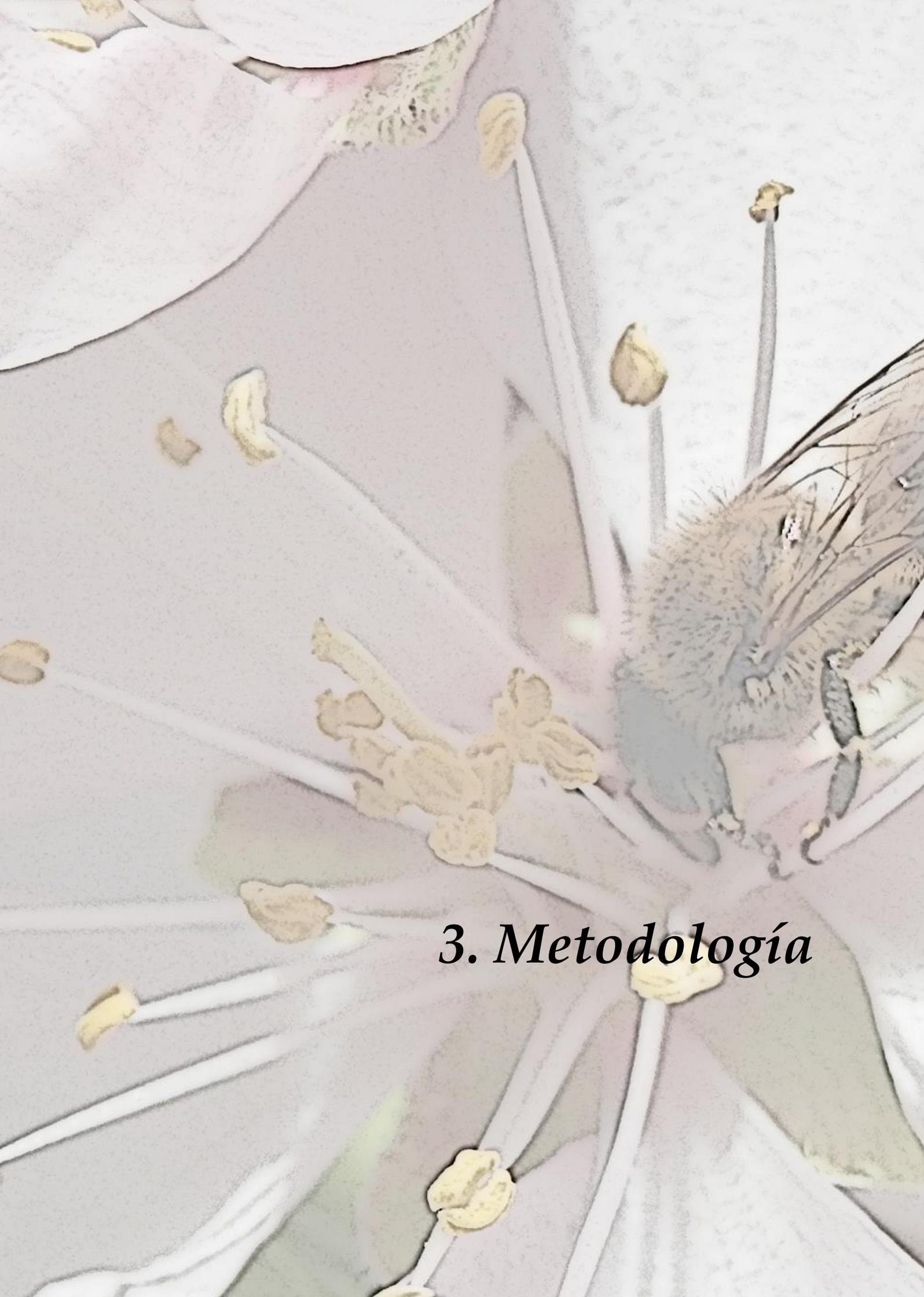
- **D07-332:** selección auto-compatible homocigótica (S_fS_f), de floración extra-tardía, obtenida en el CEBAS-CSIC del cruzamiento Tardona×R1000.
- **ITAP-1 (PSCA MSPF 2):** selección localizada durante una prospección del ITAP en la localidad de Socovos (Albacete). Es auto-incompatible ($S_{11}S_f$), con buena densidad floral, época de floración coincidente con Marcona y resistente a las heladas. Presenta una producción regular.

2.3. DESCENDENCIAS

Durante la realización de la presente tesis se han creado y analizado genotípicamente varias descendencias (Tabla 2.1.) cuyos parentales se encuentran entre los descritos anteriormente.

Tabla 2.1. Descendencias estudiadas, año de plantación y árboles obtenidos.

Año plantación	Genitor femenino	Genitor masculino	Árboles
2013	ITAP-1 ($S_{11}S_{fa}$)	Marta (S_1S_f)	23
	Marta (S_1S_f)	ITAP-1 ($S_{11}S_{fa}$)	30
	Ferraduel (S_1S_4)	ITAP-1 ($S_{11}S_{fa}$)	50
	ITAP-1 ($S_{11}S_{fa}$)	Ferraduel (S_1S_4)	25
	A2198 (S_fS_f)	ITAP-1 ($S_{11}S_{fa}$)	28
2014	D01-188 ($S_{11}S_f$)	A2198 (S_fS_f)	33
	D01-188 ($S_{11}S_f$)	ITAP-1 ($S_{11}S_{fa}$)	14
	A2198 (S_fS_f)	D01-188 ($S_{11}S_f$)	6
2015	D05-187 (S_fS_f)	D01-188 ($S_{11}S_f$)	10
	D05-187 (S_fS_f)	Vivot ($S_{23}S_{fa}$)	7
	D05-187 (S_fS_f)	ITAP-1 ($S_{11}S_{fa}$)	9
	D07-332 (S_fS_f)	Vivot ($S_{23}S_{fa}$)	2



3. Metodología

3. METODOLOGÍA

3.1. DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO DE INCOMPATIBILIDAD

En los programas de mejora del almendro, tradicionalmente se han utilizado dos metodologías para determinar el fenotipo auto-compatible o auto-incompatible del material vegetal: la auto-polinización manual o embolsado de ramas con las flores cerradas y posterior determinación del cuajado de frutos, y la observación microscópica de la presencia de tubos polínicos en el ovario tras la autopolinización.

3.1.1. Polinización manual en campo

La polinización en campo de las variedades y selecciones descritas en el Apartado 2, se realizó durante el inicio de su floración, con polen extraído previamente.

Extracción de polen

De cada una de las variedades y selecciones estudiadas se recogieron botones florales un día antes de antesis. En ese momento los botones presentan una apariencia globosa que se corresponde con el estado “D-E” descrito por Felipe (1977) (Figura 3.1). En este estado fenológico las flores están cerradas y sus anteras están aún indehiscentes, lo que asegura que los pistilos no se encuentran polinizados. Además, tanto los pistilos como el polen, se consideran maduros (Ortega y Dicenta, 2004).

De los botones florales se separaron las anteras y se colocaron en recipientes de papel a temperatura ambiente durante 24 horas, tiempo durante el que se produjo su dehiscencia y la liberación de los granos de polen.

Transcurrido este tiempo, el polen fue recogido en botes de cristal y mantenido a 4 °C hasta su utilización. En los ensayos en que fue necesario conservar el polen para el año siguiente, se almacenó a -20 °C.

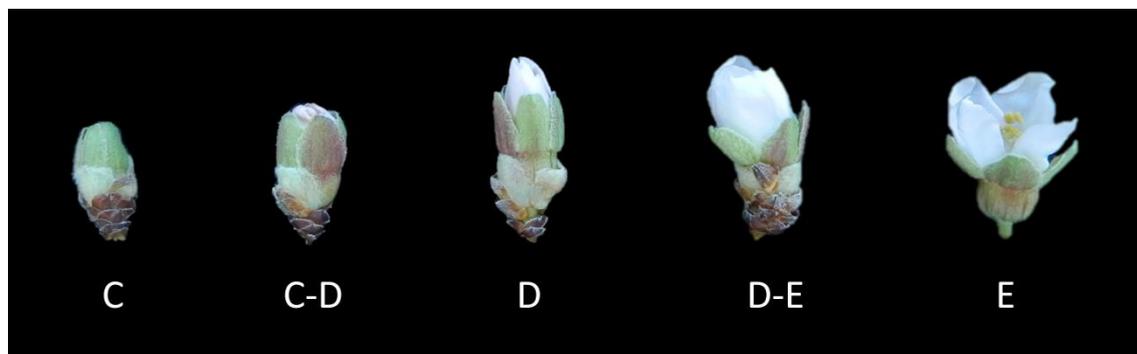


Figura 3.1. Estados fenológicos del almendro según Felipe (1977). Aparecen los estados intermedios C-D y D-E, en este último fue cuando se tomaron las muestras para la realización de los distintos análisis.

Determinación de la viabilidad del polen

La comprobación de la viabilidad del polen *in vitro* se realizó siempre antes de su utilización en las polinizaciones. Para su determinación se usaron placas Petri estériles con 25 ml de medio gelificado de sacarosa al 15% y agar al 1,2% en agua destilada (Remy, 1953). El medio se introdujo en un autoclave durante 20 minutos a 121 °C para su perfecta disolución y esterilización. A continuación se vertieron 25 ml de solución en cada placa Petri y una vez gelificado el agar las placas se conservaron a 4 °C hasta su utilización.

Para determinar la viabilidad de cada muestra de polen, los granos se depositaron uniformemente en la placa Petri con la ayuda de un pincel y se incubó seis horas a 22 °C, temperatura considerada óptima para el crecimiento del polen de almendro (Socias i Company, 1974; García y Egea, 1979). Transcurrido este tiempo se observaron los granos de polen mediante microscopía óptica (x10 aumentos), considerándose que un grano de polen había germinado cuando la longitud del tubo polínico excedía de su diámetro

(Ducon, 1968). Para cada variedad se prepararon dos placas Petri observando cuatro campos por placa, se contaron el número de granos de polen germinados y no germinados y se calculó el porcentaje medio de germinación.

Polinización en campo

Una vez elegida y etiquetada la rama que iba a ser polinizada se eliminaron las flores abiertas y aquellas que se encontraban en un estado de desarrollo muy retrasado, utilizándose sólo los botones a punto de abrir, en estado D-E (Figura 3.1). Estos botones fueron emasculados, dejando el pistilo desnudo, que fue polinizado con la ayuda de un pincel impregnado en el polen preparado anteriormente (Figura 3.2).



Figura 3.2. Polinización controlada en campo. **a)** Detalle de la emasculación del botón floral. **b)** Pistilo emasculado. **c)** Polinización controlada realizada con la ayuda de un pincel.

3.1.2. Embolsado

Para realizar el embolsado de ramas se seleccionaron 2 ramas representativas de cada genotipo, se eliminaron las flores abiertas y los botones muy atrasados, se contaron los botones restantes y se aisló la rama mediante una bolsa de malla. La luz de la malla (1,20 x 0,90 mm) evita la entrada de insectos polinizadores, de manera que los frutos obtenidos proceden de autofecundación, pero no modifica en ambiente interior de la bolsa (Figura 3.3.).



Figura 3.3. Embolsado de ramas para la determinación del cuajado de los frutos. **a)** Momento del embolsado de la rama donde se aprecian botones florales **b)** Se observan las flores ya abiertas en el interior de la bolsa **c)** Momento de la retirada de la bolsa donde se aprecia en su interior algún fruto proveniente de autopolinización.

3.1.3. Determinación del cuajado de frutos

Sesenta días después de la polinización manual de las flores en campo y del embolsado de las ramas, se contó el número de frutos cuajados. Posteriormente se calculó el cuajado de frutos, como el porcentaje de flores en las bolsas o polinizadas en las ramas que dieron lugar a fruto en este tiempo.

3.1.4. Observación del crecimiento de los tubos polínicos mediante microscopía de fluorescencia

Para la realización de esta técnica, se polinizaron en el laboratorio botones florales en estado D-E (Felipe, 1977) (Figura 3.1.). En este estado, como se ha indicado anteriormente, tanto pistilos como polen se consideran maduros, y los

estilos son ya capaces de rechazar el polen incompatible (Ortega y Dicenta, 2004). Los botones florales fueron desprovistos de la corola, los estambres y parte del cáliz, y a continuación colocados en bloques de espuma floral húmeda, situados sobre bandejas de plástico con agua (Figura 3.4). Las bandejas permanecieron a temperatura ambiente durante 24 horas, momento que coincidiría con la antesis de la flor. Transcurrido este tiempo, la receptividad del estigma es óptima y los pistilos fueron polinizados manualmente depositando el polen (extraído como se indica en el Apartado 3.1.2) sobre el estigma con ayuda de un pincel e incubados a 22 °C y 60% de humedad durante 96 horas, tiempo estimado como suficiente para que el tubo polínico alcance el ovario en condiciones de temperatura óptima (22 °C) y constante (Ortega y col., 2002). Transcurrido este tiempo, los pistilos fueron recogidos en frascos de cristal que contenían 5 ml de la solución fijadora FAA y conservados a 4 °C hasta su posterior preparación para la observación microscópica.

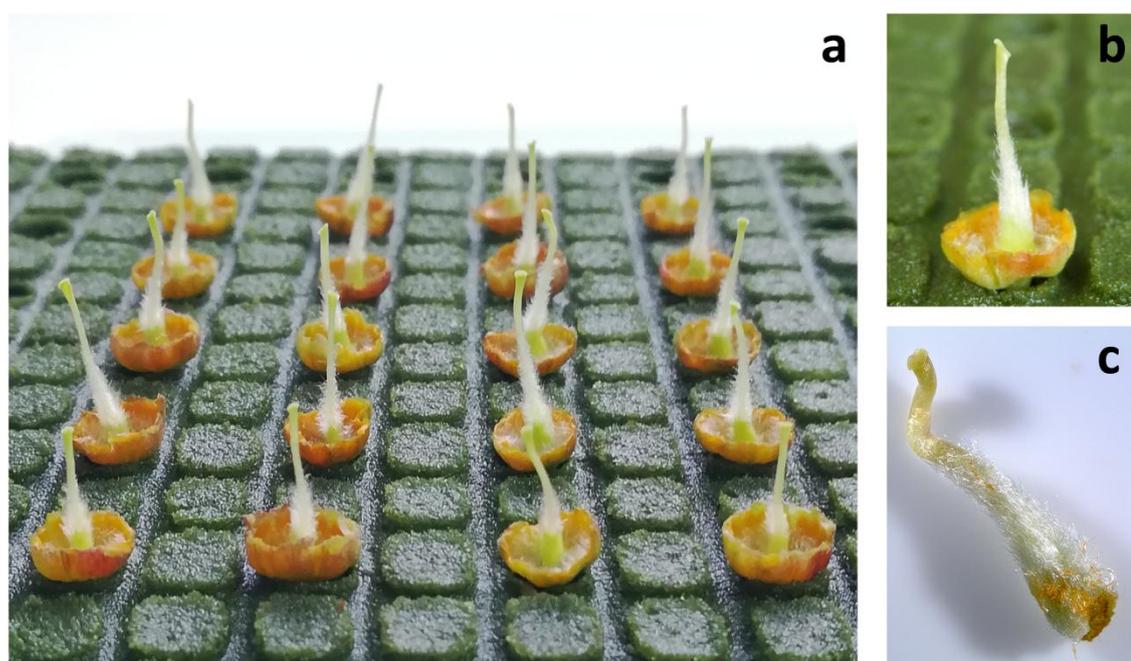


Figura 3.4. Polinización controlada en laboratorio. **a)** Pistilos sobre espuma floral húmeda en bandeja con agua. **b)** Detalle de un pistilo tras ser polinizado, se aprecia como el estigma tiene un color amarillento debido al polen. **c)** Pistilo desprovisto del cáliz listo para ser procesado o conservado.

Para eliminar la solución fijadora de los pistilos, cada frasco fue lavado tres veces con agua destilada a intervalos de 1 hora. Seguidamente, a cada frasco se le añadió 5 ml de una solución de sulfito sódico al 5%, y se introdujo 10 minutos en un autoclave a 120 °C y 1 atm de presión para ablandar los tejidos y facilitar la tinción. Cuando los frascos se habían enfriado se eliminó la solución de sulfito, y se lavaron los pistilos durante 10 minutos con agua. A continuación los pistilos se tiñeron con una solución de azul de anilina al 0,1% en tri-potasio fosfato al 0,1N (pH 8,75) y se conservaron a 4 °C.

Transcurridas al menos 12 horas desde la tinción, se eliminó la pilosidad de la epidermis del pistilo con la ayuda de unas pinzas, utilizando para ello una lupa binocular. A continuación los pistilos fueron colocados en un portaobjetos y aplastados con un cubreobjetos mediante la técnica de aplastamiento o "squash". Estas preparaciones se observaron mediante microscopía de fluorescencia, usando para ello un microscopio Olympus BH2 con un sistema adaptado de luz ultravioleta BH2-RFL-T2, que utiliza como fuente luminosa una lámpara de alta presión de mercurio Osram HBO 100 W/2.

Con esta tinción son teñidos los depósitos de calosa que se producen en el tubo polínico durante su crecimiento discontinuo. Estos depósitos aparecen de un color verde-amarillento al ser iluminados con luz ultravioleta, lo que permite seguir el crecimiento del tubo polínico a través del pistilo (Figura 3.5.) (Linskens y Esser, 1957; Martin, 1959; Kho y Baër, 1968). En cada caso se determinó si los granos de polen habían germinado en el estigma, o los tubos polínicos habían alcanzado el primer, el segundo, el tercer tercio del estilo, o el ovario.

La relación de incompatibilidad en cada cruzamiento se determinó en base al número de pistilos que presentaban tubos polínicos en el ovario de los 10 pistilos analizados, considerándose compatibles las polinizaciones en las que más de un 40% de los pistilos presentaban tubos polínicos en el ovario (Ortega y Dicenta, 2004).

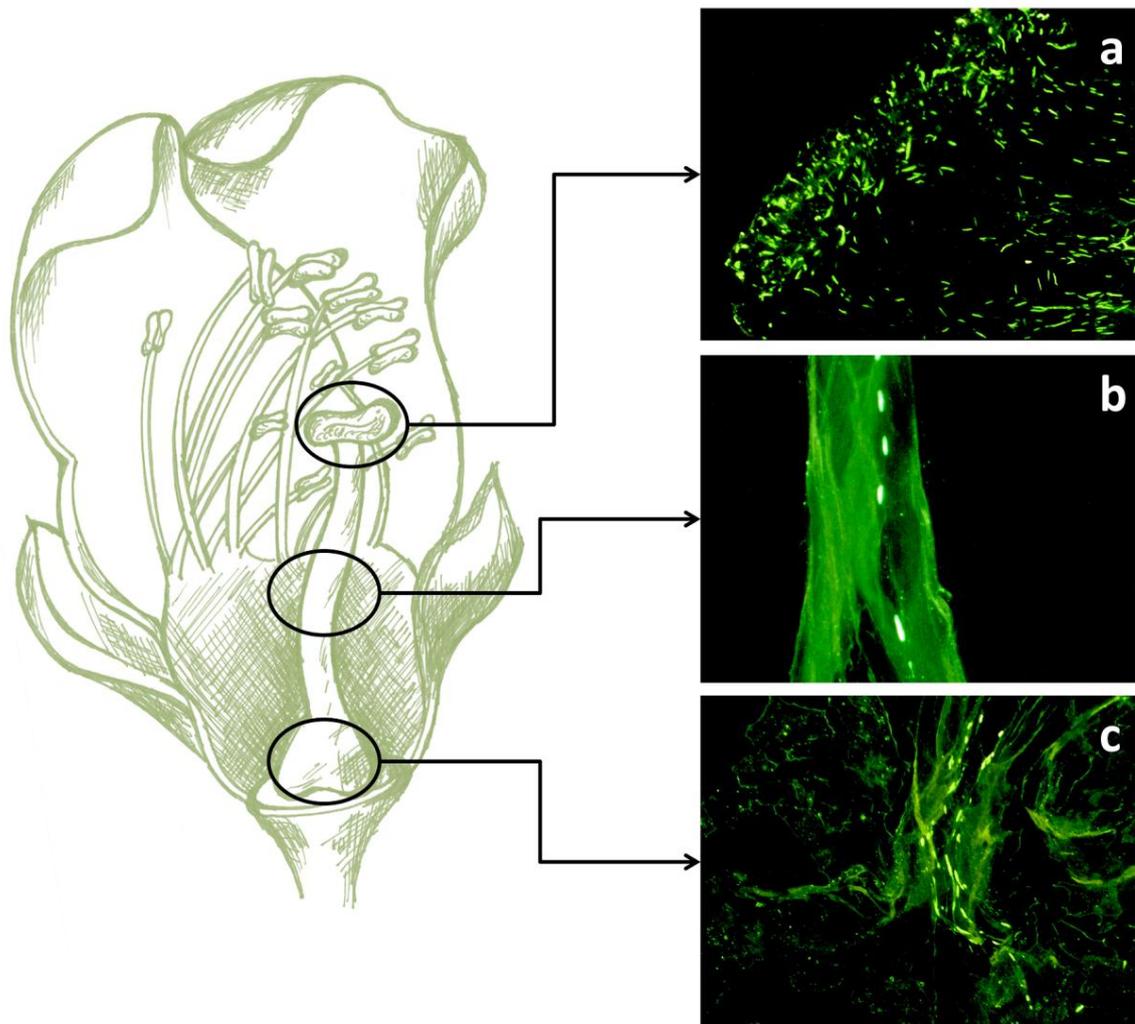


Figura 3.5. Esquema de una flor de almendro y observación del avance de los tubos polínicos en un pistilo polinizado, los cuales son visualizados gracias a la tinción de los depósitos de calosa que se producen durante el crecimiento del tubo polínico y que emiten fluorescencia al ser iluminados con luz ultravioleta. **a)** Crecimiento de los tubos polínicos en el estigma. **b)** Tubos polínicos en el segundo tercio del estilo. **c)** Detalle de los tubos polínicos en el ovario, tras una polinización compatible.

3.2. ACTIVIDAD RIBONUCLEASA E IDENTIFICACIÓN DEL GENOTIPO DE INCOMPATIBILIDAD Y

La identificación del genotipo de incompatibilidad (genotipo *S*) en almendro puede realizarse mediante el análisis de las proteínas implicadas en la incompatibilidad floral o mediante el estudio de los ácidos nucleicos.

3.2.1. Isoelectroenfoque de proteínas estilares y tinción para actividad ARNasa

La técnica del isoelectroenfoque se basa en la separación de proteínas en función de su carga neta nula o punto isoeléctrico. Esta propiedad intrínseca de las proteínas permite determinar el genotipo *S* de las variedades de almendro (Bošković y col., 1997).

Extracción de ribonucleasas estilares

Para cada muestra se utilizaron 20 estilos de botones en estado D-E. Estos botones se mantuvieron en frío desde su recogida hasta el final de la extracción para evitar la pérdida de actividad de las ARNasas, se extrajeron los pistilos de los botones y con ayuda de un bisturí se les retiró el ovario, siendo los estilos conservados a -80 °C. Los estilos fueron triturados en un mortero con 1 ml de tampón de extracción (30% DMSO, 10% sacarosa, 0,1% meta-bisulfito sódico, 0,2% Pharmalyte pH 3-10 (Farmacia Amershan Biotech) y 0,5% Triton X-100 al 10%) hasta obtener una mezcla homogénea que se recogió en tubos eppendorf de 1,5 ml. Las muestras fueron centrifugadas a -4 °C durante 1 hora a 14.500 rpm en una centrífuga Sigma 2-16PK, con un rotor 12148. A continuación, el sobrenadante fue recogido en un tubo nuevo para su cuantificación mediante el método Bradford (Bradford, 1976), tras lo que los extractos fueron conservados a -20 °C.

Electroforesis vertical en geles de poliacrilamida

La electroforesis se realizó a 4 °C usando una solución 40 mM de DL-ácido glutámico en la zona del ánodo y 0,1M de hidróxido sódico en el cátodo. Los geles de 7,5% de poliacrilamida, con un tamaño de 16 x 18 x 0,75 cm, estaban además compuestos de 10% sacarosa, 4% Pharmalyte pH 3-10, 1,2%

Pharmalyte pH 6,7-7,7, 0,4% persulfato de amonio al 10% y 0,1% de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina).

Tras 30 minutos de pre-enfoque a 100 V, se cargaron 15 µl de cada extracto (correspondientes a 5 µg de proteína) y se aplicaron las siguientes condiciones de electroforesis: 1 hora a 150 V, 1 hora a 300 V y 4 horas a 450 V.

Tinción de geles

Los geles fueron teñidos para actividad ribonucleasa según Wilson (1971) y Bošković y col. (1997), con alguna modificación.

Una vez completada la electroforesis, los geles fueron sacados de las placas de vidrio e incubados con agitación a 37 °C durante 15 minutos en tampón 0,1 M de acetato sódico y 0,1 M de cloruro potásico con el pH ajustado a 5,8. Transcurrido este tiempo, el tampón se reemplazó por una solución de ARN (RNA from *Torula utilis*, Fluka) al 0,1% en el mismo tampón y se incubó durante 40 minutos en las condiciones anteriores. Posteriormente se eliminó la solución de ARN y se sustituyó por la inicial incubando los geles en las mismas condiciones durante 20 minutos. A continuación se eliminó esta solución incubándose los geles a temperatura ambiente en una solución de ácido acético al 7% durante un minuto para detener la acción de las enzimas sobre el ARN. Finalmente, los geles fueron teñidos en una solución de Azul de Toluidina al 0,2% durante 4 minutos, enjuagándose a continuación con agua destilada. Para conseguir un mayor desteñido de los geles y, por tanto, una mejor percepción de las bandas, éstos se mantuvieron a 4 °C en agua destilada durante al menos 12 horas.

Tras el desteñido, los geles fueron observados con un transiluminador de luz blanca, apreciándose sobre la tonalidad azul del fondo, las bandas blancas, correspondientes a la presencia de actividad ribonucleasa. Cada uno de los

alelos *S* de incompatibilidad se localiza en una posición determinada, que puede identificarse la utilización de variedades de referencia de genotipo *S* conocido. La excepción es el alelo auto-compatible *Sf*, que no tiene actividad.

3.2.2. PCR y electroforesis horizontal en geles de agarosa

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction) (Mullis y col., 1986) es utilizada tradicionalmente para amplificar de manera específica determinadas regiones del ADN. El nuestro caso ha sido utilizada para determinar el genotipo de incompatibilidad de cada variedad en función del tamaño de la banda amplificada. Previamente a la realización de la PCR fue necesario extraer ADN y cuantificarlo, procesos que se describen en detalle a continuación.

Extracción de ADN genómico

El ADN genómico fue extraído de hojas jóvenes de los genotipos estudiados, siguiendo el método CTAB miniprep descrito en Sonneveld y col. (2001). Este método es una modificación del propuesto por Doyle y Doyle (1987). Para cada extracción se utilizó un disco foliar de 1 cm de diámetro que se colocó en un tubo Eppendorf de 2 ml junto con una bola de acero inoxidable de 3,5 mm de diámetro, necesaria para su posterior molienda. Los tubos se sumergieron en nitrógeno líquido y a continuación se dispusieron en gradillas que se colocaron en un molino mezclador (modelo MM 200 de Retsch), triturando las muestras hasta obtener un polvo muy fino.

A cada tubo se le añadieron 750 µl de tampón de extracción (100mM Tris pH8, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 2% PVP 40, 2% CTAB, 1% β-mercaptoetanol) a 65 °C. Cada muestra se mezcló mediante inversión y se incubó a 65 °C durante 3 minutos. A continuación se añadieron 750 µl de cloroformo:isoamilalcohol

(24:1) y se homogeneizó durante tres minutos. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas en una microcentrífuga durante 10 minutos a 14.000 rpm y la fase superior transferida a un tubo Eppendorf de 1,5 ml donde se le añadieron 450 μ l de isopropanol, a -20 °C. El contenido del tubo se mezcló cuidadosamente por inversión para que se produjera la precipitación de ADN, y se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue eliminado mediante decantación, y seguidamente el pellet de ADN formado se lavó con 500 μ l de etanol al 70% (conservado a -20 °C). Tras este paso se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante, se secó el pellet de ADN a temperatura ambiente dejando los tubos abiertos y tumbados horizontalmente sobre papel secante. Finalmente el pellet se resuspendió en 40 μ l de TE (Tris:EDTA) pH 8 con ARNasa A (10 ng/ml) durante toda la noche a 4 °C. Transcurrido este tiempo las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 30 minutos para degradar el posible ARN presente en los extractos.

Tras las extracciones, el ADN fue cuantificado por espectrofotometría, usando para ello un NanoDrop 1000 (ThermoScientific) donde además se pudo comprobar la pureza y los contaminantes presentes en las muestras. El ADN también fue cuantificado mediante comparación visual en geles de agarosa, lo que permitió además comprobar su integridad. Para el desarrollo de esta técnica se utilizó un patrón de 20, 60 y 100 ng de ADN Lambda disuelto en 10 μ l de agua y 1 μ l de ADN de cada muestra problema disuelto también en 10 μ l de agua. A todas las muestras se le añadió tampón de carga 5x (10% Sacarosa, 0,1% Orange G, 1:40 GelRed) para una concentración final de 1x, fueron cargadas en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1x (40mM Tris, 2mM EDTA, 20 mM ácido acético glacial) y visualizadas al iluminar el gel con luz ultravioleta tras una electroforesis horizontal a 40 V durante 4 horas. La comparación visual de las bandas correspondientes al ADN genómico con los

patrones de ADN Lambda permitió determinar la concentración de ADN analizado .

Amplificación de la *ARNasa-S*

La amplificación parcial de los diferentes alelos de las *ARNasa-S* se realizó usando los cebadores degenerados EM-PC2consFD (5'-TCACMATYCATGGCCTATGGC-3') y EM-PC3consRD (5'-AWSTRCCRTGYTTGTTCCATTC-3') siguiendo el método descrito en Ortega y col. (2005). Para ello se usaron 0,5 U de la polimerasa *Taq* DNA polymerase (Qiagen) en una mezcla de 20 µl de reacción compuesta por tampón de PCR 1x, 2 µl de Q-Solution, 1 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP y 0,3 µM de cada primer. Las condiciones de PCR fueron: 2 minutos de desnaturalización inicial a 94 °C, 35 ciclos de 10 segundos a 94 °C, 2 minutos a 58 °C y 3 minutos a 68 °C, con un incremento de 10 segundos por ciclo, y una extensión final de 10 minutos a 68 °C.

Los productos de PCR fueron observados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1,5% en tampón TAE 1x, determinándose el tamaño de los productos de PCR gracias a la inclusión en el gel del marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen). Para la visualización de las bandas se usó el tampón de carga GelRed a una concentración final 1x, y un transiluminador de luz ultravioleta asociado al software de adquisición de imágenes GeneSnap (SYNGENE).

Para cada muestra analizada se observaron una o dos bandas (individuo homocigótico o heterocigótico), que se asociaron en función de su tamaño con un alelo *S* de la *ARNasa*. Para esta asociación se utilizaron variedades de referencia con un patrón de amplificación conocido (Ortega y col., 2005).

3.3. VERIFICACIÓN DEL PEDIGRÍ MEDIANTE EL USO DE MARCADORES MOLECULARES TIPO SSR

La determinación de los parentales de las selecciones creadas se determinó mediante el uso de marcadores moleculares tipo SSR (*Simple Sequence Repeat*), también denominados microsatélites.

Para determinar los polimorfismos asociados a los SSR se cogieron de los árboles a analizar (descendencia del cruzamiento Marta×ITAP-1 junto con los parentales) hojas jóvenes y en buen estado, que tras ser codificadas fueron enviadas al servicio de análisis genético del “Centre for Research in Agricultural Genomics” (CRAG) de Barcelona para su análisis con los siguientes marcadores: BPPCT007, CPPCT005, Ma027, Ma040 y UDP96005 (Dirlewanger y col., 2002; Aranzana y col., 2002; Yamamoto y col., 2002; Cipriani y col., 1999), todos ellos utilizados en almendro anteriormente (Sánchez-Pérez y col. 2006; Dicenta y col., 2015). El proceso seguido en el CRAG se describe brevemente a continuación. En primer lugar el ADN fue extraído siguiendo el método CTAB de Doyle y Doyle (1987) con algunas modificaciones, descrito en el Apartado 3.2.2. Tras esto, se produjo la amplificación mediante PCR de los distintos fragmentos correspondientes a cada marcador y seguidamente se analizaron los tamaños de dichos fragmentos en un secuenciador automático ABI Prism 3130xl (PE/Applied Biosystems). Los fragmentos obtenidos de cada muestra permitieron relacionar los tamaños obtenidos para cada marcador en la descendencia con los obtenidos para cada parental, gracias a lo cual se pudo determinar la relación filogenética entre ellos.

3.4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL LOCUS S_f

Para la caracterización molecular del *locus S_f* se utilizaron técnicas de clonación y secuenciación tras la amplificación de la región promotora de la

ARNasa-S_f, del gen *ARNasa-S_f* y de la región entre este gen y el gen *SFB_f*, región a la que a partir de ahora se denominará como región intergénica.

3.4.1. PCR inversa

La región promotora de la *ARNasa-S_f*, región flanqueante 5', se obtuvo mediante la aplicación de la técnica PCR inversa (PCRi). Esta técnica se basa en una PCR convencional donde los cebadores usados se encuentran orientados de manera opuesta, ya que el molde utilizado para la amplificación es un fragmento de ADN procedente de una restricción, que se ha ligado sobre sí mismo formando un círculo (Figura 3.6.). La técnica se desarrolla según las siguientes etapas.

Digestión enzimática y purificación

El ADN genómico de la selección A2-198, extraído tal y como se indica en el Apartado 3.2.2, fue digerido con la enzima de restricción PciI (Biolabs). Para ello se usaron 10 U de PciI en un volumen de reacción de 50 µl compuesto por el buffer enzimático (1x) y 1 µg de ADN genómico. Para que la reacción se produjera las muestras se incubaron durante 1 hora a 37 °C, inactivándose seguidamente durante 20 minutos a 80 °C.

La mitad del producto de la digestión (25 µl) fue cargado en un gel de agarosa al 1,5% en TAE 1x, junto al marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen), usándose como tampón de carga GelRed (1x). Tras la visualización con un transiluminador de luz ultravioleta se cortó en el gel la zona correspondiente al producto de la digestión cargado, desde su frente de migración hasta la altura de la banda de 2 000 pb indicada por el marcador de peso molecular, pues es en esta zona donde deben encontrarse los fragmentos que contengan el promotor de la *ARNasa-S_f*. La banda extraída del gel fue

purificada siguiendo el protocolo del kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Seguidamente, el ADN digerido fue cuantificado con el NanoDrop 1000 (ThermoScientific).

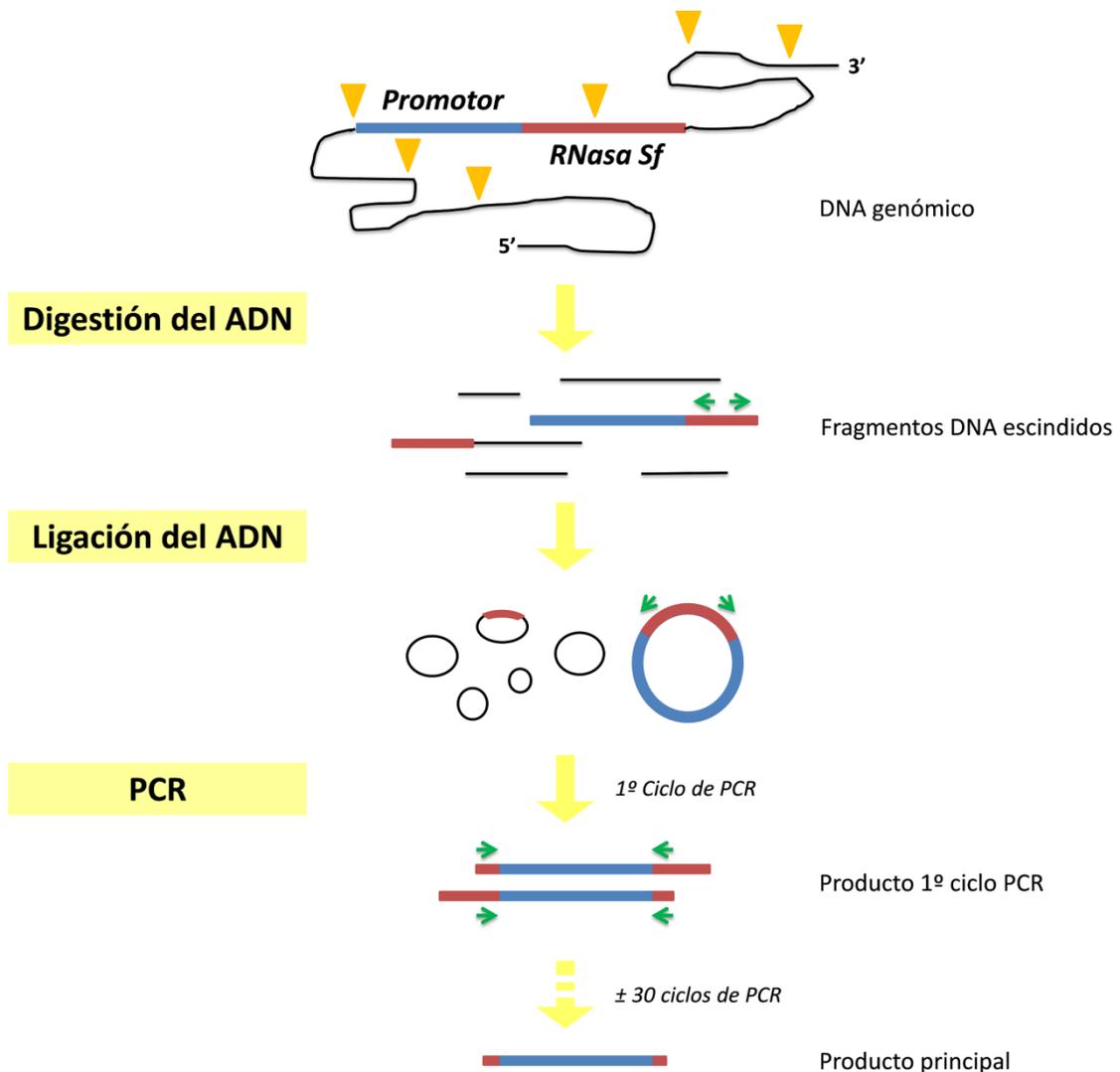


Figura 3.6. Procedimiento esquemático de la PCR inversa basado en la descripción de Ochman y col. 1988. La región conocida (*RNasa Sf*) se representa mediante un rectángulo rosado y la zona flanqueante (Promotor) no conocida mediante un rectángulo azul. El ADN es digerido con una enzima de restricción (los puntos de corte de la enzima se esquematizan con triángulos), posteriormente los fragmentos son “circularizados” con una ADN-ligasa que favorece la formación de círculos monoméricos. Estos fragmentos se amplifican mediante PCR, gracias a los cebadores complementarios a la RNasa, indicados en la figura con flechas verdes.

Auto-ligación

La auto-ligación del ADN escindido se realizó utilizando 5U de ADN ligasa T4 (Thermo Scientific), su buffer específico (1x) y 30 µg de ADN linear en un volumen de 50 µl. Las condiciones en que se llevó a cabo la reacción fueron 10 minutos a 22 °C, seguidos de otros 10 minutos a 65 °C.

PCR inversa

La amplificación de la región promotora de la *ARNasa-S_f* se realizó mediante dos PCRi. En la primera se usó un par de cebadores diseñados en base a la secuencia de la *ARNasa-S_f* incluida en la base de datos EBI con el número de accesión FN429352 (Martínez-García, 2011). Estos cebadores se localizan en el péptido señal, SRNaseSP (5'-GAAGAAAGCGAAACCAAGAACAAG-3') y en la región C5, SRNaseC5 (5'-GTTGTTACATGAAGTGGTATTTTG-3'). Tras obtener el producto de PCR este se secuenció y tras hacer una comparación tipo Blast en la base de datos EBI, se comprobó que la secuencia obtenida era igual a la zona flanqueante 5' del alelo *S_f* de la *ARNasa* con número de accesión AB433984 (Hanada y col. 2009). Así, a partir de esta secuencia se diseñó el par de cebadores Pinter-F: 5'-TTGGTAAGTGGTTTCCTTG-3' y Pinter-R: 5'-TTTTGATGGTTTAGTTGTGCT-3' para la segunda PCRi. La amplificación en ambas iPCRs se realizó en una mezcla de reacción de 12,5 µl que contenía 0,5 U de la polimerasa *Taq* DNA Polymerase (5Prime), tampón de PCR 1x, 2 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP y 2 µM de cada primer. Las condiciones de PCRi fueron: 5 minutos de desnaturalización a 95 °C, 38 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto y 30 segundos a 55 °C, 3 minutos y 30 segundos a 72 °C, y una extensión final a 60 °C durante 30 minutos.

Los productos de la PCRi fueron visualizados en un gel de agarosa al 1,5% en TAE al 1%, junto al marcador de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen),

utilizando el tampón de carga GelRed (1x). A continuación, los productos de PCR amplificados fueron extraídos de la agarosa y purificados siguiendo el protocolo del kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen).

Con los productos purificados de la PCRi se realizó una PCR anidada siguiendo las condiciones descritas anteriormente con la intención de obtener suficiente producto de PCR que poder secuenciar. Así los productos de esta PCR fueron de nuevo purificados con el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) y posteriormente enviados al servicio de secuenciación del Centro de Ricerca e Innovazione (Fondazione Edmund Mach, Italia) para comprobar que tales fragmentos se correspondían realmente con la zona del promotor que queríamos amplificar.

3.4.2. PCR de alta fidelidad

Para la clonación se utilizaron ADN polimerasas de alta fidelidad que poseen mecanismos intrínsecos de verificación y corrección que reducen la posibilidad de introducir errores en las secuencias amplificadas. Se trata de las polimerasas KOD Hot Start DNA polymerase y KOD XL DNA polymerase, de Novagen. Estas enzimas producen fragmentos de extremos romos, y son una mezcla de la ADN polimerasa de alta fidelidad “KOD HiFi” (de *Thermococcus kodakaraensis*) y dos anticuerpos monoclonales, que inhiben las actividades ADN polimerasa y 3'-exonucleasa a temperatura ambiente, lo que reduce la amplificación de fragmentos inespecíficos.

Amplificación de la región promotora de la *ARNasa-S_f*

Una vez se obtuvo la secuencia del promotor de la *ARNasa-S_f* mediante PCRi, se diseñaron cebadores para la amplificación de esta zona completa con enzimas de alta fidelidad que proporcionaron un fragmento adecuado para la

clonación. Los cebadores se localizaron en el extremo 5' de la secuencia promotora obtenida (For Promotor: 5'-ACATGTGACTCAGGTGCTCAA-3') y al inicio del primer intrón de la *ARNasa-S_f* (Rev Promotor: 5'-CTTGTAATGCAACCCACCATC-3'). La reacción de PCR de 30 µl contenía 60 ng de ADN genómico, 1x de tampón de PCR, 0,2 mM de dNTPs, 1 mM de MgSO₄, 0,3 µM de cada primer, y 1 U de KOD Hot Start ADN Polimerasa (Novagen). El programa de PCR utilizado fue el siguiente: 2 minutos de desnaturalización a 94 °C, 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 58 °C y 2 minutos a 68 °C, y una extensión final de 68 °C durante 10 minutos.

Amplificación de la *ARNasa-S_f*

La *ARNasa-S_f* fue clonada desde el péptido señal hasta 100 pares de bases aguas abajo de la región conservada C5 (AY291117), para ello se usaron los cebadores PaConsI-F (5'- MCTTGTTCTTGSTTTYGCTTTCTTC-3') (Ortega y col., 2006) y C5'-ENC-R (5'-GAAAGCTATAATTTTAATGAAACTTA-3') procediéndose según el método indicado en Ortega y col. (2006). De manera que la reacción de PCR de 30 µl, contenía 75 ng de ADN genómico, 1x de tampón de PCR, 0,2 mM de dNTPs, 1mM de MgSO₄, 0,5 µM de cada primer, y 1 U de la polimerasa KOD Hot Start (Novagen). Las condiciones de PCR utilizadas fueron: desnaturalización inicial de 2 minutos a 94 °C, 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 2 minutos a 50 °C, y 4 minutos a 68 °C, y una extensión final de 10 minutos a 68 °C.

Amplificación de la región intergénica

Para la amplificación de la región intergénica se utilizaron dos cebadores. El primero de ellos localizado en la región C5 de la *ARNasa-S_f*, se correspondía con el complemento reverso del cebador EM-PC5consRD (Sutherland y col.

2004), y poseía la siguiente secuencia, 5'-GYTGTTACATGAAGTGGTATTTTG-3'. El otro cebador, que se denominó SFB3'Sf-2 (5'-ATTTTGTTCCTTACTTTCTTACATAG-3'), se ubicó en el dominio F-box del gen *SFB_f*. La reacción de PCR de 30 µl estuvo compuesta por 100 ng de ADN genómico, 1x de tampón de PCR, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM de cada primer, y 1,5 U de la polimerasa KOD XL (Novagen). Se utilizó un programa de PCR de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 5 segundos a 54 °C, y 6 minutos a 74 °C, y una extensión final de 10 minutos a 74 °C.

3.4.3. Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR obtenidos con las polimerasas KOD Hot Start y KOD XL, y los cebadores indicados en cada caso, fueron purificados siguiendo las instrucciones del kit QIAquick Spin de Qiagen. Estas purificaciones tienen como objetivo eliminar los restos de oligonucleótidos, de dNTPs y otras impurezas que pudieran interferir en el proceso posterior de clonación.

Los fragmentos de ADN purificados de esta forma fueron cuantificados en geles de agarosa al 1% en tampón TAE 1x, utilizando un patrón de ADN Lambda, como se describe en el Apartado 3.2.2, incluyéndose además el marcador de peso molecular 1 Kb Plus de Invitrogen, que permitió determinar el tamaño de los fragmentos.

3.4.4. Clonación

Para la clonación, en función de la polimerasa utilizada según la amplificación de las distintas regiones indicadas en el Apartado 3.4.2, se utilizaron los kits de la casa Invitrogen "Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for sequencing", cuando se utilizó la polimerasa KOD Hot Start, y "TOPO XL PCR Cloning kit", cuando la polimerasa utilizada fue la KOD XL. Estos kits están

diseñados específicamente para clonar productos de PCR de extremos romos, e incluyen los vectores pCR-Blunt II-TOPO y pCR-XL-TOPO, que contienen en sus secuencias el gen *ccdB*, letal para *E. coli*, y unido al gen *lacZα*. De esta forma, la ligación de un producto de PCR de extremos romos al vector produce una disrupción de la expresión del gen *lacZα-ccdB*, permitiendo sólo el crecimiento de recombinantes positivos tras la transformación.

En la transformación se utilizaron células TOP10 de *E. coli* químicamente competentes de Invitrogen, siguiéndose las instrucciones del manual del kit tanto para la transformación como para la clonación. El volumen de cada transformación se distribuyó en tres placas Petri que contenían medio LB (Luria-Bertani)-Agar y Kanamicina (50 µg/ml), sembrándose 100 µl en cada placa. Estas placas fueron incubadas entre 14 y 16 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo las placas se conservaron a 4 °C hasta la posterior identificación de recombinantes positivos.

