

HOMOLOGÍA DE MAPAS DE HABA Y CHÍCHARO CON LA ESPECIE MODELO *Medicago truncatula* MEDIANTE MARCADORES STS

HOMOLOGY BETWEEN THE FABA BEAN AND PEA MAPS WITH THE MODEL SPECIES *Medicago truncatula* USING STS

Ramón Díaz Ruiz^{1*}, Belén Román Del Castillo², Zlatko Sátovic³, José Ignacio Cubero Salmerón⁴ y Ana Torres Romero²

¹Campus Puebla, Colegio de Postgraduados. Km 125.5 Carretera Federal Méx-Puebla. 72760, Puebla, Pue. México. Tel: 01 (22) 285-0013, Fax: 01 (22) 285-1444 ² IFAPA, CIFA-Alameda del Obispo, Área de Mejora y Biotecnología. Apdo. 3092. 14080, Córdoba, España. ³Faculty of Agriculture, Department of Seed Science and Technology. Svetosimunska 25. 10000, Zagreb, Croatia. ⁴Departamento de Genética, E.T.S.I.A.M. Apdo 3048. 14080, Córdoba, España.

* Autor para correspondencia (dramon@colpos.mx)

RESUMEN

La presencia de regiones conservadas en especies diferentes (sintenia) permite identificar genes o regiones del genoma involucrados en funciones similares. Así, un marcador estrechamente ligado a un carácter presente en una especie lo podría estar en todas las especies donde amplifique ese marcador. La investigación tuvo como objetivo amplificar marcadores STS (Sequence Tagged Sites) funcionales provenientes de la especie modelo *Medicago truncatula* y de *Pisum sativum*, en *Vicia faba*, encontrar polimorfismos mediante enzimas de restricción e incluirlos en su mapa genético, para determinar posibles homologías entre los genomas de estas especies. Para ello, se utilizó una población F₆ compuesta por 165 líneas derivadas del cruzamiento Vf6xVf136. Se analizaron 57 iniciadores STS, 37 específicos de *M. truncatula* y 20 de *P. sativum*. El mapeo de los STS que mostraron variación se hizo con el programa MAPMAKER V2.0. Aunque se obtuvo una buena amplificación en 10 STS de *M. truncatula* y seis de *P. sativum*, sólo cinco mostraron polimorfismo, cuatro de *M. truncatula* y uno de *P. sativum*. Los resultados obtenidos permitieron deducir que el Subgrupo I.A del cromosoma 1 en *V. faba* es homólogo al GL05 de *M. truncatula*, debido a la localización del STS MTU04. El PCT ubicado en el subgrupo I.B del cromosoma 1 indica homología con el GL04 de *M. truncatula*. La ubicación de los marcadores NPAC y AATC en el subgrupo II.A del cromosoma 2, demuestra homología con el GL03 de *M. truncatula* y *P. sativum*. Finalmente, el VBP1 ubicado en el cromosoma 5 muestra correspondencia con el GL07 de *M. truncatula*. Los resultados representan un avance en los estudios de sintenia realizados entre estas especies que serán corroborados al disponer de mayor número de marcadores estándar distribuidos en sus genomas.

Palabras clave: *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Medicago truncatula*, STS, mapas genéticos.

