

CONSTRUCCION Y APLICACIÓN DE UN MAPA GENETICO DE ALTA DENSIDAD EN ESPECIES FORESTALES

A.ARAGONES , M.HERNANDEZ , A.MURGA, S.ESPINEL , E.RITTER .

NEIKER, A.B.- INSTITUTO VASCO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO AGRARIO,

Granja Modelo Arkaute. Apartado 46. 01080 Vitoria-Gasteiz,

E-mail: aaragones@neiker.net

RESUMEN

Dentro del marco del proyecto europeo QLK-1999-01159, en el que participa NEIKER y otros 3 Institutos de investigación, el objetivo general es la construcción de un mapa ultradenso en *Pinus pinaster* con 12000 marcadores AFLP y en el que se incluyen también microsatélites del tipo SSR conocidos y publicados. En este trabajo se presentan los resultados preliminares de dicho proyecto.

P. C.: *Pinus pinaster*, Mapa genético, AFLP, SSR

SUMMARY

The objective of the European Project QLK-1999-01159 is to construct an ultra – high density AFLP linkage map of *Pinus pinaster* comprising up to 12.000 markers and to include in this reference map the position of published SSR markers. In this project participates NEIKER and three other research Institutes.

The present work shows the preliminary result of the project

K.W.: *Pinus pinaster*, Genetic map, AFLP, SSR

INTRODUCCION

Los marcadores genéticos presentan un gran potencial para la determinación de la variación genética inter e intrapoblacional así como para su utilización en programas de mejora genética forestal.

La empresa NEIKER en colaboración con otros 3 institutos de Investigación europeos (Universidad de Nancy, Francia, BFH de Hamburgo, Alemania, IMGPF de Florencia, Italia) está llevando a cabo un proyecto cofinanciado por la Unión europea (QLK5-1999-01159), para la elaboración de un mapa genético común en *Pinus pinaster*. Este mapa de referencia tiene múltiples aplicaciones como detección de QTLs, mejora asistida por marcadores (MAS) así como selección de genes de interés para clonación. Cada País construirá otro mapa genético en una especie de interés local, en nuestro caso, el pino radiata (*Pinus radiata* D.Don).

Los mapas genéticos ayudan a entender la estructura, función y evolución del genoma. Se ha demostrado que los mapas genéticos de especies cercanas son similares en cuanto al contenido y localización de genes y se está intentando determinar hasta que punto un mapa de una especie se puede aplicar a otras. En especies forestales, las aplicaciones más importantes de los mapas son: un conocimiento básico de la organización genómica, localización de rasgos monogénicos y multigenéticos y determinación de diversidad genética (Sewell et al, 1999).

MATERIAL Y METODOS

Población de muestreo

Para la elaboración del mapa genético ultradenso de *Pinus pinaster* se está utilizando 2 parentales genéticamente diferentes, uno de ellos de procedencia de Córcega y el otro de procedencia de Las Landas, y 80 individuos de su progenie.

La extracción y purificación del DNA de cada individuo se ha realizado a partir de acículas, este proceso se ha llevado a cabo utilizando un Kit comercial de extracción de DNA para plantas (Dneasy Plant Kit, QIAGEN.)

Marcadores moleculares

Para la construcción del mapa genético se utilizan como marcadores genéticos AFLPs y SSRs.

AFLPs

Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados. Es una técnica basada en la PCR (reacción en cadena de la polimerasa.. El polimorfismo se detecta como presencia o ausencia de una banda.). Dicha técnica se ha llevado a cabo siguiendo la metodología descrita por Vos y co. (1995). . El cribado de AFLPs se lleva a cabo con los enzimas de restricción EcoRI/MseI y con 3-4 nucleótidos adicionales en el extremo 3' terminal de los PCR-primers, los cuales son complementarios a las secuencias de los adaptadores.