3.4.5. Identificación de recombinantes positivos

Los recombinantes positivos, es decir, aquellos con insertos del tamaño esperado, fueron identificados mediante una PCR de colonias. Para ello fueron seleccionadas colonias que se subcultivaron en grupos de ocho en placas Petri mediante la técnica de estría simple. Estas placas se incubaron toda la noche a 37 °C, siendo utilizadas las colonias crecidas en la PCR posterior. Para la realización de esta PCR, cada colonia fue inoculada en un tubo de 0,2 ml, que contenía 19 µl de mezcla reacción de PCR, con una punta de pipeta estéril. La mezcla de reacción contenía 0,5 U de la polimerasa *Taq* DNA polymerase (Qiagen), tampón de PCR 1x, 2 µl de Q-Solution, 1 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP y 0,3 µM de cada cebador, variando sólo el par de cebadores, específico de cada fragmento, y las condiciones de PCR, que se indican en el Apartado 3.3.2.

Las amplificaciones de los insertos de las colonias se visualizaron posteriormente en geles de agarosa al 1,5% en TAE 1x. Tras esta comprobación, las colonias que resultaron positivas se inocularon en 5 ml de medio líquido LB-Kanamicina (50µg/ml), y se incubaron a 37 °C con agitación horizontal de 225 rpm durante 14-16 horas.

3.4.6. Extracción y restricción de plásmidos

Los plásmidos de las colonias positivas fueron extraídos siguiendo las instrucciones del kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen. Este kit emplea tres pasos básicos para la extracción del ADN del plásmido. En primer lugar tiene lugar una lisis alcalina para romper las células bacterianas, este lisado es seguidamente limpiado y neutralizado, lo que permite la adsorción del ADN en las membranas de sílice. Finalmente tiene lugar el lavado y elución del inserto del plásmido. Tras la extracción del ADN del plásmido, para comprobar el tamaño del inserto extraído y cuantificarlo, se realizó una digestión con la enzima EcoRI (Roche) que se visualizó en geles de agarosa al 1,5% en tampón TAE 1x.

3.4.7. Secuenciación de plásmidos y análisis de secuencias

Para la secuenciación de cada elemento se enviaron al menos tres plásmidos al servicio de secuenciación automática de ADN de SECUGEN S.L. (Madrid). Se aplicó el método de secuenciación de Sanger, utilizando el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) en la reacción de secuencia. Cada plásmido se envió a secuenciar con los cebadores universales M13 y, dependiendo de la longitud del inserto, también se utilizaron cebadores intermedios.

A partir de los datos de los tres plásmidos secuenciados se obtuvo una secuencia consenso mediante el software SeqManII (DNASTAR). Posteriormente, las secuencias obtenidas fueron alineadas mediante el método Clustal X (Thompson y col. 1997) con el software MegAlign (DNASTAR).

3.5. CARACTERIZACIÓN TRANSCRIPTÓMICA DEL SISTEMA DE INCOMPATIBILIDAD

El análisis transcriptómico del sistema de incompatibilidad llevado a cabo se basa en la secuenciación de ARN seguido de una comparación de la expresión diferencial entre ambas selecciones y una validación de los resultados mediante qPCR.

3.5.1. Extracción de ARN

El material utilizado para este análisis fue pistilos polinizados y sin polinizar de las selecciones A2-198 e ITAP-1 (Apartado 2.2). Para ambos análisis se cogieron botones en estado D-E (Felipe, 1977) de las selecciones indicadas anteriormente y se mantuvieron en frío desde su recogida. En el análisis de pistilos sin polinizar y polen de los botones florales recogidos se separaron pistilos y anteras y, tras ser pesados, se conservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la extracción de ARN. En el caso de los pistilos polinizados, los botones fueron desprovistos de la corola, estambres y parte del cáliz, colocados sobre espuma floral y polinizados tal y como se indica en el Apartado 3.1.4. Transcurridas 72 horas desde su polinización los pistilos fueron retirados de la espuma floral, desprovistos de la parte del cáliz que aún presentaban y, tras ser pesados, se conservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El ARN de estas muestras fue extraído usando el método CTAB descrito en Gambino y col. (2008), con algunas modificaciones. En detalle: se trituraron

de 0,2 a 0,4 g de pistilos en nitrógeno líquido con ayuda de un mortero hasta obtener un polvo fino. Este polvo fue transferido a un tubo Eppendorf de 2 ml, al que se añadieron 900 µl de tampón de extracción (2,5% CTAB, 2% PVP-40, 2 M NaCl, 100mM Tris-HCl pH 8, 25 mM EDTA pH 8 y 5% β-mercaptoetanol, añadido justo antes de utilizarlo) a 65 °C. Tras ser resuspendidas mediante agitación con vórtex, las muestras se incubaron durante 30 minutos a 65 °C con agitación. Una vez que las muestras se habían enfriado, se les añadió el mismo volumen de cloroformo:isoamílico (24:1), lo que permitió extraer el ARN. La mezcla se homogeneizó mediante inversión y se centrifugó a 16.000 xg durante 10 minutos a 4 °C. Seguidamente las muestras fueron precipitadas con LiCl 3M, incubándose a -20 °C durante al menos 1 hora. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron centrifugadas a 21.000 xg durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue desechado y el precipitado disuelto en 500 µl de tampón STE (TE, 1% SDS, 1M NaCl) a 65 °C. Tras esto se repitió el paso de extracción con cloroformo:isoamílico (24:1) precipitándose posteriormente el RNA con 0,7 volúmenes de isopropanol (-20 °C). Finalmente después de centrifugar a 21.000 xg durante 15 minutos a 4 °C, los precipitados fueron lavados con 500 µl de etanol al 70%, y se centrifugaron a 16000 xg durante 10 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se dejaron secar las muestras durante 5-20 minutos a temperatura ambiente hasta la completa evaporación del etanol, para finalmente ser resuspendidas en 50 µl de agua destilada estéril. Las muestras se cuantificaron con un NanoDrop 1000 (ThermoScientific) y posteriormente se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

3.5.2. Detección de la expresión de la *ARNasa-Sf* mediante RT-PCR

Los análisis de retrotranscripción (RT-PCR) se llevaron a cabo usando cebadores diseñados a partir de la secuencia de ADN de la *ARNasa-Sf* (FN429352) de ITAP-1 (Martínez-García, 2011). El cebador SfC2-F2 (5'-

GCACTGGGTCGCAATTTAAAAAA-3') se localiza en la región C2 justo antes del segundo intrón, mientras que el cebador SfC3-R2 (5'-TTGCCATGTTTGTTCCTCGT-3') se localiza después del segundo intrón coincidiendo casi completamente con la región C3. Estos cebadores amplifican un fragmento de 127 pb (excluyendo el intrón). Las enzimas usadas para la reacción fueron la *Avian myeloblastosis virus* reverse transcriptasa, encargada de la transcripción del ARN a ADN complementario (ADNc), y la GoTaq® polymerase (Promega), que amplifica los fragmentos de ADNc. Los parámetros de la RT-PCR incluyeron un paso de 45 minutos a 42 °C para la síntesis de ADNc, seguidos de un paso de 2 minutos a 94 °C, 35 ciclos formados por un paso de 95 °C durante 30 segundos, 62 °C durante 1 minutos y 72 °C durante 1 minuto, y un paso de extensión final de 72 °C durante 10 minutos. Los productos de la RT-PCR fueron visualizados, bajo luz UV, junto con el marcador de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen), gracias al tampón de carga de GelRed añadido, en geles de agarosa al 1% en TAE 1x.

3.5.3. Secuenciación de ARN

Para la secuenciación masiva del ARN, las muestras, extraídas tal y como se indica en el Apartado 3.4.1, fueron enviadas al Centro de Regulación Genómica (CRG, Barcelona). Allí se llevó a cabo la preparación de las librerías de ADNc así como la secuenciación del RNA. El ARNm fue obtenido usando Sera-mag (Thermo Scientific), técnica que permite la separación del ARNm empleando partículas magnéticas con oligo(dT)₁₄ unido covalentemente. Las librerías posteriores de ADNc fueron preparadas de acuerdo a los protocolos de Illumina. Seguidamente los fragmentos de ADNc de tamaño similar a 300pb fueron extraídos de un gel de agarosa y posteriormente enriquecidos mediante PCRs de 16 ciclos. Finalmente, estas librerías escindidas fueron secuenciadas

usando un secuenciador Illumina HiSeq2000, que llevó a cabo una secuenciación de 125 PE (paired-end).

Tras la secuenciación de ARN, a las muestra se les realizó un doble control de calidad. Primeramente en el mismo servicio de secuenciación con la herramienta informática Sequencer Software HiSeq Control Software 2.2.58 se comprobó de manera rutinaria el número de secuencias obtenidas así como la distribución de su longitud, y el alineamiento del 10% de las secuencias de cada muestra obtenida al azar con el genoma de referencia de *Prunus persica* mediante el uso del algoritmo GEM y permitiendo en el alineamiento 0, 1 o 2 discordancias. Estos datos permitieron determinar de forma inmediata la calidad general de las secuencias obtenidas mediante el proceso de secuenciación. A continuación se procedió a realizar una serie de gráficas rutinarias mediante el uso de FastQC (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>) para detectar errores y zonas de baja calidad en las secuencias y así tratar de minimizar la presencia de estas secuencias en nuestros análisis posteriores.

Una vez comprobada la calidad de las secuencias, éstas fueron alineadas respecto al genoma de referencia de *Prunus persica* v.1.0. Para ello se usó el programa Bowtie2 (Langmead y col., 2012). Así se obtuvieron 6 archivos de alineaciones iniciales, correspondientes a dos secuencias para cada condición. Para cada par de archivos de alineación se procedió a su fusión mediante el software Samtools 0.1.18 (Li y col. 2009) obteniéndose finalmente 3 archivos de alineación, uno para cada condición.

3.5.4. Análisis de la expresión diferencial de transcritos de ARN

Para el cálculo del nivel de transcripción de los transcritos y su normalización mediante Raw Counts se usó el paquete Bioconductor 1.20.0 (Anders y Huber, 2010). Para el cálculo de expresión diferencial se utilizó el

software DESeq que pertenece también al paquete citado anteriormente. Una vez obtenidos los genes expresados diferencialmente se realizó un filtrado para eliminar los datos con menor valor estadístico, seleccionándose los genes con un $\log_2(\text{Fold_Change}) > 7$ y $\log_2(\text{Fold_Change}) < -7$ y $\text{Base_Mean} > 10$ para aquellos genes con un $\text{Fold_Change} = 0/\text{INF}$.

Para la anotación funcional y el análisis de la significación biológica de cada gen se usó el programa Blast2Go 2.8. Este programa hace uso de diversos recursos públicos como algoritmos de comparación y bases de datos para identificar secuencias y caracterizarlas. Una manera común de determinar la significación biológica es la proyección de los genes seleccionados en la *Gene Ontology* (GO), base de datos que contiene anotaciones genéricas que describen funciones moleculares, procesos biológicos o componentes celulares asociados con cada gen. Además de ésta se usó también la base de datos *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (<http://www.genome.jp/kegg>), con lo que se consiguió realizar un análisis de enriquecimiento de genes sobre las vías biológicas conocidas actualmente. Estos análisis de determinación biológica permitieron, por tanto, observar la funcionalidad, la participación en los distintos procesos y la posible relación con el sistema de incompatibilidad de los distintos genes, siendo esta última característica la determinante a la hora de seleccionar los genes que posteriormente se analizaron mediante qPCR.

3.5.5. Validación de los datos de secuenciación de ARN mediante qPCR

Para validar el análisis de secuenciación de ARN se llevaron a cabo análisis de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Para obtener el ADNc necesario en la qPCR se usó la enzima SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen) siguiendo el protocolo tal y como se indica en su manual. Los cebadores específicos para cada transcrito fueron diseñados usando la herramienta online Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>) (Undergasser y col., 2012).

La qPCR se llevó a cabo usando el reactivo Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) que se incubó junto con los cebadores específicos y el ADNc según las siguientes condiciones de reacción: 20 segundos de desnaturalización inicial a 95 °C, 40 ciclos de 95 °C durante 1 segundo, 60 °C durante 20 segundos y la determinación final de la curva de disociación del producto de qPCR (15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 15 s a 95 °C). El análisis de las curvas de disociación permitió examinar la especificidad de amplificación de cada par de cebadores.

Para la normalización de los datos obtenidos de la qPCR se evaluaron tres genes de referencia: el ARNr 18S de melocotonero (18S) (Rasori y col., 2002), la actina (Act) y la ARN polimerasa II (RP II) (Tong y col., 2009). En nuestro caso, el gen RP II fue el más estable de manera que se utilizó para la normalización de la expresión de los genes analizados.

La eficiencia de la qPCR (E) y el ciclo umbral o punto de corte (“Threshold cycle”, C_t) fueron calculados usando el programa StepOne Software v2.3. Teniendo en cuenta estos valores, el ratio de la expresión relativa de cada gen fue calculado y su error estándar asociado en base a los valores de E y C_t de los genes candidatos y los genes de referencia de acuerdo con las ecuaciones indicadas por Perikles (2003). Siendo cada muestra medida por triplicado y calculada la media del ratio de la expresión relativa \pm los errores estándares.

3.6. CARACTERIZACIÓN PROTEICA DEL SISTEMA DE INCOMPATIBILIDAD

Con el fin de identificar las proteínas implicadas en el funcionamiento del sistema de incompatibilidad en almendro, se utilizó la técnica iTRAQ (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation). Ésta técnica, basada en el marcaje químico de péptidos mediante reactivos isotópicos, permite el

análisis de varias muestras distintas con una sola identificación mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Además con el fin de cuantificar las ARNasas presentes en las muestras de pistilos se utilizó la pseudo monitorización de reacción múltiple (pseudo-MRM), técnica muy selectiva y altamente sensible que permite cuantificar la abundancia de péptidos concretos presentes en una muestra biológica compleja. Ambas técnicas se describen en detalle a continuación.

3.6.1. Extracción de proteínas de polen y pistilos

Para la extracción de las proteínas utilizadas en el análisis iTRAQ se utilizaron 0,5 g de anteras, pistilos sin polinizar de las selecciones A2-198 e ITAP-1 y pistilos de los cruzamientos A2-198×A2-198 e ITAP-1×A2-198 a las 48 horas de su polinización. Este material fue procesado de igual manera que en los análisis transcriptómicos (Apartado 3.5.1). Este material fue triturado en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino, el cual fue resuspendido en 1,5 ml de tampón de lavado-1, que contenía 10% de ácido tricloroacético y 0,07% de clorhidrato tris (2-carboxietil)-fosfina clorhidrato (TCEP) en acetona, y a continuación centrifugado a 11700 xg durante 20 minutos a 4 °C. El pellet obtenido se resuspendió en tampón de lavado-2 (0.07% TCEP en acetona), se incubó durante 1 hora a -20 °C y posteriormente se centrifugó en las condiciones anteriores. El sobrenadante obtenido tras la centrifugación fue retirado y sustituido por nuevo tampón de lavado-2, repitiéndose el paso anterior de 3 a 6 veces hasta que las muestras quedaron libres de pigmentos. Tras estos lavados se eliminó el sobrenadante y las muestras fueron secadas durante 3 horas a temperatura ambiente. A continuación, el pellet se resuspendió mediante vórtex en tampón de extracción compuesto por 4% CHAPS, 9 M urea, 65 mM TCEP y 1mM PMSF y se incubó a 4 grados con agitación suave durante toda la noche. Al día siguiente las muestras se

centrifugaron a 20600 \times g durante 130 minutos a 4 °C y los extractos de proteínas fueron recuperados, cuantificados mediante el método Bradford (Bradford, 1976) y almacenados a -20 °C hasta su uso.

3.6.2. Análisis iTRAQ – LC-ESI-MSMS

A modo de introducción, para facilitar la comprensión de los pasos seguidos en el análisis iTRAQ realizado y antes de exponerlos con más detalle, a continuación se expone brevemente la cronografía seguida para la identificación de las proteínas implicadas en el sistema de incompatibilidad, la cual se corresponde con los protocolos estandarizados para el marcaje iTRAQ (Casado-Vela y col. 2010). Tras la extracción de los extractos proteicos de las muestras de polen y pistilos las proteínas fueron primero digeridas con tripsina a sus péptidos resultantes, los cuales seguidamente se marcaron con los reactivos iTRAQ. Estas muestras marcadas se combinan en una sola que se fracciona por cromatografía líquida de ionización por electrospray, analizándose las fracciones resultantes por espectrometría de masas en tándem (LC-ESI-MSMS), utilizándose el espectro de MSMS también para la cuantificación (Figura 3.7).

Digestión y marcaje de proteínas con el reactivo iTRAQ-4-plex®

Los extractos proteicos de anteras y pistilos fueron enviados al servicio ProteoRed del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC, Madrid) para la realización de los análisis iTRAQ. Un total de 40 μ g de proteínas para cada condición fueron precipitadas para la digestión mediante el método del metanol/cloroformo. Los pellets de proteínas fueron resuspendidos y desnaturalizados en 20 μ l de una solución 6M de clorhidrato de guanidina, 10 mM HEPES, pH 7,5 (SERVA Electrophoresis GmbH). Posteriormente las

muestras se redujeron con 2 μ l de TCEP 50 mM pH 8,0 a 60 $^{\circ}$ C durante 60 minutos y 10 minutos a temperatura ambiente tras la adición de 2 μ l del reactivo cysteine-blocking (metil metanotiosulfonato) 200mM. Las muestras fueron seguidamente diluidas hasta 120 μ l con 50mM TEAB para reducir la concentración de guanidina. La digestión se inició mediante la adición de 4 μ g de tripsina modificada (Sigma-Aldrich) a cada muestra para un ratio 1/10 (w/w), éstas se incubaron en agitación a 37 $^{\circ}$ C durante toda la noche y fueron posteriormente secadas por evaporación.

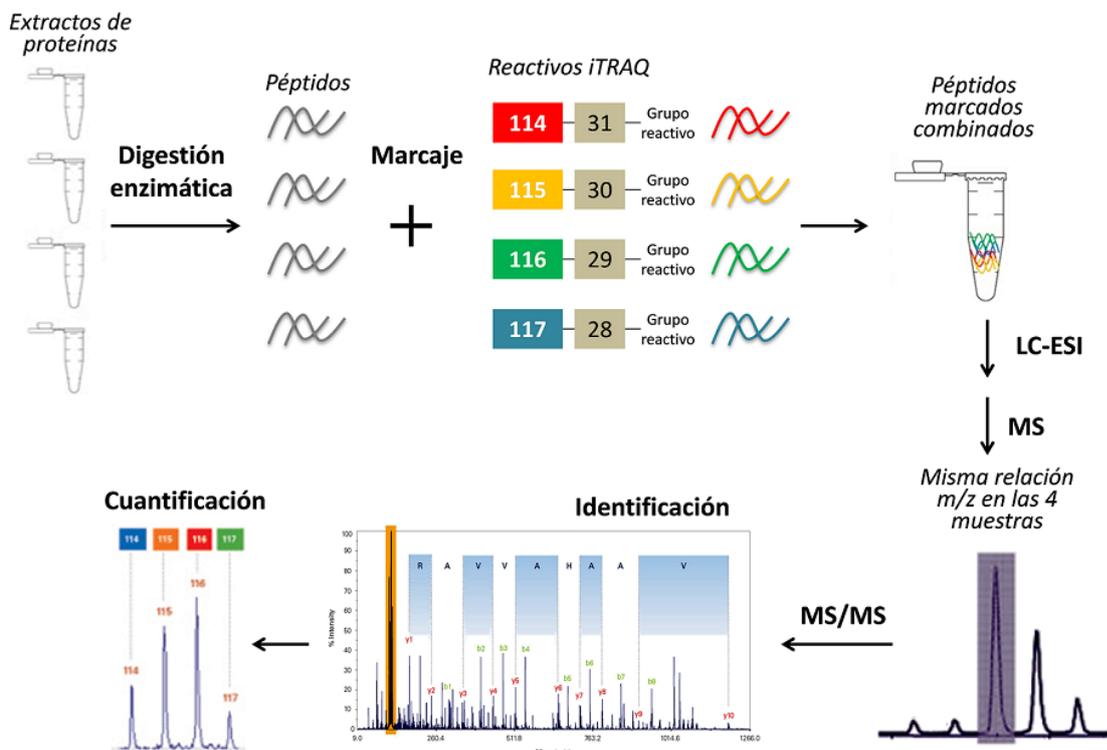


Figura 3.7. Esquema de la identificación y cuantificación de proteínas mediante análisis iTRAQ-LC-ESI-MS/MS.

Los pistilos y anteras digeridos se reconstituyeron con 80 μ l de una mezcla de 70% de etanol y 50 mM TEAB y fueron marcados a temperatura ambiente durante dos horas con media unidad del reactivo iTRAQ Reagents

Multiplex kit (Applied Biosystems). Finalmente los extractos de una misma condición (anteras, pistilos o pistilos polinizados compatibles o pistilos polinizados incompatibles) fueron combinados y se paró la reacción de marcaje mediante la adición de 100 μ l de 50% ACN y su siguiente evaporación en un concentrador de vacío.

Las mezcla de muestras digeridas y marcadas se desaló usando Sep-PAK C18 Cartridge (Waters) siguiendo las condiciones del fabricante. Los péptidos limpios se secaron mediante evaporación y fueron almacenados a -20 °C hasta el siguiente análisis.

Cromatografía líquida y análisis por espectrometría de masas

Una cantidad de 2,5 μ g de cada alícuota resultante de la mezcla anterior fueron analizadas mediante LC-ESI-MSMS usando para ello un sistema de cromatografía nano-líquida (Eksigent Technologies nanoLC Ultra 1D plus, AB SCIEX) acoplado a un espectrómetro de masas de alta velocidad Triple TOF 5600 (AB SCIEX) con una fuente doble de ionización. Para ello se utilizó la columna de sílica C18 ChromXP (75 μ m x 15 cm) (Eksigent Technologies, AB SCIEX) de fase reversa, de 3 μ m de tamaño de partícula y tamaño de poro de 120 Å. El flujo de elución de la bomba fue de 300 nl/min, bajo un gradiente de elución para el que se empleó una fase móvil A al 0,1% de ácido fórmico en agua y una fase móvil B compuesta por un 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo. Estos análisis se llevaron a cabo por triplicado para cada muestra de anteras y pistilos.

La adquisición de datos se realizó mediante el sistema Triple TOF 5600 (AB SCIEX), con el software de análisis Analyst TF 1.5 (AB SCIEX). Se estableció un criterio de conmutación de iones 350 veces mayor que el ratio masa/carga (m/z), y 1250 veces m/z menor, con un estado de carga de 2-5 y un umbral de

abundancia de más de 90 recuentos, siendo excluidos los primeros iones durante 20 s.

Análisis de datos

Los datos de espectrometría de masas y MS/MS obtenidos de las muestras fueron procesados usando el software Analyst® TF 1.5.1 (AB SCIEX). Los archivos de datos Raw obtenidos se convirtieron a archivos mgf, los cuales fueron contrastados en la base de datos UniProtKB/SwissProt frente a *Prunus pérsica* (taxón identifier: 3760), la cual contiene 28 639 genes codificadores de proteínas y sus correspondientes entradas reversas mediante el uso de Mascot Server versión 2.3.02 (Matrix Science). Los parámetros de búsqueda se establecieron de la siguiente forma: enzima, tripsina; divisiones perdidas permitidas, 1; modificaciones fijadas, iTRAQ4plex (N-terminales y K) y beta-metilolación de la cisteína; y una variable de la modificación, oxidación de la metionina. La tolerancia de las masas de los péptidos se fijó en ± 20 ppm para los precursores y 0,05 Da para los fragmentos. El intervalo de confianza para la identificación de las proteínas fue mayor o igual al 95% ($p < 0,05$), y sólo se consideraron correctamente identificados los péptidos con un “ion score” superior al 5%. Además únicamente las proteínas con al menos dos péptidos cuantificados fueron consideradas en la cuantificación proteica. La identificación de cada proteína fue asignada tras la realización de una búsqueda por homología (BLAST) en la base de datos de UniProtKB/SwissProt. Finalmente los genes asociados a las proteínas identificadas fueron localizadas en el genoma de *Prunus pérsica* versión 1.0 (Verde et al. 2013), información la cual fue obtenida de la base de datos Phytozome versión 9.1 (<http://phytozome.net>).

Empleando el modelo estadístico basado en el “ajuste por mínimos cuadrados” hemos logrado determinar las proteínas que se encuentran

expresadas diferencialmente al comparar unas muestras con otras. Para determinar los valores significativos se ha fijado el umbral de expresión diferencial (FDR) en un 5%.

3.6.3. Pseudo monitorización de reacción múltiple (MRM)

La técnica pseudo-MRM permite, como hemos indicado anteriormente, la detección de determinadas proteínas de interés de entre una mezcla compleja de éstas. Basándonos en esta posibilidad, el pseudo-MRM fue llevado a cabo con el fin de detectar la posible presencia de las ARNasas-S en muestras de proteínas de pistilos polinizados y sin polinizar. Para ello, se creó una lista con 48 masas teóricas correspondientes a las masas de los péptidos teóricos obtenidos a partir de una digestión *in silico* de la ARNasa-S. Además se usaron como control otros ocho péptidos procedentes de una proteína (M5W1Q5) detectada en el análisis anterior de las muestras mediante iTRAQ. Estos péptidos usados como control permitieron asegurar que análisis realizado fuera correcto. La digestión de las muestras, adquisición de datos se realizó mediante el sistema TripleTOF 5600 (AB Sciex) y análisis de los fragmentos por LC-ESI-MSMS se realizó de igual forma a la descripción dada en el Apartado 3.5.2.

A close-up photograph of a flower's reproductive parts. The image shows several stamens with yellowish anthers and long, thin filaments. A central pistil with a fuzzy, brownish stigma is also visible. The background is a soft, out-of-focus light color.

***4. Caracterización
fenotípica del haplotipo S_f***

4. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL HAPLOTIPO S_f

4.1. INTRODUCCIÓN

El almendro cultivado se considera en general una especie auto-incompatible. Sin embargo, existen determinadas variedades, con origen en Apulia, que son auto-compatibles (Grasselly y Oliver, 1976). Desde que se conoció la existencia de éstas, la auto-compatibilidad ha sido un carácter prioritario en los programas de mejora del almendro (Dicenta y col., 2000). Esta auto-compatibilidad se ha asociado tradicionalmente a la presencia del alelo S_f . Este alelo posee una herencia mendeliana (Dicenta y García, 1993; Ortega y Dicenta, 2003), por lo cual se ha introducido en las nuevas selecciones mediante cruzamientos en los que al menos un parental es auto-compatible (Dicenta y col., 2009).

En los estudios iniciales sobre incompatibilidad floral en almendro se utilizaron técnicas de polinización controlada en campo y laboratorio, donde la compatibilidad se establecía en función de los frutos obtenidos o mediante el estudio del crecimiento de los tubos polínicos en el pistilo hasta el ovario tras la auto-polinización o polinización cruzada (Crossa-Raynaud y Grasselly, 1985).

Posteriormente se determinó el genotipo S mediante las técnicas de isoelectroenfoque de proteínas estilares y tinción para actividad ribonucleasa, estableciéndose una correlación entre los zimogramas obtenidos y el genotipo S de las variedades analizadas (Bošković y col., 1997; Bošković y col., 2003). En estos zimogramas la auto-compatibilidad se asocia a la ausencia de actividad, presentando una sola banda los individuos heterocigóticos (S_fS_x) y ninguna los homocigóticos (S_fS_f) (Bošković y col., 1999; Dicenta y col., 2002).

En la actualidad el método utilizado de forma rutinaria para la determinación del genotipo S es la amplificación de los alelos de la *ARNasa-S* mediante PCR (Ortega y col., 2012; Ortega y col., 2016). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la presencia del alelo *ARNasa-S_f* no en todos los casos corresponde a un fenotipo auto-compatible. Estudios realizados por Kodad y col. (2009) comprobaron la existencia de una variedad con genotipo S_f pero fenotipo auto-incompatible. Estos autores denominaron este alelo de la *ARNasa* como alelo S_f activo (S_{fa}), ya que se observó su actividad ribonucleasa en geles de isoelectroenfoque. Así, asignaron a Ponç el genotipo $S_{23}S_{fa}$. Además de esta variedad, existen otras como Alzina, Garondés, Vivot o ITAP-1 con genotipo S_f y fenotipo auto-incompatible (Kodad y col. 2010; Fernández i Martí y col., 2010; Martínez-García y col., 2011). Los términos haplotipo S_{fi} (S_f inactivo) y haplotipo S_{fa} (S_f activo) fueron propuestos posteriormente por Fernández i Martí y col. (2010) para designar a los individuos con genotipo S_f y fenotipo auto-compatible y auto-incompatible respectivamente.

El objetivo de este capítulo es caracterizar fenotípicamente el haplotipo S_f en variedades de almendro con distinto fenotipo y estudiar su modo de herencia.

4.2. MATERIAL VEGETAL Y METODOLOGÍA

Para el estudio fenotípico del haplotipo S_f se realizaron diversos cruzamientos en campo y laboratorio (Tabla 4.1). En laboratorio se estudió el crecimiento de los tubos polínicos en el pistilo mediante microscopía de fluorescencia. En campo, las descendencias obtenidas fueron genotipadas mediante PCR para el alelo *ARNasa-S_f*. Por otra parte, se determinó la actividad ribonucleasa en extractos estilares mediante isoelectroenfoque.

Tabla 4.1. Cruzamientos realizados para la determinación de las relaciones de incompatibilidad en el material estudiado.

Cruzamientos	Laboratorio	Campo
<i>Genotipo femenino auto-compatible</i>		
A2-198 ($S_f S_f$) × ITAP-1 ($S_{11} S_f$)	✓	✓
× D01-188 ($S_{11} S_f$)	✓	✓
× Vivot ($S_{23} S_f$)	✓	✓
× A2-198 ($S_f S_f$)	✓	—
D05-187 ($S_f S_f$) × ITAP-1 ($S_{11} S_f$)	✓	✓
D01-188 ($S_{11} S_f$)	✓	✓
Vivot ($S_{23} S_f$)	✓	✓
D05-187 ($S_f S_f$)	✓	—
D07-332 ($S_f S_f$) × ITAP-1 ($S_{11} S_f$)	✓	✓
D01-188 ($S_{11} S_f$)	✓	✓
Vivot ($S_{23} S_f$)	✓	✓
D07-133 ($S_f S_f$)	✓	
Marta ($S_1 S_f$) × ITAP-1 ($S_{11} S_f$)	✓	✓
D01-188 ($S_{11} S_f$) × ITAP-1 ($S_{11} S_f$)	✓	✓
A2-198 ($S_f S_f$)	—	✓
D01-188 ($S_{11} S_f$)	✓	✓
<i>Genotipo femenino auto-incompatible</i>		
ITAP-1 ($S_{11} S_f$) × A2198 ($S_f S_f$)	✓	✓
Marta ($S_1 S_f$)	✓	✓
D01-188 ($S_{11} S_f$)	✓	✓
Vivot ($S_{23} S_f$)	✓	✓
Ferraduel	✓	✓
ITAP-1 ($S_{11} S_f$)	✓	✓
Vivot ($S_{23} S_f$) × A2-198 ($S_f S_f$)	✓	—
Vivot ($S_{23} S_f$)	✓	—
Ferraduel ($S_1 S_4$) × ITAP-1 ($S_{11} S_f$)	✓	✓

✓ Indica que el cruzamiento ha sido realizado.

— Indica que el cruzamiento no se ha llevado a cabo.

4.2.1. Material vegetal

Para caracterizar fenotípicamente el haplotipo S_f se utilizaron selecciones homocigóticas auto-compatibles (S_fS_f), así como variedades y selecciones heterocigóticas tanto auto-compatibles (S_xS_f) como auto-incompatibles, todas ellas descritas en el Apartado 2 de esta tesis:

- Las selecciones homocigóticas auto-compatibles utilizadas fueron A2-198 (Ortega y Dicenta, 2003), D05-187 y D07-332 (Figura 4.1.). La variedad y la selección heterocigóticas auto-compatibles fueron Marta (S_1S_f) y D01-188 ($S_{11}S_f$). Todas ellas obtenidas en el programa de mejora genética del CEBAS-CSIC.

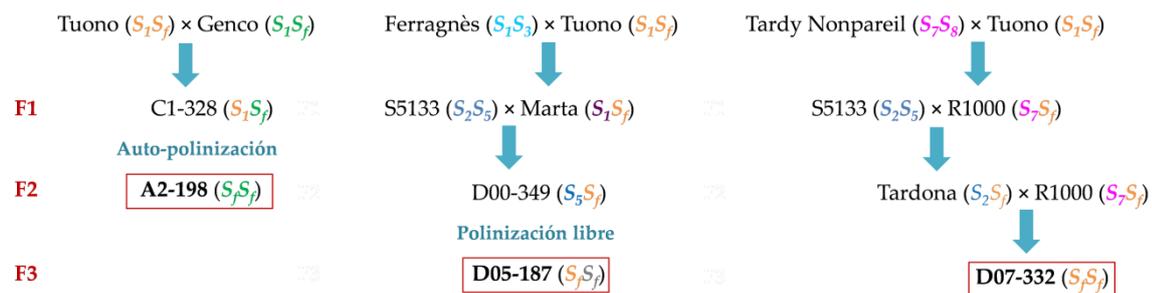


Figura 4.1. Ascendencia de las selecciones homocigóticas auto-compatibles (S_fS_f) obtenidas en el programa de mejora del CEBAS-CSIC. Los genotipos aparecen coloreados en función del parental para facilitar la observación del origen de los alelos S_f de las selecciones.

- El material heterocigótico auto-incompatible utilizado fue la variedad Vivot ($S_{23}S_{fa}$), estudiada por Fernández i Martí y col. (2010), y la selección ITAP-1 ($S_{11}S_f$) analizada por Martínez-García y col., (2011). Puesto que ambas son fenotípicamente auto-incompatibles, a partir de ahora nos referiremos al genotipo S de su *ARNasa* como S_{fa} (*ARNasa-S_f* activa), para diferenciarlo del genotipo S_f que da lugar al fenotipo auto-compatible, como ya hizo Kodad y col. (2009).

Además, para los análisis de actividad ARNasa se utilizaron, junto con las selecciones A2-198 e ITAP-1 las variedades auto-incompatibles Del Cid ($S_{12}S_{22}$) y Marcona ($S_{11}S_{12}$).

4.2.2. Determinación del fenotipo de incompatibilidad

De las selecciones y variedades de estudio (Tabla 4.1) se recogieron botones florales en el estadio D-E (Felipe, 1977) que fueron utilizados para los cruzamientos en laboratorio y en campo. Antes de realizar los cruzamientos se determinó la viabilidad del polen (Apartado 3.1.1).

Polinización controlada en laboratorio

Para la determinación del fenotipo de incompatibilidad en el laboratorio, se tomaron 10 botones florales en el estadio D-E (Felipe, 1977) que fueron colocados en espuma floral húmeda como se indica en el Apartado 3.1.4. Los pistilos fueron polinizados con el polen indicado en cada cruzamiento, preparado el día anterior. A las 96 horas de la polinización los pistilos fueron fijados en FAA y procesados para su posterior observación mediante microscopía de fluorescencia (Apartado 3.1.4). En cada caso se determinó si el polen había germinado en el estigma y si los tubos polínicos habían alcanzado el primer, el segundo o el tercer tercio del estilo, o el ovario. Se consideró que un cruzamiento era compatible cuando el porcentaje de pistilos con tubos alcanzando el ovario era superior al 40% (Ortega y Dicenta, 2004).

Polinización controlada en campo

Para comprobar la inter-incompatibilidad de las selecciones estudiadas se realizaron polinizaciones en campo con un número variable de flores

polinizadas (Tabla 4.1), siguiendo la metodología descrita en el Apartado 3.1.1. El fenotipo de auto-incompatibilidad en ITAP-1 se determinó mediante el embolsado de una rama (Apartado 3.1.2). Tanto en el embolsado como en la polinización controlada se anotó el número de frutos a los 60 días de la polinización y el cuajado de los frutos fue calculado como el porcentaje de flores que dieron lugar a frutos (Apartado 3.1.3).

4.2.3. Determinación del genotipo S de los descendientes

Los frutos obtenidos tras los cruzamientos de cada selección o variedad fueron recogidos en estado de madurez (mesocarpo abierto) y germinados posteriormente mediante estratificación. Los frutos con cascara se desinfectaron con el fungicida disulfuro de tetrametiluram (TMTD) al 2% durante 30 minutos y se mantuvieron durante 48 horas en agua, lo que favoreció su imbibición. Posteriormente se colocaron en bandejas con vermiculita húmeda a 7 °C y en oscuridad, hasta que comenzaron a germinar (emergencia de la radícula). Una vez germinadas, las semillas fueron sembradas en macetas con turba.

Cuando las plantas alcanzaron unos 20 cm de altura, de cada una, se tomó una muestra de hoja para la extracción de ADN mediante el método de Doyle y Doyle (1987), con las modificaciones de Sonneveld y col. (2001), como se describe en el Apartado 3.2.2. Seguidamente, los alelos de *ARNasa-S* fueron amplificados mediante PCR con los cebadores EM-PC2consFD y EM-PC3consRD (Sutherland y col. 2004), siguiendo el método descrito en Ortega y col. (2005), y posteriormente se visualizaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa como se indica en el Apartado 3.2.2. La observación de las distintas bandas obtenidas para cada muestra permitió la asignación del genotipo S a cada descendiente. Posteriormente se realizó la prueba estadística chi-cuadrado (χ^2), entre la frecuencia de genotipos S observados y esperados, según la genética mendeliana asignada a este carácter.

4.2.4. Verificación del pedigrí mediante el uso de marcadores moleculares tipo SSR

El uso de marcadores moleculares para la comprobar los parentales de la descendencia del cruzamiento Marta×ITAP-1 se realizó debido a que era la primera vez que se obtenían individuos con genotipo $S_f S_{fa}$ en el programa de mejora del CEBAS-CSIC. Dado que es imposible distinguir ambas *ARNasas-S_f* solo con una PCR, se realizó este análisis para confirmar que los individuos obtenidos presentaban un alelo S_f de cada parental. En el resto de cruzamientos que se obtuvo este genotipo no fue necesaria esta verificación ya que se observó que la herencia de las *ARNasas-S* en este caso seguía la segregación mendeliana esperada.

Para la determinación de los parentales de seis de los descendientes del cruzamiento Marta×ITAP-1 indicado anteriormente se utilizaron los marcadores moleculares tipo SSR BPPCT007, CPPCT005, Ma040 y UDP96005 (Dirlewanger y col., 2002; Aranzana y col., 2002; Yamamoto y col., 2002; Cipriani y col., 1999). Para este análisis se recogieron muestras de hojas de los seis descendientes y de los parentales en la finca “Tres caminos” del CEBAS-CSIC, las cuales fueron enviadas para ser procesadas al “Centre for Research in Agricultural Genomics” (CRAG) de Barcelona como se indica en el Apartado 3.3.

4.2.5. Isoelectroenfoco de proteínas estilares y tinción para actividad ARNasa

Con el fin de determinar la presencia o ausencia de actividad ribonucleasa en los estilos de las selecciones A2-198 e ITAP-1 se utilizó la técnica de isoelectroenfoco, seguida de una tinción para actividad ribonucleasa, lo que permitió observar la presencia de bandas asociadas a cada una de las *ARNasas-S*. Junto con las selecciones señaladas se analizaron también las variedades Marcona

y Del Cid, que fueron utilizadas como control para la ARNasa-S₁₁. El procedimiento seguido se ha descrito en detalle en el Apartado 3.2.1.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Determinación del fenotipo de incompatibilidad

A continuación se presentan los resultados obtenidos sobre las relaciones de incompatibilidad entre las distintas selecciones y variedades señaladas en la Tabla 4.1, mediante polinizaciones en laboratorio y campo.

Polinizaciones en laboratorio

Los análisis de viabilidad del polen mostraron porcentajes superiores al 80% en todas las muestras analizadas, siendo aptos para realizar las posteriores polinizaciones.

La Tabla 4.2 muestra el alcance de los tubos polínicos en los pistilos en cada uno de los cruzamientos y el porcentaje de ovarios penetrados. La mayoría de las polinizaciones llevadas a cabo fueron compatibles. Solo cinco cruzamientos (ITAP-1×ITAP-1, Vivot×Vivot, ITAP-1×A2-198, ITAP-1×D01-188 y Vivot×A2-198) fueron incompatibles, no alcanzando los tubos polínicos el ovario en ningún caso.

Polinizaciones en campo

El porcentaje de frutos cuajados a los 60 días tras las polinizaciones en campo fue muy variable (Tabla 4.3).

Todas las polinizaciones llevadas a cabo dieron lugar a frutos y por lo tanto fueron compatibles, exceptuando la autopolinización por embolsado de ITAP-1 y los cruzamientos ITAP-1×A2-198 e ITAP-1×D01-188. Estas tres

polinizaciones fueron las únicas de las que no se obtuvo ningún fruto, siendo por tanto incompatibles.

4.3.2. Determinación del genotipo S de los descendientes

La técnica PCR permitió determinar el genotipo S de cada uno de los descendientes estudiados (Figura 4.2). La Tabla 4.4 muestra la distribución de genotipos obtenidos en cada uno de los cruzamientos realizados.

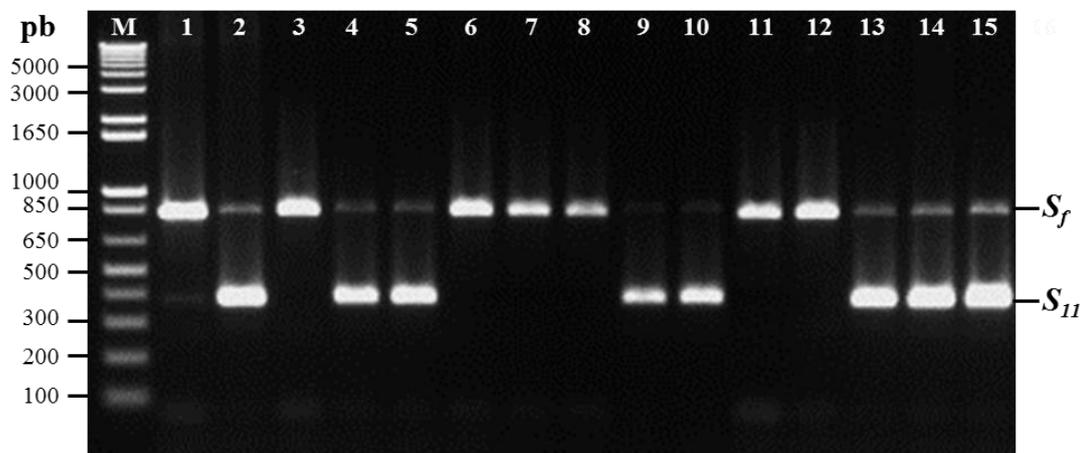


Figura 4.2. Genotipo S de las selecciones D05-187 e ITAP-1 y su descendencia mediante polinización directa. Los indicadores superiores corresponden a: M, Marcador de peso molecular 1Kb+ DNA Ladder (Invitrogen); 1, D05-187 (S_fS_f); 2, ITAP-1 ($S_{11}S_{11}$); 3-15 descendencia.

El análisis Chi-cuadrado mostró diferencias significativas entre la distribución de genotipos esperada y la observada en los cruzamientos realizados sobre A2-198, D07-332, en los cruzamientos D05-187×Vivot, D01-188×ITAP-1 y en la auto-polinización de D01-188. Estos resultados indican que en los cruzamientos realizados sobre A2-198 y D07-332 (excepto D07-332×Vivot) el alelo S_f/S_{fa} no entra en el ovario. Por lo tanto, el genotipo de los descendientes obtenidos fue $S_{11}S_f$ o $S_{23}S_f$.

Tabla 4.2. Observación de pistilos polinizados mediante microscopía de fluorescencia 96 horas después de polinizarlos. Las letras A-J se corresponden con cada pistilo analizado, y las cifras 0-4 hacen referencia a la parte del pistilo que alcanza el tubo polínico (0: estigma; 1: primer tercio del estilo; 2: segundo tercio del estilo; 3: tercer tercio del estilo; 4: ovario). Con un guion (-) ausencia de polen en el estigma.

Cruzamiento	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Ovarios	Interacción ^b
											penetrados ^a (%)	
A2-198 × ITAP-1	4	4	4	4	-	4	3	4	3	4	78	C
A2-198 × D01-188	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	90	C
A2-198 × Vivot	-	4	3	4	3	4	4	2	-	3	50	C
A2-198 × A2-198	4	3	4	2	4	4	4	2	4	3	60	C
D05-187 × ITAP-1	4	4	0	0	-	4	0	-	4	4	63	C
D05-187 × D01-188	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	100	C
D05-187 × Vivot	0	4	4	4	4	4	4	4	-	-	88	C
D05-187 × D05-187	4	4	-	-	3	4	4	3	4	4	75	C
D07-332 × ITAP-1	4	4	4	4	4	4	3	4	4	3	80	C
D07-332 × D01-188	4	4	-	4	2	4	4	4	-	4	88	C
D07-332 × Vivot	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	100	C
D07-332 × D07-332	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	100	C
Marta × ITAP-1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	100	C
D01-188 × ITAP-1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	100	C
D01-188 × D01-188	4	4	4	4	-	4	4	4	4	4	100	C
ITAP-1 × A2-198	3	-	-	3	2	2	3	2	2	2	0	IC
ITAP-1 × Marta	4	4	4	4	4	3	4	4	3	4	80	C
ITAP-1 × D01-188	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	0	IC
ITAP-1 × Vivot	2	4	4	4	4	4	4	4	4	3	80	C
ITAP-1 × ITAP-1	2	1	2	2	2	2	1	2	1	1	0	IC
ITAP-1 × Ferraduel	4	4	4	3	4	4	4	3	4	3	70	C
Vivot × A2-198	2	2	3	2	-	1	1	1	-	2	0	IC
Vivot × Vivot	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2	0	IC
Ferraduel × ITAP-1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	100	C

^aEl porcentaje de tubos polínicos en el ovario se calcula teniendo en cuenta sólo los pistilos que presentan polen.

^bC: compatible; IC: incompatible.

Tabla 4.3. Estudio del fenotipo de incompatibilidad mediante polinización controlada en campo. Se indica para ello el número de flores polinizadas, los frutos a los 60 días tras la polinización y porcentaje de frutos cuajados en este tiempo.

Cruzamiento	Flores polinizadas	Frutos obtenidos	Cuajado frutos %	Fenotipo A/C^a
A2-198 × ITAP-1*	622	85	14	C
A2-198 × D01-188	381	30	8	C
A2-198 × Vivot*	401	55	14	C
D05-187 × ITAP-1	46	29	63	C
D05-187 × D01-188	92	60	65	C
D05-187 × Vivot	27	17	63	C
D07-332 × ITAP-1	164	12	7	C
D07-332 × D01-188	184	38	21	C
D07-332 × Vivot	255	25	10	C
Marta × ITAP-1	253	82	32	C
D01-188 × ITAP-1	95	77	81	C
D01-188 × A2-198	82	62	76	C
D01-188 × D01-188	135	86	64	C
ITAP-1 × ITAP-1	Embolsado	0	0	IC
ITAP-1 × A2-198	40	0	0	IC
ITAP-1 × Marta	274	69	25	C
ITAP-1 × D01-188	80	0	0	IC
ITAP-1 × Vivot	80	24	30	C
ITAP-1 × Ferraduel	245	112	46	C
Ferraduel × ITAP-1	233	144	62	C

*Los cruzamientos se realizaron en dos años, correspondiéndose los valores de la tabla con la suma de ambos años.

^aEl fenotipo de incompatibilidad se indica mediante C, compatible; IC, incompatible.

Tabla 4.4. Segregación del genotipo S en las descendencias estudiadas y análisis Chi-cuadrado (χ^2).

