MARCADORES MOLECULARES PARA CAMBIO DE FASE JUVENIL-ADULTO EN PINO RADIATA (*Pinus radiata D.Don*)

A.ARAGONES, M.HERNANDEZ, 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

Este estudio consiste en la obtención de marcadores moleculares con el objeto de caracterizar las fases juvenil y adulta en pino radiata. (*Pinus radiata* D.Don.). Para ello, se han definido varios tipos de material vegetal para ser evaluados con dichos marcadores moleculares. Se han utilizado dos estrategias diferentes (DDRT-PCR, cDNA-AFLP) para la identificación de cDNAs expresados diferencialmente en tejidos juveniles y adultos de pino radiata. Por el momento, se han identificado 4 marcadores potenciales (PR4J, PR8A, PR9A, PR10A). Por otro lado, se ha obtenido una parte homóloga en *Pinus radiata* del gen KNAT descrito en *Arabidopsis thaliana* así como un posible marcador específico de cambio de fase.

P.C.: *Pinus radiata*, marcador molecular, DDRT-PCR, cDNA-AFLP, cambio de fase

SUMMARY

We have defined different types of plant material in radiata pine which can be evaluated with potential useful markers. Basic techniques for performing differential display of cDNA fragments has been established and applied succesfully. In this moment we have characterise 4 potential markers (PR4J, PR8A, PR9A and PR10A) identified by meansDDRT-PCR and cDNA-AFLP techniques. On the other hand, We have obtained in *Pinus radiata* an homologous part of KNAT gene described in *Arabidopsis thaliana* as well as an specific possible phase change marker.

K.W.: *Pinus radiata*, molecular marker, , DDRT-PCR, cDNA-AFLP, phase change

INTRODUCCION

La propagación vegetativa tiene muchas aplicaciones en los programas de mejora forestales y se pueden resumir en los siguientes:
- Preservación de genotipos mediante el uso de bancos clonales para mantener la diversidad genética.
- Multiplicación de genotipos seleccionados (crecimiento, resistencias, adaptabilidad) para programas específicos de mejora.
- Obtención de máximas ganacias genéticas al usar los genotipos seleccionados para su uso directo en las plantaciónes. Es decir, permite captar y transferir al “nuevo árbol” todo el potencial genético del árbol donador.

En el programa de mejora genética del Pino radiata de la CAV, que se lleva a cabo en NEIKER desde 1984, se quiere hacer especial incapié en este punto. Tan pronto como los ensayos de progenie hayan demostrado que un árbol posee un buen genotipo, mediante el enraizamiento de estaquillas se pueden obtener copias idénticas y en grandes cantidades de este árbol. Ahora bien, una limitación importante de este método es la relación entre la capacidad de enraizamiento y la edad fisiológica de las estaquillas. Las estaquillas procedentes de árboles jóvenes suelen enraizar rápidamente y en porcentajes elevados mientras que las procedentes de árboles adultos son en muchas ocasiones imposibles de enraizar. Esta circunstancia es especialmente fustrante en el caso de tener que esperar a que el árbol sea adulto para poder evaluarlo genéticamente con garantías, como ocurre con el pino radiata. Por otra parte, se pueden observar claramente diferencias en la aptitud para el estaquillado en función del genotipo particular.

Por todo ello, sería deseable contar con algún tipo de marcador que nos permitiera saber de antemano el grado de madurez y por tanto la capacidad de enraizamiento de cada árbol a cualquier edad. Esta herramienta nos permitiría saber los árboles que pueden ser propagados vegetativamente a una edad en la que ya han demostrado su calidad genética y aquellos que deben rejuvenecerse (mediante injertos en cascada) y qué grado de rejuvenecimiento requieren.

MATERIAL Y METODOS

Material Vegetal

Como material de partida, para encontrar marcadores moleculares específicos de juvenilidad, rejuvenecimiento o madurez, se ha contado con tres tipos de sistemas juvenil-adulto diferentes :

1.- Sistema Progenie (SP) consistente en árboles adultos y su progenie. Dentro de este grupo se cuenta con a) 45 individuos de un cruzamiento controlado (P68 X P40). b) 3 progenies obtenidas mediante polinización abierta y sus correspondientes parentales femeninos (P34, P56, P11). Estas progenies constan de 50 individuos.
2.- Sistema revigorización (SR): estaquillas e injertos en cascada. Se cuenta con 5 casacadas de injertos y con estaquillas obtenidas a partir de plantas madre de 3 años realizadas durante dos años consecutivos.
3.- Sistema floración (SF): material con diferente capacidad de floración. Se cuenta con clones de la misma edad, uno con abundante floración y otro sin flores femeninas.