SUMMARY

The existence of conserved regions in different species (synteny) allows the identification of genes or genomic regions with similar functions. Thus, a marker tightly linked to a trait in a certain species might be present in other species where this marker can be amplified. The objective was to amplify functional STS markers (Sequence Tagged Sites) from the model species *Medicago truncatula* and from *Pisum sativum*, in *Vicia faba*, to identify polymorphisms by means of restriction enzymes, and finally to map them into the genome of this species. The final aim was to establish possible homologies among the genomes of these species. To do so, an F₆ population of 165 lines derived from the cross Vf6 x Vf136 was used. A total of 57 STS primers were analyzed, 37 from *M. truncatula* and 20 from *P. sativum*. Mapping of the polymorphic markers was performed with the program MAPMAKER V2.0. Although 10 *M. truncatula* STS and six from *P. sativum* were successfully amplified, only five of them showed polymorphism: four from *M. truncatula* and one from *P. sativum*. Results allowed to deduce that Sub-group I.A from chromosome 1 in *V. faba* is homologous to GL05 from *M. truncatula*, due to the localization of STS MTU04. PCT, located in sub-group I.B from chromosome 1, indicates homology with GL04 from *M. truncatula*. Location of NPAC and AATC markers mapped in the sub-group II.A from chromosome 2, allowed to infer homology with GL03 from *M. truncatula* and GL03 from *P. sativum*, respectively. Finally, VBP1 located in chromosome 5 indicates correspondence with the GL07 from *M. truncatula*. The obtained results represent an advance in the synteny studies among these species and will be corroborated as more standard markers distributed throughout their genomes are available.

Index words: *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Medicago truncatula*, STS, genetic maps.

INTRODUCCIÓN

La variabilidad entre y dentro de las especies es fundamental para estudiar diferencias genéticas en los seres vivos y para seleccionar plantas con caracteres de interés agronómico. Inicialmente la diversidad genética se estudiaba mediante caracteres morfológicos, posteriormente se introdujeron marcadores bioquímicos y recientemente se han utilizado marcadores de ADN para estudiar la diversidad. Dentro de este grupo se encuentran los RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SCAR (Sequence Characterised Amplified Region), SSR (Simple Sequence Repeat), CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) y los STS (Sequence Tagged Sites), donde cada uno de estos marcadores tiene diferentes ventajas y desventajas, mismas que se toman en cuenta para su aplicación.

Los STSs son marcadores funcionales que permiten hacer homologías entre especies. De esta forma la ubicación de regiones similares entre especies permite encontrar genes o regiones del genoma involucrados en funciones similares, por lo que un marcador ligado a un carácter encontrado en una especie puede considerarse que lo está en todas las especies donde amplifique tal marcador.

Un STS se define como una secuencia corta única, amplificada mediante la técnica PCR (Polymerase Chain Reaction) que identifica una región conocida en un cromosoma (Srivastava, 1994; Talbert *et al.*, 1994). Las secuencias pueden provenir de cualquier fragmento de ADN genómico, de marcadores como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) y RAPD o extremos de BAC (Bacterial Artificial Chromosomes). También pueden originarse a partir de ADN copia, es decir de regiones genómicas que se están expresando, denominadas ESTs (Expressed Sequence Tagged Sites). A partir de dichas secuencias se diseñan iniciadores largos (20 a 25 pb) que amplifican el fragmento de interés (García-Mas *et al.*, 2000; Gilpin *et al.*, 1997).

Una vez que su reproducibilidad se establece mediante ensayos de PCR, los STSs son marcadores transferibles entre laboratorios y entre mapas genéticos. En general, son marcadores codominantes y el polimorfismo puede obtenerse directamente por diferencia en el tamaño de los alelos o mediante enzimas de restricción (Zheng *et al.*, 2003; Brauner *et al.*, 2002; Gilpin *et al.*, 1997). Una de las aplicaciones interesantes de este tipo de marcadores es que un EST desarrollado a partir de regiones conservadas de un gen puede permitir el aislamiento de regiones sinténicas en otros genomas (Mazzarella *et al.*, 1992).

Al amplificar habitualmente fragmentos de ADN de copia única, los STSs son muy útiles para la construcción de mapas físicos y facilitan, además, la integración entre los mapas genéticos y mapas físicos de una especie. Los mapas genéticos son importantes en los trabajos de mejoramiento genético, ya que muestran el orden y la localización de genes de una especie; de acuerdo con Lee (1995), los mapas saturados facilitan información para la clonación posicional de genes, permiten la expansión directa del conocimiento del acervo genético de una especie a través del mapeo comparativo entre taxones, y aceleran la identificación e incorporación de genes deseables en los cultivos al aportar pistas importantes para entender la base biológica de caracteres complejos.