Cruzamiento	N	Genotipo S observado				Genotipo S esperado
A2-198 × ITAP-1*	28	$S_{11}S_f$				$S_{11}S_f : S_fS_{fa}$
		100%				50:50
A2-198 × D01-188*	6	$S_{11}S_f$				$S_{11}S_f : S_fS_f$
		100%				50:50
A2-198 × Vivot*	4	$S_{23}S_f$				$S_{23}S_f : S_fS_{fa}$
		100%				50:50
D05-187 × ITAP-1	16	$S_{11}S_f$	S_fS_{fa}			$S_{11}S_f : S_fS_{fa}$
		44%	56%			50:50
D05-187 × D01-188	39	$S_{11}S_f$	S_fS_f			$S_{11}S_f : S_fS_f$
		54%	46%			50:50
D05-187 × Vivot*	9	$S_{23}S_f$	S_fS_{fa}			$S_{23}S_f : S_fS_{fa}$
		22%	78%			50:50
D07-332 × ITAP-1*	2	$S_{11}S_f$				$S_{11}S_f : S_fS_{fa}$
		100%				50:50
D07-332 × D01-188*	19	$S_{11}S_f$				$S_{11}S_f : S_fS_f$
		100%				50:50
D07-332 × Vivot*	8	$S_{23}S_f$	S_fS_{fa}			$S_{23}S_f : S_fS_{fa}$
		75%	25%			50:50
Marta × ITAP-1	71	$S_{11}S_f$	S_fS_{fa}	S_1S_{11}	S_1S_{fa}	$S_{11}S_f : S_fS_{fa} : S_1S_{11} : S_1S_{fa}$
		20%	21%	31%	28%	25:25:25:25
D01-188 × ITAP-1*	16	$S_{11}S_{fa}$	S_fS_{fa}			$S_{11}S_f : S_fS_{fa}$
		31%	56%			50:50
D01-188 × A2-198	33	$S_{11}S_f$	S_fS_f			$S_{11}S_f : S_fS_f$
		55%	45%			50:50
D01-188 × D01-188*	47	$S_{11}S_f$	S_fS_f			$S_{11}S_f : S_fS_f$
		70%	30%			50:50
ITAP-1 × Marta	51	S_1S_{11}	S_1S_{fa}			$S_1S_{11} : S_fS_{fa}$
		59%	41%			50:50
ITAP-1 × Vivot	7	S_1S_{23}				S_1S_{23}
		100%				100
ITAP-1 × Ferraduel	67	S_1S_{11}	S_1S_{fa}	S_4S_{11}	S_4S_{fa}	$S_1S_{11} : S_1S_{fa} : S_1S_{11} : S_4S_{fa}$
		31%	24%	30%	15%	25:25:25:25
Ferraduel × ITAP-1	107	S_1S_{11}	S_1S_{fa}	S_4S_{11}	S_4S_{fa}	$S_1S_{11} : S_1S_{fa} : S_1S_{11} : S_4S_{fa}$
		22%	27%	29%	22%	25:25:25:25

N Número de descendientes estudiados.

* Cruzamientos que presentan diferencia significativa entre la distribución observada y la esperada según un análisis χ^2 .

4.3.3. Verificación del pedigrí mediante el uso de marcadores moleculares tipo SSR

El análisis de los SSR estudiados confirmó que los descendientes correspondían efectivamente al cruzamiento Marta×ITAP-1 (Tabla 4.5).

Los marcadores polimórficos utilizados segregaron como se esperaba, obteniéndose una segregación coherente en los descendientes (con un alelo de la madre y otro del padre).

Tabla 4.5. Análisis de marcadores SSR en Marta, ITAP-1 y seis de sus descendientes elegidos al azar (D1-D6).

Muestra ^a	Genotipo S	Marcador			
		BPPCT007	CPPCT005	Ma040	UDP96005
Marta	S_1S_f	142	125/153	225/229	156
ITAP-1	$S_{11}S_{fa}$	148/162	144/149	195/263	142
D1	S_1S_{fa}	142/148	125/144	195/229	142/156
D2	S_1S_{fa}	142/148	125/144	195/225	142/156
D3	S_1S_{fa}	142/148	149/153	195/225	142/156
D4	S_fS_{fa}	142/148	125/144	195/229	142/156
D5	S_fS_{fa}	142/148	144/153	195/229	142/156
D6	S_fS_{fa}	142/148	149/153	195/229	142/156

4.3.4. Isoelectroenfoque de proteínas estilares y tinción para actividad ARNasa

Los zimogramas obtenidos tras isoelectroenfoque de proteínas estilares y tinción para actividad ribonucleasa mostraron dos bandas para cada una de las variedades de referencia (Del Cid y Marcona) y para la selección ITAP-1. Sin embargo, no se observó ninguna banda para la selección homocigótica auto-compatible A2-198 (Figura 4.3.).

Según lo esperado, Marcona presentó una banda a la misma altura que Del Cid, la cual corresponde a la ARNasa- S_{12} . La otra banda de Marcona corresponde a la ARNasa- S_{11} , la cual coincide con una de las bandas de ITAP-1. En esta selección además aparece otra banda en una posición superior que correspondería con la ARNasa- S_f .

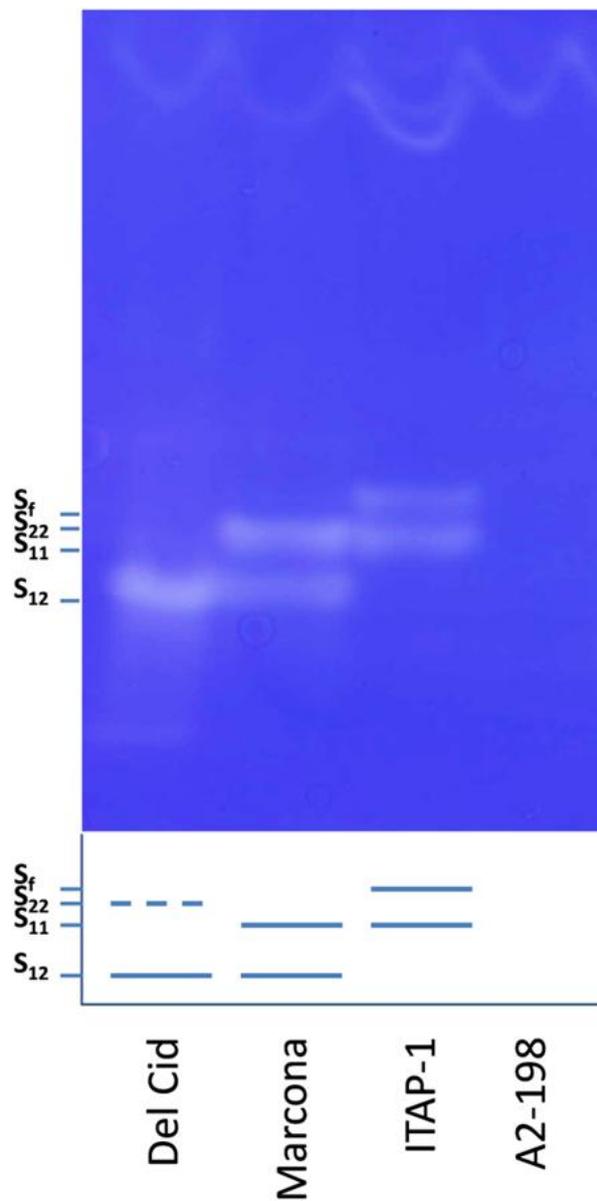


Figura 4.3. Zimograma correspondiente al IEF de proteínas estilares, tras tinción para actividad ARNasa, de las selecciones ITAP-1 y A2-198, junto con las dos variedades de referencia, para los alelos S_{11} y S_{12} , Del Cid y Marcona.

4.4. DISCUSIÓN

4.4.1. Determinación del fenotipo de incompatibilidad

Los cruzamientos realizados muestran en general, tanto en campo como en el laboratorio, los resultados esperados. Todas las variedades auto-compatibles homocigóticas (A2-198, D05-187 y D07-332) y heterocigóticas (Marta y D01-188) son además inter-compatibles con todas aquellas con las que se cruzan, incluso con ITAP-1 y Vivot, que presentan un genotipo S_{fa} . Estos resultados son los esperados en las selecciones con haplotipo S_f y además coinciden con los resultados anteriores descritos para A2-198 por Ortega y col. (2003) y Ortega y Dicenta (2006).

Sin embargo, y sobre todo, en las selecciones A2-198 ($S_f S_f$) y D07-332 ($S_f S_f$) el cuajado de los frutos tras las polinizaciones es muy bajo. Este problema en la selección A2-198 se ha observado que es debido a problemas en el desarrollo del fruto derivados del alto nivel de consanguinidad que presenta esta selección (Ortega et al., 2010). No se han realizado estudios similares con la selección D07-332, sin embargo esta selección proviene del cruzamiento R1000×Tardona, y Tardona a su vez se obtuvo del cruzamiento S5133×R1000 (Dicenta y col., 2009), con lo que al provenir ambos alelos S_f de Tuono (Figura 4.1) probablemente su nivel de consanguinidad sea alto también.

La selección ITAP-1 y la variedad Vivot, presentan un fenotipo auto-incompatible tal y como indicaban Martínez-García y col. (2011) y Fernández i Martí y col. (2010), de manera que el alelo S_{fa} en estos casos no es indicativo de auto-compatibilidad. Los resultados muestran que los cruzamientos $S_x S_{fa} \times S_x S_f$ o $S_x S_{fa} \times S_f S_f$ son inter-incompatibles. Sin embargo los cruzamientos inversos son inter-compatibles, estando por tanto ante un caso de incompatibilidad unilateral, ya que tanto el haplotipo S_f de Vivot (Fernández i Martí y col., 2010) como el de ITAP-1 presentan actividad ribonucleasa, como se ha podido

observar en los resultados obtenidos, de manera que es capaz de reconocer el haplotipo S_f . En cruzamientos directos e inversos realizados entre la variedad Vivot y las variedades Soleta y Belona, que poseen haplotipos S_{fa} y S_f como las selecciones analizadas en esta tesis, se observó también esta relación de incompatibilidad unilateral (Kodad y col., 2015). Otro caso de incompatibilidad unilateral en almendro se puede encontrar en la variedad Jeffries, originada por una mutación somaclonal espontánea de Nonpareil (S_7S_8) (Ushijima y col., 2001). Estos autores sugieren que esta variedad presenta dos copias del alelo S_8 y una baja expresión del alelo S_7 , mientras que previamente Tao y col. (1997) habían indicado que solo estaba presente la proteína S_8 . En estudios posteriores sin embargo se afirma que la proteína S_7 , no es tal, pues no se corresponde con ella en los análisis de actividad ribonucleasa realizados (Bošković y col., 2003). Jeffries es una variedad auto-incompatible que puede ser polinizada por cualquier variedad, pero sin embargo no puede polinizar a las variedades con haplotipo S_8 (Conel, 2000), por ello el origen de su incompatibilidad unilateral se ha atribuido a que el haplotipo S_8 no es funcional ni en pistilos ni en polen (Bošković y col., 2003). Pese a ser este un caso de incompatibilidad unilateral, la unilateralidad observada en esta tesis para el alelo S_f estaría debida solo a la disfunción de la ARNasa- S_f y no de la proteína SFB_f del polen, ya que el SFB_f sí es reconocido por las ARNasas- S_{fa} .

4.4.2. Determinación del genotipo S de los descendientes

De acuerdo con el sistema de incompatibilidad gametofítico descrito en almendro, el genotipo S de la descendencia obtenida de las polinizaciones realizadas sobre las selecciones homocigóticas con genotipos heterocigóticos para la ARNasa S_f o S_{fa} ($S_fS_f \times S_fS_x$ o $S_fS_f \times S_{fa}S_x$) debería tener una proporción 1:1 ($S_fS_f : S_fS_x$ o $S_fS_{fa} : S_fS_x$), pues tanto el polen correspondiente al alelo S_f como al

S_{fa} pueden crecer en pistilos con $ARNasa-S_f$, ya que este no codifica para una $ARNasa$ con actividad (Bošković y col., 1997).

Sin embargo, esto no ocurrió así en los cruzamientos de la selección A2-198 y D07-332, donde hay una clara preferencia a no transmitir el alelo S_f/S_{fa} de la $ARNasa$. Esto podría ser debido a un reconocimiento interno (debido a una reacción de incompatibilidad floral o afectando a la viabilidad del embrión) del alelo S_f en un intento de prevenir la endogamia tal y como está descrito que ocurre cuando se produce una auto-polinización de A2-198 (Ortega y Dicenta, 2006; Ortega y col., 2010) ya que la distribución de la descendencia en A2-198 es la esperada cuando se poliniza con variedades que no poseen el alelo S_f (Ortega y col., 2003). Aunque también hay que tener en cuenta en las diferencias entre los resultados obtenidos y esperados, que el número de descendientes es bajo, y esto podría influir en la desviación de las proporciones.

A diferencia de lo que ocurre en las polinizaciones de las selecciones homocigóticas auto-compatibles, en la descendencia de las polinizaciones sobre las selecciones heterocigóticas auto-compatibles S_xS_f (Marta y D01-188) sí que aparecen descendientes que presentan a la vez el alelo S_f y el alelo S_{fa} en su genotipo, lo que concuerda con lo esperado según el mecanismo de incompatibilidad descrito en almendro por Bošković y col. (1999). Además, fue comprobado que la descendencia con este genotipo, S_fS_{fa} , provenía del cruzamiento indicado y no de una auto-polinización del parental auto-compatibile. Para ello se aplicaron microsatélites ya utilizados anteriormente en estudios de test de paternidad en diferentes especies (Schueler y col., 2003; de la Rosa y col., 2004).

La descendencia S_fS_{fa} no ha podido ser analizada fenotípicamente debido al ciclo de desarrollo de los árboles, ya que aún no se han obtenido flores donde comprobar la auto-compatibilidad. Sin embargo, en un futuro

sería interesante comprobar si, como se espera, son auto-incompatibles, o son capaces de saltarse los mecanismos de incompatibilidad. Kodad y col. (2015) han llevado a cabo estudios fenotípicos sobre individuos con genotipo S_fS_{fa} , obtenidos de los cruzamientos realizados sobre las variedades auto-compatibles Belona y Soleta (S_fS_{23}) con la variedad auto-incompatible Vivot ($S_{fa}S_{23}$). Estos autores han comprobado que la descendencia es auto-incompatible, indicando por ello que la auto-compatibilidad es un carácter recesivo en los genotipos S_fS_{fa} y no dominante como se había visto hasta la fecha para el resto de combinaciones alélicas con el alelo S_f .

4.4.3. Isoelectroenfoque de proteínas estilares

Tal y como se esperaba por su fenotipo auto-incompatible, las dos ARNasas-S de la selección ITAP-1 mostraron actividad ribonucleasa. Un resultado similar a este obtuvo Fernández i Martí y col. (2010) para la variedad mallorquina Vivot, la cual también presenta haplotipo S_{fa} y fenotipo auto-incompatible. Por el contrario, la selección A2-198 presentó una total ausencia de actividad, lo que corrobora los resultados previos obtenidos para esta selección por Ortega y Dicenta (2003). Esta presencia y ausencia de actividad se tradujo en las relaciones de auto-(in)compatibilidad descritas según el sistema de incompatibilidad gametofítico (Bošković, 1997).

4.5. CONCLUSIONES

La caracterización fenotípica de los haplotipos referidos a la *ARNasa-S_f* y *ARNasa-S_{fa}* ha mostrado una relación de compatibilidad unilateral para el haplotipo S_f debida a una disfunción en el pistilo. Los pistilos con haplotipo S_f no reconocen como propio el alelo S_f del polen que avanza hasta el ovario. Sin

embargo, los pistilos con $ARNasa-S_{fa}$ sí reconocen y detienen el polen S_f , proveniente de genotipos con $ARNasa-S_f$ o $ARNasa-S_{fa}$.

Se ha comprobado que las selecciones auto-compatibles homocigóticas reconocen el haplotipo S_f del genitor masculino y tienden a no transmitirlo a la descendencia. Esto no ocurre en los individuos auto-compatibles heterocigóticos, que sí dan lugar a descendientes S_fS_{fa} .

Los zimogramas de actividad ribonucleasa han permitido comprobar la actividad de la $ARNasa S_{fa}$ de ITAP-1.

A close-up photograph of a flower's reproductive parts. The image shows several stamens with yellowish anthers and a central pistil with a brownish, hairy stigma. The background is a soft, out-of-focus light color.

***5. Caracterización
molecular del locus- S_f***

5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL LOCUS-*S_f*

5.1. INTRODUCCIÓN

El sistema de auto-incompatibilidad en almendro es, como ya se ha indicado anteriormente, de tipo gametofítico y está controlado por un único *locus* polimórfico denominado *S*. Este *locus* codifica al menos para dos genes: el gen *ARNasa-S*, que es el determinante femenino y se expresa en el pistilo, y el gen *SFB*, determinante masculino expresado en el polen (Tao and Iezzoni, 2010). Las *ARNasa-S* en almendro, al igual que en otros *Prunus*, presentan cinco regiones conservadas (C1-C5), una región hipervariable (RHV) entre C2 y C3 y dos intrones (Ushijima y col, 1998; Igit y Kohn, 2001; Ma y Oliveira, 2002). El primero de estos intrones se localiza entre el péptido señal y la región conservada 1, mientras que el segundo está en la región hipervariable (Figura 1.3). Estos dos intrones presentan un tamaño variable entre los distintos alelos de *ARNasa-S*, lo que permite diferenciar cada alelo en función de su tamaño al amplificar las zonas que contienen estos intrones mediante PCR (Ortega y col., 2005).

Aunque el tamaño del *locus-S* en *Prunus* es desconocido (Entani y col., 2003), se ha observado que en almendro los genes determinantes de la especificidad se localizan en una región de unos 70 kb, y que fuera de esta región la secuencia está muy conservada entre los distintos haplotipos (Ushijima y col., 2001). Por tanto, aunque en esta especie se han identificado los genes *ARNasa-S* y *SFB* (Ushijima y col., 2003), todavía se desconoce la estructura y la composición de gran parte del *locus-S*, en la que podrían encontrarse genes implicados en la regulación del sistema de incompatibilidad.

Por otro lado, los distintos estudios realizados para detectar recombinación en el *locus-S* han resultado negativos. Esto se asocia al ligamiento físico entre los genes *ARNasa-S* y *SFB*, así como al heteromorfismo

y la presencia de secuencias repetitivas en las regiones que flanquean la *ARNasa-S* y sus intrones (Ushijima y col, 2003; Ikeda y col., 2005).

A parte de los genes del *locus-S*, hay evidencia de la implicación de otros genes modificadores en el funcionamiento del sistema de incompatibilidad en distintas especies de *Prunus* que aunque están codificados fuera del *locus S*, se expresan en pistilo, donde interaccionan con las *ARNasas* y el *SFB*. Como se indicó en la introducción, hasta la fecha se han identificado las proteínas HTB, 120K y NaStEP (McClure y col., 1999; Lind y col., 1996; Bussot y col., 2008), aunque se han propuesto otros modificadores como la NaTrxh (Avila-Castañeda y col., 2014). Además, también se ha indicado la presencia de otros factores ajenos al *locus S* como las mutaciones en el pistilo o en el polen (Wünsch y Hormaza, 2004; Zuriaga y col., 2013; Cachi y Wünsch, 2014). En almendro se ha asociado también la auto-compatibilidad a la presencia de mutaciones fuera del *locus S*, aunque no se han localizado (Fernández i Martí y col., 2010; Martínez-García y col., 2011).

El objetivo de este capítulo es la caracterización molecular del haplotipo *S_f* en variedades de almendro con distinto fenotipo, con el fin de determinar si existen diferencias en los genes implicados en el sistema de incompatibilidad.

5.2. MATERIAL VEGETAL Y METODOLOGÍA

Con el fin de caracterizar genotípicamente el *locus S_f*, se secuenció la región promotora de la *ARNasa-S_f*, la *ARNasa-S_f* y la región intergénica *ARNasa-S_f/SFB_f* de material con haplotipo *S_f* y diferente fenotipo. Además se realizó un análisis transcriptómico para estudiar el comportamiento de la *ARNasa-S_f*, del *SFB_f* y de un transcrito localizado en la región intergénica *ARNasa-S_f/SFB_f*, y no descrito anteriormente.

5.2.1. Material vegetal

Para caracterizar molecularmente el locus S_f se utilizaron la selección A2-198 (homocigótica auto-compatible, S_fS_f) y la selección ITAP-1 (heterocigótica auto-incompatible, $S_{11}S_{fa}$). Ambas descritas en detalle en el Apartado 2.2, y cuyo comportamiento fenotípico se indica en el Capítulo 4 de la presente tesis. Además de este material, en los ensayos de secuenciación se utilizaron Vivot ($S_{23}S_{fa}$) y Tuono (S_1S_{fa}), y en los ensayos de transcripción Lauranne (S_3S_{fa}) y Vivot (material que se describe en detalle en el Apartado 2.1).

5.2.2. PCR inversa

Para la realización de la PCR inversa, se extrajo ADN genómico de hojas jóvenes de la selección ITAP-1 como se indica en el Apartado 3.2.2, siendo posteriormente digerido con la enzima PciI (Biolabs). Seguidamente los productos de la digestión fueron visualizados en geles de agarosa al 1% TAE 1x y aquellos con un tamaño inferior a 2.000 pb se extrajeron del gel, ya que se consideró éste como el tamaño aproximado que podría contener la *ARNasa-S_f* y la región promotora. Posteriormente los productos extraídos de agarosa se purificaron con el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) y tras esto se auto-ligaron utilizando 5 U de ADN ligasa T4 (Thermo Scientific) (Apartado 3.4.1).

El producto ligado se amplificó en primer lugar con los cebadores SRNase SP (5'-GAAGAAAGCGAAACCAAGAACAAG-3'), localizados en el péptido señal, y SRNase C5 (5'-GTTGTTACATGAAGTGGTATTTTG-3'), en la región C5 de la *ARNasa-S_f*, como se indica en el Apartado 3.4.1. Al obtener la secuencia de producto amplificado, y comprobar mediante una comparación tipo Blast que la secuencia obtenida era igual a la zona flanqueante 5' del alelo S_f de la *ARNasa* de Hanada *y col.*, (2009), se diseñó el par de cebadores

Pinter-F y Pinter-R de secuencias 5'-TTGGTAAGTGGTTTCCTTG TG-3' y 5'-TTTTGATGGTTTAGTTGTGCT-3,' para una segunda PCRi.

Los productos de la segunda PCRi fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% TAE 1x, extraídos de éste y purificados. Con estos productos purificados posteriormente se realizó una PCR anidada siguiendo las mismas condiciones de la PCRi (Apartado 3.4.1). A continuación se purificaron los productos y se secuenciaron en el Centro de Ricerca e Innovazione (Fondazione Edmund Mach) de San Michele all'Adige (Italia), para comprobar que tales fragmentos se correspondían con el promotor.

5.2.3. PCR de alta fidelidad

Amplificación de la región promotora de la ARN_{asa-S_f}

Una vez se obtuvo la secuencia del promotor de la ARN_{asa-S_f} se diseñaron cebadores localizados en el extremo 5' de la secuencia promotora (For Promotor: 5'-ACATGTGACTCAGGTGCTCAA-3') y al inicio del primer intrón de la ARN_{asa-S_f} (Rev Promotor: 5'-CTTGTAATGCAACCCACCATC-3') para la amplificación de esta zona. La reacción de PCR fue llevada a cabo con 1 U de KOD Hot Start ADN Polimerasa (Novagen) siguiendo el método descrito en el Apartado 3.4.2.

Amplificación de la ARN_{asa-S_f}

La ARN_{asa-S_f} de la selección A2-198 fue clonada desde el péptido señal hasta una región posterior a la región conservada C5, utilizándose para ello el cebador PaConsI-F descrito en Ortega y col. (2006) y el cebador C5'-ENC-R (5'-AGAAAGCTATAATTTTAATGAAACTTA-3'). En la reacción de PCR llevada cabo para esta amplificación se utilizó 1 U de KOD Hot Start ADN Polimerasa (Novagen), según el procedimiento indicado en el Apartado 3.4.2.

Amplificación de la región intergénica *ARNasa-S_f/SFB_f*

Para la amplificación de la región intergénica se utilizó un cebador localizado en la región C5 de la *ARNasa-S_f*, el complemento reverso del cebador EM-PC5consRD (Sutherland y col., 2004) y el cebador SFB3'Sf-2 (5'-ATTTTGTTCCTTTCACTTTCTTACATAG-3'), ubicado en el dominio F-box del gen *SFB_f*. En este caso se emplearon 1,5 U de la polimerasa KOD XL (Novagen), en las condiciones indicadas en el Apartado 3.4.2.

Todos los productos de PCR obtenidos se purificaron siguiendo las instrucciones del kit QIAquick Spin de Qiagen (Apartado 3.4.3) y tras esto, fueron cuantificados en geles de agarosa al 1% en tampón TAE 1x, utilizando un patrón de ADN Lambda, tal y como se describe en el Apartado 3.2.2.

5.2.4 Clonación y extracción de plásmidos

Para la clonación de cada región del *locus S*, en función de la polimerasa utilizada, KOD Hot Start ADN Polimerasa o KOD XL Polimerasa, se utilizaron los kits "Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for sequencing" y "TOPO XL PCR Cloning kit", respectivamente. Para la transformación se utilizaron en ambos casos, células TOP10 de *E. coli* químicamente competentes (Invitrogen) cultivadas en placas Petri con medio LB-Agar y Kanamicina (50 µg/ml), siguiendo el método descrito en el Apartado 3.4.4. Una vez crecidas las colonias, éstas se replicaron y las colonias positivas se identificaron mediante PCR. Para la realización de éstas cada colonia se inoculó en la mezcla de reacción que contenía los cebadores específicos para cada fragmento (indicados en el apartado anterior). Las condiciones de PCR y el método seguido para su realización se describen en el Apartado 3.4.5.

Una vez identificadas, las colonias positivas se inocularon y cultivaron en medio líquido LB-Kanamicina (50µg/ml). De estos cultivos se extrajeron los

plásmidos, siguiendo las instrucciones del kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen. Posteriormente, los plásmidos fueron digeridos con la enzima EcoRI (Apartado 3.4.6) y los productos correspondientes fueron visualizados en geles de agarosa, para comprobar el tamaño de los plásmidos y cuantificar el ADN.

5.2.5. Secuenciación y análisis de secuencias

La secuenciación de cada elemento se realizó aplicando el método de Sanger desarrollado por SECUGEN S.L. (Madrid). Un mínimo de tres plásmidos se envió a secuenciar con los cebadores universales M13 y, dependiendo del tamaño de cada elemento, también con cebadores intermedios. Las secuencias obtenidas fueron procesadas con los softwares BioEdit y DNASTAR. Este último ofreció una secuencia consenso con su aplicación SeqManII, y la alineación mediante el método Clustal W (Thompson y col. 1997) con la aplicación MegAlign.

Para un análisis de búsqueda de motivos o repeticiones en las secuencias se utilizaron las bases de datos PlantProm y PlantCARE (Shahmuradov y col., 2003; Lescot y col., 2002) y los softwares REPFIND (Betley et al., 2002) y EMBOSS PALINDROME (Rice et al., 2000). La búsqueda de posibles marcos abiertos de lectura dentro de la región intergénica *ARN_{asa}-S_f/SFB_f* se realizó con la aplicación ORF Finder (http://www.bioinformatics.org/sms2/orf_find.html). El análisis de homología de la secuencia se realizó mediante alineamiento tipo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en las base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

5.2.6. Detección de la transcripción mediante RT-PCR

Retrotranscripción de la *ARN_{asa}-S_f* y la *ARN_{asa}-S_{fa}*

La expresión del gen *ARN_{asa}-S_f* y del transcrito de la región intergénica se determinó mediante un análisis de retrotranscripción. Para analizar la *ARN_{asa}-S_f*

se tomaron botones florales en estado D-E (Felipe, 1977) de las selecciones A2-198 e ITAP-1, y de las variedades Lauranne y Vivot. De estos botones se separaron los pistilos y tras ser congelados a -80°C se extrajo el ARN de ellos usando el método CTAB de Gambino y col. (2008), descrito en el Apartado 3.5.1. Para realizar la RT-PCR se diseñaron los cebadores SfC2-F2 (5'-GCACTGGGTCGCAATTTAAAAA-3') localizado en la región C2, y SfC3-R2 (5'-TTGCCATGTTTGTCCACTCGT-3') localizado en la región C3 a partir de la secuencia de ADN de la ARNasa-Sf FN429352 obtenida por Martínez-García y col. (2011), de ITAP-1. Para la reacción de RT-PCR se utilizaron las enzimas *Avian myeloblastosis virus* reverse transcriptasa y GoTaq® polymerase (Promega) en el procedimiento descrito en el Apartado 3.5.2. Una vez finalizada la RT-PCR, los productos se visualizaron bajo luz UV, junto con el marcador de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen) en geles de agarosa al 1% en TAE 1x.

Retrotranscripción del ORF de la región intergénica *ARNasa-S/SFB*

En la retrotranscripción del transcrito de la región intergénica *ARNasa-S/SFB* se utilizaron pistilos no polinizados y pistilos polinizados de las selecciones A2-198 e ITAP-1. Se tomaron botones florales en estado D-E de los que se separaron anteras y pistilos. Una parte de éstos fue congelada así, y con el resto se realizaron los cruzamientos A2-198×A2-198 e ITAP-1×A2-198 en bandeja. Los pistilos fueron recogidos 48 horas después de la polinización y conservados a -80 °C. El ARN de estas muestras se extrajo usando el método CTAB de Gambino y col. (2008), descrito en el Apartado 3.5.1. El ARN así obtenido se utilizó para obtener el ADNc con la enzima SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen) según se indica en el Apartado 3.5.5.

En la PCR del ORF se utilizaron dos cebadores localizados en su interior: el cebador 3200-F (5'-GTTTCGTTATGTGGACA-3') más cercano a la *ARNasa* y el Intergen2-R (5'-CTAATCTGATAAGCAAATAACAT-3') más cercano al *SFB*.

La enzima usada para la reacción fue Taq polymerase (QIAGEN). Los parámetros de la PCR incluyeron: 3 minutos a 94 °C, 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 52 °C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos, y una extensión final de 72°C durante 10 minutos. Los productos de la PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1% en TAE 1x bajo luz UV, junto con el marcador de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen).

5.2.7. Cuantificación de los transcritos mediante q-PCR

Para realizar la cuantificación de los transcritos se utilizaron pistilos en estado D-E sin polinizar y pistilos a las 48 horas de ser polinizados de las selecciones A2-198 e ITAP-1 (Apartado 3.5.1). De estos se extrajo el ARN como se indica en el Apartado 5.2.6. Este ARN fue transcrito a ADN complementario (ADNc) con la enzima SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen), según se describe en el manual del producto. La secuencia de los cebadores específicos utilizados para la amplificación de cada transcrito se encuentra en el Anexo 1.

Para la realización de la qPCR se utilizó el reactivo Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), que se incubó junto con los cebadores específicos y el ADNc según las condiciones de reacción descritas en el Apartado 3.5.5. Se realizaron tres réplicas técnicas de cada muestra que fueron analizadas con el programa StepOne Software v2.3. Estos datos se normalizaron con los datos obtenidos para los genes de referencia 18S, Act y TEF2, (Rasori y col., 2002; Tong y col., 2009) expresándose los niveles de ARNm de cada muestra como la media del ratio de la expresión relativa \pm las desviaciones estándares.

5.3. RESULTADOS

Los análisis de secuenciación realizados en el *locus-S_f* permitieron conocer la secuencia de la *ARNasa-S_f*, su promotor y la región intergénica *ARNasa-S_f/SFB_f*

de la selección A2-198, obteniéndose una secuencia total de 8091 nucleótidos, distribuidos entre las distintas zonas (Figura 5.1).

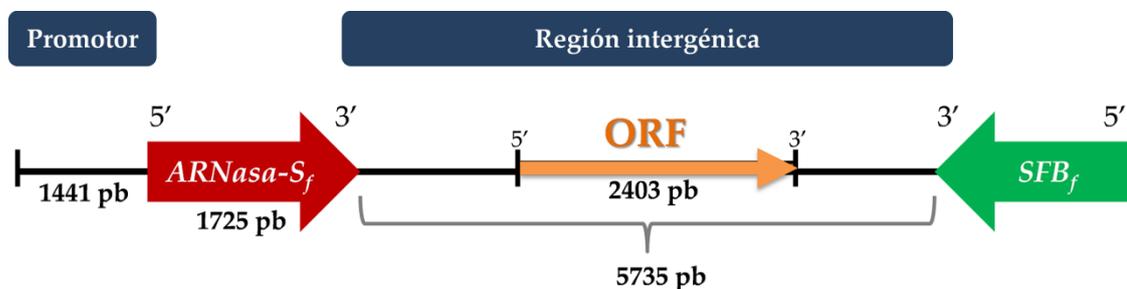


Figura 5.1. Esquema de la estructura genómica de la parte caracterizada del locus- S_f de almendro. Se indican los tamaños (pb) de las zonas secuenciadas en esta tesis y la orientación de la $ARNasa-S_f$, del SFB_f y del ORF identificado en la región intergénica $ARNasa-S_f/SFB_f$.

5.3.1. Secuenciación de la $ARNasa-S_f$ de la selección A2-198

Tras la clonación y secuenciación de la $ARNasa-S_f$ de la selección A2-198 se obtuvo una secuencia de 1708 pb (Figura 5.2). Esta secuencia fue alineada con la secuencia de la $ARNasa-S_f$ de la selección ITAP-1 con número de accesoión FN429352 obtenida por Martínez-García y col. (2011), no observándose ninguna diferencia en la alineación a excepción de que la secuencia obtenida para A2-198 fue de mayor tamaño al utilizarse un cebador diferente localizado aguas abajo. Tras procesar la secuencia obtenida y eliminar los dos intrones, se obtuvo la secuencia codificante (1-49; 381-562; 1225-1611) que fue traducida a proteína y alineada con la secuencia proteica de la $ARNasa-S_f$ de ITAP-1 CAZ68888, donde, al ser la secuencia génica igual, no se observaron tampoco diferencias.

5.3.2. Secuenciación del promotor de la $ARNasa-S_f$ y $ARNasa-S_{fa}$

La región promotora amplificada tiene un tamaño de 1543 pb, que suponen la secuenciación de 1441 pb aguas arriba del inicio de la traducción de la $ARNasa-S_f$ de A2-198 y Tuono y de la $ARNasa-S_{fa}$ de ITAP-1. La alineación de

estas secuencias con la del promotor de Vivot (comunicación personal Fernández i Martí) no presentó ninguna diferencia entre ellas.

La secuencia obtenida fue también alineada con la secuencia para la *ARNasa-S_f* EF619314, que posee una zona anterior al péptido señal. Esta secuencia fue obtenida desde mRNA y posee descrita la región codificante y las regiones 5'UTR y 3'UTR. Esto permitió situar el codón de iniciación de la traducción de la proteína (ATG) 27 pb aguas arriba del inicio de la secuencia de la *ARNasa-S_f* obtenida en esta tesis e indicada en el apartado anterior.

La secuencia se analizó frente a las bases de datos PlantProm y PlantCARE (Shahmuradov y col., 2003; Lescot y col., 2002). Ambas predijeron dos posibles TATA-box, la primera localizada en la posición -85 (ccTATAA) y la segunda en la posición -654 (ccTATAAA). Además de estas TATA-box, la base de datos PlantCare predijo seis más en sentido 5'-3' (Figura 5.2).

Por otro lado, en las regiones proximales a los dos posibles centros TATA-box del promotor aparecen elementos-*cis* característicos de los promotores. Así, se localizaron dos motivos IB (CTCCCAA) en las posiciones -889 y -123. Además, el análisis de la secuencia con PlantCARE predijo la existencia de varios elementos-*cis* característicos de los promotores (Tabla 5.1).

5.3.3. Secuenciación de la región intergénica *ARNasa-S_f/SFB_f*

La región intergénica *ARNasa-S_f/SFB_f* se localiza entre los extremos 3' de la *ARNasa-S_f* y 5' del *SFB_f* por lo que ambos genes se encuentran orientados en sentido opuesto (Figura 5.1). Esto se determinó al obtener sólo amplificación con el par de cebadores descritos en el Apartado 5.2.4 y no con otras combinaciones de cebadores situados en los extremos de ambos genes. El tamaño de la región intergénica amplificada mediante PCR es de unos 6 Kb (Figura 5.3), siendo similar en todo el material utilizado.

Tabla 5.1. Descripción de algunos elementos *cis* localizados en la región promotora de la *ARNasa-S_f*.

Elemento- <i>cis</i>	Posición	Secuencia	Función
TATA-box	171	TATA	Elemento central del promotor localizado -30 pb del inicio de la transcripción
	349	TATA	
	401	TAATA	
	468	TATA	
	479	TAATA	
	784	ccTATAAAaa	
	1257	TAATA	
	1354	ccTATAAAaa	
Motivo-IB	552	GCCAC	Elemento <i>cis</i> necesario para la transcripción de la <i>ARNasa</i> en patata
	1318	GCCAC	
CAAT-box	18	CAAT	Elemento <i>cis</i> común en regiones promotoras y potenciadoras
	53	CAAT	
	174	CAAT*	
	178	CAAT*	
	182	CAAAT*	
	227	CAAT	
	406	CAAAT	
	500	CAAAT	
	531	CAAAT	
	563	CCAAT	
	564	CAAT	
	679	CCAAT	
	680	CAAT	
	1040	CAAT*	
	1077	CAAAT*	
	1172	CAAAT*	
1319	CCCAATTT		
1320	CCAAT		
1327	CAAT*		
5UTR Py-rich stretch	1004	TTTCTTCTCT*	Elemento <i>cis</i> que confiere altos niveles de transcripción
HD-Zip 3	649	GTAAT (G/C) ATTAC	Sitio de unión de proteínas
MBSI	961	TTTTTACGGTTA*	Sitio de unión de factores de transcripción tipo MYB, implicado en la regulación de genes biosintéticos de flavonoides
TC-rich repeats	294	ATTTTCTCCA	Elemento <i>cis</i> implicado en respuesta a estrés y defensa

*Las secuencias marcadas con asteriscos aparecen en la secuencia en sentido 3'-5'.

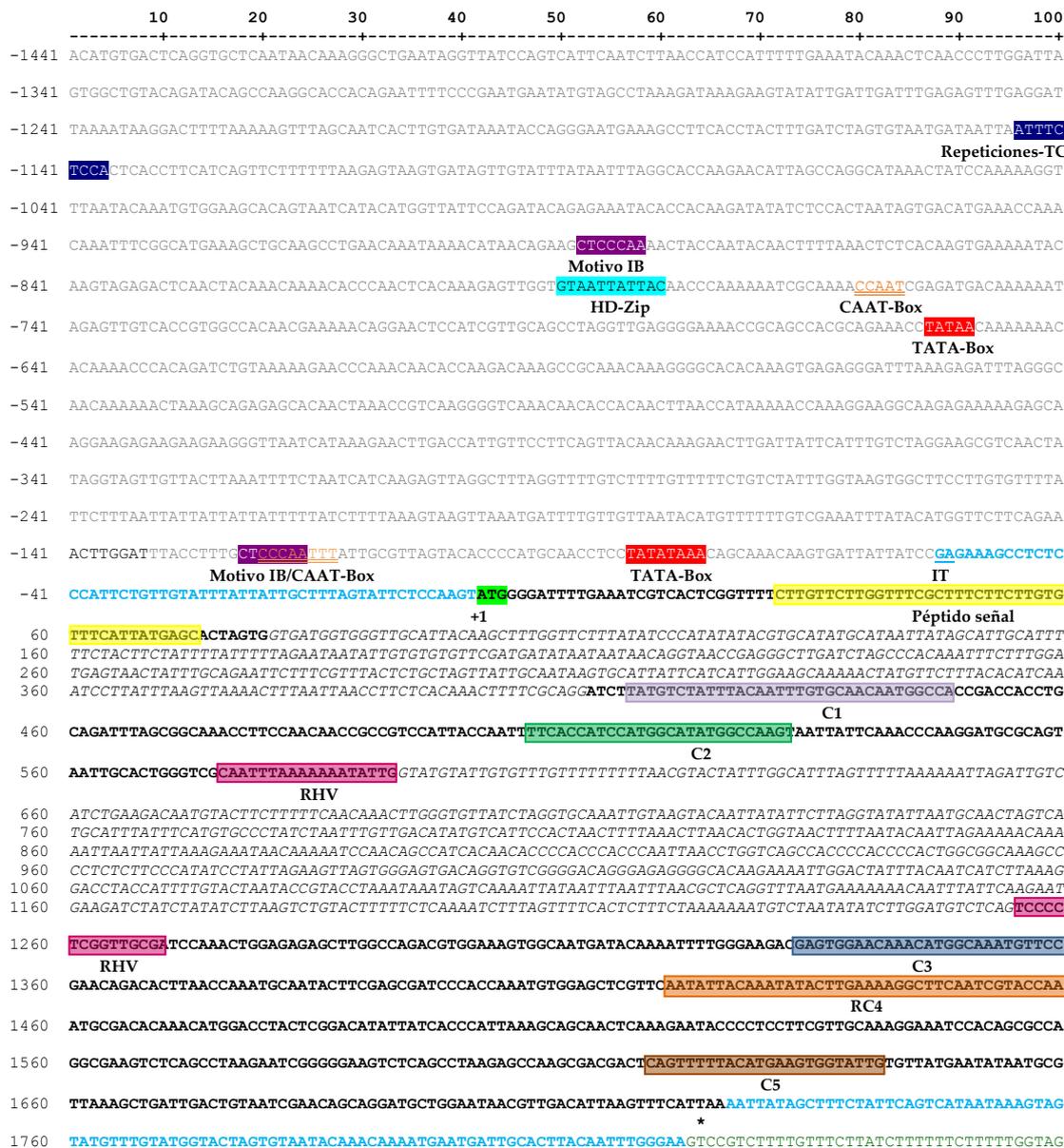


Figura 5.2. Secuencia correspondiente a la región promotora de la *ARNasa-Sf*, *ARNasa-Sf* y región intergénica *ARNasa-Sf/SFb_f* de la selección A2-198. Cada zona aparece coloreada de un modo diferente: promotor (gris), regiones 5' y 3' UTR de la *ARNasa-Sf* (azul) y *ARNasa-Sf* (negro), región intergénica (verde).

Promotor: Las zonas sombreadas corresponden a sus elementos característicos. *ARNasa-Sf:* Las zonas sombreadas corresponden a sus motivos conservados. Las bases donde se localiza el inicio de la transcripción (IT) aparecen subrayadas. Con +1 se indica el punto de inicio de la traducción. El final de la traducción se marca con un asterisco (*).

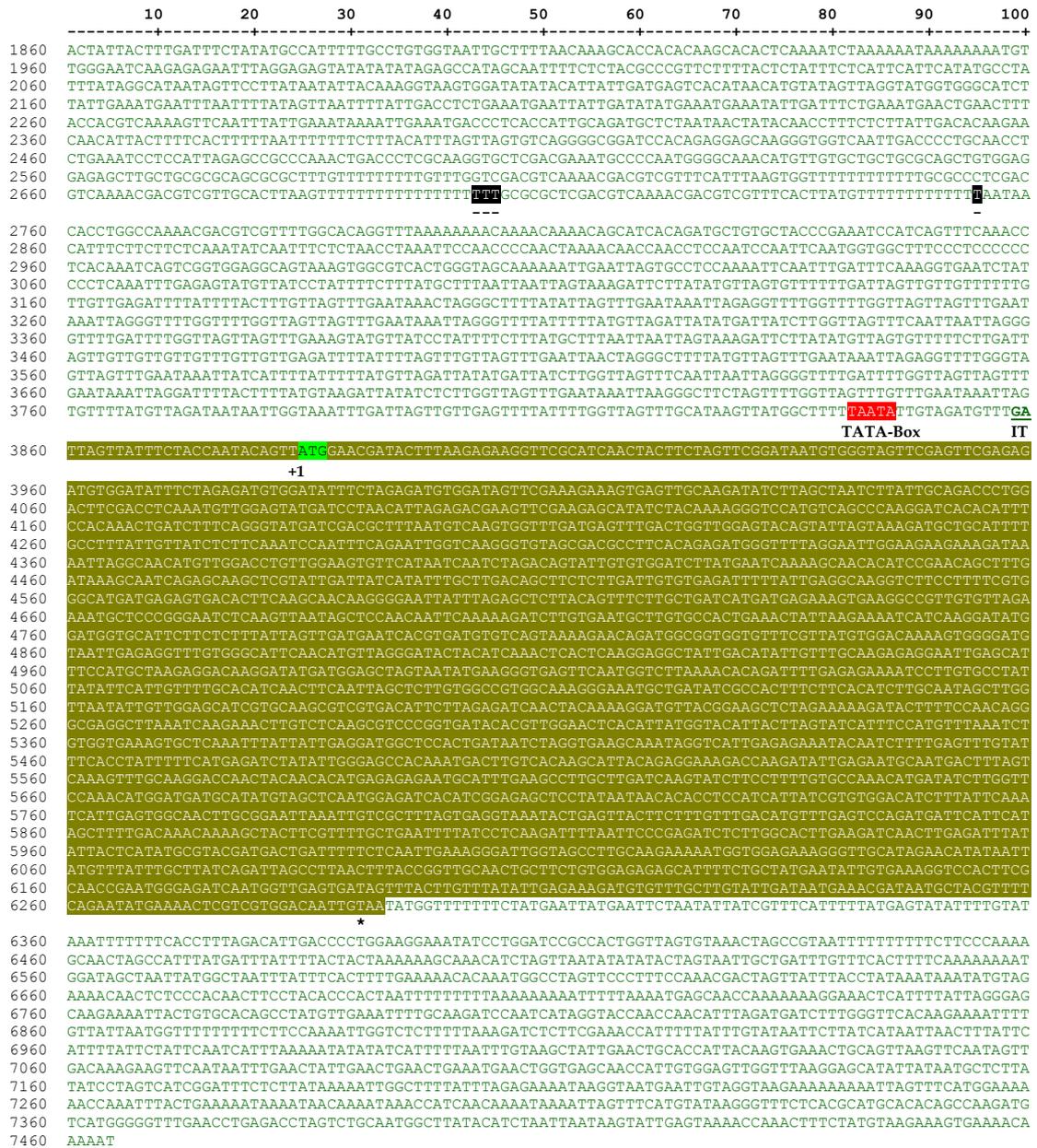


Figura 5.3. Secuencia correspondiente a región intergénica *ARNasa-Sf/SFBf* de la selección A2-198. Las bases sombreadas en negro corresponden a la inserción de timinas, no presentes en el resto de material analizado. La amplia región sombreada en verde corresponde al ORF y las bases coloreadas anteriores a esta zona corresponden a elementos característicos de los promotores. Las bases donde se localiza el inicio de la transcripción (IT) aparecen subrayadas. Con +1 se indica el punto inicio de la traducción. El final de la traducción se marca con asterisco (*).

predijo 26 posibles TATA-box, aunque solo una localizada en las inmediaciones del inicio de la transcripción del ORF, concretamente en la posición 3841 (TAATA). Además de este elemento central, la base de datos PlantCare predijo otros elementos-*cis* (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Descripción de algunos elementos *cis* localizados en la región promotora del ORF localizado en la región intergénica la *ARNasa-S_f/SFB_f*.