Extacción y purificación de RNA

El mayor problema en el aislamiento de RNA de pinos es su alto contenido en polifenoles y polisacáridos. El contenido de estas sustancias es especialmente alto en tejidos maduros.

Con el propósito de obtener una buena calidad y suficiente cantidad de rNA se han ensayado varios protocolos diferentes descritos en la literatura, aplicando en cada caso algunas modificaciones.

El mejor es el descrito por Chang y col. (1993). Como agentes reductores en el buffer de extracción incluye PVP y β mercaptoetanol para evitar los precipitados marrones que son compuestos fenólicos oxidados, los cuales se enganchan a los ácidos nucleicos y precipitan con ellos. Este método utiliza CTAB como detergente y la extracción se lleva a cabo con cloroformo en lugar de fenol para extraer las proteinas. Para eliminar los polisacáridos y el CTAB se usan concentraciones altas de sal, 2 M de cloruro sódico en lugar de la típica concentración de 0.7M en el buffer de extracción y el buffer SSTE contiene 1 M de cloruro sódico para disolver la pastilla de RNA.

Con objeto de mejorar el rendimiento y la calidad del RNA obtenido en pino radiata se optimizó el protocolo original utilizando un PVP soluble y un CTAB específico de la casa comercial SIGMA. Las precipitaciones se hicieron a -70°C durante 1 h. El RNA se cuantificó en espectrofotómetro y los rendimientos obtenidos fueron de 130 mg de RNA/g de acículas de material adulto y de 250 mg RNA/g de acículas juveniles.. La pureza fue muy buena obteniendose ratios A_{260}/A_{280} = 2 en ambos tipos de tejido juvenil y adulto.

Técnicas de expresión diferencial

Para comparar la expresión del RNA de tejidos juveniles y adultos se han utilizado la técnica de expresión diferencial DDRT-PCR (Liang and Pardee, 1992).

La técnica DDRT-PCR (Expresión diferencial de transcripción inversa- Reacción en cadena de la polimerasa) se ha llevado a cabo siguiendo la metodología descrita por la Corporación GenHunter (1996). Este método implica la transcripción inversa (RT) del RNA mensajero a partir de 0.2 mg de RNA total con cebadores oligo-dT que se anillan con la cola de poly(A) del ARNm, seguido de una reacción PCR en presencia de un segundo cebador de 10 pares de bases de secuencia arbitraria (AP-primer).

Se utilizan cebadores oligo-dT degenerados en la segunda base a partir del extremo 3'. Los ciclos de PCR y los parámetros de reacción se han puesto a punto para obtener el mayor número de bandas polimórficas. Los productos obtenidos se separan en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6% y 7 M de urea en tampón TBE. (3 h, 300 W) y se visualizan. Para ello, se ha desarrollado un método muy sensible de detección no radioactiva, en lugar de marcar los productos de amplificación utilizando 35S-dATP, se han utilizado cebadores marcados con biotina en el extremo 5'

Los productos de amplificación se visualizan directamente en el gel utilizando como anticuerpo streptoavidina y tras lavados sucesivos se detectan utilizando un sustrato colorimétrico de NBT y BCIP.

Debido al gran número de falsos positivos que se obtiene con la técnica DDRT-PCR, se ha utilizado otro método para obtener fragmentos que se expresen de manera diferencial en material adulto y juvenil. Se trata de la técnica cDNA-AFLP. El procedimiento consiste en lo siguiente:

Utilizando la tecnología de separación magnetica (DYNAL mRNA Direct Kit, 1995) y a partir del RNA total de los individuos, se ha obtenido RNA mensajero puro. Depues de la síntesis de la primera hebra de cDNA utilizando la transcriptasa inversa, se han obtenido librerías inmovilizadas de cDNA específicas para tejidos juvenil (brinzales) y adulto (parentales) las cuales pueden ser usadas para múltiples amplificaciones en aplicaciones posteriores.

