

MAPEO DE PEROXIDASAS (*Prxs*) EN ACCESIONES DE CEBADA (*Hordeum vulgare*) MEDIANTE LA TÉCNICA NBS-PROFILING.

González, A.M.¹; Marcel, T.C.²; Stam, P.²; van der Linden, C.G.³; Niks, R.E.³

¹ Misión Biológica de Galicia, CSIC. Pontevedra, España

² UMR1290, INRA-AgroParisTech. Paris, Francia

³ Laboratory of Plant Breeding, Wageningen University and Research Center. Wageningen, Holanda

1. Introducción

Las peroxidasas de clase III (*Prxs*; EC1.11.1.7) se encuentran en todas las plantas superiores. Estas *Prxs* participan en un amplio rango de procesos fisiológicos debido a su alto número de isoformas y a la regulación tan heterogénea de su expresión. Además, estas enzimas multifuncionales se encuentran altamente conservadas tanto entre genes parálogos como ortólogos. Este trabajo demuestra el uso efectivo de una nueva estrategia, denominada *Prx*-profiling, para mapear nuevos marcadores homólogos a *Prxs* en el genoma de cebada (*Hordeum vulgare*).

2. Material y Métodos

El diseño de los cebadores degenerados se basó en la secuencia de 105 genes de *Prx* de cebada (PeroxiBase, Passardi et al., 2007). Estas secuencias se alinearon con ClustalX (Thompson et al., 1997) y en ellas se identificaron dos motivos peptídicos conservados: FHDFCV y VSCADI. A partir de estos motivos se diseñaron 12 cebadores (denominados PERO) que se combinaron con tres enzimas de restricción: *MseI*, *AluI*, *RsaI*. El método de *Prx*-profiling se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito por van der Linden *et al.* (2004) con algunas modificaciones. Para probar la eficiencia de este método usamos dos RILs de cebada (Recombinant Inbred Lines, líneas recombinantes puras) (L94 x Vada y Vada x SusPrit). Se obtuvo un mapa integrado de cebada con 6990 marcadores, incluyendo 160 PERO marcadores mediante el programa JoinMap 4 (Jansen *et al.*, 2001). El mapa también incluyó secuencias basadas en *Prxs*. Para predecir el número de clusters posibles en el genoma de cebada se empleó un programa específico para el procedimiento de re-muestreo, programado en C++; la curva adaptada a los datos se realizó con el programa GenStat (VSN Int. Ltd., Oxford, UK).

3. Resultados y Discusión

Se seleccionaron las 12 combinaciones de cebador-enzima más óptimas de entre las 36 posibles. Estas combinaciones generaron 1292 bandas, de las cuales 185 fueron polimórficas. Las tasas medias de polimorfismo detectadas usando *MseI*, *RsaI* y *AluI* como enzimas fueron 14%, 13% and 18%, respectivamente. El número medio de bandas polimórficas por combinación fue 15,4. Las poblaciones no difirieron en su nivel de polimorfismo (14,2 y 14,4%).

Finalmente, se mapearon 168 bandas (84 en cada población) y 32 secuencias basadas en *Prxs*, todas ellas se situaron en un mapa integrado de cebada (figura 1). Ambas poblaciones mostraron una distribución similar de los marcadores. El procedimiento de re-muestreo dio lugar a una curva con una asíntota horizontal que corresponde a 41 (figura 2), indicando que los clusters encontrados son alrededor de un 95% del número total de genes de *Prx* en cebada.

4. Conclusiones

Gracias al empleo de la nueva estrategia denominada *Prx*-Profiling, se han conseguido mapear un gran número de genes de *Prx* en el genoma de cebada, pudiéndose hablar del mapeo de un 95 % de los clusters reales de *Prxs* en cebada.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido efectuado gracias a la financiación obtenida por A.M.González por el programa Angeles Alvariño de la Xunta de Galicia y al proyecto Bioexploit Integrated FOOD-CT-2005-513959 que financió a T. Marcel.