Elemento- <i>cis</i>	Posición	Secuencia	Función
TATA-box	134	TAATA	Elemento central del promotor localizado 30 pb del inicio de la transcripción
	173	TTTAAAAA	
	493	TAAAGATT	
	503	TATA	
	588	TATA	
	702	ATTATA	
	806	TAAAGATT	
	978	ATTATA	
	1070	ATTATA	
	1154	TAATA	
	1221	TAATA	
CAAT-box	253	CAAAT	Elemento <i>cis</i> común en regiones promotoras y potenciadoras
	260	CAATT	
	306	CCAAT	
	311	CCAAT	
	317	CAAT	
	343	CAAAT	
	390	CAATT*	
	414	CAATT	
	416	CAAAT*	
	444	CAAAT	
	447	CAAAT*	
	727	CAATT	
	1003	CAATT	
	1159	CCAAT*	
	1167	CAAAT*	
1253	CCAAT		
CAT-box	367	GCCACT*	Elemento <i>cis</i> relacionado con la expresión del meristemo
TC-rich repeats	263	ATTCTCTAAC	Elemento <i>cis</i> implicado en respuesta a estrés y defensa
	780	ATTTTCTTCA	
	467	ATTTTCTTCA	
	1148	ATTCTCTAAC*	

*Las secuencias marcadas con asteriscos aparecen en la secuencia en sentido 3'-5'.

5.3.4. Detección de los transcritos del locus *S_f*

Transcripción de la *ARNasa-S_f/S_{fa}*

La detección de la transcripción de la *ARNasa-S_f* se comprobó mediante RT-PCR tanto para el haplotipo activo como para el inactivo, amplificándose una banda de 150 pb en todo el material analizado (A2-198, ITAP-1, Lauranne y Vivot) (Figura 5.5).

El tamaño de la banda fue el esperado para la *ARNasa-S_f/S_{fa}*. Sin embargo, la intensidad de las bandas no fue igual en todos los casos, siendo menor en Lauranne (variedad auto-compatible heterocigótica), intermedia en A2-198 (homocigótica auto-compatible) y mayor en ITAP-1 y Vivot (heterocigóticas auto-incompatibles).

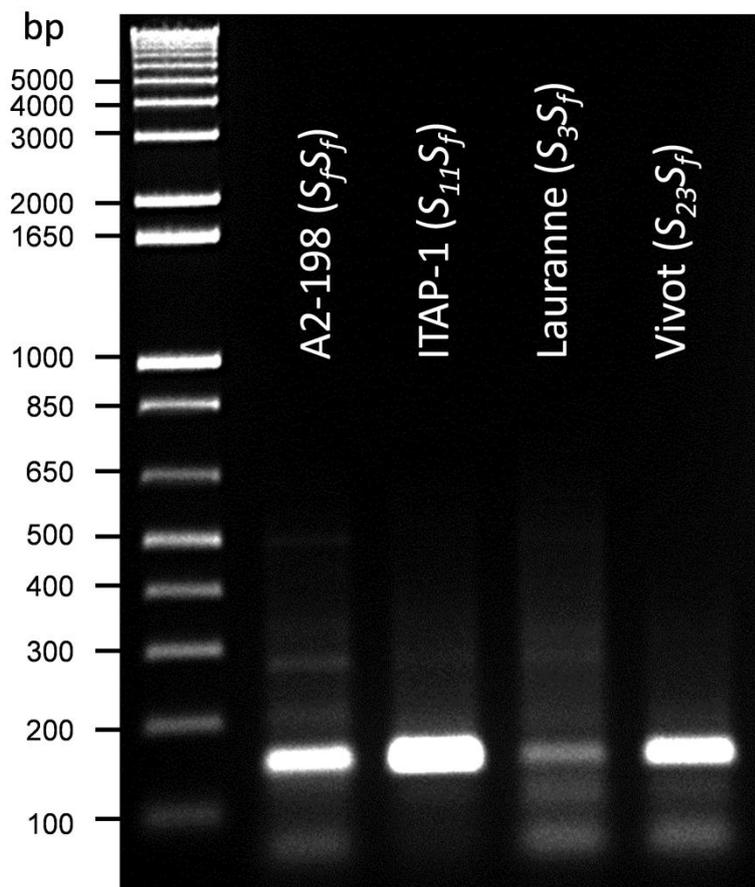


Figura 5.5. Productos obtenidos mediante RT-PCR para la *ARNasa-S_f* y la *ARNasa-S_{fa}* con los cebadores específicos S_fC2-F2 y S_fC3-R2.

Transcripción del ORF de la región intergénica *ARNasa-S_f/SFB_f*

La detección de la transcripción del ORF de la región intergénica no presentó ninguna banda en el análisis de los pistilos sin polinizar y tras la polinización compatible (A2-198×A2-198). Sólo presentó una banda de un tamaño similar a 1,2 Kb (tamaño esperado) tras la polinización incompatible (ITAP-1×A2-198) como se observa en la Figura 5.6.

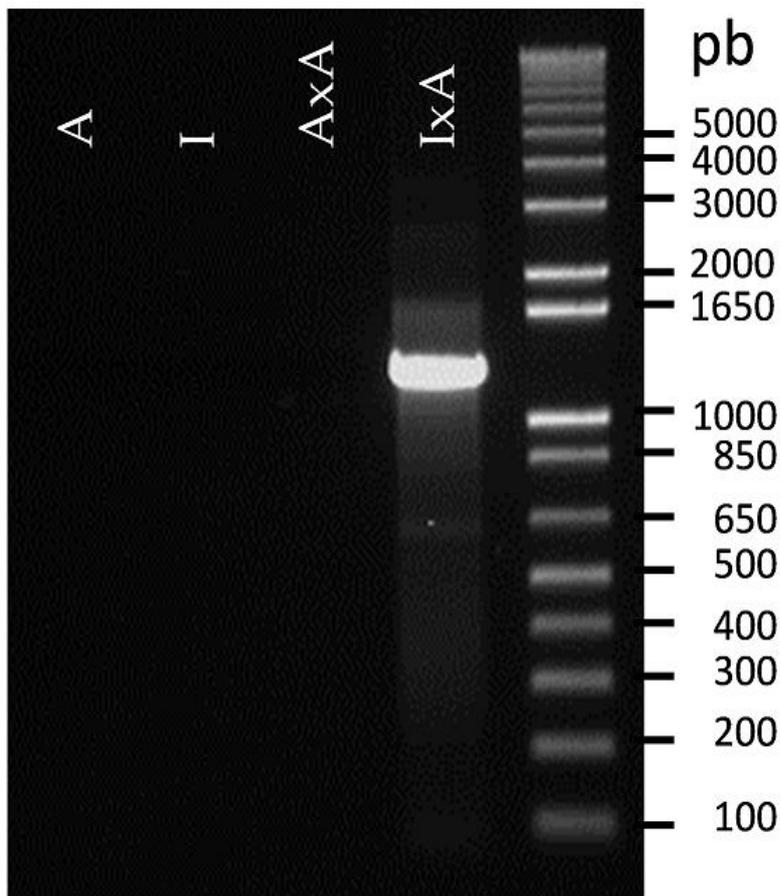


Figura 5.6. Productos obtenidos mediante RT-PCR para el ORF de la región intergénica *ARNasa-S_f/SFB_f* en pistilos no polinizados de las selecciones A2-198 (A) e ITAP-1 (I) y en pistilos polinizados correspondientes a los cruzamientos A2-198×A2-198 (A×A) e ITAP-1×A2-198 (I×A).

5.3.5. Cuantificación de transcritos del locus S_f

Mediante qPCR se obtuvieron los perfiles de expresión de las ARN_{Sas-S_f} , $ARN_{Sas-S_{fa}}$, los SFB_f y el ORF de la región intergénica ARN_{Sas-S_f/SFB_f} .

Cuantificación de la transcripción de la ARN_{Sas-S_f} y $ARN_{Sas-S_{fa}}$

Como se puede observar en la Figura 5.7, la expresión de la ARN_{Sas-S_f} en A2-198 fue menor que la expresión de la $ARN_{Sas-S_{fa}}$ en Vivot, presentando la $ARN_{Sas-S_{fa}}$ una expresión del orden de 4 veces más que la ARN_{Sas-S_f} .

Siguiendo la misma tendencia, la expresión de la $ARN_{Sas-S_{fa}}$ tras la polinización incompatible (ITAP-1 x A2-198) fue mayor que la expresión de la ARN_{Sas-S_f} tras la polinización compatible (A2-198 x A2-198). Sin embargo, la expresión de la ARN_{Sas-S_f} fue menor en los pistilos polinizados que en sus homólogos sin polinizar.

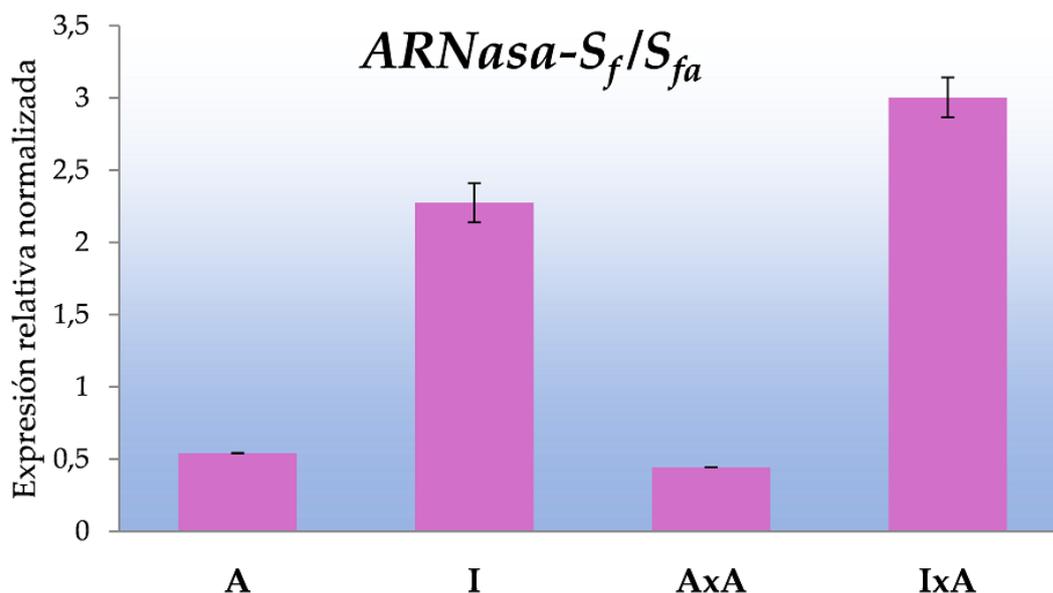


Figura 5.7. Cuantificación de la expresión de la ARN_{Sas-S_f} y $ARN_{Sas-S_{fa}}$ en pistilos sin polinizar de las selecciones A2-198 (A) e ITAP-1 (I) y en pistilos polinizados de los cruzamientos A2-198x A2-198 (AxA) e ITAP-1x A2-198 (IxA).

Cuantificación de la transcripción de SFB_f

La expresión del SFB_f fue en general muy baja en A2-198 e ITAP-1 (Figura 5.8). En los pistilos sin polinizar la expresión de SFB_f fue prácticamente nula en A2-198, e inexistente en ITAP-1. Sin embargo, la expresión de ambos aumentó tras las polinizaciones, siendo en la polinización compatible (A2-198×A2-198) el doble de la polinización incompatible (ITAP-1×ITAP-1).

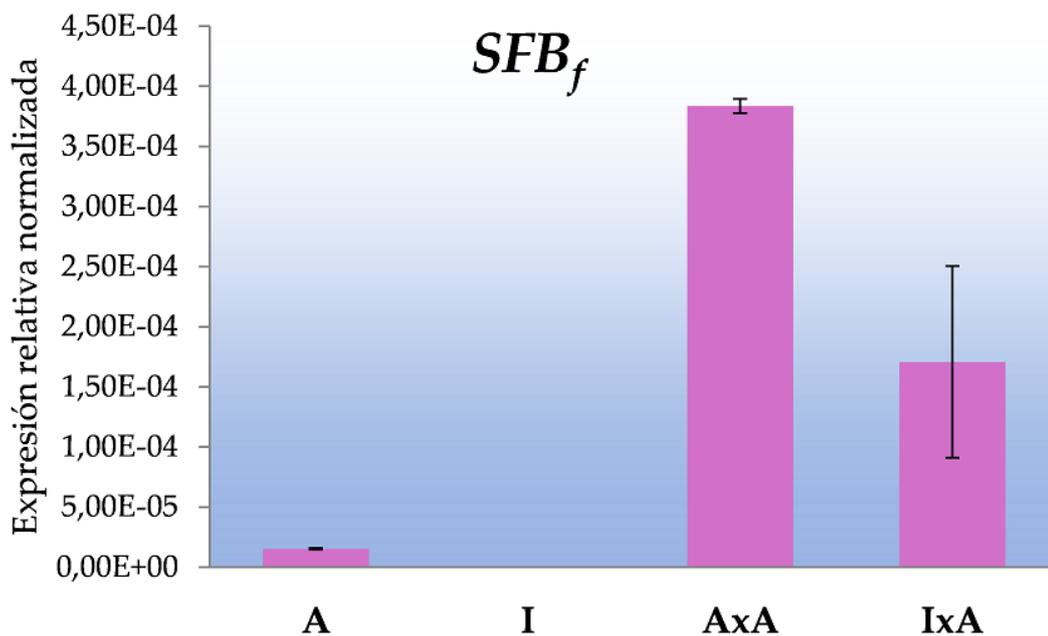


Figura 5.8. Cuantificación de la expresión del SFB_f en pistilos sin polinizar de las selecciones A2-198 (A) e ITAP-1 (I) y en pistilos polinizados de los cruzamientos A2-198×A2-198 (A×A) e ITAP-1×A2-198 (I×A).

Cuantificación de la transcripción del ORF de la región intergénica

Los resultados de la qPCR mostraron una expresión muy baja y similar, del orden de 0,07, en los pistilos sin polinizar de las dos selecciones. Mientras que esta expresión aumentó hasta un orden de 45 tras la polinización incompatible (Figura 5.9).

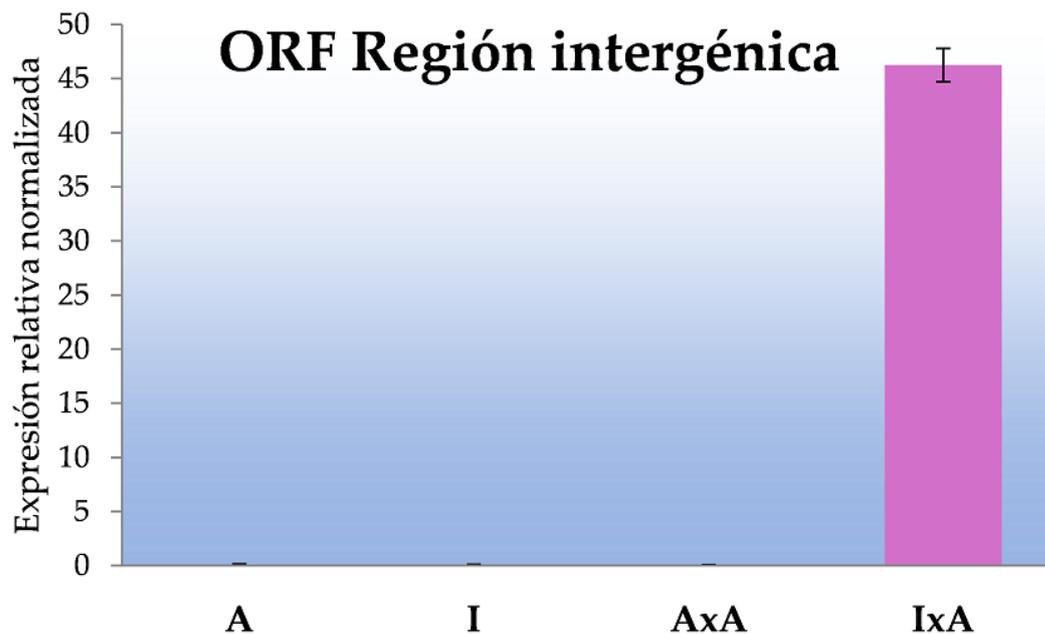


Figura 5.9. Cuantificación de la expresión del ORF de la región intergénica *ARNasa-S_f/SFB_f* en pistilos sin polinizar de las selecciones A2-198 (A) e ITAP-1 (I) y en pistilos polinizados de los cruzamientos A2-198×A2-198 (A×A) e ITAP-1×A2-198 (I×A).

5.4. DISCUSIÓN

5.4.1. Secuenciación de la *ARNasa-S_f*

Durante algún tiempo se creyó en la existencia de posibles diferencias entre las secuencias de la *ARNasa-S_f* y la *ARNasa-S_{fa}*, también denominada *ARNasa-S₃₀* por Boskovic y col. (2007). Sin embargo, la inexistencia de estas diferencias fue comprobada posteriormente por Hanada y col. (2009). Asimismo, la alineación de la secuencia obtenida para la *ARNasa-S_f* de la selección A2-198, con la secuencia de la *ARNasa-S_{fa}* de ITAP-1, obtenida por Martínez-García y col. (2011), apoyan esta inexistencia de diferencias. Además, estos mismos autores tampoco encontraron diferencias en las secuencias de sus genes *SFB*, de manera que si los dos componentes del *locus-S* identificados son iguales a nivel de ADN, el diferente fenotipo de estas selecciones tendría que deberse a la implicación de otros factores en el sistema

de incompatibilidad, que actuarían como modificadores de la función estos genes (McCLure y col., 2000).

5.4.2. Secuenciación del promotor de la *ARNasa-S_f*

La secuenciación de la región adyacente 5' de la *ARNasa-S_f* ha permitido localizar elementos típicos de los promotores proximales, que comprenden la región adyacente al punto de inicio de la transcripción ± 250 nucleótidos (Butler y Kadonaga, 2002). El elemento típico de los promotores es la caja-TATA, cuya secuencia consenso en plantas es TATAAATA y se localiza a 15-32 nucleótidos aguas arriba del inicio de la transcripción (Kahl, 2015), con este dato, podemos afirmar que la caja TATA asociada a la *ARNasa-S_f* es la localizada a -31 nucleótidos del punto marcado como inicio de la transcripción, a -85 nucleótidos del codón de inicio de la proteína. Estas posiciones son similares a las obtenidas para promotores de otras *ARNasas-S* de Solanáceas y Rosáceas que sitúan la caja TATA entre 82-124 nucleótidos aguas arriba del inicio de la transcripción (Ishizaka y col., 2003; Liu y col., 2012). Sin embargo, al realizar un alineamiento de estas secuencias con las de almendro obtenidas, se ha comprobado que son bastante distintas, compartiendo sólo determinados elementos-cis característicos de los promotores.

En la región promotora de la *ARNasa-S_f* de almendro obtenida, varios motivos CAAT-Box aparecen predichos. Este elemento-*cis* y potenciador característico de los promotores se sitúa generalmente 90 nucleótidos aguas arriba del inicio de la transcripción (Kahl, 2015). En nuestro caso, aparece este motivo localizado 68 nucleótidos aguas arriba del punto marcado como inicio de la transcripción, sin embargo está descrito que su distancia al inicio de la transcripción puede variar considerablemente y actuar en las dos direcciones. No se ha descrito que esté directamente relacionado con la especificidad del

promotor, pero se cree que determina la eficiencia de la transcripción (Porto y col., 2014).

Otro elemento-*cis* localizado en la posición -124 es el motivo-IB, este motivo fue localizado previamente por Fernández i Martí y col. (2010) en el promotor de las *ARNasa-S_{fa}* de Vivot y Blanquerna, y parece ser necesario para la expresión de la *ARNasa-S* en patata (Flicker y col., 1998). Este motivo aparece repetido aguas arriba del primero.

Según los elementos-*cis* localizados en la secuencia promotora parece ser que hay dos centros de actuación, uno de ellos cercano al inicio de la transcripción de la *ARNasa-S_f* y localizado aguas arriba. Sin embargo, teniendo en cuenta las posiciones teóricas de los motivos, indicadas anteriormente, se podría decir que el centro del promotor se localiza en torno a la posición -100, siendo el otro motivo TATA-Box secundario.

La alineación de las secuencias obtenidas para la región promotora de la *ARNasa-S_f* (en A2-198 y Tuono) y la *ARNasa-S_{fa}* (en ITAP-1 y Vivot) no presentó ninguna diferencia, por cual, la ausencia de actividad de *ARNasa* característica del haplotipo-*S_f* no se debe a diferencias en la secuencia de su promotor proximal. Sin embargo, el nivel de transcripción de un gen puede variar significativamente por otros elementos, entre los cuales se incluyen los del promotor distal. Estos elementos, activadores o represores, pueden estar localizados cientos o miles de pares de bases aguas arriba o aguas abajo del punto de inicio de la transcripción (Porto y col., 2014), pudiendo estar la región intergénica *ARNasa-S_f/SFB_f* implicada también en la regulación de la expresión de la *ARNasa-S_f*.

5.4.3. Secuenciación de la región intergénica *ARNasa-S_f/SFB_f*

La región intergénica *ARNasa-S_f/SFB_f* amplificada se encuentra entre los extremos 3' de ambos genes, esta orientación enfrentada es común en todas las variedades de almendro analizadas previamente (Ushijima y col., 2003; Tao y col., 2007; Šurbanovski y col., 2007; Hanada y col., 2009). Un cambio en esta orientación se ha calculado que ocurriría una vez cada 380 millones de años (Vieira y col., 2008). Por el contrario, estos cambios de orientación sí son comunes en la incompatibilidad esporofítica. Así, en *Brassica* es frecuente encontrar los genes *SRK* y *SP11* (determinante del pistilo y polen respectivamente) con distinta localización y orientación dentro del *locus-S* (Vieira y col., 2008).

El tamaño de la región (6 kb), coincide con el propuesto por Hanada y col., (2009), y es similar en el material utilizado. A diferencia de la orientación, el tamaño de esta región se ha descrito como altamente variable entre los distintos haplotipos *S* de almendro (Ushijima y col., 2003; Tao y col., 2007; Šurbanovski y col., 2007; Hanada y col., 2009). Esta variabilidad de tamaño se observa también en distintas especies de *Prunus* variando entre 380 bp y 40 kb (Ushijima y col., 2003; Romero y col., 2004; Ikeda y col., 2005; Watari y col., 2007; Šurbanovski y col., 2007; Vieira y col., 2008; Donia y col., 2016). Esta variabilidad va acompañada además de la presencia de múltiples repeticiones en las zonas no codificantes cercanas a la *ARNasa-S_f*, como se puede observar en los resultados ofrecidos por REPFIND lo que coincide con datos previos. (Ushijima y col., 2003; Ikeda y col., 2005).

La secuencia genómica correspondiente a la región intergénica *ARNasa-S_f/SFB_f* presenta diferencias en zonas de repeticiones de timinas. Estas diferencias suponen la inserción de tres timinas en las variedades auto-compatibles. Dicha inserción, aunque no se encuentra en la zona codificante de la *ARNasa* podría ser la causante de la baja expresión y la falta de

funcionalidad de la *ARNasa-S_f*, bien debido a una actuación directa sobre ella o bien debido a que actúe sobre otros factores como podría ser la expresión del ORF localizado aguas debajo de esta inserción. Este tipo de mutaciones, inserciones y deleciones, en la región codificante de la *ARNasa* en *Prunus cerasus* se ha visto que son las causantes de su inhibición y causantes de la compatibilidad unilateral (Yamane y col., 2003; Tsukamoto y col., 2006). Ushijima y col. (2003) indicaron que el *locus-S* es una región heteromórfica rica en secuencias retro-transposónicas, que ha sufrido repetidos reordenamientos, deleciones e inserciones a lo largo de su evolución, al igual que el *locus-S* de *Brassicaceae*. Tras su análisis, indicaron la presencia de tres genes en este *locus*: *ARNasa-S*, *SFB* y *PsSLF*, pero no aparece ningún ORF descrito entre la *ARNasa-S* y el *SFB*, a diferencia de lo que ocurre en nuestros análisis, probablemente porque la región intergénica en el haplotipo *S_c* (*S₇*), 1,556 kb, es menor que el ORF descrito en la presente tesis, 2,433 kb. Este ORF presenta además en su región adyacente 5' los elementos característicos de un promotor, así como otros elementos-*cis* típicos de su regulación, con lo cual se postula que podría además de transcribirse (como se ha comprobado mediante RT-PCR y qPCR), traducirse a proteína y expresarse.

Los dominios ZnF-TTF y Dimer-hAT localizados en el ORF de la región intergénica son característicos de transposasas. Los elementos-transponibles sobre los que actúan éstas están ampliamente distribuidos en la naturaleza, haciéndolos una fuente considerable de innovaciones genéticas durante la evolución de las especies (Feschotte y Pritham, 2007). El *locus-S* posee numerosos transposones y secuencias repetidas (Ushijima y col, 2003; Ikeda y col., 2005) que podrían ser diana de los dominios del ORF.

Las proteínas ZnF son una superfamilia de proteínas implicadas en los procesos de crecimiento y desarrollo de la planta así como en la regulación de los mecanismos de resistencia a estrés biótico y abiótico (Feurtado y col., 2011;

Giri y col., 2011). Es además un dominio típico de las proteínas de resistencia en diversas especies, en las que se ha visto que podrían tener una función en la interacción hospedador-patógeno (Gupta y col., 2012). Este tipo de interacción es tradicionalmente comparado con la interacción polen-pistilo (Hodgkin et al., 1988; Elleman and Dickinson, 1999), de modo que no se descarta su posible función en el mecanismo de incompatibilidad.

DAYSLEEPER, una transposasa esencial para el normal crecimiento en *Arabidopsis thailiana*, presenta en su estructura un dominio hAT similar al localizado en el ORF. Las plantas que carecen o que sobre-expresan fuertemente este gen no se desarrollan de manera normal. Además, la sobre-expresión da lugar a la expresión alterada de otros genes (Bundock y Hooyas, 2005). De modo que las transposasas además de ser esenciales para el desarrollo de las plantas, estarían implicadas en la regulación de la expresión génica global (Knip y col., 2012). Teniendo en cuenta esto, podríamos contemplar la posibilidad de que el ORF de la región intergénica codifique para una posible proteína responsable de la expresión de la *ARNasa-S_f*.

5.4.4. Detección y cuantificación de los transcritos del locus *S_f*

Transcripción de la *ARNasa-S_f/S_{fa}*

Como se ha podido comprobar mediante RT-PCR la *ARNasa-S_f* y la *ARNasa-S_{fa}* se transcriben, de modo que la pérdida de actividad en la *ARNasa-S_f* de A2-198 no se debe a la ausencia de transcritos en el estilo. Estos resultados difieren de los de Fernández y Martí y col. (2010), quienes indicaron que no existe transcripción de la *ARNasa-S_f* en las variedades auto-compatibles Tuono y Blanquerna. Sin embargo, en un trabajo previo, estos autores observaron niveles traza de transcritos de la *ARNasa-S_f* en la variedad auto-compatibile

Tuono (Hanada y col., 2009), indicando que esta baja transcripción podría no ser suficiente para que se produjera la reacción auto-incompatible.

La cuantificación de los transcritos mediante qPCR corrobora los resultados de la RT-PCR, transcribiéndose en *ARNasa-S_f* y *ARNasa-S_{fa}*, aunque a un nivel mucho mayor en ITAP-1 (*ARNasa-S_{fa}*). Esta elevada transcripción se podía intuir con la RT-PCR, ya que la intensidad de la banda en ITAP-1 era mayor que en el resto de genotipos analizados. De hecho, la cantidad de una *ARNasa-S* particular en diferentes variedades se ha ligado a la auto-incompatibilidad en el peral japonés (Zhang y Hiratsuka, 1999).

La presencia de la *ARNasa-S_f* y la *ARNasa-S_{fa}*, tras la polinización no presenta una gran variación a diferencia de lo que ocurre en las *ARNasas-S* de albaricoque, que disminuyen tras ser polinizadas (Feng y col., 2006). Pese a que la variación es mínima tras las polinizaciones, sí se puede observar una disminución tras la polinización compatible. Esta disminución de las *ARNasas-S* tras una polinización compatible ha sido observada a nivel de ARN así como a nivel proteico tras una polinización compatible en *Solanum chacoense* por Liu y col. (2009). Estos autores sugieren que esta disminución de los transcritos de las *ARNasas-S* podría estar generada por la degradación de las propias *ARNasas* en los tubos polínicos. Tendría lugar un mecanismo de control por retroalimentación, que resultaría en una disminución de la capacidad de mantener la cantidad de *ARNasas-S* en el estilo, reforzándose así la reacción de compatibilidad.

Transcripción de *SFB_f*

La transcripción del *SFB* no ha sido el foco de atención en los distintos estudios del mecanismo de auto-incompatibilidad en almendro debido a que, como se indica en el capítulo anterior, la incompatibilidad unilateral observada

se debe a la falta de actividad de la *ARNasa-S_f* y no a modificaciones del SFB. Sin embargo en esta tesis se ha observado una transcripción muy baja del SFB en pistilos polinizados. Esto puede deberse a que este gen se expresa específicamente en el polen (Entani y col., 2003; Ushijima y col., 2003) y la proporción del polen en los pistilos polinizados es muy baja. Además, no existe diferencia de expresión significativa tras la polinización compatible y la incompatible, lo que se corresponde con la ausencia de diferencias de transcripción observadas en los SFB del polen en ciruelo japonés (Watari y col., 2007).

Transcripción del ORF de la región intergénica *ARNasa-S_f/SFB_f*

Los análisis del ORF de la región intergénica *ARNasa-S_f/SFB_f* mediante RT-PCR y qPCR son coincidentes. En ambos casos se observa como la transcripción se dispara tras la polinización incompatible (ITAP-1×A2-198). Esta sobre-expresión podría tener relación con el mecanismo de incompatibilidad en almendro, ya que los dominios que presenta el ORF son los característicos de las transposasas y, como se ha indicado anteriormente, este tipo de proteínas están implicadas en la regulación de la expresión génica (Knip y col., 2012).

Por otro lado, no hay ninguna descripción previa del ORF observado en el *locus-S*, por lo que sería necesario realizar estudios futuros que confirmasen su función en la reacción de incompatibilidad y determinasen además, si la causa de la diferencia de expresión en la selección A2-198 e ITAP-1, tras ser polinizadas, se debe a que no se encuentren en el mismo marco de lectura, o esta característica no resulta determinante para su transcripción.

5.5. CONCLUSIONES

Los análisis de secuenciación no han mostrado diferencias entre la *ARNasa-S_f* y la *ARNasa-S_{fa}*, ni entre sus regiones promotoras, por lo que estas regiones del *locus-S* no son las responsables del diferente fenotipo de auto-incompatibilidad.

La transcriptómica cuantitativa ha demostrado que tanto la *ARNasa-S_f* como la *ARNasa-S_{fa}* se transcriben, aunque esta última presenta un nivel de transcripción mucho mayor. La presencia de transcritos de la *ARNasa-S_f* indica que su falta de actividad ribonucleasa no es debida a una falta de transcripción del gen.

Sí se han observado diferencias en las secuencias de la región intergénica *ARNasa-S_f/SFB_f* consistentes en la inserción de tres timinas. Esta modificación en la secuencia podría ser la responsable de la transcripción diferencial del ORF descrito por primera vez en esta tesis, lo que podría ser la causa del origen de la auto-compatibilidad en almendro.

A close-up photograph of a flower's reproductive parts. The image shows several stamens with yellowish anthers and long, thin filaments. A central pistil is visible, featuring a fuzzy, brownish stigma and a long style. The background is a soft, out-of-focus light color.

***6. Análisis
transcriptómico de
pistilos con haplotipo S_f***

6. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE PISTILOS CON HAPLOTIPO S_f

6.1. INTRODUCCIÓN

Los estudios de genética molecular en el género *Prunus* se han realizado fundamentalmente mediante el análisis del ADN, siendo mucho más escasos los estudios del ARN. Los estudios transcriptoma de *Prunus* se orientaron inicialmente al desarrollo y alineamiento de ESTs (Expressed Sequence Tags), y al análisis de los genes candidatos para determinados caracteres agronómicos en melocotonero (Yamamoto y col., 2002), albaricoquero (Decroocq y col., 2003; Grimplet y col., 2005) y almendro (Jiang y Ma, 2003).

En los últimos años se han desarrollado técnicas de secuenciación de alto rendimiento que están causando una revolución en la investigación de los ácidos nucleicos. La secuenciación del transcriptoma (RNA-Seq) en especies del género *Prunus* ha sido aplicada en melocotonero para identificar y aislar genes que controlan diferentes caracteres agronómicos del árbol y del fruto (Wang y col., 2013; Chen y col., 2014; Sanhueza y col., 2015). También se ha utilizado para estudiar genes implicados en procesos de patogenicidad en melocotonero (Rubio y col. 2015; Gao y col., 2016) o en albaricoquero (Rubio et al., 2016), en el análisis de la expresión génica del letargo en *Prunus mume* (Zhong y col., 2013), en el desarrollo y calidad del fruto en cerezo (Alkio y col., 2014; Wei y col., 2015), o en la resistencia al frío en almendro (Mousavi y col., 2014).

Sin embargo, pese a estos avances en la secuenciación del ARN, el conocimiento de la asociación entre genes y caracteres agronómicos en *Prunus* es aún muy limitado. Entre los caracteres que no han sido asociados aún a un gen concreto, o que poseen una asociación insuficiente debido a la implicación de factores no conocidos, se encuentra la auto-compatibilidad floral. En este

sentido, como ya se ha comentado en esta tesis, la existencia de almendros con genotipo S_f (asociado tradicionalmente con la auto-compatibilidad), pero fenotipo auto-incompatible apoya la idea de la existencia de otros componentes modificadores en el sistema de incompatibilidad ajenos al *locus S* (Martínez-García y col., 2011), aunque estos componentes podrían estar incluso dentro del *locus S*, como se ha indicado en el Capítulo 5.

Estudios de transcriptómica comparativa para identificar modificadores implicados en el sistema de incompatibilidad gametofítico se han llevado a cabo en *Citrus clementina*, *Prunus mume*, dos especies del género *Solanum* y también en *Camellia sinensis* (Caruso y col., 2012; Habu y Tao, 2014; Zhao y col., 2015; Zhang y col., 2016). Sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios similares de secuenciación de ARN (RNAseq) en almendro.

El objetivo del presente capítulo es determinar el perfil transcriptómico en pistilos con haplotipo S_f y distinto fenotipo, y también el perfil inducido tras una reacción compatible y una incompatible, y su validación mediante cuantificación de la expresión génica.

6.2. MATERIAL VEGETAL Y METODOLOGÍA

En los análisis de transcriptómica diferencial se realizó una secuenciación del ARNm de pistilos en individuos con haplotipo S_f pero diferente fenotipo, tras diferentes tratamientos de polinización, seguido de un análisis diferencial de la expresión de los transcritos.

6.2.1. Material vegetal

En este ensayo se utilizaron pistilos no polinizados de la selección auto-compatible A2-198 (S_fS_f) y la selección auto-incompatible ITAP-1 ($S_{11}S_{fa}$).

Además, se analizaron pistilos de estas selecciones, a las 48 horas de ser polinizados con A2-198.

Como ya se indicó en el Apartado 2.2, se trata de dos selecciones que comparten el haplotipo S_f pero que presentan diferente fenotipo debido a que la ARNasa de ITAP-1 presenta actividad y la de A2-198 no. Es en esta característica en la que radica el interés del uso de este material para el estudio de los factores implicados en el sistema de incompatibilidad.

6.2.2. Extracción de ARN

Para la extracción del ARN de pistilos se tomaron botones florales en estado D-E (Felipe, 1977) de ambas selecciones y se separaron pistilos y anteras del resto de la flor. Las anteras fueron utilizadas para la extracción del polen necesario para la polinización de los pistilos y se procesaron como se indica en el Apartado 3.1.1. Los pistilos no polinizados se conservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, mientras que los pistilos utilizados en las polinizaciones se colocaron en bandejas y se polinizaron al día siguiente como se indica en el Apartado 3.1.4. Los pistilos desprovistos de la parte del cáliz, que aún presentaban, se recogieron 48 horas después de ser polinizados y se conservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. El material congelado fue utilizado posteriormente para la extracción de ARN siguiendo el método CTAB de Gambino y col. (2008), descrito en el Apartado 3.5.1.

6.2.3. Secuenciación de ARN

La secuenciación del ARN se llevó a cabo en el Centro de Regulación Genómica (CRG, Barcelona) siguiendo el método descrito en el Apartado 3.3. El ARNm se obtuvo mediante Sera-mag y las librerías de ADNc se prepararon de acuerdo a los protocolos Illumina. Estas librerías tras ser escindidas se

secuenciaron con un secuenciador Illumina HiSeq2000, que llevó a cabo una secuenciación de 125 PE.

Las secuencias de ARN fueron analizadas mediante un doble control de calidad. Primero, se alinearon un 10% de lecturas seleccionadas al azar frente al genoma de referencia de *Prunus persica* v.1.0. El segundo análisis fue llevado a cabo con el software FastQC. Tras estos análisis, las lecturas de mayor calidad fueron mapeadas respecto al genoma de referencia de *Prunus persica* v.1.0. con el programa Bowtie2 (Langmead y col., 2012). Cada par de archivos obtenidos del mapeo se unificaron en un único archivo con el software Samtools 0.1.18 (Li y col., 2009) obteniéndose finalmente 3 archivos de alineación, uno para cada condición.

6.2.4. Análisis de la expresión diferencial de transcritos de ARN

Tanto el cálculo del nivel de la transcripción como su normalización mediante Raw Counts y el estudio de la expresión diferencial fueron realizados con el paquete Bioconductor 1.20.0 (Anders y Huber, 2010). Una vez obtenidos los genes expresados diferencialmente se eliminaron los datos con menor valor estadístico, seleccionándose los genes con un $\log_2(\text{Fold_Change}) > 7$ y $\log_2(\text{Fold_Change}) < -7$ y $\text{Base_Mean} > 10$ para aquellos genes con un $\text{Fold_Change} = 0/\text{INF}$.

La anotación funcional y el análisis de la significación biológica de cada gen se realizó con el programa Blast2Go 2.8, frente a las bases de datos *Gene Ontology* (GO) y *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. Estos análisis de determinación biológica permitieron caracterizar los transcritos en base a su funcionalidad, su participación en los distintos procesos y su posible relación con el sistema de incompatibilidad, siendo esta última característica la

determinante a la hora de seleccionar la mayoría de los genes que posteriormente se analizaron mediante qPCR.

6.2.5. Validación de los datos de secuenciación de ARN mediante qPCR

Los análisis de secuenciación de ARN se validaron mediante qPCR. Para esta validación se extrajo ARN de una nueva muestra de pistilos polinizados y sin polinizar de las mismas selecciones utilizadas anteriormente, pero correspondiente a otra toma de muestras. El ARN fue extraído siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente (Apartado 6.2.4.). Con este ARN se obtuvo el ADNc para cada condición siguiendo el protocolo de la enzima SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen) y los cebadores específicos para cada transcrito se diseñaron con la herramienta online Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>) (Undergasser y col., 2012). La lista de los cebadores empleados se encuentra en el Anexo II.

La qPCR se llevó a cabo usando el reactivo Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) que se incubó junto con los cebadores específicos y el ADNc según las condiciones de reacción indicadas en el Apartado 3.5.5. Los datos obtenidos se normalizaron con los genes de referencia ARNr 18S de melocotonero (18S) (Rasori y col., 2002), actina (Act) y ARN polimerasa II (RPII) (Tong y col., 2009). En nuestro caso, el gen RP II fue el más estable de manera que se utilizó para la representación de la expresión de los genes analizados.

La eficiencia de la qPCR (E) y el ciclo umbral (C_t) fueron calculados usando el programa StepOne Software v2.3. Teniendo en cuenta estos valores, el ratio de la expresión relativa de cada gen fue calculado en base a los valores de E y C_t de los genes candidatos y los genes de referencia de acuerdo a las

ecuaciones de Perikles (2003). Cada muestra se midió por triplicado y se calculó la media del ratio de la expresión relativa y las desviaciones estándar.

De acuerdo con los resultados de la GO y su localización en el genoma del melocotonero, se eligieron genes expresados diferencialmente que pudieran estar relacionados con el sistema de incompatibilidad para realizar el análisis de expresión. También se analizaron como control interno de la expresión génica genes con una elevada expresión, pero sin diferencia significativa en ésta, ni relación con el mecanismo de incompatibilidad.

6.3. RESULTADOS

6.3.1. Análisis de los resultados de secuenciación

Tras eliminar adaptadores, lecturas ambiguas y de baja calidad se generaron un total de 7.6, 6.8, 6.9 y 6.5 millones de lecturas 125 PE para los pistilos sin polinizar de A2-198, de ITAP-1, auto-polinización de A2-198 (A2-198×A2-198) y la polinización incompatible de ITAP-1 (ITAP-1×A2-198). Para cada muestra entre el 51.31% y el 60.47% de las lecturas fueron alineadas con el genoma del melocotonero utilizado como referencia (Tabla 6.1).

Tabla 6.1. Estadísticos de las lecturas obtenidas y de su mapeo frente al genoma del melocotonero *Prunus pérsica* v 1.0.

Muestra	Lecturas	Lecturas pareadas	Q30*	Lecturas mapeadas
A2-198	75 917 609	75 917 609 (100%)	95.9%	45 907 379 (60.47%)
ITAP-1	67 612 712	67 612 712 (100%)	95.7%	34 692 083 (51.31%)
A2-198×A2-198	68 570 908	68 570 908 (100%)	96.1%	40 662 549 (59.30%)
ITAP-1×A2-198	65 417 948	65 417 948 (100%)	95.8%	39 290 020 (60.02%)

*Q30 indica una probabilidad de error de secuenciación de 0.001.

6.3.2. Identificación de los genes expresados diferencialmente, clasificación y anotación funcional

Tras realizar el análisis cuantitativo de los transcritos de ARN, 28 702 genes aparecieron expresados diferencialmente. Entre estos transcritos se seleccionaron los 1357 que presentaban un mayor valor estadístico, según las condiciones indicadas en el Apartado 3.5.4. De estos transcritos expresados diferencialmente de manera significativa, un total de 852 secuencias fueron anotadas y 497 presentaron resultados frente a un análisis BLAST.

El total de transcritos expresados diferencialmente de modo significativo se distribuyen en cada tratamiento de polinización del siguiente modo:

- La comparación de los pistilos sin polinizar de ambas selecciones presenta 582 transcritos diferenciales.
- La comparación entre los pistilos sin polinizar y la polinización compatible 206. Y entre los pistilos sin polinizar y la polinización incompatible 705.
- En la comparación entre la polinización compatible y la incompatible se expresan diferencialmente 355 transcritos.

Estos transcritos diferencialmente expresados en cada condición aparecen distribuidos en cada tratamiento en función de su expresión y presencia en los distintos tratamientos según la Tabla 6.2.

El análisis de ontología génica de la función molecular frente a la base de datos GO del total de los transcritos expresados diferencialmente en pistilos no polinizados y polinizados mostró como grupo mayoritario el grupo “unión” seguido del grupo de transcritos correspondientes con “actividad catalítica”.

De manera específica, para cada condición se analizaron las tres variables que proporciona la GO, componente celular, función molecular y proceso biológico (Figura 6.1), obteniendo en todas las condiciones categorías de diferenciación similares.

Tabla 6.2. Genes expresados diferencialmente en el estudio de transcriptómica diferencial del RNAseq. Para cada condición se indica el número total de genes, si se encuentran sobre-expresados o no y los transcritos que comparten con cada una de las otras condiciones analizadas.

	Totales		Reprimidos	Compartidos			
	Sobre-expresados			A-I ^a	A-AxA ^b	I-IxA ^c	AxA-IxA ^d
A-I ^a	582	219	363	-	21	169	146
A-AxA ^b	206	172	24	21	-	81	25
I-IxA ^c	705	585	120	169	81	-	53
AxA-IxA ^d	355	172	183	146	25	53	-

^aComparación pistilos no polinizados de A2-198 versus ITAP-1.

^bComparación pistilos no polinizados de A2-198 versus pistilos polinizados del cruzamiento compatible A2-198×A2-198.

^cComparación pistilos no polinizados de ITAP-1 versus pistilos polinizados del cruzamiento incompatible ITAP-1×A2-198.

^dComparación pistilos polinizados del cruzamiento A2-198×A2-198 versus pistilos polinizados del cruzamiento ITAP-1×A2-198.

6.3.3. Genes candidatos implicados en el sistema de incompatibilidad y análisis de expresión mediante qPCR

Un total de 14 genes expresados diferencialmente (Tabla 6.3) se analizaron mediante qPCR. La expresión de estos genes presentó un perfil similar al obtenido en el análisis RNAseq (Anexo II), tal y como se puede observar en la Figura 6.2. En esta figura se representan además los perfiles transcriptómicos correspondientes a dos genes no expresados diferencialmente (ppa024457m y ppb01226m). Estos perfiles también validan el análisis de secuenciación.

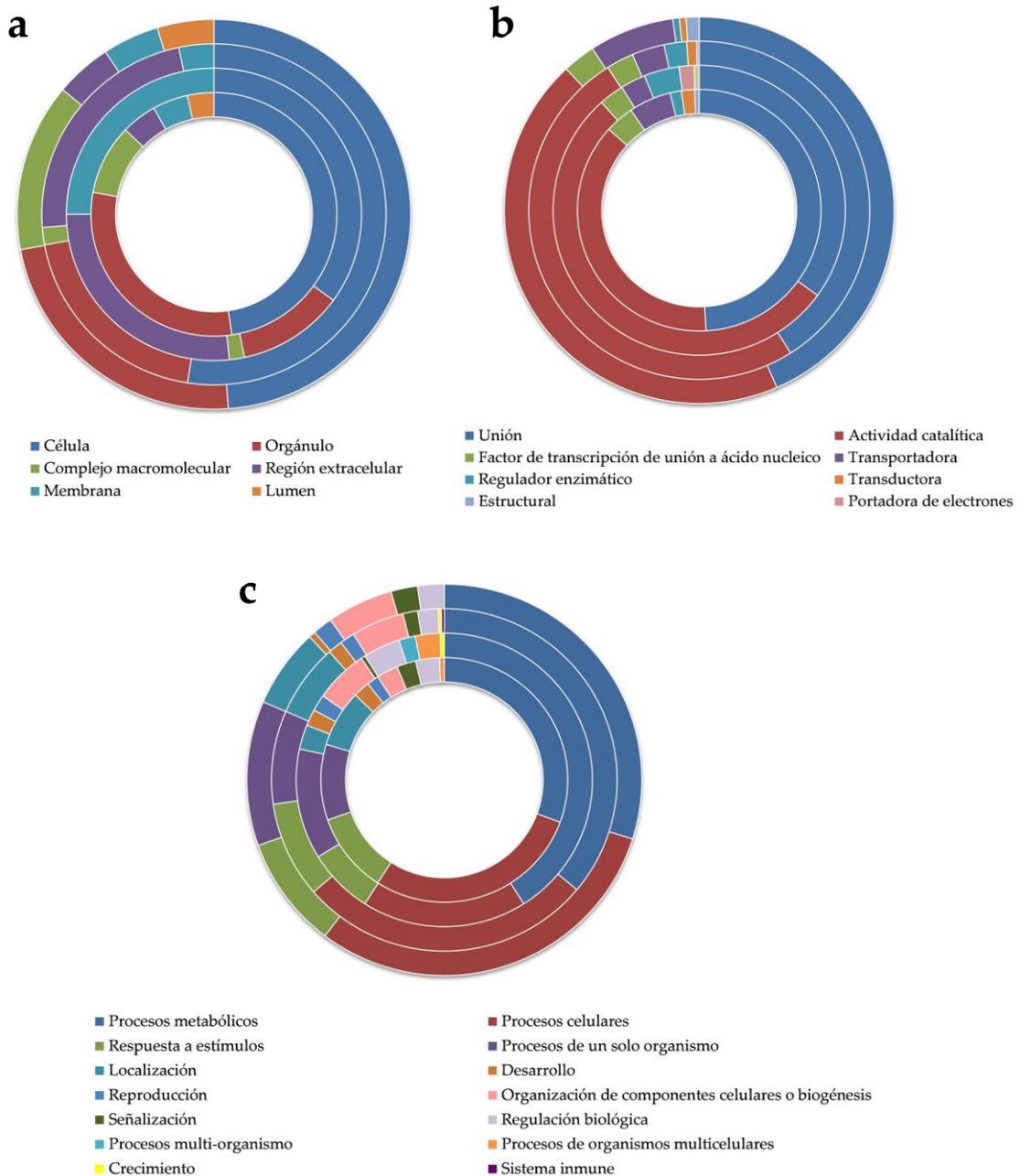


Figura 6.1. Ontología genética de los genes expresados diferencialmente en cada condición. De dentro a fuera los círculos concéntricos representan comparación de pistilos sin polinizar (A2-198 *versus* ITAP-1), comparación pistilo sin polinizar frente a polinización compatible (A2-198 *versus* A2-198×A2-198), comparación pistilo sin polinizar frente a polinización incompatible (ITAP-1 *versus* ITAP-1×A2-198); comparación polinización compatible frente a polinización incompatible (A2-198×A2-198 *versus* ITAP-1×A2-198). **a)** Distribución en base a los componentes celulares. **b)** Distribución en base a la función molecular. **c)** Distribución en base al proceso biológico.