Esta investigación tuvo como objetivo la búsqueda de marcadores STS provenientes de la especie modelo *M. truncatula* y de *P. sativum*, que amplifiquen en la especie *V. faba*, y encontrar el polimorfismo de los mismos mediante enzimas de restricción para ser utilizados en mapas de ligamiento de la especie que permitan detectar homologías con las especies de *Medicago* y *Pisum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con 165 líneas F₆ derivadas del cruzamiento Vf6 x Vf136 de haba donde el progenitor femenino Vf6 es

susceptible a la planta parásita *Orobanche crenata* Forsk, y el masculino Vf136 es la fuente de resistencia. La línea asinápica Vf6 se ha utilizado previamente en trabajos de mapeo y ha facilitado la ubicación de grupos de ligamiento en cromosomas específicos.

La extracción de ADN se hizo en hojas tiernas con el método descrito por Torres *et al.* (1993). Para la digestión de ADN se añadió 1 µL de ARNasa y las muestras se mantuvieron a 37 °C por un mínimo de 3 h con el fin de degradar el ARN y obtener ADN limpio. El ADN utilizado para la PCR se diluyó de acuerdo con la cantidad de ADN obtenida tras la disolución con amortiguador TE-EDTA (Tris-EDTA), para alcanzar una concentración de 25 a 50 ng µL⁻¹.

Se analizaron 57 STS, 37 específicos de *M. truncatula* y 20 de *P. sativum* L. Para probar la amplificación se emplearon los progenitores y cinco individuos de la progenie. Los protocolos de amplificación fueron tres; en el protocolo 1 la amplificación comprendió 40 ciclos de: 1 min a 95 °C, 1 min a 60 °C y 1 min a 72 °C, seguidos de una extensión final de 8 min a 72 °C. El protocolo 2 fue similar y se diferenció sólo en la temperatura de hibridación de 1 min a 58 °C. El protocolo 3 comprendió dos temperaturas de hibridación con 20 ciclos cada una, los primeros 20 ciclos fueron de 1 min a 95 °C, 1 min a 65 °C y 1 min a 72 °C, y los siguientes 20 ciclos fueron de 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C y 1 min a 72 °C, más una extensión final de 8 min a 72 °C. La mezcla de reacción para la amplificación del ADN se preparó con 1xAmortiguador (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.001 % gelatina, 2 mM MgCl₂, 100 µM de cada dNTP, 0.2 µM de iniciador y 0.5 U de Taq ADN polimerasa (Promega). La reacción de amplificación se realizó en un termociclador 9700 GeneAmp®.

Para identificar polimorfismos se hizo una digestión de los productos amplificados con enzimas de restricción (Cuadro 2). La digestión se desarrolló con dos unidades de cada enzima (0.2 µL) en un volumen final de mezcla de reacción de 25 µL. Los otros componentes fueron 12 µL de agua bidestilada, 2.5 µL de solución amortiguadora específica para cada enzima, y 10 µL de producto amplificado. La digestión se hizo durante 12 h a 37 °C.

La electroforesis se hizo en geles de agarosa a 2 % (1 % de agarosa tipo Seaken, y 1 % de agarosa tipo Nusieve). Los geles se fabricaron con amortiguador 1 x TBE (Tris Borato-EDTA). Las bandas amplificadas se tiñeron con 7 µL de bromuro de etidio y se observaron con luz ultravioleta.

