

Desarrollo de marcadores moleculares para *Antirrhinum linkianum* basados en el mapa genético de *Antirrhinum majus*

(Recibido: 26/03/2015; Aceptado: 19/05/2015)

Victoria Ruiz-Hernández, Julia Weiss, Marcos Egea-Cortines
 Instituto de Biotecnología Vegetal (IBV), Universidad Politécnica de Cartagena
 Edificio de I+D+i, Campus Muralla del Mar, 30202 Cartagena, España
 Teléfono: 868 071 081
 Email: victoria.ruiz@upct.es

Resumen. Trabajos anteriores han localizado un grupo de marcadores moleculares en el genoma de *Antirrhinum majus*. Nosotros hemos realizado una Línea Recombinante Consanguínea (LIR) entre *A. majus* y la especie silvestre *A. linkianum*. Con el objetivo de tener marcadores moleculares distribuidos a lo largo del genoma de este cruce, utilizamos un total de 41 marcadores del mapa de *A. majus* y los comprobamos con *A. linkianum*. Hemos identificado 23 marcadores que mostraron un polimorfismo visible en geles de agarosa entre *A. majus* 165E y *A. linkianum*. Además, hemos conseguido localizar marcadores en todos los cromosomas de *A. linkianum*.

Palabras clave. Cebador, MITE, co-dominante

Abstract. Previous works had placed a set of molecular markers on the genome of *Antirrhinum majus*. We performed a Recombinant Inbred Line (RIL) between *A. majus* and the wild species *A. linkianum*. In order to have molecular markers spread throughout the genome of this cross, we used a total of 41 markers from the *A. majus* map and tested them in *A. linkianum*. We were able to identify 23 markers that showed visible polymorphism on agarose gels between *A. majus* 165E and *A. linkianum*. Moreover, we were able to place markers in all the chromosomes of *A. linkianum*.

Keywords. Primer, MITE, co-dominant

1. Introducción

Antirrhinum majus, popularmente conocido como boca de dragón, ha sido utilizada como planta modelo en genética desde comienzos del siglo XX. El grupo de especies de *Antirrhinum* también ha sido utilizado en estudios sobre variación natural. Hay aproximadamente 20 dentro del grupo monofilético de *A. majus*. Este grupo es nativo de la cuenca Mediterránea, principalmente del suroeste de Europa y el norte de África. Estas especies varían ampliamente en ecología y morfología y están adaptadas a climas, a menudo, bastante extremos [1].

Todas las especies del género *Antirrhinum* que han sido estudiadas pueden cruzarse entre sí y son capaces de formar híbridos fértiles, lo que facilita la identificación de los genes que producen sus diferencias [2]. Hay estudios de poblaciones de especies de *Antirrhinum* que han mostrado distintas distribuciones geográficas, tamaños de poblaciones y tipos de reproducción, desde autocompatibles hasta alógamas obligadas [3]. Este género comparte el mismo número de cromosomas ($2n=16$) y la mayoría de las especies son alógamas, aunque las variedades comerciales de *A. majus* y algunas otras especies silvestres pueden autopolinizarse [4].

Se han producido algunas líneas en laboratorio a partir de cultivares de *A. majus*. Existe también una amplia colección de mutantes [4] y la mayoría están sobre un fondo genético isogénico de *A. majus*: Sippe 50 [5]. Concretamente, hay una colección de

mutantes de *A. majus* que ha sido seleccionada por su alta actividad de transposición [6]. En algunos casos, éstas líneas seleccionadas se han utilizado para aislar genes por medio de “transposon tagging” [7].

1.1. Mapas genéticos y poblaciones segregantes

Los mapas genéticos de recombinación son una fuente importante para la genómica, ya que permiten identificar las funciones de los genes, el ensamblado de secuencias de genomas y también son útiles para las técnicas de mejora. Hasta la fecha, hay publicados dos mapas genéticos de recombinación para *A. majus* (línea 165E), ambos se hicieron a partir de una población F_2 . El primero se hizo a partir de un cruce entre *A. majus* y su pariente silvestre *A. molle* [8]. El segundo se publicó en 2010 [9] y se hizo sobre un cruce entre dos líneas homocigotas: *A. majus* (165E) x *A. majus* (Sippe 50). Los genotipos resultado del primer mapeo se usaron para la construcción del segundo, para poder identificar y establecer una relación entre los grupos de unión entre las dos poblaciones. Los marcadores comunes a ambos mapas permitieron la identificación de los *loci* vinculados y su orientación.