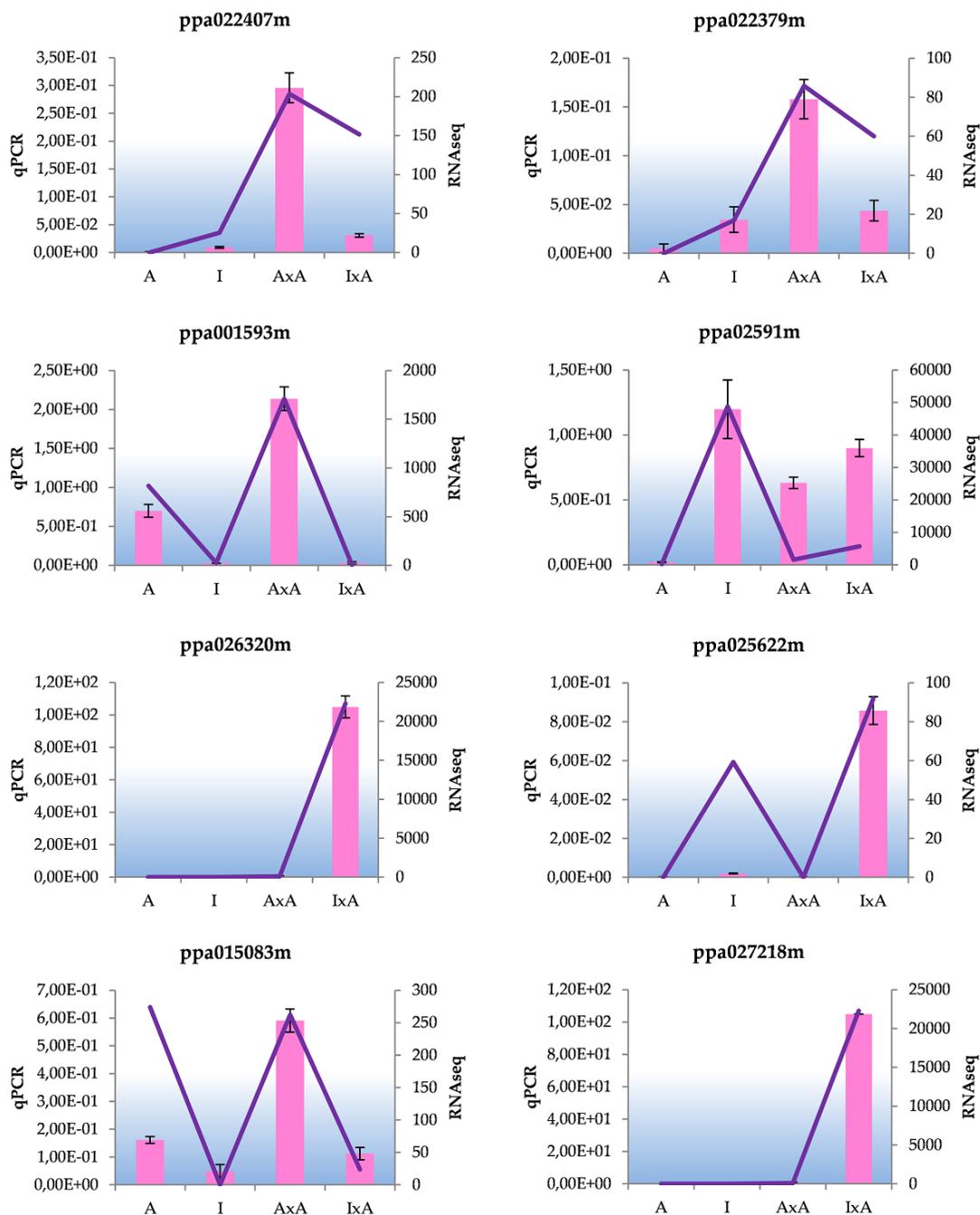


Figura 6.2. Validación del análisis de RNaseq mediante qPCR. Se muestran los valores relativos de expresión mediante qPCR en el eje principal (valores representados con las barras) junto con los valores normalizados obtenidos del análisis de la expresión de los datos de secuenciación con el programa DESeq package en el eje secundario (valores representados con la línea) para cada condición. A: pistilos sin polinizar de A2-198, I: pistilos sin polinizar de ITAP-1, AxA: Auto-polinización de A2-198 e IxA: Polinización de ITAP-1 con A2-198.

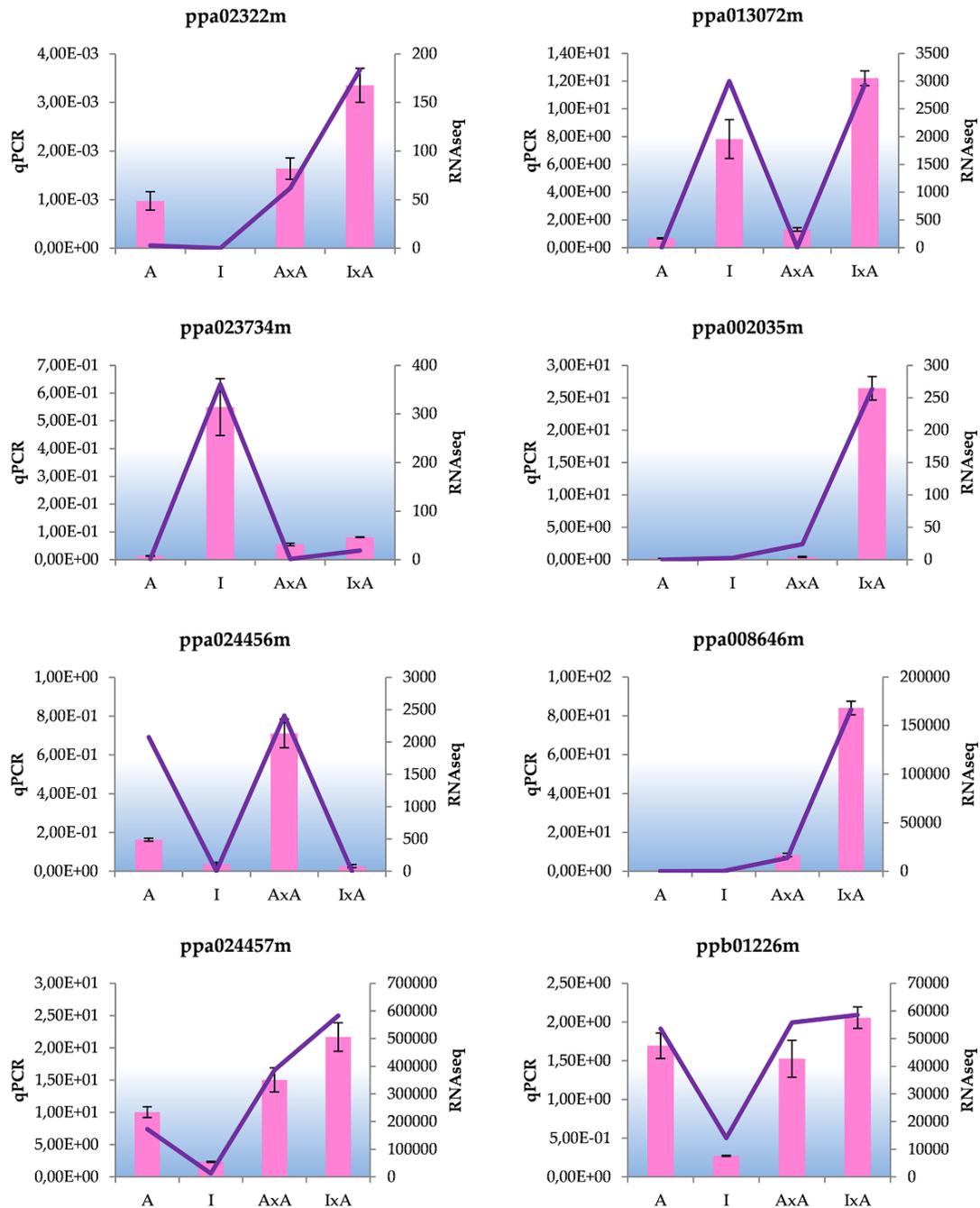


Figura 6.2. (Continuación) Validación del análisis de RNAseq mediante qPCR. Se muestran los valores relativos de expresión mediante qPCR en el eje principal (valores representados con las barras) junto con los valores normalizados obtenidos del análisis de la expresión de los datos de secuenciación con el programa DESeq package en el eje secundario (valores representados con la línea) para cada condición. A: pistilos sin polinizar de A2-198, I: pistilos sin polinizar de ITAP-1, AxA: Auto-polinización de A2-198 e IxA: Polinización de ITAP-1 con A2-198.

Tabla 6.3. Genes expresados diferencialmente en el estudio de transcriptómica diferencial del RNAseq que han sido analizados mediante qPCR. Para cada uno de ellos se indica la localización, la descripción de la secuencia y los estadísticos de la alineación frente al genoma del melocotonero.

Gen	S ^a	Descripción de la secuencia	T ^b	TA ^c	E-Valor ^d
ppa022407	1	Proteína de auto-incompatibilidad S1	285	94	2,07E-64
ppa022379	1	Proteína de auto-incompatibilidad S1	432	143	1,93E-92
ppa001593	3	Dominio lectina-g del receptor serina-treonina kinasa	2391	796	0
ppa002591	3	Proteína de shock térmico de 70 KDa (Hsp70)	1965	654	0
ppa026320	3	Alcohol deshidrogenasa	1617	538	0
ppa025622	3	Proteína con dominio Zinc-finger	1356	451	0
ppa015083	4	Proteína F-box con motivo de repetición-kelch	1224	407	0
ppa027218	5	Canal iónico de nucleótidos cíclicos	1683	560	0
ppa020322	6	Dominio lectina del receptor kinasa	1962	653	0.0
ppa013072	6	Histone h2ax	426	141	6,03E-78
ppa023734	6	Proteína F-box	555	185	1,08E-130
ppa002035	6	Transportador ABC de la familia de las proteínas G	2178	725	0
ppa024456	8	Proteína motora de microtúbulos de unión a ATP	1083	361	0
ppa008646	8	Quitinasa clase I	972	323	0

^aLocalización en los Scaffold (S) del genoma del melocotonero.

^bTamaño de la secuencia asignada (T).

^cTamaño de la secuencia alineada (TA).

^dValor estadístico de la alineación.

6.4. DISCUSIÓN

6.4.1. Análisis de los resultados de secuenciación

El porcentaje de alineamiento de las lecturas obtenidas en el análisis de secuenciación se encontró en todo momento por encima del 30%. Porcentajes entre el 5% y el 40% de las lecturas de ARN alinean cuando el genoma de referencia es el mismo que el genoma utilizado (Cao y col., 2011). Teniendo en cuenta esto, se puede considerar el análisis realizado como aceptable, ya que sólo alrededor del 43% de la secuencias no fueron mapeadas siendo el genoma de referencia melocotonero y no almendro.

6.4.2. Expresión diferencial, clasificación y anotación funcional

El elevado número de transcritos expresados diferencialmente en este ensayo demuestra que los mecanismos de compatibilidad e incompatibilidad son procesos complejos, como indicaron Zhao y col. (2015). Estos autores obtienen un número mayor de genes expresados diferencialmente que los obtenidos en nuestro análisis. Al igual que ocurre en otras especies (Zhang y col., 2015; Zhou y col., 2014), este mayor número apoya aún más la idea de la complejidad de los mecanismos.

La ontología mayoritaria de los transcritos expresados diferencialmente de modo significativo correspondió a “proteínas de unión”. Este dato coincide con los resultados obtenidos por Habu y Tao (2014) en *Prunus mume*, donde uno de los grupos más numeroso fue “proteínas de unión”, siendo además los transcriptomas de pistilo y polen similares al transcriptoma completo de *Arabidopsis*. Una distribución paralela de la GO fue también observada en especies del género *Citrus* (Zhang y col., 2015) y del género *Olea* (Iaria y col., 2016).

La ontología de los transcritos expresados diferencialmente en cada análisis diferencial presentó subcategorías similares. Pese a esto, se observaron diferencias entre las comparaciones pistilos sin polinizar frente a la polinización compatible y pistilos sin polinizar frente a polinización incompatible. Estos resultados sugieren que a pesar de que los mecanismos compatibilidad e incompatibilidad estén conservados, la regulación de dichos mecanismos es distinta para cada condición (Zhao y col., 2015).

En las comparaciones de los pistilos sin polinizar frente a las polinizaciones compatible e incompatible, la GO parcial ofreció una distribución similar a la obtenida en un análisis transcriptómico de especies del género *Solanum* (Zhao y col., 2015). En ese mismo estudio se observaron, al igual que en el presente análisis, GO implicados en respuestas a estímulos en

mayor proporción en la comparación de los pistilos sin polinizar con la polinización incompatible. Sin embargo, la proporción de GO implicados en respuesta inmune es mucho mayor en sus estudios, apareciendo además en mayor proporción en la comparación de la polinización compatible que en la de la polinización incompatible, resultados contrarios a los del presente análisis.

6.4.3. Genes candidatos implicados en el sistema de incompatibilidad y análisis de expresión mediante qPCR

Los niveles de expresión de los 16 genes representativos del análisis de RNAseq fueron confirmados mediante qPCR. Sin embargo, la correlación del nivel de expresión entre los datos del RNAseq y los datos de la qPCR no fue siempre la misma, estableciéndose diferentes proporciones entre genes. La dinámica de los transcriptomas (Martínez-Gómez y col., 2012) y el hecho de usar muestras biológicas no procedentes de la misma extracción de ARN para RNAseq y qPCR podrían ser las causas de las diferencias de expresión observadas entre ambos análisis. Por otro lado, también podrían influir en estas diferencias el tratamiento bioinformático de los datos del análisis RNAseq, mediante la estimación de la expresión de los transcritos y los perfiles creados a partir de dicha estimación (Labaj y col., 2011).

Los datos de expresión diferencial obtenidos en el análisis de RNAseq para la ARNasa-Sf asociada al gen ppa018459m de melocotonero presentan el mismo perfil de expresión que la ARNasa-Sf de almendro analizada mediante Rt-PCR y qPCR en el Capítulo 5. Sin embargo, en este análisis de secuenciación de RNA la expresión de la ARNasa-Sf en pistilos de A2-198 polinizado y sin polinizar es nula, lo que coincide con los datos de Fernández i Martí y col., (2011). Esta no detección de la expresión de la ARNasa en A2-198 podría deberse artefactos bioinformáticos, basados en la estimación de la expresión de

los transcritos (Labaj y col., 2011) como se indicó anteriormente que podría ocurrir.

Recientemente se han identificado, en los géneros *Malus* y *Pyrus*, múltiples genes F-box denominados SFBBs (*S* locus F-box brothers) como posibles candidatos del alelo *S* del polen (Sassa y col., 2007), cada uno de estos SFB, en colaboración con el resto, sería responsable del reconocimiento y la inhibición de una o varias ARNasas-S. En *Prunus*, también se han encontrado otros tres tipos de genes F-box expresados en polen (Ushijima y col., 2003; Entani y col., 2003; Ushijima y col., 2004; Matsumoto y col., 2008). Se cree que podrían funcionar de manera similar a los SFBBs pero aún no se han realizado estudios que confirmen su implicación en el sistema de incompatibilidad. En el análisis RNAseq realizado en esta tesis diversos transcritos con dominio F-box aparecían expresados diferencialmente, sin embargo sólo se analizaron mediante q-PCR dos. El gen ppa023734m posee perfil de transcripción similar al SFB de almendro analizado en el Capítulo 5 y coincide además con el perfil del RNaseq obtenido para el SFB implicado en incompatibilidad en melocotonero. En este perfil el gen aparece sobre-regulado tras la polinización, siendo mayor su regulación tras la polinización compatible. Ésta sobre-regulación en pistilos polinizados coincide con que sea una proteína típica del polen y por tanto los pistilos sin polinizar no presenten transcripción. Además un perfil similar de aumento de la transcripción tras la polinización se observa en los datos presentados por Habu y Tao (2014) en pistilos de *Prunus mume*.

Dentro de los genes analizados por qPCR para la validación del análisis de secuenciación existen varios que, por su localización en el genoma del melocotonero, ontología y patrón de expresión, sería interesante comentar.

La localización de los transcritos en el genoma del melocotonero permite fijarnos en grupos de ligamientos (LG) determinados, y así centrarnos en los genes que con mayor probabilidad podrían estar implicados en el mecanismo

de incompatibilidad según los estudios realizados en almendro y otros *Prunus* (Cachi y Wünsch, 2011; Fernández i Martí y col., 2011; Zuriaga y col., 2013). Se ha observado que dos mutaciones en el polen causan auto-incompatibilidad en *Prunus armeniaca* (Zuriaga y col. 2013). Éstas, se han localizado en el grupo de ligamiento (LG) 3, mismo LG3 en el que se ha localizado un *locus* modificador del polen, no ligado al *locus S*, que provoca auto-compatibilidad en una variedad de *Prunus avium* (Cachi y Wünsch, 2011). Por otro lado, según un estudio realizado, por Fernández i Martí y col. (2011) hay dos QTLs (*Quantitative Trait Loci*) asociados a la auto-incompatibilidad en almendro. Uno de ellos se localiza en el LG8, mientras que el otro aparece localizado en el LG6, cercano al *locus-S*. El haplotipo *S_f* de la población de almendro estudiada por estos autores es el mismo que el de las dos selecciones utilizadas en este experimento, con lo que la localización de los genes expresados diferencialmente en los LG6 y LG8, y en el LG3 citado anteriormente, se convierten en candidatas implicadas en el sistema de incompatibilidad. Por lo tanto, algunos transcritos expresados diferencialmente de estos grupos de ligamiento se utilizaron para validar la qPCR y los analizaremos a continuación en más detalle.

Los transcritos ppa001593m y ppa020322m codifican para el dominio lectina del receptor tipo serina-treonina kinasa. La proteína SRK (S-receptor kinase), determinante femenino del *locus-S* de la familia *Brassicaceae* (que presenta incompatibilidad esporofítica), es un receptor de membrana, cuyo dominio citosólico posee actividad serina-treonina kinasa (Zhang y col., 2009). La activación de esta proteína da lugar a una vía de señalización en el estigma que causa el bloqueo de la hidratación, germinación y crecimiento del tubo polínico (Takasaki y col. 2000). Además, la proteína kinasa del *locus M*, que es capaz de rechazar el polen propio en *Brassicaceae*, es también una Serina-treonina kinasa (Murase y col., 2004). El transcrito ppa020322m (Scaffold 6)

aparece sobre-expresado en la polinización incompatible al igual que en los análisis transcriptómicos de Zhao y col. (2015). Esta transcripción coincide con el perfil de expresión proteica indicada anteriormente, con lo que este transcrito se postularía como un posible modificador del sistema de incompatibilidad no descrito anteriormente en almendro. Por otro lado, el transcrito ppa001593 de descripción similar, pero con localización distinta al anterior (Scaffold 3), presenta un perfil de expresión contrario, mostrando un mayor nivel en la polinización compatible. Lo que sugiere su posible implicación en el sistema de incompatibilidad con una función diferente a la anterior y no descrita hasta ahora.

El gen ppa025622m que codifica para una proteína con dominio Zin-finger (ZnF) presenta un perfil de expresión similar al observado para el ORF de la región intergénica *ARNasa-S_f/SFB_f* caracterizado en el Capítulo 5. Sin embargo, este gen está localizado en el Scaffold 3 y no en el 6 como cabría esperar, debido a que los genes *ARNasa* y *SFB* en melocotonero se expresan también en este Scaffold 6. Las proteínas ZnF se encuentran implicadas en la regulación de los mecanismos de estrés y resistencia a patógeno (Feurtado y col., 2011; Gupta y col., 2012), de manera que como se indicaba en el Capítulo 5 para el ORF, este transcrito con dominio ZnF podría ser un factor modificador del sistema de incompatibilidad.

La expresión observada para el gen ppa027218m, que codifica para un canal iónico de nucleótidos cíclicos coincide con el perfil presentado por Zhang y col. (2015) para la expresión de esta proteína en limonero. Se sabe que la polaridad celular y el crecimiento de los tubos polínicos se basan en gradientes de iones internos (Michard y col., 2009) y que la perturbación de estos gradientes puede alterar o inhibir el crecimiento del tubo polínico (Konrad y col., 2011). Esta perturbación se consigue mediante el bloqueo de canales iónicos como el indicado anteriormente. El metabolito secundario mejor

caracterizado y que influye en el gradiente celular es el Ca²⁺, que además activa numerosas proteínas.

Una de las proteínas cuya activación depende de la señalización mediante Ca²⁺ es el determinante femenino del *locus S* de *Papaver rhoeas* (Wheeler y col., 2009). Los genes ppa022407m y ppa022379m, asociados a genes no identificados en melocotonero, pero con una similitud mayor al 50% con el gen que codifica para la proteína de incompatibilidad S1 en *Papaver rhoeas*, muestran un perfil de expresión que coincide con el RNAseq, validándolo. Sin embargo, el perfil de este gen observado no coincide con la expresión descrita para esta proteína, la cual aumenta en la reacción incompatible. La elevada expresión está relacionada con su función, impedir el crecimiento de tubos polínicos del mismo genotipo (Foote HCC y col., 1994).

6.5. CONCLUSIONES

El estudio del transcriptoma de dos selecciones de almendro con igual genotipo pero distinto fenotipo de incompatibilidad, muestra el perfil de expresión génica diferencial en pistilos no polinizados de almendro, siendo éste la base de referencia para los análisis de transcriptómica comparativa posteriores.

El análisis transcriptómico ha permitido conocer el perfil genético de la interacción auto-compatibile (A2-198 *versus* A2-198×A2-198) en el que 206 genes parecen estar implicados, así como de la interacción incompatible (ITAP-1 *versus* ITAP-1×A2-198) con 705 genes implicados. Esto sugiere la implicación diferencial de un mayor número de genes en la reacción incompatible que en la compatible. Estos perfiles de expresión son además los primeros desarrollados en transcriptómica cuantitativa en almendro.

La cuantificación mediante qPCR de la expresión de 14 genes expresados diferencialmente y dos sobre-expresados, entre los distintos tratamientos de polinización, valida el análisis de secuenciación de ARN realizado.

Algunos de los genes identificados podrían jugar un papel importante en la interacción polen-pistilo y ser considerados como posibles factores modificadores. Entre ellos destacamos el gen de la serina-treonina kinasa, determinante principal del sistema de incompatibilidad esporofítico, el gen con dominio ZnF y un gen similar al gen codificante de la proteína de auto-incompatibilidad S1 descrita en *Papaver* , ninguno de ellos descritos anteriormente en el sistema de incompatibilidad de almendro.

A close-up photograph of a flower's reproductive parts. The image shows several stamens with yellowish anthers and long filaments, and a central pistil with a fuzzy, brownish stigma. The background is a soft, out-of-focus light color.

***7. Proteómica
cuantitativa de pistilos y
anteras con haplotipo S_f***

7. PROTEÓMICA CUANTITATIVA DE PISTILOS Y ANTERAS CON HAPLOTIPO S_f

7.1. INTRODUCCIÓN

Como ya se ha indicado en los capítulos anteriores, el almendro es una especie con auto-incompatibilidad de tipo gametofítico controlada por el *locus S* (Tao and Iezzoni, 2010), aunque también existen algunas variedades auto-compatibles (Godini, 1975). La auto-compatibilidad en almendro se ha asociado a la presencia del alelo S_f (Grasselly y col., 1981; Bošković y col., 1999), sin embargo, recientemente se han identificado algunas variedades que a pesar de tener este haplotipo presentan un fenotipo auto-incompatible (Kodad y col., 2009; Kodad y col., 2010; Fernández i Martí y col., 2010; Martínez-García y col., 2011). Este comportamiento podría explicarse con la participación de factores modificadores de los genes del *locus S* en el sistema de incompatibilidad floral en el almendro, de manera similar a como ocurre en otras especies con incompatibilidad gametofítica (McClure y col. 2000). En solanáceas han sido descritos tres factores modificadores en pistilos (la proteína HTB, la proteína 120K y la proteína NaStEP), todas ellas implicadas en el rechazo del polen (Jiménez-Durán y col., 2013). También se han caracterizado varios genes modificadores como el gen NaTrxh, tiorredoxina h implicada igualmente en el rechazo del polen, y las proteínas AhSSK1 y PhSSK1 con motivo F-Box, que actuarían como un adaptador en el complejo SCF del polen (Huang y col., 2006; Zhao y col., 2010).

En los últimos años, diversos estudios proteómicos llevados a cabo en especies del género *Prunus* han mostrado la expresión diferencial de proteínas en las interacciones polen-pistilo tras polinizaciones compatibles e incompatibles (Feng y col., 2006, 2009; Cao y col., 2012; Martínez-García y col.

2015). En estos trabajos, pese a citar numerosas proteínas implicadas en la respuesta de incompatibilidad como CP100 (proteína tipo isoflavona reductasa), PsTL1 (taumatina identificada en *Pyrus serotoninina*), PELP III (proteína específica de la extensión de los pistilos), o E2, actina, ciclofilina y proteínas del proteasoma, no establecen ninguna de ellas como un factor modificador del sistema de incompatibilidad. Podría decirse que son el punto de partida, a partir del cual se deben desarrollar otros estudios complementarios que confirmen la función concreta y la implicación de las proteínas identificadas en el mecanismo de incompatibilidad. Sin embargo, no se ha llevado a cabo ningún análisis de proteómica comparativa en polen o en pistilos no polinizados en *Prunus*, siendo pionero el que se realiza en este trabajo.

La expresión diferencial de proteínas se puede determinar mediante técnicas basadas en electroforesis bidimensional (2DE) o en cromatografía líquida seguida de espectrometría de masas (LC-MS). En los últimos años se han utilizado principalmente técnicas basadas en LC-MS, concretamente la técnica denominada iTRAQ (Apartados 3.6 y 3.6.2), que resulta de fácil implantación, gran repetitividad y rapidez (Evans y col., 2012).

En este trabajo se ha elegido la técnica iTRAQ, por su capacidad para detectar proteínas difíciles de abordar mediante otras técnicas como las de membrana o las de baja abundancia (Peng y Gygi, 2001), y la realización de un análisis automatizado y simultáneo de un mayor número de muestras que las técnicas 2DE, siendo su resolución similar a la 2D-DIGE. Por otro lado, no hay que olvidar que ambas técnicas presentan ventajas y desventajas, y que la información generada por las dos al aplicarse sobre una misma muestra sería complementaria (Wu y col., 2005).

El objetivo principal de este capítulo es realizar un perfil proteómico de los pistilos y anteras con haplotipo *Sf* y *Sfa* y estudiar la posible relación entre

las proteínas expresadas diferencialmente y el mecanismo de incompatibilidad floral en almendro.

7.2. MATERIAL VEGETAL Y METODOLOGÍA

7.2.1. Material vegetal

Los genotipos utilizados en este ensayo fueron la selección auto-compatible A2-198 ($S_f S_f$) y la selección auto-incompatible ITAP-1 ($S_{11} S_{fa}$), ambas descritas en el Apartado 2.2 de esta Tesis. Como ya se ha indicado a lo largo de este documento, se trata de dos selecciones con haplotipo S_f pero que presentan diferente fenotipo. Esa característica hace de ambas selecciones un material interesante para el estudio de los factores implicados en el sistema de incompatibilidad, permitiendo así elucidar las proteínas implicadas en este proceso.

7.2.2. Diseño experimental

En este estudio se realizaron dos experimentos. En el primero se identificaron las proteínas diferencialmente expresadas en pistilos y anteras de almendros auto-compatibles y auto-incompatibles con el haplotipo S_f . En el segundo experimento se determinó la expresión diferencial de proteínas en pistilos tras una polinización compatible y otra incompatible en el mismo material vegetal.

Un día antes de antesis, momento que se corresponde con el estado fenológico "D-E" descrito por Felipe (1977), se tomó una muestra de 300 botones florales de cada una de las selecciones (100 botones el año 2013 para el experimento 1 y los 200 restantes el año 2014 para el experimento 2). En este estado de desarrollo floral, a pesar de tratarse de un botón cerrado y con anteras indehiscentes, se considera que tanto los pistilos como el polen ya están maduros,

y por tanto puede tener lugar la reacción de incompatibilidad (Ortega y Dicenta, 2004).

En el primer experimento se utilizaron alrededor de 100 botones florales de la selección A2-198 y otros 100 de la selección ITAP-1 de los que se extrajeron los pistilos sin polinizar y las anteras, que tras ser pesados se congelaron por separado en nitrógeno líquido para la extracción de proteínas. Como se indica continuación, este experimento se repitió el año siguiente (2014).

En el segundo experimento se utilizaron unos 200 botones florales de cada selección. Con 100 de ellos se procedió como en el primer experimento y los otros 100 fueron utilizados para realizar cruzamientos controlados en el laboratorio. Las anteras de estos 100 botones fueron utilizadas para la extracción de polen necesario para la posterior polinización y los pistilos se utilizaron para realizar las polinizaciones, como se indicó en el Apartado 3.1.3. Se realizaron dos cruzamientos, uno compatible y otro incompatible. El cruzamiento compatible consistió en una autopolinización de A2-198 y el incompatible en la polinización de ITAP-1 con A2-198, como se describe en el Capítulo 4. Pasadas 72 horas de la polinización, tiempo suficiente para que tenga lugar la interacción polen-pistilo a nivel del estilo, que es dónde tiene lugar la incompatibilidad gametofítica (Ortega y col., 2002), se recogieron los pistilos polinizados, se pesaron y se conservaron a -80°C hasta el momento de la extracción de proteínas.

7.2.3. Extracción de proteínas

La extracción de proteínas de anteras, pistilos sin polinizar y pistilos polinizados se realizó siguiendo el método descrito en el Apartado 3.5.1. Una vez realizada la extracción, las proteínas fueron cuantificadas mediante el ensayo de Bradford (1976) y enviadas al servicio de análisis de proteínas ProteoRed del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC, Madrid).

7.2.4. Cuantificación y análisis de la expresión de proteínas mediante marcaje isobárico diferencial (iTRAQ)

Para el análisis de la expresión diferencial de proteínas se utilizó la técnica iTRAQ, la cual se describe en detalle en el Apartado 3.6.

Se realizaron dos análisis iTRAQ en años consecutivos correspondientes a cada uno de los experimentos. En el experimento 1 se compararon anteras y pistilos sin polinizar, y en el experimento 2 se compararon pistilos polinizados (polinización compatible e incompatible) y sin polinizar, tal y como se muestra en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1. Disposición de las muestras analizadas en cada experimento iTRAQ. Se indica el marcaje con el reactivo iTRAQ-4-plex® para cada tratamiento, lo que permite establecer las comparaciones. Los tratamientos de cada cruzamiento corresponden con el análisis de las anteras y pistilos no polinizados de cada selección y con los pistilos polinizados de ITAP-1 y A2-198 con A2-198.

Condición	Marcaje	Experimento 1	Experimento 2 ^a
1	Tag-114	Pistilos A2-198	Pistilos ITAP-1
2	Tag-115	Pistilos ITAP-1	Pistilos A2-198
3	Tag-116	Polen A2-198	ITAP-1×A2-198
4	Tag-117	Polen ITAP-1	A2-198×A2-198

Para el experimento 1, tras el marcaje se unieron los digeridos dos a dos (polen por un lado y pistilos por otro) y se analizaron por triplicado (3 réplicas técnicas) mediante LC-ESI-MSMS estableciendo dos grupos distintos. En el caso del experimento 2, los digeridos, tras ser marcados, se analizaron por triplicado en un solo conjunto, lo que permitió que se pudieran realizar todas las comparaciones posibles entre ellos. Los datos obtenidos por espectrometría de masas de ambos experimentos se analizaron con el motor de búsqueda "Mascot" frente a la base de datos de *Prunus persica* en UniprotKB/SwissProt.

7.2.5. Pseudo-Monitorización de reacción múltiple

Para este análisis se siguieron las pautas descritas en el Apartado 3.6.3. Así, se creó una lista de 48 masas teóricas correspondientes a los péptidos teóricos obtenidos de una digestión *in silico* de la RNasa-S_f (identificada en las bases de datos con el código CAZ68888.2). A este listado se añadieron 8 péptidos procedentes de una proteína identificada en el análisis anterior de iTRAQ con el código M5W1Q5, la cual fue incorporada como control para comprobar que el análisis era correcto.

7.3. RESULTADOS

7.3.1. iTRAQ de pistilos no polinizados y de anteras

Mediante el análisis de iTRAQ seguido de espectrometría de masas, un total de 1667 y 1391 proteínas fueron identificadas en pistilos y anteras, respectivamente. Entre éstas, sólo fueron consideradas las que presentaron al menos dos péptidos cuantificados en cada una de las 3 réplicas técnicas: 945 en pistilos y 844 en anteras.

Proteínas expresadas diferencialmente en pistilos

Los análisis mostraron 28 proteínas expresadas diferencialmente en pistilos. De éstas, 10 presentaron unos menores niveles de expresión en la selección auto-compatible A2-198 que en la selección auto-incompatible ITAP-1, y las otras 18 presentaron mayores niveles de expresión en A2-198 que en ITAP-1. Tras realizar una búsqueda por homología mediante el método BLAST en la base de datos UniProtKB/SwissProt, solo 13 pudieron ser identificadas (Anexo III.).

Estas 13 proteínas fueron agrupadas en diferentes categorías funcionales, establecidas de acuerdo al papel que juegan en las rutas celulares, calculándose el porcentaje de proteínas de cada grupo funcional (Figura 7.1). Según esta clasificación, los grupos funcionales con un menor número de proteínas fueron el grupo de estructura celular, organización y biogénesis y el de síntesis y procesamiento de proteínas, mientras que la mayoría de las proteínas expresadas diferencialmente pertenecen a los grupos de proteínas con función metabólica y resistencia a estrés y defensa.

Proteínas expresadas diferencialmente en anteras

En las anteras 20 proteínas se expresaron diferencialmente. Seis de estas proteínas presentaron un bajo nivel de expresión en A2-198, mientras que 14 se encontraban sobre-expresadas en esta misma selección (Anexo IV). Como ocurría en el caso de los pistilos, hay un mayor número de proteínas sobre-expresadas en las anteras de la selección auto-compatible. Fue imposible caracterizar tres de las proteínas expresadas diferencialmente por no aparecer en la base de datos ProtKB/SwissProt. Además, cinco de las proteínas expresadas diferencialmente en las anteras, también habían resultado diferencialmente expresadas en pistilos (Tabla 7.2).

La clasificación funcional en este caso indicó que las proteínas con función metabólica junto con las proteínas implicadas en los procesos de resistencia a estrés y defensa son los grupos predominantes en igual proporción (Figura 7.1.). La distribución de las proteínas en los diferentes grupos funcionales resultó más homogénea que en el caso de los pistilos.

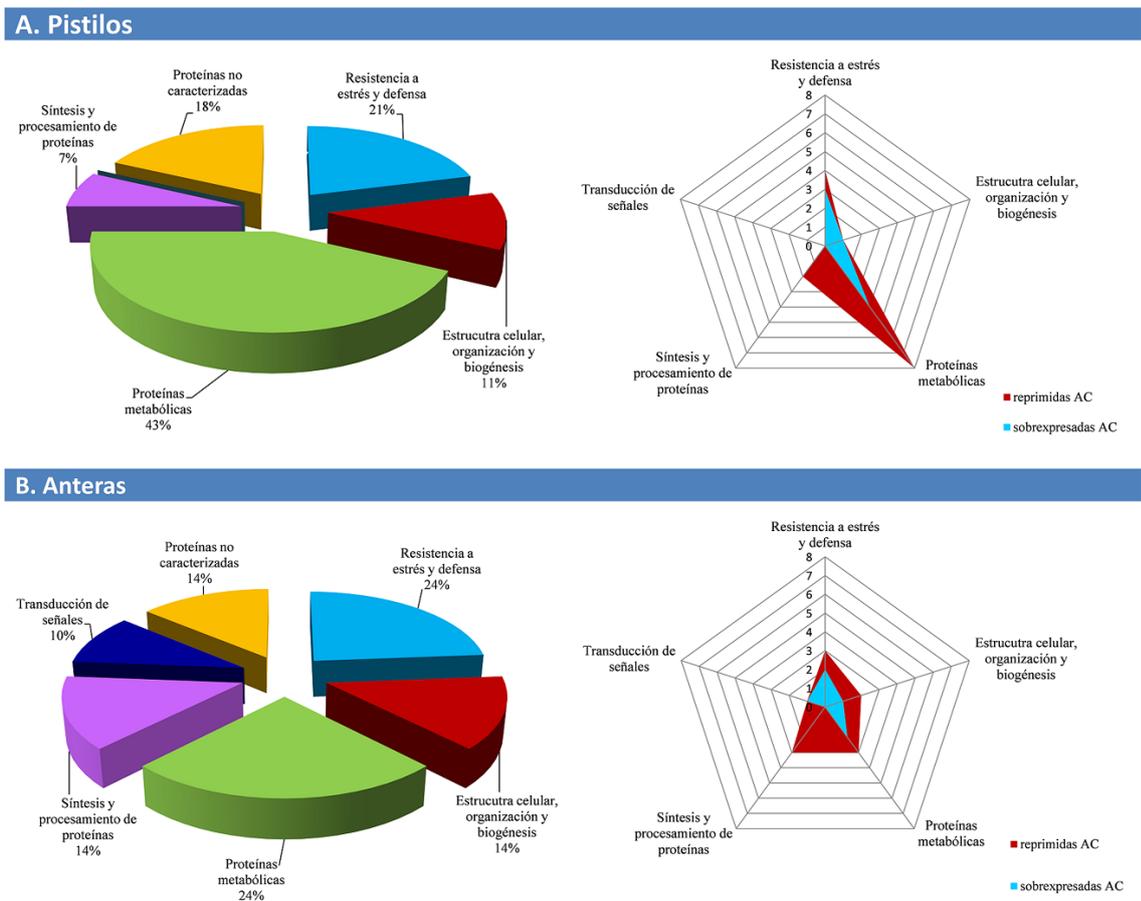


Figura 7.1. Clasificación funcional de las proteínas expresadas diferencialmente en pistilos (A) y anteras (B) de A2-198 (auto-compatible, AC) e ITAP-1 (auto-incompatible, AiC). Las figuras de la derecha indican el número de proteínas que aparecen sobre-expresadas o reprimidas en A2-198 en cada grupo funcional.

7.3.2. iTRAQ de pistilos polinizados

Mediante el análisis iTRAQ seguido de espectrometría de masas realizado a los pistilos polinizados fueron identificadas 1132 proteínas, de las cuales se consideraron 895 en los análisis de cuantificación, pues sólo de éstas se obtuvieron al menos dos péptidos cuantificados para cada una de las 3 réplicas técnicas.

Tabla 6.2. Proteínas expresadas diferencialmente en los dos experimentos, agrupadas según su función. Las proteínas reprimidas en la primera condición de cada comparación aparecen sombreadas en rojo, y las sobre-expresadas en verde. Cada accesión proteica se encuentra relacionada con la descripción de la proteína (según la base de datos UniProtKB/SwissProt) y su localización en el genoma del melocotonero (*Prunus persica* Whole Genome v1.0).

Anteras ^a	Pistilos ^b	Pistilos polinizados ^c		Descripción	S	
PA vs PI	A vs I	A×A vs A	I×A vs I	A×A vs I×A		
Resistencia a estrés y defensa						
		A4GRE2	A4GRE2	A4GRE2	Inhibidor de poligalacturonasa	7
		K4ER19	K4ER19	K4ER19	Inhibidor de poligalacturonasa	7
			M5VKR8		Fosfatasa 1	8
				M5VM54	Proteína serina-treonina kinasa	8
		M5VNN1			Proteína A de estrés universal	8
M5VQU4	M5VQU4		M5VQU4	M5VQU4	Glucan endo-1,3-beta-glucosidasa	7
			M5VYZ1	M5VYZ1	Proteína reparadora de DNA	8
				M5VZU3	Ascorbato peroxidasa citosólica	6
M5W1Q5	M5W1Q5**	M5W1Q5	M5W1Q5	M5W1Q5	Proteína patogénica PR-4	6
		M5W887			HSP90-2	6
		M5WIW4			Peroxidasa	4
		M5WR86		M5WR86	Taumatina	5
M5WRJ6					Pollen coat-like protein	3
			M5WSM4		Formato deshidrogenasa	3
	M5WT96**	M5WT96		M5WT96	Taumatina	5
		M5WV03	M5WV03		Alérgeno putativo Pru p 2.01B	3
M5X5T2					Quinona oxidoreductasa	3
		M5X697	M5X697	M5X697	Alérgeno putativo Pru p 2.01B	3
M5XCQ5					Quitinasa IV	1
M5XDU4	M5XDU4				(R)-mandelonitrilo liasa 2	1
				M5XMY9	Proteína endoplásmica	1
		M5XTC6			Alérgeno putativo Pru p 1.06B	1
	M5Y9J3				Proteína de unión a ARN rica en glicina	1
		Q2I6V8	Q2I6V8		Alérgeno mayor Pru p 1	1
Estructura celular, organización y biogénesis						
		A9YTE0	A9YTE0		Leucoantocianidina dioxigenasa	5
	H6SV49*		H6SV49		Dihidroflavonol 4-reductasa	1
	I1U4K7				Polifenol oxidasa II	4
				M1Q4H1	S-adenosilmetionina sintetasa	8
				M1QDQ8	ACC oxidasa	3
M5VGZ1					Esterasa/lipasa GDSL	8
		M5VIY7			Cadena alfa-tubulina	8
			M5VMR9	M5VMR9	Quitinasa I	8
				M5VWP4	Transportador de protones	7

Tabla 6.2. (Continuación)

Anteras ^a	Pistilos ^b	Pistilos polinizados ^c		Descripción	S	
PA vs PI	A vs I	A×A vs A	I×A vs I	A×A vs I×A		
		M5VXY9			Subunidad beta-tubulina	6
				M5W639	Asparagina sintetasa	6
M5WGH9					Proteína de asociación a lípidos	4
			M5WH02	M5WH02	Xiloglucano endotransglucosilasa	4
			M5WHY8		Tubulina-1	6
	M5WJ79			M5WJ79	Xiloglucano endotransglucosilasa	6
				M5WR07	Pirofosfatasa vacuolar H ⁺	6
			M5WT30	M5WT30	Xiloglucano endotransglucosilasa	3
				M5X2M4	Pectin metilesterasa	2
M5X4I0					Malato deshidrogenasa	4
			M5XE73		Calcona sintetasa	1
		M5XF70	M5XF70		Subunidad alfa-tubulina	1
	M5Y240			M5Y240	Poligalacturonasa	1
	M5Y9F2				Proteína con dominio de homología pleckstrina	1
Proteínas metabólicas						
		B2BMP8	B2BMP8		Beta-galactosidasa	7
				E3W0H3	Proteína Q(B) del fotosistema II	7
	E3W0K1*			E3W0K1	Ribulosa bisfosfato carboxilasa de cadena larga	6
I2BF37					Calcona sintetasa	1
				M5VM41	Alcohol deshidrogenasa	8
	M5VPU2	M5VPU2	M5VPU2	M5VPU2	Quitinasa V	7
		M5VQE4			Quitinasa II	7
			M5VW03		Fosfatasa ácida	7
		M5VXD5			Hidrolasa de compuestos O-glicosílicos	7
M5W0M7	M5W0M7				Histona H2B	6
	M5W248**				Endo-1,4-beta-glucanasa	8
	M5W266			M5W266	Prunasina hidrolasa	6
				M5W6Z4	Anhidrasa carbónica	8
		M5W713	M5W713		L-ascorbato oxidasa	6
				M5W7Y9	Anhidrasa carbónica	6
				M5WB02	Anhidrasa carbónica	7
M5WD64					Patatina	7
				M5WEE0	Ascorbato oxidasa	6
		M5WHH5		M5WHH5	Reticulina oxidasa	4
	M5WI14				Proteína de fisión mitocondrial 1	4
				M5WJE7	Ferritina	4
		M5WML6			UDP-galactosa	5
	M5WTM0*			M5WTM0	Proteína de unión a clorofía A/B	3

Tabla 6.2. (Continuación)

Anteras ^a	Pistilos ^b	Pistilos polinizados ^c		Descripción	S	
PA vs PI	A vs I	A×A vs A	I×A vs I	A×A vs I×A		
				M5WUX4	Subunidad del fotosistema II	3
				M5WW17	NADPH-protoclorofilida reductasa 1	4
	M5WWB9				Epoxi-hidrolasa 3	3
			M5X0T3		Xiloglucano endotransglucosilasa	4
	M5X1P7*			M5X1P7	Quitinasa IV	4
			M5X276		Factor sensible a oligomicina	2
				M5X3J0	Quitinasa III	2
			M5X6U1	M5X6U1	3-O-glucosiltransferasa	2
				M5XB14	Ribulosa bisfosfato carboxilasa de cadena corta	3
	M5XD05				ARN helicasa RH2a	1
		M5XEI2	M5XEI2		Hidrolasa de compuestos O-glicosílicos	1
				M5XJD4	Ferritina	2
M5XJJ3	M5XJJ3**				Enolasa	2
	M5XJV8**			M5XJV8	Amino oxidasa	1
			M5XL91		Homocisteína S-metiltransferasa	1
		M5XLA6	M5XLA6		Arabinofuranosidasa	1
	M5XLQ7**			M5XLQ7	Beta-glucosidasa periplásmica	1
	M5XMY7				Glutación transferasa S-30	1
	M5XNQ1**			M5XNQ1	Ribulosa bisfosfato carboxilasa de cadena corta	1
	M5XU12*	M5XU12	M5XU12	M5XU12	Quitinasa IV	1
				M5XWJ5	Subunidad del fotosistema II	1
				M5Y028	Endo-1,3-1,4-beta-D-glucanasa	1
	M5Y2Y6				Mandelonitril-glucosiltransferasa	1
		M5Y718	M5Y718	M5Y718	Beta-1,3-glucanasa	1
			Q1HGK8		Alfa-L-arabinofuranosidasa	7
		Q9MBD7		Q9MBD7	NAD deshidrogenasa	7
Síntesis y procesamiento de proteínas						
		M5VKD2			Fibrilarina	8
		M5VM12			Serine carboxypeptidase	8
	M5VMV1				Co-chaperona p23	8
			M5VVQ4		Serina carboxipeptidasa	8
			M5WB04	M5WB04	Cisteína endopeptidasa	5
M5WC10					Proteína ribosomal 40S-S7	5
	M5WP60				Proteína ribosomal L2	4
		M5WV82		M5WV82	Inhibidor de subtilisina	4
			M5XDT9	M5XDT9	Cisteína proteasa	1
				M5XH18	Subtilisina	1
M5XS55					Serina carboxipeptidasa	2

Tabla 6.2. (Continuación)

Anteras ^a	Pistilos ^b	Pistilos polinizados ^c		Descripción	S	
PA vs PI	A vs I	A×A vs A	I×A vs I	A×A vs I×A		
<i>Transducción de señales</i>						
	M5VJT4*			M5VJT4	Proteína 1 asociada a DAZ	8
				M5VR26	Proteína del grupo de alta movilidad	7
		M5W1J3	M5W1J3		Fosfotransferasa 1	6
M5X1U2					Anexina	2
M5XF62		M5XF62		M5XF62	Proteína de unión nuclear a GTP	1
<i>Regulación de la transcripción</i>						
				M5WQU9	Uncharacterized protein	3
<i>Regulación de la traducción</i>						
				M5XKU7	Factor de traducción 3 (subunidad C)	1
<i>Proteínas no caracterizadas</i>						
				M5VQZ6	Proteína no caracterizada	7
				M5W532	Proteína no caracterizada	7
	M5W7R0	M5W7R0		M5W7R0	Proteína no caracterizada	8
		M5W9A6		M5W9A6	Proteína no caracterizada	5
	M5WDV5				Proteína no caracterizada	5
		M5WG45	M5WG45		Proteína no caracterizada	4
M5WGA1		M5WGA1	M5WGA1	M5WGA1	Proteína no caracterizada	4
			M5WIL0	M5WIL0	Proteína no caracterizada	4
		M5WKQ1	M5WKQ1		Proteína no caracterizada	4
		M5WTT2			Proteína no caracterizada	4
				M5WV08	Proteína no caracterizada	4
M5WX95					Proteína no caracterizada	3
	M5WXM6	M5WXM6	M5WXM6	M5WXM6	Proteína no caracterizada	4
				M5X060	Proteína no caracterizada	2
				M5X0C5	Proteína no caracterizada	3
	M5XB01				Proteína no caracterizada	1
			M5XDI7	M5XDI7	Proteína no caracterizada	1
	M5XIU5				Proteína no caracterizada	1
		M5XJN1	M5XJN1		Proteína no caracterizada	1
		M5XLM2	M5XLM2		Proteína no caracterizada	1
M5XQ02					Proteína no caracterizada	1

^a PA: polen de A2-198; PI: polen de ITAP-1.