La prueba de ajuste a la segregación esperada en la población F₆ (1:1) se hizo mediante la prueba de χ^2 . El

desarrollo del mapa genético se hizo con el programa MAPMAKER V2.0 (Lander *et al.*, 1987), y se usó un LOD (Logarithm of the Odd Distance) de 3. Los esquemas de los grupos de ligamiento se realizaron con el programa MapChart versión 2.1 (Voorrips, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 57 iniciadores STS de *M. truncatula* y *P. sativum* probados en haba, 17 mostraron patrones de amplificación claros y repetibles (Cuadros 1 y 2). Con excepción de P482, todos amplificaron regiones monomórficas (Figura 1A). Para identificar polimorfismos se hizo la digestión de los productos de amplificación con enzimas de restricción (Figura 1B). De este modo, los polimorfismos debidos a cambios en un solo nucleótido SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) se transformaron en CAPs que identificaron SNPs que conferían lugares de restricción diferenciales entre los dos alelos parentales (Hauser *et al.*, 1998; Michaels y Amasino, 1998; Konieczny y Ausubel, 1993). El procedimiento permitió seleccionar nueve STS polimórficos (Cuadro 2).

En el presente cruzamiento se logró la amplificación de un mayor número de STS pertenecientes a *M. truncatula* (10) que de *P. sativum* (6). La mayoría de los STS polimórficos fueron de *M. truncatula* (6). La cantidad de STS amplificados cuya segregación se ajustó a la esperada (1:1) fue baja. Así, de 10 STS polimórficos únicamente cinco fueron incluidos en el mapa (no publicado). Cuatro fueron de *M. truncatula* (MTU04, NPAC, PCT y VBP1) y sólo uno de *P. sativum* (AATC).

Cuadro 1. Iniciadores STS amplificados con patrones monomórficos.

Nombre	Secuencia	Especie
ENOL	TTCCATCAAGGCCCGTCAGA TTGCACCAACCCCATTCATT	<i>M. truncatula</i>
L109	GTTCCATGACAGTAGAAGCATTG GTAGCATACATTTCTTGCATCTG	<i>P. sativum</i>
DSI	CCAAGACATCTTTGGTTTCATCC ACTGCAGAATCACTTGCCGAGTT	<i>M. truncatula</i>
CAB II	CTCTGAACAAATTCATCCTACC AAAGAAACCAACATGGAGAAC	<i>Beta vulgaris</i>
DENP	AGAATTGGACTTCTTCTCACTCAG CGGATGAAAAGCCTGAAGATAAGTC	<i>M. truncatula</i>
PEPCN	GCAAAAGTGAGTGAAGATG GCTTGGAAAACATTAAGGGTG	<i>P. sativum</i>
PGKI	GATGACTGTATTGGCGAGGAAGT GTTTCGACACGGCTCCAATA	<i>M. truncatula</i>

Los marcadores mapeados (Figura 2 y Cuadro 3) permitieron establecer algunos indicios de correspondencias entre los mapas genéticos de *Vicia faba*, la especie modelo *M. truncatula* (Choi *et al.*, 2004) y *P. sativum* (Weeden *et al.*, 1998). El subgrupo I.A del cromosoma 1 de *V. faba* corresponde al GL05 de *M. truncatula* donde se localiza el marcador MTU04. La localización del PCT en el subgrupo I.B del cromosoma 1 de haba, indica que dicha región tiene homología con el GL04 de *M. truncatula*. La presencia de NPAC y AATC en el subgrupo II.A del cromosoma 2 de *V. faba*, demuestra la homología de dicho cromosoma con el GL03 de *M. truncatula* y *P. sativum*. Finalmente, el cromosoma 5 de haba correspondió al GL07 de *M. truncatula*, ya que tienen en común el marcador VBP1.

La cantidad de STS analizados no se reflejó en el número de los marcadores mapeados. Hubo dos problemas principales; primero, lograr la amplificación interespecífica y después conseguir un buen ajuste de los marcadores amplificados a la segregación esperada (1:1). En estos dos pasos la mayoría de marcadores se eliminaron del estudio y sólo 9.6 % pudieron mapearse. Sin embargo, es posible

Cuadro 2. Iniciadores STS polimórficos mediante el uso de enzimas de restricción considerados en el análisis de mapeo de las líneas F₆.