Los MITEs (miniature inverted-repeat transposable element) están presentes en un bajo número de copias en todas las especies de *Antirrhinum*. Debido a que tienen una actividad relativamente baja, se les ha llamado IDLE [10]. Los transposones tipo MITE se han encontrado a menudo en zonas del genoma con

alto contenido de genes [11], en contraste con muchas familias de transposones que son los componentes principales de la heterocromatina. Este aspecto fue observado también en las inserciones de los IDLEs en *Antirrhinum* que estaban intercaladas en zonas codificantes y no se encontraban en los centrómeros ni en los telómeros [9].

El objetivo de éste trabajo es el de probar 41 marcadores moleculares desarrollados para *A. majus* como marcadores útiles para una población segregante entre *A. majus* (165E) y la especie silvestre *A. linkianum*.

2. Materiales y Métodos

2.1. Material vegetal

Utilizamos material vegetal de ambos parentales: *A. majus* (165E) y *A. linkianum*.

2.2. Extracción de ADN

El ADN se extrajo de hojas jóvenes, utilizando el kit de Macherey-Nagel, “NucleoSpin® Plant II”, y siguiendo el protocolo establecido. Utilizamos 100 mg de hojas jóvenes homogeneizadas con N₂ líquido.

2.3. PCR

Debido a que usamos muchos marcadores distintos, las condiciones de la “polymerase chain reaction” (PCR) se modificaron en función de la necesidad. Algunos productos de PCR tuvieron que ser digeridos. Las condiciones de las PCRs y las digestiones se hicieron de acuerdo con [9].

2.4. Análisis en gel

La electroforesis para aislar los fragmentos de ADN se realizó utilizando geles de agarosa con distintos porcentajes de agarosa, dependiendo del tamaño de los fragmentos de PCR, preparados tal y como indica [12].

2.5. Marcadores usados para el mapeo

Los marcadores utilizados fueron una mezcla de MITEs, AFLPs (amplified fragment length polymorphism) y zonas codificantes de proteínas: ESTs (expressed sequence tag) y CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence). Previamente publicados por [9]. Los cebadores utilizados correspondían con 6 *loci* en el cromosoma 1, 5 en cr. 2, 5 en cr. 3, 5 en cr. 4, 6 en cr. 5, 5 en cr. 6, 3 en cr. 7 y 6 en cr. 8.

3. Resultados y Discusión

Para verificar si los marcadores moleculares desarrollados en *A. majus* podían ser útiles para *A. linkianum*, comprobamos la presencia-ausencia de los marcadores desarrollados en los estudios anteriores [9]. Analizamos en paralelo *A. majus* (165E) y *A. linkianum*.

El resultado que obtuvimos fue que 23 de los 41 marcadores usados resultaron ser útiles, ya que

permitieron la identificación directa de diferencias entre *A. majus* (165E) y *A. linkianum* (Tabla 1). En el caso de emplearse estos cebadores con la progenie de este cruce, podremos identificar fácilmente la procedencia del fragmento de ADN amplificado. Los marcadores MITEs han resultado ser una buena herramienta ya que suelen amplificar bien y están distribuidos a lo largo de todo el genoma. Esta identificación se obtiene mediante presencia-ausencia o mediante diferencias de tamaño de los productos de PCR (Fig. 1).

Tabla 1. Listado de los marcadores útiles para identificar *A. linkianum* vs. *A. majus* en geles de agarosa. X*=distintos tamaños; X=presencia; Celdas vacías=ausencia; Digest.=digestión (enzima); Cr.=cromosoma.

MARCADOR	TIPO	Cr.	<i>A. majus</i>	<i>A. link.</i>	Digestión
MITE1_88i24	MITE	1		X	
MITE1_01p23	MITE	1	X*	X*	
018_5_10_p15	EST	1	X*	X*	
018_5_03_k18	EST	1	X*	X*	MseI
STY-L	GEN	2	X*	X*	Hinf
018_1_12_c18	EST	2		X	MseI
MITE1_67m10	MITE	3	X*		
ZS167	EST	3	X*	X*	Hinf
ZS168	EST	3	X*	X*	Cfr131
MITE1_2	MITE	4		X	
MITE1_67i01	MITE	4	X*	X*	
GLO/MITE1-GLO	GEN	4		X	
MITE1_06n14	MITE	5	X*	X*	
SeussL3B	GEN	5	X*	X*	Hae3
MITE1_SiGW e10	MITE	6		X	
MITE1_83d24	MITE	6	X		
018_2_04_m09	EST	6	X*	X*	Hinf
MITE1_51g09	MITE	7	X		
MITE1_8_2	MITE	7		X	
SeussL1	GEN	7	X*	X*	Hinf
MITE1_94b13	MITE	8	X*	X*	
018_2_09_k03	EST	8	X*		MseI
ZS76	EST	8	X*	X*	Nde

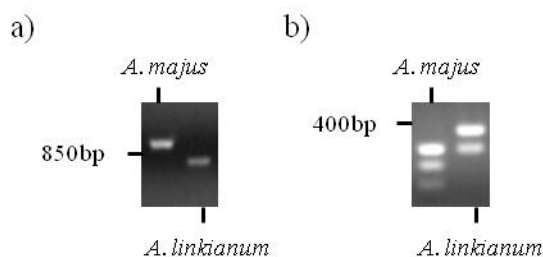


Fig. 1. Fotografías de geles de agarosa con marcadores co-dominantes a) Polimorfismo visible directamente: MITE1_67i01; b) Polimorfismo tras digestión: ZS167.