El análisis AFLP se ha realizado utilizando el sistema LICOR con cebadores fluorescentes no radioactivos. Las amplificaciones se realizan con cebadores que están marcados con una molécula IRD800 . Los productos amplificados se separan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y se detectan por un laser de baja energía incorporado a un escaner. Este sistema genera una imagen que se transfiere a un ordenador (figura 1). A partir de las imágenes resultantes se procesan los datos.

SSRs (Microsatélites)

Detectan regiones hipervariables del genoma. Un marcador SSR es una repetición de unas pocas bases (2-5) y está flanqueado por un único DNA. El microsatélite se utiliza como sonda en una librería genómica o de cDNA para identificar los clones que lo contienen. Se secuencian los clones y se diseñan cebadores para amplificar la zona de DNA que flanquea el microsatélite.

-

RESULTADOS Y DISCUSION

Marcadores AFLP

Cada grupo de trabajo ha analizado 50 combinaciones de cebadores. La tabla 1 refleja los resultados correspondientes a las combinaciones realizadas en NEIKER. Todas estas combinaciones generaron al menos una banda polimórfica. Como se puede observar el número medio de fragmentos polimórficos por combinación de cebadores fue de 6,53 lo que supone un 6.22 % del total de fragmentos obtenidos.

Del total de 320 fragmentos segregantes, 257 muestran segregación 1:1 en la progenie mientras que 63 lo hacen en 3:1.

La técnica AFLP se puede aplicar con éxito para la construcción del mapa genético del pino pinaster. Una gran ventaja de esta técnica es que genera muchos fragmentos polimórficos y que los resultados son reproducibles. Esta técnica de reciente desarrollo se está aplicando cada vez más a las especies forestales como *Eucalyptus globulus* y *E. tereticornis* (Marques et al, 1998), *Picea abies* (Paglia et al, 1998), *Pinus pinaster* (Costa et al, 2000) *Pinus taeda* (Remington et al., 1999).

Marcadores SSR

Cada grupo de trabajo ha analizado 25 SSRs. En el caso de NEIKER, éstos se han obtenido gracias a la colaboración del CSIRO (Australia) y del New Zealand Forest Research Institute. Dichos SSRs han sido identificados en Pino radiata. En los ensayos con Pino pinaster, solo 2 de las 25 combinaciones de cebadores para estos SSRs analizadas han mostrado segregación en la progenie. Los marcadores SSR son muy útiles para mapas genómicos ya que presentan herencia codominante y multi-alelica (Arcade et al 2000, Kojima et al, 1998) lo que les permite ser utilizados como marcadores de alineamiento. Es un método repetible, identifica locus simples y regiones hipervariables del genoma. El polimorfismo se detecta normalmente como una diferencia de longitud en el producto amplificado. Esta diferencia puede ser muy pequeña, incluso de 2 pares de bases.

Construcción del mapa genético

Con los datos obtenidos hasta el momento se ha obtenido un mapa genético para *Pinus pinaster* preliminar (figura 2). Para ello, se ha utilizado el programa MAPRF6 diseñado por E. Ritter.

El parental femenino (procedencia Corcega) del cruzamiento seleccionado de Pino pinaster tiene un total de 231 marcadores distribuidos en 12 grupos de ligamiento. El parental de procedencia tiene un total de 221 marcadores distribuidos también en 12 grupos. Por tanto, el número de grupos de ligamiento obtenido para ambos parentales coincide con $n = 12$ cromosomas característico del género *Pinus*.