Asimismo, se ha utilizado el "Timer Saver Kit" de Pharmacia para la construcción de librerías de cDNA. A partir del mRNA, se han sintetizado la primera y segunda hebra de cDNA, a partir de aquí se han ligado adaptadores con extremos EcoRI a los cDNAs de doble hebra, En este punto se pueden clonar en vectores apropiados. Se han construido 4 librerías de cDNA, dos de ellas con material adulto (P68 + P40 y P34) y las otras dos con material juvenil (genotipos de la progenie del cruzamiento controlado P68 X P40 y genotipos de la progenie del P34) . Utilizando cebadores específicos complementarios a los adaptadores se han amplificado fragmentos de cDNA específicos en material adulto y juvenil.

Análisis Northern

Las bandas de cDNA que se ha visto que se expresa diferencialmente en tejido juvenil y adulto se tienen que verificar mediante análisis Northern. Dicho análisis consiste en hibridar las sondas de cDNA con el ARN total , para ello 10 μg de ARN total de cada tipo de tejido se migra en un gel de agarosa al 1,2 % con glyoxal y bromuro de etidio. Este ARN se transfiere a una membrana de nylon cargada positivamente mediante capilaridad alcalina hacia abajo, tal como describe Chomczyinski (1992). La solución de transferencia utilizada ha sido: 3M NaCl y 8 mM NaOH a pH 11,4-11,45.. La membrana se neutraliza en tampón fosfato 0,2 M y se fija el ARN en estufa a 80°C durante 15 minutos.

El marcaje de las sondas de cDNA, la hibridación y la detección se ha llevado a cabo siguiendo los protocolos del sistema de digoxigenina (Boehringer Mannheim, 1993). Las sondas se han marcado incorporando DIG-!!-dUTP con Taq DNA polimerasa en una reacción de reamplificación vía PCR. Tras estimar la producción de sonda marcada y optimizar la concentración de sonda en la hibridación mediante "mock hybridization" las membranas se prehibridan 1 hora y se hibridan a 42°C durante 16 horas. La detección se lleva a cabo utilizando anti-dig y un sustrato quimioluminiscente en oscuridad.

RESULTADOS Y DISCUSION

Utilizando la técnica DDRT-PCR con un cebador poly T de 14 pares de bases (T12MA) y 5 cebadores arbitrarios de 10 pares de bases (AP1, AP2, AP3, AP4, AP5), se han obtenido 5 bandas diferenciales entre material adulto y juvenil (tabla1). Hasta el momento, sólo una de ellas (PR4J) ha podido ser confirmada mediante análisis Northern. Esta banda aparece solamente en material juvenil (brinzales de 6 meses) y en estaquillas obtenidas a partir de plantas madre de 3 años (material revigorizado), mientras está ausente en material adulto y en las cascadas de injertos. (figura 1).

La eficiencia de le técnica DDRT-PCR para generar bandas diferenciales en pino radiata es baja y en varios casos fragmentos supuestamente diferenciales han resultado ser ribosomales.

Con la técnica cDNA-AFLP se han obtenido un gran número de bandas diferenciales, pero sólo se han computado aquellas muy claras y que estaban presentes en todos los sistemas probados. Los productos de amplificación fueron reproducibles en todos los casos. Con todo esto, se han obtenido 5 fragmentos claros expresados diferencialmente en genotipos juvenil y adulto (tabla 2). Una banda aparece en material juvenil y las otras 4 en material adulto. Mediante análisis Northern 2 de ellas resultaron ser ribosomales y en este momento se tienen por tanto, 3 candidatos que se expresan diferencialmente (PR8A, PR9A, PR10A). Estos fragmentos han sido clonados y secuenciados.

EVALUACION DE CDNAS CONOCIDOS CON EXPRESION DIFERENCIAL.

Se ha probado una familia de genes, genes Knat; descrita ampliamente en la literatura , los cuales están implicados en el cambio de fase juvenil adulto, en floración y desarrollo. Se han utilizado cebadores degenerados diseñados por el CNR de Roma, basandose en secuencias aminoacídicas altamente conservadas a traves de especies de plantas. Se han llevado a cabo PCRs con cDNAs de pino radiata (RT-PCR) con la intención de encontrar algún gen Knat homólogo en esta especie. Se han obtenido 2 productos claros con el material adulto, uno de 800 bp y el otro de 400 bp, mientras que en material juvenil aparece unicamente el producto de 400 bp. (figura 2). Estos experimentos se han realizado también con material revigorizado de pino radiata: estaquillas e injertos en cascada. El patrón de bandas obtenido con las estaquillas es similar al del material juvenil y el de los injertos al del material adulto. Los fragmentos han sido clonados y secuenciados.