Un total de 10 marcadores funcionaron en uno de los parentales (presencia) y no funcionó en el otro (ausencia). Además, 13 de los 41 marcadores utilizados resultaron co-dominantes en ambos parentales y mostraron diferencias de tamaño (polimorfismos) entre *A. majus* (165E) y *A. linkianum*.

Algunos de los marcadores desarrollados en el segundo mapa molecular de *A. majus* son útiles para identificar *loci* de *A. linkianum*. Esto es una herramienta útil aplicable a nuestra RIL. Un ejemplo es que el trabajo desarrollado por [9] permitió relacionar algunos mutantes con los marcadores, indicando la zona del genoma dónde se encuentra la mutación. Ninguno de estos marcadores está contenido en la Tabla 1.

4. Conclusión

El número de marcadores utilizados proporciona un mapeo de baja resolución de *A. linkianum*. Este primer acercamiento al mapa genético de nuestra RIL (*A. majus* x *A. linkianum*) puede resultar útil, por ejemplo, en futuros análisis de QTLs (Quantitative Trait Locus).

Agradecimientos

Este trabajo se desarrolló dentro del proyecto: MCINN-FEDER. BFU2010-15843. Victoria Ruiz-Hernández es beneficiaria de una beca FPU (FPU13/03606) proporcionada por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Referencias

[1] Vargas P., Carrió E., Guzmán B., Amat E., Güemes J. (2009) "A geographical pattern of *Antirrhinum* (*Scrophulariaceae*) speciation since the Pliocene based on plastid and nuclear DNA polymorphisms" *J. Biogeogr.*, vol. 36, no. 7, pp. 1297–1312.

[2] Langlade N. B., Feng X., Dransfield T., Copsey L., Hanna A. I., Thébaud C., Bangham A., Hudson A., Coen E. (2005)

"Evolution through genetically controlled allometry space" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 29, pp. 10221–6.

[3] Mateu-Andrés I., De-Paco L. (2006) "Genetic Diversity and the Reproductive System in Related Species of *Antirrhinum*" *Ann. Bot.*, vol. 98, no. 5, pp. 1053–1060.

[4] Hudson A., Critchley J., Erasmus Y. (2008) "The Genus *Antirrhinum* (Snapdragon): A Flowering Plant Model for Evolution and Development" *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2008, no. 11, p. pdb.emo100–pdb.emo100.

[5] Stubbe H. (1966) "Genetics and cytology of *Antirrhinum* L. sect. *Antirrhinum*." 421pp.

[6] Bradley D., Carpenter R., Sommer H., Hartley N., Coen E. (1993) "Complementary floral homeotic phenotypes result from opposite orientations of a transposon at the plena locus of *Antirrhinum*" *Cell*, vol. 72, no. 1, pp. 85–95.

[7] Noda K., Glover B. J., Linstead P., Martin C. (1994) "Flower colour intensity depends on specialized cell shape controlled by a Myb-related transcription factor" *Nature*, vol. 369, no. 6482, pp. 661–4.

[8] Schwarz-Sommer Z., de-Andrade Silva E., Berndtgen R., Lonnig W.E., Muller A., Nindl I., Stuber K., Wunder J., Saedler H., Gubitza T., Borking A., Golz J. F., Ritter E., Hudson A. (2003) "A Linkage Map of an F2 Hybrid Population of *Antirrhinum majus* and *A. molle*" *Genetics*, vol. 163, no. 2, pp. 699–710.

[9] Schwarz-Sommer Z., Gubitza T., Weiss J., Gómez-di-Marco P., Delgado-Benarroch L., Hudson A., Egea-Cortines M. (2010) "A molecular recombination map of *Antirrhinum majus*" *BMC Plant Biol.*, vol. 10, no. 1, p. 275.

[10] Cartolano M., Castillo R., Efremova N., Kuckenberg M., Zethof J., Gerats T., Schwarz-Sommer Z., Vandenbussche M. (2007) "A conserved microRNA module exerts homeotic control over *Petunia hybrida* and *Antirrhinum majus* floral organ identity" *Nat. Genet.*, vol. 39, pp. 901–905.

[11] I. I.B. (2010) "Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*" *Nature*, vol. 463, no. 7282, pp. 763–8.

[12] Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.