Referencias

Jansen J, De Jong AG, van Ooijen JW. 2001. Constructing dense genetic linkage maps. *Theor. Appl. Genet.* 102: 1113-1122.

Passardi F, Theiler G, Zamocky M, Cosio C, Rouhier N, et al. 2007. Peroxibase: the peroxidase database. *Phytochemistry* 68: 1605-1611.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.

van der Linden CG, Wouters DCAE, Mihalka V, Kochieva EZ, Smulders MJM, et al. 2004. Efficient targeting of plant disease resistance loci using NBS profiling. *Theor. Appl. Genet.* 109: 384-393.

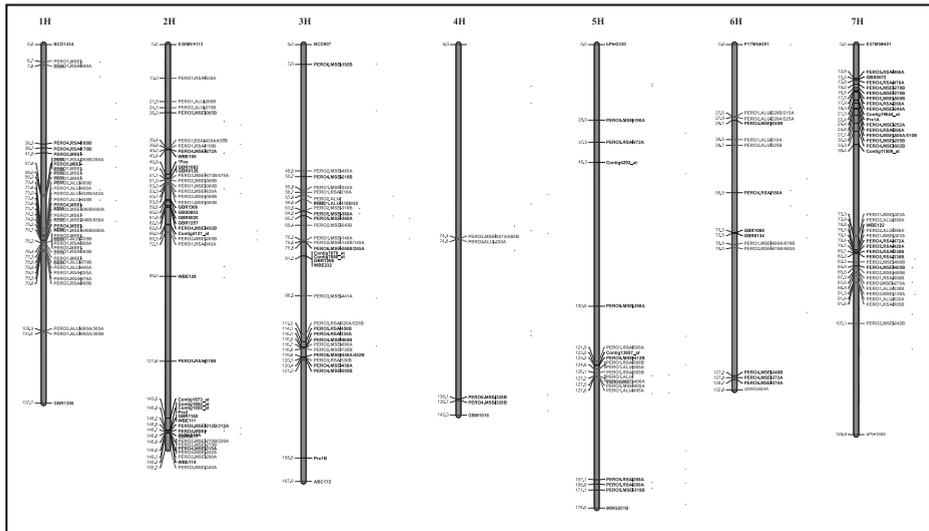


Figura1. Localización de PERO marcadores en el mapa integrado de cebada.

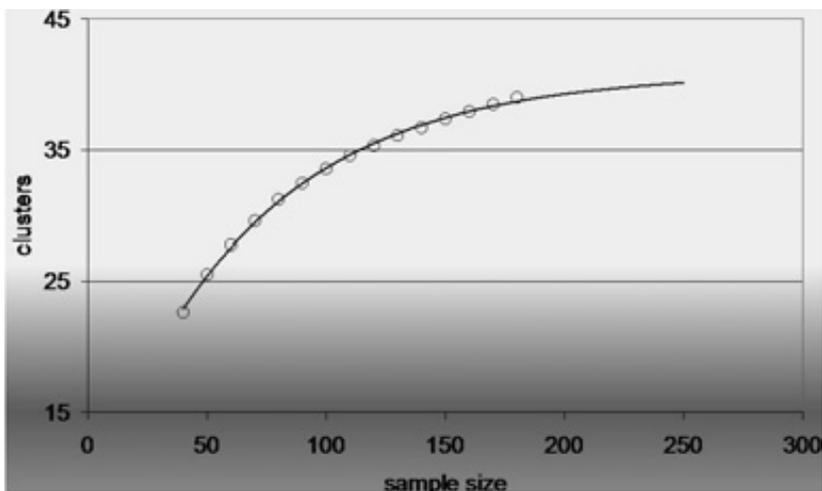


Figura 2. Cada punto representa la media de 50000 “runnings”. Se muestra la relación entre el tamaño de la muestra y el número medio de clusters de la muestra.