



MINISTERIO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA
DIRECCION GENERAL DE INVESTIGACION

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
Y DESARROLLO TECNOLÓGICO**

INFORME FINAL

Investigador Principal:	Pere Arús Gorina
Título del Proyecto:	Desarrollo de marcadores PCR de tuberización temprana basados en el gen candidato fitocromo B (PHYB) de patata
Organismo:	Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries
Centro:	Centre de Cabrils
Departamento:	Genètica Vegetal
Fecha de Inicio:	30-12-99
Fecha de Finalización:	30-12-01

Fecha: 28-11-02

Conforme el
Representante Legal
del Organismo:

El Investigador Principal:

Fdo: Agustí Fonts i
Cavestany

Fdo: Pere Arús

A. MEMORIA. Resumen de los resultados del proyecto en relación con los objetivos propuestos (máximo 2000 palabras).

Destaque su relevancia científica y/o su interés tecnológico.

En el caso de haber obtenido resultados no previstos inicialmente, indique su relevancia para el proyecto.

En caso de resultados fallidos, indiquense las causas.

1. Localización del gen *phyB* de patata

Al inicio del proyecto hemos procedido a mapear el gen *phyB* de patata en el genoma de esta especie, para ver si la zona donde reside es la misma que la zona donde ha sido mapeado anteriormente el gen *El* (earliness), relacionado con la precocidad en la tuberización. Esta aproximación de gen candidato, que describimos en la propuesta del presente proyecto, surgió al disponer de datos anteriores con plantas portadoras de construcciones antisentido del gen *phyB* que sugerían la implicación del mismo como determinante en la precocidad de tuberización. Esta era pues la hipótesis de partida del proyecto.

Al utilizar la sonda del gen *phyB* como RFLP en el grupo de la Dra. Christiane Gebhardt, que dispone de un mapa genético detallado de patata, se detectaron dos loci, un locus mayor *phyB* (a) en el grupo de ligamiento GI, ligado al marcador CP100 y cercano al gen de autoincompatibilidad *S*, y un locus menor *phyB* (b) en el grupo de ligamiento GIII a 3 cM del marcador GP1 y a 10 cM de St1.2.1. Ninguna de estas posiciones coincide con la localización del gen de precocidad *El*, que se halla en el grupo de ligamiento GV de patata, por lo que a priori descartamos que el gen *phyB* esté directamente relacionado con algún QTL mayor para la precocidad, aunque no podemos descartar su implicación con algún otro QTL menor. Así, nuestra hipótesis de partida del proyecto no resultó ser la correcta y se procedió a abordar el tema desde otra perspectiva también con marcadores moleculares.

2. Búsqueda de otros marcadores relacionados con la precocidad por la aproximación de los genes candidatos.

Puesto que conocíamos una serie de genes de patata relacionados directamente con la tuberización, decidimos realizar una aproximación por genes candidatos con dichos genes y marcadores de zonas en las que estaban descritos QTLs relacionados con precocidad ya descritos anteriormente en otros trabajos. Así, teníamos sondas, o las preparamos, para los siguientes genes, en el grupo del CSIC, que además se localizaron en el mapa de patata del grupo de la Dra. Gebhardt:

- Genes de la ruta de biosíntesis de las giberilinas: GA 20 oxidasa 1 (20 ox 1, GIII), GA 20 oxidasa 2 (20 ox 2, GVI), GA 20 oxidasa 3 (20 ox 3, GXI), GA 2 oxidasa (2 ox), GA 3 β hidroxilasa 1 (3 ox 1, GIII) y GA 3 β hidroxilasa 2 (3 ox 2, GVI)
- Gen de insensibilidad a las giberilinas: *GAI* (GXI)
- Genes de fitocromos: *phyA*, *phyB1* y *phyB2*
- Genes inducidos en tuberización: *Phor1*(GIV)
- Genes relacionados con floración: *Δ13*

También incluimos en el estudio una serie de RFLPs de tomate y de patata que se encontraban en regiones del mapa de patata en las que anteriormente se había detectado algún QTL relacionado con precocidad (Van der Berg et al, 1996): GP21 (GV), GP179 (GV), TG123

(GIV), TG130 (GIII), TG413 (GV), TG441 (GV), TG430 (GI), TG244 (GIII), TG261 (GVIII), y TG41 (GVIII).

Utilizamos estos genes como sondas de RFLP en un grupo de 15 variedades de patata de tuberización temprana (Sahel, Asun, Minerva, Palogan, Blanka), tardía (Pirola, Tacna, BL1-10, Huinkul, V-2, Szignal, Cruza-27, V-3 y LT-8) y semitemprana (Sandra), con la idea de escoger aquellas dos variedades más polimórficas entre sí, una tardía y una temprana, para cruzarlas y desarrollar una población segregante. Asimismo la empresa realizó cruzamientos entre Pirola (tardía) x Minerva (temprana), Tacna (tardía) x Minerva (temprana) y V-2 (tardía) x Minerva (temprana) y obtuvo poblaciones F₂ de 150 individuos.