Nombre	Secuencia	Especie	ER
PCT	TTGGCAAAAACGATAAACCTGT CACGGCACATCTGGAATAACTT	<i>M. truncatula</i>	<i>Hae III</i>
GPIC	GAAGCGTGGAAGGATTGT CCATGAACCAAGAGCGAA	<i>P. sativum</i>	<i>Rsa I</i>
AATC	TGCTTCACGATGCCACCAA TCCGACATTAGGATCAAGTAGG	<i>B. vulgaris</i>	<i>Alu I</i>
VBP1	CTGGAGAGCAGACCCATTCAAT GCGAAAGCCTCCAATCCAC	<i>M. truncatula</i>	<i>Hae III</i>
P482	GGTGTGTTGATGAACTGAAGTAGG TAGGTCTATTGGCGAAGATAAGG	<i>P. sativum</i>	-
SQEX	TGCCGCTATAAAAAGTAAACAAAGAA CAATTCACCCACAATTCTATCAGG	<i>M. truncatula</i>	<i>Hae III</i>
NPAC	TGGCTCCAGGTCCAGTTATTGA TCGGCTCTTCTCTCGCTTCT	<i>M. truncatula</i>	<i>Hinf I</i>
LB	CTTTAGTKAATAGCTCATGG AGCAAAGCTTCTTTAACCAAC	<i>P. sativum</i>	<i>Alu I</i>
MTU04	ATGGGAAGAGGATTGCTGTGATA AAGCGAACATTTTGGCATCTAC	<i>M. truncatula</i>	<i>Rsa I</i>
UNK21	TCGCCTCCATGTCCACCTC CGGCCTTGCTAAATCAGTCAG	<i>M. truncatula</i>	<i>Inf. I</i>

ER = Enzima de restricción.