BIBLIOGRAFIA

Costa P, Pot D, Dubos C, Frigerio J M, Pionneau C, Bodenes C, Bertocchi E, Cervera M T, Remington D L, Plomion C (2000) A genetic map of Maritime pine based on AFLP, RAPD and protein markers. *Theor Appl Genet* 100: 39-48

Marques CM, Araújo JG, Ferreira JG, Whetten R, O'Malley DM; Liu BH, Sederoff RR (1998) AFLP genetic map of *Eucalyptus globulus* and *E. Tereticornis*. *Theor Appl Genet* 96: 727-737

Paglia GP, Oliveri AM, Morgante M (1998) Towards second-generation STS (sequence-tagged sites) linkage map in conifers: a genetic map of Norway Spruce (*Picea abies* K.). *Mol Gen Genet* 258: 466-478

Plomion C, Durel CE, O'Malley DM (1996) Genetic dissection of height maritime pine seedlings raised under accelerated growth conditions. *Theor Appl Genet* 93: 849-858

Remington DL, Whetten RW, Liu BH, O'Malley DM (1999) Construction of an AFLP genetic map with nearly complete genome coverage in *Pinus taeda*. *Theor Appl Genet* 98: 1279-1292

Sewell MM, Sherman BK, Neale DB (1999) A consensus Map for Loblolly Pine (*Pinus Taeda* L.). I. Construction and Integration of Individual Linkage Maps From two Outbred Three-Generation Pedigrees. *Genetics* 51: 321-330

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van der Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nuc Ac Res* 23: 4407-4414

TABLAS

COMBINACIONES DE CEBADORES	Parental1 segregantes	Parental1 no seg.	Parental2 segregantes	Parental2 no seg.	Segregantes comunes	No segregantes comunes	Segregantes totales	Total no segregantes
EGAAMAAC	0	0	0	1	1	108	1	109
EGAAMGAC	1	0	1	0	1	80	3	80
EGAAMTTG	0	3	2	3	0	128	2	134
EGACMGAC	4	0	1	2	1	83	6	85
EGACMTAA	1	1	1	2	0	123	2	126
EGACMTAT	3	5	1	5	0	119	4	129
EGACMTCC	6	3	4	8	6	120	16	131
EGACMTCG	12	18	10	4	3	100	25	122
EGACMTGA	2	0	0	0	0	100	2	100
EGACMTTG	2	6	2	3	2	115	6	124
EGAACMGAC	3	1	4	4	0	72	7	77
EGAACMGCA	3	4	2	0	1	123	6	127
EGAACMGCT	3	4	0	2	2	94	5	100
EGAACMTCG	2	0	3	1	4	102	9	103
EGAACMACGA	4	3	4	3	4	82	12	88
EGACTMAAAA	1	0	0	0	0	115	1	115
EGACTMGAC	4	1	1	3	2	119	7	123
EGACTMGAT	1	0	1	1	0	95	2	96
EGACTMGCA	2	5	3	6	0	121	5	132
EGACTMGCG	3	2	3	1	1	110	7	113
EGACTMGCT	2	1	5	4	1	137	8	142
EGACTMTCC	0	0	2	6	0	109	2	115
EGACTMTCG	4	0	2	1	3	100	9	101
EGACTMTGC	3	0	3	0	2	104	8	104
EGACTMAACT	4	5	2	1	1	97	7	103
EGACTMACGA	3	3	1	2	2	93	6	98
EGACMCGA	8	7	9	7	5	85	22	99
EGACMCGG	3	3	2	3	0	75	5	81
EGACMCGA	1	1	2	3	0	103	3	107
EGACTMCCG	2	3	4	2	0	73	6	78
EGACTMCGA	2	4	8	6	2	83	12	93
EGACTMCGC	1	7	1	2	2	67	4	76
EGACTMCGG	2	1	3	0	1	61	6	62
EGACTMCGT	4	0	3	2	1	78	8	80
EGACTMCTC	1	0	2	1	0	76	3	77
EGACTMCTG	1	1	1	3	2	94	4	98
EGACTMCTT	0	2	1	1	0	76	1	79
EGACTMGGGA	3	10	3	2	1	141	7	153
EGACTMGGC	11	3	7	6	4	152	22	161
EGACTMGGG	5	6	6	9	3	141	14	156
EGACTMGGT	3	2	3	3	1	115	7	120
EGACTMGTT	1	3	1	0	2	73	4	76
EGACTMTAG	5	4	4	1	2	114	11	119
EGACTMTAT	2	4	0	1	0	113	2	118
EGACT/TCA	0	2	3	2	0	76	3	80
EGACTMGTA	1	1	1	0	0	87	2	88
EGACTMTAA	1	2	3	2	0	73	4	77
EGACTMTCT	1	1	0	1	0	87	1	89
AGACTMTGA	1	3	0	2	0	90	1	95
Total	132	135	125	122	63	4882	320	5139
Media	2,69	2,76	2,55	2,49	1,29	99,63	6,53	104,88