Tras analizar los datos de RFLPs obtenidos con las sondas anteriormente mencionadas en las 15 variedades, se escogió el cruzamiento Minerva (temprana) x Tacna (tardía) (MV x TC) por presentar mayor nivel de polimorfismo. En dicha población se han evaluado por parte de la empresa algunos caracteres cuantitativos, entre ellos la precocidad, objetivo del presente proyecto.

Mediante el uso de RFLPs con las sondas anteriormente mencionadas, se ha detectado polimorfismos claros entre MV y TC con alguno de los enzimas de restricción usados en el estudio (*Bst*NI, *Dra*I, *Eco*RI, *Eco*RV y *Hind*III), como podemos ver en la siguiente tabla:

Enzima de restricción	Sondas polimórficas
<i>Bst</i> NI	2 ox, 20 ox 3, 3 ox 1, 3 ox 2, <i>GAI</i> , <i>phyB1</i> , Δ 13, <i>Phor1</i> , TG123
<i>Dra</i> I	3 ox 2, TG123, TG130, TG441, TG413, TG430
<i>Eco</i> RI	20 ox 1, <i>GAI</i> , <i>phyB1</i> , Δ 13, GP179, TG123, TG441, TG413
<i>Eco</i> RV	20 ox 3, 3 ox 2, <i>phyB1</i> , <i>phyB2</i> , Δ 13, TG41, TG123, TG130, TG441, 3 ox 1
<i>Hind</i> III	20 ox 1, 20 ox 2, GP21, TG123, Δ 13, <i>GAI</i>

Se procedió a hibridar en la población F₂ de 150 individuos las sondas que produjeron alguno de los RFLPs anteriores, pero para la mayoría de las hibridaciones se obtuvieron patrones poco claros muy probablemente debidos a la baja calidad del ADN y a la naturaleza tetraploide de la especie, que complicó los patrones de bandas obtenidos. Disponemos de resultados totalmente satisfactorios para la sonda del gen *GAI*, y de resultados parciales en la mitad de la población F₂ para 3 ox 1, 3 ox 2 y 20 ox 3. Al estar muy cerca de finalizar el proyecto decidimos mapear cada una de las sondas mediante PCR debido a la imposibilidad de disponer de nuevo DNA para la realización de RFLPs en un corto periodo de tiempo. En el momento de escribir esta memoria disponemos de marcadores tipo CAPS para la 3 ox 1 y *phyB1* (ver figura 1), y estamos desarrollando marcadores CAPS a partir de las secuencias del resto de sondas implicadas en el estudio en colaboración con el grupo del CSIC.

Para los genes en los que obtuvimos patrones de segregación en la F2 de Tacna x Minerva (*GAI*, 3 ox 1, 3 ox 2, 20 ox 3 y *phyBI*) no se observó ninguna correlación significativa con los datos de precocidad suministrados por la empresa, por lo que a priori podemos descartarlos como responsables de dicho carácter en el cruzamiento que estamos utilizando.