El producto de 400 bp parece ser una parte homóloga del gen en pino radiata al gen Knat descrito en *Arabidopsis thaliana*.

Mediante análisis Northern y utilizando el fragmento diferencial de 800 bp como sonda no se ha encontrado una expresión diferencial entre tejidos juveniles y adultos, pero la intensidad de la banda es considerablemente diferente partiendo de la misma cantidad de RNA en todos los casos. Este resultado sugiere que este fragmento presenta una diferencia en cantidad entre las dos etapas juvenil y adulto. En cualquier caso, se necesitan nuevos ensayos para poder determinar con certeza la presencia de un marcador diferencial Knat en pino radiata.

Tabla 1. - cDNAs expresados diferencialmente en *Pinus radiata* mediante DDRT-PCR

Nombre	Comb.cebadores	Bp	Especificidad
PR1A	T12MA-AP3	290	Adulto
PR2A	T12MA-AP3	300	Adulto
PR3A	T12MA-AP4	250	Adulto
PR4J	T12MA-AP3	280	Juvenil
PR6J	T12MA-AP2	250	Juvenil

Tabla 2. – cDNAs expresados diferencialmente in *Pinus radiata* mediante cDNA-AFLP

Name	Primer	Bp	Specify
PR5J	cDNA-Lib	340	Juvenil
PR7A	cDNA-Lib	480	Adulto
PR8A	cDNA-Lib	350	Adulto
PR9A	cDNA-Lib	450	Adulto
PR10A	cDNA-Lib	600	Adulto

BIBLIOGRAFIA

Anonymous. 1997. Phenol/SDS Method for Plant RNA Preparation In: Current Protocols of Molecular Biology, Wiley, NY, 4.3.1 – 4.3.4

Chang S., Puryear J. & Cairney J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. Plant Mol. Biol. Rep. 11: 113-116.

Chomzynski P. 1992. One-hour downward alkaline capillary transfer for blooting of DNA and RNA. Analytical Biochemistry 201: 134-139.

DYNAL A.S. 1995. Biomagnetic Techniques in Molecular Biology. Technical Handbook, 2nd Edition, Oslo, Norway. 160 pp.

GenHunter Corporation. 1996. RNAmap – mRNA Differential Display System. Brookline, MA, USA.

Hernandez M., Aragonés A., Espinel S., Ritter E. 1998. Aplicación de la Biología molecular en la propagación

vegetativa del pino radiata. Sustrai 49(2) 56-57.

Liang P. And Pardee A.B. 1992. Differential Display of Eucaryotic Messenger RNA by means of the Polymerase Chain Reaction. Science 257, 967-971.

Schneiderbauer A., Sandermann H. & Ernst D. 1991. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds. Analytical Biochem 197: 91-95.