Tabla1. Resultados del análisis AFLP de 50 combinaciones de cebadores con fragmentos polimórficos

FIGURAS

Figura 1. Imagen parcial de un gel de AFLPs con la combinación de cebadores EgactMggc. La primera columna corresponde al parental femenino, la segunda al parental masculino y el resto de columnas corresponde a los individuos de la progenie. Los números 1 al 17 indican bandas polimórficas útiles para la construcción del mapa genético.

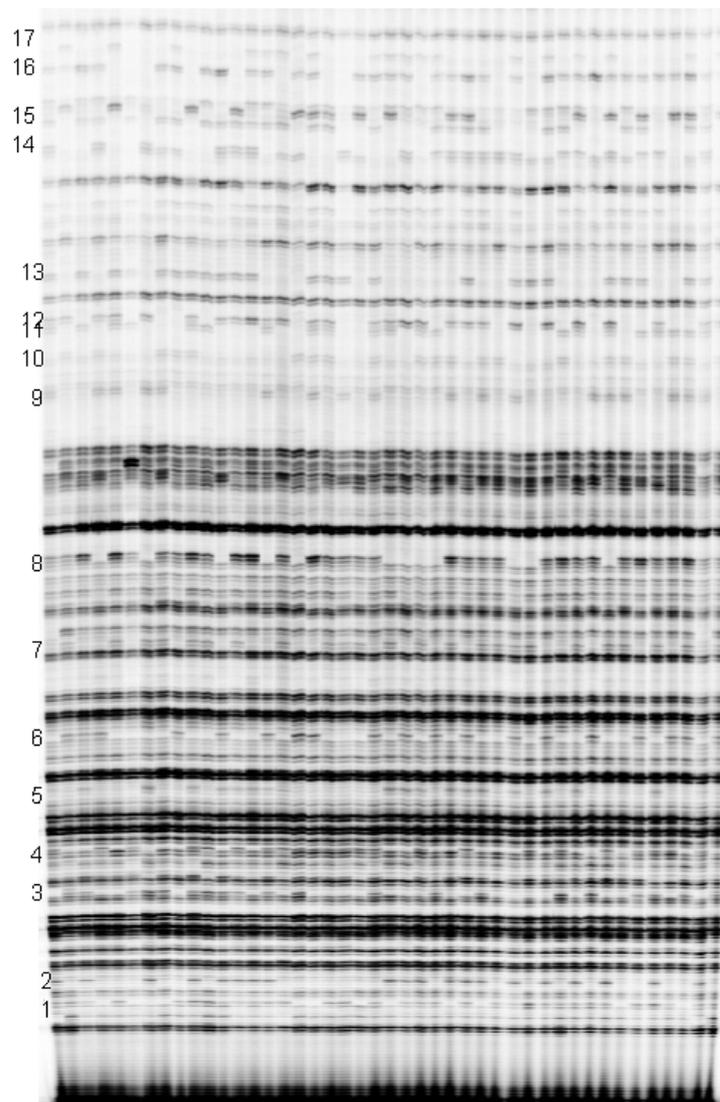
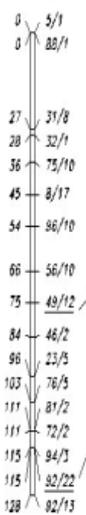
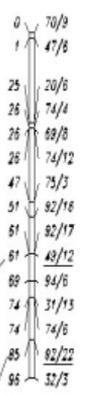


Figura 2. Mapa genético preliminar de *Pinus pinaster*. Los 12 grupos que se observan corresponden a los $n=12$ cromosomas característicos del género *Pinus*.