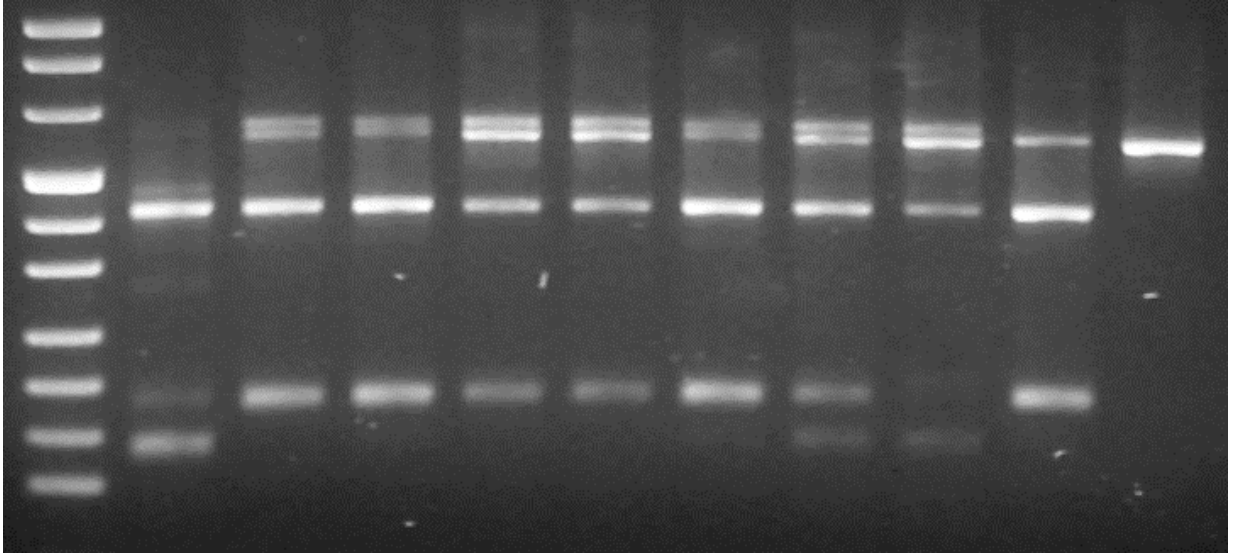


Fig. 1 Marcador CAPS para el gen *phyBI*, en el que de izquierda a derecha podemos ver los parentales TC y MV y ocho individuos de la población F2. Las bandas polimórficas entre los parentales segregan en la F2.

Actualmente seguimos el trabajo intentando mapar el resto de sondas en la población F2 (20 ox 1, 20 ox 2, 2 ox, *phyA*, *phyB2*, *Phor1* y $\Delta I3$, así como para los 10 RFLPs de patata y tomate), ya que presentan poco o ningún polimorfismo en las zonas de los genes que hemos secuenciado en ambos parentales.

Cuando dispongamos de datos para el resto de las sondas procederemos a compararlas con los datos de precocidad para definir si disponemos de algún gen candidato para el carácter que pueda ser usado como marcador para selección de dicho carácter, principal objetivo de este trabajo.

Creemos que al tratarse de un proyecto financiado para dos años nos ha faltado tiempo para acabar todos los objetivos previstos y las nuevas aproximaciones que hemos tenido que abordar, por lo que los resultados obtenidos son todavía parciales.

B. RESULTADOS MÁS RELEVANTES ALCANZADOS EN EL PROYECTO

1. Hemos demostrado que la hipótesis inicial del proyecto, es decir, que el gen de fitocromo B (*phyB*) de patata era responsable de la precocidad en tuberización es falso, ya que dicho gen mapea en una zona distinta a la posición del gen *El* (earliness).
2. Hemos analizado 15 variedades de patata de precocidad tardía y temprana con RFLPs de un grupo de genes candidatos (12) involucrados en la tuberización de la especie y con un grupo de sondas RFLP de patata y tomate (10) ligados a QTLs de precocidad en otra población estudiada por otros autores.
3. Hemos determinado que las variedades temprana y tardía más polimórficas con dichas sondas son Minerva y Tacna, que han sido los parentales utilizados para obtener una población F₂ de 150 individuos.
4. Hemos mapeado mediante RFLPs los genes *GAI*, 3 ox 1, 3 ox 2 y 20 ox 3, y mediante marcador de PCR los genes 3 ox 1 y *phyBI*, en toda la población F₂ o gran parte de la misma.
5. Los genes descritos en el apartado anterior no presentan correlación alguna con el carácter de precocidad en tuberización en el cruzamiento Minerva x Tacna.
6. Estamos a la espera de mapear en la población el resto de sondas descritas en la memoria para correlacionar su segregación con la precocidad.
7. No disponemos todavía de un marcador molecular para dicho carácter en la población Minerva x Tacna, aunque no descartamos que alguno de los genes candidatos ya probados pueda tener alguna relación con la precocidad en otro fondo genético distinto.

C. RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL PROYECTO

1. Formación del personal	Nº		
Personal Formado	(1)		
Personal formado o en formación que se ha transferido al sector industrial:			
Doctores ()	Titulados Superiores ()	Técnicos ()	()
2. Tesis doctorales	()		
3. Artículos científicos en revistas	()	nacionales ()	internacionales ()
4. Artículos de divulgación en revistas	()	nacionales ()	internacionales ()
5. Artículos de revisión en revistas	()	nacionales ()	internacionales ()
6. Libros, capítulos de libros y monografías	()	nacionales ()	internacionales ()
7. Conferencias en congresos (por invitación)	()	nacionales ()	internacionales ()
8. Patentes y otros títulos de propiedad industrial	()	registrados ()	en explotación ()
	()	España ()	extranjero ()

1. FORMACIÓN DE PERSONAL EN RELACIÓN AL PROYECTO, describir brevemente.

El trabajo ha sido realizado por un investigador postdoctoral que se ha encargado del trabajo en ambos laboratorios que intervienen en el proyecto.

2. TESIS DOCTORALES REALIZADAS TOTAL O PARCIALMENTE EN EL PROYECTO.

Indicar: Título, nombre del doctorado, Universidad, Facultad o Escuela, fecha de comienzo, fecha de lectura, calificación y director.