^b A vs I: pistilos de A2-198 (A) e ITAP-1 (I).

Proteínas obtenidas solamente en el Experimento 1 (sin asterisco), 2 (con un asterisco) y en ambos (con dos asteriscos).

^c A×A: polinización de A2-198×A2-198; I×A: polinización de ITAP-1×A2-198.

Proteínas diferencialmente expresadas en pistilos sin polinizar

Los análisis mostraron 13 proteínas expresadas diferencialmente en pistilos sin polinizar, de las cuales siete aparecieron reprimidas y seis sobre-expresadas en la selección auto-compatible A2-198 (Anexo V). De las proteínas expresadas diferencialmente en este análisis, siete coincidieron con las obtenidas en el análisis anterior de pistilos sin polinizar (Apartado 6.3.1), mientras que las otras seis resultaron nuevas (Tabla 6.2.). Pese a estas diferencias, al igual que en el anterior análisis, la mayoría de las proteínas pertenecieron a la categoría “función metabólica” (Figura 7.2).

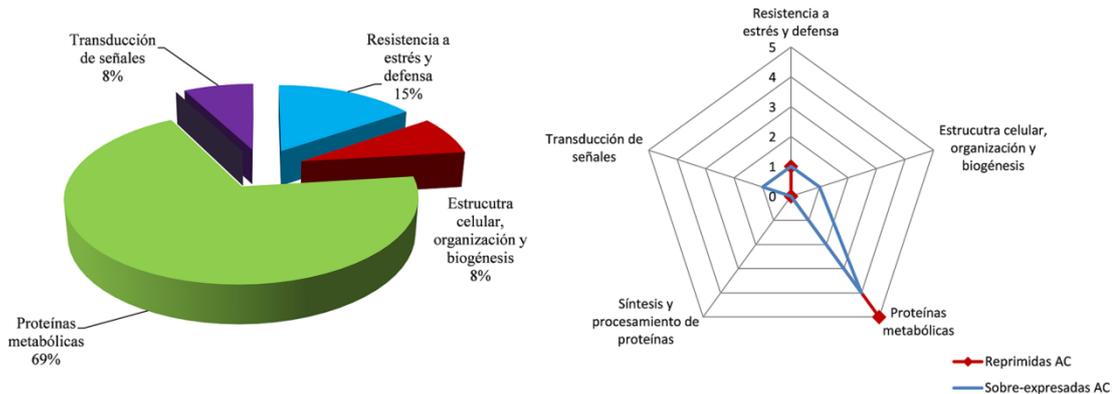


Figura 7.2. Clasificación funcional de las proteínas expresadas diferencialmente en pistilos A2-198 (auto-compatible, AC) e ITAP-1 (auto-incompatible, AiC). La figura de la derecha indica el número de proteínas que aparecen sobre-expresadas o reprimidas en A2-198 en cada grupo funcional

Proteínas expresadas diferencialmente tras la polinización auto-compatible

Los análisis mostraron 44 proteínas expresadas diferencialmente en la comparación de los pistilos auto-polinizados de la selección auto-compatible A2-198 con los pistilos de A2-198 sin polinizar. Siete de estas proteínas aparecieron reprimidas en los pistilos auto-polinizados, mientras que las otras 37 presentaron un mayor nivel de expresión en la misma condición (Anexo VI). Nueve de estas proteínas, todas ellas sobre-expresadas en los pistilos polinizados, no pudieron

ser caracterizadas por no encontrarse incluidas en la base de datos UniProtKB/SwissProt. La clasificación funcional indica que tanto las proteínas de resistencia a estrés y defensa como las proteínas con una función metabólica son las más abundantes en una proporción muy similar (27% y 30%, respectivamente) (Figura 7.3.). Si nos fijamos en la distribución establecida según aparecen sobre-expresadas en pistilos sin polinizar o tras la auto-polinización, se observa que, en todas las categorías hay una mayor expresión generalizada tras la polinización (Figura 7.3.).

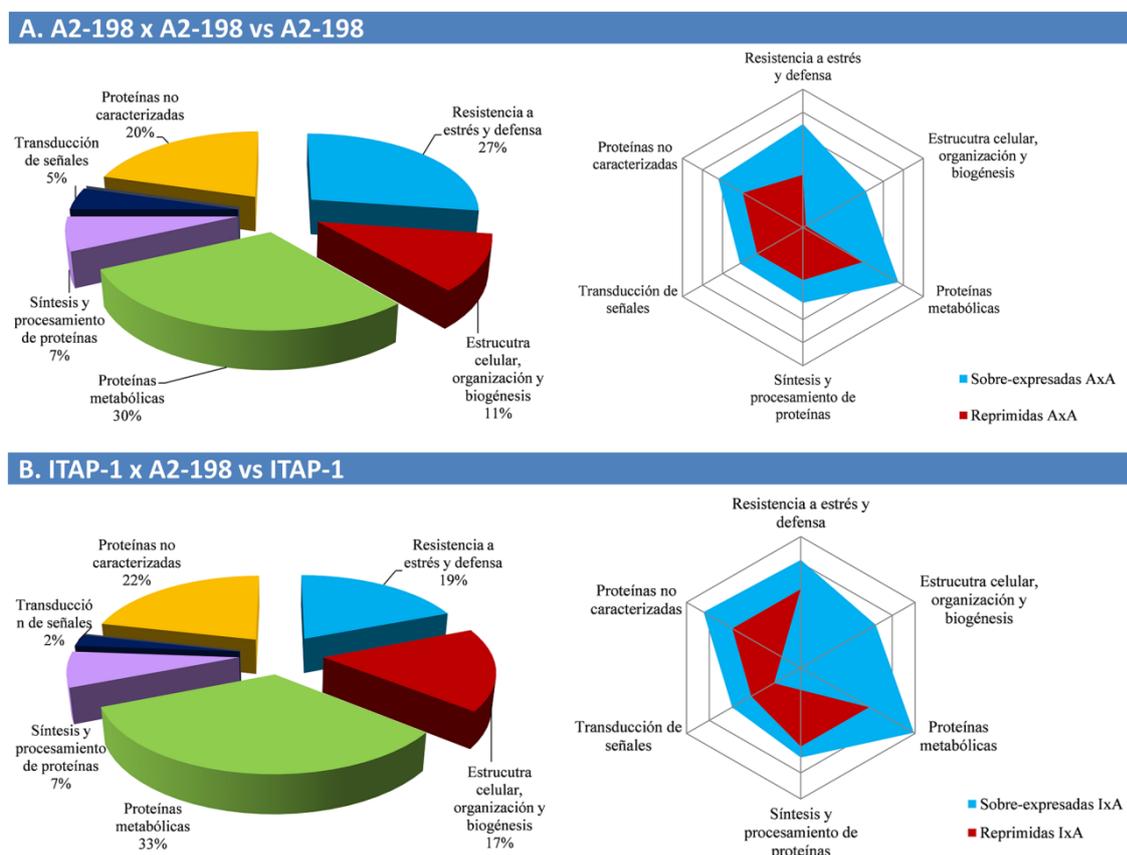


Figura 7.3. Clasificación funcional de las proteínas expresadas diferencialmente en pistilos polinizados (A) A2-198 x A2-198 (auto-polinización compatible) y (B) ITAP-1 x A2-198 (polinización incompatible) frente a sus homólogos no polinizados A2-198 e ITAP-1. Las figuras de la derecha indican el número de proteínas que aparecen sobre-expresadas o reprimidas en las polinizaciones en cada grupo funcional.

Proteínas expresadas diferencialmente tras polinización incompatible

En la comparación de las proteínas expresadas diferencialmente en pistilos de la selección ITAP-1 polinizados con A2-198 frente a los sin polinizar se identificaron 42 proteínas. Seis de estas proteínas resultaron reprimidas y 36 sobre-expresadas en los pistilos polinizados (Anexo VII). Nueve de estas proteínas, todas ellas sobre-expresadas en la polinización, no pudieron ser identificadas en la base de datos UniProtKB/SwissProt, seis de las cuales coinciden con las proteínas no caracterizadas tras la polinización auto-compatible.

Según la clasificación funcional establecida, el grupo mayoritario se corresponde con las proteínas de función metabólica (33%), siguiendo la tendencia de todos los análisis anteriores. En cuanto a la distribución en función de si la condición ITAP-1 x A2-198 (polinización incompatible) se encuentra sobre-expresada o no, se puede apreciar una tendencia similar a la producida tras la auto-polinización, donde las proteínas aparecen sobre-expresadas tras la polinización (Figura 7.3.).

Proteínas diferencialmente expresadas en pistilos polinizados

El análisis comparativo de expresión diferencial en pistilos de A2-198 tras una polinización incompatible (A2-198 x ITAP-1) y una polinización auto-compatible (A2-198 x A2-198) mostró 69 proteínas expresadas diferencialmente. De éstas, 43 presentaron un nivel de expresión inferior en la polinización compatible y 26 aparecieron sobre-expresadas en esta misma condición (Anexo VIII). De todas las proteínas expresadas diferencialmente resultó imposible caracterizar 11 por no encontrarse incluidas en la base de datos UniProtKB/SwissProt.

El conjunto de proteínas expresado diferencialmente fue re-agrupado en diferentes categorías funcionales (Figura 7.4). En esta clasificación aparecieron los grupos funcionales de regulación de la transcripción y regulación de la traducción que, aunque minoritarios, no habían aparecido en las comparaciones anteriores. Por otro lado, la mayoría de las proteínas expresadas diferencialmente pertenecen al grupo de proteínas con función metabólica. La distribución de las proteínas según si se encontraban sobre-expresadas en la polinización compatible (A2-198 x A2-198) o en la incompatible (ITAP-1 x A2-198) en los grupos funcionales establecidos, muestra una distribución similar en ambos casos como se puede apreciar en la Figura 7.5., sin embargo las proteínas implicadas en el metabolismo y en los mecanismos de estrés y defensa aparecen ligeramente sobre-expresadas tras la polinización compatible. En cambio, los grupos funcionales de regulación de la traducción y regulación de la transcripción sólo aparecen tras la polinización incompatible.

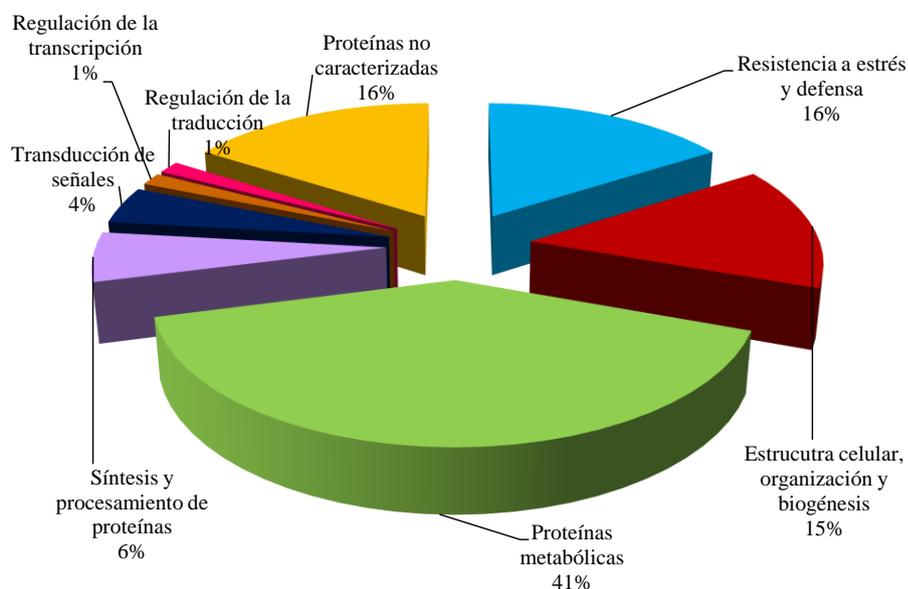


Figura 7.4. Clasificación funcional de las proteínas expresadas diferencialmente tras una polinización compatible, A2-198 x A2-198 frente a una incompatible, ITAP-1 x A2-198.

Determinadas proteínas expresadas diferencialmente, tanto en anteras y pistilos no polinizados como en pistilos polinizados, aparecen duplicadas en dos o más de las distintas condiciones establecidas en los experimentos. Estas repeticiones pueden apreciarse fácilmente en la tabla 6.2, donde se encuentran ordenadas en base a la posible función que desarrollan dentro del mecanismo celular de la planta.

Por otro lado, las diferentes proteínas analizadas en ambos experimentos se encuentran localizadas en el genoma del melocotonero (Tabla 6.2; Anexos III-VIII). Aunque se localizan en todos y cada uno de los 8 scaffold (componente estructural de los cromosomas) del genoma del melocotonero, la gran mayoría de ellas están incluidas en el scaffold 1.

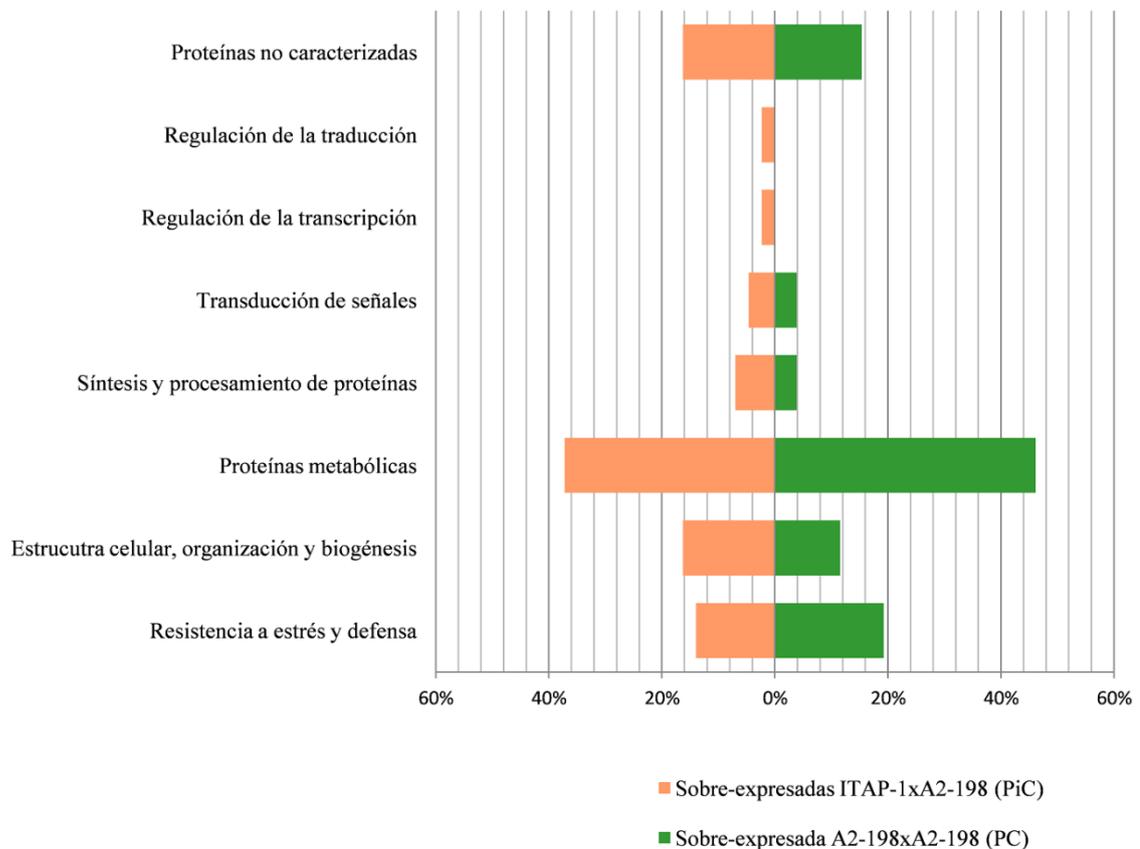


Figura 7.5. Porcentaje de proteínas sobre-expresadas en A2-198 x A2-198 (polinización compatible) e ITAP-1xA2-198 (polinización incompatible) clasificadas en base a la posible función que desempeñan.

7.3.3. Pseudo-Monitorización de reacción múltiple (MRM)

Mediante el análisis de MRM se obtuvieron ocho péptidos para la proteína control M5W1Q5 (proteína relacionada con la patogénesis PR-4) con un *valor de puntuación* de 380, confirmando los valores de cuantificación obtenidos en los análisis de iTRAQ. No obstante, para la RNasa-S, solo se obtuvieron tres péptidos con un *valor de puntuación* de 72 (los cuales se encuentran por encima del valor mínimo calculado para la FDR del 1%). Sin embargo, al ser puntuaciones muy bajas no se pudieron cuantificar las proteínas.

7.4 DISCUSIÓN

7.4.1. Clasificación funcional de las proteínas identificadas

La clasificación funcional de las proteínas muestra en todos los casos un perfil similar, donde el grupo más abundante es el de las proteínas de carácter metabólico. Asimismo, Chalivendra y col. (2013) en un análisis iTRAQ realizado en estilos de *Solanum pennellii* (especie que también presenta incompatibilidad gametofítica), observaron que un día antes de antesis el grupo más abundante de proteínas era el de metabolismo de lípidos. Según estos autores, estas proteínas junto con otras muy abundantes en este estado de desarrollo del estilo, como son las defensinas y las taumatinas, se clasifican como proteínas ricas en cisteína, las cuales intervienen en las interacciones polen-pistilo (Marshall y col., 2011). En el presente análisis las taumatinas (M5WR86, M5WT96 y M5WV03) aparecen sobre-expresadas en pistilos polinizados de ambas selecciones. Estas proteínas interactúan con 1,3- β -glucanos (Grenier y col., 1999), como la calosa, la cual se deposita durante el crecimiento discontinuo del tubo polínico (Martin, 1959). Su papel en las

interacciones polen-pistilo se asemeja a las interacciones huésped-parásito (Dumas y Knox, 1983).

Por otro lado, un análisis de ESTs (*expressed sequence tags*) realizado en pistilos de almendro muestra que uno de los grupos más numerosos se corresponde con las proteínas de resistencia a estrés y defensa (Jiang y Ma, 2003), resultados que concuerdan perfectamente con los nuestros, donde este es el segundo grupo más numeroso. Estos autores indican que la protección frente a diferentes situaciones de estrés como frío o sequías es importante para el normal desarrollo de los pistilos. Según nuestros resultados, este grupo de proteínas de defensa es también uno de los más importantes en polen, lo que coincide con datos disponibles para *Arabidopsis thaliana*, arroz o tomate (Sheoran y col., 2007).

Como se ha indicado, el grupo de proteínas metabólicas es el grupo más numeroso también en las comparaciones de pistilos polinizados, sin embargo hay más proteínas sobre-expresadas en la polinización auto-compatible que en la incompatible (Figura 7.5.). Resultados similares a estos aparecen en *Solanum penelli* tras un análisis DIGE, lo que sus autores atribuyen a que una polinización compatible requiere de un aumento de energía que permita además de la hidratación del polen en el estigma, la germinación del grano de polen, la penetración del tubo polínico en el estilo y su crecimiento hasta alcanzar el ovario (Samuel y col. 2011).

7.4.2. Localización genómica de las proteínas identificadas

La localización en el genoma del melocotonero de los genes correspondientes a las proteínas expresadas diferencialmente en este estudio, es muy útil para poder comparar nuestros resultados con los obtenidos en estudios similares en especies del género *Prunus*, ya que éste es el genoma de

referencia hasta la fecha. Esta localización nos permite tal y como indicábamos en el Capítulo 6, centrarnos en las proteínas, que con mayor probabilidad estarán implicadas en el mecanismo de incompatibilidad, según los resultados obtenidos en análisis de genética de poblaciones. Así, nos centraremos en los grupos de ligamiento donde se han localizado mutaciones en el polen (GL3) en *Prunus armeniaca* y *Prunus avium* (Cachi y Wünsch, 2011; Zuriaga y col., 2013) y en los GL6 y GL8 por asociarse con dos QTLs relacionados con la auto-incompatibilidad en almendro (Fernández y Martí y col., 2011).

7.4.3. Proteínas expresadas diferencialmente

Proteínas expresadas diferencialmente en anteras

Algunas de las proteínas expresadas diferencialmente en anteras están ligadas al desarrollo del polen, a su dinámica o a la interacción polen-pistilo. Así, la proteína esterasa/lipasa GDSL (M5VGZ1) aparece reprimida en la selección auto-compatibile. Esta proteína es una subclase de enzimas lipolíticas con propiedades multifuncionales ligadas a la hidratación del polen en el estigma (Updegraff y col., 2009). Estas proteínas también se han asociado con la fertilidad del polen en *Arabidopsis* y con la formación de proteínas de la superficie de polen implicadas en la interacción polen-pistilo, como sería la proteína expresada diferencialmente M5WRJ6 (Mayfield y col. 2001).

La anexina (M5X1U2) que, al igual que la proteína anterior (esterasa/lipasa GDSL), se encuentra reprimida en la selección A2-198, necesita para su funcionamiento de iones Ca^{2+} y fosfolípidos, y juega un papel importante en la secreción apical del tubo polínico (Backbourn y col., 1992). La colocalización de un alto nivel de Ca^{2+} y de anexinas en la zona apical del tubo polínico podría indicar una relación directa y funcional con la elongación de éste (Rudd y Franklin-Tong, 2003). Sin embargo en el presente análisis no se

encuentra una expresión diferencial significativa en pistilos polinizados que apoyen la tesis de Zou y col. (2009), que observaron una disminución de la expresión de las anexinas durante la transición de granos de polen maduros a polen germinado.

La proteína serina carboxipeptidasa (M5XS55), que se encuentra sobre-expresada en las anteras de la selección A2-198, es una proteasa que hidroliza los puentes peptídicos en el C-terminal. Proteínas similares han sido encontradas en el polen de otras especies y parece que se encuentran implicadas en la germinación y el crecimiento del tubo polínico (Dai y col., 2006), lo que ocurriría en mayor medida en una interacción compatible, tal y como se observa en el presente análisis, pero con un número de accesión diferente (M5VM12). Por el contrario, en Martínez-García y col. (2015) esta proteína aparecía sobre-expresada en la interacción incompatible.

Proteínas expresadas diferencialmente en pistilos

Los resultados obtenidos en ambos experimentos difieren en parte, de manera que sólo algunas de las proteínas se repiten en ambos experimentos. Sin embargo, el proteoma no es una entidad estática, sino que puede verse afectado por múltiples modificaciones como el ciclo celular, cambios en las condiciones externas (disposición hídrica, temperatura, etc.) y estados fisiológicos particulares, a lo que pueden deberse las diferencias encontradas entre años (Timperio y col., 2008). Esta modificación del proteoma es también la razón por la que los estudios de proteómica son una importante herramienta en el análisis de las vías bioquímicas y de respuesta de las plantas frente a estímulos (Timperio y col., 2008).

Los pistilos son unos órganos que acumulan gran cantidad de nutrientes necesarios para el crecimiento del tubo polínico, lo que los convierte en una diana

de patógenos, sin embargo, la infección de los pistilos es rara, esto es debido a que acumulan un número elevado de proteínas antimicrobianas (Sassa e Hirano, 2006), lo que está relacionado con que el segundo grupo más numeroso en nuestros resultados sea el grupo de proteínas con función de resistencia a estrés y patógenos. Proteínas de este tipo que aparecen sobre-expresadas en la selección auto-compatibile, antes de la polinización y tras ella, son las taumatinas (M5WR86; M5WT96). Estas proteínas relacionadas con la patogenicidad se encuentran ligadas al reconocimiento de las señales de polen (Sassa e Hirano, 1998) y, además, parecen interaccionar con los β -1,3-glucanos (Grenier y col., 1999) al igual que la xiloglucan endo-transglucosilasa/hidrolasa (M5WH02; M5WJ79; M5WT30; M5X0T3) encargada de remodelar y/o degradar la pared celular del tubo polínico en *Arabidopsis thaliana* (Mollet y col., 2013). Un polímero de β -1,3-glucano presente en la pared de los tubos polínicos es la calosa, cuyo papel en las interacciones polen-pistilo se ha comparado con las interacciones huésped parásito (Dumas y Knox, 1983). Esta tipo de interacción se observa bastante bien en la proteína relacionada con la patogénesis PR-4 (M5W1Q5) quien aparece sobre-expresada tras la polinizaciones tanto compatible como incompatible, aunque significativamente más en la polinización incompatible, con lo cual también podría formar parte del sistema de incompatibilidad.

La proteína M5VYZ1, con un dominio de repetición rico en Leucina (LRR), aparece sobre expresada tras la polinización incompatible. Este tipo de dominios son comunes en las proteínas transmembrana, lo que las hace participes de procesos de comunicación intercelular o en procesos de interacción con patógenos (Sanabria y col., 2008). Así mismo, Losada y Herrero (2014) indican que este dominio aparece descrito en algunas extensinas, proteínas que aparecen en el tejido transmisor del estilo de los pistilos de *Malus domestica* y posiblemente juegan un papel fundamental en la interacción-polen pistilo.

La proteína SRK (S- receptor kinase) como se indicó en el Capítulo 6, es un receptor de membrana con actividad serina-treonina kinasa, determinante femenino del *locus-S* de la familia *Brassicaceae* (Zhang y col., 2009). La activación de esta proteína bloquea la reacción compatible, habiéndose observado en *Brassica rapa* mediante análisis de inclusión de los genes *SRKs*, que es el único determinante para el mecanismo de incompatibilidad, y SLG, que sólo promueve dicha respuesta (Takasaki y col., 2000). En nuestros resultados esta proteína (M5VM54) aparece sobre-expresada 72 horas después de la polinización con un ratio de 1,72 en la polinización compatible frente a la polinización incompatible, lo que coincide con la sobre-expresión del transcrito asociado a este tipo de proteínas 48 horas después de la polinización en el Capítulo 4. Resultados diferentes fueron obtenidos por Feng y col. (2009), donde aparece sobre-expresada pistilos de *Prunus armeniaca* 24 horas después de una auto-polinización incompatible, esto mismo ocurre también con otro transcrito del capítulo 4, siendo además éste el perfil esperado en la incompatibilidad esporofítica (Takasaki y col. 2000). A pesar de que en almendro y albaricoquero la incompatibilidad es gametofítica y no esporofítica (como en *Brassica*), 72 horas después de la polinización aún hay un amplio porcentaje de tubos polínicos que se encuentran en el estigma (Ortega y col., 2002) donde tiene lugar la incompatibilidad esporofítica. De manera que, la presencia de esta proteína, y de los transcritos observados en el Capítulo 4, cuya función ha sido ampliamente estudiada en la incompatibilidad esporofítica, abre una nueva vía de estudio en la interacción polen-pistilo del almendro que debería ser elucidada.

Dentro de las proteínas expresadas diferencialmente de manera significativa hay un gran número de proteínas no caracterizadas de las que sólo en algún caso conocemos su función. De estas, a priori las más interesantes son aquellas expresadas en los LG 3 y 8. En el LG3 se encuentra la proteína M5WQU9, posible factor de transcripción, perteneciente a la familia GeBP

(GLABROUS1 enhancer-binding protein), familia implicada en la vía de regulación de la citoquinina, la regulación de la expresión de la patatina o la vía de señalización de la glucosa (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR007592>). No se ha descrito anteriormente la implicación de este factor en ningún mecanismo de incompatibilidad, sin embargo debería tenerse en cuenta su presencia en estudios posteriores.

7.4.4. Análisis MRM

A pesar de que existen estudios que confirman que las RNasas-S son proteínas abundantes en el tejido de transmisión de los estilos maduros de las especies del género *Solanaceae* (Liu y col. 2014), cabe destacar que en nuestros análisis, las RNasas-S (*S_{f/ta}* y *S₁₁*) presentes en los pistilos analizados, no son identificadas como diferencialmente expresadas. La presencia de S-RNasas en nuestras muestras se determinó mediante los análisis de MRM, los cuales identificaron RNasas-S, aunque con un número muy bajo de péptidos que impidió su cuantificación. De manera similar, en pistilos no polinizados de peral japonés, Uchida y col. (2012) detectaron sólo dos de las tres RNasas-S presentes en las selecciones analizadas mediante electroforesis 2-D. También otros estudios donde se utilizó la técnica 2D-DIGE para analizar pistilos de melocotonero o de almendro tras polinizaciones compatibles e incompatibles no pudieron identificar expresión diferencial en las RNasas-S (Cao y col., 2012; Martínez-García y col., 2015). Por el contrario, en pistilos de albaricoquero Feng y col. (2009) identifican una RNasa-S, aunque los mismos autores en un estudio previo de pistilos auto-polinizados y de polinización cruzada, no son capaces de detectar expresión diferencial en estas proteínas utilizando la misma técnica pero diferente material vegetal (Feng y col. 2006)

7.5. CONCLUSIONES

El estudio del proteoma de dos selecciones de almendro con igual genotipo pero distinto fenotipo de incompatibilidad, muestra la expresión diferencial de 20 proteínas en anteras y 32 en pistilos. Los perfiles proteómicos determinados son la base de referencia para los análisis de proteómica comparativa con pistilos polinizados.

La proteómica cuantitativa ha permitido conocer el perfil proteico de la interacción auto-compatibile (comparación A2-198 con A2-198×A2-198) en el que 44 proteínas parecen estar implicadas, así como de la interacción incompatible (comparación ITAP-1 con ITAP-1×A2-198) con 42 proteínas implicadas. Estos perfiles de expresión son los primeros desarrollados en proteómica cuantitativa de almendro.

Se ha obtenido un perfil con 69 proteínas diferencialmente expresadas entre la interacción auto-compatibile (A2-198×A2-198) y la incompatible (ITAP-1×A2-198) en pistilos.

Algunas de las proteínas identificadas podrían jugar un papel importante en la interacción polen-pistilo y ser consideradas como posibles factores modificadores. Entre ellas destacamos la serina-treonina kinasa, determinante principal del sistema de incompatibilidad esporofítico, no descrito antes en almendro, y que debería ser estudiada en detalle.

Es necesario llevar a cabo estudios futuros que confirmen la posible interacción de las proteínas identificadas en este estudio, con las codificadas por el *locus-S*.

A close-up photograph of a flower's reproductive parts. The image shows several stamens with yellowish anthers and a central pistil with a fuzzy, brownish stigma. The background is a light, textured surface.

8. Conclusiones generales

8. CONCLUSIONES GENERALES

La caracterización fenotípica de los haplotipos referidos a la *ARNasa-S_f* y *ARNasa-S_{fa}* ha mostrado una relación de compatibilidad unilateral para el haplotipo *S_f* debida a una disfunción en el pistilo. Los pistilos con haplotipo *S_f* no reconocen como propio el alelo *S_f* del polen que avanza hasta el ovario. Sin embargo, los pistilos con *ARNasa-S_{fa}* sí reconocen y detienen el polen *S_f*, proveniente de genotipos con *ARNasa-S_f* o *ARNasa-S_{fa}*.

Se ha comprobado que las selecciones auto-compatibles homocigóticas reconocen el haplotipo *S_f* del genitor masculino y tienden a no transmitirlo a la descendencia. Esto no ocurre en los individuos auto-compatibles heterocigóticos, que sí dan lugar a descendientes *S_fS_{fa}*.

Los zimogramas de actividad ribonucleasa han permitido comprobar la actividad de la *ARNasa S_{fa}* de ITAP-1.

Los análisis de secuenciación no han mostrado diferencias entre la *ARNasa-S_f* y la *ARNasa-S_{fa}*, ni entre sus regiones promotoras, por lo que estas regiones del *locus-S* no son las responsables del diferente fenotipo de auto-incompatibilidad.

Los análisis transcriptómicos han demostrado que tanto la *ARNasa-S_f* como la *ARNasa-S_{fa}* se transcriben, aunque esta última presenta un nivel de transcripción mucho mayor. La presencia de transcritos de la *ARNasa-S_f* indica que su falta de actividad ribonucleasa no es debida a una falta de transcripción del gen.

Sí se han observado diferencias en las secuencias de la región intergénica *ARNasa-S_f/SFBf* consistentes en la inserción de tres timinas en las selecciones auto-compatibles, pudiendo ser la inserción de estas bases la causa de la auto-compatibilidad en almendro. Esta modificación en la secuencia se produce

además aguas arriba del ORF descrito por primera vez en esta tesis, por lo que además podría ser también la responsable de su transcripción diferencial. Pudiendo esto también influir en el mecanismo de auto-compatibilidad en almendro.

El estudio del transcriptoma de dos selecciones de almendro con igual genotipo pero distinto fenotipo de incompatibilidad, muestra el perfil de la expresión diferencial en pistilos no polinizados de almendro, siendo este perfil la base de referencia para los análisis de transcriptómica comparativa con pistilos polinizados.

El estudio del transcriptoma de dos selecciones de almendro con igual genotipo pero distinto fenotipo de incompatibilidad, muestra el perfil de expresión génica diferencial en pistilos no polinizados de almendro, siendo éste la base de referencia para los análisis de transcriptómica comparativa posteriores.

El análisis transcriptómico ha permitido conocer el perfil genético de la interacción auto-compatible (A2-198 *versus* A2-198×A2-198) en el que 206 genes parecen estar implicados, así como de la interacción incompatible (ITAP-1 *versus* ITAP-1×A2-198) con 705 genes implicados. Esto sugiere la implicación diferencial de un mayor número de genes en la reacción incompatible que en la compatible. Estos perfiles de expresión son además los primeros desarrollados en transcriptómica cuantitativa en almendro.

La cuantificación mediante qPCR de la expresión de 14 genes expresados diferencialmente y dos sobre-expresados, entre los distintos tratamientos de polinización, valida el análisis de secuenciación de ARN realizado.

Algunos de los genes identificados podrían jugar un papel importante en la interacción polen-pistilo y ser considerados como posibles factores modificadores. Entre ellos destacamos el gen de la serina-treonina kinasa,

determinante principal del sistema de incompatibilidad esporofítico, el gen con dominio ZnF y un gen similar al gen codificante de la proteína de auto-incompatibilidad S1 descrita en *Papaver*, ninguno de ellos descritos anteriormente en el sistema de incompatibilidad de almendro.

El estudio del proteoma de dos selecciones de almendro con igual genotipo pero distinto fenotipo de incompatibilidad, muestra la expresión diferencial de 20 proteínas en anteras y 32 en pistilos. Los perfiles proteómicos determinados son la base de referencia para los análisis de proteómica comparativa con pistilos polinizados.

La proteómica cuantitativa ha permitido conocer el perfil proteico de la interacción auto-compatible (comparación A2-198 con A2-198×A2-198) en el que 44 proteínas parecen estar implicadas, así como de la interacción incompatible (comparación ITAP-1 con ITAP-1×A2-198) con 42 proteínas implicadas. Estos perfiles de expresión son los primeros desarrollados en proteómica cuantitativa de almendro.

Se ha obtenido un perfil con 69 proteínas diferencialmente expresadas entre la interacción auto-compatible (A2-198×A2-198) y la incompatible (ITAP-1×A2-198) en pistilos.

Algunas de las proteínas identificadas podrían jugar un papel importante en la interacción polen-pistilo y ser consideradas como posibles factores modificadores. Entre ellas destacamos la serina-treonina kinasa, determinante principal del sistema de incompatibilidad esporofítico, no descrito antes en almendro, y que debería ser estudiada en detalle.

Es necesario llevar a cabo estudios futuros que confirmen la posible interacción de los genes y proteínas identificadas en este estudio, con las codificadas por el *locus-S*.

A close-up photograph of a flower's reproductive parts. The image shows several stamens with yellowish anthers and a central pistil with a fuzzy, brownish stigma. The background is a soft, out-of-focus light color.

9. Referencias bibliográficas

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson MA, Cornish EC, Mau SL, Williams EG, Hoggart R, Atkinson A, Bonig I, Grego B, Simpson R, Roche P, Haley JD, Penschow J, Niall HD, Tregear GW, Coghlan JP, Crawford RJ y Clarke AE (1986) Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature* 321:38-44.
- 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.
- Anders S, y Huber, W (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology* 11:R106.
- Aranzana MJ, Garcia-Mas, Carbó J y Arús P (2002) Development and variability of microsatellite markers in peach. *Plant Breeding* 121:87-92.
- Archangeli (1882) *Comp Fl Ital* 209: 30.
- Ávila-Castañeda A, Juárez-Díaz J, Rodríguez-Sotres R, Bravo-Alberto C, Ibarra-Sánchez C, Zavala-Castillo A, Cruz-Zamora Y, Martínez-Castilla L, Márquez-Guzmán J, Cruz-García F (2014) A novel motif in the NaTrxh N-terminus promotes its secretion, whereas the C-terminus participates in its interaction with S-RNase in vitro. *BMC Plant Biology* 14, 147.
- Bateman AJ (1952) Self-incompatibility systems in angiosperms. I Theory. *Heredity* 6: 285-310.
- Batsch ASG (1801) *Beytr Gesch Naturr* 1:30.
- Bertozzi T, Bennet C y Sedgley M (1998) Almond improvement in Australia. *Nucis-Newslett* 7: 10-11.
- Betley JN, Frith MC, Graber JH, Choo S y Deshler O (2002) A ubiquitous and conserved signal for RNA localization in chordates. *Curr. Biol.* 12, 1756-1761.
- Blackbourn HD, Barker P, Huskisson NS y Battey NH (1992) Properties and partial protein sequence of plant annexins. *Plant Physiology* 99:864-871.
- Bošković R, Tobutt KR, Duval H, Batlle I, Dicenta F y Vargas FJ (1999) A stylar ribonuclease assay to detect self-compatible seedlings in almond progenies. *Theoretical and Applied Genetics* 99:800-810.
- Bošković R y Tobutt KR (1996) Correlation of stylar ribonuclease zymograms with incompatibility alleles in sweet cherry. *Euphytica* 90: 245-250.

- Bošković R, Tobutt KR, Batlle I y Duval H (1997) Correlation of ribonuclease zymograms and incompatibility genotypes in almond. *Euphytica* 97: 167-176.
- Bošković R, Tobutt KR, Batlle I, Duval H, Martínez-Gómez P y Gradziel TM (2003) Stylar ribonucleases in almond: correlation with and prediction of incompatibility genotypes. *Plant Breeding* 122:70-76.
- Bošković R, Tobutt KR, Duval H, Batlle I, Dicenta F y Vargas FJ (1999) A stylar ribonuclease assay to detect self-compatible seedlings in almond progenies. *Theoretical and Applied Genetics* 99:800-810.
- Bošković RI, Tobutt KR, Ortega E, Sutherland BG y Godini A (2007) Self-(in)compatibility of the almonds *P. dulcis* and *P. webbii* in Apulia: detection and cloning of 'wild type Sf' and alleles encoding inactive S-RNases. *Molecular Genetics and Genomics* 278: 665-676.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Bredemeijer GMM y Blaas J (1981) S-specific proteins in styles of self-incompatible *Nicotiana glauca*. *Theoretical and Applied Genetics* 59: 185-190.
- Bundock, P., and Hooykaas, P. (2005). An Arabidopsis hAT-like transposase is essential for plant development. *Nature* 436, 282-284.
- Busot GY, McClure B, Ibarra-Sánchez CP, Jiménez-Durán K, Vázquez-Santana S y Cruz-García F (2008) Pollination in *Nicotiana glauca* stimulates synthesis and transfer to the stigmatic surface of NaStEP, a vacuolar Kunitz proteinase inhibitor homologue. *Journal of Experimental Botany* 59: 3187-3201.
- Butler JE y Kadonaga JT (2002) The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes and development* 6:2583-2592.
- Cachi AM y Wunsch A (2011) Characterization and mapping of non-S gametophytic self-compatibility in sweet cherry (*Prunus avium* L.) *Journal of Experimental Botany* 62:1847-1856.
- Cao J, Schneeberger K, Ossowski S, Günther T, Bender S, Fitz J y Wang X. (2011) Whole-genome sequencing of multiple *Arabidopsis thaliana* populations. *Nature Genetics* 43:956-963.
- Cao X, Feng J, Wang D, Sun J, Lu X y Liu H (2012) Primary style protein expression in the self-incompatible/self-compatible apricot by the 2D-DIGE technique. *Gene* 503:110-117.

- Caruso M, Merelo P, Distefano G, La Malfa S, Lo Piero A, Tadeo FR, Talon M, Gentile A (2012) Comparative transcriptome analysis of stylar canal cells identifies novel candidate genes implicated in the self-incompatibility response of *Citrus clementina*. *BMC Plant Biology* 12:20.
- Casado-Vela J, Martínez-Esteso MJ, Rodríguez E, Borrás E, Elortza F y Bru-Martínez R (2010) iTRAQ-based quantitative analysis of protein mixtures with large fold change and dynamic range. *Proteomics* 10:343–347.
- Chalivendra SC, López-Casado G, Kumar A, Kassenbrock AR, Royer S, Tovar-Méndez A, Covey PA, Dempsey LA, Randle AM, Stack SM, Rose JKC, McClure B y Bedinger PA (2013) Developmental onset of reproductive barriers and associated proteome changes in stigma/styles of *Solanum pennellii*. *Journal of Experimental Botany* 64:265–279.
- Channuntapipat C, Sedgley M, Batlle I, Arús P y Collins G (2002) Sequences of genomic DNAs encoding the S2, S9, S10 and S23 alleles from almond, *Prunus dulcis*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 77: 387-392.
- Channuntapipat C, Wirthensohn M, Ramesh SA, Batlle I, Arus P, Sedgley M, Collins G (2003) Identification of incompatibility genotypes in almond (*Prunus dulcis* Mill.) using specific primers based on the introns of the S-alleles. *Plant Breeding* 122: 164-168.
- 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
- Cheng J, Han Z, Xu X y Li T (2006) Isolation and identification of the pollen-expressed polymorphic F-box genes linked to the S-locus in apple (*Malus x domestica*). *Sexual Plant Reproduction* 19: 175-183.
- Cipriani G, Lot G, Huang HG, Marrazzo MT, Peterlunger E y Testolin R (1999) AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach (*Prunus persica* (L.) Basch): isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. *Theor. Appl. Genet.* 99:65–72.
- Conel JH (2000) Pollination of almonds: practices and problems. *HortTechnology* 10(1):116-119.
- Crossa-Raynaud P y Grasselly C (1985) Existence de groupes d'interstérilité chez l'amandier. *Options Méditerranéennes. Serie Études* 1:43-45.
- Dai S, Li L, Chen T, Chong K, Xue Y y Wang T (2006) Proteomic analyses of *Oryza sativa* mature pollen reveal novel proteins associated with pollen germination and tube growth. *Proteomics* 6:2504–2529.
- de la Rosa R, James CM y Tobutt KR (2004) Using microsatellites for paternity testing in olive progenies. *HortScience* 39:351-354.

- de Nettancourt D (2001) Incompatibility and incogruity in wild and cultivated plants. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. Pp: 322.
- 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.
- Denisov VP (1988) Almond Genetic Resources in the USSR and their use in production and breeding. *Acta Horticulturae* 224: 299-306.
- Dicenta F y García JE (1993) Inheritance of the kernel flavour in almond. *Heredity* 70: 308-312.
- Dicenta F, Egea J, Ortega E, Sánchez R, Martínez P, Martínez PJ, Rubio M, Cremades T, Patiño JL. (2010) Mejora del almendro para permitir su cultivo en zonas frías. *Agricultura*, abril 2010: 280-283.
- Dicenta F, Ortega E, Egea J y Cánovas JA (2000) Hacia la plantación monovarietal de almendro con variedades autocompatibles. *Fruticultura profesional* 111: 11-18.
- Dicenta F, Ortega E, Egea J y Cánovas JA (2000b) Hacia la plantación monovarietal de almendro con variedades autocompatibles. *Fruticultura profesional* 111:11-18.
- Dicenta F, Ortega E, Martínez-Gómez P, Bošković R y Tobutt KR (2002) Comparison of homozygous and heterozygous self-compatible seedlings in an almond breeding programme. *Euphytica* 124: 23-27.
- Dicenta F, Ortega E, Martínez-Gómez P, Sánchez-Pérez R, Gambín M y Egea J (2009) Penta and Tardona: two new extra-late flowering self-compatible almond cultivars. *Acta Horticulturae* 814:189-192.
- Dicenta F, Sánchez-Pérez R, Rubio M, Egea J, Batlle I, Miarnau X, Palasciano M, Lipari E, Confolent C, Martínez-Gómez P y Duval H (2015) The origin of the self-compatible almond 'Guara'. *Scientia Horticulturae* 197:1-4.
- Dicenta F, Prudencia AS, Sánchez-Pérez R, Egea J, Martínez-Gómez P. La época de floración del almendro. *Revista de Fruticultura* 32-41.
- Dirlewanger E, Crosson A, Tavaud P, Aranzana MJ, Poizat C, Zanetto A, Arús P y Laigret L (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(1):127-138.
- Doyle JJ y Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.