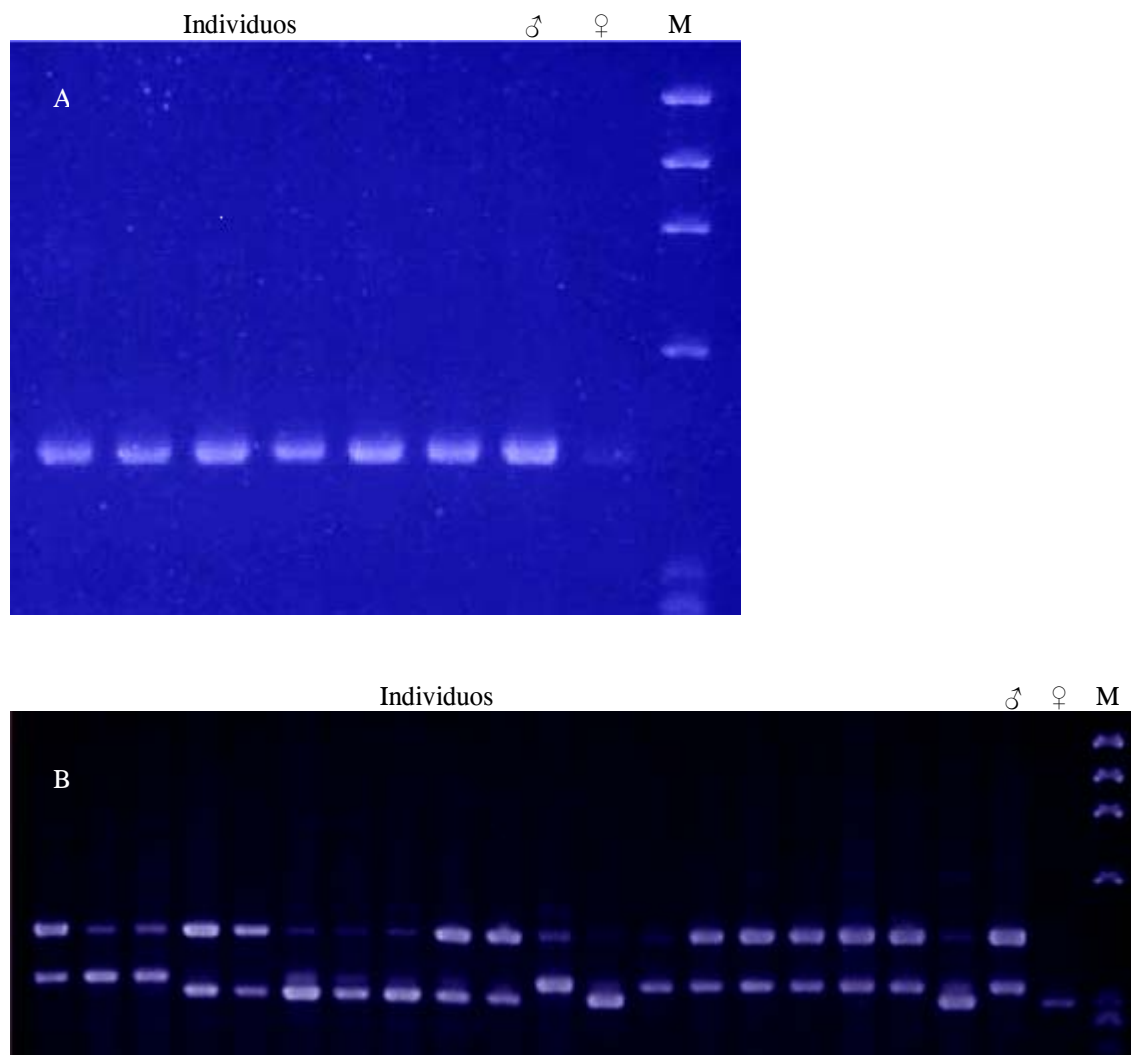


Figura 1. Amplificación (A) y digestión (B) mediante enzimas de restricción del STS AATC mapeado en el GL03 de *P. sativum* y en el GL II.A de *V. faba*. Se muestran los progenitores y algunas líneas F_6 del cruzamiento de *V. faba* Vf6 x Vf136. M= Marcador (Φ x174/Hae III). ♂= Progenitor masculino. ♀= Progenitor femenino.

continuar una búsqueda de nuevos polimorfismos en los marcadores, hasta ahora monomórficos, a través del empleo de otras enzimas de restricción o mediante la secuenciación y posterior diseño de iniciadores. Así se crearía un nuevo lugar de restricción en el producto de PCR de un progenitor y no del otro. Este tipo de marcadores se denominan marcadores CAP derivados o dCAPs (Neff *et al.*, 1998).