No procede

3. ARTICULOS CIENTÍFICOS EN REVISTAS.

Indicar: Autor(es), título, referencia de la publicación.

4. ARTÍCULOS DE DIVULGACIÓN EN REVISTAS.

Indicar: Autor(es), título, referencia de la publicación.

5. ARTÍCULOS DE REVISIÓN.

Indicar: Autor(es), título, referencia de la publicación.

6. LIBROS, CAPÍTULOS DE LIBROS Y MONOGRAFÍAS.

Indicar: Autor(es), título, referencia de la publicación

7. CONFERENCIAS EN CONGRESOS, SIMPOSIOS Y REUNIONES (POR INVITACIÓN)

Indicar: Autor(es), nombre del congreso, lugar de celebración, año.

8. PATENTES Y OTROS TÍTULOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL.

Indicar: Autor(es), título, registro, entidad titular de la patente, año, países, clase.

D. CARÁCTER DE LOS RESULTADOS DEL PROYECTO (señalar hasta dos opciones)

Teóricos

Teórico-prácticos

Prácticos

De inmediata aplicación industrial

E. COLABORACIONES Y PARTICIPACIÓN EN PROGRAMAS INTERNACIONALES.

1. Si el proyecto ha dado lugar a colaboraciones con otros grupos de investigación, coméntelas brevemente.

En caso contrario, indicar qué dificultades ha encontrado.

Hemos establecido una nueva colaboración con el grupo de la Dra. Salomé Prat del CSIC-CID de Barcelona, coordinadora del proyecto. Esto nos ha permitido converger en dos disciplinas como son la biología molecular de la tuberización de patata y el mapado de genes y análisis de caracteres cuantitativos. Además hemos establecido contactos con la empresa que participa en el proyecto, Appacale, única empresa en nuestro país que realiza mejora genética de patata.

2. Si ha participado en proyectos del Programa Marco de I+D de la UE y/o en otros programas internacionales en temáticas relacionadas con las de este proyecto, indique programa, tipo de participación y beneficios para el proyecto.

Mencione las solicitudes presentadas al Programa Marco de la UE durante la ejecución del proyecto, aunque no hayan sido aprobadas.

F. PROYECTOS COORDINADOS ¹

1. Describa el desarrollo de la coordinación entre Subproyectos, y los resultados de dicha coordinación en relación a los objetivos globales del Proyecto.

¹ A rellenar sólo por el coordinador del proyecto.

G. RELACIONES O COLABORACIONES CON DIVERSOS SECTORES

G1. Si en el proyecto ha habido colaboración con Entes Promotores Observadores (EPO) participantes:

1. Describa en detalle la relación mantenida con los EPO's, y la participación concreta de éstos en el proyecto, especificando, si procede, su aportación al mismo en todos sus aspectos. (Si se ha modificado la relación y/o el apoyo del EPO, en relación con lo previsto a la aprobación del proyecto, descríbalo brevemente).

La empresa participante Appacale ha proporcionado el material usado en este proyecto, variedades y descendencias, ha evaluado dichas descendencias para caracteres cuantitativos relacionados con la época de tuberización y ha intervenido en las decisiones que se han tomado referentes a los cambios de orientación del proyecto una vez se ha demostrado que el gen *PhyB* no era el determinante de la época de tuberización.

2. Describa, si procede, las transferencias realizadas al (los) EPO (s) de los resultados obtenidos, indicando el carácter de la transferencia y el alcance de su aplicación.

La empresa ha sido informada de los resultados obtenidos, aunque ninguno de ellos ha sido de aplicación inmediata

3. Indique si esta colaboración ha dado lugar a la presentación de nuevos proyectos o si se tiene intención de continuarla en el futuro. En caso afirmativo, describa brevemente cómo va a concretarse.

No está previsto continuar esta actividad en un futuro próximo

G2. Si el proyecto ha dado lugar a otras colaboraciones con el entorno socioeconómico (industrial, administrativo, de servicios, etc.), no previstas inicialmente en el proyecto, descríbalas brevemente.

H. RESUMEN DE GASTO DEL PROYECTO

Miles de pta.

1. Gastos de personal (indicar datos personales, situación laboral y función desempeñada)

Total

2. Material inventariable (describir brevemente el material adquirido)

Total

3. Material fungible (describir brevemente el tipo de material)

Total

4. Viajes y dietas (describir brevemente)

Total

5. Otros gastos (describir brevemente)

Total

6. Costes indirectos.

Total

7. En caso de que exista algún remanente de consideración en alguno de los capítulos, indique su cuantía y las previsiones de gasto.

TOTAL GASTOS DEL PROYECTO :

CONFORME con el resumen de gastos realizados en el Proyecto, el Responsable de los Servicios de Gestión del Organismo o Centro beneficiario.

D./D^a. :

Fecha :

Cargo :

Firma y Sello :