- Ducon P (1968) La fructification des arbres fruitiers. Etude de quelques caractères du pollen et de la biologie florale de l'Amandier et Pommier. *Pomologie Française* 5: 11-42.
- Dumas C y Knox RB (1983) Callose and determination of pistil viability and incompatibility. *Theoretical and Applied Genetics* 67:1-10.
- Duval H y Grasselly C (1994) Behaviour of some self-fertile almond selections in the south-east of France. *Acta Horticulturae* 373: 69-74.
- Egea G, Nortes PA, González-Real MM, Baille A, Domingo R (2010) Agronomic response and water productivity of almond trees under contrasted deficit irrigation regimes. *Agricultural Water Management* 97: 171-181.
- Egea J, Dicenta F, Berenguer T y García JE (2000) 'Antoñeta' and 'Marta' almonds. *HortScience* 35: 1358-1359.
- Egea L y García JE (1988) Lignes de recherche actuelle sur l'amandier au CEBAS Murcie. Objectifs et premières observations. 2 Colloque du GREMPA. Montpellier (Nîmes). Pp: 1-11.
- Egea L, García JE, Egea J, Berenguer T, Gambín M y Patiño JL (1985) Variedades de almendro de la Región de Murcia. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CSIC). Murcia.
- Elleman, C.J., and Dickinson, H.G. (1999). Commonalities between pollen/stigma and host/pathogen interactions: Calcium accumulation during stigmatic penetration by Brassica oleracea pollen tubes. *Sex. Plant Reprod.* 12, 194-202.
- Entani T, Iwano M, Shiba H, Che FS, Isogai A y Takayama S (2003) Comparative analysis of the self-incompatibility (S-) locus region of *Prunus mume*: Identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity. *Genes to Cells* 8: 203-213.
- Evans C, Noirel J, Ow SY, Salim M, Pereira-Medrano AG, Couto N, Pandhal J, Smith D, Pham TK, Karunakaran E, Zou X, Biggs CA y Wright PC (2012). An insight into iTRAQ: where do we stand now? *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404:1011-27.
- Evreinoff VA (1958) Contribution a l'étude de l'amander. *Fruits et primeurs Afrique* 28:99-104.
- Fedorov AA (1969) Chromosome numbers of flowering plants. Leningrad.
- Felipe AJ (1977) Stadi fenologici del mandorlo. Proceedings of the 3rd GREMPA Colloquium, 3-7 October 1977, Valenzano, Bari, Italy. Edizioni Quadrifoglio, Bari. Pp: 60-61.

- Felipe AJ y Socias i Company R (1985) L'amélioration génétique de l'amandier à Saragosse. Options Méditerranéennes. Serie Études 1: 9-14.
- Felipe AJ y Socias i Company R (1987) 'Aylés', 'Guara', and 'Moncayo' almonds. HortScience 22: 961-962.
- Feng J, Chen X, Yuan Z, He T, Zhang L, Wu Y, Liu W y Liang Q (2006) Proteome comparison following self- and across-pollination in self-incompatible apricot (*Prunus armeniaca* L.). Protein Journal 25:328–335.
- Feng JR, Chen XS, Yuan ZH, Zhang LJ, Ci ZJ, Liu XL, Zhang CY (2009) Primary molecular features of self-incompatible and self-compatible F1 seedling from apricot (*Prunus armeniaca* L.) Katy × Xinshiji. Molecular Biology Reports 36:263–272.
- Fernandez i Marti A, Font i Forcada C, Kamali K, Rubio-Cabetas M J, Wirthensohn M, and Socias i Company R (2015) Molecular analyses of evolution and population structure in a worldwide almond *Prunus dulcis* (Mill.) DA Webb syn. *P. amygdalus* Batsch pool assessed by microsatellite markers. Genetic Resources and Crop Evolution 62: 205-219.
- Fernandez i Marti A, Gradziel TM, Socias i Company R (2014) Methylation of the S (f) locus in almond is associated with S-RNase loss of function. Plant Molecular Biology 86: 681-689.
- Fernández i Martí A, Hanada T, Alonso JM, Yamane H, Tao R y Socias i Company R (2010) The almond Sf haplotype shows a double expression despite its comprehensive genetic identity. Scientia Horticulturae 125:685-691.
- Fernández i Martí A, Howad W, Tao R, Alonso Segura JM, Arús P, Socias i Company R (2011) Identification of quantitative trait loci associated with self-compatibility in a *Prunus* species. Tree Genetics and Genomes 7:629–639.
- Feschotte C y Pritham EJ (2007) DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. Ann. Rev. Genet. 41:331–368.
- Feurtado JA, Huang D, Wicki-Stordeur L, Hemstock LE, Potentier MS, y col. (2011) The Arabidopsis C2H2 zinc finger Indeterminate Domain1/Enhydrous promotes the transition to germination by regulating light and hormonal signaling during seed maturation. The Plant Cell 23:1772–1794.
- Franklin FCH, Lawrence MJ, Franklin-Tong VE (1995) Cell and Molecular Biology of Self-Incompatibility in Flowering Plants. In "International Review of Cytology" (WJ Kwang and J Jonathan, eds.), Volume 158, pp. 1-64. Academic Press.
- Franklin-Tong VE, and Franklin, FCH (2003) The different mechanisms of gametophytic self-incompatibility. Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences 358: 1025-1032.

- Franklin-Tong VE, Ride JP, Read ND, Trewavas AJ, Franklin FCH (1993) The self-incompatibility response in *Papaver rhoeas* is mediated by cytosolic free calcium. *The Plant Journal* 4: 163-177.
- Gambino G, Perrone I y Gribaudo I (2008) A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis* 19(6):520-5.
- 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 using RNA-Seq. *Frontiers in Physiology* 7: 170
- García JE (1986) Cultivo del almendro en zonas semiáridas del sureste español. *Anales de Edafología y Agrobiología* 45: 827-841.
- García JE y Egea L (1979) Influencia de la temperatura en la germinación del polen de variedades de almendro. *Anales de Edafología y Agrobiología* 38:2181-2193.
- García JE, Dicenta F, Berenguer T y Egea J (1996) Programa de Mejora del almendro del CEBAS (CSIC-Murcia). *Fruticultura Profesional* 81: 64-70.
- Giri J, Vij S, Dansana PK, Tyagi AK (2011) Rice A20/AN1 zinc-finger containing stress-associated proteins (SAP1/11) and a receptor-like cytoplasmic kinase (OsRLCK253) interact via A20 zinc-finger and confer abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. *New Phytol* 191: 721-732.
- Godini A (1979) Ipotesi sulla comparsa dell' autocompatibilità nel mandorlo. *Scienza e Técnica Agraria* 19: 3-10.
- Godini A y Palasciano M (1997) Growth and yield of four self-unfruitful and four self-fruitful almonds onto three rootstocks: a thirteen year study. *Acta Horticulturae* 470: 200-207.
- Goldraij A, Kondo K, Lee CB, Hancock CN, Sivaguru M, Vazquez-Santana S, Kim S, Phillips TE, Cruz-García F y McClure B (2006) Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature* 439: 805-810.
- Gómez EM, Dicenta F, Batlle I, Romero A, Ortega E (2015) Significance of S-genotype determination in the conservation of genetic resources and breeding of almond. *Options Méditerranées*.
- Gradziel TM (2011) Origin and dissemination of almond. In J Janick (ed), *Origin and Dissemination of Prunus Crops: Peach, Cherry, Apricot, Plum and Almond*. (pp 187-241). *Scripta horticulturae* 11. American pomological Soc., ISHS, Leuven, Belgium

- Gradziel TM y Kester DE (1996) Genetic improvements. En: Almond production manual. University of California, 70-75.
- Gradziel TM y Kester DE (1998) Breeding for self-fertility in California almond cultivars. *Acta Horticulturae* 470: 109-117.
- Gradziel TM, Lampinen B, Connell JH y Viveros M (2007) "Winters" almond: An early-blooming, productive, and high-quality pollenizer for "Nonpareil". *Hortscience* 42:1725-1727.
- Gradziel TM, Martínez-Gómez P (2013) Almond breeding. In "Plant Breeding Reviews", Vol. 37, pp. 207-258.
- Gradziel TM, Martínez-Gómez P, Dicenta F y Kester DE (2001) The utilization of related *Prunus* species for almond variety improvement. *Journal of the American Pomological Society* 55, 100-108.
- Grasselly C (1976) Les espèces sauvages d'amandier. *Options Méditerranéennes* 32: 28-44.
- Grasselly C y Olivier G (1976) Mise en évidence de quelques types autocompatibles parmi les cultivars d'amandier (*P. amygdalus* Batsch) de la population des Pouilles. *Annales de l'Amélioration des Plantes* 26: 107-113.
- Grasselly C, Crossa-Raynaud P, Olivier G y Gall H (1981) Transmission du caractère d'autocompatibilité chez l'amandier (*Amygdalus communis*). *Options Méditerranéennes. Serie Études* I:71-75.
- Grenier J, Potvin C, Trudel J, Asselin A (1999) Some thaumatin-like proteins hydrolyse polymeric β -1,3-glucans. *Plant Journal* 19:473-480.
- Griffiths AJF, Wessler SR, Lewontin RC y Carroll SB (2008) *Genética*. Novena edición. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U. ISBN: 978-84-481-6091-3.
- Grimplet J, Romieu C, Sauvage FX, Lambert P, Audergon JM, Terrier N (2003) Transcriptomics and proteomics tools towards ripening markers for assisted selection in apricot. *Acta Horticulturae* 663: 291-296.
- Gupta PK, Balyan HS, Sharma PC y Ramesh B (1996) Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. *Current Science* 70:45-54.
- Gupta SK, Rai AK, Kanwar AA y Sharma TR (2012) Comparative analysis of zinc finger proteins involved in plant disease resistance. *PLoS ONE* 7(8):e42578.
- Habu T y Tao R (2014) Transcriptome Analysis of Self- and Cross-pollinated Pistils of Japanese Apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 83:95-107.

- Haffani YZ, Gaude T, Cock J, Goring D (2004) Antisense suppression of thioredoxin h mRNA in *Brassica napus* cv. Westar pistils causes a low level constitutive pollen rejection response. *Plant Mol Biol* 55: 619 - 630.
- Hafizi A, Shiran B, Maleki B, Imani A, Banović B (2013) Identification of new S-RNase self-incompatibility alleles and characterization of natural mutations in Iranian almond cultivars. *Trees* 27: 497-510.
- Halász J, Fodor A, Hegedús A, Pedryc A (2008) Identification of a new self-incompatibility allele (S31) in a Hungarian almond cultivar and its reliable detection. *Science Horticulturae* 116:448-451.
- Halász J, Fodor A, Hegedús A, Pedryc A, (2010) S-genotyping of Eastern European almond cultivars: identification and characterization of new (S36-S39) self-incompatibility ribonuclease alleles. *Plant Breeding* 129: 227-232
- Hanada T, Fakuta K, Yamane H, Esumi T, Tao R, Gradziel T, Dandekar AM, Fernández i Martí A, Alonso JM y Socias i Company, R (2009) Cloning and Characterization of a Self-compatible Sf Haplotype in Almond [*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb. syn. *P. amygdalus* Batsch] to Resolve Previous Confusion in Its Sf -RNase Sequence. *HortScience* 55(3):609-613.
- Hancock CN, Kent L y McClure BA (2005) The 120kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *The Plant Journal* 43: 716-723.
- Haring V, Gray JE, McClure BA, Anderson MA, Clarke AE (1990) Self-incompatibility: A self-recognition system in plants. *Science* 250: 937-941.
- Hodgkin, T., Lyon, G.D., and Dickinson, H.G. (1988). Recognition in flowering plants: A comparison of the *Brassica* self-incompatibility system and plant pathogen interactions. *New Phytol.* 110, 557-569.
- Hua Z y Kao TH (2006) Identification and characterization of components of a putative *Petunia* S-locus F-Box-containing E3 ligase complex involved in S-RNase-based self-incompatibility. *The Plant Cell* 18: 2531-2553.
- Huang J, Zhao L, Yang Q y Xue Y (2006) AhSSK1, a novel SKP1-like protein that interacts with the S-locus F-box protein SLF. *Plant Journal* 46:780-793.
- Iaria D, Chiappetta A y Muzzalupo I (2016) De Novo Transcriptome Sequencing of *Olea europaea* L. to Identify Genes Involved in the Development of the Pollen Tube. *Scientific World Journal* 17:359.
- Igic B y Kohn JR (2001) Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:13167-13171.

- Ikedo K, Igit B, Ushijima K, Yamane H, Hauck NR, Nakano R, Sassa H, Iezonni AF, Kohn JR y Tao R (2004) Primary structural features of the S haplotype-specific F-box protein, SFB, in *Prunus*. *Sexual Plant Reproduction* 16: 235-243.
- Ioerger TR, Gohlke J, Xu B y Kao TH (1991) Primary structural features of the self-incompatibility protein in Solanaceae. *Sexual Plant Reproduction* 4: 81-87.
- Jiang YQ y Ma RC (2003) Generation and analysis of expressed sequence tags from almond (*Prunus dulcis* Mill.) pistils. *Sexual Plant Reproduction* 16:197-207.
- Jianrong Feng Æ Xuesen Chen Æ Yan Wu Æ Wen Liu Æ Qing Liang Æ Lijie Zhang. Detection and transcript expression of S-RNase gene associated with self-incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca* L.) *Mol Biol Rep* (2006) 33:215–221.
- Jiménez-Durán K, McClure B, García-Campusano F, Rodríguez-Sotres R, Cisneros J, Busot G y Cruz-García F (2013) NaStEP: a proteinase inhibitor essential to self-incompatibility and a positive regulator of HT-B stability in *Nicotiana glauca* pollen tubes. *Plant Physiology* 161:97 - 107.
- Juárez-Díaz JA, McClure BA, Vázquez-Santana S, Guevara-García A, León-Mejía P, Márquez-Guzmán-J y Cruz-García F (2006) A novel thioredoxin h is secreted in *Nicotiana glauca* and reduces S-RNase in vitro. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 3418-3424.
- Kahl G (2015) *The dictionary of genomics, transcriptomics and proteomics*. 5th edition. Weinheim, Germany. ISBN: 978-3-527-32852-9
- Kakui H, Kato M, Ushijima K, Kitaguchi M, Kato S, and Sassa H (2011) Sequence divergence and loss-of-function phenotypes of S locus F-box brother genes are consistent with non-self recognition by multiple pollen determinants in self-incompatibility of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Plant Journal* 68: 1028-1038.
- Kester DE y Gradziel TM (1996) Almonds. En: *Fruit breeding, Volume III: Nuts*. Editores: Janick J y Moore JN. Wiley: New York Pp: 1-97.
- Kester DE, Asay RN y Micke WC (1984) Solano, Sonora and Padre almonds. *HortScience* 19: 138-139.
- Kester DE, Gradziel TM y Grasselly C (1991) Almonds. En: *Genetic resources of temperate fruit and nut crops*. Editores: Moore JN y Ballington JR. Wageningen. Holanda. Pp: 701-758.
- Kester DE, Gradziel TM y Micke WC (1994) Identifying pollen incompatibility groups in California almond cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 119: 106-109.

- Kester DE, Micke W, Gradziel T y Weinbaum SA (1990) Almond cultivar research at the University of California. 8 Colloque du GREMPA. Nîmes.
- Kho YO y Bär J (1968) Observing pollen tubes by means of fluorescence. *Euphytica* 17:298–302.
- Knip M, de Pater S, Hooykaas PJ. The SLEEPER genes: a transposase-derived angiosperm-specific gene family. *BMC Plant Biology*. 2012;12:192.
- Kodad O, Alonso JM, Fernández i Marti A, Oliveira MM y Socías i Company R (2010) Molecular and physiological identification of new S-alleles associated with self-(in)compatibility in local Spanish almond cultivars. *Scientia Horticulturae* 123:308-311.
- Kodad O, Sánchez A, Saibo N, Oliveira M y Socías i Company R (2008) Identification and characterization of new S-alleles associated with self-incompatibility in almond. *Plant Breeding* 127: 632-638.
- Kodad O, Socías i Company R y Alonso JM (2015) Unilateral recognition of the Sf allele in almond. *Scientia Horticulturae* 185:29-33.
- Kodad O, Socías i Company R, Sánchez A y Oliveira MM (2009) The Expression of self-compatibility in almond may not only be due to the presence of the Sf allele. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 134:221-227.
- Kondo K, Yamamoto M, Itahashi R, Sato T, Egashira H, Hattori T, Kowiyama Y (2002) Insights into the evolution of self-compatibility in *Lycopersicon* from a study of stylar factors. *The Plant Journal* 30: 143-153.
- Konrad KR, Wudick MM y Feijo JA (2011) Calcium regulation of tip growth: new genes for old mechanisms. *Current Opinion in Plant Biology* 14:721–730.
- Kubo K, Entani T, Takara A, Wang N, Fields AM, Hua Z, Toyoda M, Kawashima S, Ando T, Isogai A, Kao T, Takayama S (2010) Collaborative Non-Self Recognition System in S-RNase-Based Self-Incompatibility. *Science* 330: 796-799.
- Łabaj PP, Leparć GG, Linggi BE, Markillie LM, Wiley HS y Kreil DP (2011) Characterization and improvement of RNA-Seq precision in quantitative transcript expression profiling. *Bioinformatics* 27:i383-i391.
- Ladizinsky G (1999) On the origin of almond. *Genetic Resources and Crop Evolution* 46, 143-147.
- Lai Z, Ma W, Han B, Liang L, Zhang Y, Hong G y Xue Y (2002) An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Molecular Biology* 50: 29-42.

- Langmead B y Salzberg SL (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9(4):357–359.
- Lawrence MJ, Afzal M, Kenrick J (1978) The genetical control of self-incompatibility in *Papaver rhoeas*. *Heredity* 40: 239-253.
- Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouzé P y Rombauts S (2002) PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research* 30(1):325-7.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N y Durbin R (2009) The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25:2078–2079.
- Lind JL, Bönig I, Clarke AE y Anderson MA (1996) A style-specific 120kDa glycoprotein enters pollen tubes of *Nicotiana glauca* in vivo. *Sexual Plant Reproduction* 9: 75-86.
- Linnaeus C (1753) *A system of vegetables*. London (Citado por Kester y col. 1990).
- Linskens HF y Esser K (1957) Über eine spezifische anfärbung der pollenschläuche im griffel und die zahl der kallosepfropfen nach selbstung und fremdung. *Naturwissenschaften* 44:16.
- Liu B, Morse D, Cappadocia M (2009) Compatible Pollinations in *Solanum chacoense* Decrease Both S-RNase and S-RNase mRNA. *PLoS ONE* 4(6): e5774.
- Liu W, Fan J, Li J, Song Y, Li Q, Zhang Y y Xue Y (2014) SCFSLF-mediated cytosolic degradation of S-RNase is required for cross-pollen compatibility in S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia hybrida*. *Frontiers in Genetics* 5:228. DOI: 10.3389/fgene.2014.00228.
- López M, Vargas FJ, Batlle I (2006) Self(in)compatibility almond genotypes: A review. *Euphytica* 150: 1-16.
- Losada JM y Herrero M (2014) Glycoprotein composition along the pistil of *Malus x domestica* and the modulation of pollen tube growth. *Bmc Plant Biology* 14:1. DOI: 10.1186/1471-2229-14-1.
- Luu DT, Qin XK, Morse D, Cappadocia M (2000) S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature* 407: 649-651.
- Ma RC y Oliveira MM (2001) Molecular cloning of the self-incompatibility genes S1 and S3 from almond (*Prunus dulcis* cv. Ferragnès). *Sexual Plant Reproduction* 14: 163-167.
- Marchese A, Bošković R, Caruso T, Raimondo A, Cutuli M y Tobutt KR (2007) A new self-compatibility haplotype in the sweet cherry 'Kronio', S5', attributable to a

- pollen-part mutation in the SFB gene. *Journal of Experimental Botany* 58: 4347-4356.
- Marshall E, Costa LM, Gutierrez-Marcos J (2011) Cysteine-Rich Peptides (CRPs) mediate diverse aspects of cell-cell communication in plant reproduction and development. *Journal of Experimental Botany* 62:1677-1686.
- Martin FW (1959) Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology* 34:125-128.
- Martínez-García PJ, Gómez EM, Casado-Vela J, Elortza F, Dicenta F, Ortega E (2015) Differential protein expression in compatible and incompatible pollen-pistil interactions in almond [*Prunus dulcis* (Miller) D.A. Webb] by 2D-DIGE and HPLC-MS/MS. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 90: 71-77.
- Martínez-García PJ, Mañas F, López P, Dicenta F y Ortega E (2011) Molecular and phenotypic characterization of the S-locus and determination of flowering time in new 'Marcona' and 'Desmayo Largueta'-type almond (*Prunus dulcis*) selections. *Euphytica* 177:67-78.
- Martínez-Gómez P, Arulsekhar S, Potter D y Gradziel TM (2003) An extended interspecific gene pool available to peach and almond breeding as characterized using simple sequence repeat (SSR) markers. *Euphytica* 131:313-322.
- Mayfield JA, Fiebig A, Johnstone SE, Preuss D (2001) Gene families from the *Arabidopsis thaliana* pollen coat proteome. *Science* 292:2482-2485.
- McClure BA y Franklin-Tong V (2006) Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanisms involved in 'self' pollen tube inhibition. *Planta* 224: 233-245.
- McClure BA, Cruz-García F, Beecher BS y Sulaman W (2000) Factors affecting inter- and intra-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Annals of Botany* 85:113-123.
- McClure BA, Gray JE, Anderson MA y Clarke AE (1990) Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA *Nature* 347: 757-760.
- McClure BA, Haring V, Ebert PR, Anderson MA, Simpson RJ, Sakiyama F y Clarke AE (1989) Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* 342: 955-957.
- McClure BA, Mou B, Canevascini S y Bernatzky R (1999) A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 96: 13548-13553.
- McCubbin AG, Kao TH (2000) Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16: 333-364.

- Miao HX, Ye ZX, Qin YH, Hu GB (2013) Identification of differentially expressed genes in 72 h styles from self-incompatible *Citrus reticulata*. *Scientia Horticulturae* 161: 278-285.
- Michard E, Alves F, Feijo' JA (2009) The role of ion fluxes in polarized cell growth and morphogenesis: the pollen tube as an experimental paradigm. *International Journal of Developmental Biology* 53:1609-1622.
- Minamikawa MF, Koyano R, Kikuchi S, Koba T, Sassa H (2014) Identification of SFBB-Containing Canonical and Noncanonical SCF Complexes in Pollen of Apple (*Malus domestica*). *PLoS ONE* 9: e97642.
- Mollet JC, Leroux C, Dardelle F y Lehner A (2013) Cell wall composition, biosynthesis and remodeling during pollen tube growth. *Plants* 2:107-147.
- 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.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G y Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51:263-273.
- Muncharaz M (2004) El almendro: Manual técnico. Edit. Mundi Prensa. Pp: 200.
- Murase K, Shiba H, Iwano M, Che FS, Watanabe M, Isogai A, Takayama S (2004) A membrane-anchored protein kinase involved in Brassica self-incompatibility signaling. *Science* 303:1516-1519.
- Nasrallah JB, Kao TH, Goldberg ML, Nasrallah ME (1985) A cDNA clone encoding an S-locus-specific glycoprotein from Brassica-oleracea. *Nature* 318: 263-267.
- O'Brien M, Kapfer C, Major G, Laurin M, Bertrand C, Kondo K, Kowyama Y, Matton DP (2002) Molecular analysis of the stylar-expressed *Solanum chacoense* small asparagine-rich protein family related to the HT modifier of gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana*. *Plant Journal* 32: 985-996.
- Ochman H, Gerber AS y Hartl DL (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120(3):621-623.
- Ortega E y Dicenta F (2003) Inheritance of self-compatibility in almond: breeding strategies to assure self-compatibility in the progeny. *Theoretical and Applied Genetics* 106:904-911.
- Ortega E y Dicenta F (2004) Suitability of four different methods to identify self-compatible seedlings in an almond breeding programme. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79:747-753.

- Ortega E y Dicenta F (2006) Pollen tube growth and fruit set in homozygous versus heterozygous self-compatible almonds following self-pollination. *Scientia Horticulturae* 109:288-292.
- Ortega E, Bošković RI, Sargent DJ y Tobutt KR (2006) Analysis of S-RNase alleles of almond (*Prunus dulcis*): characterization of new sequences, resolution of synonyms and evidence of intragenic recombination. *Molecular Genetics and Genomics* 276: 413-426.
- Ortega E, Egea J, Cánovas J y Dicenta F (2002) Pollen tube dynamics following half- and fully-compatible pollinations in self-compatible almond cultivars. *Sexual Plant Reproduction* 15:47-51.
- Ortega E, Martínez-García PJ y Dicenta F (2012) The study of self-(in)compatibility in CEBAS-CSIC almond Breeding programme. *Acta Horticulturae* 967:171-180.
- Ortega E, Martínez-Gómez PJ, Dicenta F y Egea J (2010) Disruption of endosperm development: an inbreeding effect in almond (*Prunus dulcis*). *Sexual Plant Reproduction* 23:135-140.
- Ortega E, Sutherland BG, Dicenta F, Bošković R y Tobutt KR (2005) Determination of incompatibility genotypes in almond using first and second intron consensus primers: detection of new S alleles and correction of reported S genotypes. *Plant Breeding* 124:188-196.
- Peng J, Gygi SP (2001) Proteomics: the move to mixtures. *Journal of Mass Spectrometry* 36:1083-1091.
- Perikles S (2003) Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics* 19(11):1439-1440.
- Picotti P y Aebersold R (2012) Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions. *Nature Methods* 9(6):555-566.
- Picotti P, Rinner O, Stallmach R, Dautel F, Farrah T, Domon B, Wenschuc H y Aebersold R (2010) High-throughput generation of selected reaction-monitoring assays for proteins and proteomes. *Nature Methods* 7(1):43-46.
- Pierce A, Unwin RD, Evans CA, Griffiths S, Carney L, Zhang L, Jaworska E, Lee CF, Blinco D, Okoniewski MJ, Miller CJ, Bitton DA, Sponcer E y Whetton AD (2008) Eight-channel iTRAQ enables comparison of the activity of six leukemogenic tyrosine kinases. *Molecular & Cellular Proteomics* 7:853-863.
- Puerta AR, Ushijima K, Koba T, Sassa H (2009) Identification and functional analysis of pistil self-incompatibility factor HT-B of petunia. *Journal of Experimental Botany* 60: 1309-1318.

- Punt W (1964) Names found to be incorrect for which no legitimate alternative name is available. *Regne Vegetabile* 36: 9.
- Qiao H, Wang H, Zhao L, Zhou J, Huang J, Zhang Y y Xue Y (2004) The F-Box protein AhSLF-S2 physically interacts with S-RNases that may be inhibited by the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation during compatible pollination in *Antirrhinum*. *The Plant Cell* 16: 582-595.
- Rasori A, Ruperti B, Bonghi C, Tonutti P y Ramina A (2002) Characterization of two putative ethylene receptor genes expressed during peach fruit development and abscission. *Journal of Experimental Botany* 53:2333–2339.
- Reina A, Giorgio V y Godini A (1986) Cultivar autocompatibili nella popolazione pugliese di mandorlo. *Frutticoltura* 12: 61-63.
- Remy P (1953) Contribution a l'étude du pollen des arbres fruitiers a noyau, genre *Prunus*. *Annales de l'Amélioration des Plantes* 3:351–388.
- Rice, P., Longden, I. and Bleasby, A. (2000) EMBOSS, the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.* 16, 276–277.
- Ride JP, Davies EM, Franklin FC H, Marshall DF (1999) Analysis of Arabidopsis genome sequence reveals a large new gene family in plants. *Plant Molecular Biology* 39: 927-932.
- Rosengarten F Jr (1984) *The book of Edible Nuts*. Walker and Company, New York.
- Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, Purkayastha S, Juhasz P, Martin S, Bartlett-Jones M, He F, Jacobson A y Pappin DJ (2004) Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular & Cellular Proteomics* 3:1154–1169.
- Rubio M, Ballester AR, Olivares PM, Castro de Moura M, Dicenta F y Martínez-Gómez P (2015) Gene expression analysis of Plum pox virus (sharka) susceptibility/resistance in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *PLoS ONE* 10(12):e0144670.
- Rubio M, Rodríguez-Moreno L, Ballester AR, Castro M, Bonghi C, Martínez-Gómez P (2015) Analysis of gene expression changes in peach leaves in response to Plum pox virus infection using RNA-Seq. *Molecular Plant Pathology* 16(2): 164-176.
- Rudd JJ y Franklin-Tong VE (2003) Signals and targets of the self-incompatibility response in pollen of *Papaver rhoeas*. *Journal of Experimental Botany* 54:141-148.
- Samuel MA, Tang WQ, Jamshed M, Northey J, Patel D, Smith D, Siu KWM, Muench DG, Wang ZY y Goring DR (2011) Proteomic analysis of *Brassica stigmatica*

- proteins following the self-incompatibility reaction reveals a role for microtubule dynamics during pollen responses. *Molecular and Cellular Proteomics* 10. DOI: M111.011338.
- Sanabria N, Goring D, Nuernberger T y Dubery I (2008) Self/nonself perception and recognition mechanisms in plants: a comparison of self-incompatibility and innate immunity. *New Phytologist* 178:503-513.
- Sánchez-Pérez R, Ballester J, Dicenta F, Arús P y Martínez-Gómez, P. (2006) Comparison of SSR polymorphism using automated capillary sequencers, and polyacrylamide and agarose gel electrophoresis: Implications for the assessment of genetic diversity and relatedness in almond. *Scientia Horticulturae* 108:310-316.
- 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
- Sanzol J, Sutherland BG y Robbins TP (2006) Identification and characterization of genomic DNA sequences of the S-ribonuclease gene associated with self-incompatibility alleles S1 to S5 in European pear. *Plant Breeding* 125: 513-518.
- Sassa H y Hirano H (1998) Style-specific and developmentally regulated accumulation of a glycosylated thaumatin/PR5-like protein in Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.) *Planta* 205:514-521.
- Sassa H y Hirano H (2006) Identification of a new class of pistil-specific proteins of *Petunia inflata* that is structurally similar to, but functionally distinct from, the self-incompatibility factor HT. *Molecular Genetics and Genomics* 275:97-104.
- Sassa H, Kakui H, Miyamoto M, Suzuki Y, Hanada T, Ushijima K, Kusaba M, Hirano H, Koba T (2007) S locus F-box brothers: Multiple and pollen-specific F-box genes with S haplotype-specific polymorphisms in apple and Japanese pear. *Genetics* 175: 869-1881.
- Sassa H, Nishio T, Kowayama Y, Hirano H, Koba T y Ikehashi H (1996) Self-incompatibility (S) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily. *Molecular and General Genetics* 250: 547-557.
- Schopfer CR, Nasrallah ME and Nasrallah JB (1999) The male determinant of selfincompatibility in Brassica. *Science* 266: 1697-1700.
- Schueler S, Tusch A, Schuster M y Ziegenhagen B (2003) Characterization of microsatellites in wild and sweet cherry (*Prunus avium* L.) - markers for individual identification and reproductive processes. *Genome* 46:95-102.

- SECH (1999) Diccionario de Ciencias Hortícolas. L. Rallo, R. Fernández-Escobar (Eds.). Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, 605 pp. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Sedgley M y Collins G (2002) Almond improvement in Australia. *Fruits* 57: 129-134.
- Shahmuradov IA, Gammerman AJ, Hancock JM, Bramley PM y Solovyev VV (2003) PlantProm: a database of plant promoter sequences. *Nucleic Acids Research* 31:114-117.
- Sheoran IS, Ross ARS, Olson DJH y Sawhney VK (2007) Proteomic analysis of tomato (*Lycopersicon esculentum*) pollen. *Journal of Experimental Botany* 58:3525-3535.
- Sijacic P, Wang X, Skirpan AL, Wang Y, Dowd PE, McCubbin AG, Huang S y Kao TH (2004) Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature* 429: 302-305.
- Socias i Company R (1974) Effect of temperature and genotype on pollen tube growth of some self-compatible almond selections derived from peach (*Prunus persica* L.) and almond (*Prunus amygdalus* Batsch.) hybridisation. Thesis master of science, Universidad de California, Davis.
- Socias i Company R (1984) A genetic approach to the transmission of compatibility in almond. *Options Méditerranéennes, Serie Études* 2: 123-128.
- Socias i Company R y Felipe AJ (1992) Self-compatibility and autogamy in 'Guara' almond. *Journal of Horticultural Science* 67: 313-317.
- Socias i Company R y Felipe AJ (1999) 'Blanquerna', 'Cambra' y 'Felisia'. Tres nuevos cultivares autógamos de almendro. *Información Técnica Económica Agraria* 95: 111-117.
- Socias i Company R y Felipe AJ (2006) "Belona" and "Soleta", two new autogamous almonds. *Nucis* 13: 12-15.
- Socias i Company R, Kodad O, Alonso JM y Felipe AJ (2008) 'Mardía' Almond. *HortScience* 43: 2240-2242.
- Sonneveld T, Robbins TP, Bošković R y Tobutt KR (2001) Cloning of six cherry self-incompatibility alleles and development of allele-specific PCR detection. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 1046-1055.
- Sonneveld T, Tobutt KR y Robbins TP (2003) Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers. *Theoretical and Applied Genetics* 107:1059-1070.
- Sonneveld T, Tobutt KR, Vaughan SP y Robbins TP (2004) Loss of pollen-S function in two self-compatible selections of *Prunus avium* is associated with deletion/mutation of an S haplotype-specific F-Box gene. *The Plant Cell* 17:37-51.

- Sonneveld T, Tobutt KR, Vaughan SP, Robbins TP (2005) Loss of Pollen-S Function in Two Self-Compatible Selections of *Prunus avium* Is Associated with Deletion/Mutation of an S Haplotype-Specific F-Box Gene. *The Plant Cell Online* 17: 37-51.
- Stein JC, Howlett B, Boyes DC, Nasrallah ME, Nasrallah JB (1991) Molecular-cloning of a putative receptor protein-kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica-oleracea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 8816-8820.
- Sutherland BG, Tobutt KR y Robbins TP (2004) Primers amplifying a range of *Prunus* S-alleles. *Plant Breeding* 123: 582-584.
- Takasaki T, Hatakeyama K, Suzuki G, Watanabe M, Isogai A e Hinata K (2000) The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica stigma*. *Nature* 403:913-916.
- Tamura M, Ushijima K, Sassa H, Hirano H, Tao R, Gradziel TM y Dandekar AM (2000) Identification of self-incompatibility genotypes of almond by allele-specific PCR analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 344-349.
- Tao R y Iezzoni AF (2010) The S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system in *Prunus* exhibits distinct genetic and molecular features. *Scientia Horticulturae* 124:423-433.
- Tao R, Yamane H, Sassa H, Mori H, Gradziel TM, Dandekar AM y Sugiura A (1997) Identification of stylar RNases associated with gametophytic self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*). *Plant Cell Physiology* 38: 304-311.
- Tao R, Yamane H, Sugiura A, Murayama H, Sassa H y Mori H (1999) Molecular typing of S-alleles through identification, characterization and cDNA cloning for S-RNases in sweet cherry. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124: 224-233.
- Thomas SG, Franklin-Tong VE (2004) Self-incompatibility triggers programmed cell death in *Papaver* pollen. *Nature* 429: 305-309.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F y Higgins DG (1997) The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25:4876-4882.
- Thompson RD, Kirch HH (1992) The S locus of flowering plants: when self-rejection is self-interest. *Trends in Genetics* 8: 381-387.
- Tian L, Miao WW, Liu JS, Fang ZY, Liu YM, Yang LM, Zhang YY, Zhuang M (2013) Identification of S haplotypes in cabbage inbred lines (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) *Scientia Horticulturae* 164: 400-408.

- Timperio AM, Egidi MG y Zolla L (2008) Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). *Journal of Proteomics* 71:391-411.
- Tong Z, Gao Z, Wang F, Zhou J y Zhang Z (2009) Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. *BMC Molecular Biology* 10:71.
- Tufts WP y Philp GL (1922) Almond pollination. *California Agricultural Experimental Station Bulletin* 346: 35.
- Uchida S, Sassa H, Takenaka S, Sakakibara Y, Suiko M, Kunitake H (2012) Identification of self-incompatibility related proteins in the pistil of Japanese pear [*Pyrus pyrifolia* (Burm. F.)] by proteome analysis. *Plant Omics Journal* 5:320–325.
- Undergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M y Rozen, S.G. (2012) Primer3–new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. 40(15):e115.
- Updegraff EP, Zhao F, Preuss D (2009) The extracellular lipase EXL4 is required for efficient hydration of *Arabidopsis* pollen. *Sexual Plant Reproduction* 22:197–204.
- Ushijima K, Sassa H, Dandekar AM, Gradziel TM, Tao R y Hirano H (2003) Structural and transcriptional analysis of self-incompatibility (S) locus of almond (*Prunus dulcis*): identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism. *Plant Cell* 15: 771-781.
- Ushijima K, Sassa H, Kusaba M, Tao R, Tamura M, Gradziel TM, Dandekar AM e Hirano H (2001) Characterization of the S-locus region of almond (*Prunus dulcis*): analysis of somaclonal mutant and a cosmid contig for an S haplotype. *Genetics* 158:379-386.
- Ushijima K, Sassa H, Tao R, Yamane H, Dandekar AM, Gradziel TM y Hirano H (1998) Cloning and characterization of cDNAs encoding S-RNases from almond (*Prunus dulcis*): primary structural features and sequence diversity of the S-RNases in Rosaceae. *Molecular Gene and Genetics* 260: 261-268.
- Ushijima K, Sassa H, Tao R, Yamane H, Dandekar AM, Gradziel TM y Hirano H (1998) Cloning and characterization of cDNAs encoding S-RNases from almond (*Prunus dulcis*): primary structural features and sequence diversity of the S-RNases in Rosaceae. *Molecular Gene and Genetics* 260: 261-268.
- Ushijima K, Yamane H, Watari A, Kakehi E, Ikeda K, Hauck NR, Iezzoni AF y Tao R (2004) The S haplotype-specific F-box protein gene, SFB, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *Prunus mume*. *The Plant Journal* 39: 573-586.

- Valizadeh B, Ershadi A (2009) Identification of self-incompatibility alleles in Iranian almond cultivars by PCR using consensus and allele-specific primers. *J. Horticult. Sci. Biotechnol.*, 84: 285-290.
- Vargas FJ y Romero MA (1992) Ensayo de producción de selecciones de almendro obtenidas por el IRTA en Tarragona (España) y de otras variedades de referencia. Primeros resultados. *Communications 8 Colloque du GREMPA. Nîmes, 26-27 Juin 1990. Rapport EUR 14081. Pp: 115-119.*
- Vargas FJ, Clavé J, Romero MA, Batlle I y Rovira M (1997) Autogamy studies on almond progenies. *Acta Horticulturae 470: 74-81.*
- Vargas FJ, Romero MA, Clavé J, Vergés J, Santos J y Batlle I (2006) Four New Almond Varieties Released by IRTA: Vayro, Marinada, Constantí and Tarraco. *Nucis 13: 9-12.*
- Vargas FJ, Romero MA, Rovira M y Girona J (1984) Amélioration de l'amandier par croisements de variétés. Résultats préliminaires à Tarragone (Espagne). *Options Méditerranéennes. Serie Études 84/II, 101-122.*
- Vaughan SP, Russell K, Sargent DJ y Tobutt KR (2006) Isolation of S-locus F-box alleles in *Prunus avium* and their application in a novel method to determine self-incompatibility genotype. *Theoretical and Applied Genetics 112: 856-866.*
- Vavilov NI (1930) Wild progenitors of the fruit trees of Turkistan and Caucasus and the problem of the origin of fruit trees. IX International Horticultural Congress report and proceedings. London August 7-15, 1930. Pp: 271-286.
- Vilanova S, Badenes ML, Burgos L, Martínez-Calvo J, Llácer G y Romero C (2006) Self-compatibility of two apricot selections is associated with two pollen-part mutations of different nature. *Plant Physiology 142: 629-641.*
- Wang L, Zhao S, Gu C, Zhou Y, Zhou H, Ma J, Cheng J, Han Y (2013) Deep RNA-Seq uncovers the peach transcriptome landscape. *Plant Molecular Biology 83: 365-377.*
- Wang, F., Zhang, F. J., Chen, F. D., Fang, W. M., and Teng, N. J. (2014) Identification of *Chrysanthemum* (*Chrysanthemum morifolium*) Self-Incompatibility. *Scientific World Journal.*
- Watanabe, M. et al. (2000) Genomic organization of the SLG/SRK region of the S locus in Brassica species. *Ann. Bot. 85 (Suppl. A): 155-160*
- Watari, A., Hanada, T., Yamane, H., Esumi, T., Tao, R., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., Beppu, K., and Kataoka, I. (2007). A low transcriptional level of S-e-RNase in the S-e-haplotype confers self-compatibility in Japanese plum. *Journal of the American Society for Horticultural Science 132, 396-406.*

- Webb DA (1967) *Prunus dulcis* (Miller) DA Webb, comb. nov. *Repertorium Specierum novarum Regni vegetabilis* 74: 24.
- 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.
- Wheeler MJ, de Graaf BHJ, Hadjiosif N, Perry RM, Poulter NS, Osman K, Vatovec S, Harper A, Franklin FCH, Franklin-Tong VE (2009) Identification of the pollen self-incompatibility determinant in *Papaver rhoeas*. *Nature* 459: 992-995.
- Whitehouse HLK (1950) Multiple-allelomorph incompatibility of pollen and style in the evolution of the angiosperms. *Annals of Botany* 14: 199-216.
- Wilsie C (1966) *Cultivos: aclimatación y distribución*. Editorial Acribia. Zaragoza.
- Wilson CM (1971) III. Polyacrylamide gel electrophoresis of corn ribonuclease isoenzymes. *Plant Physiology* 48:64-68.
- Wirthensohn MG, Sedgley M (2002) Almond breeding in Australia.
- Wu WW, Wang G, Baek SJ y Shen RF (2006) Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D gel- or LC-MALDI TOF/TOF. *Journal of Proteome Research* 5:651-8.
- Wünsch A y Hormaza JI (2002) Molecular characterisation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach (*Prunus persica* L.) SSR sequences. *Heredity* 89:56-63.
- Wünsch A y Hormaza JI (2004) Genetic and molecular analysis in Cristobalina sweet cherry, a spontaneous self-compatible mutant. *Sexual Plant Reproduction* 17: 203-210.
- Yamamoto T, Mochida K, Imai T, Shi YZ, Ogiwara I y 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.
- Yamane H, Ikeda K, Ushijima K, Sassa H, Tao R (2003) A pollen-expressed gene for a novel protein with an F-box motif that is very tightly linked to a gene for S-RNase in two species of cherry, *Prunus cerasus* and *Prunus avium*. *Plant Cell Physiology* 44: 764-769.
- Yamashita K, Gaude T, Dumas C, Grasselly C y Crossa-Raynaud P (1987) Protein analysis on pistils and pollens of almonds with special reference to Sf, a self-fertile gene. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 56: 300-305.
- Zeinalabedini M, Khayam-Nekoui M, Grigorian V, Gradziel TM, Martinez-Gomez P (2010) The origin and dissemination of the cultivated almond as determined by

- nuclear and chloroplast SSR marker analysis. *Scientia Horticulturae* 125: 593-601.
- Zhang C-C, Wang L-Y, Wei K, Wu L-Y, Li H-L, Zhang F, Hao Cheng H y Ni D-J (2016) Transcriptome analysis reveals self-incompatibility in the tea plant (*Camellia sinensis*) might be under gametophytic control. *BMC Genomics*. 17:359.
- Zhang S, Ding F, He X, Luo C, Huang G, y Hu Y (2015) Characterization of the 'Xiangshui' lemon transcriptome by de novo assembly to discover genes associated with self-incompatibility. *Molecular Genetics and Genomics* 290:365-375.
- Zhang YJ, Zhao ZH y Xue YB (2009) Roles of Proteolysis in Plant Self-Incompatibility. *Annual Review of Plant Biology* 60:21-42.
- Zhao L, Huang J, Zhao Z, Li Q, Sims TL y Xue Y (2010) The Skp1-like protein SSK1 is required for cross-pollen compatibility in S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Journal* 62:52-63.
- Zhao P, Zhang L y Zhao L (2015) Dissection of the style's response to pollination using transcriptome profiling in self-compatible (*Solanum pimpinellifolium*) and self-incompatible (*Solanum chilense*) tomato species. *BMC Plant Biology*. 15(1):119.
- 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.
- Zhou Q, Jia J, Huang X, Yan X, Cheng L, Chen S, Li X y Liu G (2014) The large-scale investigation of gene expression in *Leymus chinensis* stigmas provides a valuable resource for understanding the mechanisms of poaceae selfincompatibility. *BMC Genomics* 15:399.
- Zou J, Song L, Zhang W, Wang Yi, Ruan S y Wu W-H (2009) Comparative Proteomic Analysis of *Arabidopsis* mature pollen and germinated pollen. *Journal of integrative Palnt Biology* 51(5):438-455.
- Zuccherelli S, Tassinari P, Broothaerts W, Tartarini S, Dondini L y Sansavini S (2002) S-allele characterization in self-incompatible pear (*Pyrus communis* L.). *Sexual Plant Reproduction* 15: 153-158.
- Zuriaga E, Muñoz-Sanz JV, Molina L, Gisbert AD, Badenes ML, Romero C (2013) An S-Locus Independent Pollen Factor Confers Self-Compatibility in 'Katy' Apricot. *PLoS ONE* 8: e53947.



10. Anexos

ANEXO I. Cebadores utilizados para la amplificación mediante qPCR de los fragmentos correspondientes a cada gen.