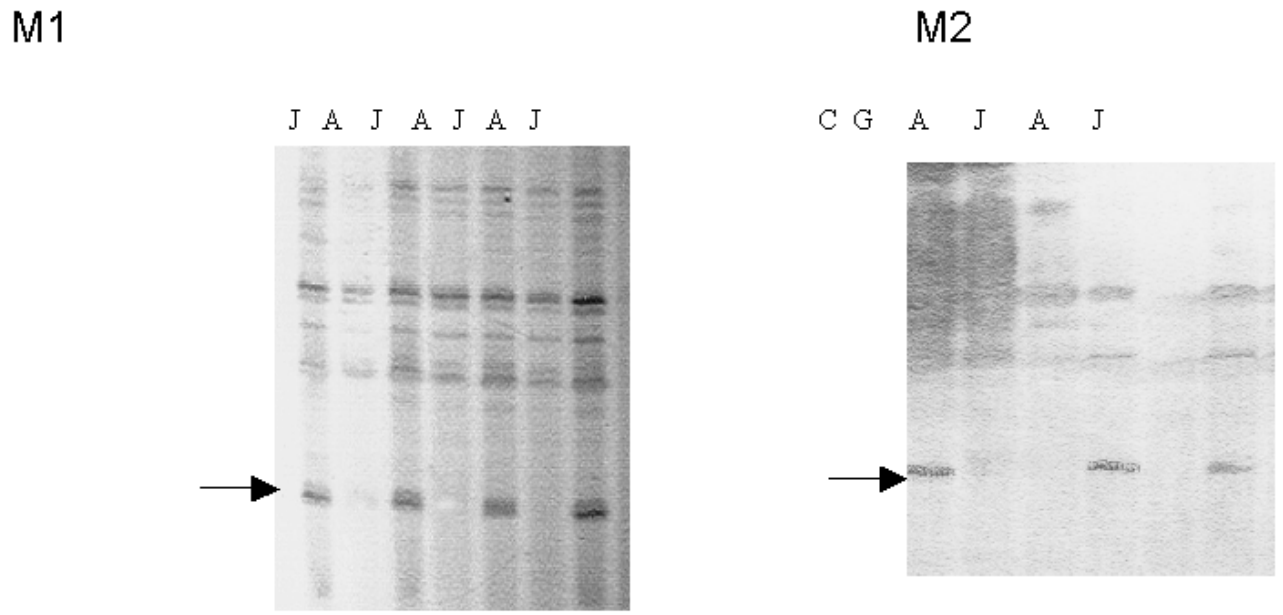

Figura1. Fragmento con expresión diferencial PR4J (280 bp) en tejido M1-Juvenil (J) y maduro (A) de diferentes familias; y M2 Material revigorizado: estaquillas (C) e injertos en cascada (G)

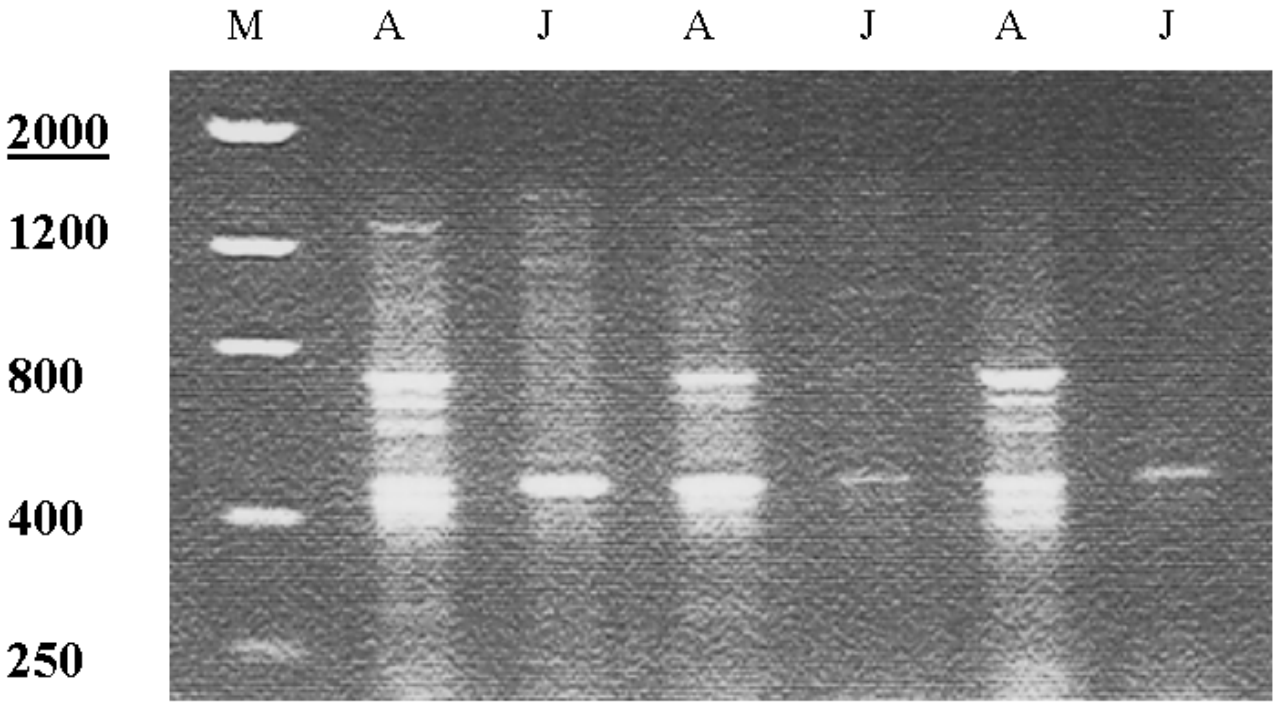

Figura 2. Amplificación de tejidos maduros (A) y juveniles (J) de diferentes familias de pino radiata con

cebadores KNAT degenerados.