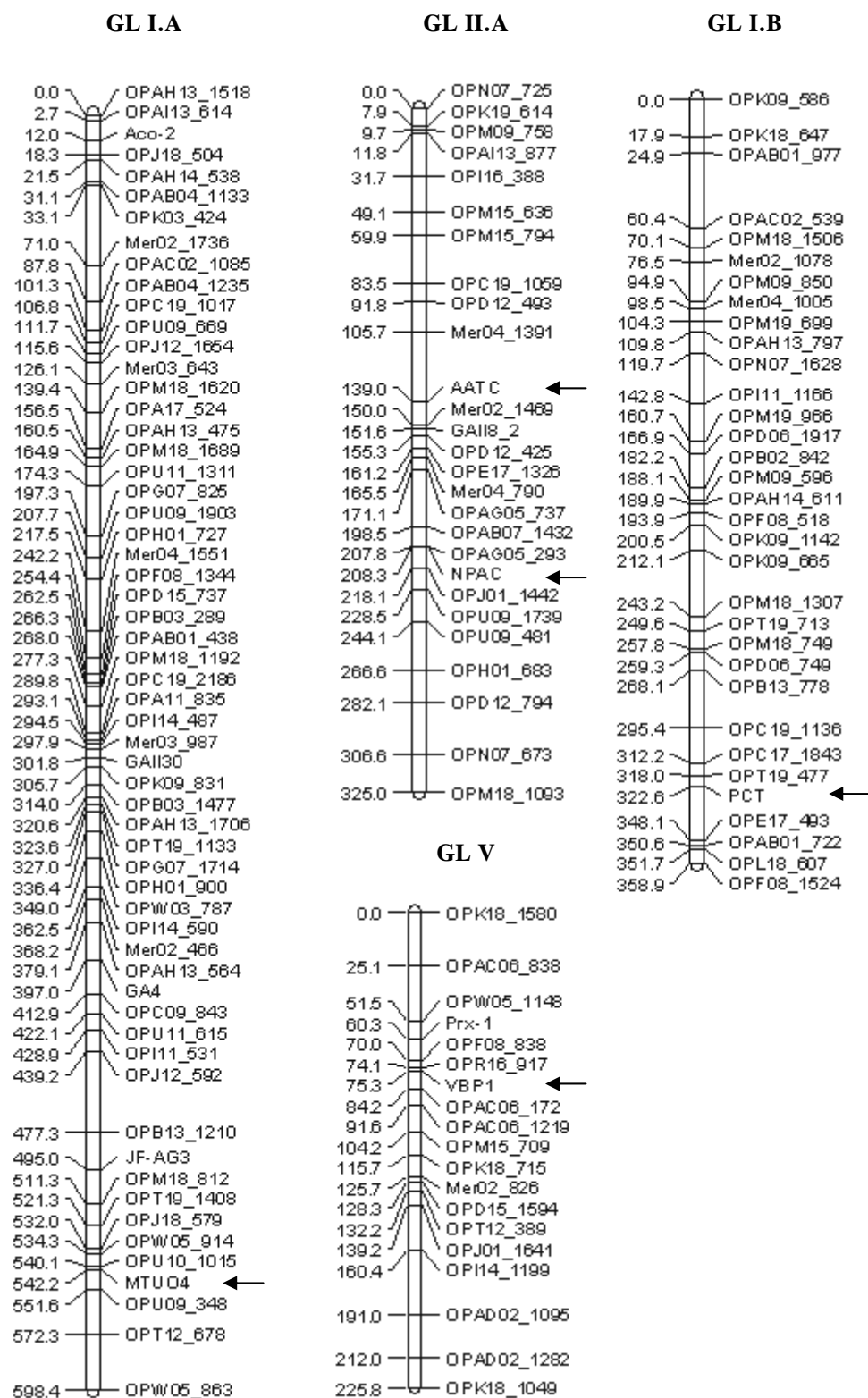
Los STS mapeados permitieron comparar y establecer indicios de homología entre algunos de los grupos de ligamiento de *V. faba*, *M. truncatula* y *P. sativum*, aunque ha sido más factible la comparación con la especie modelo

debido a la existencia mayoritaria de STS de *M. truncatula*.

Cuadro 3. Localización de los STSs ajustados a la segregación mendeliana en los grupos de ligamiento de *V. faba*, *M. truncatula* y *P. sativum*.

Iniciadores STS	<i>V. faba</i>	<i>M. truncatula</i>	<i>P. sativum</i>
AATC	II.A	-	GL03
MTU04	I.A	GL05	-
NPAC	II.A	GL03	-
PCT	I.B	GL04	-
VBP1	V	GL07	-

Pese a lo antes descrito, la total homología de cromosomas de haba con los de *P. sativum* y *M. truncatula* no podrá demostrarse de un modo inequívoco hasta disponer

Figura 2. Localización de los marcadores STSs en los grupos de ligamiento (GL) de *Vicia faba* L.

de un mayor número de marcadores estándar de esas especies, distribuidos homogéneamente a lo largo del genoma de las habas. Esto facilitará, además, la identificación de posibles reestructuraciones (inserciones, deleciones o translocaciones) entre genomios que podrían estar enmascarados por la limitación en el número de marcadores mapeados. De igual modo, la inclusión de un mayor número de genes funcionales de la especie modelo en el mapa del cultivo, podría facilitar la identificación de posibles genes candidatos responsables de caracteres de interés agronómico.