Transcrito	Cebador-F (5'-3')	Cebador-R (5'-3')
18S	18S-F GTTACTTTTAGGACTCCGCC	18S-R TTCTTTAAAGTTTCAGCCTTG
Actina	Act-F GTTATTCCTTCATCGGGCTCTTCG	Act-R CTTCAACCAATCCAGTTCATGTC
RPII	RP II-F TGAAGCATAACACCTATGATGAAG	RP II-R CTTTGACAGCACCCAGTAGATTCC
ARNasa-Sf	SfRNasa F1 TGGTTTCGCTTCTCTTCTGTGT	SfRNasa F1 CGGTTGTGGAAAGGTTTGCC
SFBf	SfSFB F2 CTCTGCAATTCGGGTTCCAC	SfSFB R2 TCTTCCAAGAGTCTGTTCTGAGA
ORF	TRANS RI-2F TTGGTCAAGGTGTAGCGAC	TRANS RI-2R TGAACACTTCCAACAGGTCCA
ppa022407m	ppa022407-F1 GCGGATGTTCTCGTTCAATTGT	ppa022407-R1 AGAATTGTGTAGTTCCTCCCAAATGT
ppa022379m	ppa022379-F1 CCGAAATGACGATCTTTGGCG	ppa022379-R1 GCCACACAAGCTGCAGTAG
ppa001593m	ppa001593-F1 GCCTGGCCAGCTTGTATCT	ppa001593-R1 AGCCACAGAAGCAGCTCAAT
ppa002591m	ppa002591-F2 TGGCTTGACAGGAACCAGTT	ppa002591-R2 ACATCTCACCCAGCACCTTG
ppa026320m	ppa026320-F1 GTCCTTATTACCAATGTCCGGAACTT	ppa026320-R1 GCTGCCACGAAAGGTACAAC
ppa025622m	ppa025622-F2 TCCACAAGCAAGGGACAAGG	ppa025622-R2 TGACCGCTTTTCTAGTATCAGCT
ppa015083m	ppa015083-F2 GTGCATCATGATAACCCGGGC	ppa015083-R2 TGCCAAACCACACGAAAGATGT
ppa027218m	ppa027218-F2 GTCAAGCGCTGTCTCTGCTT	ppa027218-R2 TCACTGGCTTAAAAATGATCACAGA
ppa020322m	ppa020322-F2 GCAACTCAACCCTTTCCCCAGC	ppa020322-R2 CCAACAACACGAGGACCCACA
ppa013072m	ppa013072-F2 GTGCTCGAATAACCTTGCTGC	ppa013072-R2 AGCTCTTCGTCGTTCCCTCAC
ppa023734m	ppa023734-F3 CTGGCCTTGTGACTTTGAGTT	ppa023734-R3 GCATGAACCCAATGATAACACCT
ppa002035m	ppa002035-F4 CGTGGCGTAACCCCTACACT	ppa002035-R4 GGGACAGAGCTGCAAGGAAA
ppa024456m	ppa024456-F1 TGCAATCGATCAACACTTAAAGGC	ppa024456-R1 TGGACTAGTAGCACCGCCTGA
ppa008646m	ppa008646-F2 AGCAGTATTATGGCCGTGGT	ppa008646-R2 AGGTCTGGGTTGTTCAACAGG
ppa024457m	ppa024457-F2 GGTGTCCCAAACCAAGACCT	ppa024457-R2 TTGAATCTCACCGCTTTGCCG
ppa012260m	ppa012260-F2 TGGGTAICGGTTTCATCACATTAGT	ppa012260-R2 GCCGCTTCATTCATCTGACG

ANEXO II. Expresión diferencial observada para cada gen en los análisis cuantitativos de RNAseq.

	baseMeanA^a	baseMeanB^b	foldChange^c	log2FoldChange	pval
ppa018459m					
A-I	0	961,76761	Inf	Inf	0,00198591
A-AxA	0	0	0	0	NA
I-IxA	961,76761	65,8799386	0,06849881	-3,86777723	0,29843441
AxA-IxA	0	65,8799386	Inf	Inf	0,09851838
ppa016317m					
A-I	62,4356777	0	0	-Inf	0,25712049
A-AxA	62,4356777	72,1408455	1,15544266	0,20844567	0,92384211
I-IxA	0	23,5285495	Inf	Inf	0,46610088
AxA-IxA	72,1408455	23,5285495	0,3261474	-1,61640395	0,57282841
ppa020322m					
A-I	2,77491901	0	0	-Inf	0,97960117
A-AxA	2,77491901	61,8350104	22,283537	4,47790634	0,17096606
I-IxA	0	183,522686	Inf	Inf	0,10169847
AxA-IxA	61,8350104	183,522686	2,96794138	1,5694626	0,39926918
ppa001593m					
A-I	816,519919	25,3838959	0,03108791	-5,00750267	0,08078903
A-AxA	816,519919	1709,05098	2,0930916	1,06563545	0,38004319
I-IxA	25,3838959	4,7057099	0,18538171	-2,43142922	0,68614042
AxA-IxA	1709,05098	4,7057099	0,00275341	-8,50456734	5,15E-07
ppa002591m					
A-I	235,868116	48727,2085	206,58667	7,69060336	0,00802646
A-AxA	235,868116	1618,87493	6,86347504	2,77893921	0,0325711
I-IxA	48727,2085	5725,67252	0,11750463	-3,08921051	0,38377039
AxA-IxA	1618,87493	5725,67252	3,53682204	1,82245363	0,10653513
ppa013072m					
A-I	0	2999,53036	Inf	Inf	0,00039865
A-AxA	0	3,43527836	Inf	Inf	0,90649835
I-IxA	2999,53036	2941,06869	0,98050972	-0,02839616	0,99317728
AxA-IxA	3,43527836	2941,06869	856,136936	9,74169776	8,82E-09
ppa015083m					
A-I	274,023252	0	0	-Inf	0,02884529
A-AxA	274,023252	261,939975	0,95590419	-0,06506207	0,96559459
I-IxA	0	23,5285495	Inf	Inf	0,46610088
AxA-IxA	261,939975	23,5285495	0,0898242	-3,47675196	0,06714937
ppa024456m					
A-I	2077,02688	2,82043287	0,00135792	-9,52438757	0,00409549
A-AxA	2077,02688	2407,27131	1,15899863	0,21287886	0,85647853
I-IxA	2,82043287	0	0	-Inf	0,94264031
AxA-IxA	2407,27131	0	0	-Inf	1,63E-09

	baseMeanA^a	baseMeanB^b	foldChange^c	log2FoldChange	pval
ppa026320m					
A-I	0	14,1021644	Inf	Inf	0,68582456
A-AxA	0	103,91717	Inf	Inf	0,01022682
I-IxA	14,1021644	22290,9478	1580,67565	10,6263256	0,02196965
AxA-IxA	103,91717	22290,9478	214,506878	7,7448801	5,31E-08
ppa027218m					
A-I	217,831142	8,46129862	0,03884338	-4,68618731	0,17456083
A-AxA	217,831142	620,926563	2,85049491	1,51121243	0,25848215
I-IxA	8,46129862	0	0	-Inf	0,74092434
AxA-IxA	620,926563	0	0	-Inf	6,86E-06
ppa008646m					
A-I	134,583572	338,451945	2,51480875	1,33044869	0,61909655
A-AxA	134,583572	13899,9951	103,281514	6,69043824	4,80E-06
I-IxA	338,451945	166670,362	492,44912	8,94383086	0,04060379
AxA-IxA	13899,9951	166670,362	11,9906778	3,58384131	0,00226247
ppa022407m					
A-I	0	25,3838959	Inf	Inf	0,48778751
A-AxA	0	203,540243	Inf	Inf	0,00056349
I-IxA	25,3838959	151,759144	5,97855999	2,57979804	0,5104346
AxA-IxA	203,540243	151,759144	0,74559774	-0,42353061	0,79756567
ppa023734m					
A-I	1,3874595	361,015408	260,198879	8,02347094	0,02617856
A-AxA	1,3874595	1,71763918	1,23797428	0,30798134	1
I-IxA	361,015408	18,8228396	0,0521386	-4,26150422	0,27623875
AxA-IxA	1,71763918	18,8228396	10,9585528	3,45398538	0,68825169
ppa002035m					
A-I	0	2,82043287	Inf	Inf	0,9615763
A-AxA	0	24,0469485	Inf	Inf	0,31739839
I-IxA	2,82043287	263,519754	93,4323794	6,5458507	0,14765803
AxA-IxA	24,0469485	263,519754	10,9585528	3,45398538	0,06660962
ppa022379m					
A-I	0	16,9225972	Inf	Inf	0,62852525
A-AxA	0	85,8819589	Inf	Inf	0,01990097
I-IxA	16,9225972	59,9978012	3,54542511	1,82595862	0,67848873
AxA-IxA	85,8819589	59,9978012	0,69860774	-0,51744547	0,82559176
ppa025622m					
A-I	0	59,2290904	Inf	Inf	0,20751843
A-AxA	0	0	0	0	NA
I-IxA	59,2290904	91,761343	1,54926139	0,63158058	0,87243161
AxA-IxA	0	91,761343	Inf	Inf	0,04182441
ppa014212m					
A-I	106389,007	350877,362	3,2980603	1,72161778	0,46690273
A-AxA	106389,007	131229,351	1,233486	0,30274134	0,7914067
I-IxA	350877,362	224915,287	0,64100826	-0,64158515	0,84808324
AxA-IxA	131229,351	224915,287	1,71390992	0,77729129	0,46868602

	baseMeanA^a	baseMeanB^b	foldChange^c	log2FoldChange	pval
ppa024457m					
A-I	172423,755	12691,9479	0,07360904	-3,76397314	0,13605295
A-AxA	172423,755	386689,532	2,2426697	1,16521716	0,31470696
I-IxA	12691,9479	582882,168	45,9253513	5,52121885	0,15369689
AxA-IxA	386689,532	582882,168	1,50736475	0,59202856	0,57977467
ppb012260m					
A-I	53627,391	14058,4477	0,26215051	-1,93153277	0,42883136
A-AxA	53627,391	55794,9323	1,04041855	0,05716402	0,95987996
I-IxA	14058,4477	58594,3232	4,16790848	2,0593236	0,5496561
AxA-IxA	55794,9323	58594,3232	1,05017285	0,07062681	0,9462992

Anexo III. Proteínas expresadas diferencialmente en pistilos de las selecciones A2-198 (auto-compatible, AC) e ITAP-1 (auto-incompatible, AI). Para cada número de accesión, correspondiente a una proteína homóloga en la base de datos UniProtKB/SwissProt, se indican la descripción de la proteína, su función, el gen al que se asocia de acuerdo con la base de datos de Rosaceas, Genome Database for Rosaceae (GDR gen) y su localización en el genoma del melocotonero (S, scaffold). Se indican además varios parámetros: Puntuación del análisis (P) y porcentaje de cobertura (C) para el análisis BLAST, número de péptidos obtenidos en el análisis iTRAQ (N), ratio de abundancia entre las selecciones y la proporción de falsos positivos esperado (FDR). Para la selección A2-198, las proteínas reprimidas (ratio AI/AC > 1) y sobre-expresadas (ratio AI/AC < 1) aparecen separadas.

Accesión	Descripción de la proteína	S	C (%)	N	p-Valor	Ratio (AI/AC)	FDR ^c	Función	GDR gen	S
Reprimidas en A2-198										
M5W1Q5	Proteína patogénica PR-4	177	36.07	3	0	6,67	0,00E+00	Patogénesis	ppa012991m	6
M5VQU4	Glucan endo-1,3-beta-glucosidasa	147	15.53	3	1.66E-06	2,15	2,61E-04	Hidrolasa	ppa010568m	7
M5W1I4	Proteína de fisión mitocondrial 1	96	28.20	2	2.31E-06	2.13	3,11E-04	Fisión mitocondrial	ppa012431m	4
M5Y240	Poligalacturonasa	194	11.33	4	6.10E-06	2.07	7,21E-04	Hidrolasa	ppa1027214m	1
M5XB01	Proteína no caracterizada	69	6.90	2	8.73E-06	2.04	9,17E-04	-	ppa007564m	1
M5XD05	ARN helicasa RH2a	108	6.40	2	4.41E-05	1.93	3,21E-03	Helicasa / Hidrolasa	ppa006619m	1
M5XNQ1	Ribulosa bifsosfato carboxilasa de cadena corta	335	46.33	7	6.61E-05	1.89	4,79E-03	Fijación del CO ₂	ppa012174m	1
M5Y9J3	Proteína de unión a ARN rica en glicina	194	42.20	2	1.47E-04	1.84	7,70E-03	Unión de nucleótidos	ppa013208m	1
M5WDV5	Proteína no caracterizada	125	4.10	2	3.03E-04	1.79	1,43E-02	-	ppa003342m	5
M5XMY7	Glutatión transferasa-S 30	125	12.10	2	4.55E-04	1.76	1,79E-02	Actividad transferasa	ppa010869m	1
Sobre-expresadas A2-198										
M5WT96	Taumatina	84	12.90	2	2.94E-11	0.36	1,39E-08	Patogénesis	ppa024543m	5
M5XJV8	Amino oxidasa	256	12.53	6	5.09E-10	0.38	1,60E-07	Metabolismo de aminas	ppa002377m	1
M5XDU4	(R)-mandelonitrilo liase 2	102	3.60	2	4.66E-09	0.40	1,10E-06	Metabolismo de alcoholes	ppa003595m	1
M5WVB9	Epoxi-hidrolasa 3	125	16.45	3	6.85E-07	0.47	1,48E-04	Hidrolasa	ppa019902m	3
M5W7R0	Proteína no caracterizada	135	14.40	3	1.53E-05	0.51	1,45E-03	-	ppa021935m	8
M5Y9F2	Proteína con dominio de homología pleckstrina	108	19.30	3	2.92E-05	0.53	2,51E-03	Metabolismo glicolípidos	ppa011640m	1
M5VPU2	Quitinasa V	145	11.25	2	3.89E-05	0.53	3,06E-03	Metabolismo de carbohidratos	ppa007396m	7
M5XLQ7	Beta-glucosidasa periplásmica	1435	45.03	24	6.47E-05	0.54	4,37E-03	Metabolismo de carbohidratos	ppa001675m	1
M5WXM6	Proteína no caracterizada	127	6.75	3	9.55E-05	0.55	5,64E-03	-	ppa022216m	4

Accesión	Descripción de la proteína	S	C (%)	N	p-Valor	Ratio (AI/AC)	FDR ^c	Función	GDR gen	S
M5XJJ3	Enolasa	714	38.03	3	1.20E-04	0.55	6,69E-03	Metabolismo glucolítico	ppa005739m	2
M5W0M7	Histona H2B	352	43.07	5	2.48E-04	0.57	1,23E-02	Ensamblaje del nucleosoma	ppa012937m	6
M5Y2Y6	Mandelonitril-glucosiltransferasa	311	21.73	6	3.81E-04	0.58	1,65E-02	Actividad transferasa	ppa004968m	1
M5XIU5	Proteína no caracterizada	86	21.20	2	3.84E-04	0.58	1,72E-02	-	ppa023970m	1
M5W248	Endo-1,4-beta-glucanasa	321	19.70	7	4.34E-04	0.58	1,78E-02	Metabolismo de carbohidratos	ppa004387m	8
I1U4K7	Polifenol oxidasa II	1289	44.87	22	5.06E-04	0.59	1,91E-02	Biosíntesis de pigmentos	ppa003190m	4
M5W266	Prunasina hidrolasa	542	28.93	10	8.61E-04	0.60	3,13E-02	Hidrolasa	ppa021137m	6
M5W6P0	Proteína ribosomal L2	297	29.77	5	1.19E-03	0.61	4,15E-02	Traducción	ppa010183m	4
M5VMV1	Co-chaperona p23	129	15.93	3	1.43E-03	0.61	4,83E-02	Plegamiento de proteínas	ppa011992m	8

Anexo IV. Proteínas expresadas diferencialmente en anteras de las selecciones A2-198 (auto-compatible, AC) e ITAP-1 (auto-incompatible, AI). Para cada número de accesión, correspondiente a una proteína homóloga en la base de datos UniProtKB/SwissProt, se indican la descripción de la proteína, su función, el gen al que se asocia de acuerdo con la base de datos de Rosaceas, Genome Database for Rosaceae (GDR gen) y su localización en el genoma del melocotonero (S, scaffold). Se indican además varios parámetros: Puntuación del análisis (P) y porcentaje de cobertura (C) para el análisis BLAST, número de péptidos obtenidos en el análisis iTRAQ (N), ratio de abundancia entre las selecciones y la proporción de falsos positivos esperado (FDR). Para la selección A2-198, las proteínas reprimidas (ratio AI/AC>1) y sobre-expresadas (ratio AI/AC<1) aparecen separadas.

Accesión	Descripción de la proteína	S	C (%)	N	p-Valor	Ratio (AI/AC)	FDR	Función	GDR gen ^d	S
Reprimidas en A2-198										
M5VQU4	Glucan endo-1,3-beta-glucosidasa	122	10,60	2	0	4.20		0 Hidrolasa	ppa010568m	7
M5XIU2	Anexina	569	45,97	13	2.11E-13	3.11	5,93E-11	Unión de iones calcio	ppa008912m	2
M5VCGZ1	Esterasa/lipasa GDSL	90	7,30	2	2.89E-07	2.24	3,05E-05	Metabolismo de lípidos	ppa018616m	8
I2BF37	Calcona sintetasa	87	10,60	2	4.26E-07	2.21	3,99E-05	Biosíntesis	ppa006888m	1
M5W1Q5	Proteína patogénica PR-4	88	23,30	2	3.89E-05	1.92	0,00234	Patogénesis	ppa012991m	6
M5X5T2	Quinona oxidoreductasa	443	44,50	7	6.56E-04	1.73	0,02914	Oxidoreductasa	ppa008712m	3
Sobre-expresadas en A2-198										
M5XDU4	(R)-mandelonitril-lyase 2	100	3,60	2	4.36E-42	0.14	1,84E-39	Metabolismo de alcoholes	ppa003595m	1
M5XCQ5	Quitinasa IV	68	6,20	2	8.74E-12	0.38	1,84E-09	Metabolismo de carbohidratos	ppa009844m	1
M5XIJ3	Enolasa	934	42,17	5	3.00E-11	0.39	5,06E-09	Metabolismo glucolítico	ppa005739m	2
M5WGH9	Proteína de asociación a lípidos	836	46,07	13	1.75E-09	0.43	2,46E-07	Estructural	ppa005787m	4
M5XF62	Proteína nuclear de unión a GTP	225	13,70	3	2.89E-08	0.46	3,49E-06	Unión de GTP	ppa007452m	1
M5WD64	Patatina	80	6,30	2	5.49E-07	0.49	4,64E-05	Metabolismo de lípidos	ppa024781m	7
M5WC10	Proteína ribosomal 40S-S7	109	16,30	2	3.74E-06	0.52	0,00029	Traducción	ppa011943m	5
M5XS55	Serina carboxipeptidasa	622	29,23	11	1.16E-05	0.54	0,00081	Hidrolasa	ppa003691m	2
M5WGA1	Proteína no caracterizada	159	9,03	3	2.42E-05	0.56	0,00157	-	ppa004087m	4
M5WRJ6	Proteína de superficie de polen	217	55,90	2	4.60E-05	0.57	0,00259	Procesos de estrés	ppa014464m	3
M5XQ02	Proteína no caracterizada	201	21,27	3	2.77E-04	0.61	0,0146	-	ppa008191m	1
M5WX95	Proteína no caracterizada	91	2,10	2	3.40E-04	0.61	0,0169	-	ppa000287m	3
M5X4I0	Malato deshidrogenasa	742	48,73	5	3.46E-04	0.61	0,01624	Metabolismo de carbohidratos	ppa022676m	4
M5W0M7	Histona H2B	87	14,20	2	1.16E-03	0.64	0,0491	Ensamblaje del nucleosoma	ppa012937m	6

Anexo V. Proteínas expresadas diferencialmente en pistilos de las selecciones A2-198 (auto-compatible, AC) e ITAP-1 (auto-incompatible, AI). Para cada número de accesión, correspondiente a una proteína homóloga en la base de datos UniProtKB/SwissProt, se indican la descripción de la proteína, su función, el gen al que se asocia de acuerdo con la base de datos de Rosaceas, Genome Database for Rosaceae (GDR gen) y su localización en el genoma del melocotonero (S, scaffold). Se indican además varios parámetros: Puntuación del análisis (P) y porcentaje de cobertura (C) para el análisis BLAST, número de péptidos obtenidos en el análisis iTRAQ (N), ratio de abundancia entre las selecciones y la proporción de falsos positivos esperado (FDR). Para la selección A2-198, las proteínas reprimidas (ratio AC/AI<1) y sobre-expresadas (ratio AC/AI>11) aparecen separadas.

Accesión	Descripción de la proteína	S	C (%)	Nº	p-Valor	Ratio (AC/AI)	FDR	Función	GDR gen	S
Reprimidas en A2-198										
M5W1Q5	Proteína patogénica PR-4	323,4	55	6	6,17E-13	0,28	2,76E-10	Patogénesis	ppa012991m	6
M5VJT4	Proteína 1 asociada a DAZ	66,7	7	2	2,78E-12	0,30	8,30E-10	Unión de nucleótidos	ppa005979m	8
H6SV49	Dihidroflavonol 4-reductasa	137,0	15	4	7,74E-05	0,51	1,39E-02	Biosíntesis de pigmentos	ppa008069m	1
M5XNQ1	Ribulosa bisfosfato carboxilasa de cadena corta	174,0	40	5	7,96E-05	0,51	1,19E-02	Fijación de CO ₂	ppa012174m	1
M5X1P7	Quitinasa IV	103,6	17	3	4,99E-04	0,56	4,96E-02	Metabolismo de carbohidratos	ppa009653m	4
E3W0K1	Ribulosa bisfosfato carboxilasa de cadena larga	626,7	50	19	5,79E-04	0,56	5,18E-02	Fijación de dióxido de carbono	ppa005184m	6
M5WTM0	Proteína de unión a clorofila A/B	296,9	41	5	6,28E-04	0,56	4,68E-02	Unión de iones	ppa010078m	3
Sobre-expresadas en A2-198										
M5XU12	Quitinasa IV	109,4	34	2	0	5,10	0,00E+00	Metabolismo de carbohidratos	ppa010947m	1
M5W196	Taumatina	96,5	13	2	2,33E-07	2,67	5,20E-05	Patogénesis	ppa024543m	5
M5W248	Endo-1,4-beta-glucanasa	167,5	16	3	8,27E-05	2,13	1,06E-02	Metabolismo de carbohidratos	ppa004387m	8
M5XJ3	Enolasa	89,1	32	2	2,26E-04	2,04	2,53E-02	Metabolismo glucolítico	ppa005739m	2
M5XJV8	Amina oxidase	270,8	18	7	6,22E-04	1,94	5,06E-02	Metabolismo de aminas	ppa002377m	1
M5XLQ7	Beta-glucosidasa periplásmica	1933,9	51	39	6,94E-04	1,93	4,78E-02	Metabolismo de carbohidratos	ppa001675m	1

Anexo VI. Proteínas expresadas diferencialmente en pistilos autopolinizados de la selección A2-198 (A2-198 x A2-198; polinización compatible, PC) y pistilos de A2-198 no polinizadas (NP). Para cada número de accesoión, correspondiente a una proteína homóloga en la base de datos UniProtKB/SwissProt, se indican la descripción de la proteína, su función, el gen al que se asocia de acuerdo con la base de datos de Rosaceae, Genome Database for Rosaceae (GDR gen) y su localización en el genoma del melocotonero (S, scaffold). Se indican además varios parámetros: Puntuación del análisis (P) y porcentaje de cobertura (C) para el análisis BLAST, número de péptidos obtenidos en el análisis iTRAQ (N), ratio de abundancia entre las selecciones y la proporción de falsos positivos esperado (FDR). Para la selección A2-198, las proteínas reprimidas (ratio PC/NP<1) y sobre-expresadas (ratio PC/NP>1) aparecen separadas.

Accesión	Descripción de la proteína	S	C (%)	Nº	p-Valor	Ratio (PC/NP)	FDR	Función	GDR gen	S
Reprimidas en A2-198 x A2-198										
A9YTE0	Leucoantocianidina dioxygenasa	374	42,77	10	2,33E-05	0,33	1,10E-03	Oxigenasa		5
M5XF70	Subunidad alfa-tubulina	742	60,17	15	5,62E-04	0,41	1,62E-02	Constituyente estructural	ppa005617mg	1
M5VXY9	Subunidad beta-tubulina	1255	60,23	28	1,07E-03	0,43	2,80E-02	Constituyente estructural	ppa004884mg	6
M5W887	HSP90-2	1130	45,00	28	1,57E-03	0,44	3,70E-02	Procesos de estrés	ppa002220mg	6
M5VIY7	Cadena alfa-tubulina	108	63,30	2	1,66E-03	0,44	3,72E-02	Constituyente estructural	ppa005633mg	8
M5VKD2	Fibrilarina	98	24,90	3	1,65E-03	0,44	3,79E-02	Metiltransferasa	ppa010543mg	8
M5WIJ3	Proteína 1 fosfotransferasa	165	21,63	4	1,86E-03	0,45	4,07E-02	Transductor de señales	ppa012595mg	6
Sobre-expresadas en A2-198 x A2-198										
K4ER19	Inhibidor de poligalacturonasa	200	32,20	6	1,55E-15	8,81	1,39E-12	Proteína de unión		
A4GRE2	Inhibidor de poligalacturonasa	358	33,00	9	5,70E-13	7,17	2,55E-10	Proteína de unión		
Q9MBD7	NAD deshidrogenasa	1147	63,20	22	7,09E-11	5,96	2,11E-08	Oxidorreductasa	ppa007458mg	7
M5WV03	Alergeno putativo Pru p 2.01B	212	29,00	5	4,09E-10	5,54	9,15E-08	Patogénesis	ppa010471mg	3
B2BMP8	Beta-galactosidasa	327	21,40	9	2,68E-08	4,60	4,00E-06	Hidrolasa		3
M5WV82	Inhibidor de subtilisina	74	17,13	2	2,46E-08	4,62	4,41E-06	Inhibidor de proteasas	ppa011448mg	4
M5VPU2	Quitinasa V	289	16,63	6	5,06E-08	4,47	6,46E-06	Metabolismo de carbohidratos	ppa007396mg	7
M5V718	Beta-1,3-glucanasa	1947	76,40	34	7,04E-08	4,40	7,87E-06	Hidrolasa	ppa024457mg	1
M5X697	Alergeno putativo Pru p 2.01B	182	37,10	6	1,16E-07	4,29	1,15E-05	Patogénesis	ppa010473mg	3
M5W713	L-ascorbato oxidasa	69	8,00	2	1,34E-07	4,26	1,20E-05	Oxidorreductasa	ppa003733mg	6
M5WIQ5	Proteína patogénica PR-4	323	55,47	6	6,85E-07	3,92	5,58E-05	Patogénesis	ppa012991mg	6

Accesión	Descripción de la proteína	S	C (%)	Nº	p-Valor	Ratio (PC/NIP)	FDR	Función	GDR gen	S
M5XL91	Homocisteína S-metiltransferasa	54	14,80	2	1,06E-06	3,83	7,92E-05	Metiltransferasa	ppa008404mg	1
M5WT96	Taumatina	97	12,90	2	1,37E-06	3,78	8,76E-05	Patogénesis	ppa024543mg	5
M5XLA6	Arabinofuranosidasa	793	30,50	18	1,36E-06	3,78	9,34E-05	Metabolismo de carbohidratos	ppa001718mg	1
Q216V8	Alérgeno mayor Pru p 1	500	60,60	10	1,65E-06	3,75	9,82E-05	Procesos de defensa		
M5WKQ1	Proteína no caracterizada	331	30,90	7	1,88E-06	3,72	1,05E-04	-	ppa021281mg	4
M5XTC6	Alérgeno putativo Pru p 1.06B	485	67,10	8	6,94E-06	3,46	3,66E-04	Patogénesis	ppa012649mg	1
M5XU12	Quitinasa IV	109	34,10	2	2,23E-05	3,23	1,11E-03	Metabolismo de carbohidratos	ppa010947mg	1
M5WGC45	Proteína no caracterizada	87	10,53	3	6,69E-05	3,02	2,99E-03	-	ppa007720mg	4
M5WGA1	Proteína no caracterizada	263	19,30	7	1,07E-04	2,93	4,56E-03	-	ppa004087mg	4
M5XJN1	Proteína no caracterizada	61	7,70	2	2,01E-04	2,81	8,16E-03	-	ppa017577mg	1
M5WR86	Taumatina	49	8,30	2	2,49E-04	2,76	9,67E-03	Patogénesis	ppa019480mg	5
M5VXD5	Hidrolasa O-glicosilica	70	4,30	2	3,51E-04	2,70	1,16E-02	Hidrolasa	ppa001896mg	7
M5WHH5	Reticulina oxidasa	60	10,15	2	3,49E-04	2,70	1,20E-02	Oxidoreductasa	ppa006568mg	4
M5WTT2	Proteína no caracterizada	243	15,30	6	3,29E-04	2,71	1,23E-02	-	ppa008113mg	4
M5W9A6	Proteína no caracterizada	136	12,40	3	3,44E-04	2,70	1,23E-02	-	ppa005470mg	5
M5WIW4	Peroxidasa	134	16,00	2	4,41E-04	2,66	1,41E-02	Respuesta a estrés	ppa008607mg	6
M5WJF9	Xiloglucano endotransglucosilasa	225	31,03	6	4,95E-04	2,63	1,53E-02	Hidrolasa	ppa009472mg	6
M5XF62	Proteína de unión nuclear a GTP	547	31,07	12	5,55E-04	2,61	1,66E-02	Unión de GTP	ppa007452mg	1
M5WXM6	Proteína no caracterizada	287	21,20	8	8,42E-04	2,53	2,28E-02	-	ppa022216mg	4
M5VQE4	Quitinasa II	168	23,13	3	8,42E-04	2,53	2,35E-02	Metabolismo de carbohidratos	ppa008859mg	7
M5XLM2	Proteína no caracterizada	149	17,37	4	1,17E-03	2,47	2,98E-02	-	ppa004762mg	1
M5W7R0	Proteína no caracterizada	228	20,20	7	1,26E-03	2,46	3,13E-02	-	ppa021935mg	8
M5VM12	Serina carboxipeptidasa	45	5,60	2	1,47E-03	2,43	3,55E-02	-	ppa005420mg	8
M5XEI2	Hidrolasa de compuestos O-glicosilicos	105	8,97	2	1,92E-03	2,38	4,10E-02	Metabolismo de carbohidratos	ppa003807mg	1
M5WML6	UDP-galactosa	307	29,80	7	2,06E-03	2,36	4,29E-02	Isomerasa	ppa007962mg	5
M5VNN1	Proteína A de estrés universal	163	25,90	2	2,13E-03	2,36	4,34E-02	Respuesta a estrés	ppa012608mg	8

Anexo VII. Proteínas expresadas diferencialmente en pistilos polinizados de la selección ITAP-1 (ITAP-1 × A2-198; polinización incompatible, PI) y pistilos de ITAP-1 no polinizadas (NP). Para cada número de accesión, correspondiente a una proteína homóloga en la base de datos UniProtKB/SwissProt, se indican la descripción de la proteína, su función, el gen al que se asocia de acuerdo con la base de datos de Rosaceae, Genome Database for Rosaceae (GDR gen) y su localización en el genoma del melocotonero (S, scaffold). Se indican además varios parámetros: Puntuación del análisis (P) y porcentaje de cobertura (C) para el análisis BLAST, número de péptidos obtenidos en el análisis iTRAQ (N), ratio de abundancia entre las selecciones y la proporción de falsos positivos esperado (FDR). Para la selección A2-198, las proteínas reprimidas (ratio PI/NP<1) y sobre-expresadas (ratio PI/NP>1) aparecen separadas.

Número de accesión	Descripción de la proteína	S	C (%)	N	p-Valor	Ratio (PI/NP)	FDR	Función	GDR gen	S
Reprimidas en ITAP-1 × A2-198										
A9YTE0	Leucoantocianidina dioxygenasa	374	42,77	10	5,94E-05	0,30	4,09E-03	Oxigenasa		5
M5XE73	Calcona sintetasa	923	55,00	20	5,35E-04	0,36	1,91E-02	Biosíntesis	ppa006888mg	1
M5W1J3	Fosfotransferasa 1	165	21,63	4	5,59E-04	0,36	1,92E-02	Transductor de señales	ppa012595mg	6
H6SV49	Dihidroflavonol 4-reductasa	137	14,67	4	1,17E-03	0,38	3,07E-02	Reductasa		1
M5XF70	Subunidad alfa tubulina	742	60,17	15	1,41E-03	0,39	3,50E-02	Constituyente estructural	ppa005617mg	1
M5WHY8	Tubulina-1	110	64,73	3	2,18E-03	0,40	4,65E-02	Constituyente estructural	ppa005693mg	6
Sobre-expresadas en ITAP-1 × A2-198										
M5XU12	Quitinasa IV	109	34,10	2	0,00E+00	39,78	0,00E+00	Metabolismo de carbohidratos	ppa010947mg	1
M5X697	Alérgeno putativo Pru p 2.01B	182	37,10	6	5,84E-13	10,33	2,61E-10	Patogénesis	ppa010473mg	3
K4ER19	Inhibidora de poligalacturonasa	200	32,20	6	2,55E-07	5,41	7,61E-05	Proteína de unión		
M5WKQ1	Proteína no caracterizada	331	30,90	7	5,00E-07	5,20	1,12E-04	-	ppa021281mg	4
M5WIL0	Proteína no caracterizada	67	12,60	2	3,94E-06	4,56	7,05E-04	-	ppa014683mg	4
M5WGA1	Proteína no caracterizada	263	19,30	7	5,36E-06	4,47	7,99E-04	-	ppa004087mg	4
M5VYZ1	Proteína reparadora de DNA	196	16,93	5	2,13E-05	4,07	2,72E-03	Procesos de resistencia	ppa005241mg	8
M5WXM6	Proteína no caracterizada	287	21,20	8	3,24E-05	3,95	3,63E-03	-	ppa022216mg	4
M5XD17	Proteína no caracterizada	131	15,10	3	4,67E-05	3,85	3,80E-03	-	ppa008986mg	1
M5WV03	Alérgeno putativo Pru p 2.01B	212	29,00	5	5,32E-05	3,81	3,97E-03	Proteína de unión	ppa010471mg	3
A4GRE2	Inhibidor de poligalacturonasa	358	33,00	9	4,67E-05	3,85	4,18E-03	Proteína de unión		
M5XLA6	Arabinofuranosidasa	793	30,50	18	4,28E-05	3,87	4,26E-03	Metabolismo de carbohidratos	ppa001718mg	1
M5WH02	Xiloglucano endotransglucosilasa	80	14,55	2	8,70E-05	3,67	5,56E-03	Hidrolasa	ppa009685mg	4
M5VQU4	Glucan endo-1,3-beta-glucosidasa	54	22,00	2	1,32E-04	3,55	6,57E-03	Hidrolasa	ppa010568mg	7

Número de accesión	Descripción de la proteína	S	C (%)	N	p-Valor	Ratio (PI/NP)	FDR	Función	GDR gen	S
M5VMR9	Quitinasa I	90	6,80	2	1,26E-04	3,57	6,63E-03	Metabolismo de carbohidratos	ppa008646mg	8
M5W713	L-ascorbato oxidasa I	69	8,00	2	1,11E-04	3,60	6,64E-03	Oxidoreductasa	ppa003733mg	6
M5WT30	Xiloglucano endotransglucosylasa	110	8,80	2	1,26E-04	3,57	7,03E-03	Hidrolasa	ppa009608mg	3
M5X6U1	3-O-glucosiltransferasa	82	6,80	2	1,76E-04	3,48	7,15E-03	Metabolismo de azúcares	ppa005520mg	2
M5Y718	Beta-1,3-glucanasa	1947	76,40	34	1,73E-04	3,48	7,37E-03	Hidrolasa	ppa024457mg	1
M5W1Q5	Proteína patogénica PR-4	323	55,47	6	1,69E-04	3,49	7,58E-03	Patogénesis	ppa012991mg	6
M5XDT9	Cisteína proteinasa	466	17,73	8	1,65E-04	3,49	7,77E-03	Proteinasa	ppa005199mg	1
B2BMP8	Beta-galactosidasa	327	21,40	9	3,49E-04	3,29	1,36E-02	Hidrolasa		
M5X0T3	Xiloglucano endotransglucosilasa	148	31,45	3	3,91E-04	3,26	1,46E-02	Emsamblaje del nucleosoma	ppa013252mg	4
M5WSM4	Formato deshidrogenasa	739	37,00	14	6,53E-04	3,12	2,17E-02	Oxidoreductasa	ppa006791mg	3
M5XLM2	Proteína no caracterizada	149	17,37	4	8,16E-04	3,06	2,61E-02	-	ppa004762mg	1
Q2I6V8	Alérgeno mayor Pru p 1	500	60,60	10	1,01E-03	3,00	3,02E-02	Procesos de defensa		
M5VPU2	Quitinasa V	289	16,63	6	1,12E-03	2,97	3,04E-02	Metabolismo de carbohidratos	ppa007396mg	7
M5WB04	Cisteína endopeptidasa	111	9,75	3	1,11E-03	2,98	3,10E-02	Proteólisis	ppa007566mg	5
M5VW03	Fosfatasa ácida	92	9,30	3	1,00E-03	3,00	3,10E-02	Hidrolasa	ppa005956mg	7
M5XZ76	Factor sensible a oligomicina	67	16,10	2	1,09E-03	2,98	3,14E-02	ATP sintasa	ppa010026mg	2
QJHGK8	Alfa-L-arabinofuranosidasa	151	12,85	4	1,29E-03	2,94	3,30E-02	Metabolismo de carbohidratos		
M5VVQ4	Serina carboxypeptidasa	148	10,90	5	1,66E-03	2,87	3,70E-02	Proteólisis	ppa004538mg	8
M5XEI2	Hidrolasa de compuestos O-glycosílicos	105	8,97	2	1,63E-03	2,88	3,74E-02	Metabolismo de carbohidratos	ppa003807mg	1
M5WG45	Proteína no caracterizada	87	10,53	3	1,57E-03	2,89	3,79E-02	-	ppa007720mg	4
M5XJN1	Proteína no caracterizada	61	7,70	2	1,63E-03	2,88	3,84E-02	-	ppa017577mg	1
M5VKR8	Fosfatasa 1	135	16,03	4	1,80E-03	2,85	3,93E-02	Procesos de estrés	ppa009421mg	8

Anexo VIII. Proteínas expresadas diferencialmente en pistilos autopolinizados de la selección A2-198 (A2-198 x A2-198; polinización compatible, PC) y pistilos polinizadas de la selección ITAP-1 (ITAP-1 x A2-198; polinización incompatible, PI). Para cada número de accesión, correspondiente a una proteína homóloga en la base de datos UniProtKB/SwissProt, se indican la descripción de la proteína, su función, el gen al que se asocia de acuerdo con la base de datos de Rosaceae, Genome Database for Rosaceae (GDR gen) y su localización en el genoma del melocotonero (S, scaffold). Se indican además varios parámetros: Puntuación del análisis (P) y porcentaje de cobertura (C) para el análisis BLAST, número de péptidos obtenidos en el análisis iTRAQ (N), ratio de abundancia entre las selecciones y la proporción de falsos positivos esperado (FDR). Para la selección A2-198, las proteínas reprimidas (ratio PC/PI<1) y sobre-expresadas (ratio PC/PI>1) aparecen separadas.

Accesión	Descripción de la proteína	S	C (%)	N	p-Valor	Ratio (PC/PI)	FDR	Función	GDR gen	S
Reprimidas en A2-198 x A2-198										
M5VMR9	Quitinasa I	90	6,80	2	6,98E-16	0,27	2,08E-13	Metabolismo de carbohidratos	ppa008646mg	8
M5W1Q5	Proteína patogénica PR-4	323	55,47	6	1,94E-12	0,32	3,48E-10	Patogénesis	ppa012991mg	6
M5X6U1	3-O-glucosiltransferasa	82	6,80	2	2,08E-11	0,34	3,10E-09	Metabolismo de azúcares	ppa005520mg	2
M5VYZ1	Proteína reparadora de DNA	196	16,93	5	1,08E-08	0,40	1,08E-06	Procesos de resistencia	ppa005241mg	8
M5WH02	Xiloglucano endotransglucosilasa	80	14,55	2	2,21E-08	0,41	1,79E-06	Hidrolasa	ppa009685mg	4
M5XU12	Quitinasa IV	109	34,10	2	3,65E-08	0,41	2,51E-06	Metabolismo de carbohidratos	ppa010947mg	1
M5XDI7	Proteína no caracterizada	131	15,10	3	3,45E-08	0,41	2,58E-06	-	ppa008986mg	1
M5XJD4	Ferritina	69	5,30	2	5,77E-08	0,42	3,69E-06	Unión de iones hierro	ppa009703mg	2
M5WW17	NADPH-protodolorofilida oxidorreductasa 1	157	16,70	4	1,66E-07	0,43	9,29E-06	Oxidorreductasa	ppa006788mg	4
M5XNQ1	Ribulosa bisfosfato carboxilasa de cadena corta	174	40,33	5	2,08E-07	0,44	1,10E-05	Fijación del dióxido de carbono	ppa012174mg	1
M5X697	Alérgeno putativo Pru p 2.01B	182	37,10	6	2,55E-07	0,44	1,27E-05	Patogénesis	ppa010473mg	3
M5WB04	Cisteína-endopeptidasa	111	9,75	3	7,25E-07	0,45	3,41E-05	Proteólisis	ppa007566mg	5
M5VQU4	Glucan endo-1,3-beta-glucosidasa	54	22,00	2	1,25E-06	0,46	5,58E-05	Hidrolasa	ppa010568mg	7
M5VJT4	Proteína 1 asociada a DAZ	67	7,10	2	3,09E-06	0,48	1,32E-04	Unión de nucleótidos	ppa005979mg	8
M5Y028	Endo-1,3-1,4-beta-D-glucanasa	79	17,60	2	3,33E-06	0,48	1,36E-04	Hidrolasa	ppa010552mg	1
E3W0K1	Ribulosa bisfosfato carboxilasa de cadena larga	627	49,70	19	4,92E-06	0,48	1,92E-04	Oxidorreductasa		

Accesión	Descripción de la proteína	S	C (%)	N	p-Valor	Ratio (PC/PI)	FDR	Función	GDR gen	S
M5X060	Proteína no caracterizada	95	12,30	3	7,44E-06	0,49	2,78E-04	-	ppa006728mg	2
M5WJE7	Ferritina	111	12,10	2	1,44E-05	0,50	4,97E-04	Unión de iones hierro	ppa010086mg	6
E3W0H3	Proteína Q(B) del fotosistema II	96	6,80	2	1,65E-05	0,51	5,47E-04	Oxidoreductasa		
M5WT30	Xiloglucano endotransglucosilasa	110	8,80	2	1,94E-05	0,51	6,19E-04	Hidrolasa	ppa009608mg	3
M5Y240	Poligalacturonasa	628	27,57	15	2,06E-05	0,51	6,34E-04	Hidrolasa	ppa1027214m	1
M5W639	Asparagina sintetasa	77	8,70	2	3,47E-05	0,52	1,04E-03	Biosíntesis	ppa003265mg	6
M5XIP7	Quitinasa IV	104	17,00	3	4,11E-05	0,52	1,19E-03	Metabolismo de carbohidratos	ppa009653mg	4
M5XKU7	Factor de traducción 3 (Subunidad C)	55	2,80	2	1,35E-04	0,55	3,46E-03	Factor de iniciación de la traducción	ppa001006mg	1
M5WUX4	Subunidad del fotosistema II	280	31,33	6	2,06E-04	0,56	4,99E-03	Unión de iones calcio	ppa010093mg	3
M5X0C5	Proteína no caracterizada	130	23,23	3	2,45E-04	0,56	5,62E-03	-	ppa009231mg	3
M5XB14	Ribulosa bífosfato carboxilasa de cadena corta	39	18,00	2	4,46E-04	0,58	9,29E-03	Fijación del dióxido de carbono	ppa012123mg	3
M5VR26	Proteína del grupo de alta movilidad	60	18,70	2	5,23E-04	0,58	1,06E-02	Unión de DNA	ppa011596mg	7
M5WGA1	Proteína no caracterizada	263	19,30	7	6,25E-04	0,59	1,24E-02	-	ppa004087mg	4
M5VZU3	Ascorbato peroxidasa citosólica	594	50,93	11	7,33E-04	0,59	1,37E-02	Procesos de estrés	ppa010431mg	6
M5VQZ6	Proteína no caracterizada	137	16,97	4	7,19E-04	0,59	1,37E-02	-	ppa008420mg	7
M5VM41	Alcohol deshidrogenasa	416	47,57	10	8,47E-04	0,60	1,49E-02	Oxidoreductasa	ppa007186mg	8
M5WQU9	Proteína no caracterizada	91	6,65	3	1,03E-03	0,60	1,77E-02	Regulación de la transcripción	ppa006690mg	3
M5XWJ5	Subunidad del fotosistema II	97	9,30	2	1,15E-03	0,60	1,91E-02	Fotosíntesis	ppa009763mg	1
M5WR07	Pirofosfatasa Vacuolar H ⁺	102	5,80	4	1,24E-03	0,61	2,02E-02	Transporte de protones	ppa001833mg	6
M5WXM6	Proteína no caracterizada	287	21,20	8	1,28E-03	0,61	2,05E-02	-	ppa022216mg	4
M5WIL0	Proteína no caracterizada	67	12,60	2	1,44E-03	0,61	2,22E-02	-	ppa014683mg	4
M5XH18	Subtilisina	106	9,80	4	1,42E-03	0,61	2,23E-02	Proteólisis	ppa001739mg	3
M5XDT9	Cisteína proteinasa	466	17,73	8	2,09E-03	0,62	3,01E-02	Peptidasa	ppa005199mg	1
M1IQDQ8	ACC oxidasa	66	11,30	2	2,97E-03	0,63	3,97E-02	oxidoreductasa		
M5XMY9	Proteína endoplásmica	611	25,13	14	2,94E-03	0,63	3,99E-02	Procesos de estrés	ppa001487mg	1
M5VWP4	Transportador de protones	122	7,20	4	3,75E-03	0,64	4,94E-02	Transporte de protones	ppa001782mg	7

Accesión	Descripción de la proteína	S	C (%)	N	p-Valor	Ratio (PC/PI)	FDR	Función	GDR gen	S
Sobre-expresadas en A2-198 x A2-198										
M5WTM0	Proteína de unión a clorofila A/B	297	41,37	5	3,83E-03	0,64	4,96E-02	Captación de luz	ppa010078mg	3
M5WR86	Taumatina	49	8,30	2	0,00E+00	4,94	0,00E+00	Patogénesis	ppa019480mg	5
M5WT96	Taumatina	97	12,90	2	0,00E+00	6,22	0,00E+00	Patogénesis	ppa024543mg	5
M5XJV8	Amino oxidasa	271	18,40	7	1,29E-14	3,81	2,88E-12	Metabolismo de aminas	ppa002377mg	1
Q9MBD7	NAD deshidrogenasa	1147	63,20	22	8,73E-11	3,10	1,12E-08	Oxidorreductasa	ppa007458mg	2
M5W266	Prunasina hidrolasa	501	29,23	12	5,32E-09	2,78	5,95E-07	Hidrolase	ppa021137mg	6
M5W532	Proteína no caracterizada	52	15,70	2	1,21E-08	2,72	1,08E-06	-	ppa024560mg	7
M5WV82	Inhibidor de subtilisina	74	17,13	2	1,14E-07	2,54	6,77E-06	Inhibidor endopeptidasas	ppa011448mg	4
M5VPU2	Quitinasa V	289	16,63	6	1,37E-05	2,17	4,91E-04	Metabolismo de carbohidratos	ppa007396mg	7
M5WB02	Anhidrasa carbónica	120	37,90	4	5,88E-05	2,05	1,65E-03	Oxidorreductasa	ppa013476mg	7
M5VHH5	Reticulina oxidasa	60	10,15	2	6,66E-05	2,04	1,81E-03	Oxidorreductasa	ppa006568mg	4
M5WV08	Proteína no caracterizada	207	20,10	3	9,58E-05	2,01	2,52E-03	-	ppa010934mg	4
M5W7R0	Proteína no caracterizada	228	20,20	7	1,96E-04	1,95	4,88E-03	-	ppa021935mg	8
M5XF62	Proteína nuclear de unión a GTP	547	31,07	12	2,18E-04	1,94	5,13E-03	Unión de GTP	ppa007452mg	1
K4ER19	Inhibidor de poligalacturonasa	200	32,20	6	2,80E-04	1,92	6,27E-03	Proteína de unión		
M5X3J0	Quitinasa III	77	9,60	2	3,59E-04	1,90	7,83E-03	Metabolismo de carbohidratos	ppa021993mg	2
M5XLQ7	Beta-glucosidasa periplásmica	1934	51,33	39	3,93E-04	1,89	8,37E-03	Metabolismo de carbohidratos	ppa001675mg	1
M5W7Y9	Anhidrasa carbónica	37	4,70	2	6,74E-04	1,85	1,31E-02	Carbonato deshidratasa	ppa018794mg	6
A4GRE2	Inhibidor de polygalacturonasa	358	33,00	9	7,81E-04	1,84	1,43E-02	Proteína de unión		
M5X2M4	Pectin metilesterasa	357	20,13	7	8,16E-04	1,83	1,46E-02	Hidrolasa	ppa003915mg	2
M5WEE0	Ascorbato oxidase	187	13,77	4	1,13E-03	1,80	1,90E-02	Oxidorreductasa	ppa003411mg	6
M5WJ79	Xiloglucano endotransglucosilasa	225	31,03	6	1,81E-03	1,76	2,74E-02	Hidrolasa	ppa009472mg	6
M5Y718	Beta-1,3-glucanasa	1947	76,40	34	1,88E-03	1,76	2,80E-02	Hidrolasa	ppa024457mg	1
M5W9A6	Proteína no caracterizada	136	12,40	3	1,98E-03	1,75	2,91E-02	Unión de ATP e iones metálicos	ppa005470mg	5
M1Q4H1	S-adenosilmetionina sintetasa	246	38,77	4	2,35E-03	1,74	3,33E-02	Carbonato deshidratasa	ppa010302mg	8
M5W6Z4	Anhidrasa carbónica	161	29,40	4	2,61E-03	1,73	3,64E-02	Patogénesis	ppa007248mg	8
M5VM54	Proteína serina-treonina kinasa	124	12,80	2	2,83E-03	1,72	3,89E-02			