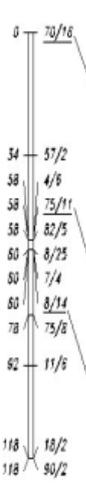
LG: 1a



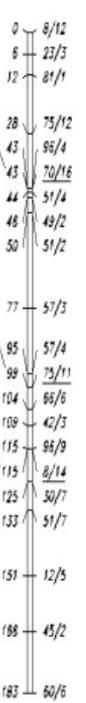
LG: 1b



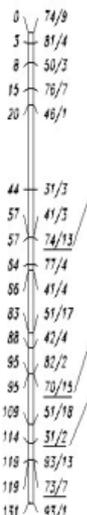
LG: 2a



LG: 2b



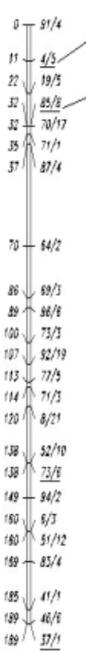
LG: 3a



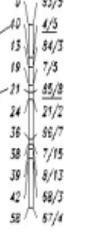
LG: 3b



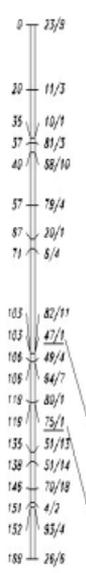
LG: 4a



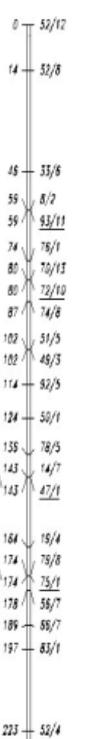
LG: 4b



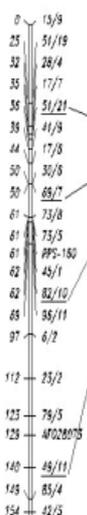
LG: 5a



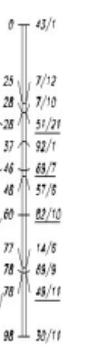
LG: 5b



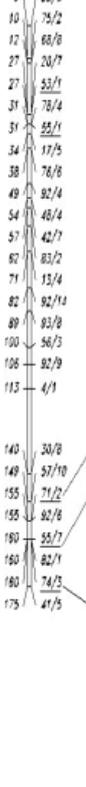
LG: 6a



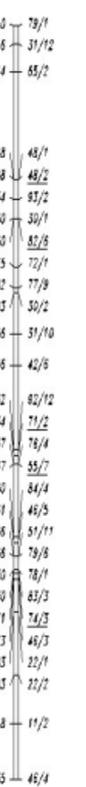
LG: 6b



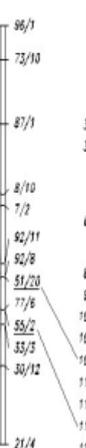
LG: 7a



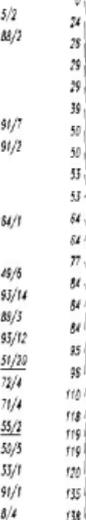
LG: 7b



LG: 8a



LG: 8b



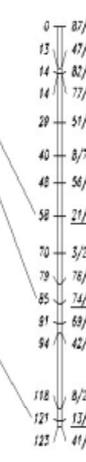
LG: 9a



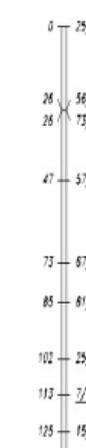
LG: 9b



LG: 10a



LG: 10b



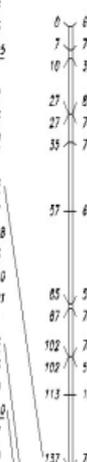
LG: 11a



LG: 11b



LG: 12a



LG: 12b