CONCLUSIONES

Se logró la amplificación de 17 marcadores STS en *Vicia faba*, que han sido mapeados en *Medicago truncatula* y *Pisum sativum*. El polimorfismo de nueve marcadores fue obtenido mediante la digestión con enzimas de restricción y sólo uno presentó polimorfismo directo.

No se logró demostrar con fiabilidad la completa homología de haba con *Medicago* y *Pisum* debido al manejo de un escaso número de marcadores estándar de dichas especies. La inclusión de un mayor número de genes funcionales de la especie modelo en el mapa de haba facilitará la futura identificación de genes candidatos responsables de caracteres de interés.

BIBLIOGRAFÍA

- Brauner S, R L Murphy, J G Walling, J Przyborowski, N F Weeden (2002) STS markers for comparative mapping in legumes. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 127:616-622.
- Choi H K, D Kim, T Uhm, E Limpens, H Lim, J H Mun, P Kalo, R V Penmetsa, A Sres, O Kulikova, B A Roe, T Bisseling, G B Kiss, D R Cook (2004) A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker co-linearity with *Medicago sativa*. Genetics 166:1463-1502.
- García-Mas J, E Graziano, M J Aranzana, A Monforte, M Oliver, J Ballester, M A Viruel, P Arús (2000) Marcadores de ADN: Conceptos, tipos, protocolos. In: Los Marcadores Genéticos en la Mejora Vegetal. F Nuez, J M Carrillo (eds). Sociedad Española de Genética, Universidad de Valencia. España. pp:91-151.
- Gilpin B J, J A McCallum, T J Frew, G M Timmerman-Vaughan (1997) A linkage map of the pea (*Pisum sativum* L.) genome containing cloned sequences of known function and expressed sequence tags (ESTs). Theor. Appl. Genet. 95:1289-1299.
- Hauser M, F Adhami, M Dorner, E Fuchs, J Glossl (1998) Generation of co-dominant PCR-based markers by duplex analysis on high resolution gels. The Plant J. 16:117-125.
- Konieczny A, F Ausubel (1993) A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. The Plant J. 4: 403-410.
- Lander E S, P Green, J Abrahamson, A Barlow, M J Daly, S E Lincoln, L Newburg (1987) MAPMAKER: an interactive computer program for constructing genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1:174-181.
- Lee M (1995) DNA markers and plant breeding programs. Adv. Agron. 55:265-344.
- Mazzarella R, V Montanaro, J Kere, R Reinbold, A Ciccodicola, M D Urso, D Schlessinger D (1992) Conserved sequence-tagged sites: a phylogenetic approach to genome mapping. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89:3681-3685.
- Michaels S D, R M Amasino (1998) A robust method for detecting single-nucleotide changes as polymorphic markers by PCR. The Plant J. 14:381-385.
- Neff M M, J D Neff, J Chory, A E Pepper (1998) dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. The Plant J. 14:387-392.
- Srivastava A K. (1994) PCR in sequence-tagged site (STS) content genome mapping. In: PCR Technology, Current Innovations. Griffin H G, A M Griffin (eds). CCR Press, Boca Raton, pp:239-247.
- Talbert L E, N K Blake, P W Chee, T K Blake, G M Magyar (1994) Evaluation of "sequence-tagged-site" PCR products as molecular markers in wheat. Theor. Appl. Genet. 87:789-794.
- Torres A M, N F Weeden, A Martin (1993) Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. Theor. Appl. Gen. 85:937-945.
- Voorrips R E (2002) MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. J. Hered. 93:77-78.
- Weeden N F, T H N Ellis, G M Timmerman-Vaughan, W K Swiecicki, S M Rozov, V A Berdnikov (1998) A consensus linkage map for *Pisum sativum*. Pisum Genetics 30:1-4.
- Zheng Y L, Z Q Zhang, Y M Wei, W Wu, Z H Yan (2003) Genetic diversity of Sichuan elite wheat cultivars based on microsatellites and STS-PCR markers. J. Gen. Breed. 57:47-58.